

β -环糊精-聚乙二醇-7-乙基-10-羟基喜树碱胶束在大鼠体内的药动学研究

彭于之^{1,2}, 姜良竹^{1,2}, 徐传锡^{1,2}, 王志强¹, 孙勇兵^{1*}

1. 江西中医药大学 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330004

2. 江西中医药大学 药学院, 江西 南昌 330004

摘要:目的 考察 β -环糊精-聚乙二醇-7-乙基-10-羟基喜树碱 (β -CD-PEG-SN38) 胶束在大鼠体内的药动学。方法 采用 HPLC-MS/MS 法测定血浆中 SN38 的质量浓度, 利用三隔室模型进行 β -CD-PEG-SN38 药动学数据拟合。结果 大鼠 iv β -CD-PEG-SN38 胶束溶液后, 游离型 SN38 和键合型 SN38 的 AUC 分别是 1 490.7、5 060.3 ng/(mL·h), 在大鼠血浆中占主导的是键合型的 SN38。结论 方法操作简单、实用, 可为 SN38 的靶向给药研究提供参考。

关键词: β -环糊精-聚乙二醇-7-乙基-10-羟基喜树碱胶束; 7-乙基-10-羟基喜树碱; 药动学; HPLC-MS/MS

中图分类号: R969.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2024)04-0894-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2024.04.011

Pharmacokinetics of β -cyclodextrin-polyethyleneglycol-SN38 micelle in rat

PENG Yuzhi^{1,2}, JIANG Liangzhu^{1,2}, XU Chuanxi^{1,2}, WANG Zhiqiang¹, SUN Yongbing¹

1. Division of Pharmaceutics, National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

2. College of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

Abstract: Objective To study pharmacokinetics of β -cyclodextrin-polyethyleneglycol-SN38 (β -CD-PEG-SN38) micelle in rat. **Methods** Contents of SN38 were determined by HPLC-MS/MS method, and a three-compartment model were used to estimate the pharmacokinetics parameters. **Results** After iv administered with β -CD-PEG-SN38 micelle, AUC of free type and bonded type SN38 was 1 490.7、5 060.3 ng/(mL·h), and the dominant SN38 in rat plasma was the bonded type. **Conclusion** This method is simple and practical to operate, and can provide reference for targeted drug delivery research of SN38.

Key words: β -cyclodextrin-polyethyleneglycol-SN38; SN38; pharmacokinetics; HPLC-MS/MS

伊立替康是喜树碱类拓扑异构酶 I 抑制剂^[1], 用于转移性结直肠癌、胰腺癌等的临床治疗。伊立替康本质上是一种前药, 需要在羧酸酯酶作用下转化为活性代谢物 7-乙基-10-羟基喜树碱 (SN38) 才能发挥疗效^[2]。然而, 仅有 2%~8% 的伊立替康可转化为活性的 SN38。SN38 在多种肿瘤细胞株上表现出比伊立替康高 10~1 000 倍的抗肿瘤活性^[3-5]。直接用 SN38 作为抗癌药物无需体内酯酶的激活, 可以克服伊立替康的代谢激活缺陷。目前开发 SN38 靶向给药系统已成为大型制药企业竞相开展的重要课题。浙江海正药业开发的 SN38 胶束制剂 PEG-

SN38 已经进入了 I 期临床^[6-7]; 日本化药株式会社开发的载 SN38 胶束制剂 NK012 已经进入 II 期临床, 而且被美国食品药品监督管理局批准作为治疗非小细胞肺癌的治疗药物^[8-9]。SN38 脂质体的研究也是一个热门^[10-11]。在前期研究中, 本课题组以 β -环糊精-聚乙二醇作为亲水端, 通过酯键将 SN38 的 20 位羟基与 β -环糊精-聚乙二醇相连, 构建了两亲性聚合物 β -环糊精-聚乙二醇-7-乙基-10-羟基喜树碱胶束 (β -CD-PEG-SN38), 该聚合物能在水性介质中自组装成 100 nm 左右的胶束。为了更好地了解 β -CD-PEG-SN38 在体内的动态行为, 开展其的药动学研

