

抗肿瘤候选药物 Gedatolisib 在体外血浆和人工胃/肠液中的稳定性研究及其降解产物分析

武婷婷^{1*}, 张宇¹, 杜瑶¹, 陈瑞², 王丽丽³, 彭鸿曼⁴, 汤磊², 王颖^{1#}, 张吉泉^{1,2} (1. 贵州医科大学药学院, 贵阳 550025; 2. 贵州医科大学贵州省化学合成药物研发利用工程技术研究中心, 贵阳 550025; 3. 贵州医科大学医药卫生管理学院, 贵阳 550025; 4. 贵阳市妇幼保健院临床教学科, 贵阳 550003)

中图分类号 R969.1; R979.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)12-1452-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.12.09

摘要 目的: 考察抗肿瘤候选药物 Gedatolisib 在体外血浆和人工胃/肠液中的稳定性, 并分析其在体外血浆中可能的降解产物。方法: 采用高效液相色谱法, 以吡啶美辛为内标, 分别检测 Gedatolisib 在 SD 大鼠(雄性)血浆中孵育 0、0.5、1.0、1.5、2.0、3.0 h 和在空白人工胃液(pH 1.3, 不含酶)、空白人工肠液(pH 6.8, 不含酶)、人工胃液(pH 1.3, 含胃蛋白酶)、人工肠液(pH 6.8, 含胰蛋白酶)中孵育 0、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、6.0 h 的含量变化, 计算其剩余百分比; 利用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF/MS)技术分析空白血浆和血浆孵育样品的总离子流图, 比较差异峰并通过 MS 图推测降解产物。结果: Gedatolisib 在大鼠血浆中孵育 2.0 h 时的剩余百分比约为 63%, 继续孵育无明显变化; 在空白人工肠液中孵育不同时间的剩余百分比均在(99.18 ± 2.15)% ~ (103.20 ± 3.41)% 范围内; 在人工肠液中孵育 2.0 h 的剩余百分比降至(88.76 ± 1.53)%, 在空白人工胃液中孵育 2.0 h 的剩余百分比降至(85.63 ± 1.55)%, 继续孵育均无明显变化; 在人工胃液中孵育的剩余百分比从 0 h 的(94.94 ± 3.52)% 降至 6.0 h 的(16.19 ± 1.17)%。UPLC-Q-TOF/MS 的总离子流图显示, 血浆孵育样品与空白血浆的差异峰出现在正离子模式扫描下的 6.42 min 处, 该峰扫描通道可见 m/z 616.335 1、632.327 7、630.317 0、602.278 6[M+H]⁺ 的分子离子峰, 推测 Gedatolisib 在大鼠血浆中可能生成 1-(4-(3-(4,6-双吗啉-1,3,5-三嗪-2-基)苯基)脲基)苯甲酰基)-N,N-二甲基吡啶-4-氧化胺、1-(4-(4-(二甲基氨基)吡啶-1-羰基)苯基)-3-(4-(4-吗啉-6-(3-氧代吗啉)-1,3,5-三嗪-2-基)苯基)脲和 1-(4-(3-(4-(4,6-双吗啉-1,3,5-三嗪-2-基)苯基)脲基)苯甲酰基)-N-甲基吡啶等 3 个降解产物。结论: Gedatolisib 在大鼠血浆中不稳定, 可能发生末端氮原子氧化、吗啉环氧化和末端氮脱甲基化等反应; 在人工肠液和空白人工胃/肠液中稳定性良好, 在胃蛋白酶存在下发生明显降解。

关键词 抗肿瘤候选药物; Gedatolisib; 体外血浆; 人工胃液; 人工肠液; 稳定性; 降解产物

Study on the Stability of Antitumor Candidate Gedatolisib in Plasma *in vitro* and Simulated Gastric/Intestinal Fluid and Its Catabolites Analysis

WU Tingting¹, ZHANG Yu¹, DU Yao¹, CHEN Rui², WANG Lili³, PENG Hongman⁴, TANG Lei², WANG Ying¹, ZHANG Jiquan^{1,2} (1. College of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China; 2. Guizhou Provincial Engineering Technology Research Center for Chemical Drug R&D, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China; 3. School of Medicine and Health Management, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China; 4. Dept. of Clinical Teaching, Guiyang Maternal and Child Health Hospital, Guiyang 550003, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the stabilities of antitumor candidate Gedatolisib in plasma *in vitro* and simulated gastric/intestinal fluids, and to analyze the possible catabolites in plasma. METHODS: HPLC method was adopted. Using indometacin as internal standard, the contents of Gedatolisib incubated in plasma of SD rats (male) for 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 h and blank simulated gastric fluid (pH 1.3, no enzyme), blank simulated intestinal fluid (pH 6.8, no enzyme), simulated gastric fluid (pH 1.3, containing pepsin) and simulated intestinal fluid (pH 6.8, containing trypsin) for 0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 6.0 h were determined. The remaining percentage of Gedatolisib was calculated. UPLC-Q-TOF/MS was used to analyze the TIC of blank

Δ 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81703356); 贵州省科技计划项目(No.黔科合[2016]支撑 2819, No.黔科合基础[2020]1Z073); 贵州省卫生健康委科学技术基金项目(No.gzwwkj2019-1-178); 贵州省大学生创新创业训练计划项目(No.2018520343, No.2018520355, No.20195200137, No.20195200128); 贵阳市科技计划项目(No.筑科合同[2017]30-28号)

