

· 药物代谢 ·

基于微透析采样技术分析羟基喜树碱磁性脂质体在大鼠体内的药代动力学

朱海媚¹, 谢毅¹, 谢波^{2*}, 凌家俊^{1*}

(1. 广州中医药大学 中药学院, 广州 510006; 2. 广州军区 广州总医院, 广州 510010)

[摘要] 目的:探究羟基喜树碱(HCPT)磁性脂质体在大鼠体内药代动力学特征,为该药物的制剂开发提供参考。方法:建立微透析样品中开环HCPT(C-HCPT),闭环HCPT(L-HCPT)的HPLC,SD大鼠尾静脉注射HCPT磁性脂质体和HCPT注射液,腹腔注射HCPT注射液(剂量以HCPT计均为 $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),于给药后采用微透析技术定时采样。微透析样品经各样本自身体内回收率校正,利用DAS 2.1.1软件计算相关药物动力学参数。结果:HCPT磁性脂质体尾静脉给药组,HCPT注射液尾静脉给药组和HCPT注射液腹腔给药组的药峰浓度(C_{\max})分别为(2.789 ± 0.158), (4.537 ± 0.092), (0.340 ± 0.066) $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,达峰时间(t_{\max})分别为(24 ± 0), (6 ± 0.127), (24 ± 0.127) min,平均滞留时间($\text{MRT}_{0-\infty}$)分别为(72.255 ± 4.668), (20.325 ± 4.288), (112.630 ± 29.969) min,药时曲线下面积($\text{AUC}_{0-\infty}$)分别为(216.870 ± 3.271), (150.668 ± 7.306), (34.883 ± 10.245) $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}$;与HCPT注射液尾静脉给药组相比,HCPT磁性脂质体尾静脉给药组的 t_{\max} , $\text{MRT}_{0-\infty}$ 较大,差异有统计学意义;与HCPT注射液腹腔给药组相比,HCPT磁性脂质体尾静脉给药组的 C_{\max} , $\text{AUC}_{0-\infty}$ 较大,差异有统计学意义。结论:HCPT磁性脂质体尾静脉注射能显著提高药物血药浓度、生物利用度及其在体内的滞留时间;且脂质体可保护HCPT活性必需基团内酯环不被破坏,从而保证HCPT的抗肿瘤活性。

[关键词] 羟基喜树碱; 磁性脂质体; 血液微透析; 高效液相色谱法; 药代动力学; 回收率

[中图分类号] R969.1;R945;R284.1;R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)18-0064-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017180064

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170626.1625.010.html>

[网络出版时间] 2017-06-26 16:25

Pharmacokinetics of Hydroxycamptothecin Magentoliposomes in Rats Based on Microdialysis Sampling Technique

ZHU Hai-mei¹, XIE Yi¹, XIE Bo^{2*}, LING Jia-jun^{1*}

(1. School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

2. General Hospital of Guangzhou Military Command of PLA, Guangzhou 510010, China)

[Abstract] **Objective:** To study on the pharmacokinetics of hydroxycamptothecin (HCPT) magentoliposomes in rats. **Method:** The detection method for open-loop HCPT (C-HCPT) and closed-loop HCPT (L-HCPT) in microdialysis samples were established by HPLC. The microdialysis samples were collected after they were treated with HCPT magentoliposomes (intravenous injection), HCPT injection (intravenous injection) and HCPT injection (intraperitoneal injection) at a concentration of $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ for HCPT. The microdialysis samples were corrected with *in vivo* recoveries, the pharmacokinetic parameters were calculated by DAS 2.1.1 software. **Result:** The pharmacokinetic parameters of HCPT magentoliposomes (intravenous injection), HCPT

[收稿日期] 20170411(003)

[基金项目] 广东省科技计划项目(2014A020210022)

[第一作者] 朱海媚, 硕士, 从事新剂型与新技术的研究, Tel:18826415742, E-mail: zhuhaimeij9211@126.com

[通讯作者] * 谢波, 副主任医师, 硕士生导师, 从事肿瘤靶向治疗技术研究, Tel:020-88654502, E-mail: xiebo72@tom.com;

* 凌家俊, 教授, 硕士生导师, 从事现代化药物制剂及药代动力学研究, Tel:020-39358043, E-mail: lj@gzucm.edu.cn

injection (intravenous injection) and HCPT injection (intraperitoneal injection) were calculated as follows: C_{max} of (2.789 ± 0.158) , (4.537 ± 0.092) , $(0.340 \pm 0.066) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, t_{max} of (24 ± 0) , (6 ± 0.127) , $(24 \pm 0.127) \text{ min}$, $\text{MRT}_{0-\infty}$ of (72.255 ± 4.668) , (20.325 ± 4.288) , $(112.630 \pm 29.969) \text{ min}$, $\text{AUC}_{0-\infty}$ of (216.870 ± 3.271) , (150.668 ± 7.306) , $(34.883 \pm 10.245) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}$. The t_{max} and $\text{MRT}_{0-\infty}$ of HCPT magentolipsomes (intravenous injection) were significantly longer than those of HCPT injection (intravenous injection); the C_{max} and $\text{AUC}_{0-\infty}$ of HCPT magentolipsomes (intravenous injection) were significantly higher than those of HCPT injection (intraperitoneal injection). **Conclusion:** HCPT magentolipsomes (intravenous injection) can evidently raise plasma concentration, bioavailability and its residence time in the body of rats, and it can protect L-HCPT from blood, which is good for the anti-tumor activity.

