

· 论著 ·

帕唑帕尼在大鼠体内药动学研究

周陈建¹, 赵娜嬛², 胡国新³ (1. 温州市中心医院, 浙江 温州 325000; 2. 温州市人民医院, 浙江 温州 325000; 3. 温州市医科大学, 浙江 温州 325000)

[摘要] **目的** 建立大鼠血浆中检测帕唑帕尼的超高效液相色谱-质谱(UPLC-MS)的方法, 研究帕唑帕尼在大鼠体内的药动学过程。**方法** 大鼠血浆样品用乙腈沉淀后检测。采用 Acquity U-HPLC BEH C₁₈ 柱为分离柱, 流动相采用乙腈-0.1% 甲酸体系, 梯度洗脱; 采用 AB Sciex QTRAP 5500 三重四级杆质谱仪(电喷雾离子源) 进行质谱检测, 帕唑帕尼和内标地西洋采用多反应监测(MRM) 的方法检测, 帕唑帕尼和内标地西洋(ISTD) 的MRM 分别为 m/z 438.3→357.2 和 m/z 285.2→193.1; 雄性SD 大鼠6只, 灌胃给予80 mg/kg 帕唑帕尼, 在给药前和给药后的不同时间点于大鼠尾静脉取血。用建立的方法测定血浆中帕唑帕尼的浓度。用DAS 3.0 计算主要药动学参数。**结果** 大鼠血浆中帕唑帕尼浓度在0.25~40.00 $\mu\text{g/ml}$ 范围内线性关系良好($r=0.9992$); 低、中、高3个质量浓度(0.50、10.00、30.00 $\mu\text{g/ml}$) 的日内精密度RSD 分别为6.17%、2.73% 和2.54%, 日间精密度RSD 分别为7.56%、5.98% 和2.84%, 回收率分别为(78.4±4.8)%、(85.9±3.5)% 和(81.1±4.2)%, 基质效应分别为(106.7±5.3)%、(101.3±6.7)% 和(97.6±4.4)%; 血浆帕唑帕尼的主要药动学参数: 峰值浓度 c_{max} 为(20.22±1.95) $\mu\text{g/ml}$, 达峰时间 t_{max} 为(1.75±0.76) h, 半衰期 $t_{1/2}$ 为(7.35±2.31) h, 药-时曲线下面积 AUC_{0-t} 为(213.16±39.92) $\mu\text{g} \cdot \text{h/L}$, $\text{AUC}_{0-\infty}$ 为(215.79±39.84) $\mu\text{g} \cdot \text{h/L}$, 表观分布容积 V_d 为(4.10±1.78) L/kg, 清除率 CL 为(0.38±0.07) L/h。用房室模型拟合, 帕唑帕尼在大鼠体内呈一级消除的二室模型。**结论** 本研究建立用UPLC-MS 检测大鼠血浆帕唑帕尼的方法, 专属性高, 分离完全, 检测时间短, 适合帕唑帕尼的药动学和药物相互作用研究。

[关键词] 帕唑帕尼; 超高效液相色谱-质谱; 药动学

[中图分类号] R979.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2017)04-0346-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.04.014

Study on pharmacokinetics of pazopanib in rats

ZHOU Chenjian¹, ZHAO Langhuan², HU Guoxin³ (1. Center Hospital of Wenzhou, Wenzhou 235000, China; 2. People's Hospital of Wenzhou, Wenzhou 235000, China; 3. Medical College of Wenzhou, Wenzhou 235000, China)

