

· 论 著 ·

兔血浆中纳曲酮 LC-MS/MS 分析方法的建立及其在纳曲酮-3-O-辛酸酯药动力学研究中的应用

王 陈, 石 童, 陈学军, 张瑞华, 李丽琴

(国民核生化灾害防护国家重点实验室, 北京 102205)

摘要:目的 建立快速灵敏的液相色谱-串联质谱法, 研究纳曲酮-3-O-辛酸酯在兔体内的药动力学。方法 纳曲酮辛酸酯进入体内后可快速水解为纳曲酮, 因此纳曲酮-3-O-辛酸酯在兔体内的药动力学参数可基于纳曲酮的血浆样品浓度检测而获得。血浆样品预处理采用甲基叔丁基醚液液萃取方法, 以纳洛酮为内标。采用 Agilent Zorbax SB-C18 (100 mm×2.1 mm, 3.5 μm) 型色谱柱, 以甲醇/0.1% 甲酸水溶液 (50:50, V/V) 作为流动相, 流速 0.2 mL·min⁻¹; 正离子多反应监测模式: 纳曲酮 (*m/z* 342.2→324.1), 内标纳洛酮 (*m/z* 328.1→310.2); 选用 12 只新西兰大耳白兔, 分别 im 给予等摩尔剂量的纳曲酮和纳曲酮-3-O-辛酸酯, 于给药前及给药后不同时间点取血, 所得的血药浓度数据采用非房室模型计算主要药动力学参数。结果 血浆内源性物质均不干扰样品峰, 建立的 LC-MS/MS 体内分析测定方法的绝对回收率 >76%, 线性范围为 0.5~100 μg·L⁻¹ (*r*² > 0.999)。兔 im 给予纳曲酮 1.0 mg·kg⁻¹ 后纳曲酮的主要药动力学参数为: *T*_{max} 为 (6.7±2.6) min, *C*_{max} 为 (681±153) μg·L⁻¹, *T*_{1/2} 为 (40.0±7.5) min, *AUC*_{0-t} 为 (25 850±4642) μg·min·L⁻¹, *MRT*_{in} 为 (43.7±6.1) min。兔 im 给予等摩尔剂量的纳曲酮辛酸酯 1.2 mg·kg⁻¹ 后, 纳曲酮的主要药动力学参数为: *T*_{max} 为 (240.0±120.0) min, *C*_{max} 为 (61.3±10.6) μg·L⁻¹, *T*_{1/2} 为 (295.7±133.0) min, *AUC*_{0-t} 为 (30 650±6775) μg·min·L⁻¹, *MRT*_{in} 为 (406.1±5.0) min。结论 本研究建立的 LC-MS/MS 方法灵敏度高, 适用于纳曲酮-3-O-辛酸酯的药动力学研究。与 im 等摩尔剂量的纳曲酮相比, 纳曲酮-3-O-辛酸酯的达峰时间和半衰期显著延长, 达峰浓度显著降低。

关键词: 纳曲酮; 纳曲酮-3-O-辛酸酯; 液相色谱质谱联用法; 药动力学

中图分类号: R965, R969

文献标志码: A

文章编号: 1000-3002-(2021)02-0102-07

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2021.02.004

纳曲酮主要作为阿片类毒品依赖者脱毒后预防复吸的辅助药物^[1-2], 最近也被用于治疗酒精成瘾^[3-4]。目前上市产品仅有片剂, 由于首过效应严重, 口服生物利用度低 (5%~40%), 需要多次服药, 患者依从性差, 造成在抗复吸治疗中的脱失率较高。因此, 为提高患者的使用依从性, 减少服药次数, 国内外研究者致力于开发多种长效制剂。一方面开发多种纳曲酮给药系统, 包括透皮制剂、微针给药系统、微球植入制剂、口服缓释制剂等^[5-6]; 另一方面, 利用纳曲酮存在活性羟基的结构特点, 开展酯化前体药物研究^[7-13], 以提高生物利用度。国内外已有文献报道应用液相色谱-串联质谱法 (liquid chromatography-tandem mass spectroscopy, LC-MS/MS) 开展纳曲酮的药动力学研究^[14-17]。本研究建立了

血浆用量少、灵敏度更高的方法, 对纳曲酮-3-O-辛酸酯在兔体内的药动力学进行研究, 并与纳曲酮原型药物的药动力学参数进行差异性比较, 为该化合物的实际应用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 药品、试剂和主要仪器

