

超高效液质联用法测定Hu7691在大鼠血浆中的含量 及其药代动力学研究

平丽¹, 洪雅雯, 左敏娟, 朱狄峰

(浙江大学 药物安全评价研究中心, 浙江 杭州 310058)

摘要: 本实验建立了一种液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法快速、灵敏测定Sprague-Dawley (SD)大鼠血浆中Hu7691的浓度。血浆样本以乙腈沉淀蛋白后, 选用三键键合烷基色谱柱, 以0.1%甲酸水-乙腈作为流动相进行梯度洗脱, 选用多重反应监测(MRM)扫描方式进行监测。将经验证的方法应用于Hu7691在SD大鼠体内的药代动力学研究。试验结果显示, SD大鼠口服5、10和20 mg/kg Hu7691以及静脉注射5 mg/kg的Hu7691后, 大鼠血浆中Hu7691的AUC 和 C_{max} 随剂量的增大而增加, 生物利用度分别为50.2%、62.0%、75.7%, 表明Hu7691具有较高的胃肠吸收率和稳定的药代动力学特性。

关键词: 液相色谱-串联质谱联用法;Hu7691;大鼠血浆;药代动力学

The content of Hu7691 in rat plasma was determined by ultra-efficient liquid mass spectrometry and its pharmacokinetic study

Ping Li, Hong Yawen, Zuo Minjuan, Zhu Difeng

(Center for Drug Safety Evaluation and Research, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: A liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method was developed for the rapid and sensitive determination of Hu7691 in Sprague-Dawley (SD) rat plasma. After the plasma samples were precipitated with acetonitrile, a triple-bonded alkyl column was used for gradient elution with 0.1% formic acid water and acetonitrile as mobile phase. Multiple reaction monitoring (MRM) scanning was used for monitoring. The validated method was applied to study the pharmacokinetics of Hu7691 in SD rats. The results showed that the AUC and C_{max} of Hu7691 in plasma of SD rats increased with the increase of dose after oral administration of 5, 10 and 20 mg/kg Hu7691 and intravenous injection of 5 mg/kg Hu7691, and

the bioavailability of Hu7691 were 50.2%、62.0% and 75.7%， respectively Hu7691 has high gastrointestinal absorption rate and stable pharmacokinetic properties.

Keywords: Liquid chromatography-tandem mass spectrometry； Hu7691； Rat plasma； Pharmacokinetics

磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) /蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB, 又称 AKT) /雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, MTOR) 通路在肿瘤细胞的生长、增殖等过程中具有重要的作用^[1]。靶向 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的关键蛋白分子成为当前抗肿瘤新药研发热点, 而 AKT 是 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的核心蛋白。Akt 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 主要包括 3 种亚型^[2], 即 Akt1、Akt2 和 Akt3, 可抑制肿瘤细胞凋亡、促进肿瘤细胞生存^[3-5], 也可促进肿瘤细胞周期运行, 导致肿瘤细胞过度增殖^[5-7]。

随着Akt结构、功能和作用机制的不断阐明, 小分子Akt抑制剂在抗肿瘤领域的应用受到越来越广泛的关注, 目前已有大量不同结构类型的小分子Akt抑制剂被报道^[8-9]。已开发的Akt特异性抗肿瘤候选化合物大多存在稳定性差、细胞通透性和溶解度不佳等类药性问题。

4-(1-甲基-1H-吡唑-基)-N-((3S,4S)-4-(3,4-二氟苯基)哌啶-3-基)-2-氟苯甲酰胺 L-苹果酸盐 (Hu7691) 是由浙江大学自主研发的新一代Akt选择性抑制剂^[10], 通过分子对接、合理药物设计等系统优化, 重点针对Akt抑制剂的激酶选择性不佳、hERG通道阻滞等问题进行改造, 在激酶选择性、体内外有效性和安全性上表现更为优异。目前国内外文献中尚无报道Hu7691在生物样本中的检测方法, 本文首次建立了测定大鼠血浆中Hu7691的超高效液相色谱-三重四极杆质谱法, 并应用该方法进行Hu7691在大鼠体内的药代动力学研究和生物利用度研究, 这项研究为该化合物的临床前和临床应用提供依据。