[Abstract] **Objective** To develop a UPLC-MS method for the determination of pazopanib in rat plasma, and study the pharmacokinetics of pazopanib in rats. **Methods** The effective UPLC MS/MS separation of the examined compounds was applied on an Acquity BEH C₁₈ column with a gradient mobile phase system. AB Sciex QTRAP 5500 triple quadrupole mass spectrometer equipped with an electrospray ionization (ESI) interface was used for mass spectrometric detection. The MRM transitions of m/z 438.3→357.2 and m/z 285.2→193.1 were used to quantify for pazopanib and ISTD, respectively; 6 rats were given 80 mg/kg pazopanib intragastric administration. Blood samples were collected from the tail vein at different point after administration. The concentration of pazopanib in plasma was detected by the UPLC-MS methods. The pharmacokinetics parameters were analyzed by DAS program. **Results** Pazopanib and ISTD were eluted at 1.10 and 1.37 min respectively. Excellent liner relationship was obtained from the range of 0.25 $\mu\text{g/ml}$ to 40.00 $\mu\text{g/ml}$ ($r=0.9992$). The intra-day RSD were 6.17%, 2.73% and 2.54% and inter-day RSD were 7.56%, 5.98% and 2.84% respectively at three concentrations (0.50, 10.00, 30.00 $\mu\text{g/ml}$), the recoveries were (78.4±4.8)%, (85.9±3.5)% and (81.1±4.2)% respectively, the Matrix effect were (106.7±5.3)%, (101.3±6.7)% and (97.6±4.4)% respectively at three concentrations (0.50, 10.00, 30.00 $\mu\text{g/ml}$); 6 rats were given 80 mg/kg pazopanib intra-gastric administration. The main pharmacokinetics parameters of pazopanib were as following: c_{max} (20.22±1.95) $\mu\text{g/ml}$, t_{max} (1.75±0.76) h, $t_{1/2}$ (7.35±2.31) h, AUC_{0-t} (213.16±39.92) $\mu\text{g} \cdot \text{h/L}$, $\text{AUC}_{0-\infty}$ (215.79±39.84) $\mu\text{g} \cdot \text{h/L}$, V_d (4.10±1.78) L/kg, CL (0.38±0.07) L/h. **Conclusion** The method was simple, rapid, accurately, which could be used to determine the pazopanib concentration in rat plasma and study on its pharmacokinetics. Pazopanib was fitted to the first-order elimination kinetics in rats.

[Key words] pazopanib; UPLC-MS; pharmacokinetics

帕唑帕尼(pazopanib)是一种新型的多靶点酪氨酸激酶抑制剂,针对血管内皮生长因子受体(VEGFR-1, -2, -3)、血小板源性生长因子受体(PDGFR-a, -b)和干细胞因子受体(c-kit),具有直接的抗增殖作用和抗血管生成的特性。帕唑帕尼通过抑制酪氨酸激酶在广谱的肿瘤类型中发挥关键作用^[1]。临床前的药动学和药效学研究结果显示,对各种异种移植的肿瘤(如结肠癌、黑色素瘤、前列腺癌、肾癌、乳腺癌、肺癌、多发性骨髓瘤),帕唑帕尼抑制肿瘤生长呈明显的剂量依赖性^[2]。本研究建立检测大鼠血浆中帕唑帕尼浓度的超高效液相色谱-质谱(UPLC-MS)的方法,研究帕唑帕尼在大鼠体内的药动学过程,为临床药物合用、药物监测和药物相互作用研究提供方法学的理论依据。

1 材料与方法

1.1 仪器 超高效液相色谱仪:1860-15018 四元溶剂管理器、1860-15017 自动进样管理器和工作站(Waters 公司 Acquity 系列)。质谱仪:AB Sciex QTRAP 5500 三重四级杆质谱仪(加拿大 Toronto 公司)。其他仪器:电子分析天平 AB204-A [梅特勒-托利多(上海)仪器公司];涡旋混合器(XK96-B, 姜堰市新康医疗器械有限公司);台式高速冷冻离心机(TGL-16G, 上海安亭科学仪器厂);超纯蒸水仪(Millipore Milli-Q, 美国 Bedford)。

