

N-(4-溴苄基)-*N*-(4-溴苄氧基)脲在大鼠体内的药动学研究

童伟^{1,2}, 麦曦^{1*}, 冯丽华¹, 向婧¹, 孙文¹ (1. 南昌大学药学院, 南昌 330006; 2. 南昌市第一医院, 南昌 330008)

摘要:目的 研究 *N*-(4-溴苄基)-*N*-(4-溴苄氧基)脲(BBU) 给药后药物在大鼠体内的血浆药动学特征, 为新药开发提供参考依据。方法 单剂量 600 mg · kg⁻¹ *N*-(4-溴苄基)-*N*-(4-溴苄氧基)脲口服给药, 应用高效液相色谱法测定大鼠体内 *N*-(4-溴苄基)-*N*-(4-溴苄氧基)脲的浓度。结果 大鼠灌胃给予 600 mg · kg⁻¹ *N*-(4-溴苄基)-*N*-(4-溴苄氧基)脲后, 大鼠血浆中 *N*-(4-溴苄基)-*N*-(4-溴苄氧基)脲的 AUC₀₋₄ 和 AUC_{0-∞} 分别为 110.55 和 122.79 mg · h · L⁻¹; *t*_{1/2z} 和 *t*_{max} 平均值分别为 3.71 和 3.67 h, ρ_{\max} 为 17.49 mg · L⁻¹; *N*-(4-溴苄基)-*N*-(4-溴苄氧基)脲的 CL_z/F 为 4.97 L · h⁻¹ · kg⁻¹, V_z/F 为 26.10 L · kg⁻¹, MRT_{0-∞} 为 6.71 h。结论 *N*-(4-溴苄基)-*N*-(4-溴苄氧基)脲一室模型和二室模型拟合效果参数非常接近, 两种模型都可选择, 但以二室模型为好。

关键词: *N*-(4-溴苄基)-*N*-(4-溴苄氧基)脲; 高效液相色谱法; 大鼠; 药动学

中图分类号: R969.1 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2012)21-1746-04

Pharmacokinetics of *N*-(4-bromobenzyl)-*N*-(4-bromobenzoyloxy) urea in Rats

TONG Wei^{1,2}, MAI Xi^{1*}, FENG Li-hua¹, XIANG Jing¹, SUN Wen¹ (1. Department of Pharmacy, Medical College, Nanchang University, Nanchang 330006, China; 2. Nanchang First Hospital, Nanchang 330008, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To characterize the pharmacokinetics of *N*-(4-bromobenzyl)-*N*-(4-bromobenzoyloxy) urea (BBU) in rats after oral administration, thus to provide reference for its development. **METHODS** A single dose of 600 mg · kg⁻¹ of BBU was orally administered to rats. The concentration of free BBU in rat plasma was determined by HPLC. **RESULTS** The AUC₀₋₄ and AUC_{0-∞} were 110.55 and 122.79 mg · L · h⁻¹, *t*_{1/2z} and *t*_{max} were 3.71 and 3.67 h, ρ_{\max} was 17.49 mg · L⁻¹, CL_z/F and V_z/F were 4.97 L · h⁻¹ · kg⁻¹ and 26.10 L · kg⁻¹, and MRT_{0-∞} was 6.71 h for free BBU. **CONCLUSION** The fitting goodness is between one-compartment model and two-compartment model. Both models can be chosen, but two-compartment model is better.

KEY WORDS: *N*-(4-bromobenzyl)-*N*-(4-bromobenzoyloxy) urea; HPLC; rat; pharmacokinetics

N-(4-溴苄基)-*N*-(4-溴苄氧基)脲(BBU) 是根据羟基脲(hydroxyurea, HU) 的构效关系进行结构修饰所获得的一个结构新颖的羟基脲衍生物, HU 主要用于治疗慢性粒细胞白血病(慢粒)、黑色素瘤、慢粒的加速期和急变期、真性红细胞增多症, 并对头颈部原发性鳞癌、复发性转移性卵巢癌等亦有一定的疗效^[1]。但由于羟基脲相对分子质量小(M_w = 76.06) 和极性大(ClogP = -1.80), 脂膜穿透能力较弱, 造成其毒副作用大和生物利用度低^[2]。BBU 是醚化的 HU 衍生物, 通过苄基对 HU 结构的修饰, 使其相对分子质量增大, 脂水分配系数提高, 用 ChemDraw Ultra 7.0 软件计算 BBU 的 ClogP 值为 4.72, 明显大于羟基脲。体外抗肿瘤活性结果显示, BBU 对小鼠淋巴细胞白血病细胞系 L1210 细胞株的活性是 HU 的 40 倍^[3]。本实验中,

