

LC-MS法测定大鼠血浆中利可君的浓度及其药动学研究

赵国珍^{1*}, 张朝晖^{1#}, 谢少斐²(1. 江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013; 2. 南京长澳医药科技有限公司, 南京 210038)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)33-3104-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.33.12

摘要 目的: 建立测定大鼠血浆中利可君浓度的方法, 并研究其药动学。方法: 取大鼠尾静脉注射利可君 1 mg/kg 和灌胃利可君 10 mg/kg ($n=6$), 采用液质联用(LC-MS)法, 以替硝唑为内标, 检测给药前和给药后 10、20、30、40、60、90、120、180、240、360、1 440 min 的血药浓度, 并用 DAS 2.0 软件计算药动学参数。液相色谱条件: 色谱柱为 Agilent Zorbax Eclipse plus C₁₈, 流动相为乙腈-水-冰醋酸(20:80:0.3), 梯度洗脱; 质谱条件: 电喷雾离子源, 利可君和替硝唑的选择检测离子质荷比分别为 296.1[M+H]⁺、248.1[M+H]⁺。结果: 利可君检测质量浓度的线性范围为 0.048~30 μg/ml ($r=0.9993$), 定量限为 0.048 μg/ml; 尾静脉注射、灌胃后的药动学参数分别为 c_{\max} : (1.51 ± 0.66)、(17.78 ± 2.67) μg/ml, $t_{1/2}$: (1.23 ± 0.85)、(0.88 ± 0.23) h, AUC_{0-∞}: (1.29 ± 0.56)、(9.87 ± 0.47) μg·h/ml。结论: 本方法准确可靠、检测灵敏, 适用于利可君的血药浓度测定; 利可君在大鼠体内药动学符合一室模型。

关键词 液质联用法; 利可君; 血药浓度; 大鼠; 药动学

Determination of Leucogen Concentration in Rats Plasma by LC-MS and Its Pharmacokinetic Study

ZHAO Guo-zhen¹, ZHANG Chao-hui¹, XIE Shao-fei²(1. School of Pharmacy, Jiangsu University, Jiangsu Zhenjiang 212013, China; 2. Nanjing Chang'ao Pharmaceutical Co., Ltd., Nanjing 210038, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To develop a method for the determination of leucogen in rat plasma, and to study its pharmacokinetics. METHODS: Rats were given leucogen 1 mg/kg by tail intravenous administration and leucogen 10 mg/kg by intragastric administration ($n=6$). Using tinidazole as internal standard, LC-MS method was used to detect the plasma concentration of leucogen before and 10, 20, 30, 40, 60, 90, 120, 180, 240, 360, 1 440 min after medication; pharmacokinetic parameters were calculated with DAS 2.0 software. The determination was performed on a Agilent Zorbax Eclipse plus C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-water-acetic acid (20:80:0.3) for gradient elution. MS condition: ESI, 296.1 [M+H]⁺ for leucogen, 248.1[M+H]⁺ for tinidazole. RESULTS: The linear range of leucogen were 0.048-30 μg/ml ($r=0.9993$). The limit of quantification of leucogen was 0.048 μg/ml. Pharmacokinetic parameters of leucogen after tail intravenous administration vs. intragastric administration were as follows as c_{\max} : (1.51 ± 0.66) vs. (17.78 ± 2.67) μg/ml; $t_{1/2}$: (1.23 ± 0.85) vs. (0.88 ± 0.23) h; AUC_{0-∞}: (1.29 ± 0.56) vs. (9.87 ± 0.47) μg·h/ml. CONCLUSIONS: The method is accurate, reliable, sensitive for detection and suitable for plasma concentration monitoring of leucogen. Pharmacokinetics of leucogen is in line with one-compartment model.

