

黄体酮缓释制剂在 Beagle 犬中的血药浓度测定方法的建立及其药代动力学研究

王 玥^{1,2}, 程 艺², 张 慧^{2*}, 郑爱萍^{1,2*}

(1. 徐州医科大学药学院, 江苏 徐州 221000; 2. 军事科学院军事医学研究院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要: 本研究建立了高效液相色谱串联质谱法 (LC-MS/MS), 测定 Beagle 犬体内黄体酮的血药浓度, 并进行黄体酮缓释微球在 Beagle 犬体内药代动力学的研究。以醋酸甲地孕酮为内标, 蛋白沉淀法处理血样。采用电喷雾离子化源 (ESI) 以多反应监测 (MRM) 方式进行正离子检测, 监测离子对分别为黄体酮 m/z 315.2→97.0, 内标醋酸甲地孕酮 m/z 385.2→267.1。雄性 Beagle 犬肌注黄体酮缓释微球, 于给药后不同时间点采集静脉血, 结合 WinNonlin 8.1 软件计算相关药代动力学参数。在 0.1~500.0 ng·mL⁻¹ 内, 黄体酮的线性关系良好 ($r^2 = 0.9989$); 验证样品的批内、批间精密度 (RSD) 小于 13.25%, 准确度 (RE) 在 8.92% 以内; 样品在室温放置 12 h、-20 °C 反复冻融 3 次、-20 °C 放置 60 d 条件下均稳定; 提取回收率为 71.43%~77.97%。Beagle 犬肌肉注射黄体酮缓释微球后, t_{max} 为 19.00 ± 25.36 h, C_{max} 为 137.72 ± 11.59 ng·mL⁻¹, $t_{1/2}$ 为 83.83 ± 26.43 h。药物在体内持续释放, 且呈多次连续吸收过程, 具有良好的缓释效果。本研究所建立的 LC-MS/MS 测定方法灵敏、快速、稳定, 适用于 Beagle 犬中黄体酮血药浓度的测定, 可应用于黄体酮相关制剂的临床前药代动力学的研究。动物实验方案已获得军事医学研究院动物伦理委员会的批准。

关键词: 黄体酮; 高效液相色谱串联质谱法; Beagle 犬; 缓释微球; 药代动力学

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)07-2191-06

Development of a method for determination of progesterone sustained-release formulation in Beagle dog plasma and its pharmacokinetic study

WANG Yue^{1,2}, CHENG Yi², ZHANG Hui^{2*}, ZHENG Ai-ping^{1,2*}

(1. School of Pharmacy, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221000, China; 2. Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract: A liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method was developed to determine the plasma concentration of progesterone in Beagle dogs, and apply it to the study of the pharmacokinetics of progesterone sustained-release formulation in Beagle dogs. The plasma samples were processed by protein precipitation method and megestrol acetate was used as an internal standard (IS). The quantitation analysis was performed using multiple-reaction monitoring (MRM) mode at the specific ion transitions of m/z 315.2→97.0 for progesterone and m/z 385.2→267.1 for megestrol acetate (IS) under the positive ion condition. Male Beagle dogs were injected intramuscularly with progesterone sustained-release microspheres and the plasma samples were collected at different time points after administration. The relevant pharmacokinetic parameters were calculated by WinNonlin 8.1 software. A good linearity over the range of 0.1–500.0 ng·mL⁻¹ was yielded by this method. The intra- and inter-day precision (RSD) were all less than 13.25% and the accuracy (RE)

收稿日期: 2021-11-15; 修回日期: 2021-12-08.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81573357).

*通讯作者 E-mail: zhui58@126.com; apzheng@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-1639

was within 8.92%. Stability test showed that progesterone in dog plasma was stable at room temperature for 12 h, up to 60 days at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ and after three cycles of freeze-thaw. The recovery of it ranged from 71.43%–77.97%. After intramuscular injection of progesterone sustained-release microspheres in Beagle dogs, t_{\max} was $19.00 \pm 25.36\text{ h}$, C_{\max} was $137.72 \pm 11.59\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, $t_{1/2}$ was $83.83 \pm 26.43\text{ h}$. The drug was released continuously *in vivo* and in a continuous absorption process for many times with good sustained-release effect. The method developed in this study is sensitive, rapid and stable. It is suitable for the determination of progesterone plasma concentration in Beagle dogs, and can be applied to the preclinical pharmacokinetic study of progesterone-related formulations. The animal experiment scheme of this study was approved by the Animal Ethics Committee of the Academy of Military Medical Sciences.

