

## 单剂量静注新型钙离子增敏剂 M6 在大鼠血浆中的药代动力学分析

樊鸿浩<sup>1,2</sup>, 邓乐君<sup>1,2</sup>, 朱晋辉<sup>1</sup>, 李健<sup>2</sup>, 万华印<sup>3</sup>, 李伟达<sup>4</sup>, 招健华<sup>4</sup>, 李茹冰<sup>1,2\*</sup>

(1. 南方医科大学, 广州 510515; 2. 广州军区总医院, 广州 510010;

3. 广州市众为生物技术有限公司, 广州 510663; 4. 广东药学院, 广州 510006)

**[摘要]** **目的:**探究新型钙离子增敏剂 M6 在大鼠血浆中的药代动力学特点,建立快速、简便的检测大鼠血浆中 M6 血药浓度的高效液相色谱法(HPLC)。 **方法:**采用颈静脉抽血法,考察大鼠尾静脉注射 M6 后于 1,3,5,10,15,30 min 和 1,2,4,6,8 h 的血药浓度变化,采用 HPLC 测定血药浓度,流动相 1% 乙酸水溶液-乙腈(85:15),检测波长 280 nm,绘制血药浓度-时间曲线,通过 PKSolver 数据处理软件计算 M6 药代动力学参数。 **结果:**M6 检测的线性范围 3.125 ~ 200 mg·L<sup>-1</sup>,最低定量限 0.6 mg·L<sup>-1</sup>,日内、日间精确度和稳定性试验的 RSD 均 < 10%,方法回收率均 > 85%。M6 在大鼠体内的主要药代动力学参数为达峰时间( $t_{max}$ )1 min,最大血药浓度( $C_{max}$ )6.67 mg·L<sup>-1</sup>,半衰期( $t_{1/2}$ )21.36 min,平均滞留时间(MRT)30.83 min;药-时曲线出现了双峰现象。 **结论:**M6 的  $t_{1/2}$  较原型药物 PPTA 延长,具有代谢时间延长的特点,有望开发 M6 的新药物。建立的 HPLC 灵敏、快速、准确,可用于大鼠血浆中 M6 质量浓度的测定。

**[关键词]** 钙离子增敏剂; M6; 盐酸椒苯酮胺; 颈静脉抽血法; 药物代谢动力学

**[中图分类号]** R969.1;R945;R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)23-0083-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015230083

### Pharmacokinetic Analysis of New Calcium Sensitizer of M6 in Rat Plasma by Single Intravenous

FAN Hong-hao<sup>1,2</sup>, DENG Le-jun<sup>1,2</sup>, ZHU Jin-hui<sup>1</sup>, LI Jian<sup>2</sup>, WAN Hua-yin<sup>3</sup>, LI Wei-da<sup>4</sup>, ZHAO Jian-hua<sup>4</sup>, LI Ru-bing<sup>1,2\*</sup>  
(1. Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 2. General Hospital of Guangzhou Military Command of PLA, Guangzhou 510010, China; 3. Guangzhou Zhongwei Biological Technology Co. Ltd., Guangzhou 510663, China; 4. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore pharmacokinetic characteristics of the new calcium sensitizer-M6 in rat plasma, and establish a fast, convenient and effective HPLC for determination of M6 in rat plasma. **Method:** Jugular vein haemospasia was adopted, M6 was injected by tail vein in rats, plasma concentration was determined by HPLC after 1, 3, 5, 10, 15, 30 min and 1, 2, 4, 6, 8 h, mobile phase of 1% acetic acid solution-acetonitrile (85:15), detection wavelength was set at 280 nm. Plasma concentration-time curve was drawn, and pharmacokinetic parameters were calculated by PKSolover software. **Result:** Linear range of M6 was 3.125-200 mg·L<sup>-1</sup>, the limit of quantitation was 0.6 mg·L<sup>-1</sup>, the intra-day, inter-day precision and stabilization were less than 10%, recovery of method was more than 85%. These main pharmacokinetic parameters of M6 were as followed:  $t_{max}$  of 1 min,  $C_{max}$  of 6.67 mg·L<sup>-1</sup>,  $t_{1/2}$  of 21.36 min, MRT of 30.83 min, concentration-time curve showed double peaks. **Conclusion:** Results suggest that  $t_{1/2}$  of M6 is longer than  $t_{1/2}$  of its prototype drug-PPTA. This HPLC is sensitive, rapid and accurate, it can be employed to determine concentration of M6 in rat plasma.