1 材料

1.1 仪器

Waters Xevo TQ超高效液质联用仪 (美国Waters公司); PureLab OptionS7 纯水仪 (英国ELGA LabWater 公司); Eppendorf 5817R离心机 (德国Eppendorf公司); MTV-100 多管漩涡混合仪 (杭州奥盛仪器有限公司); XS205电子分析天平 (METTLER TOLEDO公司)。

1.2 试药和试剂

甲醇（色谱级，美国Merck KGaA公司）；乙腈（色谱级，美国Merck KGaA公司）；甲酸（色谱级，Sigma-Aldrich 公司）。对照品Hu7691由浙江大学（杭州）创新医药研究院提供，内标氯雷他定购买于中国食品药品检定研究院。对照品和内标的结构图见图1。

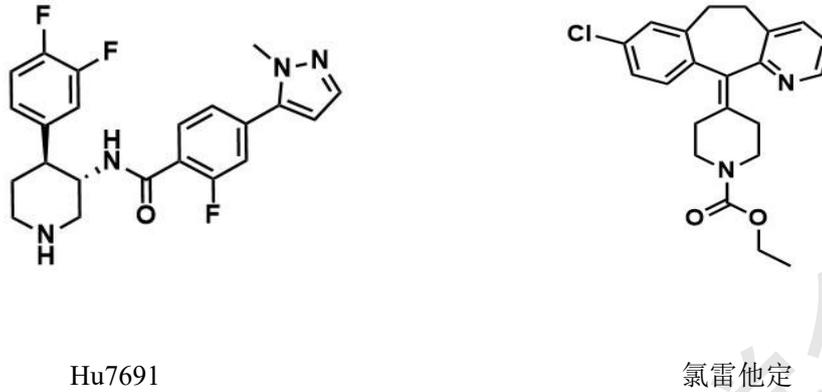


图1 Hu7691和氯雷他定的结构式

1.3 动物

Sprague-Dawley (SD)大鼠, SPF 级, 雌雄各半, 180~220g, 动物生产许可证号: SCXK(浙) 2018-0001, 浙江维通利华实验动物技术有限公司。

2 方法与结果

2.1 分析条件

2.1.1 色谱条件

色谱柱: ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm, Waters Corporation公司);
流动相: 0.1%甲酸水-乙腈 (0.00-0.50 min: 90:10, 0.50-1.50 min: 90:10→10:90, 1.50-3.50 min: 90:10, 3.50-3.51 min: 10:90→90:10, 3.51-5.00 min: 90:10); 流速为0.300 ml/min, 进样量为5 μl; 柱温40°C; 总运行时间为5min。

2.1.2 质谱条件

质谱条件离子化电源, 正离子检测; 电离电压: 3.00 kV; 锥孔电压: 30 V; 离子源温度: 150°C; 脱溶剂气温度350°C, 碰撞气流速0.15 mL/min, 脱溶剂气流速650 L/h。采用多反应监测 (MRM) 模式下进行监测, Hu7691采用MRM方式检测, 母离子m/z: 415.11, 子离子m/z: 196.09, 裂解电压: 5 V, 碰撞能量: 22 eV。内标氯雷他定采用MRM方式检测, 母离子m/z: 383.08, 子离子m/z: 267.02, 裂解电压: 5 V, 碰撞能量: 32 eV。总分析运行时间为5分钟。

2.2 溶液的制备

2.2.1 标准品储备液

精密称取Hu7691标准对照品适量，用甲醇定容配制成浓度为1 mg/ml的Hu7691储备液，置冰箱（2~8℃）保存备用。

2.2.2 内标储备液及内标工作液的配制

精密称取氯雷他定适量，用甲醇定容配制成浓度为1 mg/ml氯雷他定储备液，置冰箱（2~8℃）保存备用。试验前精密量取氯雷他定储备液适量，用乙腈稀释成浓度为4 ng/ml的氯雷他定内标工作液。

