DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.06.018
第26卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 6
2004年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2004

文章编号:1000-5404(2004)06-0517-03

论著

羟基喜树碱脂自制质体注射液与市售注射液家兔体内药代动力学行为的比较

黄 毅[1],刘松青[1],林 彩[1],穆海川[1],王 昆[2],周桃莉[2] (第三军医大学:[1]西南医院药剂科,[2]基础医学部病原生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 比较自制羟基喜树碱脂质体注射液(hydroxycamptothecin liposomes injection, L-HCPT)和市售羟基喜树碱注射液(market hydroxycamptothecin injection, M-HCPT)在家兔体内的药代动力学行为。方法 分别静脉注射单剂量(1 mg/kg)的L-HCPT和M-HCPT,用HPLC法测定血浆中的药物浓度,用3p87程序和SPSS软件处理和分析数据,计算有关药代动力学参数。结果 经3p87程序拟合,家兔静脉注射单剂量L-HCPT和M-HCPT后,其血药浓度-时间数据分别符合权重为1/C/C的二室模型;静脉注射L-HCPT和M-HCPT后Cmax分别为3.176 8、1.521 9 μg/ml,$t_{1/2\beta}$分别为33.990 7、29.392 9 min,AUC分别为28.851 5、11.655 1 μg·min·ml^{-1},CL分别为0.035 0、0.086 0 L·min^{-1}·kg^{-1},Vc分别为0.270 0、0.640 0 L/kg,可见L-HCPT比M-HCPT注射后具有更高的血药浓度水平,较长的消除半衰期,更大的血药浓度-时间曲线下面积,较低的总体清除率和较小的表观分布容积。结论 L-HCPT和M-HCPT在家兔体内的一些重要的药代动力学特性发生了明显改变,有利于HCPT疗效的增加。

关键词:羟基喜树碱;药代动力学;脂质体;高效液相色谱法
中图法分类号:R944.11;R969.1;R979.19 文献标识码:A

Comparison of the pharmacokinetic characteristics of hydroxycamptothecin liposomes injection with market hydroxycamptothecin injection in rabbits after intravenous administration

HUANG Yi[1], LIU Song-qing[1], LIN Cai[1], MU Hai-chuan[1], WANG Kun[2], ZHOU Tao-li[2] ([1]Department of Pharmacy, Southwest Hospital; [2]Department of Pathogenic Biology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To compare the pharmacokinetic characteristics of hydroxycamtothecin liposomes injection (L-HCPT) with market hydroxycamtothecin injection (M-HCPT) in rabbits administrated intravenously. **Methods** L-HCPT and M-HCPT were intravenously administrated to rabbits at a single dosage of 1 mg/kg. The HCPT plasma concentrations were determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The pharmacokinetic parameters were calculated and analyzed using 3P87 program and SPSS software. **Results** The concentration-time data of L-HCPT and M-HCPT after a single intravenous administration were fitted to two-compartment model with a weight of 1/C/C. The Cmax of L-HCPT and M-HCPT was 3.176 8 μg/ml and 1.521 9 μg/ml. $t_{1/2\beta}$ was 33.990 7 min and 29.392 9 min. AUC was 28.851 5 μg·min·ml^{-1} and 11.655 1 μg·min·ml^{-1}. CL was 0.035 0 L·min·kg^{-1} and 0.086 0 L·min·kg^{-1}. Vc was 0.270 0 L/kg and 0.640 0 L/kg, respectively. Compared with those of M-HCPT, higher plasma concentration levels, longer elimination of half life, larger area under the curve values and lower clearance, smaller apparent volume of distribution of L-HCPT were found. **Conclusion** There are obvious changes of pharmacokinetic properties of L-HCPT and M-HCPT after injection to rabbits, which is helpful to improve the therapeutic effect of HCPT.

