

去甲斑蝥素脂质微球注射液 Beagle 犬连续静脉给药 90 d 毒动学研究

林霞^{1,2}, 唐星³, 徐宇虹¹, 张宇³, 何海冰³, 杨子毅^{2*}

1. 上海交通大学药学院, 上海 200240

2. 江南大学药学院, 江苏 无锡 214122

3. 沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016

摘要: 目的 对比研究去甲斑蝥素脂质微球注射液(NCTD-LM)和去甲斑蝥酸钠注射液(NCTD-I)连续90 d静脉滴注给予Beagle犬的毒动学特征,并研究毒性剂量下2种制剂在Beagle犬体内的蓄积情况。方法 应用超高效液相色谱-质谱联用(UPLC-MS/MS)法测定各组Beagle犬在首次给药、连续给药44和90 d的血药浓度,并计算毒动学参数。结果 分别静脉滴注给予Beagle犬0.8、1.6和3.2 mg/kg NCTD-LM后,首次给药后 AUC_{0-t} 分别为 (2.22 ± 0.53) 、 (4.77 ± 1.13) 和 (13.4 ± 3.6) h·mg/L, $t_{1/2}$ 分别为 (1.37 ± 0.18) 、 (1.64 ± 0.42) 和 (1.98 ± 0.25) h; 90 d后其 AUC_{0-t} 分别为 (3.58 ± 0.95) 、 (11.4 ± 2.0) 和 (23.5 ± 3.9) h·mg/L, $t_{1/2}$ 分别为 (3.87 ± 1.90) 、 (5.75 ± 3.29) 和 (5.84 ± 2.45) h; 2.4 mg/kg 静脉滴注给予Beagle犬NCTD-I后,首次给药和90 d后其血浆 AUC_{0-t} 分别为 (9.07 ± 2.09) 和 (14.1 ± 3.0) h·mg/L, $t_{1/2}$ 分别为 (2.84 ± 1.34) 和 (3.53 ± 1.26) h。但各组动物在停药15和30 d后,血药浓度均低于定量下限。结论 NCTD-LM在Beagle犬体内0.8~3.2 mg/kg剂量内呈现非线性药动学特征。2种制剂连续静脉给予Beagle犬90 d,血药浓度、 AUC_{0-t} 和 $t_{1/2}$ 均随给药时间延长而显著增加,但无长期蓄积作用。

关键词: 去甲斑蝥素脂质微球注射液; 去甲斑蝥酸钠注射液; Beagle犬; 毒代动力学; 非线性药动学; UPLC-MS/MS

中图分类号: R285.61 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)23-3526-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.23.014

Toxicokinetics of norcantharidin lipid microsphere for injection in Beagle's dog following 90 d repeated iv administration

LIN Xia^{1,2}, TANG Xing³, XU Yu-hong¹, ZHANG Yu³, HE Hai-bing³, YANG Zi-yi²

1. School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

2. School of Pharmacy, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

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

Abstract: **Objective** To evaluate the toxicokinetics and *in vivo* accumulation of norcantharidin lipid microsphere for injection (NCTD-LM) in Beagle's dogs following 90 d repeated iv administration by comparing with sodium demethylcantharidate injection (NCTD-I). **Methods** An ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrum method was employed to determine the NCTD in plasma of Beagle's dog after 1, 44, and 90 d repeated iv administration. The toxicokinetic parameters were calculated from the plasma concentration. **Results** After the first iv administration of 0.8, 1.6, and 3.2 mg/kg NCTD-LM to Beagle's dog, the AUC_{0-t} were (2.22 ± 0.53) , (4.77 ± 1.13) , and (13.43 ± 3.64) h·mg/L, respectively, while the $t_{1/2}$ were (1.37 ± 0.18) , (1.64 ± 0.42) , and (1.98 ± 0.25) h, respectively. After the 90 d repeated iv administration of 0.8, 1.6 and 3.2 mg/kg NCTD-LM to Beagle's dog, the AUC_{0-t} were (3.58 ± 0.95) , (11.4 ± 2.0) , and (23.5 ± 3.9) h·mg/L, respectively, while the $t_{1/2}$ were (3.87 ± 1.90) , (5.75 ± 3.29) , and (5.84 ± 2.45) h, respectively. For NCTD-I, the AUC_{0-t} were (9.07 ± 2.09) and (14.1 ± 3.0) h·mg/L respectively after 1 and 90 d repeated iv administration, while the $t_{1/2}$ were (2.84 ± 1.34) and (3.53 ± 1.26) h. 15 and 30 d after the end of administration, the concentration of NCTD in plasma of Beagle's dog in each group were all dropped below the lowest limit of quantification (LLOQ). **Conclusion** NCTD displays a nonlinear elimination at the dose range of 0.8—3.2 mg/kg after iv administration of NCTD-LM to Beagle's dog. Over the 90 d repeated iv administration period, the plasma concentration levels, AUC_{0-t} and $t_{1/2}$ for both NCTD-LM and NCTD-I

