

大鼠体内米托蒽醌的血药浓度测定及药动学研究^Δ

荀桂洲^{1*}, 傅慧敏², 胡敏¹, 张全¹, 叶静¹, 张绍兰³ (1. 成都医学院药学院, 成都 610500; 2. 成都市妇女儿童中心医院药学部, 成都 610091; 3. 成都医学院基础医学院, 成都 610500)

中图分类号 R969.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)07-0882-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.07.05

摘要 目的: 建立测定大鼠体内米托蒽醌血药浓度的方法, 研究米托蒽醌在大鼠体内的药动学。方法: 取SD大鼠6只, 尾静脉注射米托蒽醌5 mg/kg, 分别于给药前和给药后5、10、20、40、60、120、240、480、720 min取尾静脉血0.3 mL, 置于肝素化EP管中, 离心分离血浆, 加入硅胶充分研磨混匀后, 再加入含0.5 mol/L盐酸的甲醇溶液沉淀蛋白, 研磨混匀, 离心取上清液, 氮气吹干后加流动相复溶。采用高效液相色谱法测定米托蒽醌的血药浓度, 色谱柱为ZORBAX SB-C₁₈, 流动相为20 mmol/L乙酸铵水溶液(用稀盐酸调pH至2.0)-甲醇(65:35, V/V), 流速为1.0 mL/min, 检测波长为244 nm, 柱温为30 ℃, 进样量为20 μL, 应用DAS 3.0软件计算药动学参数。结果: 米托蒽醌检测质量浓度的线性范围为200~10 000 μg/L ($r=0.999 6, n=6$), 定量下限为200 μg/L, 检测限为150 μg/L; 日内、日间精密度和稳定性试验的RSD均<8.0% (n 分别为5、3、6); 提取回收率为(85.64±3.93)%~(92.31±1.68)% ($n=3$); 准确度试验中的回收率为(93.58±1.42)%~(113.92±2.74)% ($n=6$)。米托蒽醌在大鼠体内的药动学参数AUC_{0-720 min}为(5 247.1±474.6) μg·h/L, $t_{1/2}$ 为(24.88±6.94) h, CL_L为(0.46±0.09) L/(h·kg), V_z 为(11.07±2.64) L/kg。结论: 该方法提取回收率高、重复性好, 适用于米托蒽醌血药浓度的测定和药动学研究。

关键词 米托蒽醌; 血药浓度测定; 药动学; 大鼠

Blood Concentration Determination and Pharmacokinetic Study of Mitoxantrone in Rats

XUN Guizhou¹, FU Huimin², HU Min¹, ZHANG Quan¹, YE Jing¹, ZHANG Shaolan³ (1. School of Pharmacy, Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China; 2. Dept. of Pharmacy, Chengdu Women's & Children's Central Hospital, Chengdu 610091, China; 3. School of Basic Medicine, Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for blood concentration determination of mitoxantrone in rats, and to study the pharmacokinetics of mitoxantrone in rats. METHODS: Totally 6 SD rats were collected and given mitoxantrone 5 mg/kg via tail vein. The blood samples 0.3 mL were collected before medication and 5, 10, 20, 40, 60, 120, 240, 480, 720 min after medication. Blood samples were placed in heparinized EP tube, and the plasma was centrifuged and separated. After adding silica gel, the plasma were ground and mixed well, then added into methanol solution containing 0.5 mol/L hydrochloric acid to precipitate protein. After grinding and mixing, the supernatant was centrifuged and dried with nitrogen and then dissolved with mobile phase. HPLC method was adopted to determine the plasma concentration of mitoxantrone. The determination was performed on ZORBAX SB-C₁₈ column with mobile phase consisted of 20 mmol/L ammonium acetate (pH adjusted to 2.0 with hydrochloric acid)-methanol (65:35, V/V) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 244 nm, and column temperature was 30 ℃. The sample size was 20 μL. Pharmacokinetic parameters were calculated with DAS 3.0 software. RESULTS: The linear range of mitoxantrone were 200-10 000 μg/L ($r=0.999 6, n=6$). The lower limit of quantitation was 200 μg/L, and the limit of detection was 150 μg/L, respectively. RSDs of intra-day and inter-day precision and stability were all lower than 8.0% ($n=5, 3, 6$, respectively). The extraction recoveries were (85.64±3.93)%-(92.31±1.68)% ($n=3$). The recoveries of accuracy test were (93.58±1.42)%-(113.92±2.74)% ($n=3$). The pharmacokinetic parameters of mitoxantrone were as follows

血再灌注损伤模型犬心肌能量代谢的影响[J]. 中国药房, 2017, 28(28): 3918-3923.