**[Key words]** calcium sensitizer; M6; piperphentonamine hydrochloride; jugular vein haemospasia; pharmacokinetic

**[收稿日期]** 20150628(010)

**[基金项目]** 广东省教育部产学研结合项目(2012B091100170);广东省重大科技专项(2012A080204010);广州市创新平台建设与共享重点实验室项目(201509010012);国家“重大新药创制”科技重大专项(2011ZX091011-003)

**[第一作者]** 樊鸿浩, 硕士, 从事药理学及新药研究, Tel:020-88654670, E-mail: fhh201308@163.com

**[通讯作者]** \*李茹冰, 主任技师, 从事药理学、生物分子学及新药开发研究, Tel:020-88654670, E-mail: lrb90927@126.com

钙离子增敏剂为新一代治疗心力衰竭的强心药物,通过与肌钙蛋白 C 氨基端结合,增加肌钙蛋白 C 与钙离子结合物构象的稳定性,并减少其从肌钙蛋白上解离,肌钙蛋白 C 与钙离子结合后,肌钙蛋白构象改变,暴露肌动蛋白结合位点,从而促进心肌纤维收缩。钙离子增敏剂适用于治疗各种急性失代偿的心力衰竭<sup>[1]</sup>,此作用特点早已引起基础研究者的广泛关注,该发现亦对如今治疗心力衰竭疾病的药物选择及新型抗心力衰竭药物结构探索提供新的研究思路。但目前仅有芬兰 Orion 公司的左西孟旦 levosimendan 于 2000 年在瑞典首次获准上市,主要用于常规疗法效果欠佳的急、慢性心衰<sup>[2]</sup>。国内亦有少数自主研发药物如 MCI-154 仍处于临床前研究<sup>[1]</sup>。国内关于钙增敏剂的研究仍处于空白状态。

盐酸椒苯酮胺 (piperphentonamine hydrochloride, PPTA) 为我国自主研发的心血管化学创新药<sup>[3]</sup>,是一种以增强钙离子敏感性的强心药与心肌保护剂<sup>[4]</sup>,PPTA 兼具强心和扩血管作用,可增加心肌收缩蛋白对  $Ca^{2+}$  的敏感性,而较少增加细胞内  $Ca^{2+}$ ,避免了  $Ca^{2+}$  超载等副作用,亦可改善心肌供血,增加心肌收缩力<sup>[5]</sup>,其药物代谢快,不会在体内积蓄,不增加心肌细胞内钙离子浓度,无致心律失常的危险。毒理学研究显示 PPTA 无致畸胎作用和胚胎毒性<sup>[6]</sup>,亦无致突变作用<sup>[7]</sup>。PPTA 冻干注射剂于 2007 年获得国家食品药品监督管理总局颁发临床药物试验批件<sup>[8]</sup>,完成 I 期临床研究,并进入 II 临床研究。

前期研究显示 M6 作为 PPTA 的活性代谢物之一,与 PPTA 同具强心和扩血管作用,因其烯酮基被体内酶还原成羟基<sup>[9]</sup>,M6 具有与原型药 PPTA 不同的脂溶性和分子构象,有望开发成新的作用靶点,保护体内重要器官,见图 1,2。健康志愿者试验结果表明 PPTA 代谢产物 M6 在人体代谢中可用 HPLC-MS 检测<sup>[9]</sup>,但该方法对仪器要求高,实验操作繁琐,仅作为 PPTA 注射人体后检测 M6 代谢产物的结果,目前仍无报道较为简便、快速的 HPLC-UV 色谱检测方法。本实验使用颈静脉抽血法快速、高效抽取大鼠血浆,建立 HPLC 检测血浆中 M6 含量的方法,可作为日后 M6 的进一步体内检测分析手段,探索 M6 在大鼠体内的药代动力学特点,开发 M6 新的药物治疗应用。

