

HPLC-MS/MS 法研究恒河猴口服新型调血脂化合物 IMM-H007 后的全血药代动力学特征

王蕊, 王宝莲*, 李燕*

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所药物代谢室, 创新药物非临床药物代谢及 PK/PD 研究北京市重点实验室, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100050)

摘要: 本研究建立了恒河猴全血中 IMM-H007 及其主要活性代谢产物 M1 及 MP 的 HPLC-MS/MS 定量测定方法, 并成功应用于恒河猴全血药代动力学研究。液相色谱分离采用 Capcell PAK ADME 柱 (2.1 mm×100 mm, 3 μm, Shiseido, Japan), 流动相为甲醇/水 (含 0.1% 甲酸), 梯度洗脱; 质谱检测采用电喷雾 (ESI) 离子源, 正离子模式, 选择离子检测 (SRM) 方式测定。经方法学考证, IMM-H007 及其代谢产物在恒河猴全血中线性关系良好, 批内和批间精密度与准确度偏差均小于 15%, 回收率高且无基质效应, 在样品处理、储存和分析过程中均稳定, 说明该测定方法准确、可靠, 可满足恒河猴全血药代动力学研究需要。恒河猴单次口服不同剂量 IMM-H007 (70、210、630 mg·kg⁻¹) 后, 原形药 IMM-H007 在体内血药浓度较低, 主要以活性代谢产物 M1 和 MP 的形式存在, MP 的体内暴露量明显高于 M1。MP 在恒河猴体内动力学过程符合线性动力学特征。上述研究为新型调血脂药物 IMM-H007 后续临床前药理毒理和临床研究提供了可靠的参考数据。

关键词: 新型调血脂化合物; 恒河猴; 药代动力学; HPLC-MS/MS

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 07-1156-06

Pharmacokinetics of IMM-H007 after oral administration in Rhesus monkey using HPLC-MS/MS analysis

WANG Rui, WANG Bao-lian*, LI Yan*

(Beijing Key Laboratory of Non-Clinical Drug Metabolism and PK/PD Study, State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Department of Drug Metabolism, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: A simple, sensitive and reliable method was developed for simultaneous quantification of IMM-H007 and its major active metabolites — M1 and MP in the blood of rhesus monkey using HPLC-MS/MS analysis. The analytes and internal standard (IS) WS070119 were separated using a Capcell PAK ADME Column (2.1 mm×100 mm, 3 μm, Shiseido, Japan) with a gradient mobile phase of methanol/water containing 0.1% formic acid. The detection was performed in positive selected reaction monitoring (SRM) mode with electrospray ionization (ESI) source. Satisfactory linearity was obtained while the inter- and intra-assay precision and accuracy differences were no more than 15% with high recovery and good stability for the quantification, indicating the present method was specific, accurate and reliable. The method was successfully applied to the pharmacokinetic study of IMM-H007 in rhesus monkey. After single oral administration of

收稿日期: 2018-02-05; 修回日期: 2018-04-10.

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程经费资助项目 (2017-I2M-1-010).

*通讯作者 Tel: 86-10-63165172, E-mail: wangbaolian@imm.ac.cn;

Tel: 86-10-63165185, E-mail: yanli@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0135

IMM-H007 (70, 210, 630 mg·kg⁻¹), M1 and MP were detected in blood, while the concentration of IMM-H007 was much lower than its metabolites. The active metabolite MP with linear kinetics had a higher exposure than other analytes *in vivo*. The results provide an useful and reliable model for pharmacological and toxicological studies of IMM-H007 as well as its clinical application.