Key words: progesterone; LC-MS/MS; Beagle dog; sustained-release microsphere; pharmacokinetics

黄体酮 (progesterone) 是一种由肾上腺皮质、性腺、中枢神经系统和外周神经系统分泌的类固醇激素^[1], 为黄体支持的首选药物, 结构见图 1。目前黄体酮在临床上常用的给药方式为肌肉注射, 注射液的溶媒为注射用油。根据适应症的不同, 患者每日需给药 1~2 次, 用药周期长达几周甚至数月。频繁的给药及相应的肌肉刺激给患者带来一定的痛苦, 大大降低了患者的顺应性。

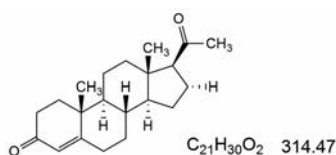


Figure 1 Chemical structure of progesterone

瑞士 Ferring 公司研发了一种新颖的混悬型黄体酮缓释注射剂 Prosphere, 首次在墨西哥上市。该制剂的溶媒为水性基质, 颗粒为球形纯药微晶, 粒径分布均一, 给药周期为 7 天, 具有良好的缓释效果^[2]。与一般黄体酮注射剂相比, 该制剂有着延长药物作用时间、降低给药频率、减少药物不良反应及提高患者依从性等特点。目前, 该产品尚未进口中国, 国内亦无仿制产品。

药代动力学是评价和筛选药物剂型的有效指标, 它贯穿于药物研发的全过程, 为临床合理用药提供科学依据, 保证用药的安全性^[3]。高效液相色谱串联质谱法 (LC-MS/MS) 作为一种特异性强、灵敏度高、分析速度快的生物样品分析方法^[4], 已成为近年来生物样品定量分析的金标准。

因此, 为全面深入了解 Prosphere 的用药效果及体内释药行为, 本研究选用 Beagle 犬进行其药代动力学研究, 并建立了一种可靠、快速和灵敏的 LC-MS/MS 方法, 测定 Beagle 犬血浆中黄体酮浓度。将该方法应用于黄体酮缓释注射剂在 Beagle 犬体内的药代动力学研究, 为黄体酮缓释制剂的后续研究提供参考。

材料与方法

药品与试剂 黄体酮标准品 (纯度 99.6%, 批号 100027-201810)、醋酸甲地孕酮标准品 (内标, 纯度 99.0%, 批号 100171-202105) (中国食品药品检定研究院); 黄体酮缓释微球注射液 (Prosphere, 批号 I 1801158, 规格 $200\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 瑞士 Ferring 公司); 乙腈 (HPLC 级, Fisher Chemical 公司); 甲酸铵 (分析纯)、甲酸 (HPLC 级) (国药集团化学试剂有限公司)。

实验动物 Beagle 犬, 3 只, 雄性, 体重 (8 ± 1) kg, 年龄约 1.0~2.0 岁, 购自北京玛斯生物技术有限公司, 许可证号 SCXK (京) 2016-0001, 由军事医学研究院动物中心一级动物房饲养。本研究动物实验方案已获得军事医学研究院动物伦理委员会的批准。

仪器 Agilent 1200 型高效液相色谱仪、Agilent G6460 型三重四极杆液质联用仪、Agilent LC/MS QQQ 质谱工作站 (美国安捷伦公司); Sigma 1-14 高速离心机 (美国 Sigma 公司); VORTEX genie-2 涡旋仪 (美国 Scientific Industries 公司); BP211D 型电子天平 (德国 Sartorius 公司); WinNonlin 8.1 统计计算软件 (美国 Pharsight 公司)。

