

抗炎化合物HB0314在大鼠体内的药动学及绝对生物利用度研究[△]

唐俏欣^{1,2*}, 许俊鹏^{1,2}, 潘超^{1,2}, 汤明海², 万丽^{1#}(1.成都中医药大学药学院, 成都 611137; 2.四川大学华西医院生物治疗国家重点实验室, 成都 610041)

中图分类号 R969.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)28-3915-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.28.08

摘要 目的:建立大鼠血浆样品中抗炎化合物HB0314的检测方法,并研究其在大鼠体内的药动学特征。方法:采用超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS),色谱柱为Waters Acquity UPLC™ BEH C₁₈柱,流动相为0.1%甲酸水溶液(A)-甲醇(B),梯度洗脱(0~2 min, 70%~90%B),流速为0.25 mL/min,柱温为30℃,进样量为5 μL;采用电喷雾离子源,毛细管电压为3 kV,离子源温度为150℃,脱溶剂气温度为450℃,脱溶剂气流量为600 L/h,锥孔气流量为45 L/h,内标为延胡索乙素。将12只大鼠随机分成iv组和ig组,每组6只,分别iv、ig HB0314溶液5、10 mg/kg,分别于给药前及给药后5、15、30、60、120、240、360、480、600、720、1 440 min取颈静脉血0.4 mL测定HB0314血药浓度,采用DAS 2.0软件计算药动学参数并计算绝对生物利用度。结果:HB0314质量浓度在1~1 000 ng/mL内线性关系良好($r=0.9955$),定量下限为1 ng/mL;日内、日间精密性、稳定性的RSD≤8.45% ($n=5$);回收率为68.21%~90.29% (RSD≤11.20%, $n=5$);基质效应为82.63%~106.90% (RSD≤6.75%, $n=5$)。iv与ig给药后,HB0314在大鼠体内的AUC_{0-24h}分别为(270.267±21.164)、(252.755±26.169) μg·h/L ($n=6$), $t_{1/2z}$ 分别为(8.722±2.266)、(11.877±4.517) h ($n=6$),绝对生物利用度为56.97%。结论:本方法快速、简便,可用于大鼠血浆中HB0314含量的测定。HB0314在大鼠体内具有较高的绝对生物利用度,提示后期剂型设计可考虑将其制成口服剂。

关键词 HB0314;超高效液相色谱-串联质谱法;大鼠;药动学;绝对生物利用度

Study on the Pharmacokinetics and Absolute Bioavailability of Anti-inflammatory Compound HB0314 in Rats *in vivo*

TANG Qiaoxin^{1,2}, XU Junpeng^{1,2}, PAN Chao^{1,2}, TANG Minghai², WAN Li¹(1.School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China; 2.State Key Laboratory of Biotherapy, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To establish the detection method for anti-inflammatory compound HB0314 in plasma of rats, and study on its pharmacokinetic characteristics in rats *in vivo*. **METHODS:** UPLC-MS/MS was performed on the column of Waters Acquity UPLC™ BEH C₁₈ with mobile phase of 0.1% formic acid aqueous solution (A) -methanol (B) by gradient elution (0-2 min, 70%-90% B) at flow rate of 0.25 mL/min, column temperature was 30℃, and injection volume was 5 μL. Electrospray ion source was used, capillary voltage was 3 kV, ion source temperature was 150℃, desolvation gas temperature was 450℃, desolvent air flow volume was 600 L/h, cone air flow volume was 45 L/h, and the inner standard was tetrahydropalmatine. 12 rats were randomly divided into iv group and ig group, 6 in each group. Rats were intravenously injected and intragastrically administrated HB0314 solution 5, 10 mg/kg. Sample blood 0.4 mL were taken from the jugular vein blood before administration and after 5, 15, 30, 60, 120, 240, 360, 480, 600, 720, 1 440 min of administration to determine the HB0314 plasma concentration. DAS 2.0 software was used to calculate the pharmacokinetic parameters and absolute bioavailability. **RESULTS:** The linear range of HB0314 was 1-1 000 ng/mL ($r=0.9955$), and the lower limit of quantification was 1 ng/mL. RSDs of extra-day and daytime precision, stability were not higher than 8.45% ($n=5$); recovery were 68.21%-90.29% (RSD≤11.20%, $n=5$), and matrix effects were 82.63%-106.90% (RSD≤6.75%, $n=5$). After intravenous injection and intragastric administration, AUC_{0-24h} were (270.267±21.164), (252.755±26.169) μg·h/L ($n=6$); $t_{1/2z}$ were (8.722±2.266), (11.877±4.517) h ($n=6$); and absolute bioavailability was 56.97%. **CONCLUSIONS:** The method is rapid, simple, and can be used for the determination of HB0314 content in plasma of rats. HB0314 shows high oral absolute bioavailability in rats *in vivo*, indicating that post-dosage form design may be considered as oral anti-inflammatory drugs.

