

LC-MS/MS法测定人血浆中重酒石酸长春瑞滨的浓度及其药动学研究

刘沛^{1*}, 刘磊¹, 刘志浩², 王长远^{2#}(1.大连市第三人民医院药剂科, 辽宁大连 116033; 2.大连医科大学药学院, 辽宁大连 116044)

中图分类号 R969.1; R979.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)20-2774-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.20.13

摘要 目的:建立测定人血浆中重酒石酸长春瑞滨浓度的方法,研究长春瑞滨在人体的药动学过程。方法:以固相萃取(SPE)技术处理样品后应用液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法进样测定。色谱柱为Agilent Extend C₁₈,流动相为5 mmol/L醋酸铵溶液(pH10.5)-乙腈-甲醇(18:10:72, V/V/V),流速为0.4 ml/min;采用电喷雾离子源(ESI),以多重反应监测(MRM)模式扫描,负离子方式检测。用于定量分析的离子反应分别为 m/z 779.50→ m/z 122.10(长春瑞滨)和 m/z 811.60→ m/z 224.50(内标,长春碱)。采用3p97程序计算药动学参数。结果:内源性杂质不干扰测定,无明显的基质效应;定量下限为2 ng/ml,长春瑞滨血药浓度在2.0~4 000.0 ng/ml范围内线性关系良好($r=0.9978$);日内、日间精密度和准确度符合生物样本测定要求。30 mg/m²、40 mg/m²长春瑞滨注射用乳剂组及30 mg/m²长春瑞滨注射液组 $t_{1/2\gamma}$ 分别为(37.958±34.256)、(47.835±54.231)、(76.873±40.537)h, c_{max} 分别为(1 426.250±397.562)、(1 700.125±624.669)、(2 187.500±828.040)ng/ml, AUC_{0-48 h}分别为(75 839±19 551)、(82 088±14 207)、(95 318±18 208)mg·h/L。结论:该试验建立的测定方法灵敏度高、准确度高、专属性强,适用于人体中长春瑞滨血药浓度的测定和药动学研究。长春瑞滨在肿瘤患者体内的代谢过程属于一级动力学三室模型。

关键词 长春瑞滨;液相色谱-串联质谱法;药动学;血药浓度

Concentration Determination of Vinorelbine Bitartrate in Human Plasma by LC-MS/MS

LIU Pei¹, LIU Lei¹, LIU Zhi-hao², WANG Chang-yuan²(1.Dept. of Pharmacy, the Third People's Hospital of Dalian, Liaoning Dalian 116033, China; 2.College of Pharmacy, Dalian Medical University, Liaoning Dalian 116044, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for determining the concentration of vinorelbine bitartrate in human plasma, and study the pharmacokinetic process of vinorelbine in human plasma. METHODS: The samples were extracted with Solid-phase extraction (SPE). LC-MS/MS was performed on the column of Agilent Extend C₁₈ with the mobile phase of 5 mmol/L ammonium acetate solution (pH10.5)-acetonitrile-methanol (18:10:72, V/V/V) at the flow rate of 0.4 ml/min, the ion source was ESI and MRM mode was used to scan positive ion detection. The ion reaction of quantitative analysis was m/z 779.50→ m/z 122.10 (vinorelbine) and m/z 811.60→ m/z 224.50 (internal standard, vinblastine). 3p97 was used to calculate the pharmacokinetic parameters. RESULTS: The determination was not interfered by endogenous impurities, and there was no matrix effect; the lowest limit of quantitative analysis was 2.0 ng/ml with the linear range of 2.0-4 000.0 ng/ml ($r=0.9978$); the linear range of vinorelbine in plasma was. The intra-day and inter-day precisions and accuracy results were all in line with the acceptable limit across all concentrations. $t_{1/2\gamma}$ of 30 mg/m², 40 mg/m² Vinorelbine Emulsion for Injection groups and 30 mg/m² Vinorelbine for Injection group were (37.958±34.256)、(47.835±54.231)、(76.873±40.537)h respectively, c_{max} were (1 426.250±397.562)、(1 700.125±624.669)、(2 187.500±828.040)ng/ml respectively, AUC_{0-48 h} were (75 839±19 551)、(82 088±14 207)、(95 318±18 208)mg·h/L respectively. CONCLUSIONS: The method is rapid, sensitive and specific, and suitable for the determination of vinorelbine and pharmacokinetic study. Metabolic processes of vinorelbine can be described as first order process of three-compartment model in cancer patients.