Key words: lipid-relating chemical; rhesus monkey; pharmacokinetics; HPLC-MS/MS

高脂血症是由多种原因导致的血浆中总胆固醇 (TC)、甘油三脂 (TG) 与低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 过高的脂质代谢紊乱疾病^[1], 可增加多种心血管疾病的患病风险^[2], 如中风、冠心病、心肌梗死等^[3]。IMM-H007 (图 1) 是中国医学科学院药物研究所从天然产物虫草素中提取并经过结构改造获得的新型调血脂化合物^[4], 药效实验^[5]和毒理学研究^[6]表明 IMM-H007 主要通过激活腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK) 发挥良好的调血脂作用, 且安全性较好, 具有良好的开发前景。

在金黄地鼠口服 IMM-H007 后体内药代动力学研究基础上^[7], 本研究以恒河猴为研究对象, 建立了 IMM-H007 及活性代谢产物 M1 和 MP 在恒河猴全血中 HPLC-MS/MS 定量测定方法, 并应用该方法研究了恒河猴单次口服不同剂量 IMM-H007 后体内药代动力学特征。

材料与方法

药品和试剂 IMM-H007、M1、MP 及内标 WS070119 均由中国医学科学院药物所合成^[8,9] (纯度分别为 99.7%、99.5%、97.0%、99.2%), IMM-H007 及代谢产物的化学结构如图 1 所示。甲酸、甲醇、乙腈均为色谱纯 (Merck, USA), 实验用水由 Milli-Q 制备, 其他化学试剂均为分析纯。

仪器设备 API4000 质谱仪 (美国 AB 公司), 包括 ESI 源、质谱泵及 Analyst1.5.2 数据处理系统; 岛津 LC-30A 液相色谱仪, 包括在线自动脱气装置; Thermo 高速台式离心机; MVS-1 型涡旋混合器 (北

京北德化学仪器厂) 等。

实验动物 健康恒河猴 8 只, 雌雄各半, 体重 5.0~5.5 kg, 许可证号为 SCXK (京) 2015-0011, 购自北京协尔鑫生物资源研究所有限责任公司。恒河猴单笼饲养, 自由摄水, 室温 18~22 °C, 日温差 3 °C, 湿度 50%~60%, 光照 12 h 明暗交替, 换气次数为每小时 20 次, 气流速度 0.1~0.2 m·s⁻¹, 空气洁净度为 1 000 级, 氨浓度 ≤ 14 mg·m⁻³, 噪声 ≤ 60 分贝, 工作照度为 150~300 LX, 动物照度为 100~200 LX。猴笼每日清洗 2 次, 每两周采用过氧乙酸消毒 1 次。

HPLC-MS/MS 条件 色谱条件: 色谱柱为 Capcell PAK ADME Column (2.1 mm × 100 mm, 3 μm, Shiseido, Japan); 柱温为 35 °C; 进样器温度为 15 °C; 流动相为 A (0.1% 甲酸水): B (0.1% 甲酸甲醇), 梯度洗脱程序: 0~1 min, 76% A; 1~3.5 min, 5% A; 4.5~5.5 min, 60% A; 6.5~7.5 min, 20% A; 8.5~9.5 min, 60% A, 10.5~11.5 min, 20% A; 12.5~13.5 min, 60% A; 14.5~15 min, 20% A; 15.5 min, 60% A, 15.5~19 min, 40% A; 19~24 min, 76% A; 流速为 0.25 mL·min⁻¹; 进样量为 2 μL。质谱条件: 电喷雾离子源 (ESI); 喷雾电压为 5.5 kV, 碰撞气为 10 psi (1 psi ≈ 6.9 kPa), CUR Gas 为 25 psi, Gas1 与 Gas2 均为 50 psi, 离子源温度为 550 °C。反应以阳离子方式检测, 扫描方式选用选择反应离子监测 (SRM), 各化合物用于定量分析的选择性反应离子分别为: *m/z* 486.2→228.1 (IMM-H007, CE: 24 eV), *m/z* 360.2→228.1 (M1, CE: 25 eV), *m/z* 440.0→228.1 (MP, CE: 28 eV), *m/z* 374.0→242.0 (IS, CE: 26 eV)。

