

## 依托泊苷亚微乳在大鼠体内的药动学研究

李 寨<sup>1</sup>, 陆 榕<sup>2</sup>, 李荣珊<sup>3</sup>, 冉瑞雪<sup>3\*</sup>

1. 天津医学高等专科学校, 天津 300222

2. 天津药物研究院 释药技术与药代动力学国家重点实验室, 天津 300193

3. 天津医科大学 药学院, 天津市临床药物关键技术重点实验室, 天津 300070

**摘要:** 目的 研究依托泊苷亚微乳在大鼠体内的药动学特征, 并与依托泊苷注射剂比较。方法 大鼠随机分为4组, 每组6只, 分别尾 iv 依托泊苷亚微乳 2.5、5.0、10.0 mg/kg 以及依托泊苷注射剂 5 mg/kg, 于给药后 0.033、0.167、0.333、0.667、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、5、6 h 取血。采用 HPLC 法测定大鼠全血中依托泊苷。结果 大鼠 iv 依托泊苷亚微乳 2.5、5、10 mg/kg 后的药动学参数分别为  $t_{1/2}$ : 0.37、0.43、0.46 h;  $C_0$ : 4.72、8.7、15.5 mg/L;  $AUC_{0-t}$ : 1.57、2.84、6.21 mg·h/L。大鼠尾 iv 依托泊苷注射剂 5 mg/L 后的药动学参数分别为:  $t_{1/2}$  为 0.34 h,  $C_0$  为 7.53 mg/L,  $AUC_{0-t}$  为 2.63 mg·h/L。依托泊苷亚微乳给药剂量在 2.5~10 mg 时,  $t_{1/2}$  无显著差异,  $C_0$ 、 $AUC_{0-t}$  呈剂量相关性, 符合线性药动学特点。与注射剂比较, 依托泊苷亚微乳的  $t_{1/2}$  延长, AUC 增大。结论 依托泊苷亚微乳的生物利用度有所提高, 但半衰期仍然较短。

**关键词:** 依托泊苷亚微乳; 依托泊苷注射剂; 依托泊苷; 血药浓度; 药动学

中图分类号: R969.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2015)08-0938-05

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2015.08.007

## Pharmacokinetic study of Etoposide Submicron Emulsion in rats

LI Zhai<sup>1</sup>, LU Rong<sup>2</sup>, LI Rong-shan<sup>3</sup>, RAN Rui-xue<sup>3</sup>

1. Tianjin Medical College, Tianjin 300222, China

2. State Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Pharmacokinetics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

3. Tianjin Key Laboratory on Technologies Enabling Development of Clinical Therapeutics and Diagnosis, School of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

**Abstract: Objective** To study the pharmacokinetic characteristics of Etoposide Submicron Emulsion in rats and compare with Etoposide Injection. **Methods** Rats were randomly divided into four groups, and each group had six rats. Etoposide Submicron Emulsion at doses of 2.5, 5, and 10 mg/kg and Etoposide Injection at dose of 5 mg/kg were iv administrated. Blood samples were collected at 0.033, 0.167, 0.333, 0.667, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 5, and 6 h. Etoposide in rat whole blood were determined by HPLC method. **Results** Pharmacokinetic parameters of Etoposide Submicron Emulsion were as follows:  $t_{1/2}$  0.37, 0.43, and 0.46 h,  $C_0$  4.72, 8.7, and 15.5 mg/L,  $AUC_{0-t}$  1.57, 2.84, and 6.21 mg·h/L, respectively. And pharmacokinetic parameters of Etoposide Injection were as follows:  $t_{1/2}$  0.34 h,  $C_0$  7.53 mg/L, and  $AUC_{0-t}$  2.63 mg·h/L. There was no significant difference of  $t_{1/2}$  for Etoposide Submicron Emulsion at dosage from 2.5 to 10 mg, while  $C_0$  and  $AUC_{0-t}$  were both dose dependent. Etoposide Submicron Emulsion presented a linear pharmacokinetic behavior. Compared with Etoposide Injection, AUC and  $t_{1/2}$  of Etoposide Submicron Emulsion increased. **Conclusion** Bioavailability of Etoposide Submicron Emulsion is improved, but half-life is still relatively short.

