

· 论著 ·

HMS-01 在大鼠体内的药动学研究

张宇¹, 秦臻¹, 孙旻¹, 吕加国¹, 吴芳², 刘霞¹ (1. 海军军医大学药学院临床药学教研室, 上海 200433; 2. 西安秦申嘉合药物研究有限公司, 陕西 西安 710068)

[摘要] 目的 研究 HMS-01 在大鼠体内的药动学, 为后续研究提供支持。方法 采用液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS) 技术, 建立灵敏、特异的测定血浆等生物样品中 HMS-01 浓度的分析方法, 用建立的方法开展 HMS-01 在大鼠体内药动学研究。在 SD 大鼠上分别进行了 1 个剂量单次灌胃给药、1 个剂量单次静注给药的药动学研究, 以获得基本药动学参数。结果 大鼠静脉注射 1 mg/kg 的 HMS-01 后, 雄性与雌性大鼠血浆浓度-时间曲线下面积 (AUC_{0-t}) 分别为 221 和 409 ng·h/ml, 平均清除率分别为 4.53 和 2.41 L/h·kg, 平均血浆消除半衰期分别为 0.786 和 1.27 h, 表观分布容积分别为 5.13 和 3.82 L/kg。灌胃给予 30 mg/kg 的 HMS-01 后, 在大鼠体内血浆浓度达峰时间 t_{max} 为 1.17 h, 达峰浓度 c_{max} 为 1 243 ng/ml, 消除半衰期 ($t_{1/2}$) 为 2.00 h。雄、雌大鼠 AUC_{0-t} 分别为 2 271 和 8 529 ng·h/ml, 生物利用度分别为 34.3% 和 69.5%。结论 HMS-01 在大鼠体内的药动学过程存在显著的性别差异, 口服吸收较好, 雌性大鼠的生物利用度远高于雄性。

[关键词] HMS-01; 药物代谢动力学; 大鼠; 血浆; 液相色谱-串联质谱法

[中图分类号] R945 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2020)03-0237-04

[DOI] 10.12206/j.issn.1006-0111.201907036

Pharmacokinetics of HMS-01 in rats

ZHANG Yu¹, QIN Zhen¹, SUN Yang¹, LÜ Jianguo¹, WU Fang², LIU Xia¹ (1. Department of Clinical Pharmacology, School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Qinshen Jiahe Pharmaceutical Research Co., Ltd, Xi'an 710068, China)

[Abstract] **Objective** To study the pharmacokinetics of HMS-01 in rats and provide support for subsequent study. **Methods** A sensitive and specific method for the determination of HMS-01 in plasma and other biological samples was established by LC-MS/MS. The pharmacokinetics of HMS-01 in rats was studied by the established method. The pharmacokinetics of one dose of single intragastric administration and one dose of single intravenous administration in SD rats were studied, and the basic pharmacokinetic parameters were obtained. **Results** After intravenous injection of 1 mg/kg HMS-01, the area under the plasma concentration-time curve AUC_{0-t} of male and female rats was 221 ng·h/ml and 409 ng·h/ml, respectively. The average clearance rates were 4.53 L/h·kg and 2.41 L/h·kg, respectively. The average plasma elimination half-lives were 0.786 h and 1.27 h, and the apparent distribution volume was 5.13 L/kg and 3.82 L/kg, respectively. After intragastric administration of 30 mg/kg HMS-01, the peak time of plasma concentration in rats was 1.17 h, the peak concentration of C_{max} was 1 243 ng/ml, and the elimination half-life $t_{1/2}$ was 2.00 h. The AUC_{0-t} of male and female rats was 2 271 and 8 529 ng·h/ml respectively, and their bioavailability was 34.3% and 69.5% respectively. **Conclusion** The pharmacokinetics of HMS-01 in rats has significant gender differences. It is well absorbed orally, and the bioavailability of HMS-01 in females is much higher than that in males.