收稿日期: 2024-01-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82360705); 江西省双千计划 (jxSq2023201078); 江西省教育厅科研课题 (GJJ2200911); 南昌市重大科技攻关项目 (2020-201-15)

作者简介: 彭于之 (1997-), 女, 重庆人, 硕士研究生。E-mail: 1416747812@qq.com

*通信作者: 孙勇兵 (1980-), 男, 安徽池州人, 教授, 博士, 主要从事药动学研究。E-mail: yongbing_sun@hotmail.com

究是非常有必要的。本研究建立了 HPLC-MS/MS 法测定大鼠血浆中游离型和键合型 SN38, 考察了 β -CD-PEG-SN38 胶束在大鼠体内的药动学, 以期为新药开发提供更多的支持。

1 仪器和材料

Nexera LC-40 超高效液相系统 (配备自动进样器和二元泵, 日本 Shimadzu 公司), API4500 三重四级杆质谱仪 (美国 AB Sciex 公司), ST8R 超高速离心机 (美国 Thermo Fisher 公司)。

SN38 原料药 [质量分数大于 99.8%, 批号 20221005, 凯立德生物医药技术 (上海) 有限公司], 盐酸小檗碱 (质量分数大于 99.5%, 批号 20221021, 江西本草天工科技有限公司)。甲醇、乙腈 (色谱级, 美国 Fisher Scientific 公司), 甲酸 (色谱级, 上海麦克林公司), 纯净水 (自制), 其余试剂均为分析纯。

β -CD-PEG-SN38 胶束由江西中医药大学自制, HPLC 法测得 SN38 的载药量为 11.2%。SD 大鼠由江西中医药大学实验动物中心提供, 动物使用许可证号 SYXK (赣) 2022-0002。药动学实验得到江西中医药大学实验动物伦理委员会批准。

2 方法和结果

2.1 色谱和质谱条件

色谱条件: 月旭 Welch C₁₈ 色谱柱 (50 mm×2.1 mm, 1.7 μ m); 流动相为水 (含 0.1% 的甲酸溶液, A) - 乙腈 (含 0.1% 的甲酸溶液, B), 梯度洗脱 (洗脱程序为 0~0.4 min, 5% B; 0.4~4.5 min, 5%~80% B; 4.51~6.0 min, 80%~5% B); 柱温是 40 $^{\circ}$ C; 体积流量 0.2 mL/min; 进样量是 1 μ L。

质谱条件: ESI 源, 正离子检测, 多反应监测 (MRM) 方式扫描; 离子通道: 393.1→349.1 (SN38), 336.1→320.0 (内标小檗碱)。源电压为 5 500 V, Gas1 (N₂) 为 60 psi (1 psi=6 895 Pa), Gas2 (N₂) 为 60 psi, 离子源温度是 600 $^{\circ}$ C; Curtain gas (N₂) 为 40 psi, CAD Gas (N₂) 为 9 psi。

2.2 溶液的制备

2.2.1 标准溶液和质量控制 (QC) 标准溶液的制备 精密称取 SN38 对照品适量, 用 70% 甲醇溶液制备 272.0 μ g/mL 储备液, 然后用 70% 甲醇溶液依次稀释制备标准曲线工作溶液, SN38 的质量浓度分别为 68.0、340.0、680.0、1 360.0、2 720.0、5 440.0、13 600.0、27 200.0、43 520.0、54 400.0 ng/mL。按照同样的方式制备 SN38 低、中、高质量浓度 (136.0、27 200.0、43 520.0 ng/mL) 的 QC 标准溶液。所有

溶液置于冰箱 (4 $^{\circ}$ C) 保存。

2.2.2 内标溶液的制备 精密称取小檗碱对照品适量, 用 70% 甲醇溶液制备 400 μ g/mL 储备液, 然后用 70% 甲醇溶液稀释制备 250 ng/mL 内标溶液, 置于冰箱 (4 $^{\circ}$ C) 保存。