[**Key words**] hydroxycamptothecin; magentolipsomes; blood microdialysis; high performance liquid chromatography (HPLC); pharmacokinetics; recovery rate

羟基喜树碱(HCPT)为我国特有植物喜树中提取的一种天然生物碱,近年来被广泛用于临床抗肿瘤治疗,可通过抑制 DNA 拓扑异构酶 I 而使肿瘤细胞发生致死性损害,为广谱抗癌药^[1]。其具有内酯型(闭环 HCPT)和羧酸盐型(开环 HCPT)2 种存在形式,闭环 HCPT 水溶性很差。临床上使用的是其钠盐注射液,由于结构中活性必需基团内酯环被打开,HCPT 主要以开环形式存在,抗肿瘤活性降低^[2]。脂质体作为药物载体近年来受到广泛关注,其可将 HCPT 包封于类脂质双分子层内进行运载,避免在水环境和血液中 HCPT 内酯环开环而失去活性,大大提高了药物的治疗指数和疗效;脂质体的缓释作用可解决 HCPT 注射液半衰期短、患者顺应性差等问题^[3]。肿瘤药物的靶向给药一直是肿瘤治疗的热点和难点,普通脂质体可通过被动靶向聚集于肿瘤组织,从而提高肿瘤组织的药物浓度,并降低药物对正常组织器官的毒副作用。已有研究报道通过外加刺激^[4-6](如磁场、热、光等)可实现肿瘤药物的主动靶向,YANG 等^[7]制备的磁性热敏脂质体以外加交变磁场刺激实现了药物在肿瘤组织有效聚集,显著提高了脂质体的靶向效率。故本课题为提高 HCPT 的体内抗肿瘤活性,以磁性脂质体作为 HCPT 的药物载体,研究 HCPT 磁性脂质体在大鼠血液中的药物动力学特征。

微透析技术是一种结合灌流取样和透析技术在生物活体内进行动态微量取样的新技术,与传统药物动力学研究方法相比,微透析技术具有准确度和灵敏度高、时间和空间分辨性好、透析液无需预处理即可在线检测等优点^[8]。国内有关 HCPT 体内药物动力学特征的研究多采用传统血药浓度法,鲜有运用微透采样技术,且已有研究只报道了总 HCPT 浓度(开环 HCPT 和闭环 HCPT 的浓度总和)的药物动

力学特征。本实验为探究 HCPT 磁性脂质体在大鼠体内药物动力学特征,采用微透析采样技术比较 HCPT 磁性脂质体尾静脉给药,HCPT 注射液尾静脉给药和腹腔给药的大鼠体内药物动力学特征,为运用微透析采样技术研究 HCPT 磁性脂质体肿瘤局部药物动力学特征及 PK-PD 结合模型的建立提供借鉴;同时检测各组体内开环 HCPT 和闭环 HCPT 的浓度变化,以探究磁性脂质体对闭环 HCPT 内酯型结构的保护作用。

1 材料

微透析系统(CMA Microdialysis AB 公司,CMA20 型血液探针,CMA402 型灌注推进泵,CMA1.0 型灌注器),2487 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),HJ-3 型磁力搅拌器(常州澳洲仪器有限公司),PHS-25 型 pH 计(上海精密科学仪器有限公司),AUW-120D 型分析天平(日本岛津公司),JY92-IID 型超声细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

羟基喜树碱(HCPT)对照品(中国食品药品检定研究院,批号 100526-200301,纯度 $\geq 99\%$),HCPT(成都兰贝植化有限公司,批号 100903,纯度 $\geq 99\%$),HCPT 注射用冻干粉(黄石飞云制药有限公司,批号 H20040623),大豆软磷脂和胆固醇(上海蓝季发展有限公司),油酸钠(阿拉丁试剂有限公司),水为双蒸水,甲醇和乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

同一批次的健康雄性 SD 大鼠由广州中医药大学实验动物中心提供,清洁级,体重 $(250 \pm 10) \text{ g}$,合格证号 SCXK(粤)2013-0085,饲养于广州中医药大学实验动物中心清洁级动物房,环境温度调至 $23 \sim 25 \text{ }^\circ\text{C}$,相对湿度 $60\% \sim 70\%$ 。本实验经广州中医药大学实验动物伦理委员会批准。