* 硕士研究生。研究方向: 药物化学。E-mail: 308755338@qq.com
通信作者: 副教授。研究方向: 药物化学。E-mail: 619624244@qq.com

plasma and incubated samples. The differential peaks were compared, and catabolites were inferred by MS chromatograms. RESULTS: The remaining percentage in plasma of rats for 2.0 h was about 63%, and there was no significant change after continued incubation. The remaining percentage of Gedatolisib incubated in blank simulated intestinal fluid for different time ranged (99.18 ± 2.15)% - (103.20 ± 3.41)%. The remaining percentage in simulated intestinal fluids for 2.0 h ranged (88.76 ± 1.53)%. The

remaining percentage in blank simulated gastric fluids for 2.0 h was ranged (85.63 ± 1.55)%, and there was no significant change after continued incubation. The remaining percentage in simulated gastric fluid was from (94.94 ± 3.52)% (0 h) to (16.19 ± 1.17)% (6.0 h). TIC of UPLC-Q-TOF/MS showed that the differential peaks of incubated samples and blank plasma was 6.42 min under positive mode scanning, molecular ion peak of m/z 616.335 1, simulated 632.327 7, 630.317 0, 602.278 6 $[M+H]^+$ could be found in scanning channel. It was speculated that Gedatolisib could generate 1-(4-(3-(4,6-dimorpholino-1,3,5-triazin-2-yl)phenyl)urea) benzoyl)-*N,N*-dimethylpiperidin-4-amine oxide, 1-(4-(4-(dimethylamino)piperidine-1-carbonyl)phenyl)-3-(4-(4-morpholino-6-(3-oxomorpholino)-1,3,5-triazin-2-yl)phenyl)urea and 1-(4-(3-(4-(4,6-dimorpholino-1,3,5-triazin-2-yl)phenyl)urea) benzoyl)-*N*-methylpiperidine. CONCLUSIONS: Gedatolisib is not stable in rat plasma, and it may undergo terminal *N* oxidation, morpholine ring oxidation and terminal *N* demethylation. Gedatolisib is stable in artificial intestinal fluid and blank artificial gastric/intestinal fluid, and degrades obviously in the presence of pepsin.

KEYWORDS Antitumor candidate; Gedatolisib; Plasma; Simulated gastric fluid; Simulated intestinal fluid; Stability; Catabolite

小分子靶向抗肿瘤候选药物 Gedatolisib 由美国 Pfizer 公司开发,目前处于 II 期临床研究阶段。该化合物能够通过抑制磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(PI3K-Akt-mTOR)通路中的 PI3K α 、PI3K γ 及 mTOR,有效抑制人乳腺癌细胞 MDA-361 和人前列腺癌细胞 PC3-MM2 的增殖^[1]。有临床研究表明,静脉注射 Gedatolisib 对乳腺癌、子宫内膜癌、胰腺癌、结直肠癌、非小细胞肺癌等多种肿瘤细胞均有显著的抑制作用^[2]。

口服药物进入生物体内发挥药效,必须经历吸收、分布、代谢、排泄的复杂过程。例如,化合物在血浆和消化道中易受血浆酶、胃肠 pH、胃肠液酶的影响,使其降解失活甚至生成毒性产物,直接影响化合物的有效性和安全性^[3-4],故对 Gedatolisib 的血浆和胃肠液稳定性进行研究并探讨其影响因素显得尤为重要。自 Gedatolisib 开展临床研究以来,均采用静脉注射的方式给药。Gedatolisib 具有较高的脂溶性($\log P=1.2$)和大于 500 的分子量($615.739\ 0$)^[1],以上两点均可能导致其水溶性差。该化合物虽不适合口服,但至今尚无相关文献解释其临床研究中仅以静脉注射给药的原因,也未见对其稳定性及代谢物分析的研究报道。本课题组前期成功合成了 Gedatolisib^[5],在此基础上,本研究采用高效液相色谱法(HPLC),以吲哚美辛为内标,考察 Gedatolisib 在 SD 大鼠体外血浆和人工胃/肠液中的稳定性;同时,本研究利用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱技术(UPLC-Q-TOF/MS),对空白血浆和血浆孵育样品的图谱进行比较,利用 UNIFI 1.8.2 数据库对 Gedatolisib 可能的降解产物进行解析,挖掘其潜在代谢位点,从而初步阐明 Gedatolisib 可能的体内代谢行为,旨在填补 Gedatolisib 稳定性研究方面的空白,为其后续结构改造与优化提供理论参考。Gedatolisib 和吲哚美辛的结构式见图 1。

1 材料

1.1 仪器

Xevo G2-XS 型 UPLC-Q-TOF/MS 仪(包括 MassLynx V4.1 型质谱工作站、UNIFI 1.8.2 数据库)和 e2695 型 HPLC 仪(美国 Waters 公司);XH-B 型旋涡混合器(江苏康健医疗用品有限公司);JN300-2 型氮气吹扫仪(苏州

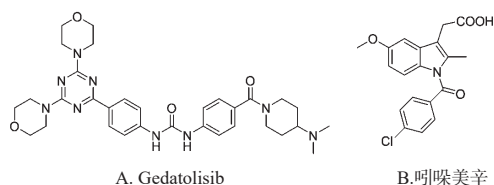


图 1 Gedatolisib 与吲哚美辛的结构式

Fig 1 Structure of Gedatolisib and indometacin

吉米诺仪器有限公司);KH-600E 型超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司);FA805N 型十万分之一电子天平(上海菁海仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

Gedatolisib 原料药(贵州医科大学药物化学重点实验室自制,批号:20190410,纯度: $>99.0\%$);吲哚美辛对照品(内标,大连美仑生物技术有限公司,批号:J0526A5,纯度: $>98\%$);肝素钠(北京索莱宝科技有限公司,批号:325D025);甲醇、乙腈为色谱纯;磷酸等其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