标准溶液与质控工作液配制 精密称取 IMM-

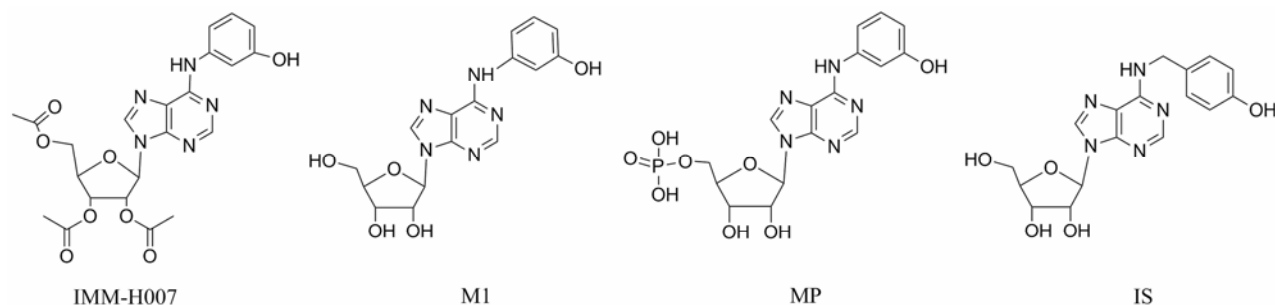


Figure 1 The structures of IMM-H007, M1, MP and WS070119

H007、M1 及 MP 对照品适量, 以甲醇溶解定容至 $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 作为储备液备用。使用前准确吸取 IMM-H007、M1 及 MP 储备液, 用甲醇以梯度稀释法配制标准曲线工作液。IMM-H007 标准曲线工作液质量浓度为 5 000、2 000、1 000、500、200、100、50、20 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, M1 标准曲线工作液质量浓度为 10 000、5 000、2 000、1 000、500、200、100、50 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, MP 标准曲线工作液质量浓度为 50 000、20 000、10 000、5 000、2 000、1 000、250、100 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。以同样方法制备质控标准工作液, IMM-H007 质控工作液质量浓度为 50、400、4 000 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, M1 质控工作液质量浓度为 100、800、8 000 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, MP 质控工作液质量浓度为 200、4 000、40 000 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

内标溶液配制 精密称取内标 WS070119 适量, 用甲醇溶解定容至 $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 作为内标储备液备用。使用前用乙腈稀释为 $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内标工作液。

全血校正曲线与质控样品制备 取肝素抗凝恒河猴空白全血 $100 \mu\text{L}$, 加入不同浓度 IMM-H007、M1 及 MP 标准曲线工作液各 $10 \mu\text{L}$ 、内标工作液 $10 \mu\text{L}$ 、乙腈 $160 \mu\text{L}$, 配成 IMM-H007、M1 及 MP 全血标准曲线样品。IMM-H007 标准曲线终质量浓度为 500、200、100、50、20、10、5、2 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, M1 标准曲线终质量浓度为 1 000、500、200、100、50、20、10、5 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, MP 标准曲线终质量浓度为 5 000、2 000、1 000、500、200、100、25、10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。涡旋振荡 2 min 后, 高速离心 ($14\,000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 5 min) 两次, 取上清液 $2 \mu\text{L}$ 进行 HPLC-MS 分析。质控样品的制备方法同标准曲线, IMM-H007 质控样品终质量浓度为 5、40、400 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, M1 质控样品终质量浓度为 10、80、800 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, MP 质控样品终质量浓度为 20、400、4 000 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

全血样品处理 取恒河猴新鲜全血 $100 \mu\text{L}$, 加入乙腈 $190 \mu\text{L}$ 及内标 $10 \mu\text{L}$, 涡旋振荡 2 min 后, 高速离心 ($14\,000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 5 min) 两次, 取上清液 $2 \mu\text{L}$ 进行 HPLC-MS/MS 分析。

药代动力学研究 恒河猴药代动力学实验方案经北京协和建昊医药技术开发有限责任公司动物伦理委员会批准实施。8 只健康恒河猴, 雌雄各半, 自由饮水与饮食, 实验前禁食 12 h, 分别口服不同剂量 IMM-H007 (70、210 和 $630 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 混悬液 (0.5% 羟丙甲纤维素配制) 后 5、15、30 min、1、2、3、4、6、8、12、24、36、48、72、96 和 120 h 于前肢取血约 0.5 mL , 新鲜全血置于含 0.5% 肝素钠和 $200 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaF 的冰浴化离心管中, 取出全血 $100 \mu\text{L}$ 按照“全

血样品处理”方法操作分析。

数据分析 药代动力学参数由 Phoenix WinNonLin 软件 (version 6.3, Certara Corporation, St. Louis, MO) 采用非房室模型计算获得。数据以均值 \pm 标准差形式表示。