KEYWORDS HB0314; UPLC-MS/MS; Rats; Pharmacokinetics; Absolute bioavailability

类风湿性关节炎(RA)是以慢性侵蚀性关节炎为主

△基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81374017)

* 硕士研究生。研究方向:药物代谢。E-mail: tangqiaoxin07@163.com

通信作者:教授。研究方向:药物分析。E-mail: wanli8801@163.com

要特征的一种系统性自身免疫病,在世界各地均有发病,具有明显家族遗传特点^[1-2]。RA早期表现为关节滑膜的慢性炎症,随后滑膜增生破坏关节软骨和关节囊,最终出现关节强直和畸形,导致功能性残疾^[3-4]。除此之外,RA还可能对眼、皮肤、肝、肾、肺、心血管系统等造成破坏^[5]。

目前治疗RA的药物主要有非甾体类抗炎药、用于改善病情的抗风湿药、糖皮质激素、生物制剂等^[6]。HB0314是基于类风湿性关节炎药物CP-690550开发的化合物,该化合物以细胞内信号转导通路的蛋白激酶为作用靶点,能够有效地选择性抑制两面神激酶3(JAK3)的活性,从而阻断多种炎症细胞因子的信号转导,有效控制风湿性关节炎病程,因此认为该化合物具有进一步开发的可能性。HB0314的化学结构式见图1^[7-9]。

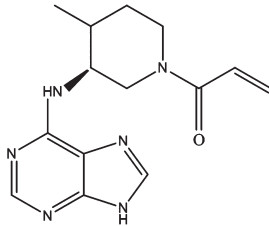


图1 HB0314的化学结构式

Fig 1 Chemical structure of HB0314

良好的药物在具备较好功效的同时还应做到毒副作用小、具有良好的药动学特征(如溶解度适中、蛋白结合率中度、代谢稳定性好、吸收与生物利用度好、生成代谢产物无毒或毒性较低等)^[10-11]。目前血浆样品处理方法主要有液-液萃取法、固相萃取法、蛋白沉淀法等^[12-15]。本文采用甲醇沉淀蛋白后超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)测定大鼠血浆中HB0314的浓度,获得药物在大鼠体内的药动学参数,为HB0314给药途径、新药设计和结构改造提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

UPLC系统和Xevo TQD三重四级杆质谱仪(美国Waters公司);AL204电子天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司);Heraeus Fresco 17离心机(美国Thermo Scientific公司);S0200-230V涡旋混合仪(上海迪奥生物科技有限公司)。

1.2 药品与试剂

HB0314(由四川大学华西医院生物治疗国家重点实验室合成,批号:20150621,经紫外、氢谱、碳谱、高分辨质谱鉴定,纯度: $>98\%$);延胡索乙素对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110726-201515,纯度: $>99.5\%$);甲醇和乙腈为色谱纯;水为娃哈哈纯净水。