KEYWORDS Vinorelbine; LC-MS/MS; Pharmacokinetics; Blood concentration

重酒石酸长春瑞滨(Vinorelbine)是长春碱类抑制细胞分裂的细胞毒类抗肿瘤药,其作为一种半合成的长春花属生物碱的重酒石酸盐,主要用于治疗非小细胞肺癌及乳腺癌等^[1]。长春瑞滨是具有特征生色基团的化合物,文献多采用高效液相色谱-紫外(HPLC-UV)法、高效液相色谱-红外(HPLC-IR)法和高效液相色谱-库仑阵列电化学检测器(HPLC-ECD)法等分析

方法^[2-5],以上方法灵敏度低、样本分析时间长,并非临床药动学研究的理想手段。此外,对于样品处理多采用液-液萃取和沉淀蛋白的方法,较为烦琐,且提取后杂质含量较多。本文采用固相萃取(SPE)技术,方法简便、快速,尤其是样品处理后无杂质干扰,利于液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)的快速分析。

1 材料

1.1 仪器

1200高液液相色谱仪(美国Agilent公司);API 3200串联四级杆质谱仪、Analysis 1.4.1数据采集软件(美国Applied Biosystems公司);AL104分析天平(上海梅特勒-托利多仪器有限

* 主管药师。研究方向:药剂学与临床药学。电话:0411-86526134。E-mail:liupe_i_0612@163.com

通信作者:实验师。研究方向:药动学。电话:0411-86110413。E-mail:wangcyuan@163.com

公司);80-2 离心沉淀机(巩义市英峪予华仪器厂);XW-80A 涡旋混合器(上海医科大学仪器厂);DK-98- II A 电热恒温水浴锅(天津泰斯特仪器有限公司);HSC-24B 型氮吹仪(天津市恒奥科技发展有限公司);ACO-004 空气泵(广东日生集团有限公司);Cleanert PAX-SPE 小柱(天津博纳艾杰尔科技有限公司)。

1.2 药品与试剂

重酒石酸长春瑞滨注射用乳剂(北京扬新科技有限公司,规格:1 ml:10 mg);重酒石酸长春瑞滨注射液(杭州赛诺菲圣德拉堡民生制药有限公司,规格:1 ml:10 mg,批号:20080819);长春瑞滨标准品(江苏豪森药业股份有限公司,批号:RS060121,纯度:99.7%);内标:长春碱标准品(杭州民生药业集团有限公司,纯度:99.5%);甲醇、乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯。空白血浆来自于大连市中心血站。

2 方法与结果

2.1 色谱及质谱条件

色谱柱:Agilent Extend C₁₈(150 mm×2.1 mm,5 μm);流动相:5 mol/L 醋酸铵溶液(pH10.5)-乙腈-甲醇(18:10:72,V/V/V);流速:0.4 ml/min;柱温:室温;进样量:10 μl^[5]。采用电喷雾离子源(ESI),以多重反应监测(MRM)模式扫描,负离子方式检测;离子喷射(IS)电压:-4 200 V;温度:590 °C^[5-6]。长春瑞滨和内标长春碱用于定量分析的离子反应分别为 m/z 779.50→ m/z 122.10 和 m/z 811.60→ m/z 224.50(图1)。数据采集和处理使用 Analysis 1.4.1 软件。

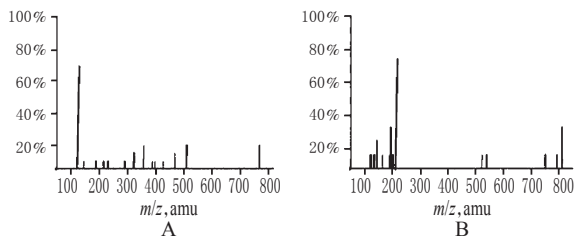


图1 质谱图

A. 长春瑞滨 m/z 779.50; B. 长春碱 m/z 811.60

Fig 1 Mass spectrum

A. vinorelbine m/z 779.50; B. vincalureklobastinum m/z 811.50

2.2 试验溶液的制备

2.2.1 长春瑞滨标准贮备液 准确称取长春瑞滨标准品 10 mg,置于 10 ml 量瓶中,加入蒸馏水溶解,并以蒸馏水稀释至刻度,得质量浓度为 1 mg/ml 的长春瑞滨标准贮备液,-20 °C 避光保存。

