

芳维A酸氨丁三醇在小鼠体内的药动学研究

李廷霞^{1*}, 王伯初², 赵语^{3#}, 夏铮铮³(1.重庆华邦制药有限公司, 重庆 401121; 2.重庆大学生物工程学院, 重庆 400044; 3.重庆医科大学附属大学城医院药剂科, 重庆 401331)

中图分类号 R965;R986 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)33-3093-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.33.08

摘要 目的:研究芳维A酸氨丁三醇(代号:FY-10)在小鼠体内的药动学规律。方法:采用高效液相色谱-质谱串联法,以阿维A为内标,检测小鼠静脉注射(16 μg/kg)FY-10后0.08、0.25、0.5、1.0、1.5、2.0、3.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0、24.0、48.0、72.0 h,与灌胃(4、16、64 μg/kg)给药FY-10后0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0、24.0、48.0、72.0 h的血药浓度,每个时间点8只,计算药动学参数;测定10、20、40 ng/ml(低、中、高剂量)FY-10在体外的鼠血浆蛋白结合率。色谱条件:色谱柱为Zorbax Extend C₁₈,流动相为混合液[甲醇-乙腈(50:50)]-20 mmol/L醋酸铵(pH 8.5)(85:15),流速为0.8 ml/min,柱温为35 ℃,进样量为40 μl;质谱条件:离子喷射电压为-3 500 V,多反应监测,负离子方式检测,用于监测的离子质荷比(*m/z*)为347→303(FY-10)和325→266(阿维A)。结果:FY-10检测质量浓度的线性范围为0.05~40.0 ng/ml(*r*=0.997 3),提取回收率为(50.6±3.1)%~(67.6±1.0)%。低、中、高剂量灌胃后药动学参数分别为AUC_{0-∞}:17.09、64.08、133.99 ng·h/ml, *c*_{max}:1.54、5.27、15.30 ng/ml, *t*_{1/2}:15.7、18.7、16.7 h;静脉注射后AUC_{0-∞}:70.80 ng·h/ml, *t*_{1/2}:22.1 h,绝对生物利用度为91.9%。低、中、高质量浓度FY-10的体外血浆蛋白结合率分别为(97.9±0.3)%、(99.3±0.1)%、(98.5±0.5)%。结论:FY-10经小鼠灌胃后和静脉注射后的药动学过程分别符合一室、二室模型,其体内绝对生物利用度和体外血浆蛋白结合率均较高。

关键词 芳维A酸氨丁三醇;高效液相色谱-质谱串联法;药动学;小鼠

Study on Pharmacokinetics of Arotinoid Trometamol in Mice

LI Ting-xia¹, WANG Bo-chu², ZHAO Yu³, XIA Zheng-zheng³(1.Chongqing Huapont Pharm. Co., Ltd., Chongqing 401121, China; 2.Bioengineering College of Chongqing University, Chongqing 400044, China; 3.Dept. of Pharmacy, University-Town Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 401331, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the pharmacokinetic profile of arotinoid trometamol (code name: FY-10) in mice. METHODS: Blood concentrations of FY-10 were determined by HPLC-MS/MS using acitretin as internal standard 0.08, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0, 24.0, 48.0 and 72.0 h after i.v. (16 μg/kg) and 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0, 24.0, 48.0 and 72.0 h after i.g. (4, 16 and 64 μg/kg) administration, at each time point with 8 mice; the pharmacokinetic parameters were calculated. The plasma protein binding rates *in vitro* of FY-10 (10, 20, 40 ng/ml) in plasma of mice were determined. Zorbax Extend C₁₈ column was used with mobile phase consisted of mixture [methanol-acetonitrile (50:50)]-20 mmol/L ammonium acetate (pH 8.5) (85:15) at the flow rate of 0.8 ml/min. The column temperature was 35 ℃ and sample size was 40 μl. Mass condition was as follows: ion spray voltage of -3 500 V, multiple reaction monitoring, negative ion detection mode, *m/z* values ranging from 347→303 for FY-10 and 325→266 for acitretin. RESULTS: The linear range of FY-10 were 0.05-40.0 ng/ml (*r*=0.997 3) with average recovery of (50.6±3.1)%-(67.6±1.0)%. Pharmacokinetic parameters of FY-10 after low-dose, medium-dose and high-dose intragastric administration were as follows: AUC_{0-∞}: 17.09, 64.08 and 133.99 ng·h/ml; *c*_{max}: 1.54, 5.27 and 15.30 ng/ml; *t*_{1/2}: 15.7, 18.7 and 16.7 h, respectively. Those after i.v. administration were as follows: AUC_{0-∞}: 70.80 ng·h/ml; *t*_{1/2}: 22.1 h; absolute bioavailability of FY-10 was 91.9%. The plasma protein binding rates *in vitro* of FY-10 at low, medium and high concentrations were (97.9±0.3)%, (99.3±0.1)% and (98.5±0.5)%, respectively. CONCLUSIONS: The pharmacokinetics process of FY-10 is in line with one-compartment model after i.g. administration and two-compartment model after i.v. administration. The *in vivo* and *in vitro* trials of mice show high bioavailability and plasma protein binding rate.