[Key words] HMS-01; pharmacokinetics; rats; plasma; LC-MS/MS method

疲劳的定义为机体生理过程不能维持其机能在一特定水平上, 或不能维持预定的运动强度^[1]。

[基金项目] 国家重大新药创制项目(2018ZX09711002-003-015, 2018ZX09J18110-03-001); 上海市“科技创新行动计划”生物医药领域科技支撑项目(18431900800, 19431901400)

[作者简介] 张宇, 硕士研究生, 研究方向: 代谢及免疫药理, Email: zhang828yu@aliyun.com

[通讯作者] 刘霞, 教授, 研究方向: 代谢及免疫药理, Email: lxflying@aliyun.com

由于疲劳的分子机制并不清楚, 目前并无真正官方认可的抗疲劳药物。一些天然产物, 如人参、红景天、大蒜等, 以及营养补充剂, 如维生素、矿物质和肌酸等, 报道有抵抗肌肉疲劳、提高运动成绩的效应, 但是效果缓慢而不显著^[2]; 苯丙胺、莫达非尼、咖啡因等药物虽能快速改善疲劳, 但实质为中枢兴奋药, 存在成瘾、耐受、改变生物节律等问题^[3]。因此, 抗疲劳药物的进一步研发, 对改善生活质量、提升运动成绩、提高军事作业能力有重要意义。

组织糖原含量与疲劳的发生密切相关^[4]。本课题组通过大规模化合物合成和筛选,获得了一个全新小分子化合物 HMS-01,可以通过促进肝脏和肌肉组织糖原的储存,改善疲劳后组织损伤,显著增加肌肉耐力,发挥抗疲劳的作用。为了进一步了解 HMS-01 的药动学特点以及在组织中的分布,本课题组采用液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)技术^[5-6],研究建立灵敏、特异的测定血浆等生物样品中 HMS-01 浓度的分析方法,并开展 HMS-01 在大鼠体内的药动学研究,为后续药物研发提供理论依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1290 Infinity II 液相色谱仪(Agilent Technologies, 美国)、4000 Q-Trap 型串联质谱仪(AB Sciex, 美国);低温高速离心机(Thermo, 德国);XW 80A 型涡旋混合器(医大仪器, 上海);Mettler AE240 十万分之一电子天平(梅特勒-托利多, 瑞士);Millipore-Q 超纯去离子水净化仪(Millipore, 美国)。

1.2 试剂

HMS-01(西安秦申嘉合药物研究有限公司, 批号 HMS-1-1010-3);罗红霉素(Sigma, CAS: 2058-46-0);乙腈(色谱纯, Fisher Chemical);甲酸(色谱纯, Fisher Chemical);其他试剂为市售分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Gemini C₁₈(50 mm×2.0 mm, 5 μm), 流动相: 含 5 mmol 甲酸铵及 1 mmol 甲酸的水溶液(A)-含 1 mmol 甲酸的乙腈(B), 梯度洗脱, 洗脱程序如下: 0~2 min, 90% A; 2~6 min, 5% A; 6~8 min, 90% A。流速: 0.35 ml/min, 柱温: 25 °C, 进样量 5 μl, 运行时间 8 min。

2.2 质谱条件

采用 ESI 正离子模式, 多反应离子监测模式(MRM)进行二级扫描;动态反应监测的离子对参数: HMS-01 772.5→614.5;罗红霉素(IS) 837.5→158.1。离子源参数设置: 干燥气温度 350 °C;干燥气流速 10 L/min;雾化器压力 40 psi;鞘气温度 400 °C;鞘气流速 11 L/min;毛细管电压 4 000 V;喷嘴电压 500 V。HMS-01 保留时间为 2.834 min, 罗红霉素保留时间为 2.839 min, 色谱图如图 1 所示。

2.3 标准曲线溶液的配制和质控样品的制备

精密称取 HMS-01 对照品 772.5 mg, 置于 10 ml

容量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得质量浓度为 77.25 mg/ml 对照品储备液。再采用逐级稀释法配置质量浓度为 772.5、386.25、193.125、96.563、48.281、24.141、12.070、6.035、3.018、1.509、0.754 ng/ml 的系列含对照品血浆溶液;随行质控样品中 HMS-01 的低、中、高质量浓度分别为 3.09、30.9、618 ng/ml。以上溶液置于 4 °C 冰箱备用。

