

胆酸偶联喜树碱衍生物 E2、G2 的稳定性研究

沈沁, 周蕾蕾, 李庆勇*, 翁琪, 郑沂欣

浙江工业大学 药学院, 浙江 杭州 310000

摘要: **目的** 考察胆酸偶联喜树碱衍生物 20(S)-O-甘氨酸-脱氧胆酸喜树碱 (E2)、20(S)-O-醋酸-脱氧胆酸喜树碱 (G2) 在大鼠血浆和人工胃肠液中的稳定性。**方法** 建立并优化高效液相色谱法, 测定并比较 E2、G2 和喜树碱在大鼠血浆和人工胃肠液中的稳定性。**结果** 在血浆和人工胃肠液中三者均有不同程度的减少, 但 E2、G2 减少量均低于喜树碱。相对于人工胃肠液, 三者在大鼠血浆中减少最为明显。三者在 3 种生物基质中发生了相似的降解, E2、G2 主要发生水解生成喜树碱, 而喜树碱则主要发生了内酯环开环。**结论** 通过偶联胆酸合成得到的喜树碱衍生物在生物基质中具有明显高于喜树碱的稳定性, 有助于维持喜树碱药效团内酯环的稳定。

关键词: 胆酸; 喜树碱; 20(S)-O-甘氨酸-脱氧胆酸喜树碱; 20(S)-O-醋酸-脱氧胆酸喜树碱; 稳定性; 大鼠血浆; 人工胃肠液
中图分类号: R927.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2018)05-1019-05

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2018.05.003

Stability of camptothecin analogues conjugated with bile E2 and G2

SHEN Qin, ZHOU Lei-lei, WENG Qi, ZHENG Yi-xin, LI Qing-yong

College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China

Abstract: Objective To investigate the stability of the two novel camptothecin analogues conjugated with bile acid, 20(S)-O-glycine-deoxycholate camptothecin (E2) and 20(S)-O-acetate-deoxycholate camptothecin (G2), in the rat plasma, simulated gastric fluid, and simulated intestinal fluid. **Methods** HPLC-UV methods were optimized, and the changes of the content of the compound in biological matrix were detected. **Results** The contents of E2, G2 and camptothecin in the three biological matrixes were decreased with varying degrees, but decrements of E2 and G2 were lower than those of camptothecin. Compared to those in simulated gastric fluid and simulated intestinal fluid, the reductions were most obvious in rat plasma. The related chromatograms revealed a similar degradation of E2, G2, and camptothecin, through which the lactone in camptothecin were hydrolyzed, and E2 and G2 were hydrolyzed to produce camptothecin with a lactone. **Conclusion** The synthesis of camptothecin derivatives obtained by coupling cholic acid would significantly improve the stability of camptothecin in the biological matrixes, and remains a E-ring form of camptothecin, which keeps the antitumor activity.

Key words: bile acid; camptothecin; 20(S)-O-glycine-deoxycholate camptothecin; 20(S)-O-acetate-deoxycholate camptothecin; stability; rat plasma; simulated gastric fluid and simulated intestinal fluid

胆酸偶联喜树碱衍生物 20(S)-O-甘氨酸-脱氧胆酸喜树碱 (E2)、20(S)-O-醋酸-脱氧胆酸喜树碱 (G2) 是课题组前期合成的两个新型喜树碱衍生物 (图 1), 实验显示它们在体内外均显示了良好的抑瘤效果, 对肝细胞具有良好的靶向性, 且具有浓度依赖性, 较低的细胞毒性^[1]。药物在进入体内参与体循环过程中保持一定的稳定性是其在体内发挥目

标药理作用的基础^[2], 其中最为基础的是血浆稳定性, 血浆中含有多种水解酶, 如胆碱酯酶、醛缩酶、脂肪酶等, 如果化合物与这些酶具有亲和力并具有水解的基团就可能在血浆中被分解, 从而在体内无法达到有效药物浓度。E2、G2 是分别通过酰胺键和酯键连接胆酸得到的喜树碱衍生物, 对其血浆稳定性进行研究有助于进一步了解其在体内的消除方