1.3 动物

SPF级健康SD大鼠12只,♂,体质量(200 ± 20)g,由北京华阜康生物技术股份有限公司提供[实验动物生产许可证号:SCXK(京)2014-0004]。实验前适应性喂养3d,自由饮水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Waters Acquity UPLC™ BEH C₁₈(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm);流动相:0.1%甲酸水溶液(A)-甲醇(B),梯度洗脱(0~2 min, 70%~90% B);流速:0.25

mL/min;柱温:30℃;进样量:5 μL。

2.2 质谱条件

采用电喷雾离子源(ESI),毛细管电压:3 kV,离子源温度:150℃,脱溶剂气温度:450℃,脱溶剂气流量:600 L/h,锥孔气流量:45 L/h。正离子多反应监测(MRM)模式监测HB0314和延胡索乙素(内标),监测离子对和碰撞能量分别为HB0314[质荷比(m/z)287.16→138.14]25 eV,内标(m/z 356.10→192.00)30 eV,驻留时间:0.20 s,锥孔电压:40 V。

2.3 贮备液的制备

2.3.1 HB0314贮备液的制备 精密称取HB0314 10.01 mg,置于10 mL量瓶中,加乙腈溶解,定容,制成1.001 mg/mL的HB0314贮备液。

2.3.2 内标贮备液的制备 精密称取延胡索乙素对照品10.01 mg,置于100 mL量瓶中,加乙腈溶解,定容,制成100.1 μg/mL的内标贮备液。

2.4 标准血浆样品的制备

用甲醇将HB0314贮备液稀释成10、50、100、200、500、1 000、5 000、10 000 ng/mL的系列标准溶液。另用甲醇将内标贮备液稀释成50 ng/mL的内标溶液。取45 μL空白血浆,置于1.5 mL EP管中,分别加入5 μL系列标准溶液,制成HB0314质量浓度分别为1、5、10、20、50、100、500、1 000 ng/mL的标准血浆。

2.5 质控样品的制备

按“2.4”项下方法制备低、中、高质量浓度的质控样品(3、100、800 ng/mL)。

2.6 血浆样品的处理

取血浆样品50 μL,置于1.5 mL EP管中,加入50 ng/mL内标溶液5 μL,涡旋混匀,加250 μL甲醇沉淀蛋白,涡旋混匀2 min,13 000 r/min离心(离心半径为8.6 cm)10 min,取上清液,进样测定。

2.7 分组、给药及取样

将12只SD大鼠随机分成iv组和ig组,每组6只。实验前12 h行颈静脉插管术,两组大鼠分别iv、ig给药,给药剂量分别为5、10 mg/kg(给药剂量为前期药效学实验有效剂量)。分别于给药前及给药后5、15、30、60、120、240、360、480、600、720、1 440 min取颈静脉血0.4 mL,加入肝素化离心管中,3 500 r/min离心(离心半径为8.6 cm)15 min,收集上清血浆,-20℃冻存,备用。

2.8 方法学考察

2.8.1 专属性考察 取大鼠空白血浆、含HB0314标准血浆及iv给药后15 min的血浆样品各50 μL,按“2.6”项下方法处理后进样测定。结果,HB0314和内标具有较好的分离度,保留时间分别为0.92、1.00 min,且血浆中内源性物质不干扰HB0314和内标测定。色谱图见图2。

2.8.2 线性关系考察 取“2.4”项下标准血浆样品,按“2.6”项下方法处理后进样分析,以HB0314质量浓度为横坐标(x)、HB0314与内标峰面积比值为纵坐标(y)进行线性回归,得回归方程 $y=0.000\ 635\ 428x+0.000\ 650\ 97$

($r=0.9955$)。结果表明,HB0314含药标准血浆在质量浓度为1~1 000 ng/mL范围内线性关系良好,定量下限为1 ng/mL(RSD=7.78%, $n=5$)。