2.4 血浆样品前处理方法

取 50 μl 血浆样品于离心管中, 加入 200 μl(含 41.875 ng/ml 的 IS 内标)乙腈溶液, 涡旋 60 s, 4 °C 条件下 3 000×g 离心 10 min, 取上清液进样。

2.5 线性关系考察

按“2.3”项和“2.4”项中的方法制备标准曲线, 平行操作 5 份, 按上述 LC-MS/MS 条件, 连续进样分析, 以对照品浓度(X)为横坐标, HMS-01 的峰面积与内标的峰面积比值(Y)为纵坐标, 进行线性回归, 得线性方程:

$$Y=0.009\ 3\ X+0.005\ 08, r=0.999\ 3,$$

线性范围为 0.976~1 000 ng/ml, 以信噪比为 3 或 5 时测得 HMS-01 的最低定量限均为 976 pg/ml。

2.6 精密度试验

按“2.3”项和“2.4”项中的方法制备低、中、高 3 种浓度的质控样品, 平行操作 5 份, 连续 3 d, 计算实测浓度。如表 1 所示, 精密度用相对标准偏差(RSD)表示, 结果日内精密度 RSD≤12%, 日间精密度 RSD≤9%;准确度以相对回收率表示, 实测浓度与理论加入浓度的比值即为相对回收率。结果表明日内、日间结果准确度范围在 87%~106%。

2.7 基质效应和提取回收率

按“2.3”项和“2.4”项中的方法制备低、高 2 种浓度含药血浆, 平行操作 6 份;取空白血浆按“2.4”项下处理, 甲醇代替内标溶液, 取处理好的空白血浆样品加入相应浓度对照品溶液, 使之浓度与待测物的峰面积理论浓度一致, 分别制备 6 份;将待测化合物标准溶液用甲醇稀释, 使之与待测物的峰面积理论浓度一致, 进样 6 次。基质效应等于(含基质样品的峰面积)/(80% 乙腈溶液的峰面积), 提取回收率等于(待测物的峰面积)/(含基质样品的峰面积), 考察内标的基质效应和提取回收率操作步骤同上。低、高两种浓度待测物及内标提取回收率均在 60%~75% 之间, 基质效应均在 5.6%~6.1% 之间, 具体结果见表 2。