2.3 血浆样品的处理

2.3.1 标准曲线和 QC 血浆样品的制备 取标准曲线溶液和 QC 工作溶液 10 μ L, 置于具塞玻璃试管中, 用氮气吹干, 加入空白血浆 200 μ L, 配制 SN38 质量浓度在 3.4~2 720.0 ng/mL 标准曲线血浆样品, 同时制备 SN38 低、中、高质量浓度分别是 6.8、1 360.0、2 176.0 ng/mL 的血浆 QC 样品。

2.3.2 血浆样品的制备 将 40 μ L 血浆样品置于 1.5 mL 离心管中, 加入 10 μ L 内标小檗碱工作溶液、20 μ L 水, 涡旋 2 min, 加入 330 μ L 甲醇溶液, 涡旋 5 min, 于 4 $^{\circ}$ C、10 000 r/min 离心 8 min, 取上清液, 即得游离型 SN38 测定的血浆样品溶液。将 40 μ L 血浆样品置于 1.5 mL 离心管中, 加入 1 mol/L 氢氧化钠溶液 10 μ L, 23 $^{\circ}$ C 孵育 10 min, 然后加入 1 mol/L 盐酸溶液 10 μ L, 再加入 10 μ L 内标小檗碱工作溶液, 涡旋 2 min, 加入 330 μ L 甲醇溶液, 涡旋 5 min, 于 4 $^{\circ}$ C、10 000 r/min 离心 8 min, 取上清液, 即得 SN38 总质量浓度 (键合型和游离型之和) 测定的血浆样品溶液。质量浓度超过标准曲线最高点的样品用空白血浆稀释 10 倍后测定。

2.4 方法学试验

2.4.1 方法选择性 取 6 个不同来源的大鼠空白血浆 40 μ L, 除不加入内标小檗碱溶液 (补加 70% 甲醇 10 μ L), 其余按照 2.3.2 项下方法操作, 得空白血浆样品; 取含 SN38 6.8 ng/mL 的低质量浓度 QC 样品 40 μ L, 加入 10 μ L 内标小檗碱工作溶液, 其余按照 2.3.2 项下方法操作, 得低质量浓度 QC 样品; 取受试大鼠给药后的血浆 40 μ L, 按照 2.3.2 项下方法操作, 得大鼠给药样品。取各样品进样测定, 色谱图见图 1。可以看出 SN38 的保留时间为 3.923 min, 内标物小檗碱的保留时间为 3.805 min, 血浆中的内源性成分不干扰 SN38、小檗碱的测定。

2.4.2 线性回归曲线方程 取标准曲线血浆样品 40 μ L, 加入 10 μ L 内标小檗碱溶液, 按 2.3.2 项下方法操作, 每个质量浓度进行双样本分析, 分别以质量浓度 (x) 为横坐标, 以待测物和内标的峰面积比 (y) 为纵坐标, 以加权 ($y=1/x^2$) 最小二乘法进行线性回归, 得典型的线性回归曲线方程 $y=$

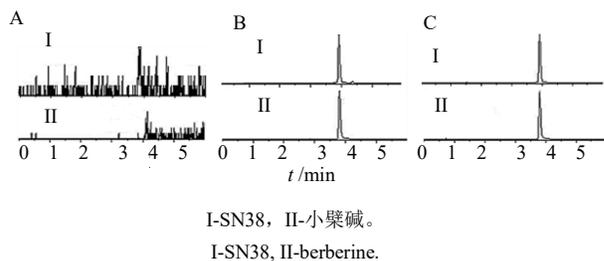


图 1 空白血浆 (A)、QC 样品 (B) 和大鼠给药样品 (C) 的 MRM 色谱图

Fig. 2 MRM chromatograms of blank plasma (A), QC sample (B), and sample from rat (C)

