

度洛西汀在正常大鼠和糖尿病大鼠体内的药代动力学比较研究

牛广豪¹, 张全英^{1,2*}, 王猛猛², 俞蕴莉², 朱艺芳²

(苏州大学 1. 医学部药学院, 江苏 苏州 215000, 2. 附属第二医院临床药理实验室, 江苏 苏州 215004)

摘要: 建立测定大鼠血浆中度洛西汀浓度的液相色谱-串联质谱法 (LC-MS/MS), 并比较研究度洛西汀在正常和糖尿病大鼠的药代动力学。以地西洋为内标, 色谱柱为 Waters Xterra® RP18 (100 mm × 4.6 mm, 3.5 μm), 以甲醇-含 0.3% 甲酸的 5 mmol·L⁻¹ 醋酸铵水溶液 (75 : 25) 为流动相, 流速为 0.6 mL·min⁻¹, 用电喷雾离子源, 正离子多反应监测, 分析时间 5.5 min。度洛西汀血浆在 10~5 000 ng·mL⁻¹ 浓度内线性关系良好。采用腹腔注射链脲佐菌素的方法建立糖尿病大鼠模型, 与正常大鼠相同剂量 (40 mg·kg⁻¹) 灌胃给予度洛西汀, 于眼眶静脉丛采血测定血药浓度, 用 DAS 软件计算药代动力学参数, 用 SPSS 软件进行统计分析。主要药代动力学参数结果表明, 糖尿病组: C_{\max} 为 1 185 ± 190.0 ng·mL⁻¹、 $AUC_{0-\infty}$ 为 8 398 ± 1 835 ng·mL⁻¹·h、 t_{\max} 为 1.6 ± 0.4 h、 $t_{1/2z}$ 为 3.6 ± 0.9 h; 正常组: C_{\max} 为 368.1 ± 40.7 ng·mL⁻¹、 $AUC_{0-\infty}$ 为 4 145 ± 640.1 ng·mL⁻¹·h、 t_{\max} 为 1.6 ± 0.3 h、 $t_{1/2z}$ 为 4.1 ± 0.8 h。结果表明, 度洛西汀在糖尿病模型大鼠体内的暴露量显著高于正常大鼠, 约是正常大鼠的 2 倍。

关键词: 度洛西汀; 糖尿病; 药代动力学; 液相色谱-串联质谱

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 05-0790-05

Comparative study of duloxetine pharmacokinetics in normal and diabetic rats

NIU Guang-hao¹, ZHANG Quan-ying^{1,2*}, WANG Meng-meng², YU Yun-li², ZHU Yi-fang²

(1. College of Pharmaceutical Science, Suzhou 215000, China, 2. Department of Clinical Pharmacology Research Laboratory, The Second Affiliated Hospital, Soochow University, Suzhou 215004, China)

Abstract: The study was aimed to establish a liquid chromatography – tandem mass spectrometric method for the determination of the duloxetine concentration in rat plasma, and compare the pharmacokinetics in normal and diabetes mellitus rat models. Diazepam was used as an internal standard. The separation was achieved on a Waters Xterra® RP18 column (100 mm × 4.6 mm, 3.5 μm) with a mobile phase consisting of methanol – 0.3% formic acid containing 5 mmol·L⁻¹ ammonium acetate (75 : 25) at the flow rate of 0.6 mL·min⁻¹. Electrospray ionization source was applied and operated in the positive multiple reaction monitoring mode. A good linearity of duloxetine was obtained in the concentration range of 10–5 000 ng·mL⁻¹. The rat models of diabetes mellitus were established by intraperitoneal injection of streptozotocin. The same dose of duloxetine (40 mg·kg⁻¹) was given by intragastric administration to the normal and diabetic rats. Blood samples were collected from the orbital venous plexus to determinate duloxetine concentration in the plasma. The pharmacokinetic parameters were calculated by DAS software. Statistical analysis was performed by SPSS software. The major pharmacokinetic parameters of diabetes group were as follows: C_{\max} was 1 185 ± 190.0 ng·mL⁻¹; $AUC_{0-\infty}$ was 8 398 ± 1 835 ng·mL⁻¹·h; t_{\max} was 1.6 ± 0.4 h; $t_{1/2z}$ was 3.6 ± 0.9 h. The major pharmacokinetic parameters of normal

收稿日期: 2016-12-28; 修回日期: 2017-02-24.