结果

1 方法学确证

1.1 方法专属性 本研究考察了恒河猴不同个体空白全血样品、空白全血样品加 IMM-H007、M1、MP 和内标 (IS)、猴生物全血样品的色谱图, 评估全血样品中生物基质对于 IMM-H007、M1 及 MP 测定是否存在干扰。空白全血、空白全血加 IMM-H007、M1、MP 和内标后样品、恒河猴全血样品色谱图见图 2。结果表明, IMM-H007、M1、MP 及内标峰形良好, 定量下限信号噪音比大于 20, 全血中未见明显杂质干扰, IMM-H007、M1、MP 的保留时间分别为 3.72、3.35、3.10、3.28 min。

1.2 标准校正曲线 恒河猴全血中 IMM-H007、M1 及 MP 与内标的比值与药物浓度线性关系良好, 线性范围分别为 $2\sim 500 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $5\sim 1\,000 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 与 $10\sim 5\,000 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 各化合物拟合校正曲线相关系数 (r^2) 均大于 0.99, 可满足恒河猴样品测定灵敏度要求。结果见表 1。

Table 1 Regression equation of IMM-H007, M1 and MP

Analyte	Regression equation	R^2
IMM-H007	$y = 0.016\,9x + 0.002\,43$	0.995 8
M1	$y = 0.006\,35x + 0.003\,3$	0.997 8
MP	$y = 0.001\,45x + 0.001\,06$	0.998 2

1.3 准确度和精密度 本研究考察了低、中、高 3 个浓度的恒河猴全血质控样品测定的批内和批间精密度和准确度。同浓度质控样品同批内连续进样 5 次考察批内精密度, 分析测定 3 个不同批次的质控样品考察批间精密度。结果表明, 恒河猴高、中、低浓度全血质控样品中 IMM-H007、M1 及 MP 测定的批内、批间精密度 RSD 在 1.25%~10.07% 之间, 准确度 RE 在 -2.18%~14.25% 内, 提示该方法准确、可靠、重现性好。

1.4 回收率和基质效应 将 IMM-H007、M1、MP 高、中、低 3 个浓度质控样品中的色谱峰面积与空白全血样品处理后的上清液配制的同浓度样品 (基质样品) 的色谱峰面积进行比较, 计算回收率; 以空白