2 方法与结果

2.1 油酸改性的 Fe₃O₄ 磁性纳米粒子的制备^[9]

将 FeSO₄ 和 FeCl₃ 按 1:2 的摩尔比混合,置于 250 mL 三口烧瓶中,电动搅拌使充分混匀,缓慢滴加 6 mol·L⁻¹ NaOH 溶液至 pH 7,滴加完毕后静置一段时间,使磁粉下沉,倾去上清液,加入适量乙醇,挥干乙醇,得 Fe₃O₄ 磁性纳米粒子,平均粒径约 22 nm;用 pH 4~5 的盐酸稀释 Fe₃O₄ 磁性纳米粒子,涡旋加热,加入适量油酸钠,70 °C 恒温水浴保温 30 min,用乙醇除去多余油酸,得黑色油光状磁性纳米粒子,即得。

2.2 HCPT 磁性脂质体的制备^[10]

精密称取处方量大豆软磷脂、胆固醇、维生素和 HCPT,溶于适量甲醇-三氯甲烷(1:5)混合有机溶剂中,按正交试验筛选得到最优处方进行操作^[9],将含药混合液置于 500 mL 茄形瓶中,42 °C 减压蒸发除去混合有机溶剂,形成均匀薄膜,往干燥的薄膜中加入分散有油酸改性 Fe₃O₄ 磁性纳米粒子的磷酸盐缓冲液(PBS)中,室温下水化 90 min,得灰黄色 HCPT 磁性脂质体混悬液,超声细化,挤压过膜(0.22 μm),得粒径较小的脂质体。药脂比 1:30,药磁比 1:1,大豆软磷脂-胆固醇(80:30),水化介质 pH 6.8。

2.3 HCPT 磁性脂质体粒径、包封率及载药量的测定

2.3.1 粒径

室温下取适量 HCPT 磁性脂质体用水稀释,测定粒径,结果表明混悬液为均一、稳定的半透明状分散体系,体系为灰黄色,粒径分布 190~272 nm,平均粒径 231 nm。

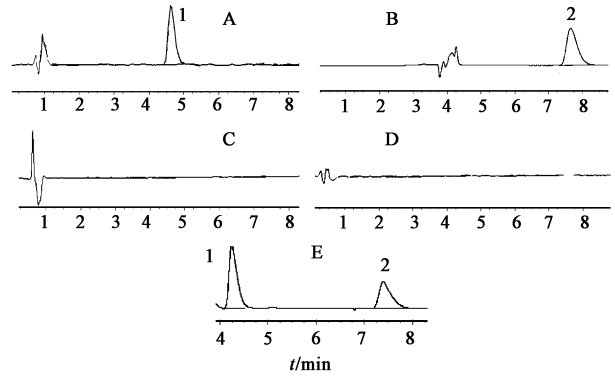
2.3.2 包封率和载药量

采用葡聚糖凝胶色谱法,取经洗脱溶剂溶胀 12 h 以上的葡萄糖凝胶(sephadex)G-50,用 PBS 以 0.5 mL·min⁻¹ 的流速冲洗平衡 12 h,备用。取 HCPT 脂质体样品 2 mL 上柱,用 pH 6.8 的 PBS 洗脱,流速 0.5 mL·min⁻¹,收集脂质体分离项下的样品置于 25 mL 量瓶中,加甲醇破乳并定容,精密移取 20 μL 进样分析,按照包封率 = $C_m/C_t \times 100\%$ 计算脂质体平均包封率 61.2%,按载药量 = $m_1/(m_1 + m_2)$ 计算载药量 2.4%,式中 C_m 为包入脂质体中的 HCPT 质量, C_t 为 HCPT 总质量, m_1 为脂质体中药物质量, m_2 为载体总质量。

2.4 色谱条件

采用 Phenomenex Luna C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-甲醇-0.05 mol·L⁻¹ KH₂PO₄(pH 6.4)(6:490:450),流速 0.8 mL·min⁻¹,检测波长 384 nm,柱温 25 °C。在此色谱条件下,开环、闭环 HCPT 峰形对称,出峰时间

分别为 4.49, 7.62 min。见图 1。



A, B. 对照品; C. 二甲基乙酰胺; D. 生理盐水; E. 血液样品; 1. 开环 HCPT; 2. 闭环 HCPT

图 1 羟基喜树碱磁性脂质体的 HPLC

Fig. 1 HPLC of hydroxycamptothecin magnetoliposomes

2.5 方法学考察

2.5.1 HCPT 对照品储备液的配制

精密称取 HCPT 对照品 10.2 mg,加 1.0 mol·L⁻¹ NaOH 溶液溶解,用水定容,得开环 HCPT 对照品母液,置于 4 °C 冰箱低温避光保存。精密称取 HCPT 对照品 10.2 mg,滴加二甲基乙酰胺溶解并定容,得闭环 HCPT 对照品母液,置于 4 °C 冰箱低温避光保存。精密称取 HCPT 对照品 5.3 mg,滴加 1.0 mol·L⁻¹ NaOH 液溶解,加水定容后调 pH 7.4,得 HCPT 开环、闭环混合对照品液,超声脱气处理 20 min,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.5.2 供试品的配制

