

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.01395

盐酸格拉司琼胶囊健康人体药代动力学研究

李 珍^{1*}, 杨武云¹, 范国荣², 闻 俊², 王法财¹, 唐世新¹, 计一平¹

1. 第二军医大学长海医院临床药理研究室, 上海 200433

2. 第二军医大学药学院药物分析学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的:**建立测定人血浆中格拉司琼浓度的LC/MS/MS法,并应用于健康人体药代动力学研究。**方法:**12例健康受试者单剂量口服2 mg 盐酸格拉司琼胶囊,LC/MS/MS法测定血浆中格拉司琼浓度,采用非房室模型统计矩法计算药代动力学参数。**结果:**单剂量口服2 mg 盐酸格拉司琼胶囊后,主要的药代动力学参数 C_{max} 、 t_{max} 、 $t_{1/2}$ 、MRT、Cl/F、 AUC_{0-24} 和 $AUC_{0-\infty}$ 分别为(6.93±1.90) ng/ml, (1.35±0.29) h, (5.59±1.87) h, (8.05±1.84) h, (54.23±16.08) L/h, (36.61±8.87) ng·h·ml⁻¹和(39.32±9.36) ng·h·ml⁻¹。**结论:**本分析方法的准确度、灵敏度、专属性及定量线性范围等均符合生物样品的分析要求,适用于盐酸格拉司琼胶囊的人体药代动力学研究。

[关键词] 盐酸格拉司琼; LC/MS/MS法; 药代动力学

[中图分类号] R 975.4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)11-1395-03

Pharmacokinetics of granisetron hydrochloride capsule in healthy volunteers

LI Zhen^{1*}, YANG Wu-yun¹, FAN Guo-rong², WEN Jun², WANG Fa-cai¹, TANG Shi-xin¹, JI Yi-ping¹

1. Department of Clinical Pharmacology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of Drug Analysis, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433

[ABSTRACT] **Objective:** To establish a sensitive and specific LC/MS/MS method for the determination of granisetron in human plasma, and to apply it in investigating the pharmacokinetics of granisetron hydrochloride capsule in healthy volunteers. **Methods:** Twelve healthy male volunteers were given single oral dose of 2 mg granisetron hydrochloride capsules. The plasma concentrations of granisetron were determined by LC/MS/MS method after liquid-liquid extraction. The pharmacokinetic parameters were calculated by noncompartment model. **Results:** The calibration curve was linear within a concentration range of 0.501-20.04 ng/ml, with the limit of quantification being 0.501 ng/ml. The main pharmacokinetic parameters of granisetron in the volunteers were as following: C_{max} (6.93±1.90) ng/ml, t_{max} (1.35±0.29) h, $t_{1/2}$ (5.59±1.87) h, MRT (8.05±1.84) h, Cl/F (54.23±16.08) L/h, AUC_{0-24} (36.61±8.87) ng·h·ml⁻¹ and $AUC_{0-\infty}$ (39.32±9.36) ng·h·ml⁻¹. **Conclusion:** The present method is accurate, sensitive and reproducible for the determination of granisetron levels in human plasma. It is suitable for pharmacokinetic study of granisetron hydrochloride capsule in human.

[KEY WORDS] granisetron hydrochloride; LC/MS/MS; pharmacokinetics

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(11):1395-1397]

盐酸格拉司琼(granisetron hydrochloride)是一种具有高度选择性的新型5-羟色胺受体拮抗剂,对因化疗、放疗及手术引起的恶心和呕吐具有良好的预防和治疗作用^[1-2]。国内外报道格拉司琼血药浓度测定方法主要有HPLC-荧光检测法^[3]、HPLC-电化学检测法^[4]和液相色谱质谱联用法^[5]。本研究参考了相关文献^[3,5],建立了测定血浆中格拉司琼浓度的LC/MS/MS法,并用于健康受试者口服盐酸格拉司琼胶囊后体内血药浓度测定和药代动力学研究,为临床合理用药提供依据。

1 材料和方法

1.1 仪器 VARIAN 1200L液相色谱-质谱联用仪,包括VARIAN ProStar 210高压泵, VARIAN ProStar 410自动进样器, VARIAN 1200L Quadrupole MS/MS仪, VARIAN MS 6.3工作站。XW-80A旋涡混合器(上海医科大学仪器厂), TGL-16G台式高速离心机和80-2B台式离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.2 药品与试剂 盐酸格拉司琼胶囊(商品名:古迪[®])由山