1.3 动物

清洁级 SD 大鼠,雄性,8~12 周,体质量 220~230 g,购自长沙市天勤生物技术有限公司,动物生产许可证号:SCXK(湘)2019-0014。

2 方法与结果

2.1 Gedatolisib 含量测定的色谱条件

色谱柱:Waters Symmetry C₁₈(150 mm \times 4.5 mm, 5 μ m);保护柱:Waters Symmetry C₁₈ VanGuard Cartridge(5 mm \times 3.9 mm, 5 μ m);流动相:甲醇(A)-0.1%磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0~7 min, 45% A \rightarrow 95% A;7~10.5 min, 95% A;10.5~12 min, 95% A \rightarrow 45% A;12~12.5 min, 45% A);流速:1 mL/min;检测波长:254 nm;柱温:35 $^{\circ}$ C;进样量:20 μ L。

2.2 降解产物定性分析的 UPLC-Q-TOF/MS 条件

色谱柱:Waters BEH C₁₈(50 mm \times 2.1 mm, 1.7 μ m);流动相:0.01%甲酸水溶液(A)-0.01%甲酸乙腈溶液(B),梯度洗脱(0~2 min, 95% A;2~8 min, 95% A \rightarrow 45% A;8~12 min, 45% A \rightarrow 5% A;12~13 min, 5% A;13~15 min, 5% \rightarrow 95% A);流速:0.40 mL/min;柱温:40 $^{\circ}$ C;进样量:2 μ L;分析时间:15 min。离子源:电喷雾

离子源(ESI);采集模式:正离子;毛细管电压:1.5 kV;离子源温度:120 ℃;溶剂气温度:400 ℃;脱溶剂气流量:800 L/h;锥孔气流量:50 L/h;扫描方式:MS^E Continuum模式;扫描范围:*m/z* 50~1 200。

2.3 溶液的制备

2.3.1 Gedatolisib对照品贮备液及对照品溶液

精密称取Gedatolisib原料药适量,以甲醇溶解并定容至5 mL量瓶中,制成质量浓度为1 mg/mL的对照品贮备液,于4 ℃贮存。使用前用甲醇稀释得到相应质量浓度的对照品溶液。

2.3.2 内标贮备液及内标溶液

精密称取内标对照品适量,以甲醇溶解并定容至5 mL量瓶中,制成质量浓度为1 mg/mL的内标贮备液,于4 ℃贮存。使用前用甲醇稀释得到相应质量浓度的内标溶液。

2.3.3 空白人工胃液的制备

按文献方法^[6],取稀盐酸16.4 mL,加水800 mL,用0.1 mol/L盐酸溶液调pH至1.3,再加水稀释并定容至1 000 mL,即得空白人工胃液。

2.3.4 人工胃液的制备

按文献方法^[6],取稀盐酸16.4 mL,加水800 mL、胃蛋白酶10 g,摇匀使其溶解,用0.1 mol/L盐酸溶液调pH至1.3,再加水稀释并定容至1 000 mL,即得人工胃液。

2.3.5 空白人工肠液的制备

按文献方法^[6],取磷酸二氢钾6.8 g,加水500 mL,摇匀使其溶解,用0.1 mol/L氢氧化钠溶液调pH至6.8,再加水稀释并定容至1 000 mL,即得空白人工肠液。

2.3.6 人工肠液的制备

按文献方法^[6],取磷酸二氢钾6.8 g,加水500 mL,摇匀使其溶解,用0.1 mol/L氢氧化钠溶液调pH至6.8;另称取胰蛋白酶10 g,加适量水溶解;将上述两种溶液混合后,再加水稀释并定容至1 000 mL,即得人工肠液。

2.4 样品采集、配制与处理

2.4.1 空白血浆采集

取清洁级大鼠6只,于股动脉采血,分别置于含肝素钠的离心管中,于4 ℃下以3 000×g离心10 min,取上层血浆于-80 ℃贮存,备用。

2.4.2 血浆样品配制

按文献方法^[6],取大鼠空白血浆198 μL,分别加入低、中、高质量浓度(2、10、30 μg/mL)的Gedatolisib对照品溶液(含醇量为1%)2 μL,振荡混匀,在37 ℃水浴中孵育0、0.5、1.0、1.5、2.0、3.0 h。

2.4.3 人工胃/肠液样品配制

精密量取质量浓度为1 mg/mL的Gedatolisib对照品溶液4份,每份50 μL,分别置于5 mL EP管中,分别用空白人工胃液、空白人工肠液、人工胃液、人工肠液稀释至刻度(含醇量均为1%);再用EP管分装200 μL,振荡混匀,于37 ℃水浴中孵育0、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、6.0 h。

2.4.4 血浆样品处理

取“2.4.2”项下样品200 μL,加入质量浓度为5 μg/mL的内标溶液400 μL,涡旋5 min混匀,于4 ℃下以20 000×g离心10 min,取上清液于37 ℃下以氮气流吹干,残渣加甲醇100 μL复溶,涡旋5 min混匀,于4 ℃下以20 000×g离心10 min,取上清液备测。

2.4.5 人工胃/肠液样品处理

取“2.4.3”项下样品200 μL,加入质量浓度为5 μg/mL的内标溶液400 μL,涡旋5 min混匀,于4 ℃下以20 000×g离心10 min,取上清液备测。