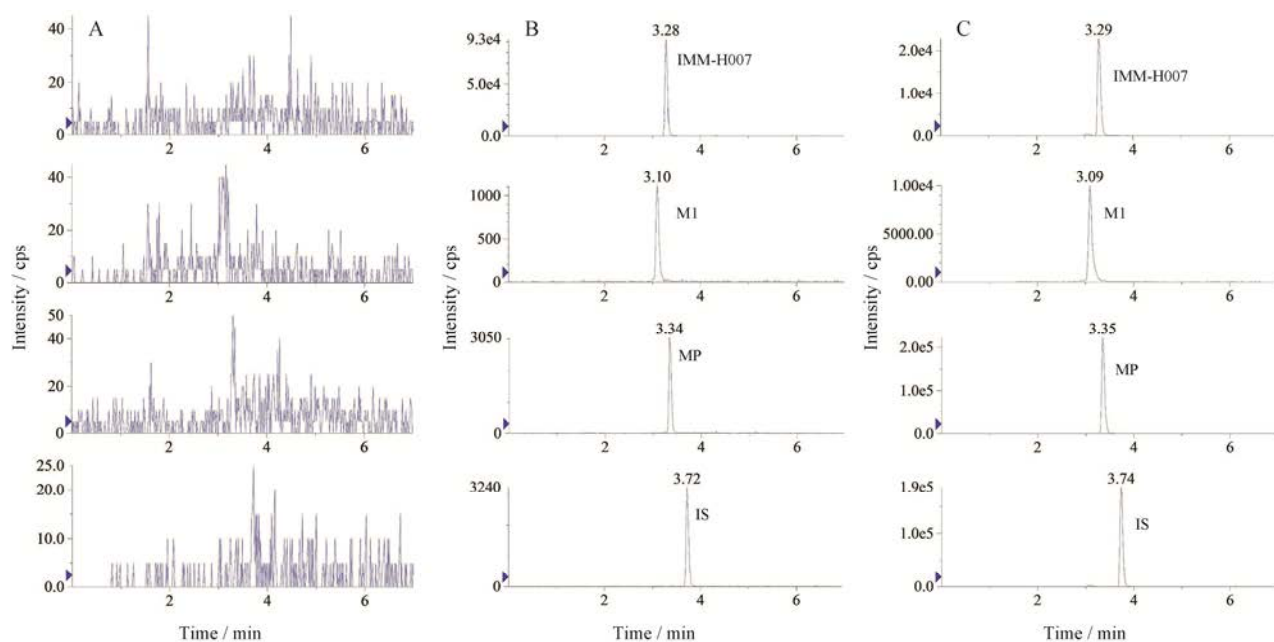


Figure 2 Mass chromatograms of IMM-H007, M1, MP and IS. A: Blank Rhesus monkey blood; B: Blank Rhesus monkey blood spiked with IMM-H007 ($2 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$), M1 ($5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$), MP ($10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) and internal standard (WS070119, $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$); C: Rhesus monkey blood sample from pharmacokinetics study at 5 min after a single oral administration of IMM-H007 ($210 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)

全血样品处理后的上清液配制的样品色谱峰面积与流动相配制的同浓度样品(标准样品)色谱峰面积进行比较,计算基质效应。结果表明,恒河猴全血中 IMM-H007、M1 及 MP 高、中、低浓度样品的基质因子(基质样品色谱峰面积/标准样品色谱峰面积)在 0.99~1.05 之间,回收率为 97%~102%。

1.5 稳定性 取全血高、中、低 3 个浓度质控样品,每个浓度 5 个平行样品,分别在冰上放置 2 h、反复冻融 3 次、室温放置 24 h、处理后样品进样仓放置 48 h、短期放置($-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 7 天)或长期放置($-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 30 天、90 天)后,测定 IMM-H007、M1 及 MP 浓度,考察其在样品处理过程中的稳定性。结果表明,高、中、低浓度全血质控样品经上述方法处理后稳定性良好,实测数值与预计值偏差均在 $\pm 15\%$ 以内,表明 IMM-H007、M1 和 MP 在上述样品处理

及放置过程中均稳定。

2 恒河猴口服不同剂量 IMM-H007 后全血药代动力学研究

恒河猴口服不同剂量 IMM-H007 (70 、 210 、 $630 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 后各时间点全血药物浓度-时间曲线见图 3,相关药代动力学参数见表 2、3。结果表明,恒河猴口服 IMM-H007 后原形药迅速代谢,血药浓度低于检测限,全血中主要以活性代谢产物 M1 和 MP 的形式存在。雌性恒河猴口服低、中、高不同剂量 IMM-H007 后,代谢产物 M1 血药浓度-时间曲线下面积 AUC_{0-t} 分别为 286.22 ± 54.9 、 905.27 ± 274.73 、 $476.59 \pm 205.6 \text{ h} \cdot \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,达峰浓度 C_{max} 分别为 49.53 ± 15.54 、 183.75 ± 61.04 、 $71.65 \pm 32.94 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$;代谢产物 MP 的血药浓度-时间曲线下面积 AUC_{0-t} 分别为 792.89 ± 225.44 、 3723.06 ± 1748.5 、 13172.77 ± 5817.41

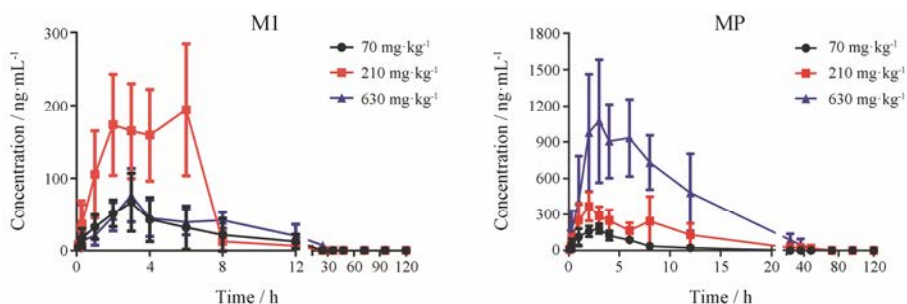


Figure 3 Blood concentration-time curves of M1 and MP in rhesus monkeys after a single oral administration of IMM-H007 at 70 , 210 and $630 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$