**Key words:** Etoposide Submicron Emulsion; Etoposide Injection; etoposide; blood concentration; pharmacokinetics

依托泊苷是一种新型抗肿瘤药物, 它能够特异性地作用于细胞周期, 干扰 DNA 拓扑异构酶 II<sup>[1-4]</sup>。目前国内外上市的依托泊苷制剂主要是口服胶囊和

静脉注射剂, 但是依托泊苷口服制剂生物利用度低, 而静脉注射剂为非水溶剂注射剂, 临用前用生理盐水稀释时容易形成细微沉淀, 引起较强的局部刺激;

收稿日期: 2015-03-24

作者简介: 李 寨 (1990—), 男, 湖南人, 学士, 从事药剂学研究。Tel: 15202221055 E-mail: 15202220155@163.com

\*通信作者 冉瑞雪 Tel: 15122047097 E-mail: ranruixue@tjmu.edu.cn

除此之外, 依托泊苷水溶液的化学稳定性差<sup>[5]</sup>。为了解决依托泊苷的水溶性问题及生物利用度问题, 药剂工作者结合注射脂肪乳或亚微乳安全、低毒、生物相容性好的特点, 拟将其制成亚微乳<sup>[6-8]</sup>。然而以亚微乳载药后是否会改变依托泊苷在体内的释药行为及药动学特征尚未清楚, 因此本实验通过 HPLC-UV 法测定依托泊苷在大鼠全血中的血药浓度, 研究了依托泊苷亚微乳在大鼠体内的药动学。

## 1 材料

### 1.1 药品与试剂

依托泊苷亚微乳, 规格 80 mg : 100 mL, 由天津药物研究院制剂室提供, 批号 20081204; 依托泊苷注射剂, 规格 0.1 g : 5 mL, 齐鲁制药有限公司, 批号 20081017; 依托泊苷对照品由中国食品药品检定研究院提供, 批号 20070404023; 内标非那西丁对照品由中国食品药品检定研究院提供, 批号 20081105019; 甲醇、醋酸乙酯均为色谱纯(天津市康科德科技有限公司); 试验用超纯水(石英亚沸高纯水蒸馏器自制)。

### 1.2 仪器

Agilent 1200 高效液相色谱仪; KH-851 型旋涡混合器(上海环宇仪器厂); 手动可调式微量移液器[大龙医疗设备(上海)有限公司]; TGL-16 型高速台式离心机(上海医疗器械六厂); 恒温水箱(北京医疗器械厂); B600 型低速自动平衡离心机(白洋离心机厂); DAS 2.0 计算程序(中国药理学会数学药理专业委员会编制)。

### 1.3 实验动物

Wistar 大鼠, 雌雄兼用, 体质量为 180~200 g, 购自中国医学科学院, 动物使用许可证号 SCXK(京)2005-0013。

## 2 方法与结果

### 2.1 对照品溶液和内标溶液的配制

精密称取依托泊苷对照品 25 mg, 置 25 mL 量瓶中, 用甲醇溶解, 并稀释至刻度, 制成 1 mg/mL 溶液, 作为储备液; 精密量取储备液适量, 用甲醇稀释制成 100  $\mu$ g/mL 标准储备液。4  $^{\circ}$ C 保存, 备用。

精密称取非那西丁对照品 12.5 mg, 置 100 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成 125  $\mu$ g/mL 内标储备液; 精密量取内标储备液适量, 用甲醇稀释制成 1.25  $\mu$ g/mL 非那西丁内标溶液。置 4  $^{\circ}$ C 保存, 备用。

### 2.2 全血样品的处理

精密吸取肝素抗凝的全血 200  $\mu$ L, 置离心管中, 精密加入内标溶液 50  $\mu$ L, 涡旋 15 s 混匀, 加入 2.5 mL 醋酸乙酯, 涡旋 3 min, 于 4 000 r/min 离心 5 min, 取上清液 2 mL 于玻璃管中, 于 40  $^{\circ}$ C 水浴中氮气吹干。以 100  $\mu$ L 流动相溶解, 于 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液 50  $\mu$ L, 即得。

### 2.3 色谱条件

日本资生堂 Capcell Pak C<sub>18</sub> 柱 (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu$ m); 流动相: 甲醇 - 20 mmol/L 甲酸铵水溶液 (41 : 59); 体积流量: 1 mL/min; 柱温: 40  $^{\circ}$ C; 检测波长: 240 nm。