2.5 生物样品定量分析方法学考察

2.5.1 专属性考察

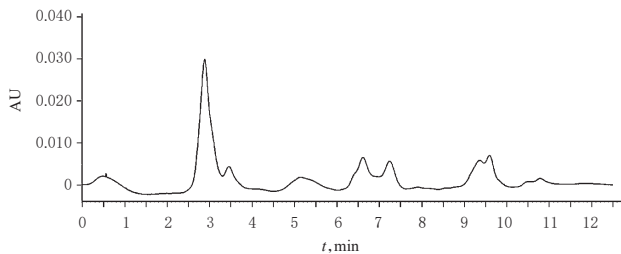
分别取空白血浆、空白血浆+Gedatolisib对照品(100 μg/mL)、血浆样品(10 μg/mL Gedatolisib孵育0.5 h),除空白血浆不加入内标外其余均按“2.4.4”项下方法处理,再按“2.1”项下色谱条件进样分析,记录色谱图;另取空白人工胃液、空白人工肠液、人工胃液、人工肠液、人工胃液+Gedatolisib对照品(100 μg/mL)、人工肠液+Gedatolisib对照品(100 μg/mL)、人工胃液样品(10 μg/mL Gedatolisib孵育0.5 h)、人工肠液样品(10 μg/mL Gedatolisib孵育0.5 h),除空白人工胃肠液和人工胃肠液不加入内标外其余均按“2.4.5”项下方法处理,再按“2.1”项下色谱条件进样分析,记录色谱图。结果,在该色谱条件下,Gedatolisib和内标均能同时被检出,保留时间分别为6.94、9.42 min,分离度良好,不受内源性物质干扰,详见图2。

2.5.2 线性关系考察

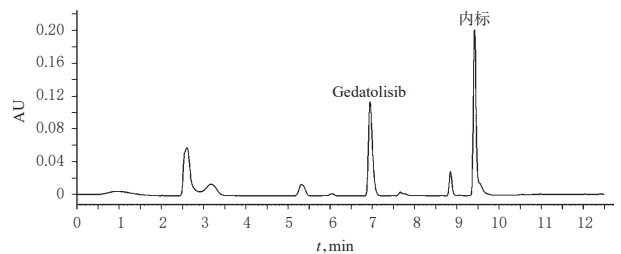
取大鼠空白血浆、空白人工胃液、空白人工肠液、人工胃液和人工肠液各198 μL,分别精密加入不同质量浓度的Gedatolisib对照品溶液2 μL,制成Gedatolisib质量浓度依次为0.5、1、2、5、10、20、40 μg/mL的样品溶液(含醇量为1%),涡旋5 min混匀,分别按“2.4.4”“2.4.5”项下方法处理,记录峰面积。以Gedatolisib峰面积与内标峰面积的比值为纵坐标(*y*)、Gedatolisib的质量浓度为横坐标(*x*)进行回归分析,得Gedatolisib在空白血浆中的回归方程为 $y=0.0345x-0.0089$ ($R^2=0.9996$),在空白人工胃液中的回归方程为 $y=0.0351x-0.0043$ ($R^2=0.9991$),在空白人工肠液中的回归方程为 $y=0.0334x-0.0052$ ($R^2=0.9995$),在人工胃液中的回归方程为 $y=0.0344x-0.0086$ ($R^2=0.9993$),在人工肠液中的回归方程为 $y=0.0338x-0.0018$ ($R^2=0.9994$)。结果表明,Gedatolisib检测质量浓度的线性范围均为1~40 μg/mL,定量下限均为1 μg/mL。

2.5.3 准确度、精密密度、稳定性试验

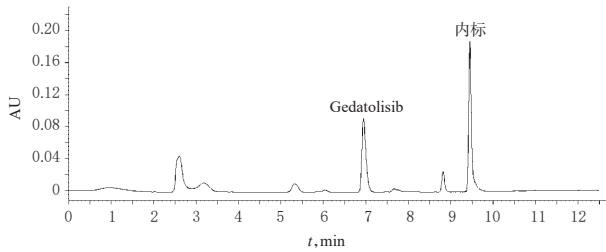
取大鼠空白血浆、空白人工胃液、空白人工肠液、人工胃液和人工肠液各198 μL,分别精密加入不同质量浓度的Gedatolisib对照品溶液2 μL,制成定量下限质量浓度(1 μg/mL)样品溶液和低、中、高质量浓度(2、10、30