KEY WORDS Arotinoid trometamol; HPLC-MS/MS; Pharmacokinetics; Mice

芳维A酸氨丁三醇(Arotinoid trometamol,代号:FY-10)是多环芳维A酸的氨丁三醇盐,属于第3代维甲酸类药物。作为芳维A酸的前体药物,FY-10进入人体后迅速游离成芳维A酸和氨丁三醇盐,因此其具有与芳维A酸类药物类似的功效^[1],可

*本科。研究方向:临床药学。电话:023-67886972。E-mail:lit-xingxia@163.com

#通信作者:副主任药师,硕士研究生导师。研究方向:临床药学。电话:023-65714812。E-mail:zhaoyuu@hotmail.com

用于银屑病的治疗。本实验采用高效液相色谱-质谱串联(HPLC-MS/MS)法研究FY-10在小鼠体内的药动学规律^[2],为进一步开展FY-10的临床研究提供资料。

1 材料

1.1 仪器

API 4000型三重四极杆串联质谱仪、电喷雾离子化(ESI源)、Analyst 1.3数据处理系统(美国Applied Biosystem公司);Agilent 1100型高效液相色谱仪,包括自动进样器(美国Agi-

lent公司)。

1.2 药品与试剂

FY-10颗粒剂(批号:20040401,规格:290 μg:1 g)、FY-10对照品(批号:20030401,纯度:99.9%)、内标:阿维A对照品(批号:200406021,纯度:99.8%)均由重庆华邦制药有限公司提供;乙腈、甲醇均为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为自制蒸馏水。

1.3 动物

昆明种小鼠,♀♂各半,体质量25~35 g,长春高新医学动物实验研究中心提供,许可证号:SCXK(吉)2003-0004。

2 方法与结果

2.1 溶液的配制

2.1.1 FY-10溶液:精密称取FY-10对照品8.1 mg(相当于芳维A酸6.0 mg),置于10 ml棕色量瓶中,甲醇稀释至刻度,配制成600 μg/ml的FY-10贮备液,使用时用甲醇水溶液稀释至所需浓度。

2.1.2 内标溶液:精密称取阿维A对照品13.0 mg,置于10 ml棕色量瓶中,甲醇稀释至刻度,配制成1.30 mg/ml的阿维A贮备液;取阿维A贮备液用甲醇水溶液稀释至130 ng/ml,作为内标溶液。

2.2 色谱条件与质谱条件

色谱柱:Zorbax Extend C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:混合液[甲醇-乙腈(50:50, V/V)]-20 mmol/L 醋酸铵(氨水调pH至8.5)(85:15),流速:0.8 ml/min;柱温:35℃;进样量:40 μl。ESI源,离子喷射电压:-3 500 V;温度:450℃;源内气体1(GS1, N₂)压力:55 psi;气体2(GS2, N₂)压力:55 psi;气帘气体(N₂)压力:10 psi;负离子方式检测;扫描方式:多反应监测(MRM);FY-10和内标的解簇电压(DP)分别为-84 V和-80 V;碰撞气(N₂)压力:4 psi;FY-10和内标的碰撞诱导解离(CID)电压分别为-28 V和-21 V;用于监测的离子质荷比(*m/z*)为347→303(FY-10)和325→266(内标)。FY-10和内标的离子全扫描质谱图见图1。

