

## LC-MS/MS 法测定 SD 大鼠血浆中紫杉醇前药含量及其在临床前药代动力学研究中的应用

王国才, 王相宜, 肖聪聪, 黄建鹏, 郁 萌, 贺玖明\*

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 国家药品监督管理局创新药物安全研究与评价重点实验室, 北京 100050)

**摘要:** 本实验建立了一种液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS) 法快速、灵敏测定 Sprague-Dawley (SD) 大鼠血浆中紫杉醇前药 (Pro-PTX) 及紫杉醇 (PTX) 的浓度。血浆样本以乙腈 (0.1% 甲酸) 沉淀蛋白后, 选用 Ultimate AQ-C18 色谱柱 (50 mm × 3.0 mm, 3 μm), 以乙腈-1 mmol·L<sup>-1</sup> 甲酸铵 (含 0.1% 甲酸) 为流动相, 选用三重四极杆串联质谱仪的多重反应监测 (MRM) 扫描方式进行监测, 选择监测离子反应分别为  $m/z$  983.4→415.2 (Pro-PTX)、 $m/z$  854.4→286.1 (PTX) 和  $m/z$  808.3→527.2 (多西他赛, 内标)。方法验证结果表明, 血浆中 Pro-PTX 和 PTX 的线性范围分别为 2.00~500 ng·mL<sup>-1</sup> ( $r > 0.99$ ) 和 4.00~1 000 ng·mL<sup>-1</sup> ( $r > 0.99$ ), 定量下限分别为 2.00 和 4.00 ng·mL<sup>-1</sup>; Pro-PTX 和 PTX 低、中、高三浓度的质控样本批内、批间相对标准差 (RSD) 均小于 9%; 相对偏差 (RE) 均在 ±9% 的范围以内; 稳定性实验中, 血浆中 Pro-PTX 和 PTX 在各种贮存条件下均稳定。本方法灵敏度高, 专属性、重现性好, 成功用于 Pro-PTX 在大鼠中的药代动力学研究。本研究中实验动物的使用已获得中国医学科学院药物研究所实验动物管理与动物福利伦理委员会批准 (批号: 00003552)。

**关键词:** 紫杉醇; 前药; 液相色谱-串联质谱联用法; 临床前药代动力学

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)09-2798-07

## Determination of paclitaxel prodrug in SD rat plasma by LC-MS/MS and its application in preclinical pharmacokinetic studies

WANG Guo-cai, WANG Xiang-yi, XIAO Cong-cong, HUANG Jian-peng, YU Meng, HE Jiu-ming\*

(State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, NMPA Key Laboratory for Safety Research and Evaluation of Innovative Drug, Beijing 100050, China)

**Abstract:** A fast and sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for the determination of prodrug of paclitaxel (Pro-PTX) and paclitaxel (PTX) in rat plasma was developed. The plasma samples were subjected to protein precipitation with acetonitrile (0.1% formic acid), and then separated by LC with an Ultimate AQ-C18 column (50 mm × 3.0 mm, 3 μm) and acetonitrile-1 mmol·L<sup>-1</sup> ammonium formate (containing 0.1% formic acid) as the mobile phase. Multiple reaction monitoring (MRM) scanning mode was used to detect the ion responses  $m/z$  983.4→415.2 (Pro-PTX),  $m/z$  854.4→286.1 (PTX) and  $m/z$  808.3→527.2 (Docetaxel, internal standard) by using a triple quadrupole tandem mass spectrometer with electrospray ionization source and positive ion mode. The method validation results show that the linear ranges of Pro-PTX and PTX in plasma were 2.00–500 ng·mL<sup>-1</sup> ( $r > 0.99$ ) and 4.00–1 000 ng·mL<sup>-1</sup> ( $r > 0.99$ ), the lower limit of quantification was 2.00 ng·mL<sup>-1</sup> and

收稿日期: 2022-03-30; 修回日期: 2022-06-23.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81974500, 81773678); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程资助项目 (2021-1-12M-026).

\*通讯作者 Tel: 86-10-63165218, E-mail: hejiuming@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0381

4.00 ng·mL<sup>-1</sup>, respectively; the quality control samples with low, medium and high concentrations of Pro-PTX and PTX were within the batch, the relative standard deviation (RSD) between batches were all less than 9%; the relative deviation (RE) was within the range of ± 9%; In the stability test, both Pro-PTX and PTX in plasma were stable under various storage conditions. The method was sensitive, specific, and reproducible, and was suitable for the pharmacokinetic study of Pro-PTX in rats. Animal experiments were approved by the Ethics Committee of Laboratory Animal Management and Animal Welfare, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences (No.: 00003552).