盐酸纳洛酮 (批号: 112K0747) 和色谱纯甲醇 (批号: WXBB0253V), 美国 Sigma 公司; 纳曲酮和纳曲酮-3-O-辛酸酯 (纯度 >99%), 防化研究院合成, 化学结构式见图 1。色谱纯甲酸 (批号: 4022536003719), 德国 Merck 公司; 分析纯甲基叔丁基醚 (批号: 20130518), 天津光复精细化工研究所; 分析纯氢氧化钠 (批号: 20130822), 北京化工厂。Agilent 1200/6410 LC/QQQ 系统, 美国安捷伦公司; Genie Vortex-2 型涡旋振荡器, 美国 Scientific Industries 公司; Sigma 1-14 高速离心机, 德国 Sigma

作者简介: 王 陈, 博士, 副研究员, 主要从事代谢组学和药代动力学研究; E-mail: wangchenpla@163.com

通讯作者: 李丽琴, E-mail: liliqinpla@163.com

公司;N-EVAP 型氮吹仪,美国 Organonation Associates 公司;DT5-4B 型低速台式离心机,北京时代北利离心机有限公司;超纯水系统,美国 Millipore 公司。

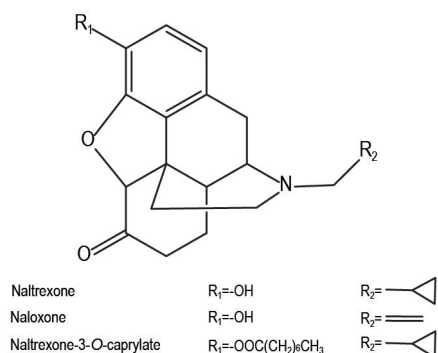


Fig.1 Chemical structures of naltrexone (NTX), naloxone and naltrexone-3-O-caprylate.

1.2 动物

12 只新西兰大耳白兔,体重 2.0~2.5 kg,成年,雌雄各半,由北京金牧阳实验动物养殖有限责任公司提供,合格证号为 SCXK(京)2015-0005。实验动物使用许可证号:SYXK(军)2012-0017。饲养条件:温度保持在 21~23°C,湿度保持在 45%~75%,自由摄食饮水。本研究的动物使用方案获防化研究院实验动物福利与伦理委员会批准。

1.3 给药方案和样品采集

选用新西兰大耳白兔,雌雄各半,随机分成 2 组,每组 6 只,分别 im 给予纳曲酮 1 mg·kg⁻¹或纳曲酮-3-O-辛酸酯 1.2 mg·kg⁻¹(与纳曲酮 1 mg·kg⁻¹等摩尔剂量)。各组动物给药前及给药后(纳曲酮组:2.5, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90, 120, 150 和 240 min;纳曲酮 3-O-辛酸酯组:5, 15, 30, 60, 120, 240, 360, 480, 600, 720 和 1440 min)分别耳缘静脉取血 0.3 mL,置于加有抗凝剂的塑料离心管中,30 min 后 166×g 离心 10 min 取血浆,-20°C 冷冻保存备用。

1.4 LC-MS/MS 检测条件

LC 条件:色谱柱:Agilent Zorbax SB-C18 (100 mm×2.1 mm, 3.5 μm);流动相:甲醇/0.1% 甲酸水(50:50);流速:0.2 mL·min⁻¹;柱温:25°C;进样量:5 μL。

MS/MS 条件:ESI 源,正离子多反应监测模式:纳曲酮(342.1→324.1),内标纳洛酮(328.1→310.0),Fragmentor 电压 135 V,干燥气温度 300°C,干燥气流速 12 L·min⁻¹,毛细管电压 5 kV,Delta EMV 为 200 V。

1.5 标准曲线制备

精密称取盐酸纳曲酮溶于甲醇,配成 1 g·L⁻¹(游离碱计)储备液。该储备液用甲醇/水(50:50)分别稀释成 10, 20, 40, 100, 200, 400, 1000 和 2000 μg·L⁻¹浓度系列的标准曲线工作液。精密称取标准品盐酸纳洛酮适量,用甲醇溶解后得到 1 g·L⁻¹(游离碱计)内标储备溶液,用甲醇/水(50:50)稀释成 200 μg·L⁻¹,作为内标溶液。取 100 μL 空白兔血浆,加入 5 μL 标准曲线工作溶液,得到浓度分别为 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50 和 100 μg·L⁻¹的血浆标准曲线样品。质控工作液(quality control, QC)同样稀释配制,纳曲酮浓度分别为 0.8, 10 和 80 μg·L⁻¹,定量限溶液配置为 0.5 μg·L⁻¹。