[收稿日期] 2008-03-02 **[接受日期]** 2008-07-01

[作者简介] 李 珍, 博士, 副主任药师。

* 通讯作者(Corresponding author). Tel:021-25070673. E-mail: lizhen-01@163.com

东淄博新达制药有限公司生产,规格 1 mg/粒,批号 050101。盐酸格拉司琼化学对照品,由上海兴康医药研究开发有限公司提供,纯度 99.7%。甲醇和乙酸乙酯为美国 Merck 公司色谱纯试剂,氢氧化钠为分析纯试剂,购自中国医药(集团)上海化学试剂公司,水为自制去离子水。

1.3 色谱条件 色谱柱为 Diamonsil™ C₁₈ 柱, 200 mm × 4.6 mm, 5 μm 粒径(迪马公司);流动相为甲醇:水(80:20),流速为 0.80 ml/min;柱温 30℃。

1.4 质谱条件 采用 ESI 离子源,正离子检测,选择 SRM 工作方式进行一/二级质谱分析。质谱检测工作参数如下:格拉司琼 Q1(Mass) 313、Q3(Mass)138;Scan time 1.0 s, SIM width 0.7, Q1 peak width 1.5; Needle 5 000 V, 12 μA; Shield 600 V, 379 kPa; Dry gas 350℃, 444.8 kPa; Capillary 35 V, Q0 -0.9 V, L4 -1.0 V, Q1 -0.75 V; Q2 Collision energy -16.0 V, Collision gas 0.24 Pa; Positive detection 1 300 V。

1.5 血浆样品处理 取血浆样品 0.5 ml 置于 5 ml 离心管中,加 1.0 mol/L NaOH 100 μl,涡旋振荡 30 s 混匀,加乙酸乙酯 5.0 ml,涡旋振荡 3 min,于 3 725 × g 离心 10 min;分取乙酸乙酯 4.0 ml,在 50℃ 水浴下通氮气挥干,残留物加流动相 100 μl 溶解,自动进样 20 μl。

1.6 受试者 12 例男性健康志愿者,年龄(23.92 ± 3.53)岁,体质量(64.67 ± 8.00) kg,身高(172.91 ± 6.56) cm。试验前 1 d 按要求体检合格,血常规、尿常规、粪常规、肝功能、肾功能、ECG 和胸片等检查均正常,无心血管系统、呼吸系统、消化系统、泌尿系统、中枢神经系统、代谢系统的明确病史或其他显著疾病,无药物与食物过敏史,无烟酒嗜好或滥用毒品史,筛选前 2 周内未服用过其他药物,入选前 3 个月内未参加过其他药物的临床试验且无献血史。健康志愿者在明了本试验的目的与要求后签署知情同意书。盐酸格拉司琼胶囊人体药代动力学试验方案报长海医院伦理委员会批准后实施。

1.7 试验设计 健康志愿者禁食过夜后,于早上 7:00 单剂量空腹口服 2 mg 盐酸格拉司琼胶囊,用 200 ml 温开水送服,服药 2 h 后可以饮水,4 h 后进食统一低脂餐。于给药前及给药后 0.25、0.5、0.75、1.0、1.25、1.5、2、3、4、6、8、10、12 和 24 h 于肘静脉取血 3 ml,肝素抗凝,2 016 × g 离心 10 min 后,分取血浆,于 -20℃ 冰箱保存至测定。按血浆样品预处理方法操作,测定血浆中格拉司琼浓度。

1.8 数据处理 用非房室模型(统计矩)法计算药代动力学参数。峰浓度(C_{max})和达峰时间(t_{max})采用实测值计算,梯形面积法计算药-时曲线下面积(AUC)。相应的参数估算公式如下: AUC_{0-t_n} = ∑(C_i + C_{i-1}) × (t_i - t_{i-1})/2; AUC_{0-∞} = AUC_{0-t_n} + C_{t_n}/λ_z; AUMC_{0-∞} = ∑(C_i t_i + C_{i-1} t_{i-1}) × (t_i - t_{i-1})/2 + C_{t_n}(1/λ_z² + t_n/λ_z); MRT = AUMC_{0-∞}/AUC_{0-∞}。上述式中 t_n 为最后 1 次可测浓度的取样时间, C_{t_n} 为最后一点的血药浓度值, λ_z 为末端相消除速率常数,用末端相 4 点