1.2 药品与试剂 帕唑帕尼(Sigma Aldrich, 美国 St. Louis);地西洋(中国药品生物制品鉴定所);甲醇及乙腈(色谱纯, Merck KGaA, 德国 Darmstadt);甲酸(Sigma-Aldrich)。

1.3 标准品溶液及内标溶液的配制 用电子分析天平(灵敏度为 0.1 mg)准确称取帕唑帕尼标准品 10 mg 于 10 ml 容量瓶中,用甲醇溶解并定容至 10 ml,得浓度为 1 mg/ml 的帕唑帕尼标准储备液,于 4 °C 冰箱中保存备用。精密称取地西洋适量,用乙腈溶解稀释成质量浓度为 20 μg/ml 的地西洋内标溶液,于 4 °C 冰箱中保存备用。

1.4 实验动物 健康雄性 SD 大鼠 6 只,体重(200±20) g,由温州医科大学实验动物中心提供,动物许可证号:SCXK(沪)2007-0005。所有动物实验的操作规程严格按照温州医科大学动物保护和利用委员会颁布的《实验动物使用和保护指导守则》进行。实验大鼠每天供给统一的饲料和水,饲养温度控制在 20~24 °C。

1.5 UPLC-MS/MS 条件

1.5.1 色谱条件 色谱柱:Acquity BEH C₁₈ 柱

(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm);流动相:乙腈-0.1% 甲酸体系,梯度洗脱,0~0.3 min:乙腈 20%→95%, 0.3~1.5 min:乙腈 95%, 1.5~1.8 min:乙腈 95%→20%, 1.8~3.0 min:乙腈 20%;流速:0.40 ml/min;柱温:40 °C,样品室温度:4 °C。

1.5.2 质谱条件 离子源为电喷雾离子源(ESI),正离子方式检测,帕唑帕尼和地西洋采用多反应监测(MRM)的方法检测。帕唑帕尼和内标地西洋的 MRM 分别为 m/z 438.3→357.2 和 m/z 285.2→193.1。气帘气 40 psi,雾化气 55 psi,锥气 55 psi;离子喷雾电压 3.5 kV;加热块温度 400 °C;压力 0.18 Pa。

1.6 血浆样品处理方法 准确吸取待测血浆样品 100 μl 于 1.5 ml 微量离心管中,加入 20 μg/ml 的地西洋内标工作液 200 μl(乙腈稀释),漩涡混匀 1.0 min。以 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液置样品瓶的内插管中,设定 2 μl 进样检测。

2 结果

2.1 专属性 帕唑帕尼的质谱扫描图,如图 1。以下血浆样品均按“1.6”项下方法处理。帕唑帕尼血浆样品 UPLC 图见图 2。取雄性 SD 大鼠空白血浆。精密吸取帕唑帕尼标准液适量,配制含帕唑帕尼 5 μg/ml 加内标地西洋 20 μg/ml 的标准血浆样品。SD 大鼠 80 mg/kg 帕唑帕尼灌胃,取灌胃后 60 min 血浆样品。帕唑帕尼和地西洋的保留时间分别为 1.10、1.37 min。故本方法具有较高的专属性。

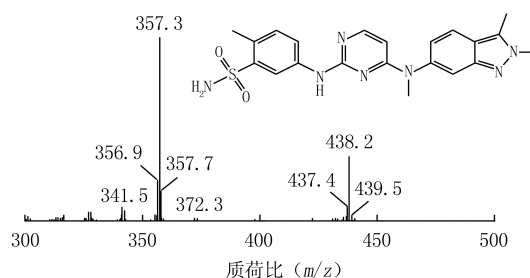


图 1 帕唑帕尼的质谱扫描图

2.2 线性关系及定量下限 配制帕唑帕尼浓度为 0.25、0.5、1、2.5、5、10、20、40 μg/ml 的血浆标准品溶液,按“1.6”项下方法处理,测定帕唑帕尼峰面积(A_s)、内标地西洋峰面积(A_i),以 A_s/A_i 为纵坐标(Y),浓度为横坐标(X),绘制帕唑帕尼的标准曲线,权重为 $1/X^2$ 。标准曲线方程为 $Y=0.6184 X+50.6916$,相关系数 $r=0.9992$,定量下限为 0.25 μg/ml。