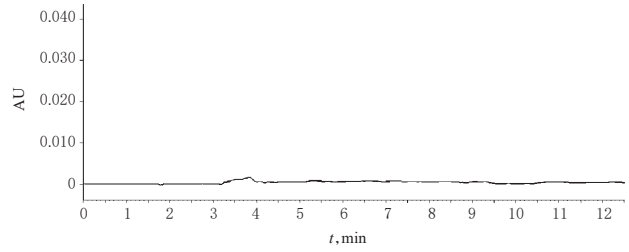
A.空白血浆



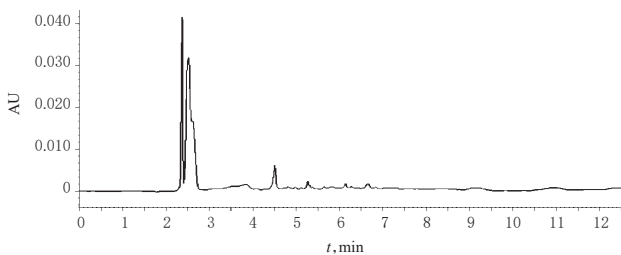
B.空白血浆+Gedatolisib+内标



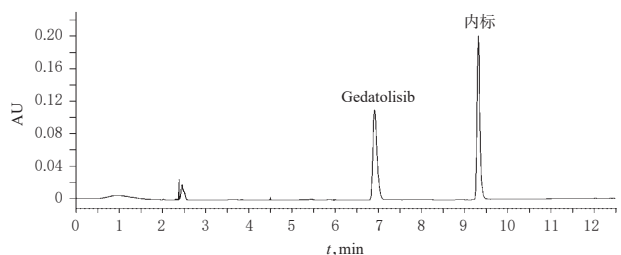
C.血浆样品+内标



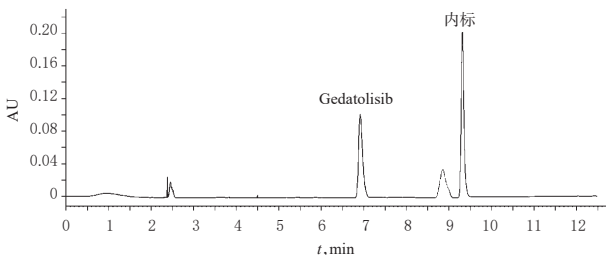
D.空白人工胃液



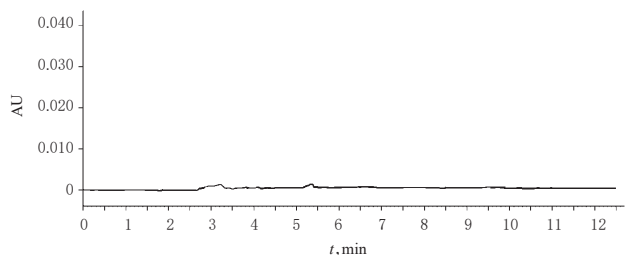
E.人工胃液



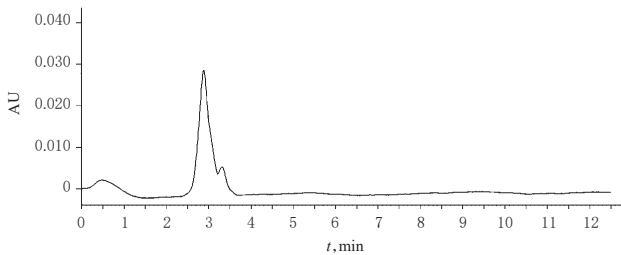
F.人工胃液+Gedatolisib+内标



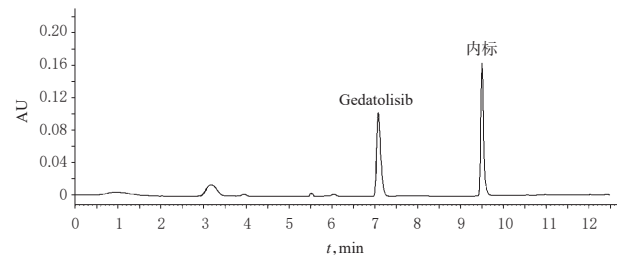
G.人工胃液样品+内标



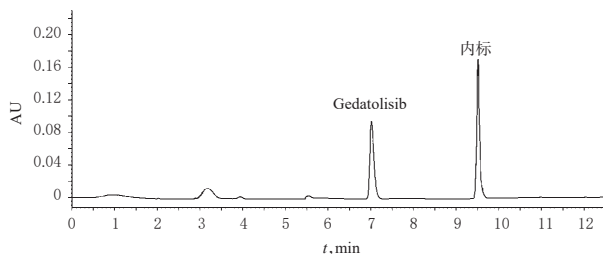
H.空白人工肠液



I.人工肠液



J.人工肠液+Gedatolisib+内标



K.人工肠液样品+内标

图2 高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms

$\mu\text{g/mL}$)质控样品溶液(含醇量为1%),每质量浓度平行5份,分别按“2.4.4”“2.4.5”项下方法处理,再按“2.1”项下色谱条件进样分析,记录峰面积,按标准曲线法计算Gedatolisib含量,以测得值与真实值进行比较,考察准确度。以含量的RSD考察日内精密性;连续进样3d,同法考察日间精密性。将上述处理后的样品溶液于室温下放置12h,再进样分析,以含量的RSD考察稳定性。结果见表1(表中结果均以检测值范围表示)。

表1 准确度、精密性、稳定性试验结果(%)

Tab 1 Results of accuracy, precision and stability tests (%)

孵育体系	Gedatolisib 剩余百分比			
	准确度 (n=5)	日内精密性RSD (n=5)	日间精密性RSD (n=15)	稳定性RSD (n=5)
空白血浆	82.64~90.36	3.25~5.39	4.63~9.89	5.66~7.89
空白人工胃液	84.02~90.64	1.43~4.91	2.12~5.12	1.56~6.20
空白人工肠液	89.21~92.63	0.82~4.15	1.54~4.43	3.11~5.17
人工胃液	82.86~90.06	1.84~4.01	2.32~7.84	2.13~6.73
人工肠液	87.97~91.07	1.17~3.36	1.68~6.36	1.89~3.32

2.6 Gedatolisib 在SD大鼠血浆中的稳定性考察

按“2.4.2”项下方法配制血浆样品,按“2.4.4”项下方法处理,再按“2.1”项下色谱条件进样分析,记录峰面积,按标准曲线法计算各样品中药物的质量浓度。每样品平行测定3次。以孵育前各样品中药物的理论质量浓度(分别为2、10、30 $\mu\text{g/mL}$)计算各孵育时间点的药物剩余百分比。结果,Gedatolisib在大鼠血浆中孵育2.0h时剩余百分比约为63%(n=3),继续孵育Gedatolisib的剩余百分比无明显变化,推测降解反应达到平衡,详见表2。

