

两性霉素 B 复合磷脂纳米脂质体 Beagle 犬体内药动学研究

何子聪¹, 徐泉玉², 袁艳娟³, 邵卿^{3*} (1.南京田家炳中学, 南京 210009, 2.南京工业大学药学院, 南京 211800, 3.江苏省药物研究所有限公司, 南京 211800)

摘要: 目的 采用 LC-MS/MS 测定 Beagle 犬血浆中两性霉素 B 的含量, 研究受试物两性霉素 B 复合磷脂纳米脂质体 (liposomal amphotericin B, L-AmB) 和参比药物 AmBisome 在 Beagle 犬体内的药动学行为。方法 选取成年健康 Beagle 犬 12 只, ♀♂ 各半。采用双交叉试验设计, 周期间洗脱期为 2 周。经前肢静脉注射给药 ($6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 采集给药前以及给药后各时间点血浆样品, 应用经验证的 LC-MS/MS 方法测定血浆中两性霉素 B 浓度, DAS 2.1.1 中求算药动学参数。结果 Beagle 犬静脉注射给予 $6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的受试物和参比药物后, 动物体内两性霉素 B 的 $\text{AUC}_{(0-t)}$ 分别为 $(705\,520 \pm 178\,252)$, $(677\,310 \pm 166\,326) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$; C_{max} 分别为 $(142\,683 \pm 29\,823)$, $(121\,992 \pm 37\,983) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$; $t_{1/2}$ 分别为 (8.9 ± 1.5) , $(9.7 \pm 0.6) \text{ h}$ 。结论 L-AmB 及参比制剂 AmBisome 在 Beagle 犬体内的药动学参数差异无统计学意义。

关键词: 两性霉素 B 复合磷脂纳米脂质体; 液相色谱-质谱联用; Beagle 犬; 药动学; 静脉注射; 血药浓度

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2022)01-0097-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.01.017

引用本文: 何子聪, 徐泉玉, 袁艳娟, 等. 两性霉素 B 复合磷脂纳米脂质体 Beagle 犬体内药动学比较研究[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(1): 97-100.

Study on Pharmacokinetic of Amphotericin B Liposome in Beagle Dogs

HE Zicong¹, XU Quanyu², YUAN Yanjuan³, SHAO Qing^{3*} (1.Middle School of Nanjing Tianjiabing, Nanjing 210009, China; 2.School of Pharmacy, Nanjing Tech University, Nanjing 211800, China; 3.Jiangsu Provincial Institute of Materia Medica, Nanjing 211800, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an LC-MS/MS method for the determination of amphotericin B in plasma of Beagle dogs, and to study the pharmacokinetic parameters of liposomal amphotericin B (L-AmB) and reference drug (AmBisome) in Beagle dogs. **METHODS** Twelve adult healthy Beagle dogs, half male and half female, were selected. The design of double cross experiment was adopted, and the period of washout was 2 weeks, $6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ($1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) was injected intravenously. The whole blood was collected before and different timepoints after administration. The concentration of amphotericin B in the plasma was determined by the validated LC-MS/MS method, and the pharmacokinetic parameters were calculated by DAS 2.1.1. **RESULTS** The main pharmacokinetic parameters of L-AmB and AmBisome were as follows: $\text{AUC}_{(0-t)}$ was $(705\,520 \pm 178\,252)$, $(677\,310 \pm 166\,326) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$; C_{max} was $(142\,683 \pm 29\,823)$, $(121\,992 \pm 37\,983) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$; $t_{1/2}$ was (8.9 ± 1.5) , $(9.7 \pm 0.6) \text{ h}$. **CONCLUSION** There is no significant difference between the Beagle dogs after intravenous injection of L-AmB and the reference drug (AmBisome).

KEYWORDS: liposomal amphotericin B; LC-MS/MS; Beagle dog; pharmacokinetic; intravenous injection; blood concentration

两性霉素 B (amphotericin B, AmB) 是从链霉菌发酵液中分离得到的一种抗真菌药物^[1], 结构式见图 1A。在现有的抗真菌药物中, AmB 是治疗危重深部真菌感染患者的首选药物。AmB 杀菌作用强, 其作用机制是通过与真菌细胞膜上的麦角固醇结合形成跨膜通道, 改变细胞膜的通透性, 导致钾、钠等离子泄露, 最终导致细胞死亡^[2]。AmB 抗菌谱广, 对曲霉菌、念珠菌、球孢子菌、毛霉菌等都有杀菌效果^[3-5]。