Table 2 Mean parameters of M1 in female and male Rhesus monkeys after oral administration of IMM-H007 (70, 210 and 630 mg·kg⁻¹)

Parameter	Female			Male		
	70 mg·kg ⁻¹	210 mg·kg ⁻¹	630 mg·kg ⁻¹	70 mg·kg ⁻¹	210 mg·kg ⁻¹	630 mg·kg ⁻¹
<i>t</i> _{1/2} /h	4.17 ± 1.42	1.37 ± 0.37	5.00 ± 1.98	3.61 ± 1.54	4.36 ± 6.66	3.67 ± 1.17
<i>t</i> _{max} /h	2.25 ± 0.50	3.50 ± 1.91	4.00 ± 2.71	2.75 ± 0.50	4.25 ± 2.06	3.00 ± 0.00
<i>C</i> _{max} /ng·mL ⁻¹	49.53 ± 15.54	183.75 ± 61.04	71.65 ± 32.94	93.0 ± 45.67	262 ± 86.81	86.3 ± 41.74
AUC _{0-t} /h·ng·mL ⁻¹	286.22 ± 54.9	905.27 ± 274.73	476.59 ± 205.6	445.64 ± 348.14	1 234.98 ± 553.21	564.72 ± 273.05
AUC _{0-∞} /h·ng·mL ⁻¹	343.83 ± 76.79	928.6 ± 275.53	574.97 ± 240.7	529.33 ± 442.44	1 878.12 ± 1 013.44	620.32 ± 290.63
MRT _{0-t} /h	4.73 ± 0.35	4.11 ± 0.28	5.86 ± 0.78	4.38 ± 0.78	3.85 ± 0.40	6.62 ± 1.85
MRT _{0-∞} /h	7.18 ± 2.13	4.24 ± 0.35	8.38 ± 2.26	5.99 ± 1.59	8.68 ± 9.39	7.82 ± 1.94

Table 3 Mean parameters of MP in female and male Rhesus monkeys after oral administration of IMM-H007 (70, 210 and 630 mg·kg⁻¹)

Parameter	Female			Male		
	70 mg·kg ⁻¹	210 mg·kg ⁻¹	630 mg·kg ⁻¹	70 mg·kg ⁻¹	210 mg·kg ⁻¹	630 mg·kg ⁻¹
<i>t</i> _{1/2} /h	2.36 ± 1.59	6.06 ± 2.60	7.11 ± 1.39	2.50 ± 0.84	6.48 ± 2.37	6.59 ± 0.94
<i>t</i> _{max} /h	2.75 ± 0.50	2.25 ± 1.26	4.00 ± 2.31	2.50 ± 1.00	3.25 ± 3.20	5.75 ± 4.50
<i>C</i> _{max} /ng·mL ⁻¹	164.1 ± 50.05	378 ± 124.49	1 187.25 ± 597.53	222.25 ± 35.85	504.75 ± 159.04	1278.75 ± 514.46
AUC _{0-t} /h·ng·mL ⁻¹	792.89 ± 225.44	3 723.06 ± 1 748.5	13 172.77 ± 5 817.41	1 081.38 ± 399.34	3 656.89 ± 1 822.78	13 632.99 ± 4 641.49
AUC _{0-∞} /h·ng·mL ⁻¹	881.98 ± 261.32	3 850.55 ± 1 805.15	13 379.07 ± 5 967.29	1 162 ± 498.67	3 833.01 ± 1 966.77	13 764.55 ± 4 675.72
MRT _{0-t} /h	3.87 ± 0.45	8.42 ± 2.64	10.27 ± 1.46	4.19 ± 0.52	7.75 ± 1.86	9.24 ± 1.06
MRT _{0-∞} /h	4.92 ± 1.62	9.41 ± 3.11	10.91 ± 1.72	4.88 ± 0.95	9.09 ± 2.70	9.68 ± 0.90