$4.356 \times 10^{-4} x + 2.43 \times 10^{-4}$, $r = 0.992 3$, 结果表明 SN38 的血浆质量浓度在 $3.4 \sim 2 720.0$ ng/mL 线性关系良好。

2.4.3 精密度和准确度试验 精确配制 6.8、1 360.0、2 176.0 ng/mL 的血浆样品, 各 5 份, 按 2.3.2 项下方法操作, 测定药物质量浓度, 同一个质量浓度样品每隔 1 h 测定 1 次, 共 3 次, 进行日内精密度计算; 每隔 1 d 测定 1 次, 共 3 次, 进行日间精密度计算, 结果见表 1。在 3 种质量浓度下, 日内精密度小于 6.5%, 日间精密度小于 6.3%。

表 1 精密度试验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 Results of precision test ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

质量浓度/ (ng·mL ⁻¹)	日内精密度		日间精密度	
	测定值/ (ng·mL ⁻¹)	RSD/%	测定值/ (ng·mL ⁻¹)	RSD/%
6.8	7.0±0.5	6.5	7.2±0.4	5.6
1 360.0	1 419.9±63.2	4.4	1 448.0±78.5	5.4
2 176.0	2 289.5±70.7	3.1	2 315.6±145.3	6.3

分别配制 6.8、1 360.0、2 176.0 ng/mL 血浆样品, 各 5 份, 按 2.3.2 项下方法操作, 按标准曲线法计算质量浓度和准确度, 见表 2。根据药物临床前药动学指导原则, 准确度应在 85%~115%, RSD 值应小于 15%, 3 种质量浓度下准确度均符合要求。

表 2 准确度试验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 2 Results of accuracy test ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

质量浓度/ (ng·mL ⁻¹)	测定值/ (ng·mL ⁻¹)	准确度/%	RSD/%
6.8	7.0±0.5	102.90±0.07	6.5
1 360.0	1 419.9±63.2	104.40±0.05	4.4
2 176.0	2 289.5±70.7	105.20±0.03	3.1

2.4.4 方法提取回收率和基质效应 配制 SN38 质量浓度分别是 6.8、1 360.0、2 176.0 ng/mL 的 QC 血浆样品。取血浆样品 40 μL, 加入 10 μL 内标小檗碱溶液, 其余按 2.3.2 项下方法操作, 测得峰面积 A_1 ; 另取空白血浆 40 μL, 先经甲醇沉淀后, 加入 QC 标准工作溶液, 制备未经提取的 QC 样品, 测得峰面积 A_2 ; 取混合后的 QC 标准工作溶液 10 μL, 除以水代替空白基质外, 其余按 2.3.2 项下操作, 制备无基质的 QC 样品, 测得峰面积 A_3 。以提取后的样品峰面积 A_1 除以未经提取的样品峰面积 A_2 计算待测物 SN38 和内标小檗碱的回收率。以未经提取的样品峰面积 A_2 除以无基质样品峰面积 A_3 分别计算待测物和内标的基质效应, 结果见表 3。SN38 的提取回收率在 88.5%~95.7%, 基质效应在 96.4%~103.2%。内标小檗碱的提取回收率和基质效应分别是 92.1%、98.3%。

表 3 提取回收率和基质效应试验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 3 Result of extraction and matrix effect ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

待测物	质量浓度/(ng·mL ⁻¹)	回收率/%	基质效应/%
SN38	6.8	93.1±4.6	103.2±6.1
	1 360.0	88.5±5.7	98.2±5.3
	2 176.0	95.7±6.2	96.4±4.7
内标	250.0	92.1±5.1	98.3±4.2

2.4.5 稳定性试验 配制 SN38 质量浓度分别是 6.8、2 176.0 ng/mL 的血浆样品, 考察样品室温放置 2 h、3 个冻融循环 (-20~23 °C)、4 °C 放置 24 h、长期放置 30 d (-20 °C) 的稳定性, 以及处理后的样品的稳定性。结果见表 4。