[21] MIRMIRAN P, HOSSEINI S, HOSSEINPOUR-NAZI S, et al. Legume consumption increase adiponectin concen-

^Δ 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81603045)

* 学士。研究方向: 药物新剂型与新技术。E-mail: 1561960763@qq.com

通信作者: 副教授, 博士。研究方向: 中药的免疫安全性。电话: 028-62739562。E-mail: zhes11022@126.com

trations among type 2 diabetic patients: a randomized crossover clinical trial[J]. *Endocrinol Diabetes Nutr*, 2019, 66(1): 49-55.

[22] WICKS SE, VANDANMAGSAR B, HAYNIE KR, et al. Mitochondrial fat oxidation induces adaptive remodeling of muscle metabolism[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(25): E3300-E3309.

(收稿日期: 2018-10-12 修回日期: 2019-01-14)

(编辑: 邹丽娟)

as $AUC_{0-720 \text{ min}}$ was $(5\ 247.1 \pm 474.6.0) \mu\text{g}\cdot\text{h/L}$; $t_{1/2z}$ was $(24.88 \pm 6.94) \text{ h}$; CL_z was $(0.46 \pm 0.09) \text{ L}/(\text{h}\cdot\text{kg})$; V_z was $(11.07 \pm 2.64) \text{ L/kg}$. CONCLUSIONS: The method has recovery and good repeatability, and is suitable for the determination of blood concentration of mitoxantrone and its pharmacokinetic research.

KEYWORDS Mitoxantrone; Blood concentration determination; Pharmacokinetics; Rat

米托蒽醌(Mitoxantrone)是一种具有蒽环结构的广谱抗生素,有明确的高效抗癌性,临床上主要用于治疗恶性淋巴瘤、乳腺癌和急性白血病,也可用于治疗肺癌、肾癌、卵巢癌等疾病^[1-3]。但米托蒽醌有较明显的骨髓抑制作用和剂量依赖性,使其临床使用受到了明显的影响^[4-6]。因此开展米托蒽醌的血药浓度监测工作,有利于早期预防其毒性的发生,对于米托蒽醌的临床安全用药具有积极意义。

近年来,不少文献报道了关于米托蒽醌的体内分析方法和检测技术^[7-17]。这些分析技术中对样品的分析主要采用了高效液相色谱法和高效液相色谱-质谱联用法,而对生物样品的处理则有多种方法,如沉淀蛋白法、萃取法等。其中,萃取法操作复杂、耗时;而沉淀蛋白法操作简单、省时。但是,笔者在预试验中发现,用已报道的方法^[15-17]处理米托蒽醌血浆样品,其回收率很低,且重复性不好。这可能是由于米托蒽醌与血浆中的蛋白结合力较强所致。由此可见,生物样品分析中血液样品的预处理方法对米托蒽醌准确快速地分析显得尤为重要。

由于米托蒽醌与血浆蛋白的结合主要是通过非共价结合的方式存在,基于药物分布实验中研磨法处理组织样品的原理,笔者推测先通过物理手段使血浆蛋白与米托蒽醌分离,然后沉淀蛋白,这样便可以将米托蒽醌保留在上清液中而不会被包埋在蛋白沉淀中。为了验证该推测,本研究中笔者先将血浆样品与硅胶充分研磨后,再加入甲醇沉淀蛋白处理血浆,并采用高效液相色谱法建立了大鼠血浆中米托蒽醌浓度的检测方法,并将其应用于大鼠体内米托蒽醌药动学的研究,以期为临床合理使用米托蒽醌提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

Agilent1260 高效液相色谱仪和四元梯度泵(美国 Agilent 公司);BS-224S 电子天平(德国 Sartorius 公司);KH2200DB 数控超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