表2 Gedatolisib 在大鼠血浆中孵育后的剩余百分比($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

Tab 2 Remaining percentage of Gedatolisib after incubated in rat plasma($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

时间, h	Gedatolisib 剩余百分比		
	2 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	30 $\mu\text{g/mL}$
0	99.82 \pm 0.20	98.87 \pm 4.69	97.13 \pm 3.32
0.5	88.42 \pm 1.50	100.92 \pm 2.61	88.31 \pm 1.27
1.0	76.70 \pm 6.24	83.15 \pm 2.40	76.91 \pm 4.83
1.5	66.20 \pm 1.81	66.85 \pm 5.87	64.52 \pm 3.26
2.0	62.20 \pm 5.14	63.72 \pm 4.02	62.65 \pm 2.11
3.0	62.51 \pm 3.68	64.60 \pm 1.42	62.27 \pm 3.05

2.7 Gedatolisib 在人工胃/肠液中的稳定性考察

按“2.4.3”项下方法配制人工胃/肠液样品,按“2.4.5”项下方法处理,再按“2.1”项下色谱条件进样分析,记录峰面积,按标准曲线法计算各样品中药物的质量浓度。每样品平行测定3次。以孵育前各样品中药物的理论质量浓度(10 $\mu\text{g/mL}$)计算各孵育时间点的药物剩余百分比。结果,Gedatolisib在空白人工肠液中孵育不同时间的剩余百分比均在(99.18 \pm 2.15)%~(103.20 \pm 3.41)%范围内;在人工肠液中孵育至2.0h时剩余百分比低至(88.76 \pm 1.53)%,之后随着时间延长,剩余百分比无明显变化;Gedatolisib在空白人工胃液中孵育2.0h时剩余

百分比低至约(85.63 \pm 1.55)%,之后随着时间延长,剩余百分比无明显变化;在人工胃液中的剩余百分比从0h的(94.94 \pm 3.52)%下降至6.0h的(16.19 \pm 1.17)%,详见表3。

表3 Gedatolisib 在人工胃/肠液中孵育后的剩余百分比($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

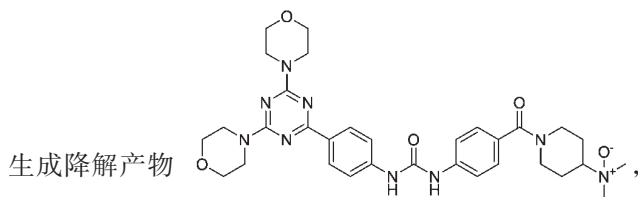
Tab 3 Remaining percentage of Gedatolisib after incubated in simulated gastric/intestinal fluid ($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

时间, h	Gedatolisib 剩余百分比			
	空白人工肠液	空白人工胃液	人工肠液	人工胃液
0	101.35 \pm 0.86	97.33 \pm 1.22	100.03 \pm 1.31	94.94 \pm 3.52
0.5	103.20 \pm 3.41	89.38 \pm 3.53	90.32 \pm 3.44	72.76 \pm 2.37
1.0	99.18 \pm 2.15	88.74 \pm 2.15	89.81 \pm 2.02	60.05 \pm 4.10
2.0	100.16 \pm 1.52	85.63 \pm 1.55	88.76 \pm 1.53	57.47 \pm 2.75
3.0	102.85 \pm 3.13	87.62 \pm 3.71	89.83 \pm 2.32	47.49 \pm 1.87
4.0	101.64 \pm 4.83	86.83 \pm 2.33	87.76 \pm 1.85	37.53 \pm 1.95
6.0	102.43 \pm 2.73	86.91 \pm 1.14	88.01 \pm 2.68	16.19 \pm 1.17

2.8 Gedatolisib 的降解产物检测试验

由于孵育时间内人工胃液中药物剩余百分比过低,剩余量无法保证有效浓度,难以保证药效发挥;另外,在空白人工胃液、空白人工肠液、人工肠液中Gedatolisib表现稳定,此外因Gedatolisib以静脉注射给药,所以仅选取血浆样品进行降解产物分析。采集在“2.6”项下稳定性试验中Gedatolisib剩余百分比最低的孵育体系(即质量浓度为10 $\mu\text{g/mL}$ 孵育2.0h的血浆样品)为体外孵育样品,并以未加入Gedatolisib的孵育溶液(空白血浆)为空白样品,按“2.2”项下条件进样分析,比较空白样品和体外孵育样品的总离子流图(见图3),找出差异峰;通过MS^E Continuum模式获得各色谱峰的准分子离子及碎片离子信息;利用UNIFI 1.8.2数据库推测Gedatolisib的降解产物。

由图3可见,体外孵育样品与空白样品的差异峰出现在正离子模式扫描下的6.42 min处。该差异峰的MS扫描通道可见m/z 616.335 1、632.327 7、630.317 0、602.278 6[M+H]⁺的分子离子峰。其中,准分子离子峰m/z 616.335 1[M+H]⁺为原型化合物Gedatolisib(见图4);根据降解产物中的准分子离子峰m/z 632.327 7[M+H]⁺推测,Gedatolisib结构中的末端氮原子可能发生氧化,



即1-(4-(3-(4,6-双吗啉-1,3,5-三嗪-2-基)苯基)苯基)脲基)苯甲酰基)-N,N-二甲基吡啶-4-氧化胺(M1,MS图见图5A);根据降解产物的准分子离子峰m/z 630.317 0[M+H]⁺推

