

## 7-乙基-10-羟基喜树碱脂质体在大鼠体内的代谢和排泄

银晓晶<sup>1</sup>, 叶田田<sup>2</sup>, 王淑君<sup>2\*</sup>

1. 中国医科大学肿瘤医院 辽宁省肿瘤医院 药学部, 辽宁 沈阳 110042

2. 沈阳药科大学 药学院, 辽宁 沈阳 110016

**摘要:** **目的** 考察 7-乙基-10-羟基喜树碱 (SN-38) 脂质体经静脉注射后, 在大鼠尿液、粪便中的代谢产物以及以 SN-38 原形药物排泄的量。**方法** 大鼠尾静脉单次给予 2.77 mg/kg SN-38 脂质体, 分别于 0~6、6~12、12~24、24~48 h 分段收集尿液、粪便, 采用 UPLC/Q-TOF MS 法对 SN-38 脂质体在大鼠尿液、粪便中的代谢产物进行鉴定, 并且建立 HPLC 法, 用于大鼠尿液及粪便样品中 SN-38 原形药物的排泄量的测定。**结果** SN-38 脂质体的在大鼠体内的代谢产物经鉴定为 SN-38G。48 h 内脂质体组共有 1.57% 的原形药物经过尿液排出, 共有 12.94% 的 SN-38 原形药物经过粪便排出。**结论** SN-38 脂质体只有少部分以原形药物经尿液和粪便排出体外。

**关键词:** 7-乙基-10-羟基喜树碱脂质体; 7-乙基-10-羟基喜树碱; 代谢; 排泄; UPLC/Q-TOF MS 法

**中图分类号:** R969.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2019)09-2593-05

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-5515.2019.09.004

## Metabolism and excretion of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin liposomes in rats

YIN Xiao-jing<sup>1</sup>, YE Tian-tian<sup>2</sup>, WANG Shu-jun<sup>2</sup>

1. Department of Pharmacy, Cancer Hospital of China Medical University, Liaoning Cancer Hospital and Institute, Shenyang 110042, China

2. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

**Abstract: Objective** To investigate the metabolism and excretion in urine and feces of rats after intravenous injection of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) liposomes. **Methods** SN-38 liposome of 2.77 mg/kg were iv administered to the tail vein of rats, collecting 48 h urine and feces in 0 — 6 h, 6 — 12 h, 12 — 24 h, 24 — 48 h, respectively. UPLC/Q-TOF MS method was used to preliminarily identify the metabolites of SN-38 liposome in rat urine and feces, and HPLC method was established for the determination of the primary drug excretion of SN-38 in rat urine and feces. **Results** The metabolites of SN-38 liposome in rats were identified as SN-38G. A total of 1.57% of the original drug in the liposome group was excreted in the urine within 48 h, and a total of 12.94% of the SN-38 prototype drug was excreted through the feces. **Conclusion** Only a small part of the SN-38 liposome is excreted in urine and feces as the original drug.

**Key words:** 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin liposome; 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin; metabolism; excretion; UPLC/Q-TOF MS

盐酸伊立替康是喜树碱类上市的新药之一, 是用于转移性结、直肠癌一线治疗的化疗药<sup>[1]</sup>, 作用于细胞周期 S 期, 阻止拓扑异构酶 I 对 DNA 断链的修复, 从而抑制细胞分裂<sup>[2]</sup>。7-乙基-10-羟基喜树碱 (SN-38) 是喜树碱的衍生物, 能特异性抑制 DNA 拓扑异构酶 I, 同时也是伊立替康的体内活性代谢物<sup>[3]</sup>, 其活性较 CPT-11 强 100~1 000 倍<sup>[4]</sup>, 细胞毒性约为伊立替康的 200~2 000 倍<sup>[5]</sup>。SN-38 作为一

个抗癌活性高, 不需要任何转化过程就可以直接作用于肿瘤细胞, 产生细胞毒作用, 具有非常广阔的应用前景, 但 SN-38 无论是在水性溶剂或是生理可接受的有机溶剂中药物的溶解性都不高<sup>[6]</sup>, 并且在体液环境下其活性内酯环极易开环失效。SN-38 做成脂质体形式后, 既可改善溶解性, 又可增强稳定性<sup>[7]</sup>。本研究旨在考察 SN-38 脂质体经静脉注射后在大鼠尿液、粪便中以 SN-38 原形药物排泄的量和