h·ng·mL⁻¹, 达峰浓度 *C*_{max} 分别为 164.1 ± 50.05、378 ± 124.49、1 187.25 ± 597.53 ng·mL⁻¹。雄性恒河猴口服低、中、高不同剂量 IMM-H007 后, 代谢产物 M1 血药浓度-时间曲线下面积 AUC_{0-t} 分别为 445.64 ± 348.14、1 234.98 ± 553.21、564.72 ± 273.05 h·ng·mL⁻¹, 达峰浓度 *C*_{max} 分别为 93 ± 45.67、262 ± 86.81、86.3 ± 41.74 ng·mL⁻¹; 代谢产物 MP 的血药浓度-时间曲线下面积 AUC_{0-t} 分别为 1 081.38 ± 399.34、3 656.89 ± 1 822.78、13 632.99 ± 4 641.49 h·ng·mL⁻¹, 达峰浓度 *C*_{max} 分别为 222.25 ± 35.85、504.75 ± 159.04、1 278.75 ± 514.46 ng·mL⁻¹。不同剂量组雌雄动物的药代动力学参数经统计学检验, 未见明显性别差异。MP 的体内暴露量明显高于 M1, *C*_{max} 和 AUC 与给药剂量呈现一定的比例关系, 基本符合线性动力学特征。

讨论

本研究建立了恒河猴全血样品中同时检测 IMM-H007 及其代谢产物 M1 和 MP 的 HPLC-MS/MS 测定方法。前期研究表明, IMM-H007 的酯键可迅速被全血中的酯酶水解, 生成活性代谢产物 M1 和 MP, 因此在采血管中加入 200 mmol·L⁻¹ NaF^[10] 以抑制样品中 IMM-H007 的生物转化从而保证浓度测定的准确性。此外, 由于血中生物基质影响, IMM-H007 及

所测代谢产物用原有金黄地鼠 HPLC-MS/MS 测定方法分析极易产生残留且峰形较差, 因此本文建立了新的恒河猴生物样品 HPLC-MS/MS 测定方法。经过实验条件优化与反复尝试, 最终选用 Capcell PAK ADME 柱改善 M1 及 MP 峰形; 用新洗液 (含 0.5% 甲酸甲醇) 代替原洗液 (甲醇-水, 3:2) 可降低 MP 残留, 结合反复梯度洗脱^[11] 及高比例有机相长时间冲洗的方法可有效解决 MP 高残留问题^[12,13]。虽然延长了分析时间, 但是在保证灵敏度的前提下, 各待测物残留量均小于最低定量限峰面积的 10%, 满足新药测定方法学要求。

研究发现, IMM-H007 在恒河猴体内药代动力学存在较大个体差异, 无明显性别差异。恒河猴口服 IMM-H007 后体内原形药浓度较低, 体内主要为活性代谢产物 M1 与 MP, 其中 MP 暴露量明显高于 M1。前期药效研究表明 MP 具有良好药效作用, 提示 MP 可能是 IMM-H007 体内发挥药效作用的主要活性形式。MP 在恒河猴体内的达峰浓度和暴露量与给药剂量呈现一定的比例关系, 但中剂量组到高剂量组 *C*_{max} 和 AUC 的增幅高于低剂量组到中剂量组的增幅。经分析, 出现该结果可能主要有两方面原因: 一是随给药量增加, 加大了药物在吸收部位的浓度差, 促进了被动扩散, 从而增加了体内暴露量。二是前期

实验证明, IMM-H007、M1 与 MP 均为 P-糖蛋白 (P-gp) 底物, 高剂量给药可能造成药物外排转运的饱和, 从而减少药物外排的比例, 提高体内血药浓度和暴露量。此外, 另一代谢物 M1 呈现随剂量增加体内暴露量先升高再降低的过程, 低剂量与高剂量体内药物浓度水平相当, 中剂量体内药物浓度最高, 提示 M1 向 MP 的转化可能不存在特定比例, 高剂量给药可能影响血液中酶活性与含量水平, 导致 M1 转化为 MP 的比例升高, 进一步机制还有待研究。

