

文章编号 1006-8147(2019)03-0292-04

论 著

HPLC-MS/MS 法测定大鼠血浆中紫杉醇含量及其脂质体药代动力学研究

宋 妍

(天津医科大学第二医院药学部, 天津 300211)

摘要 目的: 建立一种测定大鼠血浆中紫杉醇浓度的高效液相色谱串联质谱(HPLC-MS/MS)分析方法, 并研究其脂质体的药代动力学。方法: 对6只SD大鼠静脉注射1 mg/kg的紫杉醇脂质体注射液, 分别于给药后0、0.5、1、2、4、8、12、24、48 h自眼眶取血0.2 mL, C₁₈反相色谱柱作为固定相, 水(1 mmol/L 甲酸铵-0.05%甲酸)-甲醇作为流动相, ESI⁺扫描模式, MRM监测模式, 药代动力学参数采用DAS 2.0软件进行计算。结果: 紫杉醇在1~5 000 ng/mL范围内线性较好($R^2=0.9997$), 定量下限(LLOQ)为1 ng/mL, 日内和日间精密度均低于10%, 紫杉醇脂质体给药后血药浓度-时间曲线满足二室模型, 主要药代动力学参数 $t_{1/2}$ 、 C_{max} 、 AUC_{0-4} 分别为(4.79±0.85)h、(49 785.12±1 618.45) μg/L、(38 753.08±6 144.66) μg/L·h。结论: 本方法专属性和灵敏度高, 结果可靠, 能满足测定大鼠血浆中紫杉醇的定量需求。

关键词 高效液相色谱串联质谱; 紫杉醇; 药代动力学参数; 血浆

中图分类号 R9

文献标志码 A

Quantitation of paclitaxel in rats plasma by HPLC-MS/MS and its application in pharmacokinetic study

SONG Yan

(Department of Pharmacy, The Second Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China)

Abstract Objective: To establish a method for the determination of paclitaxel in rat plasma by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) and to study the pharmacokinetics of paclitaxel liposomes. **Methods:** Six SD rats were intravenously injected with 1 mg/kg of paclitaxel liposome. The blood samples were taken from the orbit at 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24 and 48 h after administration. The C₁₈ column was used as stationary phase, water (1 mmol/L ammonium formate-0.05% formic acid) - methanol were chosen as mobile phase, ESI⁺ scanning mode, and MRM monitoring mode were chosen. The mechanical parameters were calculated by DAS 2.0 software. **Results:** The linearity of paclitaxel was good in the range of 1~5 000 ng/mL ($R^2=0.9997$), the lower limit of quantification (LLOQ) was 1 ng/mL, and the inter-day and intra-day precisions were both less than 10%. The AUC curve of paclitaxel liposomes after administration satisfied the two-compartment model. The main pharmacokinetic parameters $t_{1/2}$, C_{max} and AUC_{0-4} were (4.79±0.85) h, (49 785.12±1 618.45) μg/L, and (38 753.08±6 144.66) μg/L·h, respectively. **Conclusion:** The method is specific, sensitive and reliable, and may be useful in paclitaxel in rats plasma.

Key words HPLC-MS; paclitaxel; pharmacokinetics parameter; plasma

紫杉醇(Paclitaxel, PTX)为一种双萜紫杉烷类抗癌药物, 在临床上有着极为广泛的应用, 其适应证包括乳腺癌、非小细胞肺癌及卵巢癌等^[1-3]。目前, 国内外对紫杉醇浓度或药代动力学的研究多采用HPLC-UV、HPLC-MS方法^[4-12], 但紫外检测器受制于灵敏度较低等因素, 对于生物制品中痕量紫杉醇的测定并不适用, MS方法具有较高的灵敏度, 在紫杉醇含量测定及药代动力学研究中发挥着越来越大的作用^[13-15]。本文针对现有紫杉醇高效液相色谱串联质谱测定方法较少, 且内标法的应用更为少见的现状, 建立了一种测定血浆中紫杉醇含量的HPLC-MS/MS内标方法, 并采用该方法对市售紫杉

醇脂质体在大鼠体内药代动力学进行研究, 拟为紫杉醇及其他剂型的临床研究提供参考。

1 对象与方法

1.1 仪器与试剂 岛津LC-20ADXR型高效液相色谱仪(日本岛津公司, 带自动进样器), AB Sciex API 5500三重四级杆串联质谱(美国AB Sciex公司); Analyst工作站(美国AB Sciex公司); SCDEALL VX-III多管振荡器(北京安简科技有限公司); H2-16KR型高速冷冻离心机(湖南可成仪器设备有限公司); 十万分之一电子天平(瑞士Sartorius公司)。