收稿日期: 2018-01-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31270397)

作者简介: 沈沁, 女, 硕士生, 研究方向为药物分析。Tel: 18868816251 E-mail: 812789665@qq.com

*通信作者 李庆勇 Tel: (0571)88320984 E-mail: liqy@zjut.edu.cn

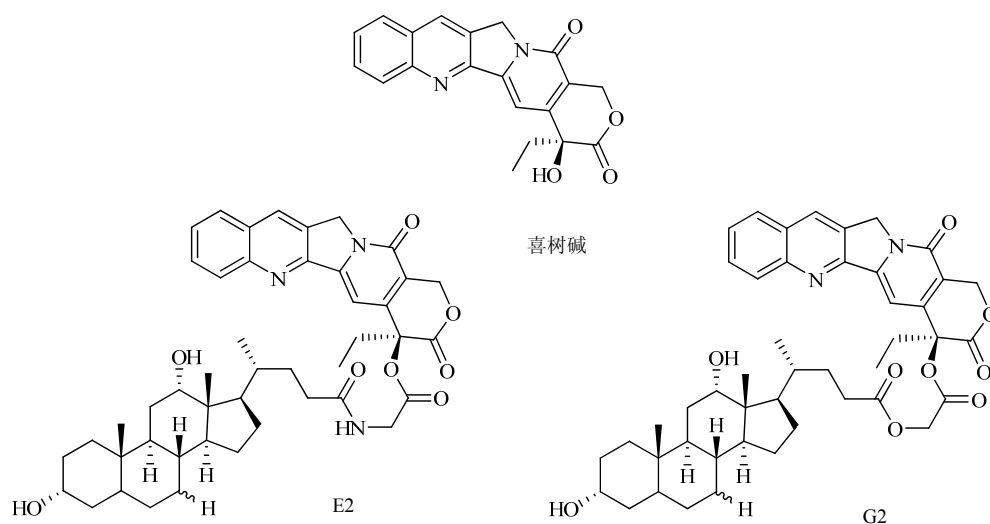


图1 E2、G2和喜树碱的结构

Fig. 1 Chemical structure of E2, G2, and camptothecin

式以及体内活性差异的原因。此外，由于胆酸为口服性药物载体，口服药物吸收的主要场所在胃肠道，胃肠液中的 pH 值与蛋白酶可能会令药物降解失活，以至直接影响药物的吸收^[3-4]，故进行胃肠道的稳定性研究也具有一定的价值

1 仪器与试剂

岛津高效液相色谱仪 (LC-20A 泵, SPD-20A 检测器, CTO-10AS VP 柱温箱), Applied Biosystem; AL204 型电子天平, Mettler Toledo 公司; MiniSpin 高速离心机, 德国 Eppendorf 公司。

喜树碱 (广州市生化制品有限公司提供, 质量分数 >98%)、喜树碱衍生物 E2、G2 (实验室自制, 质量分数 >98%)、乙腈 (TEDIA, LC-MS)、甲醇 (TEDIA, LC-MS)、纯净水 (杭州娃哈哈公司)、甲酸 (分析纯, 安徽安特食品股份有限公司)、二甲基亚砜 (DMSO, 北京百灵威科技有限公司)、大鼠血浆 (上海榕柏生物技术有限公司)、胃蛋白酶 (Aladdin)、胰蛋白酶 (Aladdin)。

2 方法与结果

2.1 溶液的配制

2.1.1 人工胃液的配制 量取稀盐酸 1.64 mL, 加入 80 mL 水、1.0 g 胃蛋白酶使其溶解后, 定容至 100 mL, 即得人工胃液 (pH 值约为 2)。

2.1.2 人工肠液的配制 称取磷酸二氢钾 0.68 g, 加入 50 mL 水使其溶解完全, 滴加 0.4% NaOH 调节 pH 值至 6.8, 加入 1.0 g 胰蛋白酶使其溶解完全, 加水定容至 100 mL, 即得人工肠液。