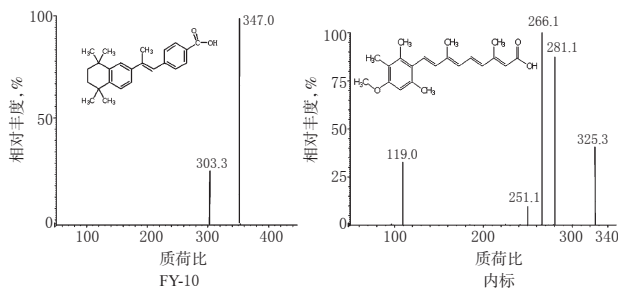


图1 FY-10和内标的离子全扫描质谱图

Fig 1 Ion scan spectra of FY-10 and internal standard

2.3 样品的处理

血浆样品:血浆解冻后,涡流30 s,向0.25 ml血浆样品中分别加入50 μl 50%甲醇水溶液和50 μl内标溶液,涡流30 s,离心,分取上清液,置于已活化好的固相萃取柱,经1 ml水和0.5 ml 20%甲醇水溶液洗涤后,以0.4 ml 95%甲醇水溶液(pH 9.0)洗脱,取洗脱液40 μl进样。组织样品:取组织匀浆上清液500 μl,按上述血浆样品中“加入50 μl 50%甲醇水溶液”起进行操作处理。

2.4 系统适用性试验

取空白血浆、空白血浆+FY-10(0.05 ng/ml)、血浆样品(静

脉给药后72.0 h),除空白血浆不加内标外,其余样品处理按“2.3”项下方法操作,进样测定。色谱见图2。

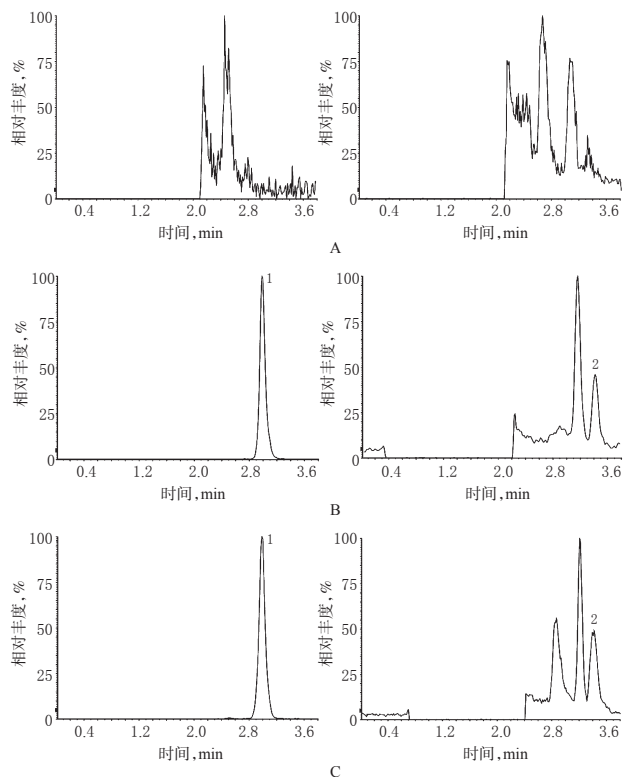


图2 高效液相色谱-质谱串联图

A. 空白血浆; B. 空白血浆+FY-10+内标; C. 血浆样品+内标; 1. 内标; 2. FY-10

Fig 2 HPLC-MS/MS spectra

A. blank plasma; B. blank plasma+FY-10+internal standard; C. plasma sample+internal standard; 1. internal standard; 2. FY-10

2.5 标准曲线的制备

取小鼠空白血浆0.25 ml,加入不同质量浓度的FY-10溶液50 μl,配制成FY-10质量浓度分别为0.05、0.12、0.4、1.2、4.0、12.0、40.0 ng/ml的血浆样品,除不加入50 μl甲醇水溶液外,其余按“2.3”项下方法进行处理,进样测定。以质量浓度(*c*)为横坐标、FY-10与内标的峰面积比(*y*)为纵坐标,用加权最小二乘法进行回归分析。得回归方程为 $y=0.033 10c+0.000 212$ ($r=0.997 3$)。FY-10检测质量浓度的线性范围为0.05~40.0 ng/ml,定量限为0.05 ng/ml。