收稿日期: 2015-04-07

基金项目: 国家科技重大专项重大新药创制: 辽宁省国家重大新药创制综合平台(2013ZX09301305)

作者简介: 林霞(1986—),女,博士在读,从事药物新剂型研究与开发。Tel: 13609896755 E-mail: 13840485982@163.com

*通信作者 杨子毅,男,副教授,从事药物新剂型研究与开发。Tel: (0510)85197769 E-mail: ziggyyang@163.com

are increased with time increasing. However, no accumulation of NCTD is observed for the both formulations.

Key words: NCTD-LM; NCTD-I; Beagle's dog; toxicokinetics; nonlinear pharmacokinetics; UPLC-MS/MS

去甲斑蝥素 (norcantharidin, NCTD) 是将传统抗肿瘤中药斑蝥素去除 1、2 位甲基得到, 与斑蝥素相比, 其泌尿系统刺激作用大大降低, 同时更为显著升高白细胞水平^[1]。NCTD 多途径、多靶点的作用于肿瘤细胞, 如抑制肿瘤细胞增殖^[2-3]、诱导凋亡^[4-5]、抗侵袭转移^[6]、抑制血管生成^[7]等, 临床用于包括肝癌、食道癌、肠癌、胰腺癌等多种消化系统癌症, 以及难治性或复发多发性骨髓瘤, 尤其适用于原发性肝癌的治疗。NCTD 本身难溶于水, 以其钠盐形式——去甲斑蝥素酸钠注射液 (NCTD-I) 应用于临床。NCTD-I pH 值在 8.0~10.0 内, 与人体血液 pH 值 (7.35~7.45) 相差较大, 在临床使用过程中, 存在较为严重的血管刺激性, 易引发静脉炎症; 同时药物本身具有较强刺激性, 亦可引起血管痉挛, 加重静脉炎, 患者顺应性极差。其次, 该药物具有一定的心脏毒性和肾毒性, 治疗窗较窄, 临床推荐剂量为 10~30 mg/d, 而部分患者静脉给药超过 20 mg/d, 即出现恶心、呕吐、头晕等不良反应。以上缺点在一定程度上限制了该药物的临床应用。

研究发现, 将脂质微球作为 NCTD 的给药载体, 制备成去甲斑蝥素脂质微球注射液 (NCTD-LM), 可有效将 80% 以上的药物包载于脂质核心中, 从而消除血管刺激性^[8-9]。NCTD-LM 与 NCTD-I 相比, 同等剂量下抑制肿瘤生长作用相当, 药物毒性降低, 如小鼠 iv 给药半数致死量 (LD_{50}) 可达 NCTD-I 的 1.5~2.0 倍; 降低大鼠连续 28 d iv 给药的心脏毒性和肾毒性^[10]。文献报道, NCTD-LM 与 NCTD-I 单次 iv 给予大鼠后, 在 1.35~4.05 mg/kg 剂量内呈现非线性药动学, 4.05 mg/kg 剂量组 (相当于 1.5 倍临床拟用量 30 mg/d) 药物代谢速度显著降低, 出现大鼠死亡^[10], 提示应密切关注 NCTD 高剂量给药时的药动学特征。目前尚无 NCTD 类制剂长期连续给药后动物体内的药动学特征报道, 亟需研究。