AmB 在水中不溶, Fungizone® 采用脱氧胆酸

钠增加水溶性。AmB 能与哺乳动物细胞膜中的固醇 (主要为胆固醇) 结合, 较容易在哺乳动物和人类体内产生毒性, 有较强的肾毒性。为改善不良反应, 相继有 Ambisome®、Amphotec®、Abelcet®、Fungisome® 上市^[6]。本研究的受试物 AmB 复合磷脂纳米脂质体 (liposomal amphotericin B, L-AmB) 是采用复合磷脂纳米脂质体材料对药物进行包裹, 氢化豆磷脂胆碱、双脂醇磷酸甘油及胆固醇分子等组成双层的脂质体, 其粒径小、靶向性高、结构稳定, 被单核巨噬系统清除的速度较慢^[7]。

作者简介: 何子聪, 男 E-mail: 498976623@qq.com

*通信作者: 邵卿, 男, 硕士, 助理研究员 E-mail: 786564914@qq.com

本研究拟建立血浆样品中 AmB 的 LC-MS/MS 定量测定方法, 内标为那他霉素(结构式见图 1B), 并应用于 Beagle 犬前肢静脉注射 L-AmB 的药动学比较研究, 为深入阐明药物作用机制、设计和优化临床试验给药方案提供参考。

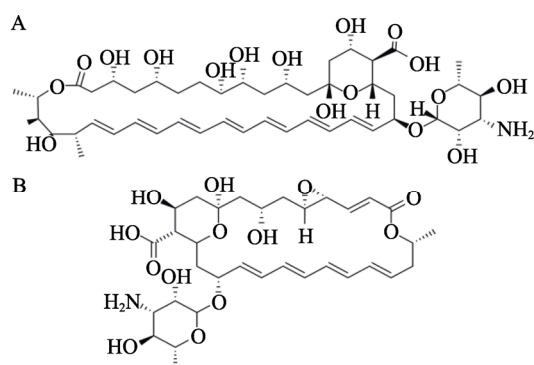


图 1 化学结构式
A-两性霉素 B; B-那他霉素(内标)。
Fig. 1 Chemical structures
A-amphotericin B; B-natamycin(IS).

1 材料与方法

1.1 仪器

API 4000 三重四极杆串联质谱仪, Analyst 1.6.2 数据采集软件, Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国 AB Sciex 公司); 5424 型 Eppendorf 离心机(艾本德中国有限公司); 基本型涡旋混合器(TALBOYS 制造有限公司); F3JN774 型超纯水机(美国 Millipore 公司); XS105DU 型分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

AmB 对照品(批号: 21031; 含量: 95.0%)、那他霉素(批号: G119698; 含量: 91.3%)均购于德国 Dr.Ehrenstorfer GmbH 公司; L-AmB(常州金远药业制造有限公司, 批号: 1705271; 含量: 100.7%); AmBisome(德国 Dr.Ehrenstorfer GmbH 公司, 批号: 009640; 含量: 95.0%)。甲醇、乙腈均为色谱纯, 均购自美国 TEDIA 公司; 乙酸铵(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 水为超纯水。

1.3 动物

Beagle 犬 12 只(♀♂各半), 南京柴门生物科技有限公司提供, 动物生产许可证号: SCXK(苏)2016-0007; 合格证号: 201710681。饲养条件为普通级动物房, 饲料和动物饮用水均符合国家标准。首次给药时, 动物的年龄范围为 6~9 月龄; 体质量为 7.0~8.2 kg。本实验通过江苏省药物安全性评价中心伦理委员会批准。

1.4 生物样本 LC-MS/MS 检测方法

1.4.1 色谱条件 色谱柱: Poroshell 120 EC-C₁₈ (4.6 mm×50 mm, 2.7 μm); 流动相: 10 mmol·L⁻¹ 乙酸铵(A)-乙腈(B), 梯度洗脱(0~5 min, 80%→20%A; 5~5.1 min, 20%→80%A; 5.1~8 min, 80%A); 流速: 0.7 mL·min⁻¹; 柱温: 25 °C; 进样量: 5 μL。

1.4.2 质谱条件 电喷雾离子源 ESI⁺; MRM 监测模式; 离子源喷雾电压(IS)5 500 V; 碰撞气 7 psi; 气帘气 25 psi; 雾化气 50 psi; 辅助加热气 50 psi; 离子源温度 550 °C; 入口电压(EP)10 V; 去簇电压(DP)41 V; 碰撞能(CE)18 V(AmB)和 13 V(内标); AmB 和内标的检测离子分别为 m/z 924.6→906.6 和 m/z 666.5→503.4。