盐酸米托蒽醌对照品(成都普菲德生物技术有限公司,批号:160315,纯度:98%);硅胶(青岛海洋化工厂分厂,批号:20160162,规格:200目);甲醇(美国 Mreda 公司,色谱纯);其他试剂均为分析纯,水为屈臣氏蒸馏水。

1.3 动物

健康 SD 大鼠 6 只,SPF 级,♂,3.5 月龄,体质量 240~300 g,购自四川省人民医院实验动物研究所,实验动物生产许可证号:SCXK(川)2016-15,饲养在温度

$(25 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$ 下,自然光照射,自由进食和饮水。

2 方法与结果

2.1 盐酸米托蒽醌对照品溶液的制备

精密称取盐酸米托蒽醌对照品适量,置于蒸馏水中,充分溶解,制备成质量浓度为 1.0 mg/mL 的对照品贮备液,于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中保存,临用时用流动相稀释至所需浓度。

2.2 血浆样品处理

取血浆样品 100 μL ,置于研钵中,加入 100 mg 硅胶,充分研磨混匀,再加入沉淀剂 0.5 mol/L 盐酸的甲醇溶液 1 mL,研磨混匀。用移液枪将 2 mL 混悬液吸入 EP 管中,12 000 r/min 离心 8 min,取上清液 1 mL,氮气吹干后加 100 μL 流动相复溶,作为供试品溶液。

2.3 色谱条件

色谱柱:ZORBAX SB-C₁₈(150 mm \times 4.6 mm,5 μm);流动相:20 mmol/L 乙酸铵溶液(用稀盐酸调 pH 至 2.0)-甲醇(65:35, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:244 nm;柱温:30 $^\circ\text{C}$;进样量:20 μL 。

2.4 方法学研究

2.4.1 专属性 取适量盐酸米托蒽醌对照品贮备液,用流动相稀释至 5 000 $\mu\text{g/L}$,作为米托蒽醌对照品溶液,按照“2.3”项下色谱条件进样测定,记录色谱。取适量空白血浆作为阴性对照样品,取给药后 4 h 时收集的血浆作为供试品。将阴性对照样品和供试品按照“2.2”项下方法处理后,再按照“2.3”项下色谱条件进样测定,记录色谱。在该色谱条件下,米托蒽醌的保留时间为 5.2 min,其色谱峰与其他峰的分度均大于 1.5,无其他内源性杂质的干扰,色谱图见图 1。

2.4.2 线性关系 在空白血浆中加入不同质量浓度的米托蒽醌对照品溶液,使血浆中米托蒽醌的质量浓度分别为 200、500、1 000、2 500、5 000、10 000 $\mu\text{g/L}$,按照“2.2”项下方法处理后,再按照“2.3”项下色谱条件进样测定,每一浓度进行 3 样本分析,记录峰面积。以测得峰面积(y)为纵坐标、米托蒽醌血药浓度(x)为横坐标绘制标准曲线。得回归方程为 $y=0.813\ 1x-48.12$ ($r=0.999\ 6$, $n=6$),结果表明,米托蒽醌检测质量浓度在 200~10 000 $\mu\text{g/L}$ 范围内,与峰面积之间线性关系良好,符合定量分析要求,定量下限为 200 $\mu\text{g/L}$ 。

2.4.3 检测限 制备一系列低浓度的米托蒽醌对照品溶液,加入一定量空白血浆,按照“2.2”项下方法处理后,再按照“2.3”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以信噪比为 3:1 时对应的米托蒽醌的质量浓度为此分析方法的检测限。结果显示,米托蒽醌的检测限为 150 $\mu\text{g/L}$ 。