2.2.2 内标溶液 按“2.2.1”项下方法制备成质量浓度为 1 mg/ml 的长春碱贮备液,加甲醇稀释成终质量浓度为 4 μg/ml 的长春碱溶液,即为所需内标溶液,-20 °C 避光保存,备用。

2.2.3 长春瑞滨标准品系列工作液 取长春瑞滨贮备液(1 mg/ml)适量,加甲醇稀释至终质量浓度分别为 40、20、4 μg/ml 及 800、200、50、20 ng/ml 的长春瑞滨标准品系列工作液,-20 °C 避光保存,备用。

2.3 血浆样品处理

精密吸取血浆样品 200 μl,置于离心管中,加入内标(4 μg/ml 长春碱)溶液 20 μl,涡旋 1 min 混匀,以离心半径为 16.5 cm、转速为 15 000 r/min 于 4 °C 离心 10 min,取上清液,加入预先活化好的 SPE 柱中,先用蒸馏水洗脱 2 次(1 ml/次),再用甲醇洗脱 2

次(1 ml/次),合并 2 次甲醇洗脱液,于 40 °C 水浴氮气吹干。残渣用流动相 150 μl 溶解,涡旋混合,吸取 10 μl 进行 LC-MS/MS 分析,记录长春瑞滨及内标峰面积,以内标法计算长春瑞滨的浓度^[7-8]。

2.4 方法专属性考察

在选定色谱及质谱条件下,血浆内源性杂质对待测物无干扰,长春瑞滨与内标峰形良好,分离完全,保留时间分别为 1.79 min 和 0.91 min,详见图 2。

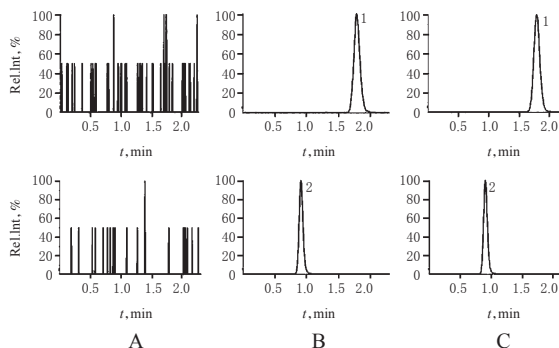


图2 色谱图

A. 空白血浆; B. 空白血浆+混合标准品溶液; C. 受试者静脉给药 12 h 后血浆样品+内标溶液; 1. 长春瑞滨; 2. 长春碱

Fig 2 HPLC chromatograms

A. blank plasma; B. mixed control; C. plasma sample 12 h after iv; 1. vinorelbine; 2. IS

2.5 标准曲线的制备与定量下限的考察

取空白血浆 200 μl,加入长春瑞滨标准品系列工作液 20 μl,加入内标溶液 20 μl,配制相当于长春瑞滨血浆浓度为 2.5、20、80、400、2 000、4 000 ng/ml 的血浆样品,按“2.3”项下方法操作,每一浓度进行双样本分析,取 10 μl 进样分析,记录色谱图。以待测物浓度(c)为横坐标,待测物与内标的峰面积比值(Y)为纵坐标,用加权($w=1/x^2$)最小二乘法进行回归运算,求得的回归方程即为标准曲线 $Y=0.00116c^3+0.00378$ ($r=0.9978$)。结果表明,长春瑞滨血药浓度在 2~4 000 ng/ml 范围内线性关系良好。

2.6 方法回收率及准确度(RE)

取长春瑞滨标准品溶液(20 ng/ml)20 μl,加入空白血浆 200 μl,配制相当于长春瑞滨血浆浓度为 2 ng/ml 的样品,在方法学确证第 1 天进行 6 样本分析,连续测定 3 d 并根据当日标准曲线计算每一样本测得浓度。求得长春瑞滨定量下限浓度的日内精密性(RSD)为 4.75%,RE 为 3.58%,日间 RSD 为 3.79%,RE 为 3.21%。结果表明,所建立的 LC-MS/MS 法测定血浆中长春瑞滨的定量下限可达 2 ng/ml。