1.5 溶液的制备

系列对照品工作液与质控(quality control, QC)工作溶液: 分别精密称取 2 份 AmB 对照品约 10 mg [10.53 mg(I)、10.63 mg(II)], 各置 10 mL 量瓶中, 20%甲酸甲醇溶液溶解并定容, 制得 1.00 mg·mL⁻¹ AmB 对照品储备液 I 和 II。分别逐级稀释成浓度为 500, 1 000, 2 000, 5 000, 10 000, 20 000, 50 000, 100 000 ng·mL⁻¹ 的系列对照品工作液和 500, 1 000, 6 500, 75 000 ng·mL⁻¹ 的 QC 工作液。

血浆对照品溶液: 取空白血浆 180 μL 于 2 mL 离心管中, 分别加入系列对照品工作液或 QC 工作液 20 μL, 混匀, 即得血浆对照品溶液。

内标工作溶液: 精密称取那他霉素适量, 稀释至浓度为 2 μg·mL⁻¹ 作为内标工作液。

1.6 血浆样品处理

待测血浆样品(-80 °C)于室温下自然解冻后, 精密吸取 50 μL, 置 2 mL 的离心管中, 精密加入内标溶液 20 μL(那他霉素, 2 μg·mL⁻¹), 涡旋混匀 1 min, 加入 150 μL 乙腈溶液, 涡旋混匀 3 min, 16 000×g 离心 5 min, 取上层溶液 150 μL 至 1.5 mL 离心管中, 再次 16 000×g 离心 5 min, 取 5 μL 上清液进样分析。

1.7 方法学验证

按照药动学研究的相关要求, 验证专属性、线性范围、精密度、准确度、样品稳定性、基质效应和回收率。

1.8 Beagle 犬体内药动学研究

1.8.1 实验设计 将 12 只 Beagle 犬, 分为 2 组, 每组 6 只, ♀♂各半。采用双交叉试验设计, 周期

间洗脱期为 2 周。动物禁食 12 h, 但不禁水, 分别由前肢静脉注射给予 $6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ($1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的 L-AmB 和参比制剂 AmBisome, 给药速率 $4 \sim 8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。负压采血管(肝素锂抗凝)经犬前肢皮下静脉采集给药前(0 min)以及给药后 1, 30 min, 1, 3, 6, 9, 24, 48, 72 h 全血, 采完后用灭菌干棉球压迫采血部位止血。每只动物每次采血 $1.0 \sim 1.5 \text{ mL}$ 。

1.8.2 血样处理 采集的全血样品轻轻颠倒数次混匀后, 立即放入内置冰袋的转运箱, 于采血后 1 h 内以 $3\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 室温离心 10 min。分离血浆于 -60°C 以下保存待测。

1.8.3 样品检测 待测血浆样品按“1.6”项下方法处理。按“1.4”项下方法进行监测分析。生物分析数据用 Analyst1.6.2 采集, 采用仪器自带定量软件处理。

1.8.4 药动学参数分析 将所得的血药浓度-时间数据以 DAS 2.1.1 求算药动学参数。

2 结果

2.1 专属性考察

选取来自不同个体的 Beagle 犬空白血浆 6 份

(♀♂各半), 获得犬空白血浆色谱图, 见图 2A。取 Beagle 犬空白血浆, 加入一定浓度的 AmB 对照品工作液和内标工作溶液, 按同样方法处理, 得色谱图, 见图 2B。静脉给药后采集犬血浆样品 $50 \mu\text{L}$, 按相同方法处理, 得色谱图, 见图 2C。结果显示, AmB 的保留时间为 4.14 min , 内标那他霉素的保留时间为 3.72 min 。色谱峰峰形良好且无内源性基质干扰, 具有较强的专属性。

2.2 标准曲线与最低定量限

按“1.5”项下方法制备标准曲线系列样品。得标准曲线的回归方程 $y=0.000\,6x+0.018\,6$, 相关系数 $r=0.999\,9$ 。结果表明, AmB 在犬血浆浓度范围 $50 \sim 10\,000 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好, 定量下限为 $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.3 精密度与准确度

按“1.5”项下方法制备相应 QC 样品, AmB 药物浓度分别为 $50, 100, 650, 7\,500 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 每个浓度样品各 6 份, 每天配制一批精密度样品及一条随行标准曲线, 连续 3 d 检测, 按“1.6”项下方法处理, 进行 LC-MS/MS 分析, 根据批内随行的标准曲线计算各样品的浓度。在 $50 \sim 10\,000 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$