前期药理研究表明, 恒河猴与金黄地鼠的有效剂量范围存在一定差异。恒河猴给药 $70 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 方可发挥药效, 远远高于依据金黄地鼠药效起始剂量和体表面积折算得到的恒河猴药效起始剂量 ($17.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。本研究表明, 与啮齿类动物金黄地鼠相比^[7], IMM-H007 及其代谢产物在恒河猴体内血药浓度和暴露量均较低: 恒河猴口服低剂量 ($70 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) IMM-H007 后 MP 体内暴露量低于金黄地鼠口服低剂量 ($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) IMM-H007 后 MP 暴露量, 而恒河猴口服高剂量 ($630 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) IMM-H007 与金黄地鼠口服中剂量 ($450 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) IMM-H007 后 MP 暴露量相当, 提示除去不同种属动物病理模型的差异外, IMM-H007 及其代谢产物体内暴露量与药效也可能存在一定相关性, 相关机制有待进一步研究。

References

- [1] Larsen MK, Nissen PH, Kristensen IB, et al. Sudden cardiac death in young adults: environmental risk factors and genetic aspects of premature atherosclerosis [J]. *J Forensic Sci*, 2012, 57: 658–662.
- [2] Wang Z, Wang X, Qu K, et al. Binding of cordycepin monophosphate to AMP-activated protein kinase and its effect on AMP-activated protein kinase activation [J]. *Chem Biol Drug Des*, 2010, 76: 340–364.
- [3] Ma A, Wang J, Yang L, et al. AMPK activation enhances the anti-atherogenic effects of high density lipoproteins in apoE^{-/-} mice [J]. *J Lipid Res*, 2017, 58: 1536–1547.
- [4] Huang ZL, Liu R, Bai XY. Protective effects of the novel adenosine derivative WS0701 in a mouse model of posttraumatic stress disorder [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2014, 35: 24–32.
- [5] Lian Z, Li Y, Gao J, et al. A novel AMPK activator, WS070117, improves lipid metabolism discords in hamsters and HepG2 cells [J]. *Lipids Health Dis*, 2011, 10: 67.
- [6] Guo P, Lian ZQ, Sheng LH, et al. The adenosine derivative 2',3',5'-tri-*O*-acetyl-*N*⁶-(3-hydroxylaniline) adenosine activates AMPK and regulates lipid metabolism *in vitro* and *in vivo* [J]. *Life Sci*, 2012, 90: 1–7.
- [7] Jia Y, Wang B, Wu X, et al. Simultaneous quantification of 2',3',5'-tri-*O*-acetyl-*N*⁶-(3-hydroxylaniline) adenosine and its principal metabolites in hamster blood by LC-MS/MS and its application in pharmacokinetics study [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2016, 1022: 46–53.
- [8] Wen XZ, Hong NW, Bo L, et al. The synthesis of the metabolites of 2',3',5'-tri-*O*-acetyl-*N*⁶-(3-hydroxyphenyl) adenosine (WS070117) [J]. *Molecules*, 2016. DOI: 10.3390/molecules21010008.
- [9] Zhang WX, Li B, Wu HN, et al. Synthesis of impurities of the novel cholesterol-lowering drug candidate WS070117 [J]. *Chin J New Drug (中国新药杂志)*, 2015, 24: 1166–1170.
- [10] Liu Y, He J, Abliz Z, et al. *In vitro* stability and metabolism of O²', O³', O⁵'-tri-acetyl-*N*⁶-(3-hydroxylaniline) adenosine in rat, dog and human plasma: chemical hydrolysis and role of plasma esterases [J]. *Xenobiotica*, 2011, 41: 549–560.
- [11] Li RS, Li QS, Huang YR, et al. Determination of batifeiban in macaque plasma by LC-MS/MS and its pharmacokinetic study [J]. *Chin J New Drug (中国新药杂志)*, 2012, 21: 1798–1802.
- [12] Wu JF, Chen LX, Luo GA, et al. Recent advances in the application of capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2006, 41: 385–389.
- [13] Song JK, Zhang W, Zhang WK, et al. Pharmacokinetics of salvianolic acid A after single intravenous administration in Rhesus monkey [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2015, 50: 1142–1147.