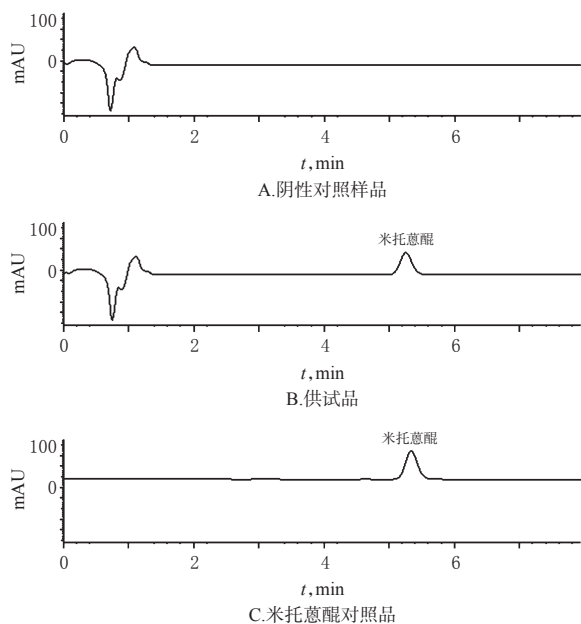


图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.4.4 精密度的在空白血浆中加入不同质量浓度的米托蒽醌对照品溶液,制备成低、中、高3个质量浓度(250、5 000、8 000 $\mu\text{g/L}$)的血浆样品,每个浓度5个样品,按照“2.2”项下方法处理后,再按照“2.3”项下色谱条件进样测定,考察日内精密度的;连续测定3 d,考察日间精密度的。精密度的试验结果见表1。

表1 精密度的试验结果

Tab 1 Results of precision tests

质量浓度, $\mu\text{g/L}$	日内RSD, % ($n=5$)	日间RSD, % ($n=3$)
250	3.72	7.96
5 000	1.78	5.47
8 000	1.16	4.17

2.4.5 提取回收率的取空白血浆200 μL ,加入不同质量浓度的米托蒽醌对照品溶液,制备成低、中、高3个质量浓度(250、5 000、8 000 $\mu\text{g/L}$)的血浆样品,按照“2.2”项下方法处理后,再按照“2.3”项下色谱条件进样测定,每一浓度进行6样本分析,获得相应峰面积为P1;另取盐酸米托蒽醌对照品贮备液适量,用流动相直接稀释得到质量浓度分别为250、5 000、8 000 $\mu\text{g/L}$ 的米托蒽醌溶液,按照“2.3”项下色谱条件进样测定,获得相应峰面积为P2。以P1与P2的比值计算提取回收率。结果显示,低、中、高3个质量浓度血浆样品中米托蒽醌的提取回收率分别为(85.64 \pm 3.93)%、(92.31 \pm 1.68)%、(88.87 \pm 2.62)($n=6$)。

2.4.6 准确度的取米托蒽醌对照品贮备液适量,与空白血浆混合后,制备成低、中、高3个质量浓度(250、5 000、8 000 $\mu\text{g/L}$)的血浆样品,按照“2.2”项下方法处理后,再按照“2.3”项下色谱条件进样测定,每一浓度进行6样本分析,记录峰面积。将所测得的峰面积代入回归方程计算米托蒽醌的测定浓度,以测定浓度与真实浓度之比计

算回收率。结果显示,低、中、高3个质量浓度血浆样品中米托蒽醌的回收率分别为(113.92 \pm 2.74)%、(100.79 \pm 1.36)%、(93.58 \pm 1.42)($n=6$)。

2.4.7 稳定性的取米托蒽醌对照品贮备液适量,与空白血浆混合后,制备成低、中、高3个质量浓度(250、5 000、8 000 $\mu\text{g/L}$)的血浆样品,各6份,取3份在常温下放置8 h,剩余3份在-40 $^{\circ}\text{C}$ 下放置21 d,然后按照“2.2”项下方法处理后,再按照“2.3”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,考察稳定性。结果显示,本方法稳定性良好,结果见表2。

表2 稳定性试验结果($n=3$)

Tab 2 Results of stability tests($n=3$)

质量浓度, $\mu\text{g/L}$	RSD, %	
	常温8 h	-40 $^{\circ}\text{C}$ 21 d
250	6.85	7.56
5 000	4.54	6.57
8 000	3.42	7.68

2.5 药动学研究

取大鼠6只,尾静脉注射给予米托蒽醌5 mg/kg ^[8],分别于给药前(空白)与给药后5、10、20、40、60、120、240、480、720 min取大鼠尾静脉血0.3 mL,置于肝素化EP管中,5 000 r/min离心10 min,分离得100 μL 血浆,于-40 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。将血浆样品按照“2.2”项下方法处理后,再按照“2.3”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,绘制药-时曲线,再应用DAS 3.0软件,按统计矩原理,计算药动学参数。米托蒽醌在大鼠体内的药-时曲线见图2,药动学参数见表3。