基金项目: 苏州药学会-常州四药临床药学会科研基金 (SYSD2015142); 江苏省自然科学基金-青年基金 (BK20150302).

*通讯作者 Tel: 86-512-67783687, E-mail: sdfeyyq@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2016-1233

group were as follows: C_{\max} was $368.1 \pm 40.7 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$; $\text{AUC}_{0-\infty}$ was $4145 \pm 640.1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}$; t_{\max} was $1.6 \pm 0.3 \text{ h}$; $t_{1/2}$ was $4.1 \pm 0.8 \text{ h}$. The results of pharmacokinetic experiments suggest that the exposure amount of duloxetine in diabetic rats is twice higher than that in normal rats.

Key words: duloxetine; diabetes; pharmacokinetics; LC-MS/MS

度洛西汀 (duloxetine, DUL) 是一种选择性 5-羟色胺 (5-HT) 和去甲肾上腺素 (NE) 再摄取双重抑制剂, 通过提高中枢神经系统中 5-HT 和 NE 的浓度调控情感、抑制对疼痛的敏感程度^[1]。度洛西汀口服给药后, 在人体的 t_{\max} 约为 6 h, $t_{1/2}$ 约为 12 h; 在大鼠体内的 t_{\max} 约为 2 h, $t_{1/2}$ 约为 3 h, 绝对生物利用度约为 21%。大鼠体内的主要代谢产物与人体内的相同, 代谢物均没有药理活性^[1, 2]。一项大鼠的放射性同位素标记实验表明, 度洛西汀的生物利用度约为 82%, 原形药物的 AUC 仅占总放射量的 4%^[2]。

在糖尿病患者中, 度洛西汀主要用于治疗糖尿病周围神经痛和伴糖尿病的抑郁症。有报道, 在糖尿病病理状态下, 机体的一些代谢酶和转运蛋白也会发生变化^[3, 4]。临床上, 糖尿病患者也往往伴随心脑血管、肝脏、肾脏等器质性病变, 甚至会有癌症的发生^[5-7]。因此, 糖尿病状态下度洛西汀的药代动力学变化, 可能是其药效和不良反应的重要影响因素。随着度洛西汀的广泛应用, 其不良反应的报道也逐渐增多^[8]。已有文献报道度洛西汀用于糖尿病神经痛患者时, 不良反应发生率高于安慰剂组 2 倍以上, 主要为恶心、头晕、困倦等^[9]。然而, 尚未有研究报道度洛西汀在糖尿病状态的药代动力学特征。本文旨在建立 LC-MS/MS 法测定大鼠血浆中度洛西汀的浓度, 并比较正常及糖尿病状态下大鼠体内的药代动力学差异。

材料与方法

试剂 盐酸度洛西汀: 迈基生物, 批号: DHS151012Y, 含量 99%; 地西洋, 购自中国食品药品检定研究院, 批号: 171225200302, 含量 100%。链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ): Sigma 公司, 批号: WXBB6772V, 含量 $\geq 98\%$ 。

动物 SD 雄性大鼠, 清洁级, 体重 $(180 \pm 20) \text{ g}$, 上海斯莱克实验动物有限责任公司, 许可证号: SCXK (沪) 2012-0002。

仪器 Agilent 1260 高效液相色谱仪, Agilent 公司; API-4000 型三重四极杆串联质谱仪, Applied Biosystem Sciex 公司。

色谱条件 色谱柱: Waters Xterra[®] RP18 (4.6 mm \times 100 mm, 3.5 μm), 预柱: Phenomenex Security Guard[™] C18 (4.0 mm \times 3.0 mm); 流动相: 甲醇-含 0.3% 甲酸的 5 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸铵水溶液 (75 : 25); 柱温 20 $^{\circ}\text{C}$; 流速 0.6 mL $\cdot \text{min}^{-1}$; 进样体积 5 μL ; 每个样本的分析时间为 5.5 min。