**Key words:** paclitaxel; prodrug; LC-MS/MS; preclinical pharmacokinetics

许多细胞毒类抗癌药物是通过非特异性亲脂性相互作用进入细胞膜,且优先选择具有较高增殖或代谢率的细胞。然而,这些条件不仅是肿瘤细胞的特征,但也有许多健康细胞,例如骨髓、消化系统上皮和毛囊等的特性。因此,抗癌药物的治疗指数通常很低,显著的不良反应可能会影响治疗结果<sup>[1]</sup>。

紫杉醇是从红豆杉中提取的天然抗肿瘤药物,主要作用于细胞微管,抑制细胞的分裂和增殖,从而发挥抗肿瘤作用。在临床上广泛应用于乳腺癌、胰腺癌、卵巢癌、肺癌等多种实体肿瘤的治疗,具有较好的治疗效果,但同时也具有较大的毒性。由于紫杉醇是水不溶性药物,上市制剂紫杉醇注射液将紫杉醇溶于聚氧乙烯蓖麻油和无水乙醇混合制得。聚氧乙基代蓖麻油为一种抗原物,进入机体后可刺激机体产生免疫反应,引起患者血压下降、心率加快、毛细血管通透性增加等严重过敏反应<sup>[2-5]</sup>。

目前,已经有很多报道的针对紫杉醇前药的修饰策略,包括增加水溶性、小分子或大分子靶向策略<sup>[6]</sup>。结合紫杉醇的结构特点以及构效关系,研究人员对C-2'羟基进行了结构修饰,并采用质谱成像技术对其进行了小鼠体内分布研究,结果表明其明显在肿瘤组织聚集<sup>[7]</sup>。体内药效结果表明,其能够明显降低毒性。基于前期研究,本研究建立并验证了液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)分析方法,定量检测大鼠血浆中紫杉醇前药 {Pro-PTX; 2-((((2R)-1-苯甲酰胺基-3-((2aR, 4aS,6R,9S,11S,12S,12bS)-6,12b-二乙酰氧基-12-(苯甲酰氧基)-4,11-二羟基-4a,8,13,13-四甲基-5-氧代-2a,3,4,4a, 5,6,9,10,11,12,12a,12b-十二氢-7,11-亚甲基-1H-环癸并[3,4]苯并[1,2-b]氧杂丁环-9-基)氧)-3-氧代-1-苯丙基-2-基)氧)羰基)氧)-氮,氮,氮-三甲基乙烷-1-铵盐} 及紫杉醇(PTX)的含量,为其临床前药代动力学评价研究奠定基础<sup>[8-12]</sup>。

## 材料与amp;方法

**仪器设备** QTRAP 5500型三重四极杆串联质谱仪:美国 Applied Biosystems 公司产品,配有电喷雾离

子化源(ESI)以及 Analyst 1.6.3 数据处理软件; Nexera XR 液相色谱仪:日本 Shimadzu 公司产品,包括 LC-20AD<sub>XR</sub>型二元泵, DGU-20A<sub>3R</sub>型脱气机, SIL-20AC型自动进样器, CTO-20AC型柱温箱; Sigma 3-30K 台式高速离心机:德国 Sartorius Stedim Biotech 公司产品。

**药品和试剂** 对照品: Pro-PTX (含量: 98.36%; 批号: E01324-16892-070-A1), 由桑迪亚医药技术(上海)有限责任公司提供; PTX (批号: L870T13; 含量: 98%), 北京百灵威科技有限公司。内标: 多西他赛, 购自中国食品药品检定研究院。甲醇、乙腈、甲酸为色谱纯(Fisher 公司), 水为娃哈哈纯净水, 其他试剂均为分析纯。

**HPLC-MS/MS 条件** 色谱柱: Ultimate AQ-C18 柱(50 mm × 3.0 mm, 5 μm, 月旭科技); 流动相: 乙腈(B)-1 mmol·L<sup>-1</sup> 甲酸铵(含 0.1% 甲酸, A), 梯度洗脱程序: 起始比例 30% B; 0~0.5 min, 50% B; 0.5~1 min, 60% B; 1.0~2.0 min, 95% B; 2.0~3.5 min, 95% B; 3.5~3.51 min, 30% B; 流速: 0.4 mL·min<sup>-1</sup>; 柱温: 室温; 进样量: 5 μL。质谱条件: 电喷雾离子化源; 离子喷射电压: 5 500 V; 温度: 550 °C; 源内气体 1(GS1, N<sub>2</sub>) 压力: 65 psi; 气体 2(GS2, N<sub>2</sub>) 压力: 60 psi; 帘气(N<sub>2</sub>) 压力: 30 psi; 正离子方式监测; 扫描方式为多重反应监测(MRM); 用于定量分析的离子反应分别为 *m/z* 983.4→415.2 (Pro-PTX)、*m/z* 854.4→286.1 (PTX) 和 *m/z* 808.3→527.2 (多西他赛), 解簇电压(DP) 均为 100 V, 碰撞能量(CE) 分别为 52、22 和 13 eV; 碰撞气(CAD, N<sub>2</sub>) 压力: Medium; Q1 和 Q3 分辨率均为 UNIT。