本研究采用超高效液相色谱-质谱联用 (UPLC-MS/MS) 法, 旨在对比研究 NCTD-LM 高、中、低剂量 (3.2、1.6、0.8 mg/kg) 和 NCTD-I (2.4 mg/kg) 连续 90 d 静脉滴注给予 Beagle 犬的毒动学特征, 考察 NCTD 不同剂型在 Beagle 犬体内的全身暴露量与各毒性剂量及时间的关系, 考察毒性剂量下的药物蓄积情况, 为后续临床试验提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Waters 超高效液相-串联质谱仪, 配有 Waters ACQUITY™ 超高效液相 (自动进样器, 二元溶剂管理器)、Waters 三重四级杆检测器 (TQD)、Masslynx 色谱工作站, 美国 Waters 公司; Barnstead EASY pure® II RF/UV 超纯水机, 美国 Loma 公司; IKA Vortex Genius 3 旋涡混合器, 德国 IKA 公司; LG10-2.4A 高速离心机, 北京医用离心机厂; GL-20B 高速冷冻离心机, 上海菲恰尔分析仪器有限公司; 系列精密移液器, 德国 Eppendorf 公司; CentriVap 浓缩仪, 美国 Labconco 公司。

1.2 药品与试剂

NCTD-LM (批号 20110119, 规格 10 mg、5 mL, 质量分数 105.4%, 包封率 83.9%)、NCTD-I (批号 1102181, 规格 10 mg、5 mL, 质量分数 99.5%), 沈阳药科大学药剂研究室自制; NCTD 对照品 (批号 20080607, 质量分数 99.7%), 沈阳药科大学药剂研究室自制; 苯海拉明 (内标, IS, 批号 101129), 沈阳药科大学药物分析研究室赠送。甲醇、乙腈, 色谱纯, 美国 Fisher 公司; 甲酸, 色谱纯, 美国 DIKMA 公司; 醋酸乙酯, 分析纯, 天津博迪化工有限公司。

1.3 实验动物

Beagle 犬, 32 只, 雌雄各半, 6~8 月龄, 体重 9.20~12.61 kg, 购于广东省高要市康达实验动物科技有限公司, 动物生产许可证号: SCXK (粤) 2009-0009。单笼饲养, 环境温度 17.9~27.9 °C、相对湿度 50.2%~82.6%, 换气次数 8~10 次/h, 12 h 照明/12 h 黑暗交替, 工作照度 150~300 lx, 动物照度 100~200 lx, 自由进食进水。

2 方法

2.1 溶液制备

2.1.1 受试药物溶液的制备 NCTD-LM: 准确吸取相应容积的药物, 用注射器吸取所需容积的 5% 葡萄糖注射液, 定容至一定体积, 配制质量浓度为 0.32、0.16、0.08 mg/mL 的药液; NCTD-I: 用 5% 葡萄糖注射液稀释配制质量浓度为 0.24 mg/mL 的药液。现用现配。

2.1.2 NCTD 对照品溶液的制备 精密称取 NCTD

对照品 25 mg 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇适量溶解并稀释摇匀, 制得 500 $\mu\text{g/mL}$ 的储备液。精密量取适量上述储备液, 加甲醇稀释制成 NCTD 质量浓度分别为 0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、20、100、200、500 $\mu\text{g/mL}$ 的系列对照品溶液, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2.1.3 IS 溶液的制备 精密称取苯海拉明 2.5 mg 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇适量溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制得 25 $\mu\text{g/mL}$ 的 IS 储备溶液。精密量取 1 mL 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 1 mL 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀得 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 的 IS 溶液, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2.2 动物分组及给药方法

检疫结束后, 将 Beagle 犬按体质量和性别随机分为 4 组, NCTD-I 组 (2.4 mg/kg, 经过预试验判断为 Beagle 犬的最大耐受剂量; 以临床拟用量 30 mg/d 计, 相当于临床用量的 3 倍), NCTD-LM 低、中、高剂量 (0.8、1.6、3.2 mg/kg, 分别相当于 NCTD-I 剂量的 0.33、0.67 和 1.33 倍; 相当于临床拟用量的 1、2 和 4 倍) 组, 每组 8 只, 雌雄各半。各组 Beagle 犬后肢匀速静脉滴注方式给药, 给药体积 10 mL/kg, 滴速 2.0~2.5 mL/min; 每天给药 1 次, 第 1 周连续给药 7 d, 从第 2 周开始, 每周给药 6 d, 连续给药 13 周 (90 d)。