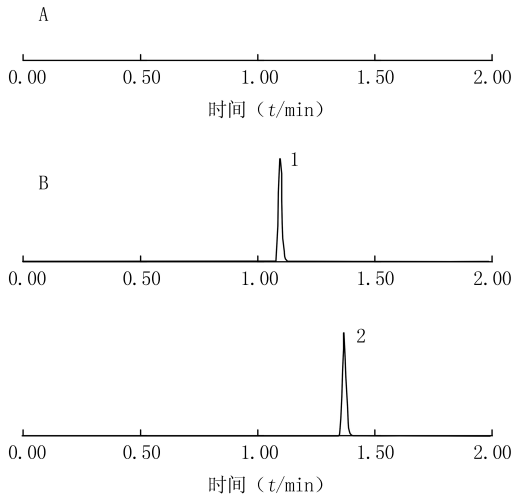


图2 帕唑帕尼 UPLC 图

A.空白血浆;B.帕唑帕尼(5 µg/ml) + 地西洋(20 µg/ml)的血浆样品;1.帕唑帕尼;2.地西洋

2.3 精密度试验 配制帕唑帕尼低、中、高3个浓度(0.5、10、30 µg/ml)的血浆标准品溶液,平行试验6次,按“1.6”项下方法处理后检测。于同一天检测,计算日内精密度;连续测定3 d,计算日间精密度。

日内、日间精密度:血浆帕唑帕尼低、中、高3个浓度的日内及日间精密度检测结果见表1, RSD均小于10%。

2.4 回收率和基质效应 配制帕唑帕尼低、中、高3个浓度(0.5、10、30 µg/ml)的血浆标准品溶液,平行试验6次,按“1.6”项下方法处理后检测。以血浆标准品溶液的峰面积分别与直接进样相同浓度的帕唑帕尼的峰面积之比值计算回收率。取6份不同大鼠的空白血浆,用乙腈进行沉淀,比较空白血浆沉淀后加入3个质控水平的帕唑帕尼的峰面积与直接进

表1 血浆帕唑帕尼的日内及日间精密度($\bar{x} \pm s, n=6$)

加入浓度 ($\rho_B/\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	日内精密度			日间精密度		
	检测浓度($\rho_B/\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	RSD(%)	相对误差(%)	检测浓度($\rho_B/\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	RSD(%)	相对误差(%)
0.50	0.49±0.03	6.17	-2.80	0.49±0.04	7.56	-2.00
10.00	10.25±0.28	2.73	2.50	10.03±0.06	5.98	0.30
30.00	30.36±0.77	2.54	1.20	29.54±0.84	2.84	-1.53

样相同浓度的帕唑帕尼的峰面积的比值计算基质效应。用同样的方法评价内标地西洋的回收率及基质效应。详见表2。

表2 帕唑帕尼与内标地西洋的回收率及基质效应($\bar{x} \pm s, n=6$)

分析物	加入浓度 ($\rho_B/\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	回收率 (%)	RSD (%)	基质效应 (%)	RSD (%)
帕唑帕尼	0.5	78.4±4.8	5.6	106.7±5.3	5.0
	10.0	85.9±3.5	4.1	101.3±6.7	6.6
	30.0	81.1±4.2	5.2	97.6±4.4	4.5
地西洋	20.0	82.3±3.9	4.8	94.8±4.6	4.9

2.5 样品稳定性 配制帕唑帕尼低、中、高3个浓度(0.5、10、30 µg/ml)的血浆标准品溶液,按“1.6”项下方法处理,分别检测在进样器内放置12 h的浓度,考察其稳定性。分别在反复冻融3次后、室温放置24 h、于-80 °C冰箱冰冻保存30 d,测定血浆帕唑帕尼的浓度,考察其稳定性。血浆样品的稳定性试验结果 RSD 均小于10%。结果见表3。