**标准曲线和质控储备液的配制** 分别精密称/量取 Pro-PTX 和 PTX 对照品, 加甲醇溶解, 配制成 1 mg·mL<sup>-1</sup> 的储备液。

**标准曲线工作溶液的配制** 分别取适量 Pro-PTX 和 PTX 储备液, 用甲醇(含 0.1% 甲酸), 稀释成 Pro-PTX/PTX 质量浓度分别为 40.00/80.00、80.00/160.00、200.00/400.00、500.00/1 000.00、1 000.00/2 000.00、5 000.00/10 000.00、9 000.00/18 000.00 和 10 000.00/20 000.00 ng·mL<sup>-1</sup> 的标准曲线工作溶液。

**标准曲线样本的配制** 取不同浓度的标准曲线工作液各 5  $\mu\text{L}$ , 分别加入空白血浆基质 95  $\mu\text{L}$ , 配制成 Pro-PTX/PTX 质量浓度分别为 2.00/4.00、4.00/8.00、10.00/20.00、25.00/50.00、50.00/100.00、250.00/500.00、450.00/900.00 和 500.00/1 000.00  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  的标准曲线样本 (Cal. 1、Cal. 2、Cal. 3、Cal. 4、Cal. 5、Cal. 6、Cal. 7、Cal. 8)。按样本前处理流程处理。

**质控 (QC) 工作溶液的配制** 分别取适量 Pro-PTX 和 PTX 储备液, 用甲醇 (含 0.1% 甲酸), 稀释成 Pro-PTX/PTX 质量浓度分别为 120.00/240.00、3 000.00/6 000.00 和 8 000.00/16 000.00  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  的 QC 工作溶液。

**质控样本的配制** 取不同浓度的质控工作液各 5  $\mu\text{L}$ , 分别加入空白血浆基质 95  $\mu\text{L}$ , 配制成 Pro-PTX/PTX 质量浓度分别为 6.00/12.00、150.00/300.00、400.00/800.00 的质控样本。按样本前处理流程处理。

**内标溶液的配制** 精确取 50  $\mu\text{L}$  多西他赛储备液 (1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 甲醇含 0.1% FA), 加入于 9.95 mL 甲醇 (含 0.1% 甲酸), 配制成多西他赛质量浓度为 5.00  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的内标溶液, 于 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存。

**血浆样本处理** 取血浆 50  $\mu\text{L}$ , 分别加入内标溶液 50  $\mu\text{L}$ , 乙腈 (含 0.1% 甲酸) 200  $\mu\text{L}$ , 涡流 1 min, 14 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 2 min, 取 200  $\mu\text{L}$  上清于进样瓶中进行 LC-MS/MS 分析。

#### 方法学验证

**特异性** 分别取 6 个不同来源的 SD 大鼠空白血浆各 50  $\mu\text{L}$ , 以等体积的甲醇 (含 0.1% 甲酸) 代替内标溶液, 按“血浆样本处理”项操作, 进行 LC-MS/MS 分析。

**基质效应和提取回收率** ① 纯溶液 (Neat-QC) 样本 (a): 取 95  $\mu\text{L}$  水, 加入 5  $\mu\text{L}$  质控工作液 (低、高浓度) 和 100  $\mu\text{L}$  内标工作液, 400  $\mu\text{L}$  乙腈 (含 0.1% 甲酸), 涡旋混匀后, 进行 LC-MS/MS 分析。每浓度 6 个平行样本; ② 提取后加标 (Unex-QC) 样本 (b): 取 190  $\mu\text{L}$  空白血浆, 加入 10  $\mu\text{L}$  甲醇 (含 0.1% 甲酸), 200  $\mu\text{L}$  稀释液, 800  $\mu\text{L}$  乙腈 (含 0.1% 甲酸), 涡旋混匀, 14 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 2 min, 取上清 495  $\mu\text{L}$ , 加入 5  $\mu\text{L}$  质控工作液 (低、中、高浓度) 和 100  $\mu\text{L}$  内标溶液, 涡旋混匀后进行 LC-MS/MS 分析。每浓度 6 个平行样本; ③ 提取前加标 (Ex-QC) 样本 (c): 同质控样本处理过程, 每个浓度 6 个平行样本。对于每批基质, 通过计算基质存在下单样本响应值 (b) 与不含基质的相应浓度 6 个 (a) 样本响应值均值的 (待测物和内标的纯溶液) 比值来计算每一待测物和内标的基质因子。进一步通过待测物的基质因子除以内标的基质因子, 计算经内标归一化的基质因子。

**标准曲线和定量下限** 取标准曲线样本 50  $\mu\text{L}$ , 按

“血浆样本处理”项操作, 以血浆中待测物浓度为横坐标, 待测物与内标的峰面积比值为纵坐标, 用加权 ( $W = 1/x^2$ ) 最小二乘法进行回归运算, 求得的直线回归方程, 即为工作曲线。每个分析批建立一条工作曲线, 每浓度 1 个样本, 连续测定 3 个分析批。按“血浆样本处理”项操作, 处理 Pro-PTX/PTX 质量浓度为 2.00 和 4.00  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  的样本, 每个分析批 6 样本, 连续测定 3 个分析批, 以相应分析批的工作曲线计算样本的浓度, 根据测定结果计算样本的相对偏差 (RE) 以及批内、批间相对标准差 (RSD)。