2.2 样品处理

对于人工胃液孵育样品, 孵育一定时间后, 量取 100 μ L 置离心管, 滴加 0.5 mol/L NaOH, 调节 pH 值至 7 后, 加入 300 μ L 冰甲醇, 涡旋混匀 20 s, 10 000 r/min 离心 20 min, 上层清液用 0.25 μ m 微孔滤膜过膜, 即得。

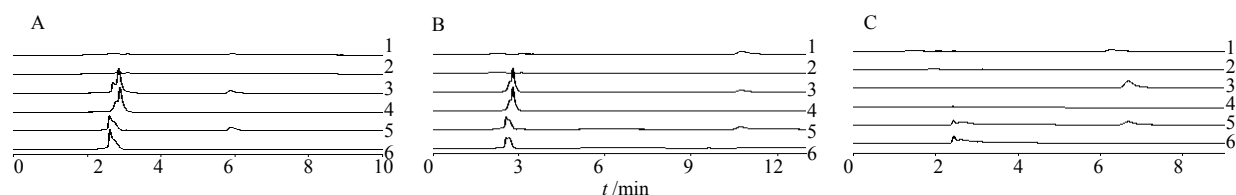
对于人工肠液样品, 孵育一定时间后, 量取 100 μ L 置离心管, 加入 300 μ L 冰乙腈, 涡旋混匀 20 s, 10 000 r/min 离心 20 min, 上层清液用 0.25 μ m 微孔滤膜过膜, 即得。

对于大鼠血浆样品, 孵育一定时间后, 量取 50 μ L 置离心管, 加入 180 μ L 终止剂冰甲醇-乙腈 (1:20), 涡旋混匀 20 s, 10 000 r/min 离心 20 min, 上层清液用 0.25 μ m 微孔滤膜过膜, 即得。

2.3 方法学考察试验

2.3.1 色谱条件 Sinochrom ODS-BP 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈-0.1%甲酸 (80:20) (E2、G2)、乙腈-0.1%甲酸 (60:40) (喜树碱); 检测波长: 365 nm; 体积流量: 1 mL/min; 柱温: 35 $^{\circ}$ C; 进样量: 20 μ L。

2.3.2 系统适应性试验 取空白生物基质样品以及 E2、G2、喜树碱的含药生物样品经处理后进样分析, 结果见图 2。E2、G2、喜树碱分别于 6.575、10.728、6.753 min 出峰, 空白生物基质样品在相应目标峰保留时间附近均无峰出现, 分离度好, 峰值集成没有困难, 提示该方法对 E2、G2、喜树碱测定具有一定的专属性, 可用于其稳定性试验。



1-在人工胃液中 2-人工胃液 3-在人工肠液中 4-人工肠液 5-在大鼠血浆中 6-大鼠空白血浆
1-in simulated gastric fluid 2- simulated gastric fluid 3-in simulated intestinal fluid 4- simulated intestinal fluid 5-in rat plasma 6- rat plasma

图2 E2 (A)、G2 (B) 和喜树碱 (C) 在生物基质中的 HPLC 图谱
Fig. 2 HPLC chromatograms of E2 (A), G2 (B), and camptothecin (C) in biology matrix

2.3.3 标准曲线的绘制 分别精密称取 E2 3.902 mg、G2 3.905 mg、喜树碱 1.74 mg 溶于 1 mL DMSO，得 5.00 mmol/L 母液。分别用大鼠血浆、人工胃液和人工肠液稀释得到 10.00、8.00、6.00、3.00、1.00、0.20 μmol/L 一系列浓度的工作液，处理，得到上层清液，测定得到峰面积。以浓度为横坐标，对应的峰面积为纵坐标，绘制散点图，得到标准方程，见表 1。

表1 E2、G2 和喜树碱在生物基质中的标准曲线
Table 1 Standard curves of E2, G2, and camptothecin in biology matrix