Key words: hydroxycamptothecin; pharmacokinetics; liposome; high performance liquid chromatography

羟基喜树碱(hydroxycamptothecin, HCPT)为喜树中提取的生物碱类抗肿瘤药物。在动物实验和临床试验中证明有较强的抗癌作用,对多种恶性肿瘤有肯定的疗效。其剂量限制性毒性为骨髓抑制和消化道反应,随剂量加大,两种不良反应的发生率和强度也呈线性增加[1]。国内以HCPT钠盐溶于水后形成注射液用于临床,静脉滴注时,其分布半衰期($t_{1/2\alpha}$)为0.052 3~

作者简介:黄 毅(1978-),男,湖北省汉川市人,硕士研究生,主要从事脂质体药物研究临床药理学方面的研究。电话:(023)68754234

收稿日期:2003-10-30;修回日期:2004-02-28

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

0.613 h, 消除半衰期($t_{1/\beta}$)为 1.03 ~2.42 h[2]; HCPT 大鼠静脉注射, 分布半衰期($t_{1/2\alpha}$)为1.9~3.1 min, 消除半衰期($t_{1/\beta}$)为 17.7~43.3 min[3], 据此认为其代谢较快, 半衰期短。为了提高疗效, 临床常需延长给药时间或延长疗程, 但剂量限制性毒性也随之增加。脂质体作为抗肿瘤药物的载体很有发展前途, 由于它对肿瘤组织具有靶向性和缓释性, 在肿瘤组织能保持较高的药物浓度, 持续作用时间长, 全身吸收药量较少, 减少了抗肿瘤药物的副作用, 显示了其特有的优越性[4]。进行HCPT 脂质体研究, 有利于改进其体内代谢快, 半衰期短的缺点, 以达到稳定血中药物浓度、提高抗肿瘤疗效、降低毒性的目的。目前国内外尚少见羟基喜树碱脂质体注射液(hydroxycamptothecin liposomes injection, L-HCPT)的有关报道, 为此本研究对自制 L-HCPT 与市售羟基喜树碱注射液(market hydroxycamptothecin injection, M-HCPT)在家兔体内的药代动力学行为进行了比较, 为进一步开发 L-HCPT 用于临床提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 药品和试剂

羟基喜树碱标准品(湖北黄石飞云制药有限公司); 羟基喜树碱注射液, 规格 2 ml: 2 mg(湖北黄石飞云制药有限公司); 羟基喜树碱脂质体制剂, 规格 2 ml: 2 mg(自制); 甲醇, 乙晴(色谱纯, 美国 Fisher scientific 公司); 其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器

Waters Alliance 高效液相色谱系统: Waters 2690 型分离系统, 474 型荧光检测器和 Millennium32 色谱工作站(美国 Waters 公司); 纯水器(Milli-Q 型, 美国 Millipore 公司); 电子天平(BP211D 型, 德国 Sartorius 公司); 振荡混合器(YKH-Ⅱ型, 江西医疗器械厂); 高速离心机(3531 型, 德国 ABBOTT 公司)。

1.3 动物

家兔 6 只, 雌雄各半, 体质量 2.35~3.15 kg (由第三军医大学实验动物中心提供)。

1.4 血浆羟基喜树碱 HPLC 检测方法

1.4.1 色谱条件 色谱柱: Waters C18 3.9 mm× 150 mm 柱; 流动相: 0.075 mol/L 醋酸铵缓冲液-乙腈 (80∶20), 加磷酸三乙胺使最终浓度为 5 mmol/L; 流速: 1.0 ml/min; 柱温: 30 ℃; 检测器波长: 激发波长 363 nm, 发射波长 550 nm; 进样量: 10 μl。

1.4.2 血浆样品的处理与测定 精密吸取 100 μl 血浆样品置 1.5 ml 离心管中, 加入 10 μl 冰醋酸振荡混匀, 避光放置 2 h, 再加入 200 μl 甲醇∶乙腈(1∶3)混合液, 振荡混匀 20 s, 13 000 r/min 离心 5 min, 取上清液进样分析。

1.4.3 血浆标准曲线的制定 取空白家兔血浆 10 份, 依次加入羟基喜树碱标准溶液, 使血浆药物浓度分别为 2、5、10、25、50、100、250、500、1 000、2 000 ng/ml, 按"血浆样品的处理与测定"操作, 以血药浓度(X)对峰面积(Y)进行线性回归, 求得血浆药物标准曲线方程。

1.4.4 HPLC 方法学考察 按照标准曲线的制备方法, 分别配制 25、250、2 000 ng/ml 的羟基喜树碱血浆样品, 按"血浆样品的处理与测定"项操作, 考察羟基喜树碱血样测定的方法回收率、日内和日间精密度。以血浆样品标准曲线羟基喜树碱得量与羟基喜树碱加入量之比求算方法回收率; 血浆样品 1 d 内按"血浆样品的处理与测定"平行操作 5 次, 测得日内精密度; 连续 5 d 每 d 1 次进行血浆样品处理和分析, 测得日间精密度。取空白血浆加入一定量的羟基喜树碱标准品, 制得 2 ng/ml 的样品, 按前法处理进样, 测定其峰高与噪音, 以信噪比大于或等于 3 计算羟基喜树碱的最低检测浓度。