### 2.4 标准曲线的制备

分别精密量取依托泊苷标准储备液适量, 用甲醇稀释制成 0.02、0.05、0.2、0.5、2、10、20  $\mu$ g/mL 依托泊苷系列溶液。精密量取上述系列溶液 200  $\mu$ L, 置离心管中, 加入全血 200  $\mu$ L, 按“2.2 全血样品的处理”项下方法处理样品, 进样分析。连续 3 d 每天处理一条标准曲线。以依托泊苷质量浓度为横坐标, 峰面积与内标峰面积的比值为纵坐标, 进行线性权重回归, 3 条标准曲线平均比值回归后, 得回归方程为  $Y=0.217 2 X+3.337\times 10^{-4}$ ,  $R^2=0.997 5$ , 线性范围为 0.2~20  $\mu$ g/mL。

### 2.5 专属性试验

在本色谱条件下, 依托泊苷的出峰时间在 12.9 min, 内标非那西丁出峰时间在 7.2 min, 峰形良好。全血中内源性物质对依托泊苷和非那西丁的测定无干扰, 色谱图见图 1。结果表明所建立的 HPLC-UV 测定法特异性较高, 灵敏度高, 能够用于全血中依托泊苷浓度的测定。

### 2.6 精密度和准确度试验

取空白全血 200  $\mu$ L, 置 5 mL 离心管, 分别精密加入 0.05、0.500、10.00  $\mu$ g/mL 依托泊苷标准储备液 200  $\mu$ L, 每种质量浓度各做 5 份。按“2.2 全血样品的处理”项下方法处理样品, 进样分析; 计算每个样品的质量浓度, 通过测得质量浓度与加入质量浓度的比值, 可计算得测定每批样品质量浓度的准确度。精密度同法操作和计算, 连续 3 d, 每天测定 1 批, 每种质量浓度各做 5 份, 通过测得质量浓度与加入质量浓度的比值, 可计算得日内和日间精密度。结果见表 1, 结果表明本测定法的准确度和精密度符合生物样品分析要求。

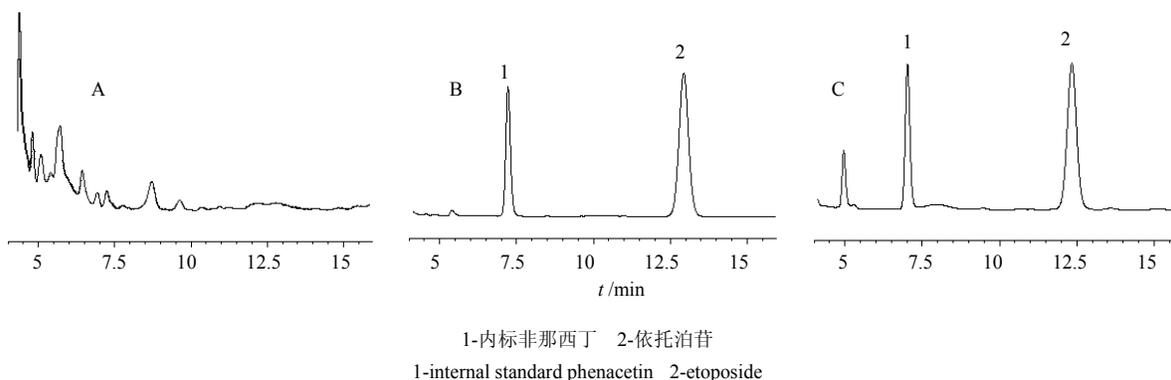


图 1 空白全血 (A)、10 µg/mL 依托泊苷对照品溶液+内标 (B) 和大鼠 iv 5 mg/kg 亚微乳后 10 min 的全血样品 (C) 的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of blank whole blood (A), 10 µg/mL etoposide reference substance added internal standard phenacetin (B), and whole blood after iv administration of submicron emulsion at a dosage of 5 mg/kg (C)

表 1 精密度试验和准确度试验结果 (n = 5)

Table 1 Results of precision and accuracy tests (n = 5)