**准确度与精密度** 按“血浆样本处理”项操作, 处理 Pro-PTX/PTX 低、中、高 3 个浓度 (分别为 6.00/12.00、150.00/300.00、400.00/800.00  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 的 QC 样本, 每浓度 6 样本, 连续测定 3 个分析批, 以同一分析批的工作曲线计算 QC 样本的浓度, 根据 QC 样本的测定结果计算方法的准确度与精密度。

**稳定性** 取 QC 样本 50  $\mu\text{L}$ , 分别考察血浆样本室温放置约 4 h、经 4 次冻融、 $-70^{\circ}\text{C}$  冰冻放置至少 1 个月 Pro-PTX 和 PTX 的稳定性, 每浓度平行 3 个样本。

**药代动力学研究** 动物实验程序经中国医学科学院药物研究所实验动物管理与动物福利伦理委员会批准 (批号: 00003552)。SD 大鼠, 约 6~8 周, 体重 (232.9  $\pm$  17.2) g, 购自于北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证号: SCXK (京) 2016-0011。动物实验分为两组, 一组以生理盐水为溶媒, 考察不同给药剂量时, Pro-PTX 在动物体内的药代动力学情况; 另一组以 15% 羟丙基环糊精为溶媒, 考察不同溶媒, 相同给药剂量时, Pro-PTX 在动物体内的药代动力学情况是否有差异<sup>[13-21]</sup>。

**供试品的配制** ① Pro-PTX (生理盐水组): 称取适量的 Pro-PTX, 加入所需药液体积的 5% 二甲基亚砷 (DMSO) 使药物完全溶解, 加入 5% 药液体积的 95% 乙醇, 加入 5% 药液体积的 Tween 80, 振荡并超声 30 s, 加入剩余体积的生理盐水, 超声 5~10 min, 配制成 0.6、0.9、1.2  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的 Pro-PTX 的溶液, 按 0.005  $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$  给大鼠静脉注射; ② Pro-PTX (15% 羟丙基环糊精组): 称取适量的 Pro-PTX, 加入所需药液体积的 5% DMSO 使药物完全溶解, 加入 5% 药液体积的 95% 乙醇, 加入 5% 药液体积的 Tween 80, 振荡并超声 30 s, 加入剩余体积的 15% 羟丙基环糊精, 超声 5~10 min, 配制成 1.2  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  Pro-PTX 的溶液, 按 0.005  $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$  给大鼠静脉注射。

**血样采集** 动物静脉采集全血 (约 0.4 mL) 用于药代分析。动物采血时间点: 给药前、给药后 5 min、15 min、30 min、1 h、2 h、4 h、8 h、24 h。血样采用乙二胺四乙酸二钾盐 ( $\text{K}_2\text{-EDTA}$ ) 抗凝, 在冰浴条件下进行

转运, 取血后 1 h 内完成离心, 分离血浆后于 -70 °C 以下冻存, 避免反复冻融, 血浆转运过程中使用放有碎冰或干冰的泡沫盒。

数据分析 药代动力参数采用 Phoenix WinNonlin 软件 (Version 8.0), 采用非房室模型计算获得。数据以均值±标准差形式表示。

## 结果

### 1 方法学确证

**1.1 特异性** 图 1 显示了 Pro-PTX、PTX、多西他赛 (内标) 的典型色谱图。大鼠空白血浆样本提取后色谱图见 1A; 取 Pro-PTX/PTX 质量浓度为 2.00 和 4.00 ng·mL<sup>-1</sup> 定量下限样本 (LLOQ) 50 μL, 按“血浆样本处理”项操作, 得色谱图 1B; 取 1 只动物给药后收集的血浆样本, 按“血浆样本处理”项操作, 得色谱图 1C。结果表明, Pro-PTX、PTX 和内标多西他赛的保留时间分别约为 2.20、2.60 和 2.40 min, 空白血浆中的内源性物质不干扰 Pro-PTX, PTX 和多西他赛的测定。

**1.2 基质效应和提取回收率** 测定低、高 2 个浓度血浆样本中 Pro-PTX 的基质效应分别为 (84.11 ± 6.63)% 和 (85.66 ± 5.61)%, 平均基质效应为 (84.89 ± 5.91)%; PTX 的基质效应分别为 (93.72 ± 9.92)% 和 (98.19 ± 1.94)%, 平均基质效应为 (95.95 ± 7.21)%。以样本提取前 (c) 后 (b) 待测物与内标的响应值比的比值表示, 测定低、高 2 个浓度血浆样本中 Pro-PTX 的提取回收率分别为 (98.61 ± 7.77)% 和 (103.52 ± 6.78)%, 平均提取回收率

为 (101.07 ± 7.41)%; PTX 的提取回收率分别为 (95.50 ± 10.11)% 和 (98.13 ± 1.94)%, 平均提取回收率为 (96.82 ± 7.07)%。