质谱条件 电喷雾 (ESI) 离子源, 正离子电离模式, 多反应监测 (MRM) 扫描方式, 碰撞气: 6 psi (1 psi \approx 6.9 kPa), 气帘气: 10 psi, 雾化气: 60 psi, 加热辅助气: 50 psi, 电喷雾电压: 3 500 V, 离子源温度 (TEM) 550 $^{\circ}\text{C}$; 待测物和内标 (IS) 的检测离子分别为: 度洛西汀: m/z 298.2 \rightarrow 154.0, 地西洋 (IS): m/z 285.5 \rightarrow 154.0。

糖尿病大鼠模型的建立 选健康大鼠禁食 12 h, 现配 STZ 溶液 (溶剂: pH 4.3 枸橼酸/枸橼酸钠缓冲溶液), 按照剂量 65 mg $\cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔注射, 3 天后测空腹血糖, 空腹血糖高于 11.1 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ 的大鼠选入糖尿病模型组^[10]。

大鼠血样的采集 糖尿病模型组大鼠 ($n=6$) 与正常组大鼠 ($n=6$) 同等条件下饲养 3 天后, 禁食不禁水 12 h。将盐酸度洛西汀用水溶解后灌胃给药 (40 mg $\cdot \text{kg}^{-1}$), 分别于给药前 (0 h) 及给药后 0.5、1、1.5、2、3、5、8、11、24 h 从眼眶静脉丛取血 0.5 mL 置于经肝素处理的离心管中, 离心 10 min (3 000 r $\cdot \text{min}^{-1}$), 分离血浆, 于 -30°C 保存待测。

标准系列样品和质控样品的制备 取大鼠空白血浆 48 μL , 依次加入度洛西汀系列标准曲线工作液或系列质控工作液 2 μL , 制备成 10.00、30.00、100.0、300.0、1 000、2 000、3 500 和 5 000 ng $\cdot \text{mL}^{-1}$ 系列标准血浆样品和 10.00 ng $\cdot \text{mL}^{-1}$ (LLOQ)、20.00 ng $\cdot \text{mL}^{-1}$ (QCL)、1 200 ng $\cdot \text{mL}^{-1}$ (QCM)、4 000 ng $\cdot \text{mL}^{-1}$ (QCH) 系列质控血浆样品。

血浆样品预处理 吸取待测大鼠血浆样品 50 μL 至离心管中, 加入内标工作液 10 μL , 加入甲醇 140 μL 沉淀蛋白, 涡旋 1 min, 于 15 000 r $\cdot \text{min}^{-1}$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min, 吸取上清液 10 μL 至另一离心管, 加流动相 190 μL , 涡旋混匀后 5 μL 进样分析。

数据处理 采用 DAS 3.2.3 (上海博佳医药科技

有限公司) 软件, 分别处理测得的血药浓度数据, 得到非房室模型统计矩参数, 其中 C_{\max} 和 t_{\max} 均为实测值, AUC 计算方法为线性梯形法。将正常组和糖尿病组的各药代动力学参数 (t_{\max} 除外) 经对数转换后, 用 SPSS 22 (IBM) 软件进行独立样本的 t 检验 ($\alpha=0.05$), t_{\max} 进行 Mann-Witney U 检验 ($\alpha=0.05$)。

方法学考察

特异性 按“血浆样品预处理”项操作, 分别考察 6 种不同来源的大鼠空白血浆不加内标样本、空白血浆加入内标样本、空白血浆加度洛西汀样本、给药后大鼠血浆加入内标样本, 并记录相应的色谱图。

标准曲线与线性范围 取大鼠标准血浆系列样品 50 μL , 按“血浆样品预处理”项操作, 以度洛西汀的加入浓度 C 为 x 轴, 以待测物 A_s 与内标 A_i 的峰面积比值 ($f=A_s/A_i$) 为 y 轴进行权重回归 (权重系数为 $1/C^2$)。

最低定量限与精密度和准确度 取度洛西汀血浆质控系列样品 (LLOQ、QCL、QCM、QCH) 每种浓度 6 份, 按“血浆样品预处理”项操作, 连续测定 3 个分析批, 以随行标准曲线计算最低定量限与质控样品的浓度, 将同一浓度 3 个批次共 18 个样品的实测浓度进行单因素方差分析, 计算批内、批间精密度 (RSD) 和准确度 (RE)。