理论质量浓度/(µg·mL <sup>-1</sup> )	日内精密度			日间精密度		
	实测质量浓度/(µg·mL <sup>-1</sup> )	RSD/%	RE/%	实测质量浓度/(µg·mL <sup>-1</sup> )	RSD/%	RE/%
0.05	0.047±0.005	10.2	-5.6	0.046±0.003	7.3	-7.6
0.50	0.490±0.035	7.1	-2.1	0.477±0.028	5.7	-4.6
10.00	10.600±0.273	2.6	5.7	10.200±0.535	5.3	1.6

## 2.7 提取回收率和基质效应

取空白全血 200 µL, 置 5 mL 离心管, 分别精密加入 0.05、0.5、10 µg/mL 依托泊苷标准储备液 200 µL, 每个质量浓度平行 5 份, 作为提取回收率样品; 另取 5 个不同来源空白全血同法处理, 取上清液, 加入依托泊苷和内标标准溶液, 配制以上高、中、低 3 个质量浓度的标准液, 每个浓度各做 5 份, 作为提取回收率对照样品和基质效应样品; 以水代替全血按同样方法配制及处理同上高、中、低 3 个质量浓度的标准液, 每个质量浓度各做 5 份, 作为基质效应对照样品。将以上样品进样, 记录峰面积, 提取回收率和基质效应分别为提取回收率和基质效应样品的峰面积与相应对照样品峰面积均值之比, 结果见表 2。依托泊苷的基质效应稳定, 适合样品测定; 依托泊苷的提取回收率较好, 全血基质对测定无影响。

## 2.8 稳定性试验

取含依托泊苷 0.05、0.50、10.00 µg/mL 大鼠全血, 分别考察室温放置 6 h、进样器放置 24 h、冻融 1 次、冻融 3 次、样品提取后干管冰冻 24 h, 以及冷冻保存 7、14 d 处置方法的稳定性, 样品处理方

表 2 提取回收率和基质效应试验结果 (n = 5)

Table 2 Results of recovery and matrix effect tests (n = 5)

理论质量浓度/(µg·mL <sup>-1</sup> )	提取回收率/%		基质效应	
	数值	RSD	数值	RSD
0.05	90.5±4.4	4.9	100.9±2.7	2.7
0.50	94.1±5.5	5.9	102.4±1.9	1.9
10.00	103.6±4.9	4.8	104.9±2.3	2.2

法按照“2.2 全血样品的处理”项下操作, 考察其药物浓度的变化, 每个质量浓度测定 3 份样品, 结果见表 3。结果显示含依托泊苷的全血在上述条件下稳定性良好。

## 2.9 药动学研究

**2.9.1 不同剂量亚微乳的药动学参数和药时曲线比较** 静脉注射依托泊苷亚微乳 2.5、5、10 mg/kg, 每个剂量组 6 只成年 Wistar 大鼠, 雌雄各半。于静注给药后 0.033、0.167、0.333、0.667、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、5 h (10 mg/kg 多取 6 h 的点) 眼眶后静脉丛取血 0.3 mL。按“2.2 全血样品的处理”项下方法处理样品, 血药浓度-时间曲线见图 2。

表3 稳定性试验结果 (n=5)

Table 3 Results of stability tests (n = 5)

理论质量浓度/( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	室温放置 6 h		进样器放置 24 h		冻融 1 次		冻融 3 次	
	实测质量浓度/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	RE/%	实测质量浓度/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	RE/%	实测质量浓度/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	RE/%	实测质量浓度/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	RE/%
0.05	0.047±0.002	-6.6	0.046±0.002	-8.3	0.046±0.002	-8.5	0.043±0.002	-11.4
0.5	0.489±0.012	-2.2	0.502±0.016	0.4	0.478±0.033	-4.4	0.496±0.018	-0.8
10	10.20±0.664	1.8	9.330±0.314	-6.6	10.400±0.153	4.3	8.910±0.087	-10.9
理论质量浓度/( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	干管冰冻 24 h		冷冻保存 7 d		冷冻保存 14 d			
	实测质量浓度/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	RE/%	实测质量浓度/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	RE/%	实测质量浓度/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	RE/%		
0.05	0.046±0.003	-8.3	0.044±0.001	-11.4	0.054±0.002	8.1		
0.5	0.462±0.017	-7.7	0.510±0.011	2.0	0.519±0.022	3.8		
10	9.970±0.398	-0.3	9.920±0.434	-0.8	10.500±0.473	5.3		