KEY WORDS LC-MS; Leucogen; Plasma concentration; Rats; Pharmacokinetics

- leptin resistance by activation of cAMP-epac signaling[J]. *Cell Metab*, 2011, 13(3):331.
- [2] de Lartigue G, Barbier de la Serre C, Espero E, et al. Diet-induced obesity leads to the development of leptin resistance in vagal afferent neurons[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2011, 301(1):E187.
- [3] Leblanc ES, O'Connor E, Whitlock EP, et al. Effectiveness of primary care-relevant treatments for obesity in adults: a systematic evidence review for the U.S.[J]. *Ann Intern Med*, 2011, 155(7):434.
- [4] Bouza C, López-Cuadrado T, Gutierrez-Torres LF, et al. Efficacy and safety of metformin for treatment of overweight and obesity in adolescents: an updated systematic review and meta-analysis[J]. *Obes Facts*, 2012, 5(5):753.
- [5] Yan Li, Kang B, Li G, et al. Effects of metformin on serum levels of sex hormone, leptin and insulin in ovariectomized Sprague-Dawley rats[J]. *Pharmazie*, 2009, 64(12):834.
- [6] Tucholski K, Otto-Buczowska E. The role of leptin in the regulation of carbohydrate metabolism[J]. *Endokrynol Pol*, 2011, 62(3):258.
- [7] Yang G, Badeanlou L, Bielawski J, et al. Central role of ceramide biosynthesis in body weight regulation, energy metabolism, and the metabolic syndrome[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2009, 297(1):E211.
- [8] Jorgensen SB, O'Neill HM, Sylow L, et al. Deletion of skeletal muscle SOCS-3 prevents insulin resistance in obesity[J]. *Diabetes*, 2013, 62(1):56.
- [9] Gu H, Liu L, Ma S, et al. Inhibition of SOCS-3 in adipocytes of rats with diet-induced obesity increases leptin-mediated fatty acid oxidation[J]. *Endocrine*, 2009, 36(3):546.

* 硕士研究生。研究方向: 药物分析。E-mail: zhaoguozen516@163.com

通信作者: 教授, 硕士研究生导师。研究方向: 中药资源学与生药学。电话: 025-83581286。E-mail: zzh6495@sohu.com

(收稿日期: 2013-03-25 修回日期: 2013-05-27)

利可君,又名利血生,化学名为2-(α -苯基-2- α -乙氧羰基-甲基)噻唑烷-4-羧酸,其广泛用于肿瘤放射治疗和化学治疗引起的白细胞减少症^[1]。临床上利可君对血小板减少及再生障碍性贫血也具有一定疗效,无明显不良反应^[2-3]。随着利可君在临床上的应用越来越多,对其定性定量分析的研究越来越深入。但目前尚无利可君血药浓度测定方法方面的文献报道。本试验研究旨在建立一种专属、灵敏和快速的液质联用(LC-MS)法,用以测定大鼠血浆中利可君的血药浓度,为其非临床药动学研究提供检测方法。

1 材料

1.1 仪器

LCMS-2020 LC-MS 仪、CBM-20A 系统控制器、CTO-20A 柱温箱、Lab-Solutions 5.11.160 工作站(日本岛津公司);3-30K 高速离心机(西格玛离心机有限公司);Millipore Driect-Q5 超纯水机(法国 Millipore 公司);HH-4 数显恒温水浴锅(常州国华电器有限公司);XW-80A 旋涡混合器(上海青浦沪西仪器厂)。

1.2 药品与试剂

利可君原料药(南京长澳医药科技有限公司,批号:100221,纯度:99.9%);替硝唑标准品(内标,中国食品药品检定研究院,批号:100336-200703,纯度:99.8%);冰醋酸(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);乙腈(色谱纯,美国 Tedia 公司);高氯酸为优级纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

1.3 动物

清洁级 Sprague-Dawley 大鼠,♂ ♀ 各半,体质量(200 ± 20)g,由浙江省实验动物中心提供,合格证号:SCXK(浙)20080033。

2 方法与结果

2.1 溶液的配制

2.1.1 利可君标准溶液。精密称取利可君原料药 12.0 mg,置于 100 ml 量瓶中,用乙腈溶解定容,得标准贮备液。再将标准贮备液分别稀释制成 0.192、0.96、2.4、4.8、12、24、60、120 $\mu\text{g/ml}$ 的系列标准溶液, -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。