2.3 生物样品采集

于给药的第 1、44、90 天的给药前 (0 时), 给药开始后 5、15、30 min 及给药结束时间点 (1 h), 给药结束后 5、15、30 min 和 1、2、3、4、6、8、12、24 h (分别相当于给药开始后 1.083、1.25、1.5、2、3、4、5、7、9、13 和 25 h) 于前肢小隐静脉采集静脉血 2.0 mL; 在实验第 105、120 天单次采集静脉血 2.0 mL。加入 12 μL 肝素钠抗凝, 2 000 r/min 离心 15 min, 取血浆置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

2.4 血浆样品处理方法

取血浆样品 200 μL 置于 7 mL 离心管中, 加入 0.05 $\mu\text{g/mL}$ IS 溶液、甲醇和 1 mol/L 盐酸水溶液各 20 μL , 涡旋 1 min, 加醋酸乙酯 3 mL, 涡旋震荡 10 min, 4 000 r/min 离心 10 min 后, 取上清液 2.0 mL, $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 减压挥干, 用 100 μL 甲醇复溶, 涡旋震荡 5 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 5 μL 进样测定。

2.5 NCTD 测定方法^[10]

2.5.1 质谱条件 离子源为电喷雾离子 (ESI) 源, 正离子扫描, 毛细管电压 1.6 kV, 二级锥孔电压 3.0 V, RF 电压 0.5 V, 离子源温度 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, 脱溶剂气温度 $400\text{ }^{\circ}\text{C}$, 脱溶剂气体积流量 500 L/h, 锥孔反吹气体积流量 50 L/h, 扫描方式为多重反应监测 (MRM), 用于定量分析的离子反应分别为: NCTD m/z 169.02 $\rightarrow$ 123.10, 一级锥孔电压 40 V, 碰撞能量 10 eV; IS m/z 256.20 $\rightarrow$ 166.90, 一级锥孔电压 30 V, 碰撞能量 15 eV; 扫描时间 0.2 s。

2.5.2 色谱条件 ACQUITY UPLC[®] BEH C₁₈ 色谱柱 (50 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm), 流动相为 0.1% 甲酸水 (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱程序: 0~1.0 min, 80% $\rightarrow$ 20% A; 1.0~2.2 min, 20% A; 2.2~2.5 min, 20% $\rightarrow$ 80% A; 2.5~3.0 min, 80% A。体积流量 0.2 mL/min, 柱温 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$, 进样量 5 μL 。

3 结果

3.1 方法学考察

3.1.1 专属性考察结果 按“2.4”项方法处理空白血浆 (不加 IS 溶液)、空白血浆加入 NCTD 对照品溶液和 IS 溶液, 以及静脉滴注 NCTD-LM 和 NCTD-I 结束后 5 min 血浆样品加入 IS 溶液, 按“2.5”项方法进样检测, 色谱图见图 1。NCTD 和 IS 的保留时间分别约为 0.86、1.47 min。结果表明, 空白血浆中

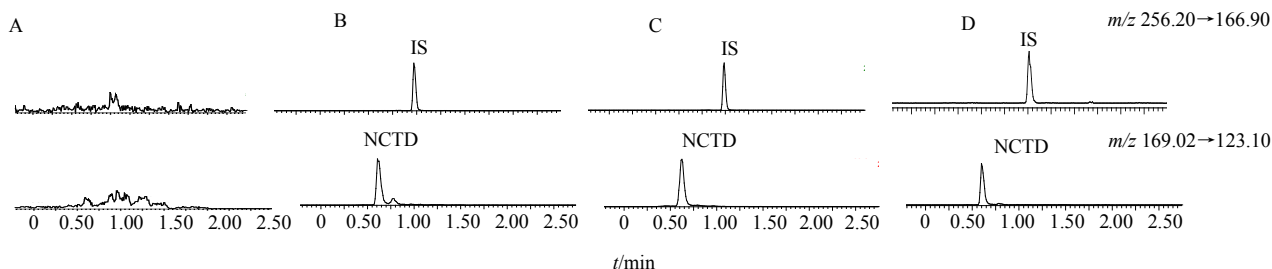


图1 空白血浆 (A)、空白血浆+NCTD 对照品+IS (B)、静脉滴注 NCTD-LM (C)、NCTD-I (D) 结束后 5 min 血浆样品+IS 的 UPLC-MS/MS 色谱图