表 4 稳定性试验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 4 Result of stability ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

储存条件	质量浓度/(ng·mL ⁻¹)		RSD/%	RE/%
	加入值	测量值		
室温放置 2 h	6.8	7.3	5.7	7.4
	2 176.0	2 289.2	6.1	5.2
3 个冻融循环 (-20~23 °C)	6.8	6.4	6.3	-5.9
	2 176.0	2 339.2	5.9	7.5
4 °C 放置 24 h	6.8	6.5	5.9	-4.4
	2 176.0	2 313.1	4.7	6.3
长期放置 30 d (-20 °C)	6.8	7.3	6.1	7.4
	2 176.0	2 280.5	7.7	4.8

2.5 药动学研究

取 SD 大鼠 12 只, 实验前禁食给水过夜, 随机分成 2 组。大鼠 iv β -CD-PEG-SN38 胶束溶液, 剂量以 SN38 计为 6 mg/kg, 给药后观察大鼠的腹泻情况, 同时用乙醚麻醉大鼠, 在 5、15、30、45 min 以及 1、1.5、2、3、4、6、8、10、24、48 h 眼眶取血 0.2 mL。在 4 °C、2 000 r/min 条件下离心 10 min, 分离血浆, 并于 -20 °C 冰箱中保存待测。

将同一份血浆分为两份, 各 40 μ L, 按照 2.3.2 项下方法处理, 其中 1 份用来测定血浆中游离型的 SN38 质量浓度, 另 1 份用来测定血浆中 SN38 总质量浓度 (键合型和游离型之和), 其中血浆中 SN38 的总质量浓度减去游离型的 SN38 质量浓度就是键合型的 SN38 质量浓度。

利用 Das 软件计算 β -CD-PEG-SN38 胶束溶液中 SN38 的药动学参数。平均血药浓度-时间曲线见图 2, 主要药动学参数见表 5。结果发现, 利用 Das 软件处理药动学数据, 三室模型能最佳的进行药动学数据的拟合。大鼠 iv β -CD-PEG-SN38 胶束溶液后, 游离型 SN38 和键合型 SN38 的 AUC 分别是 1 490.7、5 060.3 ng/(mL·h), 在大鼠血浆中占主导的是键合型的 SN38。

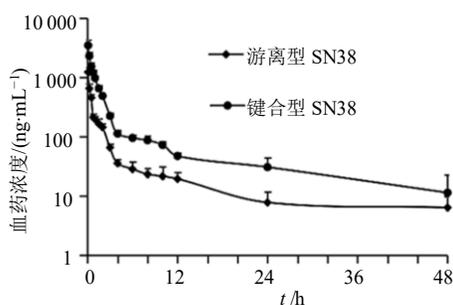


图 2 大鼠体内平均血药浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Mean plasma concentration-time curve of SN38 in rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3 讨论

本研究建立了测定血浆中 SN38 质量浓度的 HPLC-MS/MS 方法, 通过碱性水解的方法将键合型的 SN38 从 β -CD-PEG-SN38 胶束上断裂出来, 血浆中 SN38 的总质量浓度减去游离型的 SN38 质量浓度就是键合型 SN38 的质量浓度。利用沉淀蛋白法处理样品, 操作简单; 方法的基质效应很低, 适合高通量的药物测定。