色谱条件 色谱柱: CAPCELL PAK C18 column ($2.7\text{ }\mu\text{m} \times 2.0\text{ mm} \times 50\text{ mm}$); 流动相为乙腈溶液 A (含 0.1% 甲酸)–10 mmol·L⁻¹ 甲酸铵水溶液 B (含 0.1% 甲酸), 梯度洗脱, 洗脱程序见表 1; 柱温为 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$; 流速为 $0.35\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 进样量为 $5\text{ }\mu\text{L}$ 。

质谱条件 离子源为 ESI; 多反应监测 (MRM) 模

Table 1 Mobile phase gradient elution conditions. A: Acetonitrile solution (containing 0.1% formic acid); B: Ammonium formate solution ($10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, containing 0.1% formic acid)

Time / min	A%	B%
0.00	70%	30%
0.40	70%	30%
0.41	60%	40%
1.70	60%	40%
1.71	70%	30%
3.00	70%	30%

式; 离子极性: 正离子; 离子反应: 黄体酮 m/z 315.2 \rightarrow 97.0, 碎裂电压 145 V, 碰撞能量 25 V; 内标醋酸甲地孕酮 m/z 385.2 \rightarrow 267.1, 碎裂电压 120 V, 碰撞能量 16 V; 干燥气流速: 10 L \cdot min $^{-1}$; 干燥气温度: 350 $^{\circ}$ C; 雾化室压力 40 psi; 毛细管电压: 4 000 V。

标准溶液、质控溶液和内标溶液配制 精密称取 2 份黄体酮标准品和 1 份醋酸甲地孕酮标准品, 分别加乙腈溶解并稀释成 10 mg \cdot mL $^{-1}$ 的储备液, 分别用于配制黄体酮标准系列溶液、质控溶液和内标工作液。用乙腈稀释黄体酮储备液, 配制浓度为 0.1、1、5、10、20、50、100、200、500 ng \cdot mL $^{-1}$ 的标准系列溶液以及 0.1、0.2、80、400 ng \cdot mL $^{-1}$ 的定量下限、质控溶液。用乙腈稀释内标储备液, 配制浓度为 300 ng \cdot mL $^{-1}$ 的内标溶液, 备用。

血浆样品处理 取 50 μ L 血浆样品, 加入 50 μ L 内标溶液 (300 ng \cdot mL $^{-1}$), 再加入 400 μ L 乙腈, 涡旋 1 min 混匀, 13 000 r \cdot min $^{-1}$ 离心 15 min 后取 300 μ L 上清液于离心管内, 相同离心条件进行 2 次离心, 取上清液待检测分析。

方法学考察

专属性 取不同 Beagle 犬空白血浆作为基质, 按“血浆样品处理”项下操作, 制备空白血浆混内标、空白血浆混标准溶液样品。同样按“血浆样品处理”项下操作, 制备 Beagle 犬肌注给药后的血浆样品。将各样品进行 LC-MS/MS 分析, 记录图谱。

基质效应 取 Beagle 犬的空白血浆 50 μ L, 按“血浆样品处理”项下操作, 在二次离心前, 分别加入 50 μ L 的低、高浓度的质控溶液及内标溶液, 涡旋混匀后, 进行二次离心, 取上清进行 LC-MS/MS 分析。每个浓度配制 6 份样品 (不同来源 Beagle 犬血浆), 计算黄体酮与内标物的峰面积比 A。以乙腈代替空白血浆, 配制上述相同浓度的含有黄体酮及内标物的纯溶液样品, 进行 LC-MS/MS 分析, 每个浓度配制 6 份样品, 计算黄体酮与内标物的峰面积比 B。两者峰面积比的比值即为基质效应值。

标准曲线与定量下限 取空白血浆 50 μ L, 分别加入标准系列溶液及内标溶液 50 μ L, 按“血浆样品处理”项下操作, 进行 LC-MS/MS 分析。以黄体酮的浓度为横坐标, 黄体酮与内标物峰面积比值为纵坐标, 使用最小二乘法进行线性回归运算, 得到标准曲线, 标准曲线的最低点即为定量下限。

