

# 芳维甲酸乙酯在Beagle犬体内的药动学研究

杨辉<sup>1\*</sup>, 周远大<sup>1</sup>, 何海霞<sup>1</sup>, 孙纪红<sup>2#</sup> (1. 重庆医科大学附属第一医院药学部, 重庆 400016; 2. 重庆市中医院麻醉科, 重庆 400011)

中图分类号 R961; R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)25-3522-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.25.18

**摘要** 目的: 研究芳维甲酸乙酯(RO)在Beagle犬体内的药动学特征。方法: 18只Beagle犬随机分为高、中、低剂量组(40、20、10 mg/kg), 每组6只, ig相应剂量的RO。给药后0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、6.0、8.0、12.0、24.0、36.0、48.0、60.0、72.0 h时于小隐静脉采血1 mL, 分离血浆, 采用反相高效液相色谱法同时测定血浆中RO及其代谢产物芳维甲酸乙酸(RA)的浓度; 采用DAS 2.0软件进行拟合, 计算药动学参数。结果: RO和RA在犬体内均呈一室模型分布。RO高、中、低剂量组犬体内的 $c_{max}$ 分别为(1.42±0.87)、(0.54±0.09)、(0.31±0.05) μg/mL,  $t_{1/2z}$ 分别为(1.20±0.33)、(1.14±0.45)、(1.90±0.65) h,  $AUC_{0-72h}$ 分别为(3.55±0.90)、(0.87±0.50)、(0.92±0.31) μg·h/mL,  $CL/F$ 分别为(11.99±4.01)、(19.87±10.79)、(12.29±7.57) L/(kg·h); RA高、中、低剂量组犬体内的 $c_{max}$ 分别为(32.51±4.04)、(19.87±2.78)、(16.55±4.06) μg/mL,  $t_{1/2z}$ 分别为(7.27±4.20)、(7.17±4.20)、(10.18±4.01) h,  $AUC_{0-72h}$ 分别为(408.14±96.61)、(333.39±61.28)、(286.55±30.96) μg·h/mL,  $CL/F$ 分别为(1.30±0.53)、(0.76±0.87)、(0.54±0.10) L/(kg·h)。结论: RO口服极易吸收, 且消除迅速, 其活性代谢产物RA在体内蓄积时间较长。  
**关键词** 芳维甲酸乙酯; 芳维甲酸乙酸; 药动学; Beagle犬; 反相高效液相色谱法

## Study on the Pharmacokinetics of Arotinoid Ethylester in Beagle Dogs

YANG Hui<sup>1</sup>, ZHOU Yuanda<sup>1</sup>, HE Haixia<sup>1</sup>, SUN Jihong<sup>2</sup> (1. Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 2. Dept. of Anesthesiology, Chongqing TCM Hospital, Chongqing 400011, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the pharmacokinetic characteristics of arotinoid ethyl ester (RO) in Beagle dogs *in vivo*. METHODS: 18 Beagle dogs were randomly divided into high-dose, medium-dose, low-dose groups (40, 20, 10 mg/kg), 6 in each group. Rats were intragastrically administrated related doses of RO. Blood sample 1 mL was taken after 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 12.0, 24.0, 36.0, 48.0, 60.0, 72.0 h of administration, and plasma was separated. RP-HPLC was used to determine the concentrations of RO and its metabolite arotinoid acetic acid (RA) in plasma. Using DAS 2.0 software for fitting, pharmacokinetic parameters were calculated. RESULTS: Both RO and RA showed a distribution in one-compartment model in dogs *in vivo*. The  $c_{max}$  of RO high-dose, medium-dose, low-dose groups in dogs *in vivo* were (0.42±0.87), (0.54±0.09), (0.31±0.05) μg/mL;  $t_{1/2z}$  were (1.20±0.33), (1.14±0.45), (1.90±0.65) h;  $AUC_{0-72h}$  were (3.55±0.90), (0.87±0.50), (0.92±0.31) μg·h/mL; and  $CL/F$  were (11.99±4.01), (19.87±10.79), (12.29±7.57) L/(kg·h). The  $c_{max}$  of RA high-dose, medium-dose, low-dose groups in dogs *in vivo* were (32.51±4.04), (19.87±2.78), (16.55±4.06) μg/mL;  $t_{1/2z}$  were (7.27±4.20), (7.17±4.20), (10.18±4.01) h;  $AUC_{0-72h}$  were (408.14±96.61), (333.39±61.28), (286.55±30.96) μg·h/mL; and  $CL/F$  were (1.30±0.53), (0.76±0.87), (0.54±0.10) L/(kg·h). CONCLUSIONS: Orally taking RO is easy to absorb with rapid elimination. Its active metabolite RA has longer accumulation time *in vivo*.