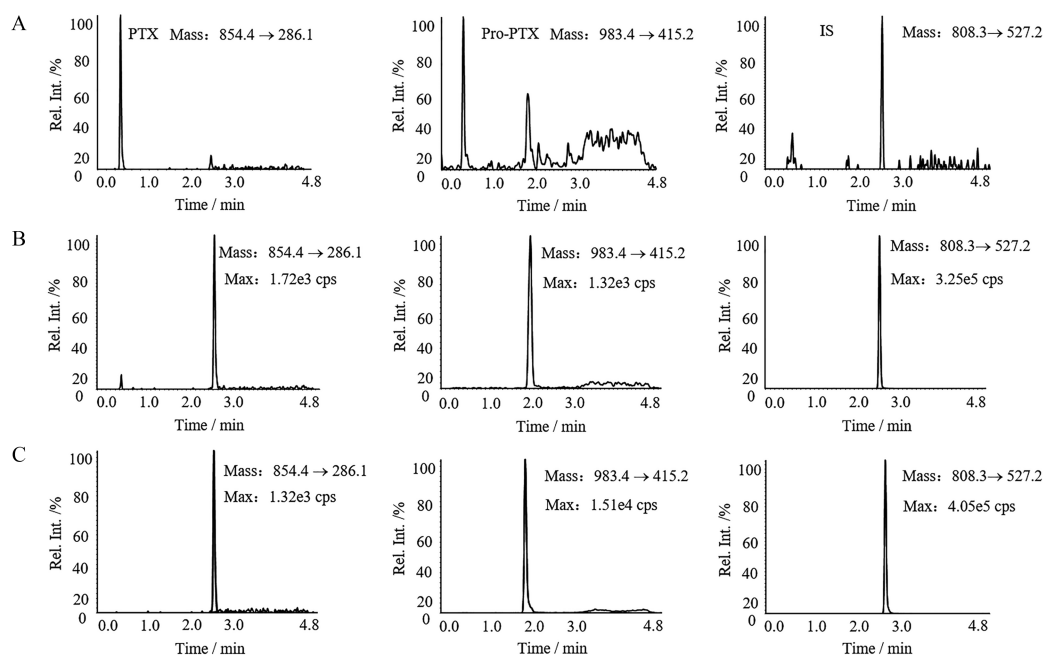
**1.3 标准曲线和定量下限** Pro-PTX 线性回归方程:  $y = 0.005\ 08X + 0.003\ 5$  ( $r = 0.993\ 8$ ), 线性范围为 2.00~500 ng·mL<sup>-1</sup>; PTX 线性回归方程:  $y = 0.004\ 86X + 0.001\ 38$  ( $r = 0.999\ 3$ ), 线性范围为 4.00~1 000 ng·mL<sup>-1</sup>。在 LLOQ 样本浓度下, Pro-PTX 和 PTX 的平均准确度偏差均在 ±15% 以内, 批内、批间 RSD 均小于 20%, 因此 Pro-PTX 和 PTX 的定量下限分别为 2.00 和 4.00 ng·mL<sup>-1</sup>。

**1.4 准确度与精密度** Pro-PTX 和 PTX 各浓度水平 QC 准确度与精密度考察结果见表 1。两个化合物准确度偏差 (RE) 均在 ±15% 以内, 批内、批间 RSD 均小于 15%。

**1.5 稳定性** Pro-PTX 和 PTX 稳定性考察结果列于表 2。两个化合物的测定浓度与理论浓度的 RE 均在 ±11% 以内, 表明在血浆样本室温放置、反复冻融 4 次、长期 -70 °C 冰冻放置过程中, Pro-PTX 和 PTX 均较为稳定, 各贮存条件不影响对样本浓度进行准确测定。

### 2 SD 大鼠静脉注射不同剂量 Pro-PTX 后血浆药代动力学研究

采用生理盐水溶解的 Pro-PTX 实验组, 3、4.5 和 6 mg·kg<sup>-1</sup> 三个剂量组分别静脉注射给药后, Pro-PTX 平均血药浓度-时间曲线见图 2, 主要药代动力学参数药时曲线下面积 (AUC<sub>0-t</sub>) 分别为 4 335.62 ± 508.06、7 866.95 ± 2 834.53 和 15 186.37 ± 6 596.38 ng·h·mL<sup>-1</sup>,



**Figure 1** Chromatograms of paclitaxel (PTX), prodrug of paclitaxel (Pro-PTX) and docetaxel. A: Blank plasma; B: PTX and Pro-PTX standard curve sample (2.00 ng·mL<sup>-1</sup>); C: Plasma sample from an animal 0.5 h after intravenous administration of 6 mg·kg<sup>-1</sup> Pro-PTX

**Table 1** Results of precision and accuracy for the determination of Pro-PTX and PTX in rat plasma.  $n = 18, \bar{x} \pm s$ 