2.8 稳定性试验

按“2.3”项和“2.4”项中的方法制备低、高 2 种

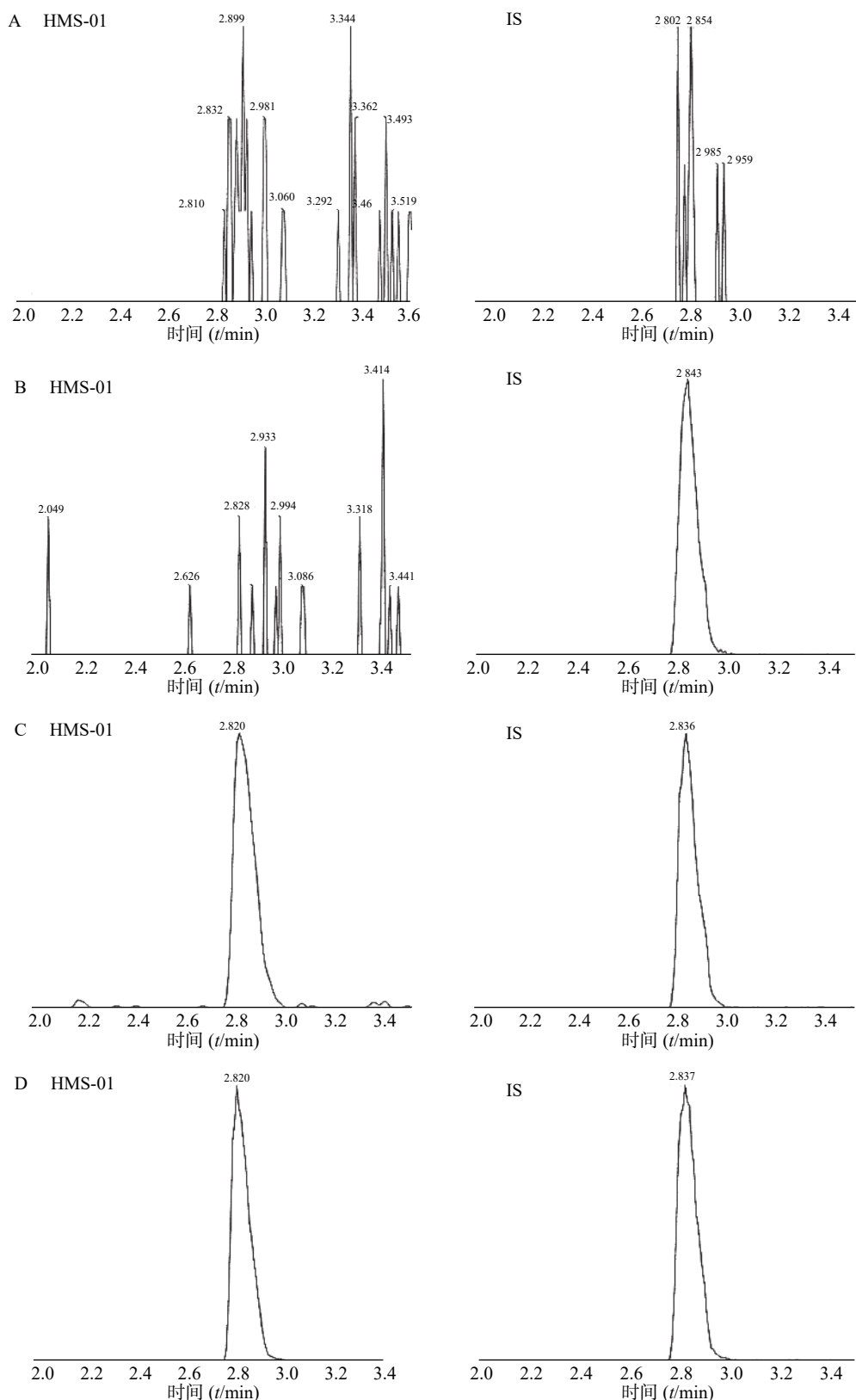


图1 典型质量色谱图

A.空白大鼠血浆; B.空白大鼠血浆添加内标 38.625 ng/ml; C.大鼠血浆中添加 HMS-01 低浓度样品(1.509 ng/ml); D.大鼠血浆中添加 HMS-01 高浓度样品(618 ng/ml); IS.罗红霉素

浓度含药血浆, 分别考察样品前处理后室温放置 24 h, 3 次冻融循环以及 -70 °C 保存 30 d 的稳定性, 测定样品浓度, 计算平均值, 并计算 RSD(%) 及相

对偏差 RE(%), 计算公式: $RE\% = \frac{\text{实测值} - \text{真实值}}{\text{真实值}} \times 100\%$ 。结果见表 3。测定结果的 RE 范围为 2%~17%, RSD 均小于 7%, 表明样本稳定性良好。

表1 HMS-01 在大鼠血浆中的精密度和准确度 (n=5)

浓度(ng/ml)	日内			日间		
	实测浓度(ng/ml)	精密度(%)	准确度(%)	实测浓度(ng/ml)	精密度(%)	准确度(%)
3.09	2.71±0.27	7.7	87.9	2.71±0.27	7.5	87.9
30.9	31.4±4.8	11.8	102	32.6±3.6	8.4	106
618	618±46	5.8	100	618±46	5.4	98.4

表2 待测物基质效应和提取回收率 (n=6)

待测物	浓度(ng/ml)	提取回收率(%)	基质效应(%)
HMS-01	3.09	68±3	6.1
	618	63±4	5.7
内标	3.35	73±2	6.1
	670	73±2	5.6

表3 样品稳定性 (n=3)

条件	浓度(ng/ml)	RSD(%)	RE(%)
室温24 h	3.09	3.7	16.5
	618	1.0	2.6
3次冻融循环	3.09	6.7	4.5
	618	0.6	5.9
-70 °C保存30 d	3.06	6.8	8.7
	6.18	0.6	10.1