**KEYWORDS** Arotinoid ethylester; Arotinoid acetic acid; Pharmacokinetics; Beagle dog; RP-HPLC

维甲酸类药物是天然或合成的具有维生素A活性的视黄醇衍生物, 芳维甲酸乙酯(RO)是第三代维甲酸类药物的代表。RO是一种强效、长效诱导分化剂, 主要用于治疗严重的银屑病, 角化性皮肤病, 风湿性、免疫性疾病, 恶性肿瘤, 白血病等<sup>[1-5]</sup>。RO最早由罗氏公司在英国上市, 我国于1992年进口, 国内陆续有一些厂家仿制, 2010年后, 国内不再有厂家生产。作为第三代维甲酸类

药物唯一的口服制剂, RO对银屑病的治疗有特效且副作用最低。鉴于此, 笔者拟重新开发RO制剂。目前, 关于RO药动学的研究尚未见报道, 为阐明其体内过程, 笔者研究了RO在Beagle犬体内的药动学特征。

## 1 材料

### 1.1 仪器

P200 II型高效液相色谱仪, 包括UV200 II型检测器(大连依利特科学仪器有限公司); HP3295型积分仪(惠普上海分析仪器有限公司); UV-265型紫外检测器(日本岛津公司); TG1850-WS型高速台式离心机(上海医疗器械六厂)。

\* 主管药师, 博士。研究方向: 新药的研究开发、医院药学。电话: 023-89012224。E-mail: yanghui\_023@126.com

# 通信作者: 主管护师。研究方向: 临床药学。电话: 023-61802573。E-mail: 844406527@qq.com

## 1.2 药品与试剂

RO原料药(批号:13-6298,纯度99.4%)、芳维甲酸乙酸(RA)原料药(批号:980,纯度:99.6%)、维胺酯(VA,批号:980616,纯度:99.7%)均由重庆华邦制药有限公司提供;甲醇、磷酸二氢钾、氢氧化钠均为分析纯。

## 1.3 动物

健康合格一级Beagle犬18只,体质量(9.0±1.0)kg,6月龄,♀♂各半,由四川养麝研究所提供,质量合格证号和环境设施合格证号分别为川实动管63号、64号。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

采用反相高效液相色谱法。色谱柱:μBondapak C<sub>18</sub>(150 mm×4.6 mm, 10 μm),预柱:C<sub>18</sub>;流动相:甲醇-水-冰醋酸(90:9:1, V/V/V, pH 3.0);流速:1.0 mL/min;柱温:室温;检测波长:294 nm;进样量:20 μL。

### 2.2 溶液的制备

精密称取RO原料药结晶粉末,用甲醇制备成588 ng/mL的标准贮备液,低温保存。精密称取RA原料药,用甲醇制备成474 ng/mL的标准贮备液,低温保存。精密称取VA,用甲醇制备成640 ng/mL的溶液,即为VA内标液,低温保存。

### 2.3 血浆样品处理

取空白血浆1.0 mL,加入VA内标液10 μL、50%冰醋酸0.4 mL,混匀,加入三氯甲烷4 mL,振摇5 min,15 000 r/min(离心半径6 cm)离心3 min,取有机层,60℃水浴中氮气吹干,100 μL甲醇复溶,进样测定。

### 2.4 方法学考察

2.4.1 方法专属性 取空白血浆、空白血浆+VA内标液、空白血浆+VA内标液+RO标准贮备液+RA标准贮备液、血浆样品(给药后2 h)+VA内标液,预处理后按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱。结果表明,RO、RA、VA与内源性物质分离良好,RO、RA、VA的保留时间分别为17.78、9.41、12.56 min,色谱图见图1。