回收率 取度洛西汀血浆质控系列样品 (QCL、QCM、QCH) 每种浓度 6 份, 按“血浆样品预处理”项操作, 以其进样得到的峰面积除以空白血浆经处理后直接加入低、中、高 3 种相应质量浓度的度洛西汀质控工作液及内标工作液后进样得到的峰面积, 计算血浆中度洛西汀和内标的提取回收率。

基质效应 按“血浆样品预处理”项操作, 处

理 6 种不同来源空白血浆 (每种来源 3 个), 得到空白血浆基质后, 分别加入低、中、高 3 种质量浓度的度洛西汀质控工作液及内标工作液, 以其进样得到的峰面积除以同种操作下以水代替空白血浆的待测物峰面积, 计算血浆中内源性物质对度洛西汀和内标的绝对基质效应, 再以度洛西汀的绝对基质效应除以内标的绝对基质效应, 得到度洛西汀的内标归一化的基质效应因子。

稳定性 根据样品制备与分析过程, 分别考察了血浆低、中、高 3 种质量浓度的质控样品在 $-30\text{ }^\circ\text{C}$ 冷冻 7 天、 $-30\text{ }^\circ\text{C}$ 反复冻融 3 次、 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 放置 24 h、室温放置 6 h、样品处理后进样器放置 24 h 的稳定性, 其中每个条件下每种浓度的样品平行制备 3 份。

结果

1 方法学考察

1.1 特异性 度洛西汀及内标的峰形良好, 保留时间分别约为 2.02 min 和 3.55 min, 大鼠空白血浆中的内源性物质不干扰测定, 结果如图 1 所示。

1.2 标准曲线与线性范围 度洛西汀在大鼠血浆中的典型的线性回归方程为 $y=0.008\ 36x+0.016\ 9$, 相关系数为 $r=0.999\ 4$, 线性范围为 $10\sim 5\ 000\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

1.3 最低定量限与精密度和准确度 大鼠血浆中度洛西汀的精密度和准确度结果见表 1。

1.4 回收率 度洛西汀的提取回收率为 $80.99\%\sim 103.14\%$, RSD 为 $4.49\%\sim 8.12\%$; 内标的提取回收率为 $82.16\%\sim 104.10\%$, RSD 为 5.85% 。

1.5 基质效应 度洛西汀的内标归一化基质效应为 $88.16\%\sim 104.84\%$, RSD $\leq 5.71\%$ 。

1.6 稳定性 稳定性考察结果见表 1, 所有样本实测

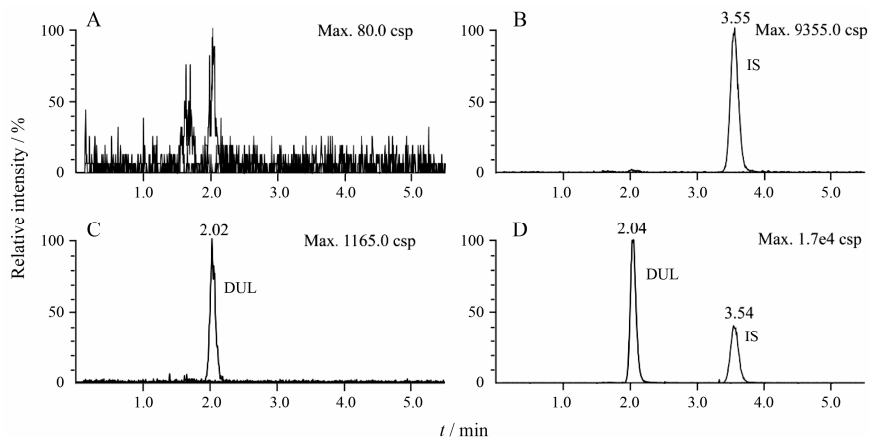


Figure 1 Representative LC-MS/MS chromatograms of duloxetine (DUL) and diazepam (IS). A: Rat blank plasma; B: Rat blank plasma spiked with IS; C: Rat blank plasma spiked with DUL ($10.00\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$); D: Rat plasma sample spiked with IS of 0.5 h after an intragastric administration at dose of $40\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ DUL

Table 1 Precision, accuracy and stabilities of duloxetine in rat plasma sample. ^a $n=6$, ^b $n=3$, $\bar{x} \pm s$