1.5 家兔体内的药代动力学试验

将 6 只家兔禁食过夜, 分为两组, 分别交叉从耳缘静脉注射羟基喜树碱脂质体或羟基喜树碱注射液, 给药剂量均为 1 mg/kg。于给药后 2、5、10、15、20、30、60、120、240 min 从耳缘静脉采取血样 1~2 ml, 置肝素抗凝管中, 13 000 r/min 离心 5 min 后分离血浆, 按"血浆样品的处理与测定"处理分析。

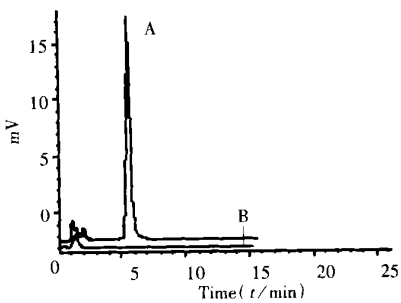
1.6 统计学分析

数据用 SPSS 软件进行相关分析及 t 检验; 应用 3P87 药代动力学计算程序进行房室模型拟合, 并求得药代动力学参数。

2 结果

2.1 色谱行为

在本试验色谱条件下, 羟基喜树碱和空白血浆的色谱分离情况如图 1, 羟基喜树碱的保留时间为 5.852 0 min。羟基喜树碱与空白血浆中的其他组分达到完全分离。



A: Chromatograms of hydroxycamptothecin (t_R= 5.852 0 min); B: Chromatograms of blank plasma

图 1 羟基喜树碱 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of hydroxycamptothecin and blank plasma

2.2 标准曲线

结果表明, 羟基喜树碱在 2~2 000 ng/ml 范围内, 线性良好, 标准曲线方程为: Y= 4 648.6X- 6 025.8, r= 0.999 9。

2.3 回收率与精密度

25、250、2 000 ng/ml 3 样品, 其回收率分别为(106.419 7±1.540 3)%、(95.141 9±0.541 5)%、(100.403 4±0.014 2)%。日内 RSD 分别为 1.197 3%、1.619 3%和 1.524 3%; 日间 RSD 分别

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

为 1 622 3%、2 324 2%、5. 895 1%(n=5)。

2.4　最低检测限

以信噪比大于或等于 3 计算, 本法羟基喜树碱的最低检测质量浓度为 0. 2 ng/ml。

本研究建立的用荧光检测器检测的 HPLC 分析方法灵敏度高, 特异性强, 而且回收率高, RSD(%)小, 可用于血浆中羟基喜树碱含量的测定。

2.5　药代动力学研究

家兔耳缘静脉单次注射 L-HCPT(1 mg/kg)和 M-HCPT(1 mg/kg)后, 血药浓度-时间曲线见图 2。血药浓度-时间数据采用 3P87 药代动力学计算程序进行房室模型拟合, 静注 L-HCPT 和 M-HCPT 的药时曲线符合权重因子为 1/C/C 的二室模型, 其主要药代动力学参数见表 1, 其中 Vc、AUC 和 CL 4 个参数 L-HCPT 与 M-HCPT 有显著性差异(P< 0. 05)。

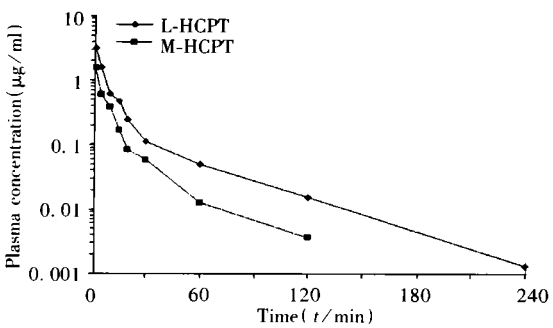


图 2　家兔静脉注射(1 mg/kg) L-HCPT 和 M-HCPT 后的血药浓度-时间曲线

Fig 2　Plasma concentration-time curve after i. v. administration of L-HCPT and M-HCPT to rabbits at dose of 1 mg/kg

表 1　家兔静注(1 mg/kg) L-HCPT 和 M-HCPT 后的药代动力学参数($\bar{x}\pm s$, n=6)