1.6 血浆样品预处理

取兔血浆 0.1 mL 置于 10 mL 具塞玻璃试管中,加入 5 μL 甲醇/水(50:50)(标准曲线样品和质控样品不加)、内标纳洛酮(200 μg·L⁻¹)5 μL、0.1 mol·L⁻¹ NaOH 溶液 10 μL,涡旋振荡 20 s 后,加甲基叔丁基醚 2 mL,涡旋振荡 2 min,于 400×g 离心 10 min,分取有机层 1.6 mL,在 50°C 条件下氮吹仪吹干。残留物用流动相 100 μL 溶解,10 625×g 离心 10 min,分取上清 75 μL,取 5 μL 进样。

1.7 统计学分析

血浆样品预处理后经 LC-MS/MS 检测,所得的血药浓度数据经 PKC V1.0 软件(上海宏能软件有限公司)处理,采用非房室模型计算主要药动学参数。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验进行统计学分析。*P*<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 质谱条件的确定和优化

纳曲酮和内标纳洛酮在 ESI 正离子电离方式下,主要生成准分子离子峰 $[M+H]^+$ 峰,分别为 *m/z* 342 和 *m/z* 328,选择性对 $[M+H]^+$ 峰进行产物离子全扫描分析,纳曲酮和内标纳洛酮生成的主要碎片离子分别为 *m/z* 324 和 *m/z* 310(图 2),将其作为定量分析监测的产物离子,并进一步采用仪器自带的二级优化程序进行优化,最终优化碰撞能量分别为 18 eV 和 20 eV。

2.2 分析方法验证

2.2.1 专属性

在优化后的 LC-MS/MS 条件下,空白血浆样品、定量下限样品(lower limit of quantification, LLOQ)和兔 im 给药后的血浆样品色谱图见图 3。研

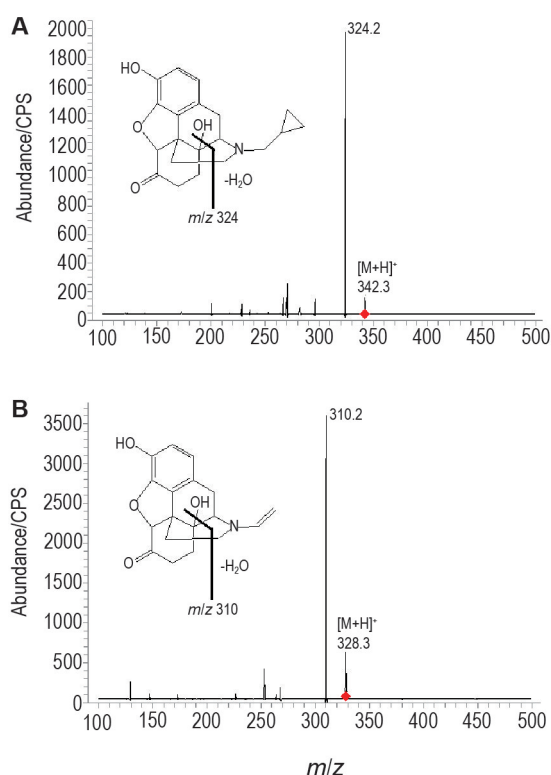


Fig.2 Product ion spectra of [M+H]⁺ of naltrexone (A) and naloxone (B).

究结果表明,纳曲酮和内标纳洛酮的保留时间分别为 1.45 和 1.35 min,空白血浆中的内源性成分在目标成分的出峰位置无干扰。

2.2.2 标准曲线和定量下限

以每个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,采用 1/x 加权最小二乘法进

行线性回归,5 d 内完成 5 条标准曲线的测定。平均标准曲线为 $y=(0.1987 \pm 0.0022)x+(0.0881 \pm 0.0117)$ ($n=5$)。5 条标准曲线在 $0.5 \sim 100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内均显示良好的线性 ($r^2 > 0.999$)。新配 LLOQ ($0.5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 浓度点样品进行定量下限的考察,每天测定 5 份样品,连续 3 d,计算批间和批内的准确度和精密度。在 LLOQ 浓度下,批间和批内准确度为 109.5% 和 108.1%,RSD 分别为 3.2% 和 5.2%。

2.2.3 稀释效应

对于超出线性范围的血浆样品,用空白血浆样品稀释 10 倍后进行重新测定,通过稀释效应进行考察。配制 $800 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的血浆样品 ($n=3$),用空白血浆稀释 10 倍后,按 1.6 方法进行操作。根据随行标曲计算样品的实测浓度平均值为 $81.4 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,准确度为 101.8%,RSD 为 2.4%。表明采用空白血浆对高浓度样品进行稀释,对测定结果基本无影响。

