

左旋苯环壬酯在小鼠体内的组织分布研究

李敬来, 王晓英, 乔建忠, 张振清

[摘要] 目的 研究左旋苯环壬酯在小鼠体内主要脏器组织分布特征, 分析是否存在药物浓度高、蓄积时间长的组织和器官, 并着重考察其在药效靶器官中的分布。方法 采用液相色谱串联质谱法测定组织中左旋苯环壬酯的药物浓度, 分析药物在组织中的分布特征。结果 小鼠口服盐酸左旋苯环壬酯后, 肝、脾、肺、心在给药后 5 min 浓度即达到峰值, 其中肝浓度最高, 为 531.50 ng/g 其他组织在给药后 30 min 浓度达峰, 2 h 后各组织的药物均降至较低水平。结论 盐酸左旋苯环壬酯在小鼠体内的吸收、分布均较快, 药物入血后很快分布到体内各个组织中, 药物在组织中的消除也较快, 没有组织蓄积现象。

[关键词] 左旋苯环壬酯; 组织分布; 液相色谱串联质谱法

[中图分类号] R969.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1008-9926(2011)01-027-03

[DOI] 10.3969/j.issn.1008-9926.2011.01.08

Studies on Tissue Distribution of L-phencynonate Hydrochloride in Mice

LI Jing-lai, WANG Xiao-ying, QIAO Jian-zhong, ZHANG Zhen-qing

National Key Lab of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, the Academy of Military Medical Sciences
Beijing 100850, China

[Abstract] **Objective** To study *in vivo* distribution behavior of L-phencynonate hydrochloride in mice. **Methods** The liquid chromatography/tandem mass spectrometry method was established to determine the concentration of L-phencynonate in tissues of mice. **Results** Following oral administration to mice, the concentration of L-phencynonate in the liver, spleen, lung and heart reached the peak in 5 minutes and in 30 minutes in the other tissues respectively. Drug concentration of L-phencynonate in the tissues decreased to a very low level in 120 minutes. **Conclusion** L-phencynonate can be quickly absorbed, distributed and eliminated after po administration to mice and no concentration cumulation is observed in the tissues.

[Key words] L-phencynonate; distribution; liquid chromatography/tandem mass spectrometry

盐酸苯环壬酯 [phencynonate hydrochloride, α -环戊基- α -苯基-羟乙酸-9- α -[3-甲基-3-氮杂双环(3,3,1)壬]酯]消旋体是军事医学科学院毒物药物研究所研制的化学药物注册分类 1 类新药, 对椎动脉供血不足引起的眩晕、位置性眩晕及美尼尔氏病具有很好的治疗作用, 中枢不良反应小, 其疗效确定而不良反应低于临床常用药物东莨菪碱。苯环壬酯分子结构中含有 1 个手性碳, 2 种光学异构体。左旋苯环壬酯 (L-phencynonate) 为活性异构体, 在可逆性胆碱酯酶抑制剂引起的兔逆向转圈综合征和猫运动病样综合征两种动物运动病模型, 显示比消旋体有更好的抗晕效果, 具有良好的临床应用开发前

景^[1-4]。盐酸左旋苯环壬酯剂量小, 血药浓度低^[5], 用常规方法难以达到检测灵敏度的要求。因此, 我们采用了高灵敏度的液相色谱串联质谱法选择反应监测 (liquid chromatography/tandem mass spectrometry/selected reaction monitoring LC/MS/MS/SRM) 的分析方法进行了盐酸左旋苯环壬酯的组织分布学研究, 所得结果可为盐酸左旋苯环壬酯临床上安全合理用药提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 TSQ Quantum 型液相色谱-质谱联用仪 (LC/MS/MS 美国 Thermo 公司); 色谱柱: C₈ 柱 (2.0 mm × 100 mm, 5 μ m, 日本资生堂公司); 台式高速离心机 (美国 Thermo 公司); 盐酸左旋苯环壬酯 (分子式 C₂₂H₃₁NO₃ · HCl 相对分子质量 393.95 固体粉末, 纯度: 99.8%, 批号: 050503), [²H₃] 盐酸苯环壬酯 (内标, 粉末, 纯度 > 99%, 批号: 891009 均由军事医学科学院毒物药物研究所药