准确度与精密度 按“血浆样品处理”项下操作, 分别制备定量下限和低、中、高浓度质控样品, 每个浓度配制 5 份样品, 共 3 批, 连续 3 d 进行分析检测, 并随测定标准曲线。由标准曲线计算出各样品浓度, 考察方法的准确度与精密度。

样品稳定性考察 考察低、高浓度质控样品在各条件下的稳定性, 包括室温放置 12 h、 -20 $^{\circ}$ C 反复冻融 3 次、 -20 $^{\circ}$ C 放置 60 d。计算测得浓度与标示浓度的偏差。

提取回收率 按“血浆样品处理”项下操作, 分别制备低、中、高浓度质控样品, 每个浓度配制 6 份样品, 计算黄体酮与内标物的峰面积比 C。另取空白血浆 50 μ L, 预处理后, 在二次离心前, 分别加入 50 μ L 的低、中、高浓度的质控溶液及内标溶液, 涡旋混匀后, 进行二次离心, 取上清进行 LC-MS/MS 分析, 每个浓度配制 6 份样品, 计算黄体酮与内标物的峰面积比 D。两者峰面积比的比值即为提取回收率。

稀释可靠性 制备定量上限 (500 ng \cdot mL $^{-1}$) 血浆样品, 用空白血浆稀释 10 倍后, 按“血浆样品处理”项下操作, 进行 LC-MS/MS 分析, 平行测定 5 份, 考察稀释的可靠性。

黄体酮缓释制剂的药代动力学

试验设计及样品采集 选择体重相近的 Beagle 犬 ($n=3$) 在标准实验环境下, 给药前一晚禁食, 自由进水。在犬大腿右侧肌肉注射 Prosphere 1 mL (约含黄体酮 100 mg), 分别于给药后 15 min、30 min、1 h、2 h、4 h、6 h、8 h、12 h、24 h、2 d、3 d、5 d、7 d、9 d、12 d、15 d, 于四肢静脉交替采血 1 mL 于抗凝管中, 6 000 r \cdot min $^{-1}$ 离心 10 min, 提取血浆, 于 -20 $^{\circ}$ C 存放待检测。

样品检测及数据处理 将采集好的血样按“血浆样品处理”项下操作, 进行 LC-MS/MS 分析, 记录结果, 计算各取样时间点的血药浓度。

统计学分析 采用 WinNonlin 8.1 软件以非房室模型对数据进行处理和统计学分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

结果

1 质谱分析

以上述质谱条件分析得到待测物黄体酮及内标醋酸甲地孕酮的产物离子扫描图见图 2。

2 方法学验证

2.1 选择性 结果显示, 在该测定条件下, 黄体酮和内标物的保留时间分别为 1.344 min 和 1.311 min 左右, 在测定时间内, 血浆中药物及内标物之间无相互干扰, 相应图谱见图 3。

2.2 基质效应 结果表明, 低、高质控样品的基质效应在 93.03%~95.81% 之间, RSD 在 2.94%~6.23% 之间, 黄体酮和内标在 Beagle 犬血浆中不存在离子抑制或增强现象, 符合有关生物样品分析方法验证的要求^[5,6]。

2.3 标准曲线与定量下限 在 0.1~500.0 ng \cdot mL $^{-1}$ 内, 黄体酮的线性关系良好, 标准曲线的线性回归方程

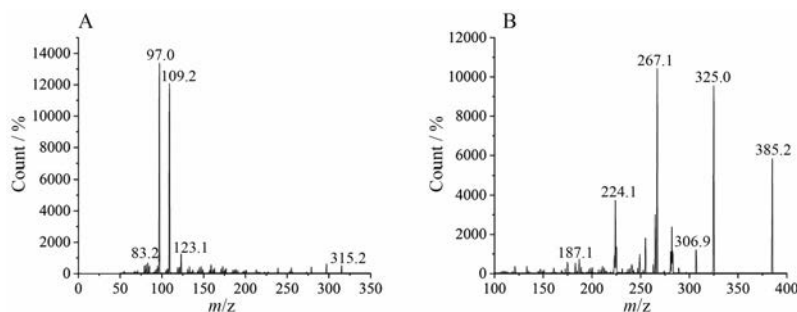


Figure 2 Production mass spectra of progesterone (A) and megestrol acetate (internal standard, IS) (B)