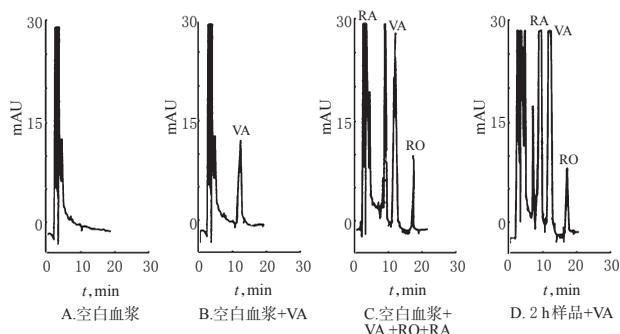


图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.4.2 线性回归与定量下限考察 在空白血浆中分别加入相应质量浓度的RO标准贮备液和RA标准贮备液,使RO质量浓度为6.25、12.5、25、50、100、200、400、800 ng/mL, RA质量浓度为0.041、0.12、0.37、1.11、3.33、

10.00、30.00 μg/mL的血浆样品各5份,按“2.3”项下方法处理后,进样分析,记录峰面积。以待测物质量浓度为横坐标(x)、待测物与内标的峰面积之比为纵坐标(y),进行线性回归,得回归方程分别为RO: $y=0.037\ 59x+9.660\ 0$ ( $r=0.998\ 6, n=5$ ), RA: $y=0.107\ 0x+1.005\ 2$ ( $r=0.999\ 7, n=5$ )。结果表明,RO和RA检测质量浓度的线性范围分别为6.25~800、0.041~30.00 μg/mL,定量下限分别为6.25、0.041 μg/mL。

2.4.3 精密性与准确度试验 分别制备RO低、中、高质量浓度(16.67、400、600 ng/mL)和RA低、中、高质量浓度(0.12、16.65、22.5 μg/mL)的血浆样品各5份,按“2.3”项下方法处理后,进样分析。各样品重复测定5次,连续测定5 d,考察日内、日间精密性;以实测质量浓度与理论质量浓度比较,考察准确度。结果显示,RO各质量浓度血浆样品的日内RSD为3.09%~9.18%( $n=5$ ),日间RSD为6.41%~11.47%( $n=5$ ),准确度为92.0%~115.0%( $n=5$ );RA各质量浓度血浆样品的日内RSD为2.92%~5.38%( $n=5$ ),日间RSD为5.93%~9.62%( $n=5$ ),准确度为97.40%~105.4%( $n=5$ )。

2.4.4 提取回收率试验 分别制备RO低、中、高质量浓度(16.67、400、600 ng/mL)和RA低、中、高质量浓度(0.12、16.65、22.5 μg/mL)的血浆样品各5份,按“2.3”项下方法处理后,进样分析,记录峰面积为 $A_1$ ;另将空白血浆1.0 mL加入至相应质量浓度的RO、RA的标准贮备液中,使最终质量浓度与前者相对应,按“2.3”项下方法处理后,进样分析,记录峰面积为 $A_2$ ;计算提取回收率( $A_1/A_2 \times 100\%$ )。结果显示,RO各质量浓度血浆样品的提取回收率分别为91.86%、97.78%、94.69%(RSD=2.00%,  $n=3$ );RA各质量浓度血浆样品的提取回收率分别为95.50%、95.70%、94.17%(RSD=0.63%,  $n=3$ )。

2.4.5 稳定性试验 分别制备RO低、中、高质量浓度(16.67、400、600 ng/mL)和RA低、中、高质量浓度(0.12、16.65、22.5 μg/mL)的血浆样品各5份,分别于4℃放置24 h、室温放置14 h、样品预处理后室温放置24 h、反复冻融3次、-20℃冷冻保存50 d,然后按相应要求进行处理,考察其稳定性。结果显示,RO和RA低、中、高质量浓度血浆样品在4℃放置24 h的RSD分别为2.99%、9.46%、6.72%和7.04%、7.16%、9.54%;室温放置14 h的RSD分别为8.98%、1.05%、5.96%和7.21%、5.31%、2.46%;样品预处理后室温放置24 h的RSD分别为9.07%、8.42%、6.15%和5.89%、6.80%、9.22%;反复冻融3次的RSD分别为7.41%、5.20%、4.06%和3.77%、3.67%、3.87%;-20℃冷冻保存50 d的RSD分别为4.82%、7.81%、9.73%和9.47%、8.37%、4.44%( $n=5$ )。