2.3 样品处理

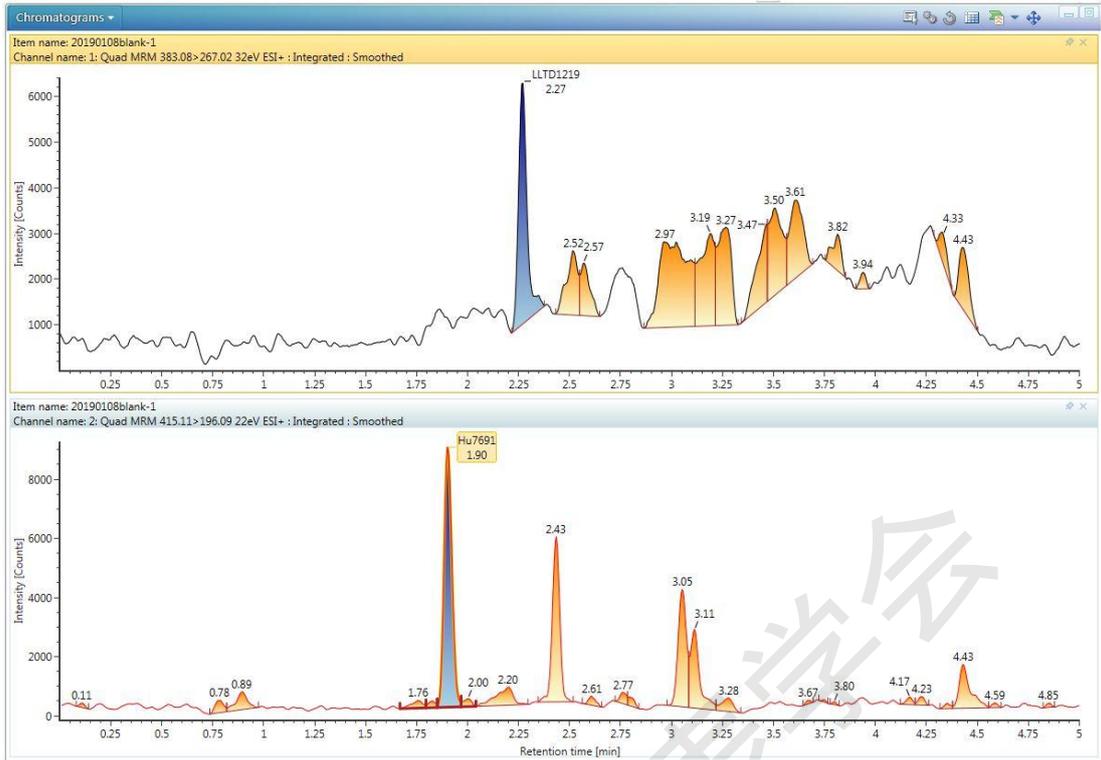
血浆样本使用6倍量乙腈沉淀蛋白处理。精密吸取50 μ l 匀浆液加入到1.5 ml 离心管中，加入300 μ l乙腈溶液（含质量浓度为4 ng·ml⁻¹的氯雷他定内标溶液），涡旋10 min，12 000 r·min⁻¹离心10 min，取上清液LC-MS /MS分析。

2.4 方法学考察^[11]

2.4.1 方法专属性

取 6只不同SD大鼠的空白血浆各50 μ l，置1.5 ml离心管中，除不加内标外，其余按“2.3”项下方法操作，在本实验LC-MS/MS条件下进样分析，获得空白血浆色谱图（图1A）；将一定浓度的Hu7691标准液及内标工作液加入空白血浆中，同法操作获得相应的色谱图（图1B）；取给药Hu7691后的2 h时间点的血浆样本，同法操作得相应的色谱图（图1C）。

该分析条件下，Hu7691的保留时间为1.90 min，内标氯雷他定的保留时间为2.27 min。结果表明，在本实验条件下，Hu7691对照品和内标氯雷他定分离良好，血浆中的内源性杂质不干扰测定。