将全血浓度 - 时间数据用 DAS 2.0 药动学计算程序计算, 比较不同拟合结果, 参考 AIC、AE、 $R^2$ 、SBC 及 Fit times 等参数, 发现依托泊苷在大鼠体内的动力学过程符合二房室模型。用统计矩法计算 AUC,  $C_0$  为实测值, 药动学参数见表 4。

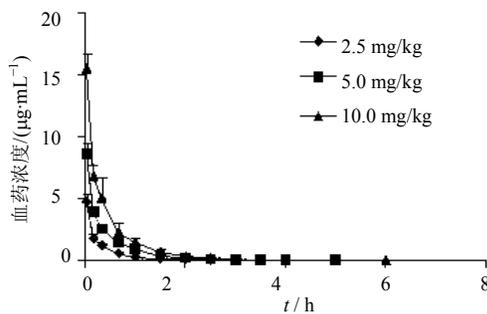


图2 大鼠 iv 依托泊苷注射乳剂后血药物浓度 - 时间曲线  
Fig. 2 Mean plasma concentration-time curves of etoposide submicron emulsion after iv administration

表4 大鼠静注依托泊苷亚微乳后药动学参数比较

Table 4 Comparison of pharmacokinetic parameters after iv administration of etoposide submicron emulsion

参数	单位	不同给药剂量下的数值		
		2.5 mg/kg	5 mg/kg	10 mg/kg
$t_{1/2}$	h	0.37	0.433	0.464
VL	$\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$	0.571	0.447	0.168
CL	$\text{L}/(\text{h}\cdot\text{kg})^{-1}$	2.955	1.599	0.754
$\text{AUC}_{0-t}$	$\text{mg}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$	1.568	2.844	6.214
$\text{AUC}_{0-\infty}$	$\text{mg}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$	1.733	3.128	6.744
$\text{MRT}_{0-t}$	h	0.476	0.578	0.577
$C_0$	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	4.72	8.7	15.542

2.9.2 亚微乳和普通注射剂的药动学参数和药时曲线比较 大鼠静脉给药 5 mg/kg 依托泊苷普通注射剂, 选用 6 只成年 Wistar 大鼠, 雌雄各半。于静注给药后 0.033、0.167、0.333、0.667、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、5 h 眼眶后静脉丛取血 0.3 mL, 按“2.2 全血样品的处理”项下操作处理样品, 血药浓度 - 时间曲线见图 3, 药动学参数比较见表 5。

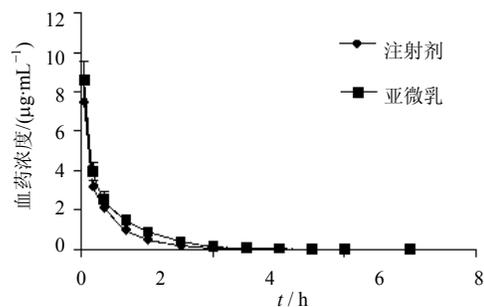


图3 大鼠 iv 依托泊苷注射剂、亚微乳血药浓度-时间曲线  
Fig. 3 Mean plasma concentration - time curves of etoposide after iv administration of etoposide injection and submicron emulsion

### 3 讨论

实验初期拟取大鼠血浆进行药动学研究, 但在进行样品测定时, 发现药物在血浆中分布较少, 样品测定精密度不好, 这可能是因为部分依托泊苷未从亚微乳中游离出来, 取血离心后得到血浆中药物浓度较低, 因此本实验采用全血对依托泊苷亚微乳进行药动学评价研究。以全血作为生物样本时, 需要特别注意全血样品的保存及处理, 全血采集后要

表 5 大鼠分别静脉注射依托泊苷注射剂和亚微乳后药动学参数

Table 5 Pharmacokinetic parameters of etoposide after iv administration of etoposide injection and etoposide submicron emulsion

参数	单位	注射剂	亚微乳
$t_{1/2}$	h	0.340	0.433
VL	L·kg <sup>-1</sup>	0.422	0.447
CL	L/(h·kg) <sup>-1</sup>	1.74	1.599
AUC <sub>0-t</sub>	mg·h·L <sup>-1</sup>	2.63	2.844
AUC <sub>0-∞</sub>	mg·h·L <sup>-1</sup>	2.89	3.128
MRT <sub>0-t</sub>	h	0.477	0.578
C <sub>0</sub>	mg·L <sup>-1</sup>	7.53	8.7