## 1 材料

2487 型高效液相色谱仪(含 1525 型双元泵,717plus 型自动进样器,美国 Waters 公司),DN-24A

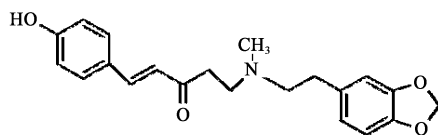


图 1 PPTA 的化学结构式

Fig. 1 Chemical structure formula of PPTA

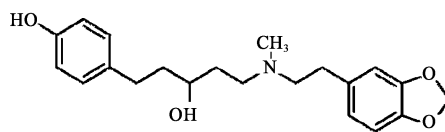


图 2 PPTA 代谢产物 M6 的化学结构式

Fig. 2 Chemical structure formula of M6

型氮气吹干仪(天津东康科技有限公司),YSK-360 型冷冻型微量离心机(美国 Thermo 公司),BP211D 型精密电子天平(德国赛多利斯公司)。M6(广州市众为生物技术有限公司,纯度 97.3%),地西洋(中国食品药品检定研究院,批号 171225-200302),水为自制三蒸水,乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。健康的雌性 SD 大鼠,SPF 级,体重 200 ~ 250 g,购自广州军区广州总医院医学动物实验中心,质量合格证号 4400210004984,合格证号 SYXK(粤)2014-0100。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** ODSC<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相 1% 乙酸水溶液-乙腈(85:15),流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 280 nm,柱温 40 °C,进样量 20 μL。

### 2.2 溶液的制备

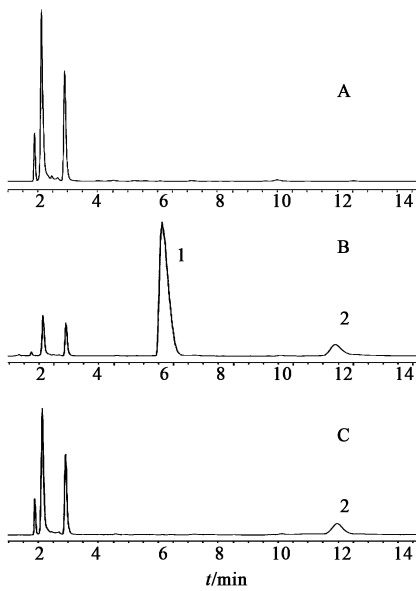
**2.2.1 M6 对照品溶液** 精密称取适量 M6,加入 pH 3.0 冰乙酸水溶液配成 1 g·L<sup>-1</sup> 的 M6 储备液。精密吸取储备液适量,用 pH 3.0 冰乙酸水溶液分别稀释成 200,100,50,25,12.5,6.25,3.125 mg·L<sup>-1</sup> 的对照品溶液。

**2.2.2 内标溶液** 取地西洋对照品适量,加乙酸乙酯溶解成 0.5 g·L<sup>-1</sup> 溶液。

**2.3 血浆样品的处理** 取血浆 100 μL 置于 2 mL 离心管中,加入内标溶液 50 μL,混匀,加入含 1% 冰乙酸的乙酸乙酯 1 mL,涡旋混合 3 min,离心 10 min (13 000 r·min<sup>-1</sup>,下同),取上清液,用氮气吹干,加入流动相 100 μL,涡旋 3 min,离心 15 min,取上清液进行 HPLC 分析。

**2.4 专属性试验** 以空白血浆、空白血浆 + M6 + 地西洋、空白血浆 + 地西洋按 2.3 项下方法处理,按 2.1 项下色谱条件测定,结果显示血浆内源性物质

和内标物质地西洋不干扰 M6 的测定,各色谱峰的分度好,说明该方法具有良好的专属性,见图 3。



1. M6; 2. 地西洋

图 3 空白血浆(A),空白血浆+M6+地西洋(B),空白血浆+地西洋(C)的 HPLC

Fig. 3 HPLC of blank plasma (A), blank plasma + M6 + diazepam (B) and blank plasma + diazepam (C)

**2.5 标准曲线的绘制** 取系列 M6 对照品溶液 (200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 mg·L<sup>-1</sup>) 加入空白血浆 100 μL 中,按 2.3 项下方法处理,按 2.1 项下色谱条件测定,以 M6 质量浓度为横坐标, M6 与内标峰面积的比值为纵坐标,得回归方程  $Y = 0.024 2X + 0.09 (R^2 = 0.999 1)$ , 线性范围 3.125 ~ 200 mg·L<sup>-1</sup>。以信噪比 S/N = 3 为最低检测限,信噪比 S/N = 10 为最低定量限,得该方法的最低检测限、最低定量限分别为 0.12, 0.60 mg·L<sup>-1</sup>。