精密称取 HCPT 5.3 mg,滴加 1.0 mol·L⁻¹ NaOH 溶液溶解,加水定容并调 pH 7.4,得开环、闭环混合供试品溶液,超声脱气 20 min,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,即得。利用 HCPT 开环、闭环混合供试品配制 2 mg·L⁻¹ HCPT 含药灌流液。取 HCPT 冻干粉针剂,滴加生理盐水,得 1 g·L⁻¹ 注射液,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,备用。给药前临时配制,保持 HCPT 总质量浓度 0.5 g·L⁻¹,得 HCPT 磁性脂质体注射液。

2.5.3 标准曲线的制备

精密称取开环 HCPT 对照品溶液适量,分别加 pH 12 的 NaOH 溶液定容,得质量浓度依次为 0.102, 0.51, 1.02, 2.04, 3.06, 5.1 mg·L⁻¹ 的系列对照品溶液,以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,得回归方程 $Y = 101\ 916X - 851.47$ ($r = 0.999\ 9$),线性范围设定 0.102~5.1 mg·L⁻¹。精密称取 HCPT 闭环对照品液适量,加二甲基乙酰胺定容,得 0.102, 0.51, 1.02, 2.04, 3.06, 5.1 mg·L⁻¹ 的系列质量浓度的对照品溶液,以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,得回归方程

$Y = 41\ 557X + 1\ 021.5$ ($r = 0.999\ 9$), 线性范围 $0.102 \sim 5.1\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.5.4 专属性试验 取空白生理盐水、二甲基乙酰胺各 $100\ \mu\text{L}$ 进行 HPLC 检测, 结果在 HCPT 的出峰位置无其他色谱峰, 表明空白生理盐水、二甲基乙酰胺不存在干扰作用, 分析条件可行。

2.5.5 精密度考察 配制开环 HCPT 低、中、高 3 个质量浓度 ($0.012, 0.102, 1.02\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的对照品溶液, 按 2.4 项下条件连续进样 6 次, 每次 $10\ \mu\text{L}$, 结果开环 HCPT 峰面积的 RSD 分别为 2.0%, 1.8%, 0.1%。配制闭环 HCPT 低、中、高 3 个质量浓度 ($0.020\ 4, 0.204, 1.428\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的对照品溶液, 按 2.4 项下条件连续进样 6 次, 每次 $10\ \mu\text{L}$, 结果闭环 HCPT 峰面积 RSD 分别为 2.3%, 2.0%, 0.9%。

2.5.6 稳定性考察 配制 $5\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 开环 HCPT, 分别于 1, 2, 4, 6, 8, 12 h 按 2.4 项下条件测定, 连续测 5 d, 计算日内 RSD 及日间 RSD。闭环 HCPT 同法操作。结果开环 HCPT 的日内 RSD 1.4%, 日间 RSD 2.1%; 闭环 HCPT 的日内 RSD 1.8%, 日间 RSD 2.2%。表明 HCPT 供试品溶液在 5 d 内稳定。

2.5.7 定量限与检测限 配制系列质量浓度的开环 HCPT 对照品, 按 2.4 项下条件进样 $10\ \mu\text{L}$, 得检测限约 $51\ \text{pg}$ ($S/N = 3$), 定量限约 $120\ \text{pg}$ ($S/N = 10$); 同法测得闭环 HCPT 检测限约 $48\ \text{pg}$ ($S/N = 3$), 定量限约 $526\ \text{pg}$ ($S/N = 10$)。

2.6 体外血浆蛋白结合率的测定^[11]

2.6.1 空白血浆的制备 取健康雄性 SD 大鼠, 实验前 24 h 禁食不禁水。乙醚麻醉, 腹主动脉取血于肝素化管中, $3\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 分离上层血浆, 低温保存备用。

2.6.2 含药血浆的制备 精密移取开环、闭环 HCPT 混合对照品溶液, 调节 pH 7.4, 加至大鼠血浆中, 制备得 $10, 25, 50, 75\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 系列质量浓度的含药血浆, $37\ ^\circ\text{C}$ 水浴 2 h, 振荡混和均匀。含药血浆临用前配制。