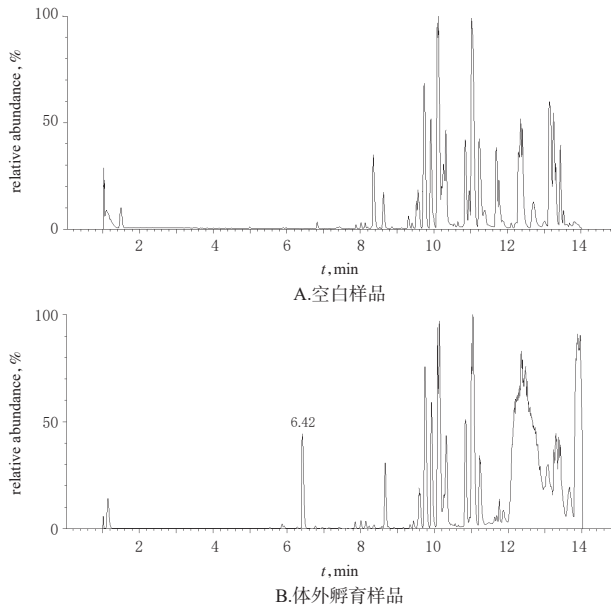


图3 总离子流图
Fig 3 TIC diagrams

测, Gedatolisib 结构中的吗啉环可能发生氧化, 生成降解

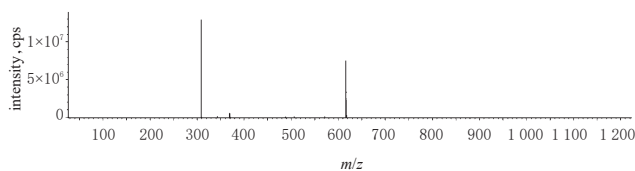
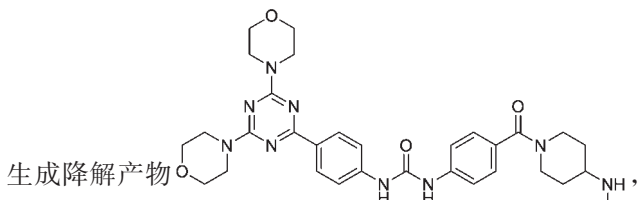
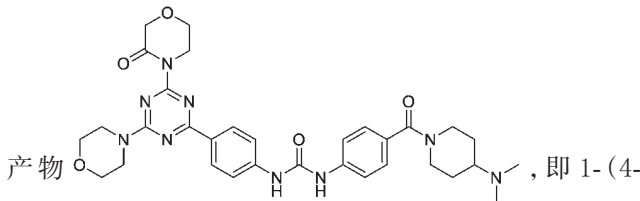


图4 Gedatolisib 的 MS 图
Fig 4 MS chromatograms of Gedatolisib

3 讨论

定量分析方法验证的目的与意义在于考察 Gedatolisib、内标与所含基质组分是否能够有效分离以及在所建立的检测条件下是否能够准确定量。因此, 本研究前期考察了孵育体系中存在的缓冲盐、血浆中各种

酶对待测物定量分析的影响。结果显示, Gedatolisib 和内标均能有效分离, 且内源性物质无干扰。

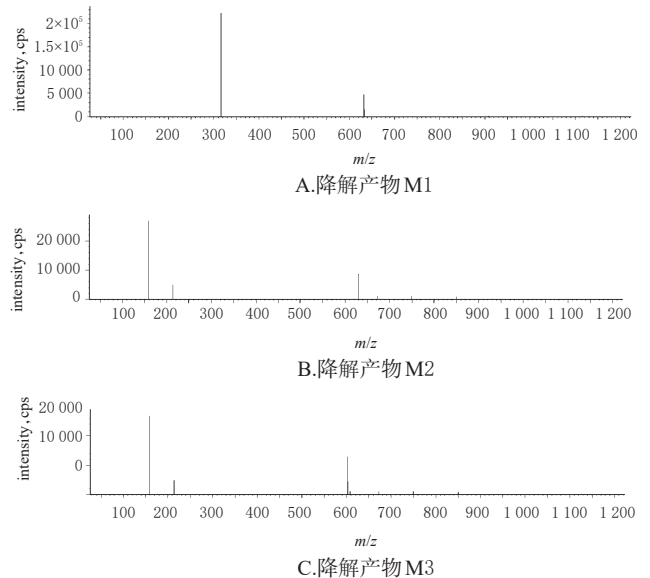


图5 降解产物的 MS 图
Fig 5 MS chromatograms of catabolites

化合物通过在体外与血浆共同孵育, 能够快速确定该化合物在血浆中是否易发生降解及其降解的程度。参考文献研究^[4]和前期试验, Gedatolisib 在 SD 大鼠血浆中稳定性的孵育时间选定在 3.0 h, 在人工胃肠液中稳定性的孵育时间选定为 6.0 h。

Gedatolisib 分子末端是由富余电子的氮原子和两个供电子的甲基构成, 二甲氨基结构中氮弱碱性导致其极易被氧化, 也常发生末端脱甲基化。与其他含氮杂环(如哌啶或咪啶)相比, Gedatolisib 结构中的吗啉环由于氧原子的诱导作用和氮原子的弱碱性, 形成了一个相对缺电子的杂环体系, 使得吗啉环易被氧化成内酯或内酰胺, 该结构在酸性环境下易发生开环^[7]。