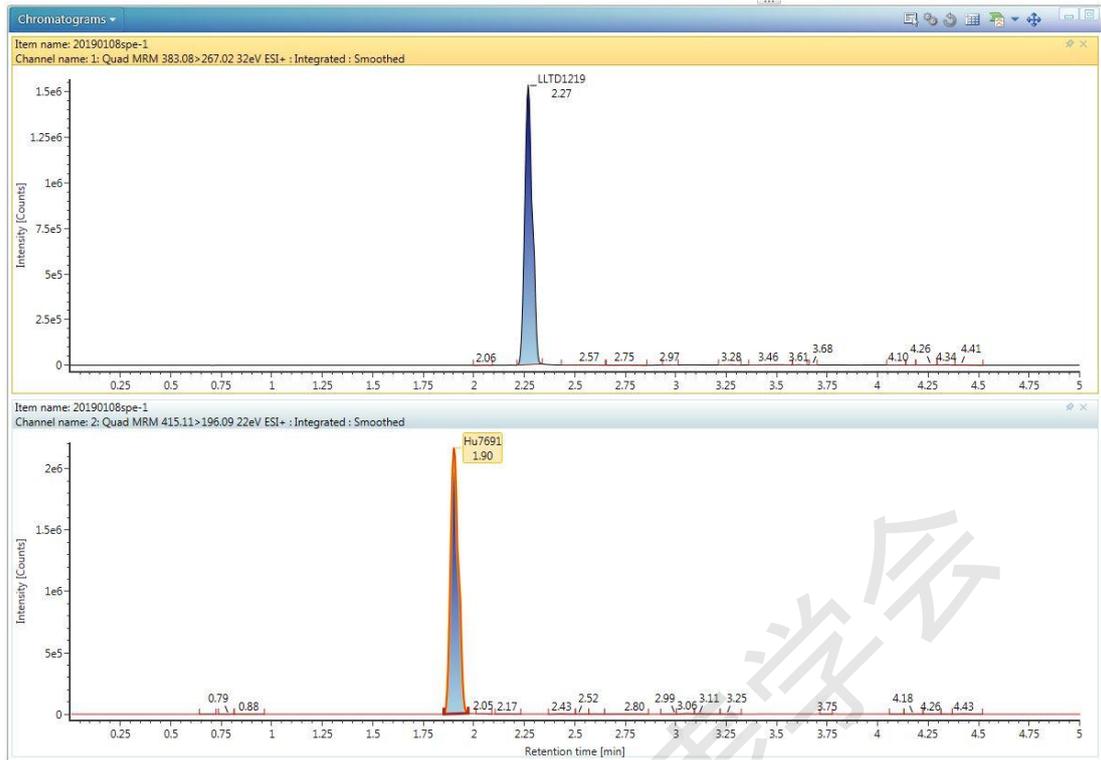


图2 Hu7691血浆样品LC-MS/MS图

空白血浆; B-空白血浆+对照品, 其中Hu7691浓度为5 ng/ml;

C-取SD大鼠给予Hu7691后2 h后的血浆

2.4.2线性范围和定量限

取空白 SD 大鼠血浆 47.5 μ l, 加入 Hu7691 系列标准液 2.5 μ l, 配制成一系列浓度为 5、10、20、50、100、200、500、1000 ng/ml 的血浆工作曲线。按“2.3”项进行处理, 在本实验条件下进样分析。所得结果以待测物浓度为横坐标, 待测物峰面积与内标峰面积的比值为纵坐标, 用加权最小二乘法进行回归运算, 求得的直线回归方程 $Y=0.0146x+0.0129$ ($r=0.9960$)。在 5~1000 ng/ml 内, 线性关系良好。

取 5 ng/ml 模拟血浆样本 5 份, 按“2.3”项进行处理, 在本实验 LC-MS/MS 条件下进样分析。测得结果平均值为 1.01 ng/ml, RSD 为 1.66%, RE 为 -1.56%, 故定量下限为 5 ng/ml, 满足方法学样品测定要求。

2.4.3精密度和准确度

取空白 SD 大鼠血浆 47.5 μ l 加入 1.5 ml 离心管中, 分别加入浓度为 0.3、8、16 μ g/ml 的 Hu7691 质控溶液 2.5 μ l 混匀, 配制浓度为 15、400、800 ng/ml 的 Hu7691 血浆质控样品。按“2.3”项进行处理, 在本实验 LC-MS/MS 条件下进样分析, 每一浓度 5 份样品, 连续测定 3 批, 考察 Hu7691 批内及批间精密度, 结果显示, Hu7691 质控样品批内精密度在 0.90~2.86%

之间，批间精密度在 3.64~6.36%之间，批内准确度在-8.48~12.92%之间，批间准确度在-4.82~4.30%之间。

2.4.4 回收率

取空白 SD 大鼠血浆 47.5 μl 加入 1.5 ml 离心管中，加入浓度为 0.3、8、16 $\mu\text{g/ml}$ 的 Hu7691 质控溶液 2.5 μl 混匀，配制浓度为 15、400 和 800 ng/ml 的 Hu7691 血浆质控样品，每一浓度 3 份样品，按“2.3”项进行处理，在本实验 LC-MS/MS 条件下进样分析；同时，取空白 SD 大鼠血浆 47.5 μl ，按“2.3”项进行处理后添加相应浓度的 Hu7691 质控溶液 2.5 μl ，每一浓度各 3 份，在本实验 LC-MS/MS 条件下进样分析。计算峰面积比值得到该方法下血浆回收率。得到该方法下 Hu7691 提取回收率为 100.26~109.70%。