的 lnC 对时间回归求得。t_{1/2} = 0.693/λ_z; Cl/F = Dose/AUC_{0-∞}。

2 结果

2.1 方法的专属性 本文采用正离子方式检测,格拉司琼的准分子离子峰 m/z 313,选择性对其进行二级质谱分析,得到主要碎片离子 m/z 138,以 SRM 工作方式,对碎片离子 m/z 138 进行定量分析。在本实验条件下格拉司琼的保留时间约为 2.3 min,分析时间 5 min,血浆内源性物质均不干扰体内格拉司琼的测定。在上述 LC/MS/MS 条件下测得格拉司琼一/二级质谱见图 1,空白血浆、空白血浆添加标准品、受试者实测血浆样品见图 2。

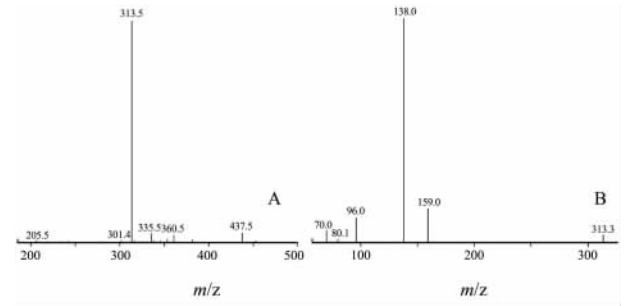


图 1 格拉司琼的 LC/MS/MS 分析的质谱图
Fig 1 Full scan LC/MS/MS spectra of granisetron
A: MS; B: MS/MS

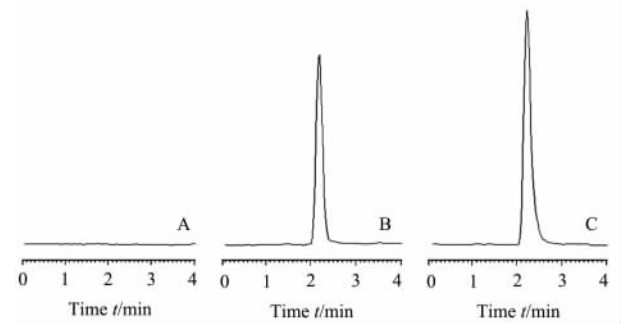


图 2 血浆中格拉司琼的典型色谱图
Fig 2 Chromatograms of granisetron in human plasma
A: Plasma control; B: Plasma control + standard(2 ng/ml); C: Sample (3 h after administration)

2.2 标准曲线及最低定量浓度 从格拉司琼标准溶液中精密吸取相当于 2.004、5.01、10.02、20.04、50.10、100.20、200.40 ng 格拉司琼置于 7 个 10 ml 量瓶中,加入空白血浆配制成含格拉司琼分别为 0.200 4、0.501、1.002、2.004、5.01、10.02 和 20.04 ng/ml 的标准血浆样品。按上述血浆样品预处理步骤操作,并进行 LC/MS/MS 分析。以格拉司琼化学对照品的峰面积(A)对相应的浓度(C, ng/ml)进行加权(1/C)线性回归,得血浆标准曲线方程为 A = 1.386C + 0.118 7, r = 0.999 7 (n = 5),线性范围为 0.200 4 ~ 20.04

ng/ml, 最低定量浓度为 0.200 4 ng/ml。

2.3 回收率试验 配制 0.501、2.004、10.02 ng/ml 低、中、高 3 种不同浓度的格拉司琼标准血浆样品, 按上述血浆样品预处理步骤操作, 血浆样品中格拉司琼色谱峰面积代入血浆标准曲线, 通过测得量与加入量的比值求得相对回收率, 结果见表 1。

表 1 格拉司琼血浆回收率试验

Tab 1 Recovery test of granisetron in human plasma

(n=5)			
Added $\rho_B / (\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1})$	Detected $\rho_B / (\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1})$	Recovery(%)	RSD(%)
0.501	0.50±0.03	100.64±6.63	6.59
2.004	1.99±0.07	99.31±3.62	3.65
10.02	10.12±0.25	101.03±2.45	2.43

2.4 精密度与准确度 配制 0.501、2.004、10.02 ng/ml 低、中、高 3 种不同浓度的格拉司琼标准血浆样品, 按上述生物样品预处理步骤同法操作, 测得日间和日内精密度分别 <8% 和 <7%。

2.5 稳定性考察和质控 本试验考察了格拉司琼标准贮备液和血浆标准样品的稳定性。格拉司琼在流动相中避光、密封、4℃ 保存 15 d 内稳定。血浆标准样品 -20℃ 保存 15 d、3 次冷冻-解冻循环试验以及避光、室温条件下 4 h 稳定性均良好。