2.9 HMS-01 药动学研究

SD大鼠12只,分成2组,每组6只,雌雄各半。给药前禁食12 h,自由饮水。按30 mg/kg的剂量单次灌胃、1 mg/kg的剂量单次静注给药。灌胃给药的,于给药前和给药后5、10、20、30 min和1、1.5、2、4、6、8、10、12、24 h分别眼眶采血约100 μl;静注给药的,于给药前和给药后3、8、15、30 min和1、2、3、4、6、8、10、12、24 h分别眼眶

采血约100 μl。血液用1%肝素抗凝,8 000×g离心5 min,分离血浆。-70 °C保存待测。采血过程冰浴避光,以防止光对药物稳定性产生影响。

大鼠单次静注给予1 mg/kg HMS-01后的药动学参数(非房室模型)总结于表4。大鼠静脉注射1 mg/kg HMS-01后,雄、雌大鼠药动学参数血浆浓度-时间曲线下面积(AUC)、平均清除率(CL)显示有极显著性差异($P<0.01$),药动学参数血浆消除半衰期($t_{1/2}$)、表观分布容积(V)均呈显著性差异($P<0.05$)。雄性大鼠AUC_{0-t}为221 ng·h/ml,CL为4.53 L/h·kg,为大鼠肝脏血流量(约3.3 L/h·kg)的137%,体内清除快, $t_{1/2}$ 约为0.786 h, V 为5.13 L/kg;雌性大鼠AUC_{0-t}为409 ng·h/ml,CL为2.41 L/h·kg,为大鼠肝脏血流量的73%,体内清除较快, $t_{1/2}$ 约为1.27 h, V 为3.82 L/kg。

大鼠单次灌胃给予30 mg/kg HMS-01后的药动学参数(非房室模型)总结见表5。灌胃给予30 mg/kg HMS-01后,雄、雌大鼠药动学参数AUC显示有极显著性差异($P<0.01$),药动学参数CL、 F 显示有显著性差异($P<0.05$)。在大鼠体内血浆浓度达峰时间 t_{max} 为1.17 h,达峰浓度 c_{max} 为1 243 ng/ml,消除半衰期 $t_{1/2}$ 为2.00 h。雄、雌大鼠AUC_{0-t}分别为2 271和8 529 ng·h/ml,生物利用度分别为34.3%和69.5%。

表4 大鼠静注1 mg/kg HMS-01后血浆药动学参数($\bar{x} \pm s$, n=6)

性别	AUC _{0-t} (ng·h/ml)	AUC _{0-∞} (ng·h/ml)	MRT _{0-∞} (t/h)	$t_{1/2z}$ (t/h)	CLz (L/h·kg)	V_z (L/kg)	c_{max} (ng/ml)
雄性	221±12.6	221±12.4	0.776±0.022	0.786±0.039	4.53±0.252	5.13±0.388	491±112
雌性	409±23.3**	416±21.0**	1.270±0.115	1.090±0.141*	2.41±0.120**	3.82±0.666*	571±55.1
合计	315±105	319±108	1.030±0.282	0.940±0.193	3.47±1.17	4.47±0.871	531±90.3

表5 大鼠灌胃30 mg/kg HMS-01后血浆药代动力学参数($\bar{x} \pm s$, n=6)

性别	AUC _{0-t} (ng·h/ml)	AUC _{0-∞} (ng·h/ml)	MRT _{0-∞} (t/h)	$t_{1/2z}$ (t/h)	t_{max} (t/h)	CLz/F (L/h·kg)	V_z/F (L/kg)	c_{max} (ng/ml)	F (%)
雄性	2 271±666	2 279±667	2.58±0.156	1.43±0.130	1.17±0.289	14.00±4.31	28.5±7.04	729±263	34.3±10.1
雌性	8 529±1 920**	9 071±1 529**	4.79±1.39	2.58±1.060	1.17±0.289	3.38±0.629*	13.1±7.78	1757±584	69.5±15.6*
合计	5 400±3 661	5 675±3 867	3.68±1.50	2.00±0.924	1.17±0.258	8.69±6.44	20.8±10.7	1 243±694	51.9±22.6