2.4.5 基质效应

取 6 只 SD 大鼠的空白血浆 47.5 μl ，按“2.3”项进行处理后再分别加入浓度为 0.3、16 $\mu\text{g/ml}$ 的 Hu7691 质控溶液 2.5 μl 混匀，每一浓度 6 份，在本实验 LC-MS/MS 条件下进样分析；同时取水 47.5 μl ，加入浓度为 0.3、16 $\mu\text{g/ml}$ 的 Hu7691 质控溶液 2.5 μl 混匀，每一浓度 6 份，按“2.3”项进行处理，在本实验 LC-MS/MS 条件下进样分析。以峰面积比值计算基质效应 (ME)。得到 ME 为 96.82%~98.55%，表明基质效应可以忽略。

2.4.6 稳定性

配制 Hu7691 在血浆中低、高 2 个浓度分别为 15 和 800 ng·mL⁻¹ 的质控样品，考察生物样本稳定性，样本冰盒放置 4 h 稳定，偏差为-5.73%~0.90%；样本处理后室温放置 5 h 稳定，偏差为-4.20%~-2.44%；样品置-20℃冰箱保存 30 d 稳定，偏差为-11.56%~-5.84%；样品反复冻融解冻 3 次稳定，偏差为-0.93%~5.42%。

3 Hu7691 的大鼠血浆动力学试验

3.1 试验过程

选用 SD 大鼠 32 只，随机分成灌胃低、中、高剂量组和静脉注射组 4 组，每组 8 只，雌雄各半。灌胃给药，低、中、高剂量组的剂量分别为 5、10 和 20 mg/kg，静注组的剂量为 5 mg/kg。灌胃给药的血样采集时间分别为给药前、给药后 0.25、0.5、1、2、4、6、8、10、12、24 和 48 h。静脉给药的血样采集时间分别为给药前、给药后 0.083、0.25、0.5、1、2、4、6、8、12 和 24 h。各组大鼠于给药前和给药后尾静脉采血 0.2 ml 左右，血液于 4000 r min⁻¹ 离心 10 min，取上层澄清血浆，迅速贮存于-20℃冰箱。样品测定前从冰箱取出，室温融化，按“2.3”项下方法处理，根据当日标准曲线计算血浆中药物浓度。

3.2 结果

采用 DAS3.1 药动学软件选择非房室模型计算主要动力学参数 AUC (0-t)、C_{max}、T_{max} 等, 结果见表 1。大鼠单次灌胃给予 5、10 和 20 mg/kg 的 Hu7691 后血药浓度-时间曲线见图 3, 低、中、高剂量组的绝对生物利用度分别为 50.2%、62.0%、75.7%。随着给药剂量的增加, 大鼠血浆中 Hu7691 的 AUC 和 C_{max} 随剂量的增大而增加。

表1 各组大鼠给予Hu7691后的药代动力学参数

剂量 (mg/kg)	C _{max} (ng/ml)	T _{1/2} (h)	MRT _{0-t} (h)	AUC _{0-t} (ngh/ml)	AUC _{0-∞} (ngh/ml)	F (%)
5 (p.o.)	53.9±30.6	5.1±2.9	6.7±2.5	673±564	770±662	50.2
10 (p.o.)	123.3±78.9	5.2±3.0	7.6±3.5	1662±1494	1771±1568	62.0
20 (p.o.)	278.9±134.8	5.3±2.6	8.0±3.6	4057±3321	4164±3339	75.7
5 (i.v.)	687.8±109.1	5.8±3.1	4.6±2.6	1340±679	1504±779	-