注射用紫杉醇脂质体(批号: 161205, 南京绿叶思科药业有限公司); 紫杉醇标准品(批号: 012765, 中国药品生物制品检定研究院); 内标, 盐酸普萘洛

作者简介 宋妍(1986-), 女, 药师, 硕士, 研究方向: 药代动力学; E-mail: mackerel_272@163.com。

尔(批号:100783-201202,中国食品药品检定研究院);甲醇、乙腈、甲酸、叔丁基甲醚为色谱纯,水为超纯水,其余为分析纯。

SD大鼠,雌雄各半,体质量180~220 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,SPF级,合格证号:SCXK(京)2012-0005。

1.2 仪器条件 色谱条件:Imatakt Unison UK-C₁₈(75 mm×3.0 mm id,3.0 μm);流动相:A相为水(含1 mmol/L 甲酸铵,0.05%甲酸),B相为甲醇,梯度洗脱,柱温25℃,流速0.8 mL/min,进样量4 μL。质谱条件:离子源:ESI⁺;离子源温度:500℃;检测模式:多重反应模式(MRM);紫杉醇:m/z 854.2→286.2, DP:100,CE:23;普萘洛尔:m/z 260.2→116.2, DP:60,CE:25;辅助气、雾化气、碰撞气:N₂;采集时间4 min。根据各组分保留时间和一级、二级质谱参数,应用MRM模式对各组分进行定量分析。

1.3 样品前处理 精密量取50 μL待分析的大鼠血浆,转移至2 mL离心管中,加入50 μL 50%乙腈水,充分涡旋混合30 s,样品加入100 μL内标工作溶液(IS:配制在50%乙腈水中,浓度为5 ng/mL的普萘洛尔),充分混合均匀,加入1 mL的叔丁基甲醚,涡旋振荡120 s,充分混合均匀,室温下于10 000 r/min转速下离心1 min,取上清液900 μL,50℃氮气吹干,加入1 mL的流动相,涡旋振荡60 s,充分混合均匀,过0.22 μm滤膜,上机检测。

1.4 标准溶液和内标溶液的制备 精密称取10 mg紫杉醇标准品到10 mL容量瓶内,用乙腈溶解稀释并定容至刻度,得到浓度为1 000 μg/mL储备液,用50%乙腈水将上述储备液稀释到浓度分别为1、5、10、50、100、500、1 000和5 000 ng/mL的标准工作溶液。精密称取10.19 mg盐酸普萘洛尔,用甲醇溶解稀释并定容至10 mL,得到893 μg/mL的内标储备液。吸取上述储备液0.224 mL,用甲醇定容至10 mL,得到20 μg/mL的内标二级储备液。吸取上述二级储备液0.2 mL,用50%乙腈水定容至10 mL,得到0.4 μg/mL的内标三级储备液。吸取上述储备液1.25 mL,用50%乙腈水定容至100 mL,得到0.005 μg/mL的内标工作液。

1.5 方法学考察 本研究根据美国食品药品监督管理局(FDA)关于生物分析方法验证的指南,进行方法验证,以证明生物分析方法对于预期应用的可靠性^[16]。

1.5.1 特异性和选择性 方法的特异性和选择性通过比较大鼠空白血浆样品的色谱峰与加入高、中、低浓度标准品的空白大鼠血浆的色谱峰(包括静注紫杉醇后的大鼠血浆样品)来评估。明确血浆中是否存

在内源性物质或紫杉醇代谢物对待测物的干扰。

1.5.2 线性和灵敏度 精密量取混合物储备液,稀释成1~5 000 ng/mL浓度范围的紫杉醇混合标准溶液。按照“1.3 样品前处理”项下进行前处理操作,后上机测定。通过绘制分析物与IS的峰面积比与浓度的关系来绘制校准曲线,采用加权线性最小二乘线性回归拟合,加权因子为1/y,其中y是紫杉醇与IS峰面积比,标准曲线相关系数(R²)均满足>0.99。灵敏度主要通过计算方法的LLOQ,主要基于以下两个标准确定:(1)LLOQ的分析物响应至少是空白响应的5倍;(2)待测物峰可识别、离散的、可重复的、相对标准偏差(RSD)在20%以内。