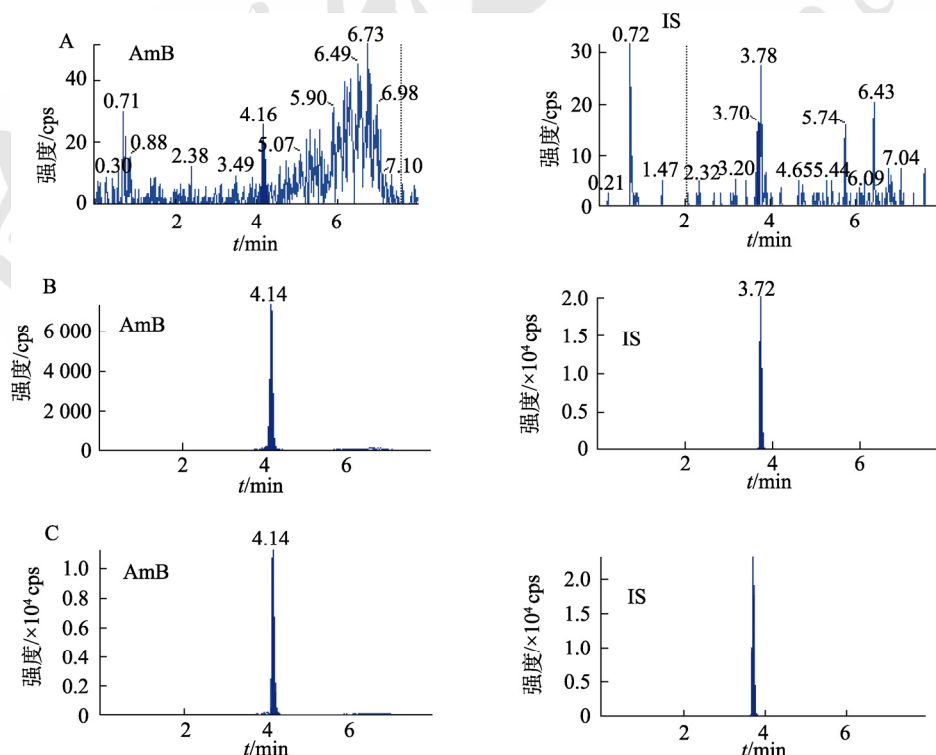


图 2 Beagle 犬血浆中 AmB 和内标的典型 MRM 色谱图

A-空白血浆样品; B-空白血浆添加 AmB($2\,000 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)与内标($2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$); C-比格犬静脉注射 $6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ L-AmB 3 h 后血浆样品。

Fig. 2 Typical MRM chromatograms of AmB and IS in Beagle dog plasma

A-blank plasma sample; B-blank plasma spiked with AmB($2\,000 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) and IS($2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$); C-plasma sample after i.v. administration of $6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ L-AmB to Beagle dog for 3 h.

内,测定犬血浆中 AmB 批内精密度 $RSD < 5.37\%$,批内准确度为 $96.33\% \sim 105.46\%$;批间精密度 $RSD < 6.78\%$,批间准确度为 $97.39\% \sim 104.10\%$ 。

2.4 回收率和基质效应

取犬空白血浆,加 QC 工作液配制 QC 样品,按“1.6”项下方法处理,进行 LC-MS/MS 分析;另取犬空白血浆,同法按“1.6”项下方法处理后,加入 QC 系列工作液,进行 LC-MS/MS 分析;计算回收率。

取空白溶液及犬空白血浆,加 AmB 对照品储备液制得浓度分别为 $50, 100, 650$ 和 $7\,500\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的无基质及基质样本,考察基质效应。

结果显示,AmB 的回收率为 $93.17\% \sim 101.36\%$,内标回收率为 96.92% ,基质效应为 $93.83\% \sim 103.27\%$,内标基质效应为 97.58% ,均符合检测要求。

2.5 稳定性试验

采用 QC 样品,分别考察不同时间、温度和冻融条件下血浆样品中 AmB 的稳定性。各储存条件下测定得到的结果显示,含药血浆于室温放置 12 h 、反复冻融 3 次和 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 长期冷冻 31 d 以及提取后的样品在进样器放置 24 h 条件下,血浆样本在各条件下稳定性均良好。