2.6.3 血浆蛋白结合率的测定 取出空白血浆放置至室温, 置恒温磁力搅拌器上, 以 $200\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 充分搅拌并使温度维持在 $37\ ^\circ\text{C}$, 把探针半透膜插入空白血浆中, 以 $2\ \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速灌流 HCPT 含药灌流液, 平衡 30 min, 收集 6 份透析液, 平衡 60 min, 将探针插入含 $10\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ HCPT 的含药血浆中, 用空白生理盐水以 $2\ \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速灌流探针, 平衡 30 min 收集 6 份透析液, 弃去第 1 份, 后 5 份及灌流

液用 HPLC 检测, 计算血浆蛋白结合率。同法分别测定其他质量浓度 HCPT 的血浆蛋白结合率。结果表明试验质量浓度范围内 HCPT 血浆蛋白结合率均 $>72\%$, RSD 0.3%。HPLC 测定透析液中 HCPT 质量浓度 ($C_{\text{dialysate}}$) 及灌流液中 HCPT 质量浓度 ($C_{\text{perfusate}}$), C_0 为含药血浆药物质量浓度; HCPT 释放率 ($\text{RL} = (C_{\text{perfusate}} - C_{\text{dialysate}}) / C_{\text{perfusate}}$); HCPT 回收率 ($\text{RR} = \text{RL}$); 探针周围游离 HCPT 质量浓度 ($C_p = C_{\text{dialysate}} / \text{RR}$); 血浆蛋白结合率 = $(C_0 - C_p) / C_0$ 。

2.7 大鼠给药方式及血液微透析采样

2.7.1 大鼠给药方式 健康雄性 SD 大鼠 15 只, 随机分为 3 组, 每组 5 只, 分别为 HCPT 注射液腹腔给药组, HCPT 注射液尾静脉给药组和 HCPT 磁性脂质体尾静脉给药组; 给药剂量以 HCPT 计均为 $10\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

2.7.2 血液探针的植入 SD 大鼠实验前 24 h 禁食不禁水, 腹腔注射 25% 乌拉坦生理盐水进行麻醉, 置于加热垫上, 用细绳固定大鼠四肢及头部, 颈部剪毛, 在大鼠右侧的肩胛骨处侧剪 $2 \sim 3\ \text{cm}$ 的切口分离出颈静脉, 用眼科剪在颈静脉剪 V 形小口, 沿着开口向右心室方向植入探针, 用手术线固定, 缝合伤口。空白生理盐水以 $2\ \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速灌流探针 60 min 平衡。

2.7.3 血液透析样品的收集和体内回收率测定 以给药完毕作为零时间点采集样品, 以 $2\ \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速灌流空白生理盐水, 透析液每隔 6 min 收集 1 份, 共收集 150 min。待 HCPT 在大鼠体内清除干净, 更换为 HCPT 含药灌流液, 平衡 30 min 后收集 6 份透析液, HPLC 测定 $C_{\text{dialysate}}$ 和 $C_{\text{perfusate}}$ 。按 $\text{RR} = (C_{\text{perfusate}} - C_{\text{dialysate}}) / C_{\text{perfusate}}$ 计算开环、闭环 HCPT 体内回收率, 以进行透析液样品质量浓度的校正。

2.7.4 体内回收率的稳定性试验^[12] 正常大鼠植入探针后以 $2\ \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速灌流 HCPT 含药灌流液, 每 15 min 收集 1 份透析液, 共收集 8 h, 透析液低温保存。HPLC 测定 $C_{\text{dialysate}}$ 和 $C_{\text{perfusate}}$, 按 $\text{RL} = (C_{\text{perfusate}} - C_{\text{dialysate}}) / C_{\text{perfusate}}$ 计算开环、闭环 HCPT 释放率。结果表明 8 h 内开环、闭环 HCPT 回收率基本保持稳定, 平均回收率分别为 18.34%, 25.12%, RSD 分别为 3.9%, 4.7%, 说明微透析适合于 HCPT 的药物动力学研究。

2.8 药物动力学数据分析 每个有效样本进行自身体内回收率校正。血液中游离的开环 HCPT 质量浓度 = $C_{\text{dialysate}(\text{开})} / \text{RR}(\text{开})$; 血液中游离的闭环 HCPT 浓度 = $C_{\text{dialysate}(\text{闭})} / \text{RR}(\text{闭})$; 血液中游离的总 HCPT 浓度等于血液中开环 HCPT 浓度和闭环 HCPT 浓度之

和。分别以血液中游离的开环 HCPT 浓度和闭环 HCPT 浓度对采样时间作图,得各组平均血药浓度-时间曲线,见图 2~4。3 组大鼠给药后总 HCPT 药-时曲线的比较见图 5,采用 DAS 2.1.1 药代动力学分析软件处理,按房室动力学模型进行分析,权重系数为 1 时拟合效果较好,药物动力学参数见表 1。