2.6 药动学参数 雄性SD大鼠6只,给予帕唑帕尼80 mg/kg灌胃,血浆帕唑帕尼的平均药物浓度-时间曲线见图3。血浆药物浓度经 DAS(Drug And

Statistics, version3.0) 程序处理,用非房室模型估算药动学参数,详见表4。

表3 帕唑帕尼血浆样品的稳定性试验

加入浓度 ($\rho_B/\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	RSD(%)		
	处理后 样品	冻融 样品	室温放置(24 h)、 冰冻(-80 °C)保存样品
0.50	0.48	1.77	1.90
10.00	0.27	0.85	1.43
30.00	0.13	1.15	2.17

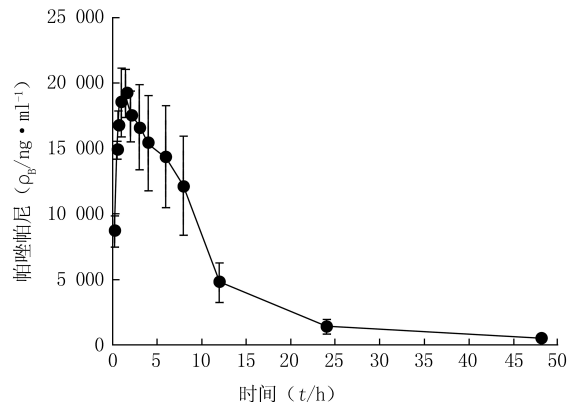


图3 帕唑帕尼的平均药-时曲线

表4 帕唑帕尼的主要药动学参数

参数(单位)	均值	标准差
AUC _(0-t) (μg·h/L)	213.16	39.92
AUC _(0-∞) (μg·h/L)	215.79	39.84
t _{1/2} (t/h)	7.35	2.31
t _{max} (t/h)	1.75	0.76
Vd (L/kg)	4.10	1.78
CL(L/h)	0.38	0.07
C _{max} (Q ₆ /μg·L ⁻¹)	20.22	1.95

3 讨论

帕唑帕尼对肾细胞癌(RCC)有明显的抗肿瘤作用,对其他恶性肿瘤如肝细胞癌(HCC)、非小细胞肺癌(NSCLC)、卵巢癌和多发性骨髓瘤也有抗肿瘤作用^[1]。帕唑帕尼是目前通过美国FDA和EMA批准作为转移性肾细胞癌患者的一线治疗药物^[3,4]。与安慰剂组相比,口服帕唑帕尼800 mg/d,1次/d,可改善晚期及转移性肾癌(肾细胞癌)患者的无进展生存期。两种HPLC法检测血浆中帕唑帕尼的浓度已见报道^[5,6],但存在灵敏度不高、血浆样品处理方法复杂、色谱运行时间长等不足,限制了其药动学研究结果的应用。

本研究结果显示,大鼠灌胃给予80 mg/kg帕唑帕尼后,平均在1.75 h达到20.22 μg/ml的药物峰值浓度;血浆t_{1/2}为7.35 h左右,Vd约为4.10 L/kg,CL约为0.38 L/h。用房室模型拟合,

帕唑帕尼在大鼠体内呈一级消除的二室模型。本研究建立UPLC-MS/MS检测大鼠血浆帕唑帕尼的方法,专属性高,分离完全,检测时间短,适合帕唑帕尼的药动学和药物相互作用研究。

【参考文献】

[1] Ranieri G, Mammì M, Donato Di Paola E, et al. Pazopanib a tyrosine kinase inhibitor with strong anti-angiogenetic activity: A new treatment for metastatic soft tissue sarcoma [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2014, 89(2):322-329.