2.6 提取回收率与精密度试验

按“2.5”项下方法配制FY-10质量浓度分别为0.12、1.2、36.0 ng/ml(低、中、高)的血浆样品,以固相萃取后测得的浓度除以未经提取直接进样测得的浓度,考察提取回收率。结果表明,低、中、高浓度血浆样品中FY-10的提取回收率分别为(67.6±1.0)%、(50.6±3.1)%、(51.9±2.4)%。同日内每个浓度测定6次,计算得日内RSD均<5%;连续测定3 d,计算得日间RSD均<6%。

2.7 药动学实验^[9]

2.7.1 静脉给药:取小鼠128只,随机分成15个实验组及1个空白对照组,每组8只,♀♂各半,实验期间自由进食与饮水。空白对照组小鼠只采血不给药,实验组均以16 μg/kg的剂量(“2.7.2”项下中剂量)经尾静脉注射FY-10溶液(给药容积为5

ml/kg),每个实验组分别对应1个采血时间点,于给药后0.08、0.25、0.50、1.0、1.5、2.0、3.0、4.0、6.0、8.0、10、12、24、48、72 h摘除小鼠眼球取血(不少于0.5 ml),置于肝素化试管中,离心,分离血浆,-20℃保存。

2.7.2 灌胃给药:取小鼠312只,随机分成3个剂量组,每个剂量组再随机分成12个实验组及1个空白对照组,每组8只,♀♂各半。空白对照组小鼠只采血不给药,其余组小鼠分别灌胃给予FY-10颗粒剂制备的溶液(给药容积为20 ml/kg),给药剂量分别为4、16、64 μg/kg(低剂量为临床拟用剂量换算所得,中、高剂量按4倍递增)。每个实验组分别对应1个采血时间点,于给药后0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0、24.0、48.0、72.0 h摘除小鼠眼球取血(不少于0.5 ml),置于肝素化试管中,离心,分离血浆,-20℃保存。

2.7.3 药-时曲线与药动学参数:取“2.7.1”和“2.7.2”项下各时间点的血浆,处理后,进样测定,记录峰面积。采用Topfit 2.0软件,根据非房室模型计算小鼠给药后的药动学参数,对FY-10在小鼠体内的动力学过程进行房室模型拟合。FY-10不同方式给药后在小鼠体内的药-时曲线见图3,FY-10不同方式给药后在小鼠体内的药动学参数见表1。

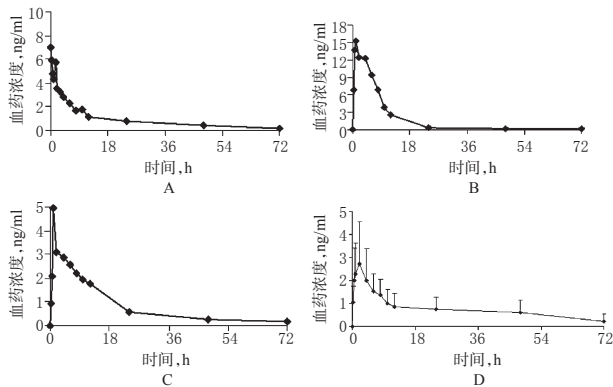


图3 FY-10不同方式给药后在小鼠体内的药-时曲线

A.静脉注射;B.64 μg/kg灌胃;C.16 μg/kg灌胃;D.4 μg/kg灌胃

Fig 3 Plasma concentration-time curves of FY-10 in mice after different administration

A. i.v. administration; B. i.g. administration of 64 μg/kg; C. i.g. administration of 16 μg/kg; D. i.g. administration of 4 μg/kg