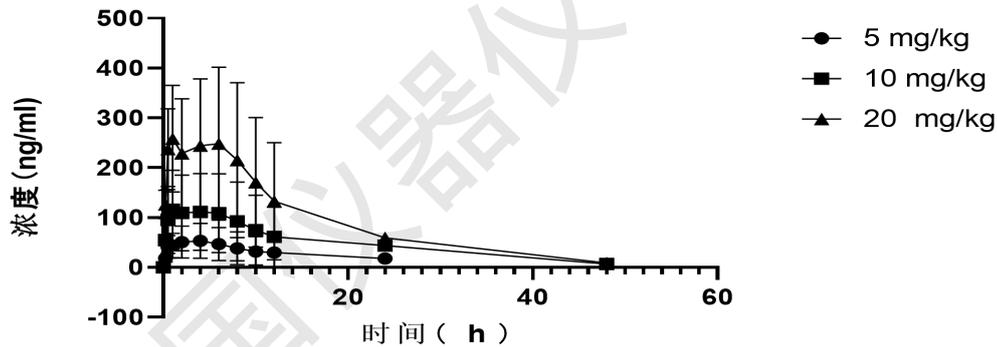


图3 大鼠灌胃5、10、20 mg/kg Hu7691 后的血药浓度-时间曲线

4 结论

本研究建立了一种选择性佳、分离度高、快速的 LC-MS/MS 方法用于测定大鼠血浆中 Hu7691 浓度。通过线性、精密度和稳定性等考察生物分析方法验证合格, 分析的定量限范围为 5-1000 ng/ml。并将该方法应用于 Hu7691 在大鼠体内的药代动力学研究和生物利用度研究, 描述了 Hu7691 在大鼠体内的吸收情况, 研究结果显示 Hu7691 具有较高的胃肠吸收率和稳定的药代动力学特性, 适合用于口服给药。为该药临床研究提供非临床的动物试验依据, 为该药物的进一步开发提供参考依据。

参考文献:

- [1] Thorpe LM, Yuzugullu H, Zhao JJ. PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting[J]. *Nat Rev Cancer*, 2015, 15 (1) : 7-24.
- [2] Engelman, JA, Chen L, Tan X, et al. Effective use of PI3K and MEK inhibitors to treat mutant Kras G12D and PIK3CA H1047R murine lung cancers[J]. *Nat Med*, 2008, 14 (12) : 1351-1356.
- [3] Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy[J]. *Cell*, 2002, 108 (2) : 153-164.
- [4] del Peso L, Gonzalez-Garcia M, Page C, et al. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt[J]. *Science*, 1997, 278 (5338) : 687-689.
- [5] Kitada S, Krajewska M, Zhang X, et al. Expression and location of apoptosis-regulating Bcl-2family protein BAD in normal human tissues and tumor cell lines[J]. *Am J Pathol*, 1998, 152 (1) : 51-61.
- [6] El-Deiry WS. Akt takes centre stage in cell-cyclederegulation[J]. *Nat Cell Biol*, 2001, 3(3) : E71-E73.
- [7] Zhou BP, Liao Y, Xia W, et al. Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-over expressing cells[J]. *Nat Cell Biol*, 2001, 3 (3) :245-252.
- [8] Lindsley CW. The Akt /PKB family of protein kinases: a review of Small molecule inhibitors and progress toward target validation: a 2009 update[J]. *Curr Topics Med Chem*, 2010, 10: 458-477.
- [9] Mattmann ME, Stoops SL, Lindsley CW. Inhibition of Akt with small molecules and biologics: historical perspective and current status of the patent landscape[J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2011, 21: 1309-1338.
- [10] Che J, Dai X, Gao J, Sheng H, Zhan W, Lu Y, Li D, Gao Z, Jin Z, Chen B, Luo P, Yang B, Hu Y, He Q, Weng Q, Dong X. Discovery of N- ((3S,4S) -4- (3,4-Difluorophenyl) piperidin-3-yl) -2-fluoro-4- (1-methyl-1H-pyrazol-5-yl) benzamide (Hu7691) , a Potent and Selective Akt Inhibitor That Enables Decrease of Cutaneous Toxicity[J].*Med Chem*. 2021 Aug 26;64 (16) :12163-12180.

- [11] Li Ping, Xinwei Dong, Minjuan Zuo, Yawen Hong and Difeng Zhu. Development and Validation of an Ultra-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for Quantitative Determination of N-((3S,4S)-4-(3,4-Difluorophenyl)piperidin-3-yl)-2-fluoro-4-(1-methyl-1Hpyrazol-5-yl)benzamide in Dog Plasma[J]. Appl. Sci. 2022, 12(1), 158.

中国仪器仪表学会