收稿日期: 2019-03-27

作者简介: 银晓晶 (1988—), 女, 辽宁沈阳人, 主管中药师, 硕士, 研究方向为中药学。E-mail: 245560433@qq.com

\*通信作者 王淑君 (1972—), 女, 辽宁抚顺人, 教授, 博士生导师, 主要从事药剂学及中药制剂学研究。E-mail: 1252116911@qq.com

代谢产物,为进一步非临床研究提供依据。

## 1 仪器与材料

LC-15C 高效液相色谱仪(日本 Shimadzu 公司), HC-2062 高速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司), MA200 型电子天平(上海良平仪器仪表有限公司), XK96-A 快速混匀器(姜堰市新康医疗器械有限公司), 氮气吹扫仪(杭州兴盛仪器有限公司), 微量移液器(芬兰 Biohit 公司), pH 计(上海宇隆仪器有限公司), 大鼠代谢笼(苏州实验动物笼具厂), UPLC/Q-TOF MS (Waters ACQUITY UPLC™ 系统, Xevo™ G2 Qtof 系统, Masslynx™ NT 4.1, 美国 Waters 公司)。

SN-38 (质量分数 >99.0%, 荆门帅邦化学科技有限公司), 喜树碱(质量分数 >99.0%, 四川南部诚信科技有限公司), PL-100M 蛋黄卵磷脂(上海艾伟特医药科技有限公司), 色谱级乙腈(天津康科德科技有限公司), 磷酸二氢钠(天津博迪化工有限公司), 磷酸(天津博迪化工有限公司), 氯化钠注射液(沈阳志鹰制药厂), 肝素钠注射液(上海第一生化药业有限公司)。

Wistar 大鼠, 体质量 200~250 g, 雌雄各半, 由沈阳药科大学动物中心提供, 许可证号 SCKK (辽) 2010-0001。

## 2 方法与结果

### 2.1 SN-38 脂质体的制备

精密称取 SN-38 原料 10.1 mg、注射用 LIPOID S-100 豆磷脂 301.2 mg、胆固醇 50.1 mg、Solutol HS 15 30.2 mg、溶于 20 mL 无水乙醇, 超声 30 s 至完全溶解, 混合均匀后倒入 250 mL 磨口圆底烧瓶, 并倒入 1.50 g 葡萄糖粉末, 振摇至葡萄糖粉末混悬, 60 r/min、50 °C (48~52 °C) 恒温水浴减压蒸去无水乙醇, 再通入氮气进一步吹干膜材, 同时可防止磷脂的氧化。将 10 mL pH 4.5 PBS 倒入圆底烧瓶, 磁力搅拌下 15 min 至重组完全, 400 W 超声 5 min, 充氮气, 并分装在西林瓶中。3 批样品的平均包封率为 92.0%。

### 2.2 给药方案和尿液、粪便的采集

取大鼠 30 只, 雌雄各半, 随机分成 5 组, 每组 6 只。通过药理实验得到 SN-38 脂质体的高、中、低 3 个有效给药剂量, 本实验选取中剂量 (2.77 mg/kg) SN-38 脂质体给药。取空白尿液、粪便后, 于大鼠尾 iv 2.77 mg/kg SN-38 脂质体。分别于 0~6、6~12、12~24、24~48 h 分段收集 48 h 的尿液、

粪便, -20 °C 冷冻保存。

### 2.3 SN-38 脂质体在大鼠体内的代谢

**2.3.1 色谱条件** Waters ACQUITY HSS C<sub>18</sub> 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 流动相 A: 水-0.1% 甲酸, B: 乙腈, 进样量: 10 μL, 体积流量 0.5 mL/min, 梯度洗脱为 0~8.00 min, 95%~80% A; 8.00~14.00 min, 80%~45% A; 14.00~14.10 min, 45%~1% A; 14.10~16.00 min, 1% A; 16.00~16.10 min, 1%~95% A; 16.10~18.00 min, 95% A。

**2.3.2 质谱条件** 离子源为 ES<sup>+</sup>, 毛细管电压为 3 kV, 离子源温度为 130 °C, 脱溶剂气体温度为 400 °C, 锥孔气流速为 50.0 L/h, 脱溶剂气体流速为 700.0 L/h, 一级全扫描质量范围为 50~1 000。

**2.3.3 大鼠尿液的处理** 精密吸取大鼠尿液 200 μL, 加入含 0.5% 乙酸的乙腈溶液 200 μL 于 1.5 mL 离心试管中, 涡旋 1 min, 于 15 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液 200 μL 至另一干净 1.5 mL 的 EP 管中, 50 °C N<sub>2</sub> 下吹干, 加入 100 μL 流动相复溶, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液进样分析。