### 2.5 药动学实验

将18只Beagle犬随机分为高、中、低剂量组(40、20、10 mg/kg),每组6只,于实验前12 h禁食。实验时按各组犬体质量计算每只犬的具体RO给药量,然后将药物

用2号胶囊封装为2粒,ig给药,待8 h后再供食。给药后0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、6.0、8.0、12.0、24.0、36.0、48.0、60.0、72.0 h时于小隐静脉采血1 mL,分离血浆(肝素抗凝),依法测定血浆中RO及其代谢产物RA的浓度,绘制药-时曲线。各组犬体内RO、RA的药-时曲线见图2。

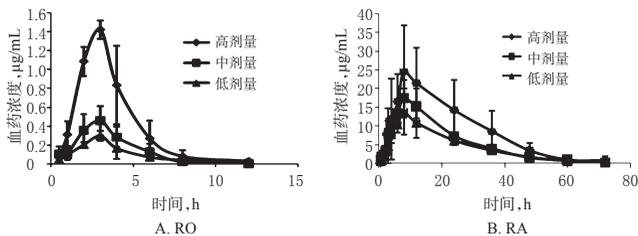


图2 各组犬体内RO、RA的药-时曲线

Fig 2 Concentration-time curves of RO and RA in dogs *in vivo* of each group

采用DAS 2.0软件进行房室模型拟合,选择最佳药动学模型,计算药动学参数。各组犬体内RO、RA的药动学房室模型拟合结果见表1。

表1 各组犬体内RO、RA的药动学房室模型拟合结果

Tab 1 Results of pharmacokinetic compartment model fitting of RO and RA *in vivo* in each group

房室模型	权重	RO						RA					
		高剂量组		中剂量组		低剂量组		高剂量组		中剂量组		低剂量组	
		AIC	R <sup>2</sup>	AIC	R <sup>2</sup>	AIC	R <sup>2</sup>	AIC	R <sup>2</sup>	AIC	R <sup>2</sup>	AIC	R <sup>2</sup>
一室模型	1	100.304	0.948	76.865	0.875	80.459	0.865	47.259	0.975	33.823	0.983	33.210	0.972
	1/C	49.892	1	42.746	0.999	41.209	0.999	22.573	0.996	20.734	0.994	14.588	0.993
	1/C <sup>2</sup>	10.964	1	9.562	1	2.329	1	18.900	0.997	4.303	0.998	10.100	0.995
二室模型	1	104.383	0.947	70.176	0.973	79.822	0.924	48.240	0.980	37.750	0.983	37.110	0.972
	1/C	53.913	1	50.026	0.998	46.528	0.999	26.572	0.996	25.447	0.994	18.588	0.993
	1/C <sup>2</sup>	11.702	1	14.306	1	3.477	1	22.900	0.997	8.333	0.998	14.097	0.995

由表1可知,当房室模型为一室模型,权重系数为1/C<sup>2</sup>时,RO和RA的AIC均最小,且R<sup>2</sup>越接近1,表明Beagle犬体内血浆中RO和RA的血药浓度随时间的变化符合一室模型,权重系数1/C<sup>2</sup>拟合较佳。以此计算药动学参数结果见表2。

表2 各组犬体内RO、RA的药动学参数结果( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Tab 2 Results of pharmacokinetic compartment model fitting of RO and RA *in vivo* in dogs of each group ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