及时冰冻保存, 尽量避免多次反复冻融, 保持全血的新鲜程度。

不同剂量依托泊苷亚微乳的药动学参数和药时曲线比较的结果表明, Wistar 大鼠静注 2.5、5、10 mg/kg 后, 依托泊苷在全血中消除迅速,  $t_{1/2}$  分别为 (0.37±0.06)、(0.43±0.44)、(0.46±0.10) h, 3 个剂量的 C<sub>0</sub> 分别为 (4.72±0.74)、(8.7±1.05)、(15.5±1.21) mg/L; AUC 分别为 (1.57±0.30)、(2.84±3.22)、(6.21±0.92) mg/(L·h), 3 个剂量之间的 C<sub>0</sub>、AUC 呈良好的线性关系 ( $R>0.99$ )。说明依托泊苷亚微乳剂量在 2.5~10 mg 符合线性药动学特点。

大鼠分别静脉注射 5 mg/kg 的普通注射剂和亚微乳后,  $t_{1/2}$  分别为 (0.34±0.024)、(0.43±0.44) h, C<sub>0</sub> 分别为 (7.53±1.30)、(8.7±1.05) mg/L; AUC 分别为 (2.63±0.26)、(2.84±3.22) mg/(L·h)。大鼠静注依托泊苷普通注射剂和亚微乳后的药动学试验显示, 依托泊苷亚微乳剂普通注射剂比较  $t_{1/2}$  有所延长、AUC 增大, C<sub>0</sub> 基本不变。这可能是因为依托泊苷包含于亚微乳乳滴的中心, 药物从载药乳剂的油相进入到水相需要一定的时间, 导致代谢减慢, 血药浓度相对增加, 使得 AUC 增大, 清除率降低<sup>[9]</sup>。

可以看出, 依托泊苷亚微乳制剂与普通注射剂

比较, 药物的生物利用度有所提高, 但半衰期仍然较短。为了延长依托泊苷亚微乳在体内的驻留时间, 已经将制备条件优化, 制成依托泊苷长循环微乳制剂<sup>[10]</sup>, 相关药动学研究有待进一步展开。

#### 参考文献

- [1] Beijnen J H, Holthuis J J M, Kerkdijk H G, *et al.* Degradation kinetics of etoposide in aqueous solution [J]. *Int J Pharm Sci*, 1988, 41(1/2): 169-178.
- [2] Smit E F, Camey D N, Harford P, *et al.* Phase II study of oral etoposide in elderly patients with small cell lung cancer [J]. *Thorax*, 1989, 44(8): 257-263.
- [3] Hande K R. Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor [J]. *Eur J Cancer*, 1998, 34(10): 1514-1521.
- [4] Sinkule J A. Etoposide: a semisynthetic epipodophyllotoxin. Chemistry, pharmacology, pharmacokinetics, adverse effects and use as an antineoplastic agent [J]. *Pharmacotherapy*, 1984, 4(2): 61-73.
- [5] Shah J C, Chen J R, Chow D. Preformulation study of etoposide: identification of physicochemical characteristics responsible for the low and erratic oral bioavailability of etoposide [J]. *Pharm Res*, 1989, 6(5): 408-412.
- [6] Gao Z G, Choi H G, Shin H J, *et al.* Physicochemical characterization and evaluation of a microemulsion system for oral delivery of cyclosporin A [J]. *Int J Pharm*, 1998, 161(1): 75-86.
- [7] Venkateswarlu V, Patlolla R R. Lipid microspheres as drug delivery systems [J]. *Ind J Pharm Sci*, 2001, 63(6): 450-458.
- [8] Möller R H, Schmidt S, Buttle I, *et al.* Sol Emulsi novel technology for the formulation of i.v. emulsions with poorly soluble drugs [J]. *Ind J Pharm Sci*, 2004, 269(2): 293-302.
- [9] Chen H, Shi S, Zhao M M, *et al.* A lyophilized etoposide submicron emulsion with a high drug loading for intravenous injection: preparation, evaluation, and pharmacokinetics in rats [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2010, 36(12): 1444-1453.
- [10] 李华龙, 尹东东, 王杏林. 依托泊苷长循环亚微乳的制备和理化性质研究[J]. *现代药物与临床*, 2013, 28(2): 164-169.