Compound	Storage condition/ng·mL <sup>-1</sup>	Nominal concentration /ng·mL <sup>-1</sup>	RE/%	Inter-day RSD	Intra-day RSD
Pro-PTX	6.00	6.50 ± 0.45	-8.31	4.83%-7.63%	6.87%
	150.00	162.83 ± 12.80	-8.56	5.88%-8.51%	7.86%
	400.00	399.83 ± 23.66	0.04	3.48%-4.27%	5.92%
PTX	12.00	12.07 ± 0.92	-0.60	2.33%-8.78%	7.62%
	300.00	307.61 ± 22.21	-2.54	4.32%-8.44%	7.22%
	800.00	755.94 ± 64.31	5.51	4.97%-7.61%	5.51%

**Table 2** Results of stability studies of Pro-PTX and PTX in rat plasma under various storage conditions.  $n = 3, \bar{x} \pm s$ 

Compound	Storage condition	Nominal concentration/ng·mL <sup>-1</sup>	Measured concentration/ng·mL <sup>-1</sup>	RE/%
Pro-PTX	Room temperature for 4 h	6.00	6.09 ± 0.22	1.56
		150.00	156.33 ± 14.43	4.22
		400.00	430.33 ± 36.61	7.58
	-70 °C freeze-thaw four cycle	6.00	6.51 ± 0.35	8.50
		150.00	155.33 ± 3.21	3.56
		400.00	408.67 ± 18.72	2.17
	-70 °C long-term stability, 42 d	6.00	6.66 ± 0.15	11.06
		150.00	159.33 ± 6.66	6.22
		400.00	405.33 ± 4.93	1.33
PTX	Room temperature for 4 h	12.00	11.88 ± 0.37	-1.00
		300.00	312.59 ± 22.69	4.20
		800.00	870.97 ± 71.37	8.87
	-70 °C freeze-thaw four cycle	12.00	13.34 ± 1.12	11.14
		300.00	307.12 ± 17.25	2.37
		800.00	810.43 ± 40.13	1.30
	-70 °C long-term stability, 42 d	12.00	11.86 ± 0.18	-1.14
		300.00	304.10 ± 12.50	1.37
		800.00	789.34 ± 15.13	-1.33

AUC<sub>0-∞</sub> 分别为 4 341.26 ± 508.52、7 873.04 ± 2 832.62 和 15 193.78 ± 6 597.72 ng·h·mL<sup>-1</sup>, 达峰浓度 (C<sub>max</sub>) 分别为 12 475.00 ± 2 090.26、19 616 ± 6 328.80 和 32 541.67 ± 16 226.41 ng·mL<sup>-1</sup>, 半衰期 (t<sub>1/2</sub>) 分别为 1.07 ± 0.45、0.74 ± 0.19 和 1.78 ± 1.78 h。PTX 主要药代动力学参数 AUC<sub>0-t</sub> 分别为 285.00 ± 20.62、238.78 ± 51.39 和 916.47 ± 493.36 ng·h·mL<sup>-1</sup>, AUC<sub>0-∞</sub> 分别为 313.24 ± 25.00、339.83 ± 82.97 和 2 158.66 ± 2 377.09 ng·h·mL<sup>-1</sup>。

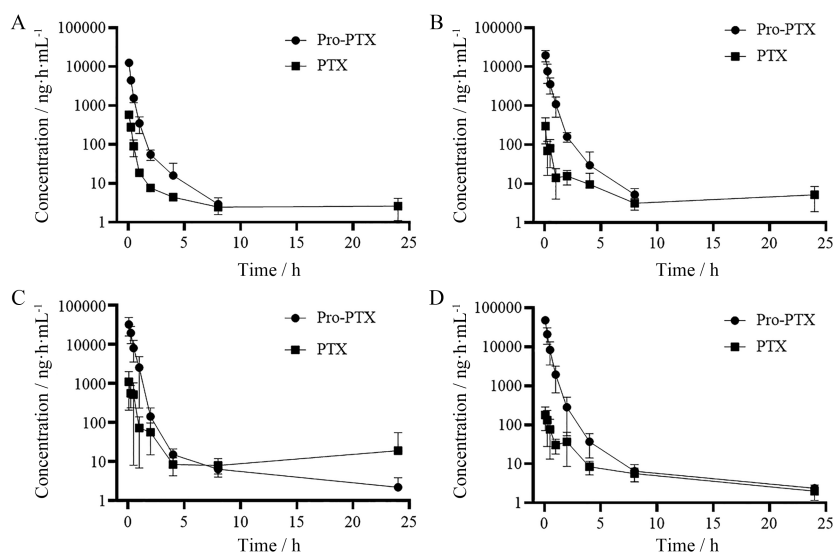
采用 15% 羟丙基环糊精水溶液溶解的 Pro-PTX 实验组, 6 mg·kg<sup>-1</sup> 静脉注射给药后, Pro-PTX 平均血药浓度-时间曲线见图 2D, 主要药代动力学参数 AUC<sub>0-t</sub> 为 18 740.97 ± 5 038.95 ng·h·mL<sup>-1</sup>, AUC<sub>0-∞</sub> 为 18 750.28 ± 5 039.11 ng·h·mL<sup>-1</sup>, C<sub>max</sub> 为 48 016.67 ± 4 407.00 ng·mL<sup>-1</sup>, t<sub>1/2</sub> 为 1.19 ± 0.55 h。PTX 主要药代动力学参数 AUC<sub>0-t</sub> 为 265.79 ± 92.62 ng·h·mL<sup>-1</sup>, AUC<sub>0-∞</sub> 为 297.19 ± 100.03 ng·h·mL<sup>-1</sup>。