**2.3.4 大鼠粪便的处理** 取大鼠粪便精密称定质量, 加入 4 倍量的生理盐水匀浆, 再加入 1 mL 生理盐水稀释匀浆液。精密量取大鼠粪便匀浆液 200 μL, 加入 200 μL 含 0.5% 乙酸的乙腈, 涡旋提取 1 min。于 15 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液置 1.5 mL EP 管中, 50 °C N<sub>2</sub> 吹干, 加入 100 μL 流动相复溶, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液进样分析。

**2.3.5 SN-38 脂质体的代谢产物鉴定** 通过与空白样品比较, 在 Wistar 大鼠尿样中发现了 SN-38 脂质体的一种代谢产物, 为 SN-38 发生葡萄糖醛酸结合的产物 M1 (SN-38G), 在大鼠粪便样品中只有 SN-38 原形药物。采用液相色谱-质谱(LC/MS) 分析每种代谢产物的色谱保留行为、准分子离子, 推测 SN-38 脂质体的体内代谢产物的结构。结果 SN-38 脂质体尿液样品中有两个峰, 保留时间分别在 7.22、10.00 min。对应的质谱图中有[M+H]<sup>+</sup>为 *m/z* 569.177 2 为 SN-38G 的准分子离子峰, 色谱图中的保留时间为 7.22 min, 碎片离子 *m/z* 170.060 3; [M+H]<sup>+</sup>为 *m/z* 393.144 0 是 SN-38 原形药物的准分子离子峰, 色谱图保留时间为 10.00 min, 碎片离子为 *m/z* 123.091 9、177.063 4、475.245 5。粪便样品中只有 SN-38 原形。因此在 SN-38 脂质体组的大鼠尿液中, 可以检测到 SN-38 葡萄糖醛酸化的代谢产

物 SN-38G 和 SN-38 原形药；在大鼠粪便样品中只有 SN-38 原形药存在。

**2.3.6 代谢途径** SN-38 脂质体的在大鼠体内的代谢产物经鉴定为 SN-38G。代谢途径见图 1。SN-38 脂质体在大鼠体内的代谢途径是在肝脏内发生葡

萄糖醛酸结合，可能的反应机制是尿核苷三磷酸和葡萄糖发生反应，生成尿核苷二磷酸葡萄糖 (UDPG)，UDPG 进一步被氧化生成活性供体尿核苷二磷酸葡萄糖醛酸 (UDPGA)，然后 UDPGA 再与 SN-38 的羟基结合生成 SN-38G。

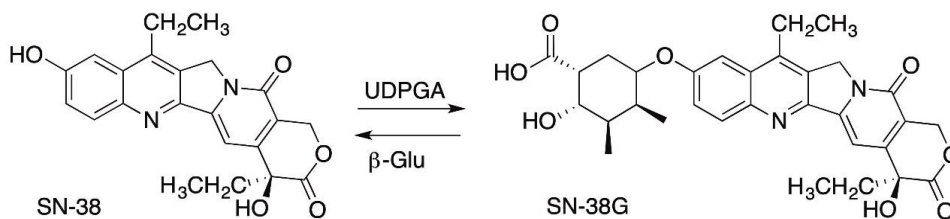


图 1 7-乙基-10-羟基喜树碱脂质体的代谢途径

Fig. 1 Metabolism pathways of SN-38 liposome

**2.4 SN-38 脂质体和伊立替康在大鼠体内的排泄**

**2.4.1 色谱条件** Venusil XBP C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)，流动相：NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 缓冲盐溶液 (25 mmol/L, pH 3.1) - 乙腈 (75 : 25)，体积流量：1.4 mL/min，检测波长：381 nm，进样量：20 μL，柱温：室温

**2.4.2 对照品溶液的配制** 精密称取 SN-38 适量，用乙腈溶解并定量稀释成 100 μg/mL 的储备液，于 4 °C 冰箱保存。精密量取 SN-38 储备液适量，用含 0.5% 乙酸的乙腈溶液稀释成浓度分别为 25、50、100、1 000、5 000、10 000 ng/mL 的系列对照品溶液。精密称取喜树碱适量，加入含 0.5% 乙酸的乙腈溶液溶解并稀释至 5 000 ng/mL 的溶液，作为内标液，于 4 °C 冰箱保存。