成分	生物基质	标准方程	R^2	线性范围/(μmol·L ⁻¹)
E2	血浆	$Y=3\,719.6\,X-2\,302$	0.992 8	0.20~10.00
	人工胃液	$Y=3\,583.4\,X-1\,555.5$	0.991 5	0.20~10.00
	人工肠液	$Y=3\,413.1\,X-1\,085.6$	0.998 1	0.20~10.00
G2	血浆	$Y=4\,656\,X-653.78$	0.998 6	0.20~10.00
	人工胃液	$Y=4\,876.1\,X-1\,144$	0.996 8	0.20~10.00
	人工肠液	$Y=4\,581.9\,X+16.876$	0.997 7	0.20~10.00
喜树碱	血浆	$Y=8\,547.9\,X-1\,820.9$	0.996 0	0.20~10.00
	人工胃液	$Y=8\,142.7\,X-286.68$	0.997 1	0.20~10.00
	人工肠液	$Y=7\,798.2\,X+34.018$	0.998 5	0.20~10.00

2.3.4 精密度试验 取母液分别用大鼠血浆、人工胃液和人工肠液稀释得到浓度为 0.20、3.00、10.00 μmol/L 的 E2、G2、喜树碱工作液，处理后重复进样 6 次，记录峰面积值，计算得到在不同生物基质中 E2、G2、喜树碱峰面积 RSD 值分别在 0.98%~1.91%、0.49%~1.49%、0.32%~1.20%。

2.3.5 稳定性试验 取母液分别用大鼠血浆、人工胃液和人工肠液稀释得到浓度分别为 0.20、3.00、10.00 μmol/L 的 E2、G2、喜树碱工作液，处理后储存于 4 ℃，分别于 0、2、4、8、12、24 h 测定峰面积值，计算得 E2、G2、喜树碱峰面积 RSD 值分别在 0.72%~2.91%、0.69%~3.09%、0.98%~3.20%。

2.3.6 回收率试验 取母液分别用大鼠血浆、人工胃液和人工肠液稀释得到浓度分别为 0.20、3.00、10.00 μmol/L 的 E2、G2、喜树碱工作液，处理后重复进样 3 次，测定峰面积值，根据其对应的标准方

程计算得到浓度，在 3 种基质中，计算得到 E2、G2、喜树碱的平均回收率分别在 98.77%~99.47%、98.38%~100.93%、98.99%~100.02%，RSD 值均不大于 2.0%。

2.3.7 测定方法 通过标准曲线法计算得到结果。通过检测等体积一系列浓度的 E2、G2、喜树碱工作液得到相应峰面积，使其与浓度进行回归直线，即得标准曲线。其后通过检测各样品中药物的峰面积，带入相应的标准曲线即计算得药物浓度。

2.4 各成分在大鼠生物基质中的稳定性

量取适量 5 mmol/L 母液，分别加入人工胃液、大鼠血浆稀释得到 10 μmol/L 含药孵育液，令孵育液中 DMSO 含量小于 0.2%，置于 37 ℃ 下孵育，分别于 0、5、10、20、30、60、90、120 min 以及 3、4、6 h 后取样，进行处理，HPLC 法测定 E2、G2 浓度，实验设置平行 3 组，结果用剩余率（剩余