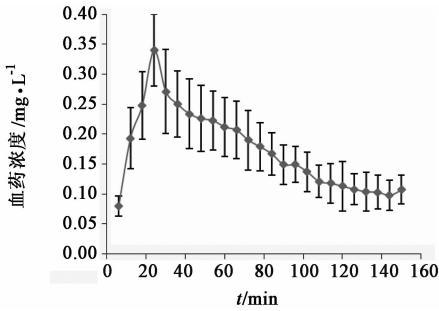


图 2 HCPT 注射液腹腔给药后开环 HCPT 的平均血药浓度-时间曲线($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 2 Mean plasma concentration-time curve of C-HCPT upon intraperitoneal injection with HCPT injection($\bar{x} \pm s, n = 5$)

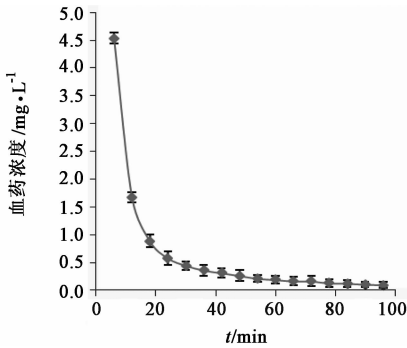


图 3 HCPT 注射液尾静脉给药后开环 HCPT 的平均血药浓度-时间曲线($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 3 Mean plasma concentration-time curve of C-HCPT upon intravenous injection with HCPT injection($\bar{x} \pm s, n = 5$)

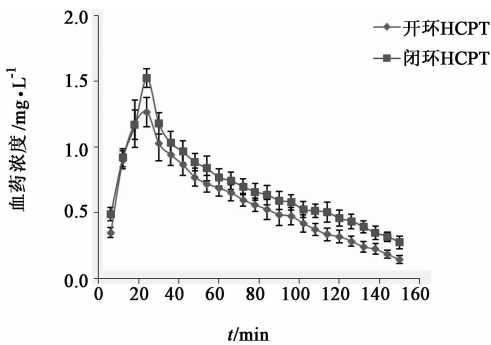


图 4 HCPT 磁性脂质体尾静脉给药后开环、闭环 HCPT 的平均血药浓度-时间曲线($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 4 Mean plasma concentration-time curves of C-HCPT and L-HCPT upon intravenous injection with HCPT magnetoliposomes($\bar{x} \pm s, n = 5$)

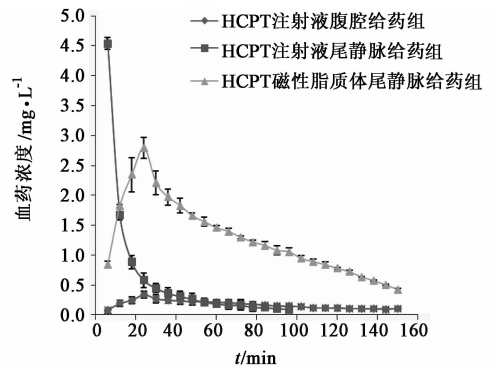


图 5 HCPT 注射液腹腔给药,尾静脉给药及 HCPT 磁性脂质体尾静脉给药后总 HCPT 平均血药浓度-时间曲线($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 5 Mean plasma concentration-time curves of total HCPT upon intraperitoneal injection with HCPT injection, intravenous injection with HCPT magnetoliposomes and HCPT injection($\bar{x} \pm s, n = 5$)

由图 2,3 可知,HCPT 注射液腹腔给药或尾静脉给药后,透析液中均未能检测到闭环 HCPT,说明 HCPT 注射液在进入体内后,主要以开环形式存在,内酯结构已被破坏,这与临床上 HCPT 注射液疗效不佳的情况相吻合。由图 4 可知,脂质体尾静脉给药后,体内同时存在开环和闭环 HCPT,且血液中游离的闭环 HCPT 浓度稍高于开环 HCPT,说明 HCPT 发挥抗肿瘤活性的必须基团内酯环结构受脂质体保护,延缓了血液对闭环 HCPT 的破坏。由图 5 可知,大部分采样时间点显示 HCPT 磁性脂质体尾静脉给药后血液中总 HCPT 浓度远高于 HCPT 注射液腹腔给药组和尾静脉给药组,这与脂质体缓释作用及其对闭环 HCPT 的保护作用有关。由表 1 可知,HCPT 磁性脂质体尾静脉给药组的体内药物代谢时间、体内滞留时间远远大于 HCPT 注射液尾静脉给药组;与 HCPT 注射液腹腔给药组相比,HCPT 磁性脂质体尾静脉给药能显著提高药物的血药浓度和生物利用度。综上所述,HCPT 磁性脂质体尾静脉给药可以显著提高药物血药浓度、生物利用度及其在体内的滞留时间。