1.5.3 精密度、准确度和基质效应 日内精密度和准确度通过在单日内分别测定高浓度(400 ng/mL)、中浓度(20 ng/mL)、低浓度(2 ng/mL)浓度的QC样品(重复6次)来确定,日间精密度和准确度通过测定3 d内3个浓度QC样品含量(重复6次),精密度采用相对标准偏差(RSD)表示。

基质效应=紫杉醇在血浆中标准曲线斜率/在纯溶剂中标准曲线斜率。

1.5.4 回收率 回收率的测定分别选取了高浓度(400 ng/mL)、中浓度(20 ng/mL)、低浓度(2 ng/mL)浓度3个浓度,通过比较提取的样品的峰面积响应与提取的空白血浆后以相同浓度添加的样品的峰面积响应来评估。每个加标水平取6个平行样品。按1.2项下“仪器条件”进行含量测定。

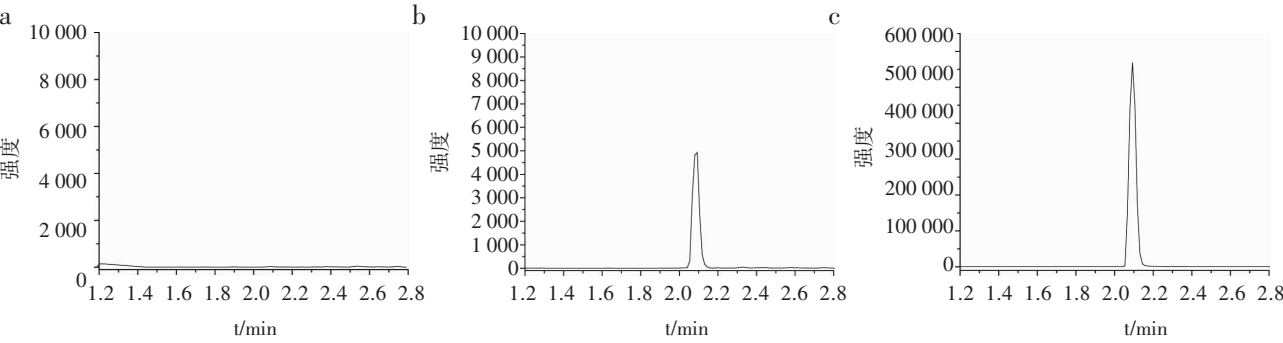
1.5.5 稳定性 分别考察稳定性(室温放置稳定性、冻融稳定性、进样稳定性、长期稳定性),室温放置稳定性指QC样品在室温(25℃)下保持6 h的稳定性;冻融稳定性指-80℃冷冻-融化循环3次后的稳定性;进样稳定性指室温下在自动进样器中保持12 h后的稳定性;长期稳定性为QC样品在-80℃下储存30 d的稳定性。如果测定结果与标示值的偏差≤±15%,则样品被认为是稳定的。

1.6 药代动力学研究 SD大鼠适应性喂养后,择期按12 mL/kg剂量尾静脉注射紫杉醇脂质体。给药后0、0.5、1、2、4、8、12、24、48 h经大鼠眼眶静脉采血0.2 mL置于肝素抗凝的离心管中,按照“1.3 样品前处理”项下进行前处理操作,后上机测定。

1.7 统计学分析 采用DAS2.0软件分析药代动力学参数。

2 结果

2.1 专属性 本实验建立分析方法专属性较高,待测物不受血清内源性物质干扰。血清样品提取离子色谱图见图1。



a.空白血浆;b.对照血浆样品(30 ng/mL 加标);c.大鼠给药后 0 h 的血浆样品

图 1 血浆样品色谱图

Fig 1 The chromatograms of plasma sample

2.2 线性和灵敏度 紫杉醇的标准曲线、定量下限见表 1。

表 1 标准曲线、最低定量限和最低检测限

Tab 1 The standard curve, the limit of quantification and the limit of detection

待测物	范围/($\mu\text{g/L}$)	线性方程	R^2	LLOQ/($\mu\text{g/L}$)
紫杉醇	1~5 000	$y=0.002\ 62x+0.002\ 54$	0.999 7	1

2.3 日内、日间精密度和准确度 日内、日间精密

表 2 血浆中日内、日间精密度和准确度

Tab 2 The inter-day and intra-day precisions of plasma

浓度/(ng/mL)	日内($n=6$)			日间($n=6$)		
	测定浓度/(ng/mL)	精密度,RSD/%	准确度/%	测定浓度/(ng/mL)	精密度,RSD/%	准确度/%
400	398.76 ± 20.72	4.38	99.69	402.24 ± 23.25	5.92	100.56
20	20.98 ± 1.41	5.03	104.90	18.76 ± 2.03	7.12	93.80
2	2.04 ± 0.19	5.56	102.00	1.97 ± 0.16	8.44	98.50