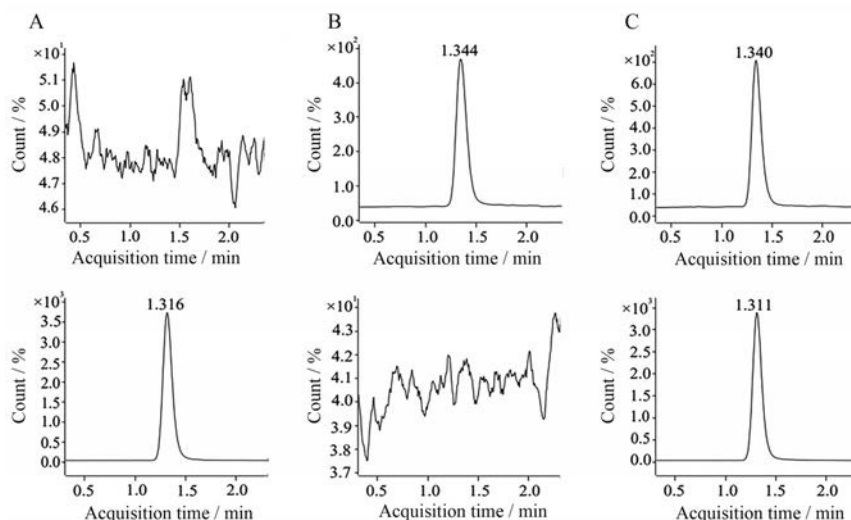


Figure 3 Representative multiple-reaction monitoring (MRM) chromatograms of progesterone (1.344 min), megestrol acetate (IS) (1.311 min). A: Blank plasma mixed IS sample; B: Blank plasma mixed standard solution sample; C: Plasma sample collected at 6 h after administration

为 $y = 0.0011x + 0.0159$ ($r^2 = 0.9989$), 定量下限为 $0.1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.4 准确度与精密度 结果见表2。定量下限样品的批内、批间精密度 (RSD) 分别为7.30%、13.25%, 准确度 (RE) 为8.92%; 低、中、高质控样品的批内、批间精密度 (RSD) 分别在4.95%~6.08%、0.12%~8.28%之间, 准确度 (RE) 在0.83%~4.85%之间, 符合生物样品分析有关要求。

2.5 稳定性考察 结果见表3, 低、高浓度质控样品在室温放置12 h、 -20°C 反复冻融3次、 -20°C 放置60 d的储存条件下, 稳定性良好。

Table 2 Precision and accuracy for the analysis of progesterone in dog plasma. RSD: Relative standard deviation; RE: Relative error

Spiked	Concentration/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$		Precision (RSD)/%		Accuracy (RE)/%
	Measured		Intra-day	Inter-day	
0.1	0.11 ± 0.01		7.30	13.25	8.92
0.2	0.21 ± 0.01		5.36	4.21	4.85
80	80.67 ± 4.91		6.08	8.28	0.83
400	416.93 ± 20.63		4.95	0.12	4.23

2.6 提取回收率 结果表明, 低、中、高3种质控样品的提取回收率分别为71.43%、77.97%和72.08%, 各浓度血浆样品的提取回收率之间差异较小。

2.7 稀释可靠性 稀释10倍后的血样样品的准确度

Table 3 Stability of progesterone in dog plasma

Storage condition	Concentration/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$		Precision (RSD)/%	Accuracy (RE)/%
	Spiked	Measured		
At room temperature for 12 h	0.2	0.19 ± 0.01	0.96	-9.78
	400	396.45 ± 51.87	2.46	13.08
Three freeze-thaw cycles	0.2	0.20 ± 0.01	5.72	-2.13
	400	361.77 ± 15.59	8.46	4.31
At -20°C in the refrigerator for 60 d	0.2	0.20 ± 0.01	0.90	10.89
	400	428.86 ± 26.60	1.12	6.20