基金项目: 国家重大新药创制综合性大平台, No. 2009ZX09301-002

国家重大新药创制单元平台, No. 2009ZX09304-004

作者简介: 李敬来, 博士。研究方向: 药物代谢与药物动力学。Tel: (010) 66930633; E-mail: ljilail08@eyou.com

作者单位: 100850 北京, 军事医学科学院毒物药物研究所

通讯作者: 张振清, Tel: (010) 66930632 E-mail: zqzhang55@yahoo.com

物合成室提供); 甲醇、乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

1.2 动物 KM小鼠, ♂, 体质量 18~22 g〔军事医学科学院动物中心提供, 动物合格证号: SCXK-(军)2002-001〕, 饲养条件: 军事医学科学院动物中心一级动物房。

1.3 小鼠组织分布实验方法 根据大鼠 2 mg/kg 剂量给药的药-时曲线变化趋势, 选取 4 个采样时间点, 代表了吸收相、平衡相和消除相的药物组织分布情况, 每个时间点采用 5 只小鼠。小鼠给药前禁食 12 h, 自由饮水, 按 2 mg/kg 剂量灌胃给药, 分别于给药后 2.5、30、120 min 摘眼球, 立即拉颈处死, 取脑、心、肝、肺、脾、肾、肌肉、空肠、脂肪及睾丸, 脏器用水冲洗干净血液, 并用滤纸吸去水份, 称取各器官约 0.1~0.2 g 于匀浆器中加蒸馏水制成 10% 匀浆。分别取 0.1 ml 匀浆, 加入 0.1 ml [²H₃] 盐酸苯环壬酯 (内标, 20 ng/ml), 摇匀后加入 0.4 ml 乙腈, 充分振荡后, 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清 20 μl 进样于 LC/MS/MS 分析测定。

1.4 色谱与质谱条件 色谱柱: C₈ 柱 (2.0 mm × 100 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水-甲酸 (60:40:0.1); 流速: 0.2 ml/min; 进样量: 20 μl; 柱温: 室温。

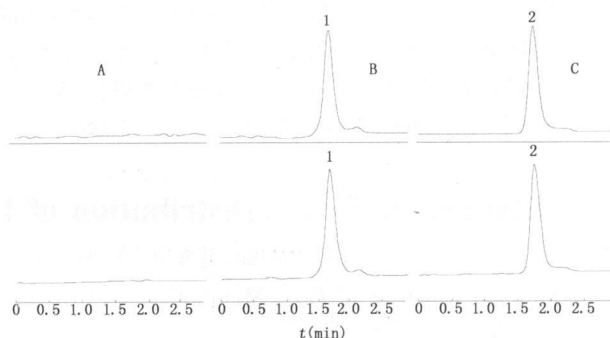
LC 接口采用气动辅助电喷雾离子化电离源 (ESI), 喷雾电压 4.8 kV; 加热毛细管温度 300°C; 鞘气 (N₂) 流速 10 psi; 辅助气 (N₂) 流速 1 psi; 碰撞气 (Ar) 压力 1.5 (mTorr); 源内碰撞诱导解离 (Source CD) 能量为 10 V, 左旋苯环壬酯和内标的碰撞能量均为 43 eV, 正离子方式检测; 质谱扫描方式为选择反应监测 (SRM), 分别测定目标化合物和内标的正离子 *m/z* 358.2⁺ 156.1 和 *m/z* 361.2⁺ 159.1; 扫描时间为 0.5 s。

2 结果

2.1 方法学评价^[6] 药物及内标不受组织匀浆中杂质的干扰, 方法专属性好。以肝脏匀浆液中的专属图谱为例, 空白组织匀浆、空白组织匀浆外加药物和选择反应离子检测色谱图见图 1。为了提高工作效率, 减少标准曲线的数量, 并保证数据定量的准确性, 首先考察了不同组织匀浆对定量测定的影响, 配制 1、10 ng/ml 的不同组织匀浆样品, 用乙腈沉淀后进样测定, 结果表明, 不同组织匀浆提取回收率未见显著性差异, 不同组织对检测结果没有显著影响, 见表 1, 因此组织浓度的定量均采用血样做标准曲线, 回归方程为:

$$Y = -0.0327071 + 0.125283X, r^2 = 0.9915$$

左旋苯环壬酯在 0.1~100 ng/ml 范围内呈良好线性关系, 最低定量限为 0.1 ng/ml; 低、中、高 3 个浓度 (0.3、1、10 ng/ml) 的批内、批间 RSD 均小于 12%, 准确度在 86%~112%; 低、中、高 3 个浓度 (0.3、1、10 ng/ml) 的提取回收率均在 82% 以上, 基质效应均小于 17%。