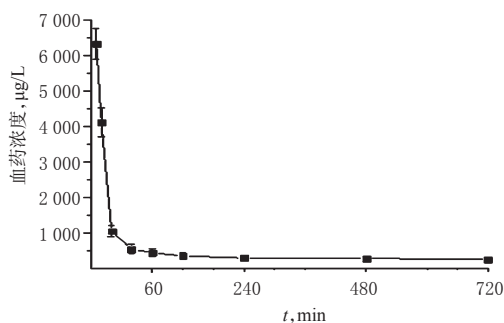


图2 米托蒽醌在大鼠体内的药-时曲线($n=6$)

Fig 2 Mean plasma concentration-time curve of mitoxantrone in rats($n=6$)

表3 米托蒽醌在大鼠体内的药动学参数($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 3 Pharmacokinetic parameters of mitoxantrone in rats($\bar{x} \pm s, n=6$)

参数	米托蒽醌
$\text{AUC}_{0-720 \text{ min}}, \mu\text{g}\cdot\text{h/L}$	5 247.12 \pm 474.60
$\text{AUC}_{0-\infty}, \mu\text{g}\cdot\text{h/L}$	13 853.24 \pm 927.93
$\text{MRT}_{0-720 \text{ min}}, \text{h}$	3.89 \pm 0.18
$t_{1/2\alpha}, \text{h}$	24.88 \pm 6.94
$\text{CL}_z, \text{L}/(\text{h}\cdot\text{kg})$	0.46 \pm 0.09
$V_z, \text{L}/\text{kg}$	11.07 \pm 2.64

3 讨论

在生物样品分析中,最重要的两部分就是生物样品的前处理和建立目标待测物合适的检测方法。目前已报道的米托蒽醌检测方法大都采用高效液相色谱法,如代广会等^[7]建立了固相萃取-高效液相色谱法测定细胞内、外米托蒽醌含量的方法;熊素彬等^[8]采用反相-高效液相色谱法对生物样本中的米托蒽醌进行测定,但文献报道的血液样品预处理方法多种多样且方法复杂、耗时。也有研究报道,使用磺基水杨酸和乙腈对血浆样本进行处理,或采用10%三氯乙酸甲醇一步沉淀法提取血浆中的米托蒽醌^[15-17],笔者对文献方法进行了多次重复操作,但是回收率测定结果都只能达到30%~50%,且重现性不好。相对而言,本研究通过在血浆样品处理过程中加入适量的硅胶混匀研磨,再加入有机溶剂沉淀蛋白,即便是100 μL样本量也能获得较高的回收率,且重复性良好。

在流动相的选择上,笔者考察了甲酸铵、磷酸二氢钠和乙酸铵,结果发现,以甲酸铵、磷酸二氢钠作为流动相时米托蒽醌的峰形均出现不同程度地拖尾,且有杂峰出现,而以乙酸铵作为流动相时能明显改善米托蒽醌的峰形。

用硅胶研磨处理血浆的方法目前国内外文献均未见报道,结合硅胶的物理特性及血浆样品的信息,笔者就本方法提高回收率的原理作如下猜想:因药物在体内大多以自由态和结合态的形式存在,将米托蒽醌加入血浆中时,药物与血浆蛋白结合,形成一种化学键,通过加入硅胶研磨,使药物与血浆蛋白分离,此时加入有机溶剂能使蛋白充分沉淀。此法制得米托蒽醌回收率比直接用有机溶剂沉淀蛋白的回收率高。用硅胶处理血浆使米托蒽醌回收率显著提高的确切原理还有待进一步研究。

本试验采用硅胶与血浆充分研磨后再加入有机溶剂沉淀蛋白的方法处理米托蒽醌的血浆样品,大大提高了血浆中米托蒽醌的回收率,并用高效液相色谱法建立了大鼠血浆中米托蒽醌含量的检测方法,结果米托蒽醌峰形较好,血浆杂质对其测定无干扰,方法学验证如线性、精密度、回收率和稳定性均符合相关要求,适用于米托蒽醌的药动学研究。

参考文献

[1] GREEN AK, CORTY RW, WOOD WA, et al. Comparative effectiveness of mitoxantrone plus prednisone versus prednisone alone in metastatic castrate-resistant prostate cancer after docetaxel failure[J]. *Oncologist*, 2015, 20(5): 516-522.