2.1.2 内标溶液。精密称取替硝唑标准品 14.25 mg,置于 10 ml 量瓶中,用乙腈溶解定容,得 1.425 mg/ml 的贮备液,继续以乙腈稀释得 1.425 $\mu\text{g/ml}$ 的内标溶液, -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。

2.2 样品处理^[4]

精密量取血浆样品 100 μl ,置 1.5 ml EP 管中,加入内标溶液 25 μl ,涡旋 30 s,再加入 4% 高氯酸 100 μl ,涡旋 3 min,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 20 000 r/min 离心 10 min 2 次,取上清液 10 μl 进样分析。

2.3 色谱条件

色谱柱:Agilent Zorbax Eclipse plus C₁₈(150 mm×3.9 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水-冰醋酸(20:80:0.3);流速:0~4 min 为 0.3 ml/min,4~5 min 由 0.3 ml/min 线性升至 0.6 ml/min,维持 0.6 ml/min 至 14.5 min,14.5~15 min 由 0.6 ml/min 线性下降至 0.3 ml/min;柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;进样量:10 μl 。

2.4 质谱条件

电喷雾离子源(ESI);选择性离子检测(SIM);离子极性:正离子;检测离子:利可君为[M+H]⁺,质荷比(m/z)=296.10,内

标为[M+H]⁺, m/z =248.10。工作参数,干燥气流量:15 L/min;干燥气温度:250 $^{\circ}\text{C}$;雾化气温度:200 $^{\circ}\text{C}$ 。正离子扫描质谱图见图 1。

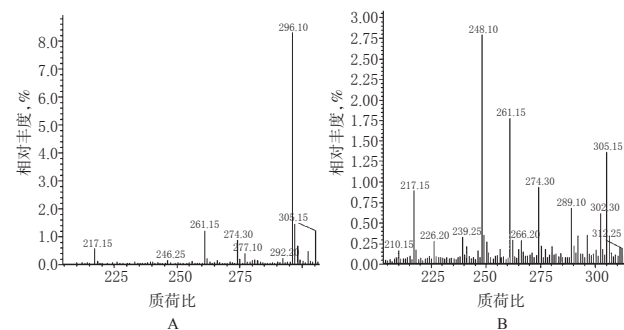


图 1 正离子扫描质谱图

A. 利可君; B. 替硝唑

Fig 1 Positive ion mass spectra

A. leucogen; B. tinidazole

2.5 专属性考察

取大鼠空白血浆、空白血浆+利可君标准溶液、给药后 30 min 收集的血浆样品,除空白血浆不加内标溶液外,其余均按“2.2”项下方法操作,进样测定,记录色谱。结果表明,利可君的保留时间约为 8.62、9.36、10.64、11.64 min,内标的保留时间约为 3.01 min,空白血浆中的内源性物质不干扰测定,色谱图见图 2。

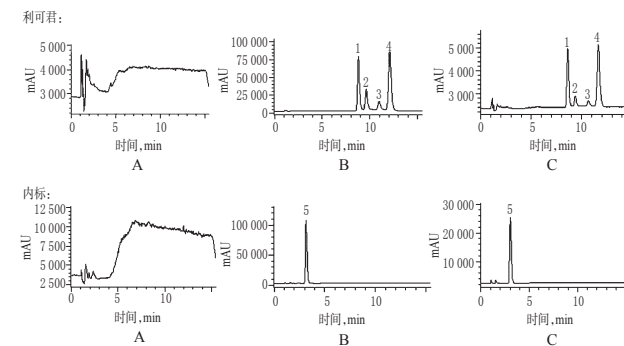


图 2 液质联用色谱图

A. 空白血浆; B. 空白血浆+利可君+内标; C. 血浆样品+内标; 1~4. 利可君; 5. 内标

Fig 2 LC-MS chromatogram

A. blank plasma; B. blank plasma sample spiked with leucogen and internal standard; C. plasma spiked with internal standard; 1-4. leucogen; 5. internal standard