表 3 紫杉醇回收率

Tab 3 The results of recovery test for paclitaxel

待测物	加标浓度/(ng/mL)	提取效率/%	
		$\bar{x}\pm s$	RSD
紫杉醇	400	91.07 ± 2.99	3.02
	20	96.85 ± 1.85	1.91
	2	89.45 ± 3.01	3.54

2.5 基质效应 该法基质效应不明显,见表4。

表 4 两条标曲斜率比

Tab 4 Standard curve slope

待测物	标准曲线	R^2	R_{slope}		
			Min	Max	ΔR
紫杉醇	$y=0.002\ 62x+0.002\ 54$	0.999 7	0.805	0.918	0.106

R_{slope} =基质匹配法标曲斜率/纯溶剂中标曲斜率

2.6 稳定性试验 结果表明:血浆样品在 4℃保存

度和准确度测定结果见表 2。高浓度(400 ng/mL),中浓度(20 ng/mL)和低浓度(2 ng/mL)的 QC 样品 RSD 范围为 4.38%~5.56%(日内)和 5.92%~8.44%(日间),范围在 15%的接受限度内,结果表明该测定法具有良好的准确度和精密度。

2.4 回收率 检测结果见表 3,平均回收率均>85%,相对标准偏差为<5%,说明该方法回收率较好,适用于待测物的测定。

24 h,室温放置 24 h,冻融 3 次以及-80℃保存 30 d 均稳定性良好,见表 5。

表 5 血浆中紫杉醇稳定性研究

Tab 5 The stability of paclitaxel in plasma

储存条件	浓度/(ng/L)	$\bar{x}\pm s$	RSD/%
自动进样器(4℃)中放置 24 h	2	2.08 ± 0.21	7.51
	20	21.12 ± 1.72	5.49
	400	405.17 ± 5.12	3.11
	2	2.20 ± 0.29	7.69
室温(25℃)下放置 24 h	20	21.54 ± 2.44	5.61
	400	408.33 ± 5.55	2.16
	2	2.31 ± 0.27	8.29
	20	21.66 ± 1.46	6.16
-80℃下放置 30 d	400	408.24 ± 7.87	1.58
	2	2.21 ± 0.22	8.11
	20	22.15 ± 1.78	6.54
	400	407.17 ± 6.01	2.02

2.7 药动学研究 样品按上述方法测得的平均血药浓度-时间曲线如图2所示,采用DAS2.0软件计算紫杉醇脂质体的药代动力学参数见表6。

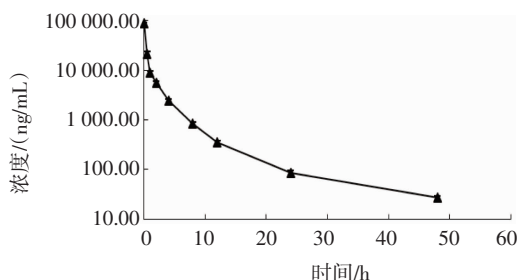


图2 紫杉醇血药浓度-时间曲线($n=6$)

Fig 2 The concentration - time curves of paclitaxel($n=6$)

表6 紫杉醇脂质体的药代动力学参数($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 6 The pharmacokinetic parameters of paclitaxel liposome ($\bar{x} \pm s, n=6$)

药动学参数	单位	对照组
AUC(0- ∞)	$\mu\text{g/L} \cdot \text{h}$	38 753.08 \pm 6 144.66
MRT(0- ∞)	H	2.54 \pm 0.61
$t_{1/2}$	H	4.79 \pm 0.85
V_z	L/kg	2.142 \pm 1.01
CL _z	L/(h \cdot kg)	0.31 \pm 0.12
C_{max}	Mg/L	49 785.12 \pm 1 618.45