参数	RO			RA		
	高剂量组	中剂量组	低剂量组	高剂量组	中剂量组	低剂量组
t <sub>1/2α</sub> , h	1.23±0.22	2.12±2.63	2.18±0.83	10.36±6.11	8.85±1.65	10.60±0.88
t <sub>1/2β</sub> , h	1.20±0.33	1.14±0.45	1.90±0.65	7.27±4.20	7.17±4.20	10.18±4.01
K <sub>12</sub> , h <sup>-1</sup>	0.58±0.11	0.45±0.33	0.37±0.15	0.08±0.03	0.08±0.02	0.07±0.01
t <sub>95</sub> , h	0.69±0.25	0.38±0.38	0.59±0.24	1.45±0.65	1.07±0.54	1.77±0.80
AUC <sub>0-∞</sub> , µg·h/mL	3.61±8.34	1.00±0.59	1.02±0.37	477.91±80.05	337.71±64.00	290.83±31.46
AUC <sub>0-72h</sub> , µg·h/mL	3.55±0.90	0.87±0.50	0.92±0.31	408.14±96.61	333.39±61.28	286.55±30.96
c <sub>max</sub> , µg/mL	1.42±0.87	0.54±0.09	0.31±0.05	32.51±4.04	19.87±2.78	16.55±4.06
t <sub>max</sub> , h	3.00±0.00	2.83±0.37	3.17±0.37	8.00±2.31	8.00±2.31	8.17±3.18
CL/F, L/(kg·h)	11.99±4.01	19.87±10.79	12.29±7.57	97.45±35.81	61.49±12.06	34.79±3.80
V1/F, L/(kg·h)	21.75±9.96	25.33±10.30	34.02±14.28	1.30±0.53	0.76±0.87	0.54±0.10

由表2可知, AUC<sub>0-72h</sub>、c<sub>max</sub>与RO的给药剂量均成正

相关,符合一级药动学特征;V1/F结果提示RO不仅分布在血液中,也分布在组织中;CL/F和t<sub>1/2z</sub>提示RO的消除迅速。

### 3 讨论

RO和RA都有的“反二苯乙烯”的共轭结构使其具有相似的紫外吸收光谱,RO的最大吸收波长为294 nm, RA的最大吸收波长为296 nm<sup>[6]</sup>。考虑到本实验条件下RO的检测灵敏度较RA低,因此选择294 nm作为检测波长。本研究建立了反相高效液相色谱法同时测定RO和RA浓度,结果表明,内源性物质不干扰药物的测定,相关方法学考察结果均满足生物样品检测的要求<sup>[7]</sup>。

Beagle犬分别ig给予RO 40、20、10 mg/kg剂量后,RO和RA的AUC<sub>0-∞</sub>分别为(3.61±8.34)、(1.00±0.59)、(1.02±0.37) µg·h/mL和(477.91±80.05)、(337.71±64.00)、(290.83±31.46) µg·h/mL,剂量之比均为4:2:1,对应的AUC<sub>0-∞</sub>之比分别为3:1:1和5:3:3,表明AUC<sub>0-∞</sub>与给药剂量呈非线性正相关性。本实验结果表明,RO口服极易吸收,大约于给药后0.5 h即在血中出现较高浓度,3 h左右达峰浓度,8 h左右血药浓度已降至较低浓度或难以测出,表明RO脂溶性较高、易于吸收,能迅速分布到外周围组织而不是高度集中在血液或循环丰富的组织器官,避免了对器官损害,符合临床要求。此外,RO进入体内后,部分药物即行分解为RA,RA于给药后0.5 h即出现在血中,约8 h时达峰浓度,持续至72 h尚可测到。由于RA也具备与RO相同的防治银屑病的作用,RA在体内蓄积时间较长,也为防治银屑病或增强机体免疫提供了有利条件。

### 参考文献

- [1] 王沪凯. 维甲酸药物对皮肤病的治疗探讨[J]. 中国药物经济学, 2012, doi: 10.3969/j.issn.1673-5846.
- [2] 高丽, 赵利涛. 阿维A联合窄谱中波紫外线治疗银屑病临床疗效观察[J]. 中国现代药物应用, 2015, 9(24): 161-162.
- [3] 钟桂书, 何渊民, 廖勇梅, 雷公藤. 人参与芳维甲酸乙酯对培养光老化真皮成纤维细胞的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(2): 267-271.
- [4] 袁浩. 从文献报道分析维甲酸药物治疗银屑病的临床疗效[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2009.
- [5] 吴军, 张国威, 何威, 等. 口服芳维A酸乙酯联合窄谱中波紫外线照射治疗寻常型银屑病的临床研究[J]. 重庆医学, 2008, 37(12): 1280-1281.
- [6] 赵华, 李惠芝, 邱宗荫, 等. 反相高效液相色谱法测定血浆中TTNPB酸乙酯及其代谢物TTNPB[J]. 药物分析杂志, 2000, 20(2): 106-108.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 二部[S]. 2015年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 附录363-368.

(收稿日期: 2017-02-08 修回日期: 2017-06-01)

(编辑: 邹丽娟)