Fig. 1 UPLC-MS/MS of blank plasma (A), blank plasma + NCTD + IS (B), plasma sample after 5 min of iv administration of NCTD-LM + IS (C), and plasma sample after 5 min of iv administration with NCTD-I + IS (D)

的内源性物质不干扰 NCTD 的测定,方法专属性高。

3.1.2 线性关系考察结果 取 Beagle 犬空白血浆 200 μL , 分别加入 NCTD 系列对照品溶液 20 μL , 配制成 NCTD 质量浓度分别为 0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0 $\mu\text{g/mL}$ 的血浆样品,按“2.4”项方法处理,“2.5”项方法进样检测。以 NCTD 质量浓度为横坐标 (X), NCTD 与 IS 峰面积比值为纵坐标 (Y),用加权 ($1/X^2$) 最小二乘法进行回归运算,求得标准曲线方程。血浆中 NCTD 的标准曲线方程为 $Y=4.14 X-2.11$; $r=0.9938$ 。在 0.01~20 $\mu\text{g/mL}$ 内线性关系良好。

3.1.3 最低定量下限 参照文献方法^[11-12],取 Beagle 犬空白血浆 200 μL ,加入质量浓度为 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 的 NCTD 对照品溶液 20 μL ,配制成 NCTD 质量浓度为 0.01 $\mu\text{g/mL}$ 的血浆样品(即标准曲线最低点),按“2.4”项方法处理,平行分析 6 个样本,并根据当日标准曲线计算每一样本测得质量浓度。RSD 为 9.6%,准确度为 $(91.7\pm 13.5)\%$,表明本方法最低定量下限可达 0.01 $\mu\text{g/mL}$ 。

3.1.4 精密度与准确度试验结果 向 Beagle 犬空白血浆中分别加入不同质量浓度的 NCTD 对照品溶液,配制成低、中、高 3 个质量浓度(0.02、0.5、1.6 $\mu\text{g/mL}$)的质控(QC)样品,按“2.4”项方法处理,每一质量浓度进行 6 样本分析,连续测定 3 d,根据当日标准曲线,求算 QC 样品质量浓度,根据 QC 样品结果计算本法的精密度与准确度。结果显示,低、中、高浓度 QC 样品批内精密度(RSD)分别为 4.1%~15.4%、2.5%~6.8%、1.8%~11.2%,均小于 20%;批间精密度(RSD)分别为 7.6%、7.5%、7.9%,均小于 15%;准确度分别为 $(91.5\pm 14.2)\%$ ~ $(96.8\pm 10.6)\%$ 、 $(92.9\pm 4.7)\%$ ~ $(106.8\pm 2.6)\%$ 、 $(101.8\pm 2.6)\%$ ~ $(111.2\pm 2.6)\%$,均在 85%~115%内。结果表明本分析方法精密度和准确度均符合要求。

3.1.5 提取回收率试验结果 (1)取 Beagle 犬空白血浆 200 μL ,分别加入 NCTD 系列对照品溶液 20 μL ,配制低、中、高 3 个质量浓度(0.02、0.5、1.6 $\mu\text{g/mL}$)样品,按“2.4”项方法处理,“2.5”项方法进样检测。每一质量浓度进行 6 样本分析,记录色谱图,得血浆样品中 NCTD 峰面积。(2)另取 Beagle 犬空白血浆 200 μL ,除不加 IS 溶液,按“2.4”项血样处理方法操作至“4 000 r/min 离心 10 min”,取上清液加入相应质量浓度的 NCTD 对照品溶液和 IS 溶液各 20 μL ,按“2.4”项方法“4 000 r/min 离

心 10 min”后面步骤操作,记录色谱图,得未经提取的 NCTD 峰面积(取 6 次测定的平均值)。以每一质量浓度 2 种处理方法峰面积之比计算提取回收率。在低、中、高质量浓度下 NCTD 提取回收率分别为 $(58.5\pm 3.3)\%$ 、 $(57.6\pm 3.5)\%$ 和 $(69.2\pm 4.6)\%$ 。