(RE) 在 $-3.91\% \sim 2.51\%$ 之间, 精密性 (RSD) 为 2.66% 。结果表明, 血浆样品稀释后进行分析, 不影响样品测定结果的准确度和精密性。

3 药代动力学研究

以建立好的分析方法对肌注黄体酮缓释微球的 Beagle 犬的血样进行检测, 其平均血药浓度-时间曲线见图 4。用 WinNonlin 8.1 软件进行非房室模型分析, 相应的药代动力学参数见表 4。结果表明, 黄体酮缓释微球在 Beagle 犬体内可缓慢释放, C_{\max} 为 $137.72 \pm 11.59 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, $t_{1/2}$ 为 $83.83 \pm 26.43 \text{ h}$, t_{\max} 为 $19.00 \pm 25.36 \text{ h}$ 。

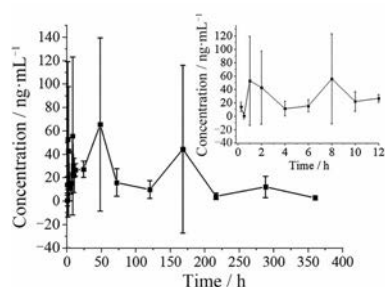


Figure 4 Mean plasma concentration-time profile of progesterone after intramuscular injection of progesterone sustained release microspheres in Beagle dogs

Table 4 The pharmacokinetic parameters of progesterone after intramuscular injection of progesterone sustained release microspheres in Beagle dogs

Parameter	Plasma progesterone
$C_{\max}/\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	137.72 ± 11.59
t_{\max}/h	19.00 ± 25.36
$\text{AUC}_{0-t}/\text{h}\cdot\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	$7\,319.22 \pm 5\,724.78$
$\text{AUC}_{0-\infty}/\text{h}\cdot\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	$7\,013.81 \pm 5\,661.67$
$\text{MRT}_{0-t}/\text{h}\cdot\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	142.75 ± 12.13
$\text{MRT}_{0-\infty}/\text{h}$	121.57 ± 23.48
$t_{1/2}/\text{h}$	83.83 ± 26.43

讨论

黄体酮为弱碱性药物, 甲酸的加入可酸化黄体酮, 促进其离子化^[7], 在增强其响应、提高灵敏度的同时, 可一定程度地减少基质效应的影响^[8]; 由于甲酸易挥发, 甲酸铵缓冲液的加入可防止因流动相中酸的挥发所引起的色谱行为的改变, 有效改善待测物的峰形。因此, 本方法采用乙腈溶液 (含 0.1% 甲酸) $-10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲酸铵水溶液 (含 0.1% 甲酸) 为流动相。以梯度洗脱的方式, 有效改善了峰的拖尾现象, 且使每个样品在 3 min 内即可完成分析, 大大减少了分析测定时间, 适用于大批量血浆样品的测定。正离子的检测模式适用于碱性样品的检测, 因此, 本方法采用正离子检测模式

对血浆样品中的黄体酮进行测定。

在进行体内药代动力学研究的过程中, 样品处理是必不可少的步骤, 其影响方法的分析速度、准确性及灵敏度^[9]。本研究以乙腈为蛋白沉淀剂, 体积比为 $1:9$, 对血浆进行蛋白沉淀。结果显示该方法可有效去除血浆中的大部分蛋白, 减少基质效应的产生, 且该处理方式操作简便快速、成本低廉, 适合批量操作。对蛋白沉淀且离心后的上清溶液进行二次离心, 可最大程度减少样品对仪器的污染。

黄体酮的适用人群主要为女性, 原则上应选择雌性 Beagle 犬进行药物体内药代动力学的研究, 但作为内源性药物, 雌性 Beagle 犬体内黄体酮浓度随生理周期和时辰做周期性波动, 变化幅度大, 且雌性 Beagle 犬体内黄体酮个体间差异也较大。为准确了解黄体酮缓释微球在体内的释药行为, 本研究选择黄体酮本底更低的雄性 Beagle 犬进行研究, 以减少重要的非实验因素对结果的影响。