我们对 BBU 在大鼠体内的药动学特点进行研究, 以便为后期的剂型设计和体内药效学等研究提供依据。

1 材料

1.1 动物

SD 大鼠, 雌雄各半, 体重 250 ~ 300 g [(江西中医药大学实验动物中心, 清洁级, 动物合格证号: SCXK(赣)2005-0001)]。

1.2 药品和试剂

BBU(自制, 纯度 99.15%), 联苯苄醇(内标, 批号: 100327-200201, 中国食品药品检定研究院), 乙腈为色谱纯, 乙酸乙酯为分析纯, 双蒸水(自制)。

1.3 仪器

岛津高效液相色谱仪(SCL-10AVP 系统控制器, SPD-10AVP 紫外检测器, LC-10ATVP 输液泵,

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项课题(2009ZX09103-087)

作者简介: 童伟, 女, 硕士研究生 研究方向: 药物分析 * 通讯作者: 麦曦, 女, 教授, 研究生导师 研究方向: 药物分析 Tel/Fax: (0791)8095338 E-mail: maixi123@yahoo.com.cn

CTO-10AsVP 柱温箱, Class-*vp* 工作站), 色谱柱: (Kromasil C₁₈: 4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 定量管 20 μL。电子天平(北京赛多利斯天平有限公司, 0.1 mg)。

2 实验方法

2.1 色谱条件

色谱柱: Kromasil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相: 乙腈-水 (73:27), 流速: 0.8 mL · min⁻¹, 检测波长: 225 nm, 柱温: 30 °C, 进样体积: 20 μL。

2.2 标准溶液的配制

精密称取 15 mg BBU 置 10 mL 量瓶中, 用乙腈溶解并稀释至 10 mL, 使其质量浓度为 1.5 mg · mL⁻¹; 精密量取联苯苄醇 10 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 用乙腈溶解并稀释至 100 mL, 使其浓度为 100 μg · mL⁻¹, 置 4 °C 冰箱中冷藏备用。

2.3 血浆样品处理

精密量取 100 μL 血浆样品置 10 mL 具塞离心管中, 加入 20 μL 50 μg · mL⁻¹ 的内标溶液, 涡旋 30 s。加入 300 μL 乙腈, 涡旋振荡 1 min 沉淀蛋白, 加乙酸乙酯 1 mL, 涡旋提取 3 min, 4 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液于另一玻璃离心管中, 50 °C 氮气吹干。固体残渣用 100 μL 乙腈重新溶解, 12 000 r · min⁻¹ 离心 5 min, 取上清液 20 μL 进样。

2.4 BBU 大鼠体内药动学研究

2.4.1 给药与取血 SD 大鼠 6 只, 雌雄各半, 给药前 12 h 禁食不禁水。称取 BBU 适量置研钵中, 加入少量吐温 80, 碾磨成糊状, 量取 1% 羧甲基纤维素钠溶液 3~4 mL 于研钵中, 碾磨使 BBU 成混悬液^[4], 按 600 mg · kg⁻¹ (结合急性毒性实验结果 BBU 小鼠最大耐受量 8 g · kg⁻¹ 和羟基脲人体日常最大用量 80 mg · kg⁻¹^[5] 换算综合考虑而得) 灌胃给药。给药后于 0.5、1、2、3、4、6、8、10、14 h 眼眶静脉取血 0.4 mL, 给药前取空白血, 置于肝素抗凝管中, 3 500 r · min⁻¹ 离心 5 min 分离血浆, 然后放置于 -40 °C 冰箱保存至测定。

2.4.2 药动学参数计算 记录每只大鼠各时间点的 BBU 的峰面积, 计算样品峰面积与内标峰面积的比值, 并利用回归方程计算各采血点的浓度, 最后利用 DAS 2.1.1 药动学软件分析得出主要药动学参数。