3.1.6 基质效应试验结果 取 Beagle 犬空白血浆 200 μL ,操作同“3.1.5(2)”项,记录 NCTD 和 IS 的峰面积。另取蒸馏水 200 μL 代替 Beagle 犬空白血浆,同法处理,得 NCTD 和 IS 的峰面积(取 6 次测定的平均值)。以每一质量浓度 2 种处理方法峰面积之比计算基质效应。结果显示, NCTD 基质效应为 $(99.0\pm 9.2)\%$ ~ $(103.1\pm 2.1)\%$,在 85%~115%内,表明 Beagle 犬血浆内源性物质对 NCTD 的测定基本无干扰。

3.1.7 稳定性试验结果 Beagle 犬空白血浆配制 QC 样品,每个质量浓度 36 份。每 6 份分别室温放置 6 h 后、置-20 $^{\circ}\text{C}$ 左右冰箱中储存 6 个月后、置-20 $^{\circ}\text{C}$ 左右冰箱中于 24、48 和 72 h 取出反复冻融,按“2.4”项方法处理,并进样分析,考察其稳定性;另取 6 份按“2.4”项方法处理,将复溶离心后上清液样品置进样室储存 24 h 后,进样分析,考察其进样室稳定性。结果显示,室温贮存 6 h 后、-20 $^{\circ}\text{C}$ 左右冰箱中储存 6 个月后、经 3 次冻融循环后、进样室储存 24 h 后,低、中、高质量浓度 QC 样品中 NCTD 的准确度分别为 91.6%~111.2%、93.3%~109.6%、91.3%~110.9%、103.5%~111.3%,均在 85%~115%。表明各储存条件下 NCTD 血浆样品均稳定。

3.2 毒动学血药浓度-时间曲线

Beagle 犬分别连续静脉滴注 0.8、1.6、3.2 mg/kg NCTD-LM 和 2.4 mg/kg NCTD-I 后,各时间点血药浓度的平均值与时间的关系见图 2。停药 15、30 d 后,即在第 105、120 天各给药组血药浓度均低于定量下限,未检测到 NCTD 的存在。

3.3 毒动学参数统计结果

各给药组血药浓度数据利用 DAS 2.0 软件,采用非隔室模型(统计矩法)估算毒动学参数,并利用 SPSS 11.5 软件,采用独立样本 t 检验对各组数据进行统计学比较。结果见表 1~4。

4 讨论

Beagle 犬首次静脉滴注 NCTD-LM 的低、中、高 3 个剂量组,其给药剂量比为 1:2:4,而相应剂量的 $C_{\max}$ 和 $\text{AUC}_{0-\infty}$ 比均约为 1:2:6;连续给药第