表1 FY-10不同方式给药后在小鼠体内的药动学参数

Tab 1 Pharmacokinetic parameters of FY-10 in mice after different administration

给药方式	给药剂量, μg/kg	c_{max} , ng/ml	t_{max} , h	$t_{1/2}$, h	AUC_{0-72h} , ng·h/ml	$AUC_{0-\infty}$, ng·h/ml	MRT, h	CL, ml/(min·kg)	V_z , L/kg
静脉注射	16			22.1	65.05	70.80	18.6	3.77	7.21
灌胃	64	15.30	0.5	16.7	130.48	133.99	8.7	7.96	11.50
灌胃	16	5.27	1.0	18.7	59.78	64.08	16.4	4.16	6.67
灌胃	4	1.54	1.0	15.7	16.59	17.09	12.9	3.90	5.32

由图3和表1可知,FY-10经小鼠灌胃后的药动学过程符合一室模型,静脉注射后的药动学过程符合二室模型,绝对生物利用度(59.78/65.05)为91.9%;灌胃后的 AUC_{0-72h} 、 $AUC_{0-\infty}$ 及 c_{max} 均与给药剂量呈线性相关($r \geq 0.9758$),且各剂量间差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

2.7.4 血浆蛋白结合率^[4]:采用平衡透析法测定FY-10的血浆蛋白结合率。配制一定药液浓度的小鼠新鲜血浆试液,分别

取1.2 ml放入10 cm长管状半透膜透析袋中,两端扎紧,放入带塞试管中0.1 mol/L磷酸盐缓冲液(内含0.034 mol/L氯化钠,pH 7.0)液面下,FY-10的质量浓度分别为10、20、40 ng/ml。将试管置于(37±1)℃水浴中,持续振荡48 h,分别测定袋内血浆和袋外透析液中FY-10浓度,计算不同浓度血浆试液中血浆蛋白结合率:蛋白结合率=(袋内血浆中药物浓度-袋外透析液中药物浓度)/袋内血浆中药物浓度×100%。不同质量浓度FY-10在体外的小鼠血浆蛋白结合率见表2。

表2 不同质量浓度FY-10在体外的小鼠血浆蛋白结合率

Tab 2 Protein binding rates *in vitro* of different concentrations of FY-10 in mice plasma

质量浓度, ng/ml	平衡时间, h	血浆中FY-10的质量浓度, ng/ml	透析液FY-10的质量浓度, ng/ml	血浆蛋白结合率, %	平均血浆蛋白结合率, %
10	48	6.84	0.16	97.6	97.9±0.3
		10.20	0.19	98.1	
		7.26	0.16	97.8	
		10.30	0.19	98.2	
20	48	12.20	0.10	99.1	99.3±0.1
		13.70	0.10	99.3	
		12.80	0.10	99.2	
		13.90	0.08	99.4	
40	48	21.80	0.21	99.1	98.5±0.5
		22.10	0.45	98.0	
		21.70	0.25	98.9	
		22.40	0.42	98.1	

由表2可知,FY-10的体外小鼠血浆蛋白结合率较高,均在97%以上。

3 讨论

因FY-10结构中多个烯键极易被氧化,而光线、空气、水分、温度等均可催化、加速其氧化分解反应,故标准品及样品的保存和分析测试应该在严格的避光条件下完成。本实验是在暗室中以微弱红光(40 W×2)为照明光源的条件下完成的。

因FY-10的半衰期偏长,经多次预实验结果对比,本实验取血间隔相应较长。本实验采用的剂量是在本课题组前期动物药效学和药理毒理学研究结果基础上选择的,拟开发剂型为口服胶囊剂,故计算了灌胃给药的绝对生物利用度。实验结果表明,FY-10口服绝对生物利用度高,说明该药物的口服给药活性较强,具有一定临床开发应用价值。

参考文献

- [1] Orfanos CE, Ehlert R, Gollnick H. The retinoids. A review of their clinical pharmacology and therapeutic use[J]. *Drugs*, 1987, 34(4): 459.
- [2] Howard WB, Willhite CC, Sharma RP, et al. Pharmacokinetics, tissue distribution and placental permeability of tetrahydro-tetramethyl-naphthalenyl-propenyl benzoic acid (a retinoidal benzoic acid derivative) in hamsters [J]. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 1989, 14(2): 153.
- [3] 国家食品药品监督管理局药品评审中心.化学药品非临床药代动力学研究技术指导原则[S].2005-03.
- [4] 徐叔云.药理实验方法学[M].3版.北京:人民卫生出版社,2002:708.

(收稿日期:2012-11-02 修回日期:2013-01-31)