**2.4.3 大鼠尿样的处理** 精密吸取大鼠尿液 100 μL，加入喜树碱内标液 100 μL 和含 0.5% 乙酸的乙腈溶液 200 μL 于 1.5 mL 离心试管中，涡旋 1 min，于 15 000 r/min 离心 10 min，吸取上清液 200 μL 置另一干净 1.5 mL 的 EP 管中，50 °C、N<sub>2</sub> 下吹干，加入 50 μL 流动相复溶，12 000 r/min 离心 10 min，取上清液 20 μL 进样，进行 HPLC 分析。

**2.4.4 大鼠粪便的处理** 取大鼠粪便精密称定质量，加入 4 倍量的生理盐水匀浆，再加入 1 mL 生理盐水稀释匀浆液。精密量取大鼠粪便匀浆液 200 μL，加入喜树碱内标液 50 μL 涡旋 30 s，加入 150 μL 含 0.5% 乙酸的乙腈，涡旋提取 1 min。于 15 000 r/min 离心 10 min，吸取上清液置 1.5 mL 的 EP 管中，50 °C、N<sub>2</sub> 吹干，加入 50 μL 流动相复溶，12 000

r/min 离心 10 min，取上清液 20 μL 进样，进行 HPLC 分析。

**2.4.5 方法专属性** 分别取大鼠的空白尿样、大鼠空白粪便，按照“大鼠尿样的处理”、“大鼠粪便的处理”项下依法操作，进样 20 μL，得色谱图；将一定浓度的 SN-38 对照品溶液和内标溶液加入空白生物样品中，依法操作，得色谱图；取大鼠给药后收集的尿样，依法操作，得色谱图。见图 2。结果表明，SN-38 和内标物均能与尿样中的内源性物质得到良好分离。

**2.4.6 标准曲线与线性范围** 取 6 个 1.5 mL EP 管，精密吸取 SN-38 系列对照品溶液，挥干溶剂，加入大鼠空白尿液、空白粪便匀浆液 50 μL 于试管中，配制成相当于 SN-38 质量浓度为 25、50、100、1 000、5 000、10 000 ng/mL 的血浆标准样品，按“大鼠尿样的处理”、“大鼠粪便的处理”项下依法操作。以尿液、粪便中 SN-38 的质量浓度为横坐标，以 SN-38 峰面积与内标物峰面积之比为纵坐标，用加权最小二乘法进行回归计算，求得线性回归方程。SN-38 在大鼠粪便中的标准曲线方程为  $Y=3.3 \times 10^{-4} C + 0.010\ 38$  ( $r=0.992\ 8$ )，线性范围为 25~10 000 ng/mL。SN-38 在大鼠尿液中的标准曲线方程  $Y=1.61 \times 10^{-3} C + 0.048\ 80$  ( $r=0.992\ 8$ )，线性范围为 25~10 000 ng/mL。