2.6 线性关系与定量限考察

精密量取利可君标准溶液适量,置于 1.5 ml EP 管中,氮气吹干,加入大鼠空白血浆 100 μl ,涡旋 30 s,制备成利可君质量浓度分别为 0.048、0.24、0.6、1.2、3、6、15、30 $\mu\text{g/ml}$ 的血浆样品,按“2.2”项下方法操作,进样分析,同时随行空白 1 份。以血浆中利可君质量浓度(c)为横坐标、利可君峰面积(4 个峰面积之和)与内标峰面积之比(y)为纵坐标,进行线性回归,得回归方程为 $y=0.00117c-0.01500$ ($r=0.9993$)。结果表明,利可君检测质量浓度的线性范围为 0.048~30 $\mu\text{g/ml}$,定量限为 0.048 $\mu\text{g/ml}$ 。

2.7 精密度考察

精密量取利可君标准溶液适量,置于1.5 ml EP管中,氮气吹干,加入大鼠空白血浆100 μ l,涡旋30 s,制成质量浓度分别为0.24、3、30 μ g/ml(低、中、高质量浓度)的血浆样品,按“2.2”项下方法操作,进样测定。记录利可君峰面积与内标峰面积之比,代入标准曲线计算药物浓度。同日测定5次考察日内RSD;每日测定1次,连续测定5 d考察日间RSD。结果,低、中、高质量浓度血浆样品的日内RSD分别为3.98%、2.37%、2.52% ($n=5$),日间RSD分别为6.46%、4.63%、4.67% ($n=5$)。

2.8 提取回收率考察

按“2.7”项下方法制备利可君质量浓度为0.24、3、30 μ g/ml的血浆样品,按“2.2”项下方法操作,进样分析,记录利可君峰面积与内标峰面积的比值(R_1)。另取1.5 ml EP管,精密加入利可君标准溶液适量,氮气吹干,加入200 μ l流动相,涡旋30 s,制成利可君质量浓度分别为0.24、3、30 μ g/ml(低、中、高质量浓度)的样品,加内标溶液25 μ l,涡旋30 s,取10 μ l进样分析,记录利可君峰面积与内标峰面积的比值(R_2)。计算提取回收率= $R_1/R_2 \times 100\%$ 。结果,低、中、高质量浓度血浆样品的提取回收率分别为94.54%、94.97%、94.88%,RSD分别为2.22%、2.68%、3.92% ($n=3$)。

2.9 稳定性考察

精密量取利可君标准溶液适量,氮气吹干,加大鼠空白血浆100 μ l,涡旋30 s,制成利可君质量浓度分别为0.24、3、30 μ g/ml(低、中、高质量浓度)的血浆样品。按“2.2”项下方法处理后,分别立即测定,4 $^{\circ}$ C进样器中放置24、36 h后测定,3次反复冻融和室温放置6、12 h后测定,-20 $^{\circ}$ C冰冻60 d后测定,考察稳定性。结果,低、中、高质量浓度血浆样品的RSD分别为3.51%、4.70%、5.05% ($n=6$),表明利可君在上述条件下均稳定。

2.10 基质效应考察

取大鼠空白血浆100 μ l,除不加内标外,其余按“2.2”项下方法操作,得空白血浆经4%高氯酸沉淀后的基质溶液。精密量取不同浓度的利可君标准溶液,分别加入内标溶液25 μ l,氮气吹干,再加入225 μ l基质溶液,涡旋30 s,相当于利可君质量浓度分别为0.24、3、30 μ g/ml,每个浓度3份,取10 μ l进样分析,记录利可君和内标的峰面积之比(A_1)。另流动相取代基质溶液,同法测得利可君和内标的峰面积之比(A_2)。结果 $A_1/A_2 \times 100\%$ 均为95%~115%,表明不存在明显的基质效应。