3 讨论

HCPT 临床上常用的给药途径包括经腹腔或静脉给药,由于腹腔给药途径存在吸收过程会破坏脂质体结构的问题,故未设 HCPT 磁性脂质体腹腔给药组。本文研究结果表明与 HCPT 注射液尾静脉给药和腹腔给药相比,HCPT 磁性脂质体尾静脉给药由于脂质体的缓释作用及其对闭环 HCPT 的保护作用,可以显著提高药物血药浓度、生物利用度及其在体内的滞留时间,证实了选择磁性脂质体作为 HCPT 药物载体的可行性。已有研究报道了尾静脉

表 1 HCPT 注射液腹腔给药组, HCPT 注射液尾静脉给药组及 HCPT 磁性脂质体尾静脉给药组在大鼠体内的药物动力学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)
Table 1 Pharmacokinetic parameters of HCPT injection (intraperitoneal injection and intravenous injection) and HCPT magentoliposomes (intravenous injection) in rats ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

参数	单位	HCPT 注射液腹腔给药组	HCPT 注射液尾静脉给药组	HCPT 磁性脂质体尾静脉给药组
房室模型	-	二室	二室	二室
$t_{1/2\alpha}$	min	26.797 ± 6.411	3.072 ± 0.597	34.245 ± 3.245 ⁴⁾
$t_{1/2\beta}$	min	76.437 ± 5.859	28.686 ± 7.040	61.808 ± 2.549 ³⁾
V_1/F	L·kg ⁻¹	20.912 ± 6.280	0.637 ± 0.137	2.651 ± 0.863 ^{2,3)}
CL/F	L·min ⁻¹ ·kg ⁻¹	0.313 ± 0.091	0.067 ± 0.003	0.046 ± 0.001 ²⁾
AUC _{0-t}	mg·L ⁻¹ ·min	25.725 ± 5.458	103.955 ± 4.822	191.838 ± 5.717 ^{2,3)}
AUC _{0-∞}	mg·L ⁻¹ ·min	34.883 ± 10.245	150.668 ± 7.306	216.870 ± 3.271 ^{2,3)}
K_{10}	min ⁻¹	0.016 ± 0.004	0.113 ± 0.035	0.020 ± 0.007 ⁴⁾
K_{12}	min ⁻¹	0.016 ± 0.016	0.112 ± 0.016	0.011 ± 0.009 ⁴⁾
K_{21}	min ⁻¹	0.023 ± 0.014	0.039 ± 0.013	0.024 ± 0.011
MRT _{0-t}	min	64.878 ± 3.571	13.797 ± 2.373	60.338 ± 1.290 ³⁾
MRT _{0-∞}	min	112.630 ± 29.969	20.325 ± 4.288	72.255 ± 4.668 ³⁾
t_{max}	min	24.000 ± 0.127	6.000 ± 0.127	24.000 ± 0 ³⁾
C_{max}	mg·L ⁻¹	0.340 ± 0.066	4.537 ± 0.092	2.789 ± 0.158 ^{2,3)}

注:与 HCPT 注射液腹腔给药组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与 HCPT 注射液尾静脉给药组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。

注射 HCPT 脂质体及 HCPT 注射液后,总 HCPT 在大鼠和 Beagle 犬体内的药物动力学特征,结果表明脂质体可延缓 HCPT 在体内的消除,并推测脂质体可能会延长 HCPT 在体内的药效作用时间,从而具有更强的抗肿瘤活性^[13-14]。然而,闭环 HCPT 才是抗肿瘤的主要有效成分,只研究总 HCPT 的药物动力学特征并不全面,因此本课题在采样过程中同时检测了体内开环 HCPT 和闭环 HCPT 的浓度变化情况,以证实脂质体对闭环 HCPT 的保护作用,为进一步研究 HCPT 磁性脂质体体内抗肿瘤活性与闭环 HCPT 浓度之间的相关性提供参考。

以往报道在研究 HCPT 体内药物动力学特征时采用的均为传统血药浓度法^[13-14]。传统血药浓度法获得的是游离型药物与结合型药物的浓度之和,本实验关于 HCPT 血浆蛋白结合率的研究结果表明试验浓度项下 HCPT 与大鼠血浆蛋白呈高度结合(血浆蛋白结合率 > 72%),而药理学研究表明给药后体内发挥药效的为游离型药物^[11]。因此,相比传统血药浓度法,本研究通过微透析采样所获得的游离型药物浓度与药效之间关联更佳。且微透析技术兼有采样与纯化的双重作用,在实验过程中可大大减小样品前处理所带来的误差与变异,减少劳动力;每个实验动物即为完整样本,获得完整的药-时曲线,大大节约了实验动物^[15]。凌家俊等^[9]对 HCPT

磁性脂质体的磁靶向研究已证实磁性脂质体在外加磁场的引导下,能够发挥肿瘤局部靶向定位作用。综上所述,HCPT 磁性脂质体的大鼠体内药物动力学特征及磁靶向研究可为采用微透析采样技术研究其肿瘤局部药物动力学特征及肿瘤局部 PK-PD 结合模型的建立提供借鉴。

[参考文献]

[1] Zunino F, Dallavalle S, Laccabuea D, et al. Current status and perspectives in the development of camptothecins [J]. *Curr Pharm Des*, 2002, 8 (27): 2505-2520.