本研究中所用制剂为黄体酮缓释制剂, 给药周期为 7 天, 规格为每支 200 mg 。考虑到 Beagle 犬与人体对药物吸收的差异性, 以及考察制剂给药后在体内吸收的全过程, 给予每只犬半支制剂 (1 mL , 100 mg), 并以 15 天为 1 个采血周期, 进行黄体酮缓释微球的 Beagle 犬体内药代动力学研究。

应用 LC-MS/MS 法对 Beagle 犬肌注黄体酮缓释微球制剂后的血药浓度进行测定, 结果表明, 在取样的 15 天中, 注射入 Beagle 犬体内的黄体酮缓释微球持续释放药物, 维持体内黄体酮血药浓度在一定水平。平均血药浓度-时间曲线 (图 4) 显示, 药物呈多峰谷波动, 表明该制剂在 Beagle 犬体内具有多次连续吸收的过程, 其波动趋势与黄体酮相关文献^[10-12]中所报道的相似, 与该制剂专利^[13]中所列出的药时曲线的波动趋势相吻合。微球在注射入肌肉组织后, 小粒径微球迅速被肌肉组织中丰富的血流溶解并吸收^[14], 而粒径较大的微球则在注射部位形成药物储库, 缓慢溶解、扩散、吸收, 维持血液中黄体酮的浓度在较高水平, 从而达到缓释效果。

以非房室模型计算得出该缓释制剂的 C_{\max} 为 $137.72 \pm 11.59 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 t_{\max} 为 $19.00 \pm 25.36 \text{ h}$, 但由于该药时曲线波动趋势较为特殊, 推算出的数值仅能作为部分参考^[10]。从图 3 中, 可估算出该制剂 t_{\max} 为 48 h , C_{\max} 为 $65.55 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。据文献^[15,16]报道, 部分动物的黄体酮的有效治疗血药浓度为 $2 \sim 5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。在本研究中, 微球在注射入组织后, 黄体酮血药浓度迅速达到 $5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 以上, 且在后续释药过程中, 浓度水平也基本波动在该有效范围之上, 表明该微球制剂在缓释的同

时也可保证药物的有效性。

本研究使用3只雄性Beagle犬,结果显示,血药浓度存在较大的个体差异性。当某一药物的个体内变异系数CV ≥ 30%时即为高变异药物,黄体酮属于常见的高变异药物。因此,对于该类药物的个体差异性结果在不影响临床药效和安全性影响不大的情况下,可适当放宽接受范围^[17,18]。由于雄性Beagle犬自身存在一定浓度的内源性黄体酮,因此,血药浓度在达到最大值之后,虽在缓慢降低,但也并未能达到完全消除。为客观评价药物体内浓度,应设立空白对照组,与给药犬在同一时间进行血样的采集,来评估由于外源性抑制剂引起的体内黄体酮药物浓度的变化。

随着我国生育政策的逐步放开,高龄产妇显著增加,黄体酮是治疗先兆流产及体外受精-胚胎着床的必备药物,通常,这些适应症需要高剂量和长期服用黄体酮进行治疗。因此,研发高效缓释的黄体酮制剂尤为重要。本研究对墨西哥上市的黄体酮缓释微球注射液Prosphere进行了Beagle犬药代动力学研究,深入了解该制剂的体内释药行为,并成功开发一种专属性强、灵敏度高、准确性好的LC-MS/MS分析方法,可有效检测Beagle犬体内黄体酮的血药浓度,为今后黄体酮相关缓释制剂的研发提供了新的方法及评价依据。