[2] MONTAZERABADI AR, SAZGARNIA A, BAHREYNI-TOOSI MH, et al. Mitoxantrone as a prospective photosensitizer for photodynamic therapy of breast cancer[J]. *Photodiagn Photodyn*, 2012, 9(1): 46-51.

[3] KRUKEMEYER MG, KRENN V, JAKOBS M, et al. Mitoxantrone-iron oxide biodistribution in blood, tumor, spleen, and liver: magnetic nanoparticles in cancer treat-

ment[J]. *J Surg Res*, 2012, 175(1): 35-43.

[4] SMITH LA, CORNELIUS VR, PLUMMER CJ, et al. Cardiotoxicity of anthracycline agents for the treatment of cancer: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials[J]. *BMC Cancer*, 2010. DOI: 10.1186/1471-2407-10-337.

[5] FOX EJ. Management of worsening multiple sclerosis with mitoxantrone: a review[J]. *Clin*, 2006, 28(4): 461-474.

[6] RICHARDSON D, POIRIER VJ, MATSUYAMA A, et al. Correlation between body weight and mitoxantrone-associated neutropenia in dogs[J]. *J Am Anim Hosp Assoc*, 2018, 54(3): 144-149.

[7] 代广会, 周卿, 尚京川. 固相萃取-高效液相色谱法测定细胞内外米托蒽醌的含量[J]. *药物分析杂志*, 2007, 27(7): 1075-1077.

[8] 熊素彬, 陆彬, 杨红, 等. RP-HPLC法研究米托蒽醌蛋白纳米粒在大鼠的体内分布和淋巴结靶向性[J]. *药物分析杂志*, 2006, 26(8): 1043-1049.

[9] 张志荣, 廖工铁, 叶利民. 柱切换HPLC法研究米托蒽醌毫微粒冻干静脉注射剂的药代动力学[J]. *药学学报*, 1995, 30(11): 843-847.

[10] ŠTENGLOVÁ-NETÍKOVÁ IR, PETRUŽELKA L, ŠTASTNÝ M, et al. Anthracycline antibiotics derivate mitoxantrone: destructive sorption and photocatalytic degradation[J]. *PLoS One*, 2018, 13(3): e0193116.

[11] ZHANG L, REN Y, WANG Y, et al. Pharmacokinetics, distribution and anti-tumor efficacy of liposomal mitoxantrone modified with a luteinizing hormone-releasing hormone receptor-specific peptide[J]. *Int J Nanomedicine*, 2018. DOI: 10.2147/IJN.S150512.

[12] HU OY, CHANG SP, LAW CK, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies with mitoxantrone in the treatment of patients with nasopharyngeal carcinoma[J]. *Cancer*, 1992, 69(4): 847-853.

[13] FELDMAN EJ, ALBERTS DS, ARLIN Z, et al. Phase I clinical and pharmacokinetic evaluation of high-dose mitoxantrone in combination with cytarabine in patients with acute leukemia[J]. *J Clin Oncol*, 1993, 11(10): 2002-2009.

[14] CHOI KE, SINKULE JA, HAN DS, et al. High-performance liquid chromatographic assay for mitoxantrone in plasma using electrochemical detection[J]. *J Chromatogr*, 1987, 420(1): 81-88.

[15] YANG X, MORRIS ME. Pharmacokinetics and biliary excretion of mitoxantrone in rats[J]. *J Pharm Sci*, 2010, 99(5): 2502-2510.

[16] 周子晔, 周彬, 王陈翔, 等. HPLC法测定大鼠血浆中米托蒽醌浓度及其在药动学中的应用[J]. *中国临床药理学杂志*, 2016, 25(3): 153-156.

[17] 李耿, 孟繁蕴, 杨洪军, 等. UPLC法同时测定丹参中11种成分的含量[J]. *中国药房*, 2014, 25(19): 1766-1768.

(收稿日期: 2018-10-16 修回日期: 2019-01-17)

(编辑: 邹丽娟)