## 讨论

Pro-PTX 在不同给药剂量下, 动物体内暴露量 AUC<sub>0-t</sub> 比值约 1:1.8:3.5, C<sub>max</sub> 比值约 1:1.6:2.6, 体内暴露量与给药剂量的增加而增加。以血药浓度的对数与时间作图, 曲线呈现两段消除, 表明 Pro-PTX 进入体内

后, 可能按多室模型进行分布和消除。对 Pro-PTX 给药剂量为 6 mg·kg<sup>-1</sup> 时, 不同溶媒的 AUC<sub>0-t</sub>, 采用 SPSS 25 进行差异性分析。采用两组独立样本 Wilcoxon 秩和检验进行统计分析,  $P > 0.05$ , 表明不同溶媒时, Pro-PTX 在体内的暴露量差异无统计学意义<sup>[22-28]</sup>。

Pro-PTX 含有酯键, 其在血浆中稳定性较差。本方法建立过程中, 考察了冰水浴、加入酯酶抑制剂、调节血浆 pH 值等条件, 最终确定同时含有酯酶抑制剂氟化钠 (NaF, 约 2 mg·mL<sup>-1</sup>) 和含 0.1% 的甲酸时, Pro-PTX 的稳定性最好。此条件下, PTX 亦能够保持稳定性。PTX 极性小, 溶解性差, 而经过化学结构改造的 Pro-PTX, 溶解性得到了改善, 且极性较大。两种极性相差较大的化合物, 用同一种前处理方法从生物基质中提取出来, 对于检测方法的建立, 将是一种挑战<sup>[29-32]</sup>。本文以甲基叔丁基醚作为提取试剂, 采用液液萃取方法对血浆中 Pro-PTX 和 PTX 进行提取, 发现 Pro-PTX 和 PTX 的提取效果均很差。结合灵敏度、回收率、基质效应等因素, 最终确定含 0.1% 甲酸的乙腈作为沉淀剂, 以 4 倍血浆体积的量对血浆进行沉淀处理后, 直接离心取上清进行检测分析。基质效应、回收率等的变异系数均能控制在 15% 以内, 方法的精密度和准确度良好。



**Figure 2** Mean plasma concentration-time graph at the dose of  $3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  (A),  $4.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  (B),  $6 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  (C) and  $6 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  with hydroxypropyl cyclodextrin as vehicle (D)

**作者贡献:** 王国才负责实验方案设计与实施和论文撰写; 王相宜、肖聪聪、黄建鹏和郁萌负责实验施行、数据采集和核对; 贺玖明负责基金获得、实验监督及论文审阅。

**利益冲突:** 所有作者均声明不存在利益冲突。

## References

- [1] Hou K, Wang F, Yang P. Population pharmacokinetic model of paclitaxel for cancer patients in Inner Mongolia of China [J]. *Anti-tumor Pharm (肿瘤药理学)*, 2020, 10: 691-697.
- [2] Fan RR, Wang ZM, Zhang H, et al. Preparation, *in vitro* characterization and pharmacokinetics of paclitaxel thermosensitive gel [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2022, 57: 2197-2205.
- [3] Ma L, Shi JF, Tong N. Adverse reactions of paclitaxel drugs [J]. *China Pharm (中国药房)*, 2018, 29: 3014-3017.
- [4] Shangguan DG, Chen XJ, Yang J, et al. The research of  $^{11}\text{C}$ -choline diagnostic value for brain metastases [J]. *Anti-tumor Pharm (肿瘤药理学)*, 2021, 11: 346-349.
- [5] Grigoletto A, Martinez G, Gabbia D, et al. Folic acid-targeted paclitaxel-polymer conjugates exert selective cytotoxicity and modulate invasiveness of colon cancer cells [J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13: 929.
- [6] Meng ZY, Lv QX, Lu J, et al. Prodrug strategies for paclitaxel [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17: 796-818.
- [7] Zhang J, Du QQ, Song XW, et al. Evaluation of the tumor-targeting efficiency and intratumor heterogeneity of anticancer drugs using quantitative mass spectrometry imaging [J]. *Theranostics*, 2020, 10: 2621-2630.
- [8] Shi MZ, Xing TY, Chen JJ, et al. Effect of Xiao-Ai-Ping injection on paclitaxel pharmacokinetics in rats by LC-MS/MS method [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2019, 174: 728-733.
- [9] Christner SM, Parise RA, Ivy PS, et al. Quantitation of paclitaxel, and its 6- $\alpha$ -OH and 3- $\text{para}$ -OH metabolites in human plasma by LC-MS/MS [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2019, 172: 26-32.
- [10] Wang R, Wang BL, Li Y. Pharmacokinetics of IMM-H007 after oral administration in Rhesus monkey using HPLC-MS/MS analysis [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2018, 53: 1156-1161.
- [11] Janhavi P, Divyashree S, Sanjailal KP, et al. DoseCal: a virtual calculator for dosage conversion between human and different animal species [J]. *Arch Physiol Biochem*, 2022, 128: 426-430.
- [12] Mendes MDS, Hatley O, Gill KL, et al. A physiologically based pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling approach to predict incidence of neutropenia as a result of drug-drug interactions of paclitaxel in cancer patients [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2020. DOI: 10.1016/j.ejps.2020.105355.
- [13] Saiki I, Miki Y, Yara M, et al. Functional expression of choline transporter-like protein 1 in LNCaP prostate cancer cells: a novel molecular target [J]. *Biomol Ther (Seoul)*, 2020, 28: 195-201.
- [14] Hertz DL. Exploring pharmacogenetics of paclitaxel- and docetaxel-induced peripheral neuropathy by evaluating the direct pharmacogenetics-pharmacokinetic and pharmacokinetic neuropathy relationships [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2021, 17: 227-239.
- [15] Tore BS, Troels KB, Deanna LK, et al. Clinical pharmacokinetics of paclitaxel monotherapy: an updated literature review [J]. *Clin Pharmacokinet*, 2018, 57: 7-19.
- [16] Geng Q, Jiang H, Li DQ, et al. Anti-tumor effect of PD-1 antibody in combination with low-dose albumin-bound paclitaxel on lung cancer Lewis cells xenografts in nude mice [J]. *Chin Clin Oncol (临床肿瘤学杂志)*, 2021, 26: 411-416.
- [17] Li SZ, Yao YB, Tang ZY, et al. Exploring the mechanism of paclitaxel inhibiting T-cell lymphoma based on high-throughput