2.6 Beagle 犬体内药动学研究

Beagle 犬静脉给予受试物 L-AmB/参比制剂 AmBisome 的血药浓度-时间数据见图 3,用 DAS 2.1.1 软件计算由药时曲线数据得到的药动学参数,按组进行统计分析。结果显示,L-AmB 及 AmBisome 组 $AUC_{(0-t)}$ 、 $AUC_{(0-\infty)}$ 、 $MRT_{(0-t)}$ 、 $MRT_{(0-\infty)}$ 、 $t_{1/2}$ 、 CL 、 V 、 $C_{\max}$ 等参数均无显著差异,结果见表 1。

表 1 Beagle 犬静脉注射 $6\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ L-AmB 和 AmBisome (参比制剂)后的药动学参数($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

Tab. 1 Pharmacokinetic parameters after i.v. administration of L-AmB or AmBisome(reference) in Beagle dogs at $6\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

参数	L-AmB	AmBisome
$AUC_{(0-t)}/\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$	$705\,520 \pm 178\,252$	$677\,310 \pm 166\,326$
$AUC_{(0-\infty)}/\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$	$708\,169 \pm 179\,274$	$680\,631 \pm 166\,431$
$MRT_{(0-t)}/\text{h}$	11.4 ± 1.5	12.2 ± 2.1
$MRT_{(0-\infty)}/\text{h}$	11.6 ± 1.7	12.5 ± 2.1
$t_{1/2}/\text{h}$	8.9 ± 1.5	9.7 ± 0.6
$T_{\max}/\text{h}$	0.017 ± 0.000	0.097 ± 0.088
$CL/\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$	0.009 ± 0.002	0.009 ± 0.002
$V/\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$	0.114 ± 0.028	0.130 ± 0.037
$C_{\max}/\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	$142\,683 \pm 29\,823$	$121\,992 \pm 37\,983$

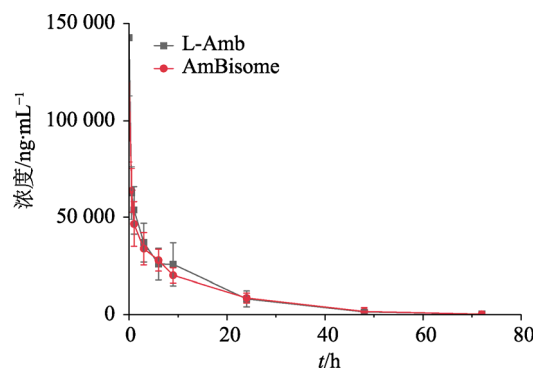


图 3 L-AmB 与 AmBisome 平均血药浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

Fig. 3 Mean drug plasma concentration-time curves of L-AmB and AmBisome ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

3 讨论

综上所述,Beagle 犬静脉注射给予受试物或参比药物后,各组动物体内 AmB 药动学行为未见明显差异。

受试物及参比制剂临床拟用量为 $3\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,按体表面积换算后 Beagle 犬等效剂量约为 $6\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,所以本研究选择 $6\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 作为给药剂量。

本研究中受试物及参比制剂在犬体内的血药浓度-时间曲线变化趋势一致,主要药动学参数经统计分析后,差异无统计学意义。本实验采用单次静脉注射给药研究犬体内的药动学,因此,多剂量给药以及其他途径给药的药动学值得进一步研究,以便制定更合理的临床给药方案。

REFERENCES

- [1] LEMKE A, KIDERLEN A F, KAYSER O. Amphotericin B[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2005, 68(2): 151-162.
- [2] 陈裕充, 温海. 两性霉素 B 及其脂质体的抗真菌机制[J]. 中国真菌学杂志, 2006, 1(5): 312-314, 307.
- [3] SIDHU R, LASH D B, HEIDARI A, et al. Evaluation of amphotericin B lipid formulations for treatment of severe coccidioidomycosis[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2018, 62(7). Doi: 10.1128/aac.02293-17.
- [4] CHONG G L, BROEKMAN F, POLINDER S, et al. Aerosolised liposomal amphotericin B to prevent aspergillosis in acute myeloid leukaemia: Efficacy and cost effectiveness in real-life[J]. Int J Antimicrob Agents, 2015, 46(1): 82-87.
- [5] SOSA L, CLARES B, ALVARADO H L, et al. Amphotericin B releasing topical nanoemulsion for the treatment of candidiasis and aspergillosis[J]. Nanomedicine, 2017, 13(7): 2303-2312.
- [6] XIU X, FENG C X, DU Y L, et al. Preparation of amphotericin B liposomes and its pharmacokinetics[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2015, 24(2): 148-150.
- [7] 李培军. 脂质体的特性及临床治疗进展[J]. 中国现代药物应用, 2014, 8(5): 243-245.

收稿日期: 2020-11-10

(本文责编: 曹粤锋)