率=孵育一定时间后测定峰面积/孵育0 min时测定峰面积)表示,见图3。

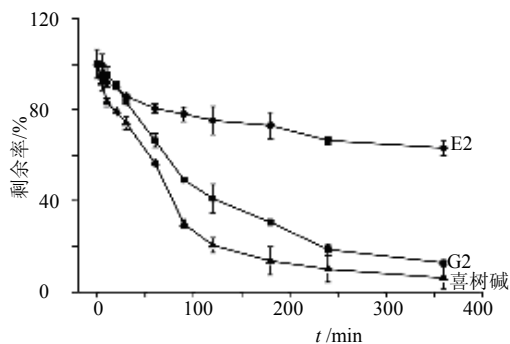


图3 E2、G2和喜树碱在大鼠血浆中的稳定性

Fig. 3 Stability of E2, G2, and camptothecin in rat plasma

E2、G2 在大鼠血浆中都显示出了较喜树碱强的稳定性,其中E2最为稳定,经过6 h的孵育后原药含量达63%左右,而G2为13%,喜树碱为6%,该结果与文献中报道在血浆水解酶作用下,酯键较酰胺键更易水解一致^[5]。结果表明E2、G2在大鼠血浆中可能发生水解。此外,孵育后的生物样品HPLC图谱(图4)同样显示这一结果,E2、G2经孵育后生成了喜树碱,且其量随孵育时间加长而增多,但未发现其开环,而喜树碱在大鼠血浆中稳定性极弱,大部分发生了内酯环开环反应。

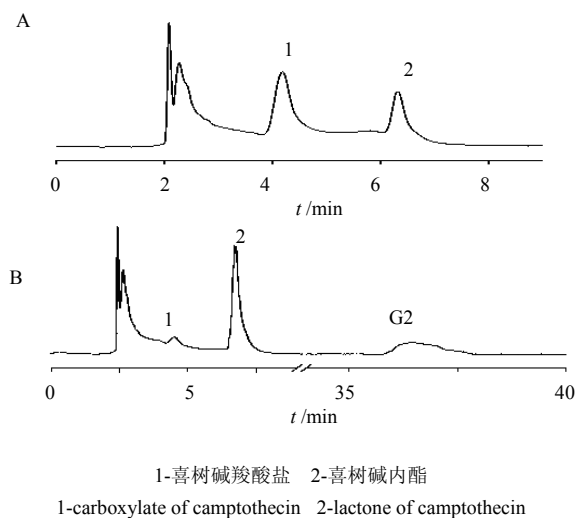


图4 E2 (A)和G2 (B)经大鼠血浆孵育后的HPLC图谱
Fig. 4 HPLC chromatogram of E2 (A) and G2 (B) incubated in rat plasma

人工胃肠液稳定性结果见图5。相对大鼠血浆而言,E2、G2、喜树碱在人工胃肠液中均显现出了更高的稳定性,其中E2、G2经6 h孵育后在人工

胃液中原药剩余量达80%以上,人工肠液中达90%以上,仅有一小部分发生降解。喜树碱在人工胃液中剩余60%左右,人工肠液中则接近90%。

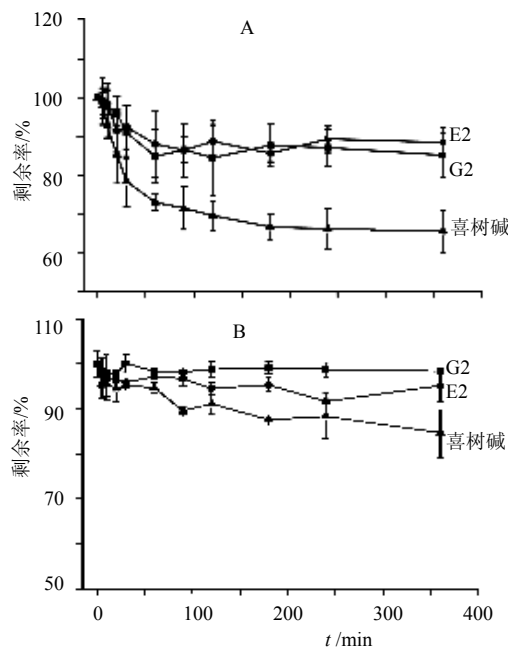


图5 E2、G2和喜树碱在人工胃液(A)和人工肠液(B)中的稳定性

Fig. 5 Stability of E2, G2, and camptothecin in simulated gastric fluid (A) and simulated intestinal fluid (B)