[2] Hamberg P, Verweij J, Sleijfer S. (Pre-)clinical pharmacology and activity of pazopanib, a novel multikinase angiogenesis inhibitor[J]. Oncologist, 2010, 15(6):539-547.

[3] Motzer RJ, Hutson TE, Cella D, et al. Pazopanib versus sunitinib in metastatic renal-cell carcinoma[J]. N Engl J Med, 2013, 369(8):722-731.

[4] Welsh SJ, Fife K. Pazopanib for the treatment of renal cell carcinoma[J]. Future Oncol, 2015, 11(8):1169-1179.

[5] Dziadosz M, Lessig R, Bartels H. HPLC-DAD protein kinase inhibitor analysis in human serum [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2012, 893-894:77-81.

[6] Minocha M, Khurana V, Mitra AK. Determination of pazopanib (GW-786034) in mouse plasma and brain tissue by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC/MS-MS)[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2012, 901:85-92.

[收稿日期] 2016-12-19 [修回日期] 2017-02-17

[本文编辑] 李睿旻

(上接第327页)

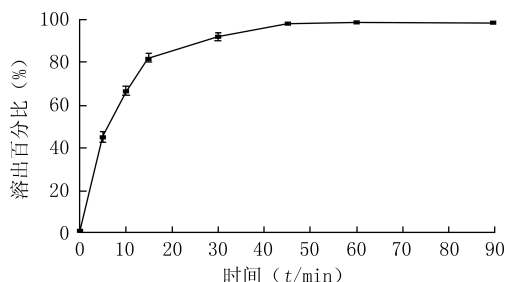


图2 地奥司明栓剂的溶出曲线

述,运用本方法制备的地奥司明栓剂符合质量控制标准的要求,也为该药物新剂型的开发提供了参考。

【参考文献】

[1] 李文哲, 巩龙, 王霖, 等. 地奥司明的药理活性研究进展 [J]. 中国疗养医学, 2012, 21(10): 887-888.

[2] 黎凤明, 田晓东, 胡国文, 等. 地奥司明的临床应用进展 [J]. 现代中西医结合杂志, 2012, 21(6): 680-681.

[3] 张群芳. 地奥司明在治疗下肢深静脉血栓形成中的作用研究 [J]. 实用临床医药杂志, 2012, 16(15): 93-94.

[4] Giannini I, Amato A, Basso L, et al. Flavonoids mixture

(diosmin, troxerutin, hesperidin) in the treatment of acute hemorrhoidal disease: a prospective, randomized, triple-blind, controlled trial [J]. Tech Coloproctol, 2015, 19(6):339-345.

[5] Tajana A, Boccasanta P, Micheletto G, et al. Results of the use of topical diosmin (venosmine) in the treatment of acute hemorrhoid pathology [J]. Minerva Med, 1988, 79(5):387-390.

[6] 蔡莉. 马应龙麝香与地奥司明膏联合或单用治疗血栓性痔的临床效果 [J]. 中国实用医药, 2013, 8(24):181-182.

[7] 陈惠红. 栓剂基质研究进展 [J]. 中国药业, 2009, 18(4):59-60.

[8] 张恒, 普俊学, 王乙鸿, 等. 中药栓剂的临床应用及其新剂型 [J]. 安徽医药, 2015, 19(10):1841-1844.

[9] 周伟忠, 傅红兴, 吴岚岚, 等. 一种小型复方雷帕霉素栓剂的制备及其体外质量评价 [J]. 温州医科大学学报, 2015, (4): 278-280.

[10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2015 年版 [S]. 北京: 化学工业出版社, 2015; 通则 0107, 0922, 0931.

[11] 程超. 地奥司明片在治疗痔疮急性发作中的临床疗效分析 [J]. 中国冶金工业医学杂志, 2013, 30(4):384-385.

[收稿日期] 2016-12-15 [修回日期] 2017-06-05

[本文编辑] 李睿旻