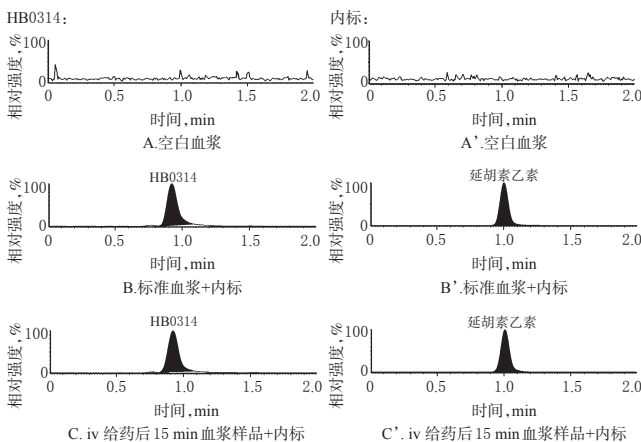


图2 MRM色谱图

Fig 2 MRM chromatograms

2.8.3 基质效应考察 取空白血浆45 μ L于1.5 mL EP管中,加入250 μ L甲醇,涡旋混匀沉淀蛋白,分别加入HB0314低、中、高质量浓度(终质量浓度分别为3、100、800 ng/mL)的HB0314溶液各5 μ L,均平行5份。再加入50 ng/mL的内标溶液5 μ L,涡旋混匀,13 000 r/min离心(离心半径为8.6 cm)15 min,取上清液,进样测定。计算得HB0314低、中、高质量浓度质控样品的基质效应分别为(98.34 \pm 3.20)%、(100.14 \pm 6.76)%、(86.64 \pm 4.01)%,RSD分别为3.26%、6.75%、4.62%($n=5$)。

2.8.4 准确度考察 取“2.5”项下低、中、高质量浓度质控样品各5份,按“2.6”项下方法处理后进样分析,以测得值与理论值的比值计算方法回收率。结果,低、中、高质量浓度质控样品的方法回收率分别为(82.37 \pm 6.92)%、(79.61 \pm 9.32)%、(76.71 \pm 8.50)%,RSD分别为7.01%、9.86%、11.20%($n=5$)。这表明本方法回收率良好。

2.8.5 精密度考察 按“2.5”项下方法制备低、中、高质量浓度质控样品各5份,按“2.6”项下方法处理后进样分析,连续测定3 d。以当日标准工作曲线计算各样品浓度,计算方法的日内、日间精密度。结果,低、中、高质量浓度质控样品日内RSD分别为4.94%、6.98%、7.65%($n=5$),日间RSD分别为8.45%、5.45%、4.20%($n=5$)。该结果表明,各质量浓度质控样品的精密度良好,符合生物样本的测定要求。

2.8.6 稳定性考察 按“2.5”项下的方法制备低、中、高质量浓度质控样品,均平行5份,分别考察室温下放置6 h、4 $^{\circ}$ C放置24 h、反复冻融3次的样品稳定性。结果,低、中、高质量浓度质控样品质量浓度测得值范围在91.48%~114.72%之间,RSD分别为7.94%、3.66%、5.88%($n=5$)。这表明HB0314在样品贮存及测定过程中均保持稳定。

2.9 药动学考察

两组大鼠体内HB0314药-时曲线见图3。采用DAS 2.0软件求算药动学参数,结果见表1。

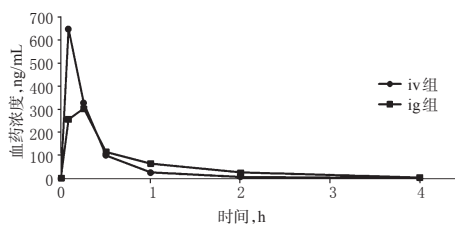


图3 两组大鼠体内HB0314的药-时曲线图

Fig 3 Concentration-time curves of HB0314 in rats in two groups

表1 两组大鼠体内HB0314的药动学参数($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 1 Pharmacokinetics parameters of HB0314 in rats in two groups($\bar{x} \pm s, n=6$)

药动学参数	iv组	ig组
AUC _{0-24 h} , μ g·h/L	270.267 \pm 21.164	252.755 \pm 26.169
AUC _{0-∞} , μ g·h/L	273.902 \pm 23.699	260.827 \pm 19.857
MR T _{0-24 h} , h	2.404 \pm 0.502	2.134 \pm 0.436
$t_{1/2\alpha}$, h	8.722 \pm 2.266	11.877 \pm 4.517
t_{max} , h		0.250 \pm 0.000
CL/F, L/(h·kg)	18.346 \pm 1.575	38.486 \pm 2.891
V/F, L/kg	208.032 \pm 46.930	561.830 \pm 151.729
C_{max} , μ g/L		303.200 \pm 37.100