本研究在 Gedatolisib 的稳定性实验中发现, 在血浆中孵育一段时间后 Gedatolisib 剩余百分比能够达到平衡, 而在人工胃液 (pH 1.3) 中, Gedatolisib 则呈现出不可逆的降解。这可能是该化合物在多项临床试验中均采用静脉给药而非口服给药的重要原因。

本研究建立了在血浆、人工胃/肠液等生物样品中 Gedatolisib 的含量测定方法, 考察了 Gedatolisib 在上述生物样品中孵育 3~6 h 的稳定性; 同时, 利用 UPLC-Q-TOF/MS 技术结合 UNIFI 1.8.2 数据库对体外血浆中 Gedatolisib 的降解产物进行分析, 初步确定找到了 Gedatolisib 结构中易发生降解的部位, 为后续同类衍生物的结构改造以及该化合物的剂型开发和联合用药方案提供重要参考。

参考文献

[1] VENKATESAN AM, DEHNHARDT CM, DELOS SANTOS E, et al. Bis(morpholino-1,3,5-triazine) derivatives:

贵州产红孩儿药材的质量标准提升研究[△]

刘利琴^{1,2*}, 彭 潇^{1,2}, 马 雪³, 李勇军³, 刘春花³, 潘 洁³, 王永林¹, 王爱民^{3#}(1. 贵州医科大学贵州省药物制剂重点实验室/省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室, 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学药学院, 贵阳 550025; 3. 贵州医科大学民族药与中药开发应用教育部工程研究中心, 贵阳 550004)

中图分类号 R282 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)12-1458-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.12.10

摘要 目的:为提升贵州产红孩儿药材的质量标准提供参考。方法:收集5批贵州产红孩儿药材,观察药材粉末的显微特征,参照2015年版《中国药典》(四部)通则相关方法,采用薄层色谱法(TLC)对红孩儿药材进行定性鉴别并测定其水分、总灰分及水溶性浸出物的含量;采用高效液相色谱法测定红孩儿药材中芦丁的含量。结果:红孩儿药材粉末呈棕褐色,石细胞类方形、类多角形或不规则形;淀粉粒众多,复粒稀少;可见导管、草酸钙方晶/簇晶;在与红孩儿对照药材TLC图谱相同位置处显相同荧光斑点。5批红孩儿药材中水分含量为10.15%~11.41%,总灰分含量为8.70%~12.59%,水溶性浸出物含量为16.91%~19.58%。芦丁检测质量浓度的线性范围为18.47~147.8 μg/mL($r=0.9998$),重复性、中间精密性、稳定性试验(8h)的RSD均小于3.0%,平均加样回收率为99.39%~100.29%(RSD为0.23%~2.59%, $n=3$);5批红孩儿药材中芦丁的含量为0.102%~0.198%。结论:药材水分、总灰分含量分别不得超过13.0%、14.0%,水溶性浸出物、芦丁含量分别不得低于15.0%、0.080%。本研究所建质量标准可用于红孩儿药材的质量控制。

关键词 红孩儿;质量标准;显微观察;水分;总灰分;水溶性浸出物;芦丁;含量测定

Study on Quality Standard Improvement of Rhizoma Begoniae from Guizhou

LIU Liqin^{1,2}, PENG Xiao^{1,2}, MA Xue³, LI Yongjun³, LIU Chunhua³, PAN Jie³, WANG Yonglin¹, WANG Aimin³(1. Guizhou Key Lab of Pharmaceutical Preparation/State Key Lab of Medicinal Plant Function and Utilization, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 2. College of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China; 3. Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and TCM, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To provide reference for improving the quality standard of Rhizoma Begoniae from Guizhou. METHODS: Five batches of Rhizoma Begoniae from Guizhou were collected, and the microscopic characteristics of the Rhizoma Begoniae powder were observed. According to the corresponding methods in 2015 edition of *Chinese Pharmacopoeia* (part IV),

potent adenosine 50-triphosphate competitive phosphatidylinositol-3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitors: discovery of compound 26 (PKI-587), a highly efficacious dual inhibitor[J]. *J Med Chem*, 2010, 53 (6) : 2636-2645.

[2] MALLON R, FELDBERG LR, LUCAS J, et al. Antitumor efficacy of PKI-587, a highly potent dual PI3K/mTOR kinase inhibitor[J]. *Clinical Cancer Research*, 2011, 17(10):3193-3203.

△ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.U1812403);贵州省科技计划项目(No.黔科合平台人才[2016]5613, No.黔科合平台人才[2016]5677)

* 硕士研究生。研究方向:中药药动学。E-mail: 1622740101@qq.com

通信作者:教授,硕士生导师。研究方向:中药新药研发。电话:0851-86908468。E-mail: gywam100@163.com

[3] 郭宗儒. 药物分子设计的策略: 药理活性与成药性[J]. 药学学报, 2010, 45(5): 539-547.

[4] 爱德华·H. 克恩斯, 邝力. 类药性质: 概念、结构设计与方法: 从ADME到安全性优化[M]. 钟大放, 译. 北京: 科学出版社, 2011: 163-164, 329.

[5] 李述敏, 武婷婷, 王兴兰, 等. Gedatolisib的合成[J]. 中国医药工业杂志, 2019, 50(1): 59-62.

[6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 四部[S]. 2015年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 119.

[7] KOUROUNAKIS AP, XANTHOPOULOS D, TZARA A. Morpholine as a privileged structure: a review on the medicinal chemistry and pharmacological activity of morpholine containing bioactive molecules[J]. *Med Res Rev*, 2019. DOI: 10.1002/med.21634.

(收稿日期: 2020-02-20 修回日期: 2020-05-12)

(编辑: 邹丽娟)