已有研究表明,喜树碱的不稳定性主要是由于其E环内酯键的水解,相关HPLC图谱同样证明了这一点,而在3种生物介质中,E2、G2的稳定性显著提高,从化学结构出发,在喜树碱20位偶联大基团加大了内酯环所在的空间位阻,阻止水解酶或活性氢与其接触,防止内酯环发生水解,从而在一定程度上增强了其稳定性。喜树碱在人工肠液中明显高于胃液的稳定性,则是由于在中性偏碱的环境下,内酯键不易受到活性氢的攻击,更偏向于形成内酯环形式。此外两者相对而言,E2通过酰胺键连接去氧胆酸,G2则通过酯键,酰胺键存在p- π 共轭,且左右两侧含有甲基的空间位阻,相比酯键而言稳定得多,因此在大鼠血浆的酶解条件下,其水解能力远远弱于酯键,因此E2的稳定性明显高于G2。而在人工胃肠液中两者的稳定性相差不大,是由于其为弱酸及弱碱环境,在空间位阻的影响下不足以使其水解。

3 讨论

药物进入人体均会经过吸收、分布、代谢、排

泄这一复杂的过程,在该过程中可能会使药物结构发生变化,从而导致一些在体外具有良好活性的新化学实体在体内试验中无法得到令人满意的结果,故生物环境中保持一定的稳定性是药物能够在体内发生目标药效的先决条件,故在新药研发早期对化合物的生物稳定性进行考察十分必要。

喜树碱作为具有高活性的植物抗癌药物,对于其衍生物、类似物的研究是近一个世纪以来的热点,拓扑替康和依立替康等已成功应用于临床^[6]。本文研究对象为通过偶联口服性载体胆酸得到的新喜树碱衍生物,体外实验均得到了令人满意的结果。以喜树碱为对照,对其在大鼠血浆和人工胃肠液中的稳定性进行研究,能够在早期评价其成药价值并为进一步了解其转化提供线索。

实验结果表明在 3 种生物介质中,E2、G2 的稳定性均强于喜树碱。人工胃肠液中降解程度均较低,推测受其中蛋白酶的影响较弱。人工胃液中降解程度略高,可能是由于酸性条件下酯键、酰胺键更易水解。而相对于人工胃肠液,三者在大鼠血浆中降解程度最大,可能受血浆中水解酶作用。且相关色谱图表明喜树碱在此 3 种介质中降解方式主要为内酯环开环,E2、G2 则发生水解生成内酯环形式的喜树碱。已有文献报道^[7]喜树碱中的 E 环内酯

环为其中一个活性基团,因此胆酸偶联喜树碱衍生物能够明显提高喜树碱活性基团的稳定,维持其活性。该结果说明了通过偶联胆酸得到的喜树碱衍生物能够有效地提高其结构、活性的稳定性,并为后续 E2、G2 的体内研究提供了相关线索。

参考文献

- [1] Li X, Zhao T, Cheng D, *et al.* Synthesis and biological activity of some bile acid-based camptothecin analogues [J]. *Molecules*, 2014, 19(3): 3761-3776.
- [2] 彭梦露, 潘建波, 纪志梁. 药物 ADME Pathway 数据库 [C]. 厦门: 中国化学会第 27 届学术年会, 2010.
- [3] 王广生, 李荣昌, 窦培延. 去甲斑蝥素在胃肠液中的存在状态 [J]. 中国药理学杂志, 1984, 19(8):24-26.
- [4] 黄财顺, 李宝才, 向 诚. 人工胃肠道模型在药物稳定性研究中的应用现状 [J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(10): 1836-1841.
- [5] Horn J, Milewska M, Arnold S M, *et al.* Metabolic pathways of the camptothecin analog AR-67 [J]. *Drug Metab Dispos*, 2011, 39(4): 683-692.
- [6] Pizzolato J F, Saltz L B. The camptothecins [J]. *Lancet*, 2003, 361(9376): 2235-2242.
- [7] Yeh T K, Li C M, Chen C P, *et al.* Antitumor activities and pharmacokinetics of silatecans DB-67 and DB-91 [J]. *Pharmacol Res*, 2010, 61(2): 108-115.