Tab 1　Pharmacokinetic parameters after intravenous administration of L-HCPT and M-HCPT (1 mg/kg) in rabbits ($\bar{x}\pm s$, n=6)

Parameter	Unit	L-HCPT	M-HCPT
A	μg/ml	3. 530 7±0. 570 5	1. 505 0±0. 290 5
α	1/min	0. 173 7±0. 019 1	0. 163 8±0. 033 2
B	μg/ml	0. 173 9±0. 029 9	0. 058 2±0. 006 2
β	1/min	0. 020 4±0. 002 8	0. 023 6±0. 005 8
Vc	L/kg	0. 270 0±0. 080 0 *	0. 640 0±0. 045 8
$t_{1/2\alpha}$	min	3. 990 2±0. 327 2	4. 230 6±0. 687 8
$t_{1/2\beta}$	min	33. 990 7±6. 663 2 *	29. 392 9±2. 531 9
K_{21}	1/min	0. 027 6±0. 008 5	0. 028 8±0. 009 3
K_{12}	1/min	0. 038 1±0. 010 2	0. 024 5±0. 004 8
K_{10}	1/min	0. 128 4±0. 025 6	0. 134 1±0. 022 5
AUC	μg·min·ml^{-1}	28. 851 5±3. 7808 *	11. 655 1±2. 030 7
CL	L·min^{-1}·kg^{-1}	0. 035 0±0. 009 2 *	0. 086 0±0. 019 0

*: P< 0. 05 *vs* M-HCPT

3　讨论

羟基喜树碱血浆浓度的检测采用 HPLC 法[3], 方法学研究表明, 通过对流动相比例的选择, 使羟基喜树碱与家兔血浆中的其他组分得到良好的分离。该分析方法灵敏度高, 特异性强, 且回收率高, RSD(%)小, 认为该方法可行, 检测结果可靠。

药代动力学参数表明, L-HCPT 和 M-HCPT 在家兔体内的药代动力学特征有显著不同。M-HCPT 体内代谢极快, 其仅 29. 392 9 min, 这与文献[3]报道的 17. 7～43. 3 min 相近。由于 M-HCPT 代谢快, 故静注 M-HCPT 2 h 后血中即未有检出 HCPT。L-HCPT 比 M-HCPT 注射后具有更高的血药浓度水平, 更大的 AUC 面积, 较长的和较低的 CL, 血药浓度也可维持至 4 h。组织分布试验表明羟基喜树碱制成脂质体后在动物体内配置发生了变化, 其在肝脏、脾脏等组织分布较多(待发表)。结合羟基喜树碱制成脂质体后其血中明显延长, 我们可认为肝脾等脏器作为药物储库将药物缓慢释放回放血液中, 这与文献[5, 6]报道相符。表明本研究制备的 L-HCPT 具有较明显的肝靶向性分布和缓释作用。以上结果还表明: L-HCPT 的清除率降低, 血浆药物浓度提高, 延长了 HCPT 在循环系统内的滞留时间, 使 HCPT 在血浆中的浓度能维持较长时间, 也使得为了提高 HCPT 的治疗效果, 而延长给药时间或疗程, 从而产生较明显毒性的问题有希望得以解决。

参考文献:

[1] 张　力, 李　苏, 廖　海, 等. 羟基喜树碱Ⅰ期药代动力学及人体耐受性临床研究[J]. 癌症, 2001, 20(12): 1391－1395.

[2] 李　书, 姜文奇, 张　力, 等. 羟基喜树碱不同给药方式的药理学比较[J]. 中国临床药理学杂志, 2001, 17(6): 427－430.

[3] Zhang R W, Li Y F, Cai Q Y, *et al*. Preclinical pharmacology of the natural product anticancer agent 10-hydroxycamptothecin, an inhibitor of topoisomerase I[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 1998, 41(7): 257－267.

[4] David L E. Liposomal delivery of camptothecins[J]. Pharm Sci Technol Today, 2000, 3(6): 205－209.

[5] David L E, Ray B, Eric B, *et al*. Antitumor efficacy, pharmacokinetics, and biodistribution of NX 211: A Low-Clearance liposomal formulation of lurtotecan[J]. Clini Canc Res, 2000, 6(7): 2903－2912.

[6] LI M, Paola B, Silvia A, *et al*. Preparation, characterization, cytotoxicity and pharmacokinetics of liposomes containing docetaxel[J]. J Controlled Release, 2003, 91(5): 417－429.

(编辑　冯崇英)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net