2.2.4 基质效应和回收率

取 0.8, 10 和 $80 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 3 个浓度的质控样品 ($n=6$),按 1.6 方法进行操作,进行 LC-MS/MS 分析后所得的峰面积为 A。取来源于不同兔的空白血浆 0.1 mL,按 1.6 方法进行操作,残留物分别用 $100 \mu\text{L}$ 浓度分别为 0.8, 10 和 $80 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的纳曲酮溶液(均含内标纳洛酮 $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)复溶,进行 LC-MS/MS 分析后所得的峰面积为 B;取 0.1×10^{-3} L 的水代替空白血浆,按 1.6 方法处理,所得的峰面积为 C。回收率(%)=A/B \times 100%,基质效应(%)=B/C \times 100%。

表 1 为基质效应和回收率的考察结果。在质控浓度为 0.8, 10 和 $80 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 下,纳曲酮的基质效应

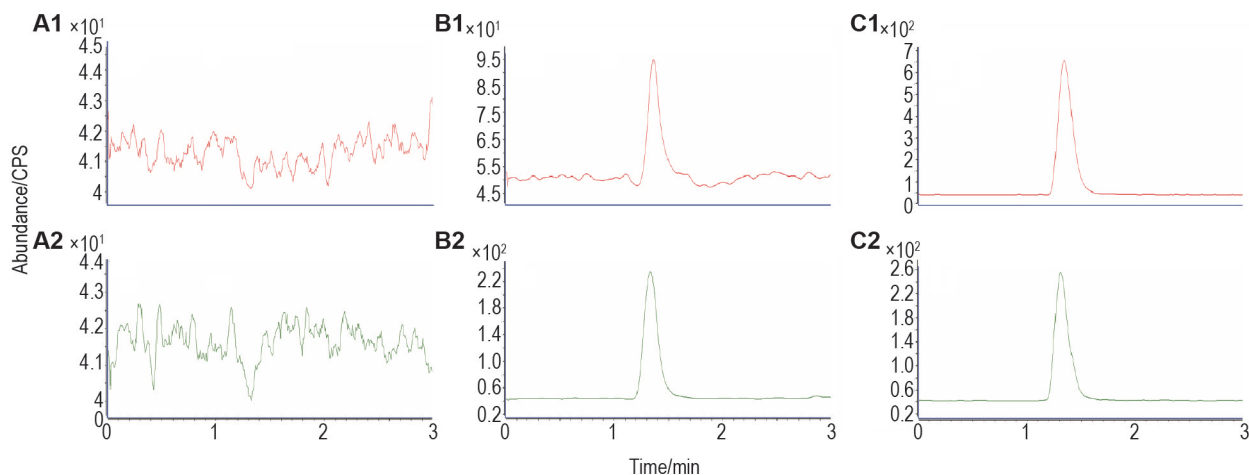


Fig.3 Representative multiple reaction monitoring (MRM) chromatograms of naltrexone (A) and naloxone (B) in rabbit plasma. A1, B1 and C1: blank plasma sample; A2, B2 and C2: blank plasma spiked with $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ naltrexone and $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ naloxone. Plasma sample collected after an im administration of naltrexone-3-*O*-caprylate. HPLC separation was accomplished on an Agilent Zorbax SB-C18 column (100 mm \times 2.1 mm, 3.5 μm) with a mobile phase composed of methanol-0.1 FA water (50:50) at a flow rate of 0.2 mL \cdot min⁻¹. The ion transitions monitored in multiple reaction-monitoring modes were m/z 342.2 \rightarrow 324.1 and m/z 328.1 \rightarrow 310.2 for naltrexone and naloxone, respectively.

分别为 87.2%, 84.6% 和 86.8%, 基质可引起目标成分信号抑制, 但 3 个浓度的抑制程度基本相当, 因此不影响目标成分的定量测定, 内标纳洛酮的基质效应为 75.2%。3 个浓度纳曲酮的回收率分别为 77.1%, 81.0% 和 76.5%, 内标纳洛酮的回收率为 77.8%。

Tab.1 Matrix effect and extraction recovery of naltrexone and naloxone in rabbit plasma

Concentration/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Matrix effect/%		Extraction recovery/%		
	$\bar{x}\pm s$	RSD	$\bar{x}\pm s$	RSD	
Naltrexone	0.8	87.2 \pm 6.1	7.0	77.1 \pm 5.6	7.3
	10	84.6 \pm 5.5	6.5	81.0 \pm 2.8	3.5
	80	86.8 \pm 3.3	3.8	76.5 \pm 3.3	4.3
Naloxone	10	75.2 \pm 4.4	5.9	77.8 \pm 3.3	4.2

The mean peak area of the analytes spiked into the pre-extraction plasma, the post-extraction plasma, and the post-extraction water are defined as A, B and C, respectively. The extraction recovery is expressed as $A/B\times 100\%$ and the matrix effect is expressed as $B/C\times 100\%$. RSD: relative standard deviation. $n=6$.