3 讨论

本实验建立的 HPLC-MS/MS 法,具有很高的专属性,每一样品分析时间不足 5 min,操作简便、灵敏度高、重现性好、结果准确,仪器 LLOQ 可以低至 1 ng/mL,适用于体内成分中紫杉醇含量测定。本实验对流动相中醋酸和醋酸铵对紫杉醇色谱行为的影响进行了优化,发现单用醋酸铵,紫杉醇响应降低,而单用醋酸,随上样液 pH 不同色谱峰保留会出现偏移,因此选用(0.05%甲酸-1 mmol/L 甲酸铵)水-甲醇作为流动相,该色谱条件下紫杉醇和内标峰形好、灵敏度高。本实验还考察了乙醚、乙酸乙酯、叔丁基甲醚作为提取溶剂,发现乙醚提取回收率较差,乙酸乙酯提取后血浆样品基质效应较高,采用叔丁基甲醚提取后样品杂质干扰小,提取效率最理想。故采用叔丁基甲醚为提取溶剂。本研究根据 FDA 关于生物分析方法验证指南进行方法验证。简便、快速、省时、灵敏,对紫杉醇分析有较大的应用前景。

参考文献:

[1] Rajappa S, Joshi A, Doval D C, et al. Novel formulations of docetaxel, paclitaxel and doxorubicin in the management of metastatic breast cancer[J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(3): 3757

[2] Zhan X K, Li J L, Zhang S, et al. Betulinic acid exerts potent antitumor effects on paclitaxel-resistant human lung carcinoma cells (H460) via G2/M phase cell cycle arrest and induction of mitochondrial apoptosis[J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(3): 3628

[3] Ganipineni L P, Ucakar B, Joudiou N, et al. Magnetic targeting of paclitaxel-loaded poly (lactic-co-glycolic acid)-based nanoparticles for the treatment of glioblastoma[J]. *Int J Nanomedicine*, 2018, 13(1): 4509

[4] Choudhury H, Gorain B, Karmakar S, et al. Development and validation of RP-HPLC method: scope of application in the determination of oil solubility of paclitaxel[J]. *J Chromatogr Sci*, 2014, 52(1): 68

[5] Mo J, Eggers P K, Raston C L, et al. Development and validation of a LC/TOF MS method for the determination of carboplatin and paclitaxel in nanovesicles[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2014, 406(11): 2659

[6] Liu Y, Sun J, Lian H, et al. Determination of paclitaxel in hyaluronic acid polymeric micelles in rat blood by protein precipitation-micelle breaking method: application to a pharmacokinetic study[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2013, 935(18):10

[7] Chen W, Shen Y, Rong H, et al. Development and application of a validated gradient elution HPLC method for simultaneous determination of 5-fluorouracil and paclitaxel in dissolution samples of 5-fluorouracil/paclitaxel-co-eluting stents[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2012, 59(2):179

[8] Fernández-Peralbo M A, Priego-Capote F, Luque De Castro M D, et al. LC-MS/MS quantitative analysis of paclitaxel and its major metabolites in serum, plasma and tissue from women with ovarian cancer after intraperitoneal chemotherapy[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 91(5):131

[9] Hendriks J J, Rosing H, Schinkel A H, et al. Combined quantification of paclitaxel, docetaxel and ritonavir in human feces and urine using LC-MS/MS[J]. *Biomed Chromatogr*, 2014, 28(2): 302

[10] Cai Y, Zhang X. Pharmacokinetics of Carbon nanoparticle-paclitaxel suspension for use in intraperitoneal chemotherapy[J]. *Hepatogastroenterology*, 2013, 60(128): 1998

[11] Jain A, Gulbake A, Jain A, et al. Development and validation of the HPLC method for simultaneous estimation of Paclitaxel and topotecan[J]. *J Chromatogr Sci*, 2014, 52(7): 697

[12] Park J H, Park J H, Hur H J, et al. Effects of silymarin and formulation on the oral bioavailability of paclitaxel in rats[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2012, 45(3): 296

[13] Lee J H, Lee A, Oh J H, et al. Comparative pharmacokinetic study of paclitaxel and docetaxel in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *Biopharm Drug Dispos*, 2012,33(8): 474

[14] Wei Y, Xue Z, Ye Y, et al. Pharmacokinetic and tissue distribution of paclitaxel in rabbits assayed by LC-UV after intravenous administration of its novel liposomal formulation[J]. *Biomed Chromatogr*, 2014, 28(2): 204

[15] Zhang S Q, Song Y N, He X H, et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of paclitaxel in rat plasma after intravenous administration of poly (L-glutamic acid)-alanine-paclitaxel conjugate[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 51(5): 1169

[16] Rezazadeh M, Emami J, Mostafavi A, et al. A rapid and sensitive HPLC method for quantitation of paclitaxel in biological samples using Liquid-Liquid extraction and UV detection: application to pharmacokinetics and tissues distribution study of paclitaxel loaded targeted polymeric micelles in tumor bearing mice[J]. *J Pharm Pharm Sci*, 2015, 18(5): 647