A: 空白肝脏组织匀浆;
B: 含有左旋苯环壬酯和内标的肝脏匀浆;
C: 灌胃给左旋苯环壬酯 5 min 后的肝脏匀浆和内标;
1: 左旋苯环壬酯; 2: 内标

图 1 左旋苯环壬酯在肝脏组织匀浆中的 LC/MS/MS 色谱图

表 1 不同组织匀浆的加样回收率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组织	加入浓度 (ng/ml)	测定浓度 (ng/ml)	回收率 (%)	RSD (%)
血	1	1.12 ± 0.13	112.00 ± 13.00	11.61
	10	9.32 ± 0.99	93.23 ± 9.85	10.57
心	1	1.27 ± 0.15	127.00 ± 14.73	11.60
	10	8.75 ± 0.97	87.50 ± 9.76	11.15
肝	1	1.10 ± 0.18	110.00 ± 18.03	16.39
	10	10.54 ± 1.56	105.40 ± 15.62	14.82
脾	1	1.14 ± 0.08	113.67 ± 7.64	6.72
	10	10.37 ± 1.51	103.73 ± 15.08	14.54
肺	1	1.08 ± 0.17	107.67 ± 16.80	15.61
	10	9.19 ± 2.13	91.97 ± 21.26	23.12
肾	1	1.21 ± 0.16	120.67 ± 15.82	13.11
	10	8.96 ± 0.58	89.53 ± 5.80	6.48
睾丸	1	1.11 ± 0.17	111.67 ± 17.24	15.44
	10	9.67 ± 1.38	96.73 ± 13.77	14.24
脑	1	1.10 ± 0.24	109.67 ± 23.50	21.43
	10	11.49 ± 1.16	114.87 ± 11.60	10.10
肌肉	1	1.07 ± 0.09	106.67 ± 8.50	7.97
	10	10.93 ± 1.67	109.27 ± 16.67	15.26
脂肪	1	1.11 ± 0.16	110.67 ± 15.89	14.35
	10	9.89 ± 1.71	98.87 ± 17.10	17.30
小肠	1	1.16 ± 0.25	116.33 ± 24.66	21.20
	10	8.64 ± 0.62	86.37 ± 6.16	7.13

2.2 左旋苯环壬酯在小鼠体内的组织分布 小鼠口服盐酸左旋苯环壬酯 2 mg/kg 后的组织分布浓度见表 2 图 2、3。结果显示, 除小肠由于灌胃给药原因, 其浓度在给药后 2 min 已较高外, 肝、脾、肺、心在给药后 5 min 浓度即达到峰值, 其中肝浓度最高, 为 531.50 ng/g。其他各个组织均在给药后 30 min 浓度达峰, 浓度从高至低依次为肌肉、睾丸、肾、脂肪和脑。另外, 从结果还可以看出, 给药后 120 min 除小肠浓度较高 (25.23 ng/g) 外, 其他各组织的药物水平均降至 6.11 ng/g 以下。以上结果表明, 盐酸左旋苯环壬酯在小鼠体内的吸收分布较快, 药物入血后很快分布到体内各个组织中, 尤其在血流较为丰富的组织中形成较高的浓度, 药物在组织中的消除也较快, 没有组织蓄积作用。

表 2 小鼠口服盐酸左旋苯环壬酯后各组织药物浓度 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组织	浓度 (ng/g)			
	2	5	30	120 (min)
心	16.33 ± 1.47	34.83 ± 7.42	9.97 ± 5.62	2.08 ± 1.54
肝	129.38 ± 23.14	531.50 ± 161.01	32.40 ± 10.18	4.78 ± 5.02
脾	71.83 ± 98.85	83.43 ± 21.28	9.18 ± 0.94	1.62 ± 1.10
肺	47.14 ± 14.41	62.45 ± 15.71	15.37 ± 0.93	3.41 ± 0.95
肾	9.80 ± 1.24	21.12 ± 1.74	42.38 ± 16.01	2.19 ± 0.93
睾丸	10.77 ± 2.59	11.77 ± 2.61	55.21 ± 17.88	2.06 ± 0.32
脑	11.79 ± 1.28	14.46 ± 3.57	19.64 ± 6.95	1.39 ± 0.35
肌肉	9.21 ± 3.99	9.39 ± 1.91	104.72 ± 56.02	1.94 ± 0.22
脂肪	6.53 ± 1.75	7.10 ± 0.70	26.88 ± 9.22	6.11 ± 4.55
小肠	10326.80 ± 2059.12	244.82 ± 27.09	397.83 ± 48.71	25.23 ± 5.54