2.2.5 准确度和精密度

采用 3 个分析批次对测定方法的准确度和精密度进行验证, 取浓度为 0.8, 10 和 80 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的质控样品, 按 1.6 方法进行操作, 在每个分析批次内进行 5 次分析测定, 每分析批次随行标准曲线, 并以该标准曲线计算血药浓度, 求算每批的批内精密度和准确度以及 3 批共 15 个数据的批间精密度和准确度。

方法的准确度和精密度结果如表 2 所示, 3 个浓度的质控样品的准确度为 94.9%~105.4%, 批内精密度 1.3%~5.0%, 批间精密度 2.7%~4.2%。分析方法的准确度和精密度均符合方法学要求。

2.2.6 稳定性

方法学验证过程中, 利用 0.8, 10 和 80 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 3 个浓度的质控样品对稳定性进行考察, 包括室温 25 $^{\circ}\text{C}$ 放置 4 h、-20 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻条件下保存 30 d、样品置于自动进样器中 8 h 和 3 次冻融循环的稳定性, 并利用随行标准曲线计算样品的实测浓度。样品的稳定性考察结果如表 3 所示, 血浆样品在室温下放置 4 h、-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存 30 d, 处理后样品在室温条件下在自动进样器内放置 8 h 以及血浆样品 3 次冻融循环后样品保持稳定, 准确度为 98.3%~103.0%, 精密密度为 1.8%~6.7%。

2.3 药动学参数分析

应用所建立的 LC-MS/MS 方法测定了兔 im 给予纳曲酮和纳曲酮-3-O-辛酸酯后血浆中纳曲酮的含量, 平均血药浓度-时间曲线见图 4。采用非房室模型对所测数据进行分析, 得到主要的药动力学参数见表 4。研究表明, im 给予纳曲酮 1.0 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 后吸收迅速; 而与之相比, im 给予纳曲酮-3-O-辛酸酯 1.2 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 后, 血浆中纳曲酮浓度上升缓慢, T_{max} , $T_{1/2}$ 和 MRT_{m} 均显著延长 ($P<0.01$), C_{max} 显著降低 ($P<0.01$)。

Tab.2 Accuracy and precision of determination of naltrexone in rabbit plasma

Naltrexone/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Run 1 ($n=5$)		Run 2 ($n=5$)		Run 3 ($n=5$)		Between-run ($n=15$)	
	Accuracy/%	RSD/%	Accuracy/%	RSD/%	Accuracy/%	RSD/%	Accuracy/%	RSD/%
0.8	99.5 \pm 3.5	3.5	94.9 \pm 3.9	4.1	97.9 \pm 4.1	4.2	97.4 \pm 4.0	4.2
10	99.6 \pm 5.0	5.0	101.2 \pm 1.3	1.3	100.8 \pm 4.2	4.2	100.5 \pm 3.7	3.6
80	104.5 \pm 2.1	2.0	105.4 \pm 3.7	3.5	103.7 \pm 2.6	2.5	104.5 \pm 2.8	2.7

The accuracy and precision were assessed by analyzing the quality control samples. Accuracy was assessed by calculating the percentage of the theoretical concentration. Precision was determined by calculating the coefficient of variation of the replicates.

Tab.3 Stability of naltrexone in rabbit plasma

Naltrexone/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	25 $^{\circ}\text{C}$, 4 h		-20 $^{\circ}\text{C}$, 30 d		In autosampler, 8 h		3 Freeze-thaw cycles	
	Accuracy/%	RSD/%	Accuracy/%	RSD/%	Accuracy/%	RSD/%	Accuracy/%	RSD/%
0.8	99.6 \pm 2.7	2.7	98.3 \pm 1.8	1.8	98.7 \pm 3.8	3.8	101.4 \pm 3.2	3.2
10	100.1 \pm 4.8	4.8	101.6 \pm 3.2	3.1	100.2 \pm 1.3	1.3	100.9 \pm 6.8	6.7
80	100.2 \pm 2.4	2.4	100.3 \pm 3.2	3.1	102.2 \pm 3.4	3.3	103.0 \pm 3.5	3.4

The stability was assessed at different quality control concentration levels by keeping samples at 25 $^{\circ}\text{C}$ for 4 h, at -20 $^{\circ}\text{C}$ for 30 d, at ambient temperature for 8 h in autosampler, and over three freeze-thaw cycles, respectively. $n=5$.