2.7 提取回收率和基质效应

取空白血浆 200 μl,按“2.5”项下方法配制低、中、高梯度浓度(长春瑞滨血浆浓度分别为 5、80、2 000 ng/ml)的样品,每一浓度进行 6 样本分析,获得相应峰面积为 A;另取空白血浆 200 μl,按“2.5”项下方法处理,所得残渣在测定前用流动相 150 μl 溶解,加标准品使成为与质控(QC)样品相同浓度的血浆样品,涡旋混合,精密吸取 10 μl 进行 LC-MS/MS 分析,获得相应峰面积为 B;以流动相溶解对照品配制与 QC 样品相同浓度的样品分析测定获得相应峰面积为 C。即 A/B 为提取回收率,B/C 为基质效应,结果见表 1。

表1 提取回收率和基质效应($\bar{x} \pm s, n=6$)Tab 1 Extraction recoveries and matrix effect for vinorelbine($\bar{x} \pm s, n=6$)

标示浓度, ng/ml	提取回收率, %	RSD, %	基质效应, %	RSD, %
5	79.71 ± 1.77	2.22	103.38 ± 1.90	1.83
80	81.56 ± 0.59	0.72	99.48 ± 1.21	1.20
2 000	80.53 ± 0.51	0.63	103.67 ± 1.31	1.26

2.8 样本稳定性考察

依据“2.3”项下方法制备QC(长春瑞滨血浆浓度分别为5、80、2 000 ng/ml)样品,每浓度3样本分析,分别考察血浆样品室温放置4 h、血浆样品反复冻融3次以及血浆样品-20℃冷冻放置1个月的稳定性。测定结果显示,血浆样品在上述条件下稳定,详见表2。

2.9 血浆样品的测定

临床试验方案经大连医科大学附属第一医院伦理委员会

表3 长春瑞滨静脉给药后的主要药动学参数结果($\bar{x} \pm s$)Tab 3 Pharmacokinetic parameters of vinorelbine in human plasma after administration($\bar{x} \pm s$)

药动学参数	A组	B组	C组	P	
				A组 vs B组	A组 vs C组
$t_{1/2\alpha}$, h	0.192 ± 0.103	0.099 ± 0.039	0.160 ± 0.060	0.031*	0.457
$t_{1/2\beta}$, h	2.362 ± 0.983	1.653 ± 0.877	2.948 ± 1.187	0.150	0.301
$t_{1/2\gamma}$, h	37.958 ± 34.256	47.835 ± 54.231	76.873 ± 40.537	0.670	0.057
CL, L/(h·m ²)	409.043 ± 269.454	243.053 ± 114.540	264.863 ± 123.932	0.131	0.191
V_c , L/m ²	498.086 ± 605.749	168.046 ± 207.729	167.776 ± 146.957	0.167	0.156
AUC _{0-48h} , mg·h/L	75 839 ± 19 551	82 088 ± 14 207	95 318 ± 18 208	0.477	0.058
AUC _{0-∞} , mg·h/L	82 497 ± 18 568	91 837 ± 14 615	102 503 ± 17 287	0.282	0.043*
c_{max} , ng/ml	1 426.250 ± 397.562	1 700.125 ± 624.669	2 187.500 ± 828.040	0.313	0.034*
MRT, h	13.494 ± 3.968	14.900 ± 5.259	12.778 ± 15.334	0.556	0.900

注: *表示 $P < 0.05$

Note: * showed $P < 0.05$

3 讨论

本试验采用LC-MS/MS法测定,其灵敏度好、准确度高,采用MRM模式扫描,专属性强;采用SPE法,有效地将标的物与干扰组分分离,大大增强对长春瑞滨痕量分析物的检出能力。结果表明,本法适用于人体中长春瑞滨血药浓度的测定及药动学研究,通过3p97程序分析后得出该药物在肿瘤患者体内的代谢过程属于一级动力学三室模型^[7-11]。 $t_{1/2\gamma} > 37$ h,说明其在体内自深室的消除慢,与Levêque D等^[10]报道的长春瑞滨终末 $t_{1/2}$ 在20~40 h的结果相似。另外,Lush RM等^[11]报道的长春瑞滨终末 $t_{1/2}$ 为49 h,也与所测得结果较为接近。其中30 mg/m²长春瑞滨注射用乳剂与30 mg/m²长春瑞滨注射液经统计学检验, $P > 0.05$,差异无统计学意义。本次试验采样最大时间点为48 h,虽未达到5个半衰期的要求,但药物的体内过程各个时相均有足够的采样数,满足检测的需要。另外,长春瑞滨属于长半衰期药物,在体内消除时间过长,如采用5个半衰期采样的要求,不利于试验操作,也会给受试者造成痛苦^[9-11]。