配制浓度为 0.499、1.996 和 9.98 ng/ml 低、中、高 3 种不同浓度的格拉司琼血浆质控品, 按上述血浆样品预处理步骤同法操作, 在每批样品分析时插入随行标准曲线和质控品来考察方法稳定性, 结果低、中、高 3 种不同浓度的格拉司琼血浆质控品的相对回收率分别为 (98.82±6.75)%、(98.91±3.24)% 和 (100.19±2.68)%, RSD 分别为 6.83%、3.27% 和 2.67%。

2.6 格拉司琼健康人体药-时曲线和药代动力学参数 平均血药浓度-时间曲线见图 3, 主要的药代动力学参数 C_{\max} 、 t_{\max} 、 $t_{1/2}$ 、MRT、Cl/F、 AUC_{0-24} 和 $AUC_{0-\infty}$ 分别为 (6.93±1.90) ng/ml、(1.35±0.29) h、(5.59±1.87) h、(8.05±1.84) h、(54.23±16.08) L/h、(36.61±8.87) ng·h·ml⁻¹ 和 (39.32±9.36) ng·h·ml⁻¹。

3 讨论

盐酸格拉司琼对 5-HT₃ 的特异性和亲和力高, 又具有高度的内在活性, 疗效显著优于灭吐灵等传统抗呕吐药物, 且无锥体外系反应, 是临床应用广泛的 5-HT₃ 拮抗剂之一^[6]。由于给药仅需 2 mg, 体内血药浓度水平低, 本研究采用 LC/MS/MS 技术, 具有很强的专属性和灵敏度, 最低定量浓度为 0.2 ng/ml, 分析一个样品仅需 5 min, 大大提高了分析测试效率。本法通过准确度、灵敏度、专属性及定量线性范围等考察, 符合生物样品的分析要求, 适用于盐酸格拉司琼胶囊的人体药代动力学研究。

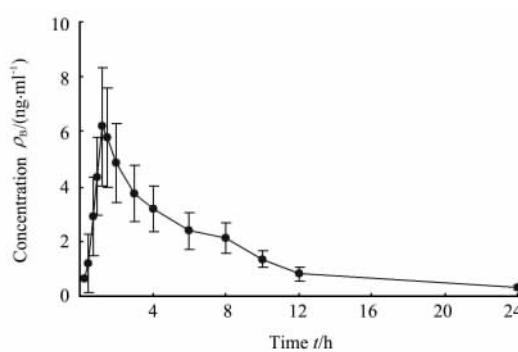


图 3 志愿者单剂量口服 2 mg 盐酸格拉司琼胶囊后的平均血药浓度-时间曲线

Fig 3 Mean plasma concentration-time profile of granisetron after single oral dose of 2 mg granisetron hydrochloride capsules in 12 healthy volunteers

n=12, $\bar{x} \pm s$

本研究采用非房室模型法分析了盐酸格拉司琼胶囊在健康受试者体内的药代动力学过程, 口服 2mg 盐酸格拉司琼胶囊后血药浓度达峰迅速, t_{\max} 为 (1.35±0.29) h, 格拉司琼血药浓度总体水平低, C_{\max} 仅为 (6.93±1.90) ng/ml, 该药消除半衰期 $t_{1/2}$ 为 (5.59±1.87) h, 在体内平均滞留时间 MRT 为 (8.05±1.84) h, 主要药代动力学参数与文献^[3]报道相似, 说明该药起效较快, 化疗前 1 h 给药, 每日给药 2 次可以取得令人满意的临床疗效^[6]。

[参考文献]

- [1] Rubenstein E B, Slusher B S, Rojas C, Navari R M. New approaches to chemotherapy-induced nausea and vomiting: from neuropharmacology to clinical investigations [J]. Cancer J, 2006, 12: 341-347.
- [2] Fujii Y. Clinical strategies for preventing postoperative nausea and vomiting after middle ear surgery in adult patients [J]. Curr Drug Saf, 2008, 3: 230-239.
- [3] 章杰兵, 周国华, 古卓良. 国产和进口盐酸格拉司琼片人体药代动力学和相对生物利用度 [J]. 中国临床药理学杂志, 2000, 9: 355-357.
- [4] Boppana V K. Simultaneous determination of granisetron and 7-hydroxy metabolite in human plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography internal fluorescence and electro-chemical detection [J]. J Chromatogr A, 1995, 692 (1-2): 195-202.
- [5] Woo J S. Nasal absorption studies of granisetron in rats using a validated high-performance liquid chromatographic method with mass spectrometric detection [J]. Arch Pharm Res, 2007, 30: 778-784.
- [6] 章杰兵, 古卓良, 周国华. 盐酸格拉司琼片与枢复宁片临床疗效及安全性比较 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2000, 5: 355-356.

[本文编辑] 尹 茶