Concentration /ng·mL ⁻¹	Precision ^a		Accuracy ^a	Stabilities ^b			
	Intra-day RSD/%	Inter-day RSD/%	RE/%	-30 °C, for 7 days/%	-30 °C, after third freeze-thaw cycle/%	Room temperature, for 6 h/%	Process (extracted sample) 4 °C, for 24 h/%
10.00	5.28	6.91	-13.97 - 4.03	-	-	-	-
20.00	4.30	7.23	-14.00 - -1.33	100.82 ± 5.44	100.66 ± 9.02	98.05 ± 8.24	97.54 ± 8.82
1 200	5.80	9.13	-14.25 - 8.67	100.14 ± 3.01	101.71 ± 9.19	100.37 ± 4.76	102.54 ± 6.29
4 000	6.08	7.30	-14.17 - 7.44	99.56 ± 2.86	100.36 ± 1.78	100.18 ± 3.66	99.52 ± 4.11

浓度与加入浓度比较, 均满足 RE 在 ±15% 以内, RSD ≤ 15%, 在本文所考察范围内度洛西汀的稳定性良好。

2 度洛西汀在正常和糖尿病模型大鼠的药代动力学

度洛西汀在正常和糖尿病模型大鼠体内的血药浓度-时间曲线见图 2, 主要药代动力学参数及统计分析结果见表 2。

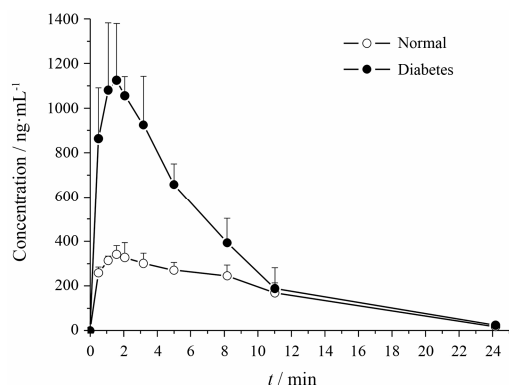


Figure 2 Mean plasma concentration-time curves of duloxetine in normal and diabetic rats after intragastric administration at dose of 40 mg·kg⁻¹. $n=6$, $\bar{x} \pm s$

Table 2 Pharmacokinetic parameters of duloxetine in normal and diabetic rats after intragastric administration. $n=6$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs normal group

Parameter	Normal	Diabetes
AUC _{0-t} /ng·mL ⁻¹ ·h	4 037 ± 655.6	8 273 ± 1 793*
AUC _{0-∞} /ng·mL ⁻¹ ·h	4 145 ± 640.1	8 398 ± 1 835*
MRT _{0-t} /h	7.2 ± 0.3	5.5 ± 0.5*
MRT _{0-∞} /h	7.9 ± 0.6	5.9 ± 0.6*
$t_{1/2z}$ /h	4.1 ± 0.8	3.6 ± 0.9
V_z/F /L·kg ⁻¹	58.8 ± 15.8	25.5 ± 7.1*
CL_z/F /L·h ⁻¹ ·kg ⁻¹	9.8 ± 1.4	5.0 ± 1.1*
C_{max} /ng·mL ⁻¹	368.1 ± 40.7	1 185 ± 190.0*
t_{max} /h	1.6 ± 0.3	1.6 ± 0.4