3 实验结果

3.1 方法专属性考察

在本实验所用的 HPLC 条件下, BBU 与内标分离良好, 样品的保留时间为 7.5 min, 内标的保留时间为

8.5 min。样品峰附近无内源性杂峰干扰, 其峰型良好。空白血浆、空白血浆中加入 BBU、空白血浆中加入 BBU 和内标、给药后血浆的 HPLC 图见图 1。

3.2 标准曲线和定量限

取空白血浆 100 μL, 精密量取 BBU 系列浓度乙腈液 20 μL, 使血浆质量浓度分别为 0.5、1、2、5、10、20、30 μg · mL⁻¹。再于各管中精密加入 50 μg · mL⁻¹ 的联苯苄醇 (内标) 溶液 20 μL, 按“2.2”项下操作, 以样品峰面积与内标峰面积的比值为横坐标, BBU 浓度为纵坐标, 进行线性回归。其回归方程为: $y = 9.6541\rho - 0.4060$, $r^2 = 0.9993$, 线性范围为 0.5~30 μg · mL⁻¹, 血浆中 BBU 最低定量限为 500 ng · mL⁻¹。

3.3 绝对回收率

将 BBU 标准溶液配制成 1、5、20 μg · mL⁻¹ 高中低 3 个浓度, 配制 3 个浓度的血浆样品 (每个浓度 5 份), 按“2.2”项下操作后进样, 以血浆样品的峰面积与标准溶液的峰面积之比计算绝对回收率, 结果见表 1。

3.4 精密度及方法回收率

准确配制质量浓度为 1、5、20 μg · mL⁻¹ 高、中、低 3 个浓度的血浆样品溶液 (每个浓度配制 5 份), 按“2.2”项下操作处理后进样测量, 每个浓度于同一日内测定 5 次, 连续测定 3 d, 计算其日内日间精密度和方法回收率。结果见表 2。

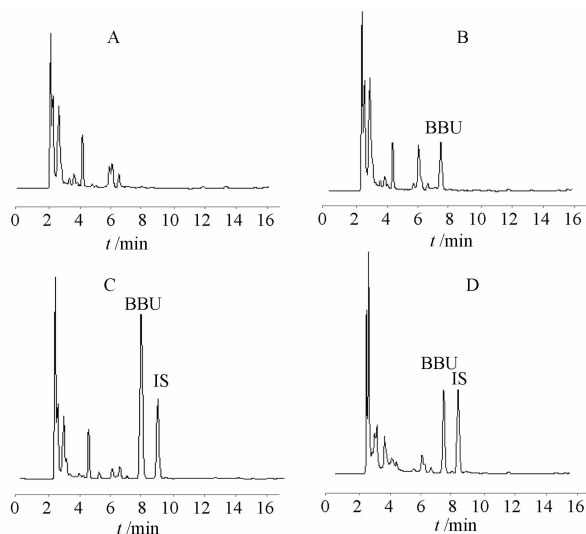


图 1 *N*-(4-溴苄基)-*N*-(4-溴苄氧基)脲 (BBU) 的 HPLC 色谱图

A - 空白血浆; B - 空白血浆 + BBU; C - 空白血浆 + BBU + 内标; D - 血浆样品

Fig. 1 HPLC Chromatograms of BBU

A - blank plasma; B - plasma spiked with BBU; C - plasma spiked with BBU and internal standard; D - rat plasma sample

3.5 样品稳定性

3.5.1 室温放置与冰冻保存血浆样品稳定性 配制低、中、高3个浓度的BBU血浆样品溶液,每个浓度10份,其中5份在室温下放置24 h后再按“2.2”项下处理后进样检测,并记录结果,药物剩余百分率分别是(95.86 ± 5.61)%、(106.46 ± 2.59)%、(101.15 ± 0.60)%,3个浓度的RSD分别为5.85%、2.44%、0.59%。另外5份置于-40℃冰箱中冻存保存1周后,再经“2.2”项下处理后进样检测,并记录结果,药物剩余百分率分别是(99.47 ± 5.24)%、(102.18 ± 3.45)%、(99.29 ± 4.82)%,3个浓度的RSD分别为5.27%、3.37%、4.85%。结果说明血浆样品在室温放置和冰冻保存的条件下均具有很好的稳定性。