**2.4.7 定量限** 精密移取适宜小的 (必要时再稀释) 不同质量浓度的 SN-38 储备液于 1.5 mL 离心试管中，挥干溶剂后，分别加入 50 μL 生物样品，按“大鼠尿样的处理”、“大鼠粪便的处理”项下依

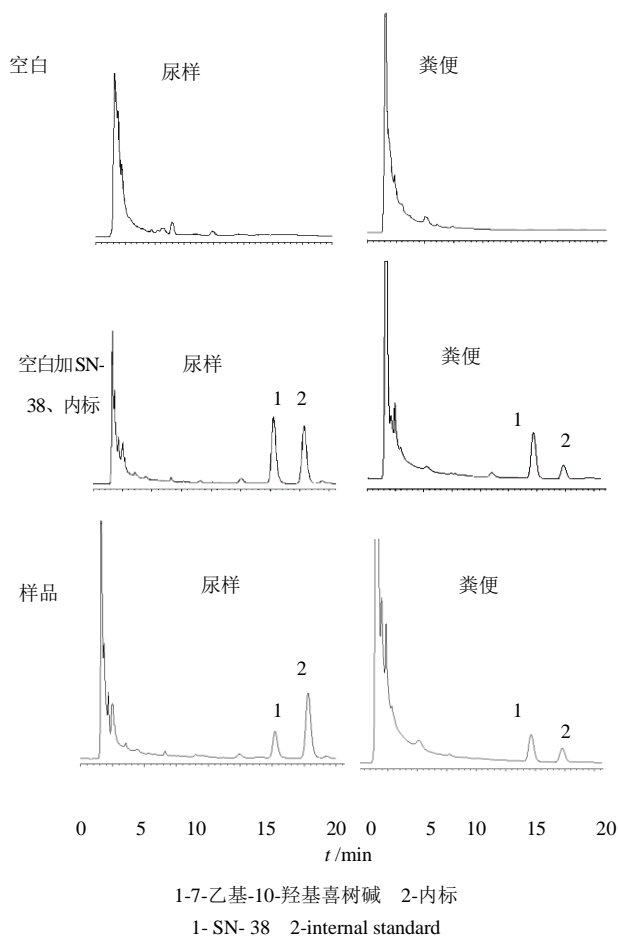


图 2 SN-38 在大鼠尿液和粪便中的 HPLC 图谱

Fig. 2 HPLC chromatograms of SN-38 in rat urine and feces

法进行处理，进行 HPLC 分析，当样品峰高为噪音的 10 倍时，相应浓度定为此方法的定量限，确定方法定量下限的浓度为 25 ng/mL。

**2.4.8 提取回收率** 用空白生物样品按“标准曲线与线性范围”项下配制含 SN-38 低、中、高 3 个质量浓度的质量控制 (QC) 样品，每一个质量浓度各 3 个样本，以处理后 SN-38 的峰面积除以未经提取的相应浓度的 SN-38 的峰面积，即为 SN-38 的提取回收率，见表 1。

表 1 SN-38 在尿液和粪便中的提取回收率 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )  
Table 1 Extraction recovery of SN-38 in urine and feces ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

质量浓度/(ng L <sup>-1</sup> )	提取回收率/%	
	尿样样品	粪便样品
25	85.43 ± 4.20	88.61 ± 3.39
1 000	87.30 ± 5.43	85.81 ± 4.58
5 000	89.39 ± 6.33	87.32 ± 5.51

**2.4.9 精密度与准确度试验** 取空白生物样品按“标准曲线与线性范围”项下配制含 SN-38 低、中、高 3 个浓度的质量控制 (QC) 样品，连续测定 3 d，并与标准曲线同时进行。计算 QC 样品的日间和日内标准差和 RSD 治。结果见表 2。

表 2 SN-38 测定的精密度与准确度试验 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )  
Table 2 Precision and accuracy for determination of SN-38 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

样品	质量浓度/(ng L <sup>-1</sup> )	日内精密度 RSD/%	日间精密度 RSD/%
尿样	25	6.6	6.0
	1 000	4.0	4.6
	5 000	2.7	4.3
粪便	25	5.9	6.5
	1 000	2.2	3.7
	5 000	3.8	3.8

**2.4.10 稳定性试验** 考察了组织样品在室温放置 8 h、经历 3 次冻融循环、-20 °C 放置 7 d 和经处理后 4 °C 放置 12 h 的稳定性。制备 SN-38 低、中、高 3 个质量浓度 (25、1 000、5 000 ng/mL) 的质量控制 (QC) 样品，每一个质量浓度进行 5 个样本分析，SN-38 在大鼠尿液和粪便样品中的稳定性试验结果见表 3。

**2.4.11 SN-38 在大鼠体内的排泄** 经 HPLC 分析，测定 SN-38 脂质体组在大鼠尿液、粪便中的排泄量，计算排泄率 (排泄率 = 排泄量/给药量)，结果见表 4。可以看出，SN-38 脂质体在 0~6 h 内尿液中排出的 SN-38 原形药物最多，48 h 内脂质体组共有 1.57% 的原形药物经过尿液排出；SN-38 脂质体在 6~12 h 的粪便中排出的 SN-38 原形药物最多，48 h 内脂质体组经过粪便共排出 12.94% 的 SN-38 原形药物。SN-38 脂质体只有少部分以原形药物经尿液排出，而有很多以原形药物经过粪便排出体外。

### 3 讨论

在本实验中，采用 UPLC/Q-TOF MS 对盐酸伊立替康注射液及 SN-38 脂质体在大鼠尿液、粪便中的代谢产物进行鉴定，建立了粪便及尿液中 SN-38 的测定方法，经方法学验证，该方法准确可靠。

SN-38 脂质体的代谢产物有 SN-38、SN-38G 两种形式，本实验只测定代谢产物中 SN-38 的量，从实验结果可以看出，SN-38 脂质体只有很少部分以

表3 SN-38在尿样和粪便中不同储存条件下的稳定性 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )  
Table 3 Stability of SN-38 at different storage conditions in urine and feces ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