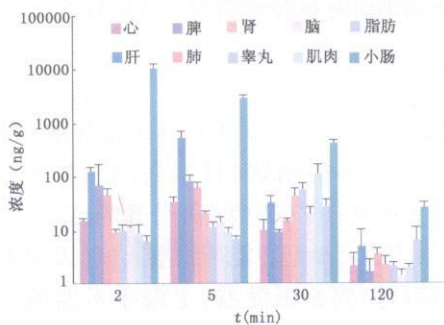


图 2 小鼠口服盐酸左旋苯环壬酯后不同时间的组织浓度 (ng/g)

3 讨论

左旋苯环壬酯为全新结构的抗胆碱药物, 消旋体被批准为 1 类新药上市, 用来治疗晕动病, 目前大

量研究发现左旋体为其活性优映体, 开发活性单体能显著提高药效, 降低药物的毒副作用。左旋苯环壬酯的组织分布研究在国内外文献尚未见报道, 因口服给药剂量低, 对检测灵敏度要求高, 需要使用 LC-MS/MS 进行测定, 该方法检测专属性好, 各组织测定时均不受杂质的干扰。各组织测定浓度前, 考察了药物在各组织中的回收率, 发现药物在组织中的回收率均较高, 并且未见明显差异, 所以在测定组织浓度时, 采用血浆标准曲线进行定量, 简化了测定过程并且能保证测定的准确度。

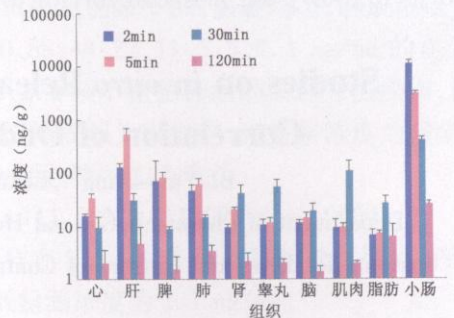


图 3 小鼠口服盐酸左旋苯环壬酯后不同组织浓度比较 (ng/g)

小鼠口服盐酸左旋苯环壬酯后 2 min 靶组织脑中药物浓度已达到较高水平, 作为治疗晕动病的新药, 对于晕车和晕船的人, 盐酸左旋苯环壬酯能够迅速起效, 达到较好的防治效果。给药后 120 min 各组织的药物水平均降至较低水平, 说明该药没有组织蓄积作用, 药物的安全性较好。

[参考文献]

- [1] 王 赞, 王丽韞, 郑健全, 等. 盐酸苯环壬酯及其衍生物药理学作用研究 [J]. 中国药科大学学报, 2006, 37(1): 59-62
- [2] 李 更, 王丽韞, 郑健全, 等. 盐酸苯环壬酯左旋体及光学异构体抗动物晕动病药效学研究 [J]. 中华航空航天医学杂志, 2006, 17(2): 87-91
- [3] Wang LY, Wang Y, Zhang JQ, et al. Pharmacological profiles of anticholinergic agents phenacylonate hydrochloride and its optical isomers [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2005, 26(5): 527-532
- [4] Wang YA, Zhou WX, Liu YQ, et al. Antagonism of phenacylonate and other anticholinergics against different convulsants [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol*, 2003, 17(2): 111-116
- [5] 袁淑兰, 乔建忠, 阮金秀, 等. 盐酸苯环壬酯人体药代动力学及生物利用度研究 [J]. 中国临床药理学杂志, 1995, 11(2): 98-102
- [6] 王晓青, 李敬来, 高永良. 左旋盐酸苯环壬酯鼻腔喷雾剂的体内评价 [J]. 中国药学杂志, 2009, 44(9): 700-702

(收稿日期: 2010-06-27; 修回日期: 2010-07-18)

(本文编辑 狄亚敏)