3.5.2 冻融条件下血浆样品稳定性 配制高、中、低3个浓度的BBU血浆样品溶液,放入-40℃冰箱中,反复冻融3次后,按“2.3”项下处理后进样检测,每个浓度测定5次,药物剩余百分率分别为(102.99 ± 0.28)%、(100.35 ± 2.70)%、(98.60 ± 4.78)%,3个浓度的RSD分别为0.27%、2.69%、

4.85%。结果显示,冻融条件对血浆样品的检测结果没有明显影响。

3.6 BBU大鼠体内的药动学研究

用HPLC测定BBU的血药浓度,灌胃给药的不同时间血药浓度数据见表3,平均药-时曲线见图2,用DAS2.1.1药动学软件拟合后药动学参数见表4。

表1 BBU绝对回收率

Tab.1 Absolute recoveries of BBU

Concentration/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	Absolute recovery/% $n=5$	RSD/%
1.0	107.42 ± 1.97	1.83
5.0	102.29 ± 2.83	2.77
20.0	99.41 ± 1.64	1.65

表2 BBU方法回收率与精密度

Tab.2 Relative recovery and precision of the HPLC method for BBU

Concentration/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	Relative recovery/ $\%$ ($n=5$)	Intra-assay precision ($n=5$)	Inter-assay precision ($n=3$)
1.0	98.60 ± 4.88	4.94	5.18
5.0	101.68 ± 1.83	1.80	0.98
20.0	102.50 ± 1.19	1.16	0.62

表3 不同时间BBU的血药浓度值, $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

Tab.3 Plasma concentrations of BBU at different time. $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

Rat number	t/h									
	0.5	1	2	3	4	6	8	10	14	
1	5.93	8.72	13.15	17.74	15.77	8.42	6.69	4.84	3.24	
2	5.59	8.23	15.14	17.74	18.74	10.71	5.79	3.90	1.66	
3	5.88	8.98	12.51	16.14	18.80	10.16	5.57	3.45	1.29	
4	4.02	7.80	10.94	15.90	21.73	14.81	6.06	4.62	2.92	
5	4.19	6.34	8.87	11.46	11.97	9.54	6.76	4.50	2.38	
6	4.22	7.66	10.57	15.94	12.76	7.95	5.39	3.02	2.59	
mean	4.97	7.96	11.86	15.82	16.63	10.27	6.04	4.06	2.35	
SD	0.92	0.94	2.20	2.30	3.81	2.46	0.57	0.72	0.75	

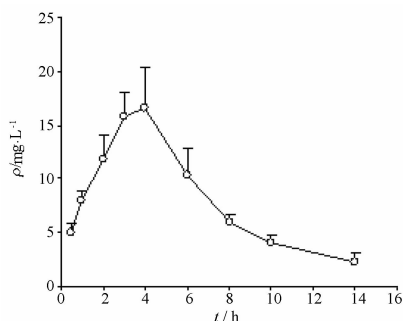


图2 BBU的平均血药浓度-时间曲线. $n=6, \bar{x} \pm s$

Fig.2 Mean plasma concentration-time profile of BBU in rats. $n=6, \bar{x} \pm s$

表4 大鼠口服给药BBU 600 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的药动学参数. $n=6$

Tab.4 Pharmacokinetic parameters of BBU 600 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ after oral administration in rats. $n=6$

Pharmacokinetic parameter	Mean	SD
$\text{AUC}_{0-t}/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}$	110.55	13.27
$\text{AUC}_{0-\infty}/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}$	122.79	17.79
$t_{1/2}/\text{h}$	3.71	1.10
$CL_z/F/L \cdot \text{h} \cdot \text{kg}^{-1}$	4.97	0.73
$V_z/F/L \cdot \text{kg}^{-1}$	26.10	5.94
t_{max}/h	3.67	0.52
$\rho_{\text{max}}/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	17.49	3.29
$\text{MRT}_{0-t}/\text{h}$	5.30	0.32
$\text{MRT}_{0-\infty}/\text{h}$	6.71	1.206

4 讨论

将血药浓度-时间数据采用 DAS2.1.1 软件按一级吸收的开放一室模型和一级吸收的开放二室模型,分别进行模型拟合,其 AIC 值分别为 32.998 和 30.988, r^2 值分别为 0.911 和 0.948。根据判别标准:AIC 值愈小,则认为该模型拟合愈好; r^2 值愈大说明所选择的模型与该药有较好的拟合度^[6],选择二室模型为好。但是两种模型拟合效果参数非常接近,故两种模型都可选择。