作者贡献: 王玥负责设计实验、实验操作、数据分析、文章撰写和返修;程艺负责动物实验血浆样品采集;张慧和郑爱萍提供了实验平台、文章选题设计和文章质量的把关和校审。

利益冲突: 所有作者声明无任何利益冲突。

References

- [1] Goletiani NV, Keith DR, Gorsky SJ. Progesterone: review of safety for clinical studies [J]. *Exp Clin Psychopharmacol*, 2007, 15: 427-444.
- [2] Roberto BE, Manuel CB, Rosalba AC, et al. Observational study of the local tolerability of injectable progesterone microspheres [J]. *Gynecol Obstet Invest*, 2012, 73: 124-129.
- [3] Li JL, Cui MX, Zhang ZQ, et al. The significance and role of pharmacokinetics in drug development [J]. *Pharm J Chin PLA (解放军药学报)*, 2010, 26: 258-261.
- [4] Koal T, Schmiederer D, Hai PT, et al. Standardized LC-MS/MS based steroid hormone profile-analysis [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2012, 129: 129-138.
- [5] National Food and Drug Administration. Technical Guide-lines for Nonpharmacologic Pharmacokinetics of Drugs (药物非临床药代动力学研究技术指导原则) [S]. CFDA, 2014 [2020-05-21]. <https://wenku.baidu.com/view/3314aaadcad376eeaeaad1f34693daef5ef71320.html>.
- [6] Chinese Pharmacopoeia Commission. Guiding Principles for Quantitative Analysis of Biological Samples (生物样品定量分析方法验证指导原则) [S]//Chinese Pharmacopoeia (中国药典), 2020 Ed. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020.
- [7] Gu TT, Zhao WH, Gao XL. LC-MS/MS determination of progesterone in Beagle plasma and its Pharmacokinetics [J]. *Chin J Pharm Anal (药物分析杂志)*, 2011, 31: 6-12.
- [8] Yao MK, Ma BL, Ma YM. Overview of the matrix effects in quantitative liquid chromatography/mass spectrometry analysis of biological samples [J]. *Chin J Pharm Anal (药物分析杂志)*, 2010, 30: 2436-2440.
- [9] Dong JC, Zeng LL, Wang X, et al. Progress on application of biological sample pretreatment technology in pharmacokinetic research [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol (中药新药与临床药理)*, 2018, 29: 110-117.
- [10] Tuleu C, Newton M, Rose J, et al. Comparative bioavailability study in dogs of a self-emulsifying formulation of progesterone presented in a pellet and liquid form compared with an aqueous suspension of progesterone [J]. *J Pharm Sci*, 2004, 93: 1495-1502.
- [11] Salem HF. Sustained-release progesterone nanosuspension following intramuscular injection in ovariectomized rats [J]. *Int J Nanomedicine*, 2010, 5: 943-954.
- [12] Li L, Li W, Sun J, et al. Preparation and evaluation of progesterone nanocrystals to decrease muscle irritation and improve bioavailability [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2018, 19: 1254-1263.
- [13] Jones GF, Lola LS, Jones GP, et al. Preparation method of pharmaceutical composition for parenteral injection: CN, 91104859.6 [P]. 2000-07-28.
- [14] Pu C, Qiao W, Zhang H, et al. *In vitro-in vivo* relationship of amorphous insoluble API (progesterone) in PLGA microspheres [J]. *Pharm Res*, 2017, 34: 2787-2797.
- [15] Jameela SR, Kumary TV, Lal AV, et al. Progesterone-loaded chitosan microspheres: a long acting biodegradable controlled delivery system [J]. *J Control Release*, 1998, 52: 17-24.
- [16] Deluca PP, Mehta RC, Hausberger AG, et al. Biodegradable Polyesters for Drug and Polypeptide Delivery [M]. Washington, DC: ACS Symposium Series American Chemical Society, 1993: 53-79.
- [17] He CY, Sun H, Xie HT. Bioequivalence test and quantitative evaluation of highly variable drugs [J]. *Chin J Clin Pharmacol Ther (中国临床药理学与治疗学)*, 2016, 21: 721-730.
- [18] Zhu FC, Wang AG, Han F, et al. Investigation of FDA issued guidance for Bioequivalence Recommendations for Specific Products related with high variable drugs [J]. *Chin J Drug Eval (中国药物评价)*, 2016, 33: 397-401.