**2.6 精密度试验** 制备高、中、低 3 个质量浓度 (200, 25, 3.125 mg·L<sup>-1</sup>) 的 M6 血浆样品,按 2.3 项

下方法处理,按 2.1 项下色谱条件连续进样 6 次,计算日内精密度 RSD 分别为 4.4%, 5.7%, 4.4%; 在 3 d 内测得日间精密度 RSD 分别为 5.9%, 5.9%, 4.6%, 表明仪器精密度良好,见表 1。

表 1 M6 血浆样品的日内和日间精密度试验

Table 1 Intra-day and inter-day precision of M6 in plasma samples

加样质量浓度 /μg·mL <sup>-1</sup>	日内精密度 (n=6)		日间精密度 (n=3)	
	检测质量浓度 /mg·L <sup>-1</sup>	RSD /%	检测质量浓度 /mg·L <sup>-1</sup>	RSD /%
200	191.40 ± 6.17	4.4	190.30 ± 11.20	5.9
25	24.49 ± 1.53	5.7	24.41 ± 1.43	5.9
3.125	2.90 ± 0.13	4.4	2.97 ± 0.14	4.6

**2.7 重复性试验** 制备高、中、低 3 个质量浓度 (200, 25, 3.125 mg·L<sup>-1</sup>) 的 M6 血浆样品,按 2.3 项下方法处理,按 2.1 项下色谱条件测定 (n=6), 计算 M6 与内标峰面积比值的 RSD 分别为 3.2%, 4.3%, 4.5%, 表明该方法重复性良好。

**2.8 回收率试验** 制备高、中、低 3 个质量浓度 (200, 25, 3.125 mg·L<sup>-1</sup>) 的 M6 血浆样品,按 2.3 项下方法处理,按 2.1 项下色谱条件测定,计算回收率分别为 (99.19 ± 2.57)%, (95.48 ± 2.69)%, (95.81 ± 3.02)%, 表明该方法准确可靠。

**2.9 稳定性试验** 以空白血浆制备 M6 高、中、低 3 个质量浓度 (200, 25, 3.125 mg·L<sup>-1</sup>) 的血浆样品,按 2.3 项下方法处理,按 2.1 项下色谱条件测定,分别在反复冻融 3 次, -4 °C 贮存 12 h, 室温放置 12 h 条件下进样分析,结果高质量浓度样品的 RSD 分别为 3.7%, 9.8%, 7.6%, 中质量浓度样品的 RSD 分别为 4.1%, 6.7%, 8.4%, 低质量浓度样品的 RSD 分别为 7.1%, 4.6%, 8.7%, 符合方法学要求,见表 2。

表 2 M6 血浆样品的稳定性试验

Table 2 Stability test of M6 in plasma samples

加样质量浓度 /mg·L <sup>-1</sup>	反复冻融 3 次		-4 °C 贮存 12 h		室温放置 12 h	
	检测质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	RSD/%	检测质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	RSD/%	检测质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	RSD/%
200	183.8 ± 18.0	3.7	181.06 ± 6.75	9.8	195.83 ± 14.87	7.6
25	26.66 ± 1.79	4.1	24.64 ± 1.01	6.7	25.13 ± 2.10	8.4
3.125	2.8 ± 0.20	7.1	2.85 ± 0.13	4.6	2.9 ± 0.26	8.7

**2.10 药代动力学分析** 取 SD 大鼠 5 只,用水合氯醛麻醉,手术暴露颈静脉后,按剂量 8 mg·kg<sup>-1</sup> 尾静脉注射 M6 溶液,分别在给药前、给药后 1, 3, 5,

10, 15, 30 min 和 1, 2, 4, 6, 8 h 颈静脉取血 0.2 mL, 置于肝素化离心管内,离心 (4 000 r·min<sup>-1</sup>, 7 min), 取血浆 100 μL,按 2.3 项下方法处理,按 2.1 项下色

谱条件测定,计算 M6 的血药浓度,绘制血药浓度-时间曲线,见图 4。采用 PKSolver 数据处理软件计算药代动力学参数,见表 3。

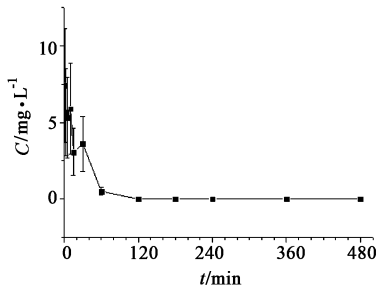


图 4 尾静脉注射后 M6 在大鼠血浆中浓度-时间曲线( $\bar{x} \pm s, n=5$ )  
Fig. 4 Concentration-time curve of M6 in rat plasma after tail vein injection ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