根据以下公式计算HB0314在大鼠体内的绝对生物利用度(F)=(AUC_{0-24 h ig} $\times D_{iv}$)/(AUC_{0-24 h iv} $\times D_{ig}$) $\times 100\%$ (D 为给药剂量)。经计算得到HB0314在大鼠体内的 F 为56.97%。

3 讨论

液质联用技术能帮助实现对复杂生物样品中化合物的快速识别,尤其是MRM模式根据待测物的离子对进行选择检测,具有很强的特异性。因此本文采用UPLC-MS/MS建立了血浆中抗炎化合物HB0314的检测方法,并考察该化合物在大鼠体内的药动学特征。在该色谱条件下,能实现待测物与大鼠血浆中内源性物质的分离,同时能在较短时间内出峰,HB0314和内标的保留时间分别为0.92、1.00 min。在色谱分离过程中,流动相中加入适量甲酸,有助于改善峰形,提高检测灵敏度,因此本研究流动相A相采用0.1%甲酸水溶液。采用蛋白沉淀法进行样品前处理,操作简便,能节约大量时间成本,适合大批量样品的前处理。本研究采用甲醇沉淀蛋白,其回收率良好,能最大程度除去血浆中的大分子物质,从而保护色谱柱,延长柱使用寿命。

本研究结果显示,大鼠ig给药后,血药浓度在0.25 h达到最大值,表明HB0314能在大鼠体内得到迅速分布。大鼠iv、ig给药后, $t_{1/2\alpha}$ 分别为(8.722 \pm 2.266)、(11.877 \pm 4.517) h,CL/F分别为(18.346 \pm 1.575)、(38.486 \pm 2.891) L/(h·kg),表明HB0314能够在大鼠全身得到广泛的分布,且代谢和排泄速度较慢,能在体内维持较长的作用时间;AUC_{0-24 h}分别为(270.267 \pm 21.164)、(252.755 \pm 26.169) μ g·h/L, F 为56.97%,说明

阿卡地新对体外循环心肌缺血再灌注损伤模型犬心肌能量代谢的影响[△]

张登沈^{1*}, 梁贵友^{1#}, 刘达兴¹, 张 建¹, 王 峰¹, 刘晓晨²(1.遵义医学院附属医院心血管外科, 贵州 遵义 563000; 2.新乡医学院第一附属医院心血管外科, 河南 新乡 453100)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)28-3918-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.28.09

摘要 目的:探讨阿卡地新对体外循环(CPB)心肌缺血再灌注损伤(MIRI)模型犬心肌能量代谢的影响。方法:将犬随机分为对照组、模型组和阿卡地新低、高剂量组(0.8、3.2 mg/kg),每组6只。所有犬行CPB术,除对照组外,其余各组犬建立MIRI模型,并于主动脉阻断60 min后灌注含相应药物的St.Thomas心脏停搏液。分别于转流前和再灌注15、60、90 min时检测并计算心肌葡萄糖和游离脂肪酸(FFA)摄取率、静脉窦血浆中肌酸激酶同工酶(CK-MB)含量、线粒体中三磷酸腺苷(ATP)含量;分析左心室收缩压(LVSP)和左心室舒张末期压(LVEDP);检测心肌组织中腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK) mRNA表达和磷酸化AMPK(p-AMPK)蛋白表达。结果:各组犬转流前的所有指标差异均无统计学意义($P>0.05$);转流后,与对照组比较,模型组和各给药组犬3个时间点的心肌葡萄糖摄取率、FAA摄取率、ATP含量、AMPK mRNA表达、p-AMPK蛋白表达和LVSP均明显降低($P<0.05$),LVEDP和血浆中CK-MB含量均明显升高($P<0.05$)。与模型组比较,各给药组犬3个时间点的心肌葡萄糖摄取率、FAA摄取率、ATP含量、AMPK mRNA表达、p-AMPK蛋白表达和LVSP均明显升高($P<0.05$),LVEDP和血浆中CK-MB含量均明显降低($P<0.05$),其中高剂量组较低剂量组变化更明显($P<0.05$)。结论:阿卡地新可促进AMPK磷酸化,有助于心肌葡萄糖和FFA的摄取,促使心肌线粒体中ATP增加,有助于减轻CPB术后MIRI。