聚合物胶束制备工艺简单, 胶束能以一个完整的形式达到肿瘤部位, 实现肿瘤靶向性。两亲性聚

表 5 药动学参数 ($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Pharmacokinetics parameters ($\bar{x} \pm s$)			
参数	单位	游离型 SN38	键合型 SN38
$t_{1/2\alpha}$	h	0.13 \pm 0.01	0.12 \pm 1.4
$t_{1/2\beta}$	h	1.07 \pm 0.11	0.83 \pm 0.1
$t_{1/2\gamma}$	h	18.6 \pm 1.4	23.6 \pm 3.2
V_1	L·kg ⁻¹	1.3 \pm 0.2	3.50 \pm 0.41
CL	L·h ⁻¹ ·kg ⁻¹	1.0 \pm 0.2	3.40 \pm 0.36
AUC _{0-t}	ng·mL ⁻¹ ·h ⁻¹	1 490.7 \pm 239.3	5 060.3 \pm 709.1
AUC _{0-∞}	ng·mL ⁻¹ ·h ⁻¹	1 767.7 \pm 167.4	5 739.6 \pm 843.2
K_{10}	h ⁻¹	0.98 \pm 0.10	0.80 \pm 0.10
K_{12}	h ⁻¹	2.20 \pm 0.12	2.00 \pm 0.21
K_{21}	h ⁻¹	1.60 \pm 0.14	3.20 \pm 0.33
K_{31}	h ⁻¹	0.06 \pm 0.01	0.07 \pm 0.01
K_{13}	h ⁻¹	1.04 \pm 0.12	0.72 \pm 0.09

合物胶束的药动学研究是一个具有挑战性的难题。从本研究结果可以看出, 键合型 SN38 质量浓度显著高于游离 SN38 的质量浓度, 说明胶束在血浆中具有较好的稳定性, SN38 会更多地以胶束的形式靶向肿瘤部位。键合型 SN38 的表观分布容积大, 说明胶束在组织中尤其是肿瘤组织中分布较多^[7]。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Chen A Y, Liu L F. DNA topoisomerases: essential enzymes and lethal targets [J]. *Annu Rev Pharmacol*, 1994, 34(1): 191-218.
- [2] Li T K, Liu L F. Tumor cell death induced by topoisomerase-targeting drugs [J]. *Annu Rev Pharmacol*, 2001, 41(1): 53-77.
- [3] Liew S T, Yang L X. Design, synthesis and development of novel camptothecin drugs [J]. *Curr Pharm Design*, 2008, 14(11): 1078-1097.
- [4] Mathijssen R H J, van Alphen R J, Verweij J, et al. Clinical pharmacokinetics and metabolism of irinotecan (CPT-11) [J]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7(8): 2182-2194.
- [5] Sun R S, Zhu L J, Li L, et al. Irinotecan-mediated diarrhea is mainly correlated with intestinal exposure to SN-38: Critical role of gut Ugt [J]. *Toxicol Appl Pharm*, 2020, 398: 115032.
- [6] Fontaine S D, Hann B, Reid R, et al. Species-specific optimization of PEG-SN38 prodrug pharmacokinetics and antitumor effects in a triple-negative BRCA1-deficient xenograft [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2019, 84(4): 729-738.
- [7] Qi Q R, Tian H, Yue B S, et al. Research progress of SN38

- drug delivery system in cancer treatment [J]. *Int J Nanomedicine*, 2024, 19: 945-964.
- [8] Hamaguchi T, Tsuji A, Yamaguchi K, *et al.* A phase II study of NK012, a polymeric micelle formulation of SN-38, in unresectable, metastatic or recurrent colorectal cancer patients [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2018, 82(6): 1021-1029.
- [9] Ri M, Suzuki K, Iida S, *et al.* A phase I/II study for dose-finding, and to investigate the safety, pharmacokinetics and preliminary efficacy of NK012, An SN-38-incorporating macromolecular polymeric micelle, in patients with multiple myeloma [J]. *Intern Med*, 2018, 57(7): 939-946.
- [10] Li K, Wang S J. Preparation, pharmacokinetic profile, and tissue distribution studies of a liposome-based formulation of SN-38 using an UPLC-MS/MS method [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2016, 17(6): 1450-1456.
- [11] Yang Y, Qi J, Hu J, *et al.* Lovastatin/SN38 co-loaded liposomes amplified ICB therapeutic effect via remodeling the immunologically-cold colon tumor and synergized stimulation of cGAS-STING pathway [J]. *Cancer Lett*, 2024: 216765.

[责任编辑 解学星]