表 3 M6 在大鼠血浆中的药动学参数

Table 3 Pharmacokinetic parameters of M6 in rat plasma

参数	单位	M6
$K_0$	$\text{mg} \cdot \text{min}^{-1}$	8.00
$t_{1/2}$	min	21.37
$V$	L	1.18
CL	$\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$	0.04
$t_{\text{max}}$	min	1.00
$C_{\text{max}}$	$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	6.67
$C_{\text{ss}}$	$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	208.96
$\text{AUC}_{0-t}$	$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}$	178.64
$\text{AUC}_{0-\infty}$	$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}$	208.96
MRT	min	30.83
$V_{\text{ss}}$	L	1.18

### 3 讨论

本文采用颈静脉抽取大鼠全血,该方法简便、快速,与传统的眼内眦静脉取血不同,传统眦静脉采血耗时长,采集 0.5 mL 需 1~3 min,尤其在实验后半段,眦静脉内凝血,采集时间延长,故难以准确评估不同时间点的血浆代谢特点,同时清醒动物的有创采血方式,将增加动物本身应激性,既干扰实验结果,又与动物伦理相违背。采用颈静脉采血方法<sup>[10]</sup>,其采血过程仅在 1 s 内即可完成,既适用于快速、大量的全血采集,又能避免应激反应对心血管类药物 M6 的影响,可准确评价不同时间点中药物的血浆浓度。

至今为止,对钙离子增敏剂的开发与研究较少,

本文围绕新型钙离子增敏剂 PPTA 的代谢产物 M6 展开,采用 HPLC-UV 快速检测不同采集点内 M6 的血药浓度,试验结果表明该方法稳定、回收率好,可作为常规的血浆检测方法。药代动力学参数结果显示 M6 的半衰期( $t_{1/2}$ ) 21.37 min, PPTA 的  $t_{1/2}$  1.53 min<sup>[10]</sup>。这可能因为 M6 分子结构具有羟基基团,延长了体内代谢酶的作用时间。I 期临床研究显示 PPTA 的冻干注射剂安全、有效、质量可控,“快代谢型”的 PPTA 有望应用于急性心力衰竭、急性冠脉综合征、心脏直视手术等,而活性代谢物 M6 的代谢时间延长,则有望开发 M6 的新应用,如改变 M6 给药的途径或者探索 M6 的器官靶点作用。

### [参考文献]

[1] 常翠娥,史爱欣,胡欣,等. 新型钙增敏剂的研究进展[J]. 中国新药杂志,2010,9(1):28-32.

[2] 薛祚臣,单兆亮. 钙增敏剂对心肌钙稳态的影响[J]. 心血管病学进展,2014,35(6):653-656.

[3] 周力践,袁小惠,刘铁球. 椒苯酮胺或其盐用作制备治疗心血管疾病药物的应用:中国, CN02125316.1 [P]2003-02-12.

[4] 杨向阳,李若冰,万华印. 新型钙增敏剂左西孟旦和盐酸椒苯酮胺研究进展[J]. 国际药学研究杂志,2010,37(1):32-35.

[5] 叶益新,范礼理. 羟苯氨酮强心作用的生化机理研究[J]. 药学报,1999,34(2):90-94.

[6] 李茹冰,李健,吴新荣,等. 盐酸椒苯酮胺致畸敏感期毒性试验[J]. 中国老年学杂志,2013,33(22):5610-5611.

[7] 陈阳述,李茹冰,李健,等. 盐酸椒苯酮胺致突变实验[J]. 中国老年学杂志,2013,33(19):4747-4749.

[8] 国家食品药品监督管理总局. 国家食品药品监督管理总局临床批件/http://app1.sfda.gov.cn/datasearch/face3/base.jsp?tableId=16&tableName=TABLE16&title=%D2%A9%C6%B7%D7%A2%B2%E1%C5%FA%BC%FE%B7%A2%CB%CD%D0%C5%CF%A2&bcId=124356691500929088825573428019[Z]. 2013.

[9] Yang F, Zhang Q, Liang Q, et al. Bioavailability enhancement of paclitaxel via a novel oral drug delivery system: Paclitaxel-loaded glycyrrhizic acid micelles[J]. Molecules,2015,20(3):4337-4356.

[10] 牟英. 椒苯酮胺临床前药代动力学研究[D]. 沈阳:沈阳药科大学,2003.

[责任编辑 刘德文]