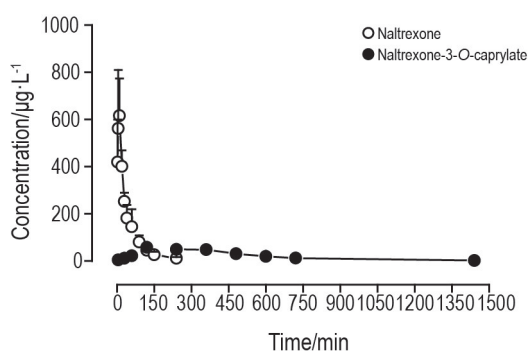


Fig.4 Mean plasma concentration-time curve of naltrexone after intramuscular administration of naltrexone ($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) or equal molar dose of naltrexone-3-O-caprylate ($1.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) in rabbits.

Tab.4 Main pharmacokinetic parameters of naltrexone after intramuscular administration of naltrexone or naltrexone-3-O-caprylate in rabbits.

Parameter	Naltrexone	Naltrexone-3-O-caprylate
T_{\max}/min	6.7 ± 2.6	$240.0 \pm 120.0^{**}$
$C_{\max}/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	680.8 ± 153.1	$61.3 \pm 10.6^{**}$
$T_{1/2}/\text{min}$	40.0 ± 7.5	$295.7 \pm 133.0^{**}$
$\text{AUC}_{0-t}/\mu\text{g} \cdot \text{min} \cdot \text{L}^{-1}$	$25\ 850 \pm 4642$	$30\ 650 \pm 6775$
$\text{AUC}_{\text{inf}}/\mu\text{g} \cdot \text{min} \cdot \text{L}^{-1}$	$26\ 578 \pm 4944$	$31\ 815 \pm 6641$
$\text{MRT}_{\text{tn}}/\text{min}$	43.7 ± 6.1	$406.1 \pm 5.0^{**}$

See Fig.4 for the dosage. $\bar{x} \pm s$, $n=6$. $^{**}P < 0.01$, compared with the naltrexone group.

3 讨论

本研究对 LC-MS/MS 方法学进行了系统验证。采用 ESI 源进行正负离子扫描,发现纳曲酮和内标纳洛酮在正离子模式下响应值较高,因此采用正离子检测模式。在色谱条件优化中,以分离度、对称性及保留时间为指标,对流动相组成及甲酸、乙酸、甲酸铵等添加剂的种类和含量进行优化,最终确定以甲醇/0.1%FA 水溶液 (50:50) 作为流动相。在样品预处理过程中,以回收率和基质效应为指标,考察了正己烷、乙酸乙酯和甲基叔丁基醚等有机溶剂及其不同比例的混合物作为提取溶剂,最后发现甲基叔丁基醚提取效率高,基质干扰少,最终优选其为提取溶剂。本研究所建立的方法快速、准确、灵敏度高,适用于兔血浆样品中纳曲酮含量的测定。

兔是药物临床前研究的主要实验对象之一。纳曲酮及其新剂型常以兔为实验对象开展代谢动力学研究^[18-19],同时也有一些文献报道酯化前体药物在兔体内的药动学研究^[20-21]。本研究发现,纳曲酮辛酸酯作为酯化前体药物,能够显著延长纳曲酮

在体内的驻留时间, T_{\max} 、 $T_{1/2}$ 和 MRT_{tn} 都较纳曲酮显著延长,分别延长至 35.8、7.4 和 9.3 倍, C_{\max} 降低至 9.0%,起到明显的缓释效果。

本研究建立的 LC-MS/MS 方法可用于检测兔血浆样品中纳曲酮的含量,并比较了纳曲酮原型药物与酯化前体药物的药动学参数,为设计研发阿片类毒品依赖者脱毒后长效抗复吸药物提供数据参考。

参考文献:

- [1] Navaratnam V, Jamaludin A, Raman N, *et al.* Determination of naltrexone dosage for narcotic agonist blockade in detoxified Asian addicts [J]. *Drug Alcohol Depend*, 1994, 34(3):231-236.
- [2] Takemori AE, Larson DL, Portoghesi PS. The irreversible narcotic antagonistic and reversible agonistic properties of the fumaramate methyl ester derivative of naltrexone [J]. *Eur J Pharmacol*, 1981, 70(4): 445-451.
- [3] Farren CK, Scimeca M, Wu R, *et al.* A double-blind, placebo-controlled study of sertraline with naltrexone for alcohol dependence [J]. *Drug Alcohol Depend*, 2009, 99(1-3):317-321.
- [4] Roozen HG, de Waart R, van der Windt DA, *et al.* A systematic review of the effectiveness of naltrexone in the maintenance treatment of opioid and alcohol dependence [J]. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2006, 16(5):311-323.
- [5] Goonoo N, Bhaw-Luximon A, Ujoodha R, *et al.* Naltrexone: a review of existing sustained drug delivery systems and emerging nano-based systems [J]. *J Control Release*, 2014, 183:154-166.
- [6] Gao X, Brogden NK. Development of hydrogels for microneedle-assisted transdermal delivery of naloxone for opioid-induced pruritus [J]. *J Pharm Sci*, 2019, 108(11):3695-3703.
- [7] Satyanarayana V, Dana CH, Kalpana SP, *et al.* *In vivo* evaluation of 3-O-alkyl ester transdermal prodrugs of naltrexone in hairless guinea pigs [J]. *J Control Release*, 2005, 102(2):509-520.
- [8] Yerramreddy TR, Milewski M, Penthala NR, *et al.* Novel 3-O-pegylated carboxylate and 3-O-pegylated carbamate prodrugs of naltrexone for microneedle-enhanced transdermal delivery [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2010, 20(11):3280-3283.
- [9] Vaddi HK, Hamad MO, Chen J, *et al.* Human skin permeation of branched-chain 3-O-alkyl ester and

- carbonate prodrugs of naltrexone [J]. *Pharm Res*, 2005, 22(5):758-765.
- [10] Nalluri BN, Milligan C, Chen J, *et al.* *In vitro* release studies on matrix type transdermal drug delivery systems of naltrexone and its acetyl prodrug [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2005, 31(9):871-877.
- [11] Pillai O, Hamad MO, Crooks PA, *et al.* Physico-chemical evaluation, *in vitro* human skin diffusion, and concurrent biotransformation of 3-*O*-alkyl carbonate prodrugs of naltrexone[J]. *Pharm Res*, 2004, 21(7): 1146-1152.
- [12] Hussain MA, Shefter E. Naltrexone-3-salicylate (a prodrug of naltrexone): synthesis and pharmacokinetics in dogs [J]. *Pharm Res*, 1988, 5(2):113-115.
- [13] Vaddi HK, Banks SL, Chen J, *et al.* Human skin permeation of 3-*O*-alkyl carbamate prodrugs of naltrexone [J]. *J Pharm Sci*, 2010, 98(8):2611-2625.
- [14] Valiveti S, Nalluri B, Hammell D, *et al.* Development and validation of a liquid chromatography-mass spectrometry method for the quantitation of naltrexone and 6 β -naltrexol in guinea pig plasma [J]. *J Chromatogr B*, 2004, 810(2):259-267.
- [15] Clavijo C, Bendrick-Pearl J, Zhang YL, *et al.* An automated, highly sensitive LC-MS/MS assay for the quantification of the opiate antagonist naltrexone and its major metabolite 6 β -naltrexol in dog and human plasma [J]. *J Chromatogr B*, 2008, 874(1-2):33-41.
- [16] Yun HY, Bang SC, Lee KC, *et al.* Simultaneous analysis of naltrexone and its major metabolite, 6 β -naltrexol, in human plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: application to a parent-metabolite kinetic model in humans [J]. *Talanta*, 2007, 71(4):1553-1559.
- [17] 原梅, 郭继芬, 魏淑香, 等. HPLC/MS/MS 测定恒河猴血浆中纳曲酮及其代谢物纳曲醇的浓度[J]. 药物分析杂志 (*Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*), 2004, 24(6):573-576.
- [18] Taylor SM, Rodgers RM, Lynn RK, *et al.* The seminal excretion, plasma elimination, tissue distribution and metabolism of naltrexone in the rabbit [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1980, 213(2):289-299.
- [19] Mohajeri SA, Yaghoubi S, Abdollahi E, *et al.* *In-vivo* study of naltrexone hydrochloride release from an *in-situ* forming PLGA-PEG-PLGA system in the rabbit [J]. *J Drug Deliv Sci Tec*, 2016, 36:156-160.
- [20] Tzeng JI, Su WL, Chu KS, *et al.* Pharmacokinetics of ketorolac pentyl ester, a novel ester derivative of ketorolac, in rabbits [J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2005, 21(8):365-370.
- [21] Liu SY, Liu KS, Kuei CH, *et al.* Simultaneous determination of buprenorphine and its prodrug, buprenorphine propionate, by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection: application to pharmacokinetic studies in rabbits [J]. *J Chromatogr B*, 2005, 818(2):233-239.