本实验选用 SD 清洁大鼠,雌雄各半,在表 3 中编号 1~3 为雄性大鼠的血药浓度,编号 4~6 为雌性大鼠的血药浓度,从表 3 可以看出雌雄大鼠的血药浓度差别不大,经过 DAS2.1.1 软件统计雌雄大鼠在药动学方面无显著差异。

大鼠血药浓度方法建立时,经过紫外扫描发现 BBU 在 215 nm 处有最大吸收,接近羟基脲的检测波长^[7]。但是在 215 nm 处有内源性杂质的较小的干扰,选择 225 nm 测定,干扰消失,虽灵敏度有所降低,但方法的灵敏度符合药动学要求,故最终以 225 nm 作为设定波长。

本实验选择乙腈和水为流动相,分离度好,方法简便可靠。在该色谱条件下血浆 BBU 峰形和分离度较好,操作方便,灵敏度较高,该法最低定量限能满足药动学研究中所需的监测给药后 3~5 个半衰期时血药浓度的要求^[8],故该方法适合于血浆 BBU 的药物浓度检测和药动学研究。

本法采用乙腈蛋白沉淀,乙酸乙酯提取^[9],提

取回收率在 90% 以上,解决了用乙腈直接蛋白沉淀提取回收率不高的问题。

了解药物的体内过程是新药研究的重要步骤,其结果对给药剂量、用药间隔以及疗效的评价具有一定的指导作用。由于本实验是在动物体内进行的,有一定的局限性,故还须进一步研究健康人和患者体内的药动学。

REFERENCES

- [1] NAVARRA P, PREZIOSI P. Hydroxyurea: New insights on an old drug[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 1999, 29(3):249-255.
- [2] GWILT P R, TRACEWELL W G. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of hydroxyurea [J]. *Clin Pharmacokinet*, 1998, 34(5):347-358.
- [3] XI M, LU X S, XIA H Y, et al. Synthesis, antitumor evaluation and crystal structure of hydroxyurea derivatives[J]. *Chem Pharm Bull*, 2010, 58(1): 94-97.
- [4] XU S Y, BIAN R L, CHEN X. *Experimental Methodology of Pharmacology*(药理学实验方法学)[M]. Beijing: People's medical Publishing House, 2002;350-356.
- [5] Martindale Milliam. *Martindale the Extra Pharmacopoeia*(生物药剂学与药代动力学)[M]. London: The Pharmaceutical Press. 2007:35.
- [6] LIANG W Q. *Biopharmacy and Pharmacokinetics*[M]. Beijing: People's medical Publishing House, 2007;223-224.
- [7] IYAMU E W, ROA P D, KOPSOMBUT P, et al. New isocratic high-performance liquid chromatographic procedure to assay the anti-sickling compound hydroxyurea in plasma with ultraviolet detection[J]. *J Chromatography B*, 1998, 709(1):119-126.
- [8] State Food and Drug Administration. Non-clinical pharmacokinetic study of chemical drug [S]. 2005,3.
- [9] LIU X L, CHEN Y Y, LIU H J. Pharmacokinetics of nimodipine in rats[J]. *Chin Med J*(中华医学杂志), 2007,5(7):3-5.

(收稿日期:2011-10-01)

FDA 批准首个预防 HIV 感染的药物

美国食品药品监督管理局(FDA) 2012 年 7 月 16 日批准 Truvada(恩曲他滨/富马酸替诺福韦酯),这是首个获批用于处于 HIV 高危感染但未感染的个体以及可能与艾滋病感染者发生性行为的个体的治疗药物,以降低这些人群感染 HIV 风险。高危成年患者每日服用 Truvada,在相对安全的性行为下用于暴露前预防(pre-exposure prophylaxis, PrEP),以减低性-获得 HIV 感染的风险。FDA 曾批准 Truvada 与其它抗病毒药物联用治疗成年和 12 岁或以上儿童 HIV-感染。

作为暴露前预防的一部分,处于 HIV 高危感染风险但未感染的个体每天服用 Truvada 以降低暴露于病毒时感染 HIV 的风险。暴露前预防这一适应证意味着 Truvada 获批用作 HIV 预防全面战略的一部分,此外包括其它预防方法,如安全性行为规范,减少风险相关咨询,以及常规 HIV 检验。

(董江萍 王坚成)