B组的AUC>A组,但尚未达到1.3倍,两者差异无统计学意义($P > 0.05$),原因可能系因本研究中的受试者本身为肿瘤患者,存在相当大的异质性,个体差异大,且试验采用的样本数仅为8例,受试例数较少。A组与C组相比,前者AUC_{0-48h}为后者的79.57% ($P > 0.05$)。3组的MRT值均>12 h,且较为接近,说明其在体内的滞留时间较长,且3组间无差异。

参考文献

[1] 国家食品药品监督管理局.化学药物临床药代动力学研

表2 稳定性试验结果($\bar{x} \pm s, n=3$)Tab 2 Result of stability test for vinorelbine($\bar{x} \pm s, n=3$)

标示浓度, ng/ml	实测浓度, ng/ml	室温放置4 h	反复冻融3次	-20℃冷冻放置1个月
5	5.08 ± 1.60	5.16 ± 0.91	4.80 ± 0.22	5.29 ± 1.68
80	83.71 ± 4.63	84.13 ± 1.32	77.73 ± 2.91	84.20 ± 3.13
2 000	2020 ± 3.50	2050 ± 2.50	2097 ± 4.52	2071 ± 3.50

批准,24名受试者为符合入选标准的肿瘤患者(均签署知情同意书),男女兼有,分为3组:30 mg/m²长春瑞滨注射用乳剂组(A组)、40 mg/m²长春瑞滨注射用乳剂组(B组)、30 mg/m²长春瑞滨注射液组(C组)。分别单次静脉推注给药,于静脉推注15 min后0.08、0.16、0.25、0.5、1、1.5、2、3、4、6、8、12、24、48 h时采集静脉血4 ml,置于肝素管中。样品处理后每次测定随行2条标准曲线,每批所做QC样品数均大于未知样品总数的5%。测定结果采用3p97程序对静脉推注给药后原药的药-时数据进行分析,计算药动学参数,结果见表3。

究技术指导原则[S]. 2005-03-01.

- [2] 国家食品药品监督管理局.化学药物和生物制品临床试验的生物统计学技术指导原则[S]. 2005-03-01.
- [3] 邹玲莉,李秋莎,韩国柱,等.外源性磷酸肌酸在大鼠体内的药代动力学和代谢处置[J].药学学报,2011,46(1):75.
- [4] Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS[J]. *Anal Chem*, 2003, 75(13):3 019.
- [5] Puozzo C, Ung HL, Zorza G. A high performance liquid chromatography method for vinorelbine and 4-O-deacetyl vinorelbine: A decade of routine analysis in human blood [J]. *J Pharm Bio Anal*, 2007, 44(1):144.
- [6] Niwa M, Kawashiro T. Sensitive measurement of vinorelbine in dog plasma by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry utilizing transitions from double-charged precursor ions[J]. *Biomed Chromatogr*, 2011, 25(4):517.
- [7] de Graeve J, van Heugen JC, Zorza G, et al. Metabolism pathway of vinorelbine (Navelbine) in human: characterisation of the metabolites by HPLC-MS/MS[J]. *Pharm Biomed Anal*, 2008, 47(1):47.
- [8] Guilhaumou R, Solas C, Rome A, et al. Validation of an

重症监护室呼吸机相关性肺炎发生的危险因素和病原菌分布及药敏分析

陈雪梅*, 杨宁(广安市人民医院重症监护室, 四川 广安 638000)

中图分类号 R969.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)20-2777-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.20.14