[2] 周建军,刘键,胥彬. 羟基喜树碱内酯环形式与其抗癌活性的关系 [J]. *中药药理学报*, 2001, 22 (9): 827-830.

[3] ZHANG X, CHEN B. Recombinant high density lipoprotein reconstituted with apolipoprotein AI cysteine mutants as delivery vehicles for 10-hydroxycamptothecin [J]. *Cancer Lett*, 2010, 298(1): 26-33.

[4] XIE X, YANG Y, LIN W, et al. Cell-penetrating peptide-siRNA conjugate loaded YSA-modified nanobubbles for ultrasound triggered siRNA delivery [J]. *Colloid Surface B Biointerfaces*, 2015, 136: 641-650.

[5] YANG Y, YANG Y, XIE X, et al. Dual-modified liposomes with a two-photon-sensitive cell penetrating peptide and NGR ligand for siRNA targeting delivery [J]. *Biomaterials*, 2015, 48: 84-96.

- [6] Kim C S, Duncan B, Creran B, et al. Triggered nanoparticles as therapeutics [J]. Nano Today, 2013, 8 (4): 439-447.
- [7] YANG Y, XIE X, XU X, et al. Thermal and magnetic dual-responsive liposomes with a cell-penetrating peptide-siRNA conjugate for enhanced and targeted cancer therapy [J]. Colloid Surface B Biointerfaces, 2016, 146: 607-615.
- [8] 陈翔, 凌家俊, 陈亮. 烟碱微透析回收率的体外测定方法及影响因素研究 [J]. 广州中医药大学学报, 2010, 27(2): 159-163.
- [9] 凌家俊, 古锦辉, 谢毅, 等. 羟基喜树碱磁性脂质体的制备及其靶向性特征试验 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(16): 19-23.
- [10] 古锦辉, 凌家俊, 谢毅, 等. 羟基喜树碱脂质体的制备与性质研究 [J]. 北方药学, 2012, 9(4): 23-24.
- [11] 黄勇, 牟景丽, 陈慧, 等. 平衡透析法、超滤法结合液质联用技术比较测定注射用复方荛草中黄酮类成分的血浆蛋白结合率 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(20): 91-96.
- [12] 谢波, 凌家俊, 吴秀君, 等. 微透析技术用于化疗药物-吉西他滨体内药动学的初步研究 [J]. 中药临床药理学与治疗学, 2010, 15(9): 1035-1039.
- [13] 易跃能, 吴文质. 大鼠血浆内羟基喜树碱脂质体冻干剂的测定及其药动学研究 [J]. 长沙医学院学报, 2016(2): 48-52.
- [14] 黄毅. 羟基喜树碱脂质体的研制及动物药代动力学研究 [D]. 重庆: 第三军医大学, 2004.
- [15] ZHANG Y J, WU L, YUAN Y, et al. Pharmacokinetics of phenolic compounds of Danshen extract in rat blood and brain by microdialysis sampling [J]. J Ethnopharmacol, 2011, 136(1): 129-136.

[责任编辑 刘德文]

《中国实验方剂学杂志》简介

《中国实验方剂学杂志》主编为吴以岭院士,由国家中医药管理局主管,中国中医科学院中药研究所和中华中医药学会共同主办。以报道、介绍中医药研究为主旨的专业性学术期刊,创刊于 1995 年 10 月,目前为半月刊。

随着中医药政策扶持力度的加大和中医药科技创新的振兴,在中医药事业蓬勃发展的进程中,《中国实验方剂学杂志》也进入快速发展阶段! 以下是本刊在各权威数据库中的最新评价数据及收录情况:

①中国知网《中国学术期刊影响年报》(2016 年版):影响力指数(CI)学科排序 3/122(中医药类 122 本期刊中排第 3 名);复合影响因子 1.319,学科排序 9/122;

②万方数据《中国科技期刊引证报告(扩刊版)》: H 指标为 16,总被引频次 15 664,复合影响因子 1.620,在中医药类 122 本期刊中排序分别为第 2, 2, 11 名;

③入选“中国科学引文数据库来源期刊”(CSCD 2015—2016);

④入选最新版《北大中文核心期刊要目总览》(2014 年版);

⑤入选“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊 2016 年版);

⑥被评为“RCCSE 中国权威学术期刊(A+)”(《中国学术期刊评价研究报告(武大版)(2017—2018)》)。