- sequencing and public databases [J]. *J Exp Hematol* (中国实验血液学杂志), 2021, 29: 741-750.
- [18] Alves RC, Fernandes RP, Eloy JO, et al. Characteristics, properties and analytical methods of paclitaxel: a review [J]. *Crit Rev Anal Chem*, 2018, 48: 110-118.
- [19] Moon BS, Park HS, Sunwoo J, et al. Tissue pharmacokinetics of DHP107, a novel lipid-based oral formulation of paclitaxel, in mice and patients by positron emission tomography [J]. *Clin Transl Sci*, 2021, 14: 1747-1755.
- [20] Zhu LY, Chen LQ. Progress in research on paclitaxel and tumor immunotherapy [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2019, 24: 40.
- [21] Zhou MH, Zhang M, Zhang S, et al. Effect of molecular weight of polyethylene glycol on pharmacokinetics of baicalin [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2021, 56: 1416-1423.
- [22] Luo BF, Zhang J, Yang T, et al. Effect of amoxicillin on the expression of PEPT1 and pharmacokinetics upon acute hypoxia at high altitude in rat [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2017, 52: 1715-1721.
- [23] Li XJ, You Y, Zhang QL, et al. Preparation of paclitaxel-loaded and folic acid-modified poly (lactic-co-glycolic acid) nanomicelles and *in vitro* anticancer effect on cervical cancer HeLa cells [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2021, 46: 2481-2488.
- [24] Wang Y, Jiang JD. A new research mode of drug PK-PD mediated by the gut microbiota: insights into the pharmacokinetics of berberine [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2018, 53: 659-666.
- [25] Wang X, Wang YQ, Zhang Q, et al. Research progress in cellular pharmacokinetics of nano-drug delivery systems [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2018, 53: 1620-1629.
- [26] Zhao X, Yu SW, Du JF, et al. The anti-glioma effects of borneol and RGD co-modified docetaxel loaded nanoparticles after intranasal administration [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2021, 56: 3233-3242.
- [27] Chen Y, Wang XJ, Xiong F, et al. Kinetic study of pyrrolizidine alkaloid-derived pyrrole-protein adducts in rats after intragastric administration of *Gynura japonica* [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2020, 55: 473-477.
- [28] Ji X, Liu XQ, Gao L, et al. Pharmacokinetics of the main components differing between *ligustri lucidi fructus* and its wine-steamed product [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2021, 56: 3518-3525.
- [29] Liu SS, Geng YJ, Xia YY, et al. Quantification of norfloxacin in human plasma by LC-MS/MS and validation of the analytical method [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2019, 54: 695-700.
- [30] Liu YT, Jiang QY, Huang GY, et al. Determining the effect of Huangqi on the pharmacokinetics of six different alkaloids from Fuzi in rats by LC-MS [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2019, 54: 2289-2295.
- [31] Chen ZD, Gao YX, Xue H, et al. Pharmacokinetics of FGF21-164 fusion protein in mice using UHPLC-MS/MS method [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2021, 56: 2372-2377.
- [32] Song Y. Quantitation of paclitaxel in rats plasma by HPLC-MS/MS and its application in pharmacokinetic study [J]. *J Tianjin Med Univ* (天津医科大学学报), 2019, 25: 292-295.