关键词 阿卡地新;体外循环;犬;心肌缺血再灌注损伤;心肌能量代谢

ig 给药后大鼠对HB0314的吸收效果较理想。这提示在后期经过制剂设计研究,可以考虑将该药物制成口服剂。

参考文献

- [1] Pericolini E, Alunno A, Gabrielli E, et al. The microbial capsular polysaccharide galactoxylomannan inhibits IL-17A production in circulating T cells from rheumatoid arthritis patients[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e53336.
- [2] 范鸣. 抗类风湿性关节炎药Tofacitinib[J]. *药学进展*, 2011, 35(10): 480.
- [3] Zerbini CA, Lomonte AB. Tofacitinib for the treatment of rheumatoid arthritis[J]. *Expert Review of Clinical Immunology*, 2012, 8(4): 319-331.
- [4] Chaparro DMR, Rillo OL, Casalla L. Work productivity in rheumatoid arthritis: relationship with clinical and radiological features[J]. *Arthritis*, 2012, 2012(6): 1-7.
- [5] 张群, 王竞秋. 类风湿性关节炎发病机制与临床治疗的研究进展[J]. *内蒙古中医药*, 2013, 32(21): 148-149.
- [6] 王澳轩, 刘冰妮, 刘颖, 等. 抑制JAK3激酶的免疫抑制剂托法替尼[J]. *药物评价研究*, 2014, 30(2): 169-172.
- [7] 胡若飞, 徐跃洋, 张二利, 等. 酪氨酸蛋白激酶JAK3抑制剂研究进展[J]. *中国新药杂志*, 2015, 24(9): 1017-1023.
- [8] 杨智, 张生龙. JAK3抑制剂托法替尼治疗类风湿关节炎研究进展[J]. *国际骨科学杂志*, 2013, 34(5): 326-328.
- [9] 王士伟, 谭初兵, 徐为人. 新型类风湿关节炎治疗药物托法替尼[J]. *中国新药杂志*, 2013, 22(14): 1607-1609.
- [10] 李敬来, 崔梦珂, 张振清, 等. 药物代谢动力学在药物研发中的意义及作用[J]. *解放军药学报*, 2010, 26(3): 258-261.
- [11] 李燕. 先导物药代特性评价与新药开发[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 164-169.
- [12] 高坤, 陈凤菊, 孙进, 等. 高效液相色谱-质谱联用法测定大鼠血浆中多西他赛的含量[J]. *沈阳药科大学学报*, 2008, 25(6): 462-466.
- [13] 周于禄, 曾嵘, 裴奇, 等. 金银花提取物中绿原酸在大鼠体内药动学和生物利用度的研究[J]. *中国医院药学杂志*, 2016, 36(3): 164-167.
- [14] 李灵, 陈晓辉, 毕开顺, 等. LC-MS/MS法测定大鼠体内多西他赛血药浓度及其药动学研究[J]. *中国药房*, 2011, 22(5): 398-401.
- [15] 张立康, 汪小珍, 李婉姝, 等. 姜黄素在大鼠体内药代动力学和生物利用度研究[J]. *中国药理学通报*, 2011, 27(10): 1458-1462.

[△] 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81560058、81360035); 贵州省科技计划项目(No.黔科合SZ字[2014]3022号); 贵州省科技合作计划项目(No.黔科合LH字[2015]7507号)

* 主治医师, 硕士。研究方向: 心肌缺血再灌注损伤。E-mail: 540229523@qq.com

通信作者: 教授, 博士, 博士生导师。研究方向: 心肌缺血再灌注损伤。E-mail: guiyou515@163.com

(收稿日期: 2017-01-20 修回日期: 2017-07-30)

(编辑: 刘明伟)