加入质量浓度/(ng mL <sup>-1</sup> )	室温放置 8 h		处理后 4 °C 放置 12 h		3 次冻融循环		-20 °C 放置 7 d	
	测得质量浓度/(ng mL <sup>-1</sup> )	RSD/%	测得质量浓度/(ng mL <sup>-1</sup> )	RSD/%	测得质量浓度/(ng mL <sup>-1</sup> )	RSD/%	测得质量浓度/(ng mL <sup>-1</sup> )	RSD/%
尿样								
25	22.4	4.7	21.3	5.1	22.0	6.1	22.8	5.2
1 000	931.0	5.8	827.1	6.3	916.1	4.0	932.9	4.3
5 000	4 316.0	4.3	4 495.0	6.1	4 628.0	5.7	4 741.5	6.5
粪便								
25	21.1	5.1	22.4	6.7	24.8	5.3	22.3	5.3
1 000	934.3	6.0	906.0	6.5	888.6	4.1	901.2	6.2
5 000	4 691.0	3.9	5 055.0	3.8	4 361.5	5.6	4 120.0	5.6

表4 SN-38静脉注射后在尿样和粪便中的排泄率  
Table 4 Excretion rate of SN-38 liposomes after iv administration in urine and feces

组别	排泄率/%				总排泄率/%
	0~6 h	6~12 h	12~24 h	24~48 h	
尿样	0.78	0.28	0.28	0.23	1.57
粪便	1.22	5.19	4.35	2.18	12.94

原形药物经尿液排出体外，而有相对多的以原形药物经过粪便排出体外。药物的排泄主要通过肾脏排泄、胆汁排泄，较多的SN-38以原形的形式从粪便排出，说明SN-38经肾脏排泄的量少，故尿液检测到的SN-38原形药物很少，而SN-38主要经胆汁排泄，由胆汁排入肠道的原形药物，很少能再从肠道吸收，而大部分从粪便排出。有报道表明，仅有2%~8%的伊立替康最终转化为有活性的SN-38，而且SN-38极易转化为SN-38G<sup>[8-9]</sup>。由于个体之间的差异性，伊立替康代谢为SN-38的转化率不确定且不可预见<sup>[10]</sup>，给临床应用带来了更大的难度和风险，因此，SN-38脂质体有很好的应用前景，值得进一步深入研究。

参考文献

[1] 缴万里, 刘海洁, 张熙杰, 等. 不同给药途径伊立替康在家兔体内的药代动力学和生物利用度 [J]. 中国老年学, 2012, 32(14): 2978-2981.  
[2] Yu Q Q, Qiu H, Zhang M S, et al. Predictive effects of

bili-rubin on response of colorectal cancer to irinotecan-based chemotherapy [J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(16): 4250-4258.  
[3] Kawato Y, Aonuma M, Hirota Y, et al. Intracellular roles of SN-38, a metabolite of the camptothecin derivative CPT-11, in the antitumor effect of CPT-11 [J]. *Cancer Res*, 1991, 51: 4187-4191.  
[4] 胡艳玲. 合用沙利度胺对盐酸伊立替康药代动力学影响的研究 [D]. 济南: 山东大学, 2008.  
[5] 汪皖青, 黄晨蓉. HPLC法测定血浆中伊立替康及其代谢产物SN-38、SN-38G浓度及方法学研究 [J]. 药学与临床研究, 2015, 23(6): 565-568.  
[6] Zhang J A, Xuan T, Parmar M, et al. Development and characterization of a novel liposome-based formulation of SN-38 [J]. *Int J Pharm*, 2004, 270(1-2): 93-107.  
[7] 易小军, 王淑君, 高瑞雪, 等. 脂质体对7-乙基-10-羟基喜树碱稳定性影响[J]. 沈阳药科大学学报, 2012, 29(7): 491-496.  
[8] Ohe Y, Sasaki Y, Shinkai T, et al. Phase I study and pharmacokinetics of CPT-11 with 5-day continuous infusion [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1992, 84(12): 972-974.  
[9] Gupta E, Lestingi T M, Mick R, et al. Metabolic Fate of irinotecan in humans: correlation of glucuronidation with diarrhea [J]. *Cancer Res*, 1994, 54(14): 3723-3725.  
[10] Hofheinz R, Hartung G, Samel S, et al. Adding weekly irinotecan to high-dose 5-fluorouracil and folinic acid (HD-5-FU/FA) after failure for first-line HD-5-FU/FA in advanced colorectal cancer—a phase II study [J]. *Anti-Cancer Drug*, 2002, 13(10): 999-1004.