讨论

本文建立了测定大鼠血浆中的度洛西汀浓度的 LC-MS/MS 法, 方法准确、简便、快速。采用甲醇直接沉淀血浆蛋白, 操作简便, 快速高效。

从度洛西汀在正常和糖尿病模型大鼠的血药浓

度-时间曲线及药代动力学参数可知: 和正常组相比, 糖尿病组的 MRT_{0-t} 与 MRT_{0-∞} 均显著减小, 原因可能是度洛西汀主要经肾排泄, 其中 70% 的度洛西汀经尿液排出^[11], 而糖尿病状态下大鼠的尿量增加甚至可能存在肾损伤^[12], 进而导致药物的排泄加快。另外, 度洛西汀主要经 CYP1A2 代谢^[1], 有文献报道糖尿病患者体内的 CYP1A2 的活性增强^[13], 这也是糖尿病组 MRT 减小的可能原因之一。 t_{max} 在两组间无显著性差异, 说明糖尿病状态下不会影响药物的达峰时间。尽管糖尿病状态下度洛西汀的 MRT 降低, 体内消除加快, 但是糖尿病组体内暴露量 (C_{max} 、AUC_{0-t} 与 AUC_{0-∞}) 显著增大, 分别是正常组药动学参数的 3、2、2 倍。同时由于糖尿病状态下度洛西汀的体内暴露量显著增大, 导致相同剂量下表观分布容积 (V_z/F) 显著减小。上述结果说明在糖尿病状态下, 度洛西汀药物的吸收显著增强, 可能源于大鼠胃肠道功能异常, 药物的吸收过程发生改变, 具体原因还有待进一步探索。

药物的不良反应通常与体内暴露量相关。度洛西汀用于糖尿病神经痛患者时不良反应发生率高于安慰剂组 2 倍, 主要为恶心、头晕、困倦等^[9]。度洛西汀在糖尿病患者体内不良反应的发生率增加可能源于其暴露量的增大。该结果提示在临床应用中, 需关注糖尿病患者体内度洛西汀的暴露量, 如暴露量增加可以考虑在不影响疗效的基础上调整糖尿病患者的用药剂量。

References

- [1] Knadler MP, Lobo E, Chappell J, et al. Duloxetine: clinical pharmacokinetics and drug interactions [J]. Clin Pharmacokinet, 2011, 50: 281-294.
- [2] Bymaster FP, Lee TC, Knadler MP, et al. The dual transporter inhibitor duloxetine: a review of its preclinical pharmacology, pharmacokinetic profile, and clinical results in depression [J]. Curr Pharm Des, 2005, 11: 1475-1493.
- [3] Hasegawa Y, Kishimoto S, Shibatani N, et al. The pharmacokinetics of morphine and its glucuronide conjugate in a rat

- model of streptozotocin-induced diabetes and the expression of MRP2, MRP3 and UGT2B1 in the liver [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2010, 62: 310–314.
- [4] Wang L, Liu KX. Alteration of related transporters and its application significance in common intestinal disease, liver disease, renal disease and diabetes [J]. *Acta Pharm Sin (药 学 学 报)*, 2015, 50: 127–132.
- [5] Engelgau MM, Geiss LS, Saaddine JB, et al. The evolving diabetes burden in the United States [J]. *Ann Intern Med*, 2004, 140: 945–950.
- [6] Ritz E, Orth SR. Nephropathy in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. *N Engl J Med*, 1999, 341:1127–1133.
- [7] Yu JJ, Hua F, Hu ZW. Advances in the studies of the link between diabetes and cancer [J]. *Acta Pharm Sin (药 学 学 报)*, 2016, 51: 1017–1024.
- [8] Voican CS, Corruble E, Naveau S, et al. Antidepressant-induced liver injury: a review for clinicians [J]. *Am J Psychiatry*, 2014, 171: 404–415.
- [9] U.S. Food and Drug Administration. Highlights of Prescribing Information: Cymbalta (duloxetine hydrochloride) Delayed-Release Capsules for Oral Use, Reference ID: 3009610 [EB/OL]. 2011-09-07 [2016-10-15]. http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2011/021427s0391bl.pdf.
- [10] Cheng L, Shen ZF, Sun GB, et al. Advances in diabetic animal models and its application in the traditional Chinese medicine research [J]. *Acta Pharm Sin (药 学 学 报)*, 2015, 50: 951–958.
- [11] Lantz RJ, Gillespie TA, Rash TJ, et al. Metabolism, excretion, and pharmacokinetics of duloxetine in healthy human subjects [J]. *Drug Metab Dispos*, 2003, 31: 1142–1150.
- [12] Chadha GS, Morris ME. Effect of type 2 diabetes mellitus and diabetic nephropathy on IgG pharmacokinetics and subcutaneous bioavailability in the rat [J]. *AAPS J*, 2015, 17: 965–975.
- [13] Lee JH, Yang SH, Oh JM, et al. Pharmacokinetics of drugs in rats with diabetes mellitus induced by alloxan or streptozocin: comparison with those in patients with type I diabetes mellitus [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2010, 62: 1–23.