Development of liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for determination of naltrexone in plasma and its application to pharmacokinetic study of naltrexone-3-*O*-caprylate in rabbits

WANG Chen, SHI Tong, CHEN Xue-jun, ZHANG Rui-hua, LI Li-qin
(State Key Laboratory of NBC Protection for Civilians, Beijing 102205, China)

Abstract: OBJECTIVE To develop a rapid and sensitive liquid chromatography-tandem mass spectroscopy method for the pharmacokinetic study of naltrexone-3-*O*-caprylate in rabbits. **METHODS** Naltrexone-3-*O*-caprylate was completely metabolized to naltrexone after administration, therefore, the pharmacokinetic study was carried out based on the naltrexone concentration in plasma after administration of naltrexone and its esterification prodrug. The analyte and internal standard (naloxone) were extracted from plasma samples by methyl-tertiary-butyl ether. The separation was accomplished on an Agilent Zorbax SB-C18 column (100 mm \times 2.1 mm, 3.5 μ m) with a mobile phase composed of methanol-0.1 FA water (50:50, V/V) at a flow rate of 0.2 mL \cdot min⁻¹. The ion transitions monitored in multiple reac-

tion-monitoring modes were m/z 342.2 \rightarrow 324.1 and m/z 328.1 \rightarrow 310.2 for the naltrexone and naloxone internal standard, respectively. Twelve rabbits received im administration of either naltrexone or naltrexone-3-*O*-caprylate. Blood samples were collected before administration and at different time points after administration. The concentration-time data were analyzed with a non-compartmental method. **RESULTS** All plasma lots were found to be free of interferences with the compounds of interest. The extraction recovery of naltrexone and naltrexone was higher than 76%. The method was sensitive with good linearity ($r^2 > 0.999$) over the linear range of $0.5 \times 10^{-6} - 100 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. The main pharmacokinetic parameters of naltrexone after intramuscular administration of naltrexone ($1.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) were as follows: T_{\max} (6.7 ± 2.6) min, C_{\max} (681 ± 153) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $T_{1/2}$ (40.0 ± 7.5) min, AUC_{0-t} ($25\ 850 \pm 4642$) $\mu\text{g} \cdot \text{min} \cdot \text{L}^{-1}$ and MRT_{tn} (43.7 ± 6.1) min. The main pharmacokinetic parameters of naltrexone after intramuscular administration of an equal molar dose of naltrexone-3-*O*-caprylate ($1.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) were as follows: T_{\max} (240.0 ± 120.0) min, C_{\max} (61.3 ± 10.6) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $T_{1/2}$ (295.7 ± 133.0) min, AUC_{0-t} ($30\ 650 \pm 6775$) $\mu\text{g} \cdot \text{min} \cdot \text{L}^{-1}$ and MRT_{tn} (406.1 ± 5.0) min. **CONCLUSION** The method established is sensitive, specific, and successfully applied to the pharmacokinetic study of naltrexone-3-*O*-caprylate in rabbits. Compared with intramuscular injection of an equal molar dose of naltrexone hydrochloride, T_{\max} and $T_{1/2}$ of naltrexone-3-*O*-caprylate are significantly increased, while C_{\max} is significantly reduced.

Key words: naltrexone; naltrexone-3-*O*-caprylate; LC-MS/MS; pharmacokinetics

Corresponding author: LI Li-qin, E-mail: liliqinpla@163.com

(收稿日期: 2020-12-16 接受日期: 2021-02-20)

(本文编辑: 魏霞)

文献类型标志符号含义及统计表的书写原则

1. 文献类型标志如下:普通图书 M, 会议录 C, 汇编 G, 报纸 N, 期刊 J, 学位论文 D, 报告 R, 标准 S, 专利 P, 数据库 DB, 计算机程序 CP, 电子公告 EB。会议录包括座谈会、研讨会、学术年会等会议的文集;汇编包括多著者或个人著者的论文集,也可标注为 M。电子文献载体类型标志如下:磁带 MT, 磁盘 DK, 光盘 CD, 联机网络 OL。

2. 统计表内不应空格,若使用符号表示“未测”或“未做”,可用“…”或“ND”表示;如果表示“未测到”或数值小于有效数字,可用“-”或“0.0”“0.00”(据有效数字位数而定)。