2.11 药动学研究

取大鼠12只,按体质量随机分为灌胃(10 mg/kg)组和尾静脉注射(1 mg/kg)组,每组6只, δ η 各半,给药剂量按临床常用剂量换算。给药前禁食24 h,不禁水,分别给予相应剂量的利可君。于给药前及给药后10、20、30、40、60、90、120、180、240、360、1 440 min眼眶后静脉丛取血0.3 ml,置肝素化的EP管中,3 500 r/min离心10 min,分离血浆。按“2.2”项下方法操作,进样测定各血浆样品中利可君浓度,绘制药-时曲线。药-时数据经模型拟合,按赤池信息量准则(AIC),确定利可君在大鼠体内符合一室模型特征。应用DAS 2.0软件进行处理,计算药动学参数。利可君在大鼠体内的药-时曲线见图3,药动学参数见表1。

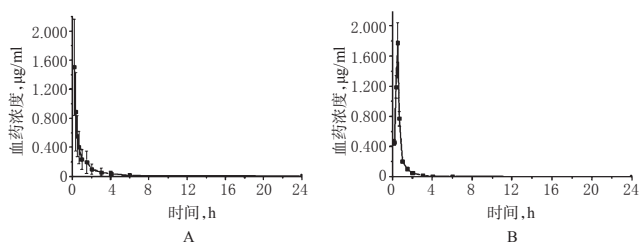


图3 利可君在大鼠体内的药-时曲线

A.尾静脉注射组;B.灌胃组

Fig 3 Mean plasma concentration-time curve of leucogen in rats

A.tail intravenous group;B.gavage group

3 讨论

表1 利可君在大鼠体内的药动学参数($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 1 Main pharmacokinetics parameters of leucogen in rats($\bar{x} \pm s, n=6$)

参数	尾静脉注射组	灌胃组
$c_{max}, \mu\text{g/ml}$	1.51 ± 0.66	17.78 ± 2.67
t_{max}, h	0.17 ± 0.00	0.50 ± 0.00
$t_{1/2}, \text{h}$	1.23 ± 0.85	0.88 ± 0.23
$AUC_{0-1440 \text{ min}}, \mu\text{g} \cdot \text{h/ml}$	1.20 ± 0.55	9.82 ± 0.47
$AUC_{0-\infty}, \mu\text{g} \cdot \text{h/ml}$	1.29 ± 0.56	9.87 ± 0.47
$MRT_{0-1440 \text{ min}}, \text{h}$	0.746 ± 0.44	0.772 ± 0.04
$MRT_{0-\infty}, \text{h}$	1.256 ± 0.836	0.839 ± 0.055
$CL_z/F, L/(kg \cdot h)$	0.79 ± 0.49	1.02 ± 0.05
$1/2/F, L/kg$	3.62 ± 5.33	1.29 ± 0.35
F		81.94%

LC-MS色谱图上利可君有4个峰,这是由于利可君结构中含有2个手性碳,在溶液状态下存在4个非对映异构体,并且它们在溶液中可以相互转化。此外4个非对映异构体面积之和在6 h内稳定^[6](血药浓度按内标法以4个非对映异构体峰面积之和计算)。

本实验参照生物利用度及生物等效性指导原则及相关实验方法建立的LC-MS方法,可以准确测定血浆中利可君的浓度。样品检测级可达到纳克级。实验结果表明,本方法操作简便、准确可靠(血浆内源性杂质不干扰、无明显基质效应)等优点,适用于利可君的血药浓度测定。

参考文献

- [1] 奚若明,张明国.中国化工医药产品大全:第一卷[M].北京:科学出版社,1991:921.
- [2] 张宏业.一种利可君的质量检测方法:中国,1948963A[P].2007-04-18.
- [3] 焦更生.利血生的化学性质及其作用原理的研究[J].渭南师范学院学报,2001,16(2):29.
- [4] 曾晓会,陈玉兴,赵自明,等.姜黄素微囊在大鼠体内的药代动力学研究[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(2):107.
- [5] 郑修文,钱文,杭太俊,等.溶液状态下利可君及其有关物质的结构研究[J].药学报,2006,41(7):675.

(收稿日期:2012-12-05 修回日期:2013-02-19)