摘要 目的: 认知导致呼吸机相关性肺炎(VAP)的危险因素, 为预防和治疗 VAP 提供理论依据。方法: 采用病例对照研究的方法, 对 190 例接受机械通气支持的 ICU 患者的临床资料进行分析。结果: 我院 VAP 的发生率为 48.4%; 高龄(>65 岁)、机械通气时间过长(>5 d)、使用糖皮质激素、使用制酸药物、留置胃管、多种抗生素合用为 VAP 发生的危险因素; 162 株病原菌中, 革兰阳性菌 39 株(24.07%), 革兰阴性杆菌 102 株(62.96%), 真菌 21 株(12.96%); 多数病原菌存在多重耐药性。结论: 多种因素与 VAP 的发生密切相关; 病原菌分布以革兰阴性杆菌为主; 菌株多重耐药性现象较普遍。采取对高龄患者加强监护, 提高其免疫力; 合理使用激素类药物; 尽量缩短机械通气支持的时间, 做好撤机计划; 留置胃管及进行肠内营养支持的患者, 抬高其床头、做好口腔清洁; 医护人员在日常操作中严格遵循无菌原则, 做好手部卫生, 合理使用抗菌药物等措施可降低 VAP 的发生率。

关键词 呼吸机相关性肺炎; 危险因素; 病原菌; 耐药性

Distribution of Risk Factors and Pathogens of Ventilator-associated Pneumonia in ICU and Drug Sensibility Analysis

CHEN Xue-mei, YANG Ning(Dept. of ICU, Guang'an Municipal People's Hospital, Sichuan Guang'an 638000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To analyze the risk factors, pathogens and drug sensitivity test of ventilator-associated pneumonia (VAP) in ICU. METHODS: A case-control study was conducted to analyze the clinical data of 190 patients receiving mechanical ventilatory support in ICU. RESULTS: The incidence of VAP in our hospital was 48.4%; elderly patients (>65 years), duration of mechanical ventilation (>5 d), use of corticosteroids, antacid drugs, indwelling stomach tube, and combined use of antibiotics were the risk factors of VAP; among the 162 pathogens, 39 were Gram-positive bacteria (24.07%), 102 were Gram-negative bacteria (62.96%), 21 were fungi (12.96%); multi-drug resistance existed in most pathogens. CONCLUSIONS: A variety of factors are closely associated with the incidence of VAP; the main pathogens of VAP are Gram-negative bacteria; the phenomenon of multi-drug resistance is common. Some measures are adopted to decrease the incidence of VAP, such as strengthen monitoring of elderly patients, to improve their immunity; use hormonal drugs reasonably; shorten the course of mechanical ventilation as much as possible, and plan ventilator removal; elevate the head of the bed and clean the oral for patients receiving gastric canal implantation and enteral nutrition; clean hands in accordance with asepsis principle strictly, and use antibacterials reasonably.

KEYWORDS Ventilator-associated pneumonia; Risk factor; Pathogen; Drug resistance

机械通气支持在危重症患者的急救中起着至关重要的作用, 但其常可导致呼吸机相关性肺炎(Ventilator-associated pneumonia, VAP)的发生。VAP 是指应用机械通气治疗 48 h 后或停用机械通气 48 h 内发生的肺实质炎症, 其可增加患者死亡率, 延长住院时间、加重患者的经济负担等^[1]。为掌握我院 VAP 发生的危险因素及病原菌分布情况, 为今后进一步预

防和治疗 VAP 提供理论依据, 笔者对 2011 年 1 月—2013 年 9 月我院重症监护室(ICU)发生 VAP 患者的临床资料进行了回顾性分析。

1 资料与方法

1.1 资料来源

采用病例对照研究(Case-control study)方法, 选取 2011 年

electrospray ionization LC/MS/MS method for quantitative analysis of vincristine in human plasma samples[J]. *Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2010, 878(3/4):423.

[9] Wong M, Balleine RL, Blair EY, et al. Predictors of vinorelbine pharmacokinetics and pharmacodynamics in pa-

tients with cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24(16):2448.

[10] Levêque D, Jehl F. Clinical pharmacokinetics of vinorelbine[J]. *Clin Pharmacokinet*, 1996, 31(3):184.

[11] Lush RM, McCune JS, Tetteh L, et al. The absolute bioavailability of oral vinorelbine in patients with solid tumors[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2005, 56(6):578.

* 主治医师。研究方向: 重症感染、脓毒症。电话: 0826-2600102。E-mail: 2420829510@qq.com

(收稿日期: 2015-01-28 修回日期: 2015-04-07)

(编辑: 李劲)