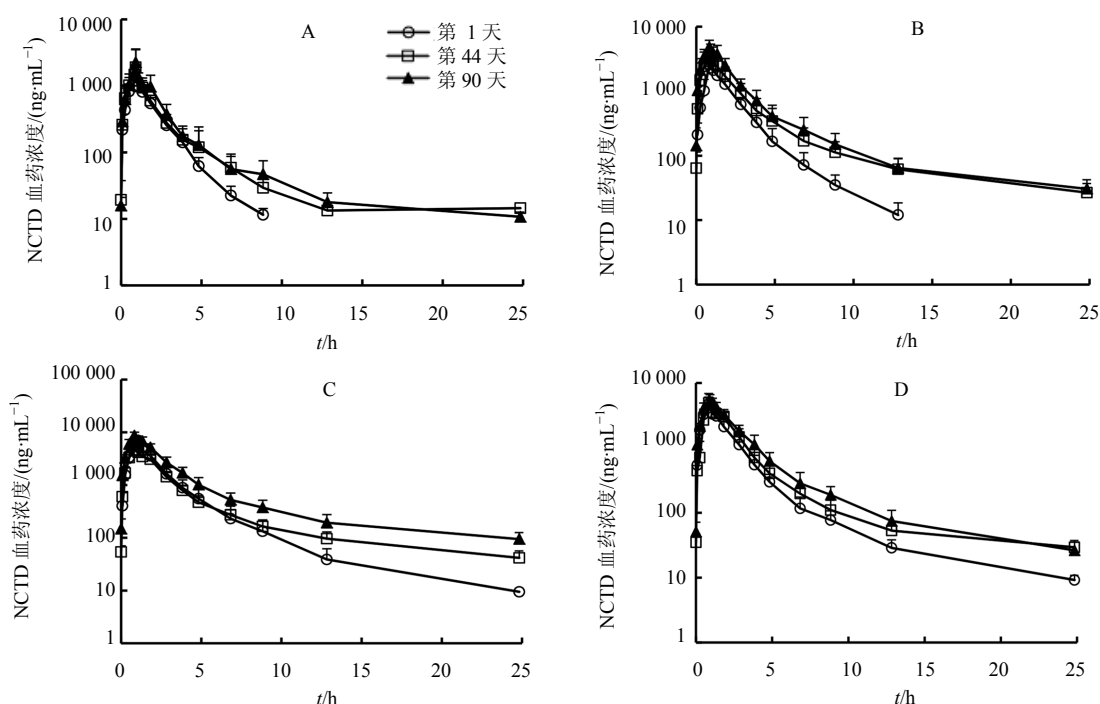


图2 Beagle犬静脉滴注 NCTD-LM 0.8 (A)、1.6 (B)、3.2 (C) mg/kg 和 NCTD-I 2.4 mg/kg (D) 后第1天 ($n=8$)、第44天 ($n=8$) 和第90天 ($n=6$) 的血药浓度-时间曲线图

Fig. 2 Plasma concentration versus time profiles on days 1 ($n=8$), days 44 ($n=8$), and days 90 ($n=6$) after iv administration of 0.8 (A), 1.6 (B), 3.2 (C) mg/kg NCTD-LM and 2.4 mg/kg NCTD-I (D)

表1 Beagle犬静脉滴注 NCTD-LM 0.8 mg/kg 各项毒动学参数

Table 1 Toxicokinetic parameters of NCTD after iv administration of 0.8 mg/kg NCTD-LM to Beagle's dog

参数	单位	1 d ($n=8$)	44 d ($n=8$)	90 d ($n=6$)
AUC_{0-t}	$h \cdot mg \cdot L^{-1}$	2.22 ± 0.53	$2.95 \pm 0.77^*$	$3.58 \pm 0.95^{**}$
$AUC_{0-\infty}$	$h \cdot mg \cdot L^{-1}$	2.24 ± 0.53	$2.99 \pm 0.78^*$	$3.63 \pm 0.95^{**}$
MRT_{0-t}	h	1.80 ± 0.15	$2.64 \pm 0.43^{**}$	$2.58 \pm 0.75^*$
$t_{1/2}$	h	1.37 ± 0.18	$4.07 \pm 1.89^{**}$	$3.87 \pm 1.90^{**}$
t_{max}	h	0.83 ± 0.14	0.90 ± 0.09	0.83 ± 0.17
CL	$L \cdot h^{-1} \cdot kg^{-1}$	0.37 ± 0.08	$0.29 \pm 0.08^*$	$0.24 \pm 0.07^{**}$
V_z	$L \cdot kg^{-1}$	0.74 ± 0.20	$1.55 \pm 0.53^{**}$	$1.23 \pm 0.57^*$
C_{max}	$mg \cdot L^{-1}$	1.26 ± 0.40	2.12 ± 1.61	$2.33 \pm 1.18^*$

与给药后第1天比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下同

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs parameter of 1 d after iv administration of NCTD-LM or NCTD-I, same as below

表2 Beagle犬静脉滴注 NCTD-LM 1.6 mg/kg 各项毒动学参数

Table 2 Toxicokinetic parameters of NCTD after iv administration of 1.6 mg/kg NCTD-LM to Beagle's dog

参数	单位	1 d ($n=8$)	44 d ($n=8$)	90 d ($n=6$)
AUC_{0-t}	$h \cdot mg \cdot L^{-1}$	4.77 ± 1.13	$8.08 \pm 2.70^*$	$11.40 \pm 2.00^{**}$
$AUC_{0-\infty}$	$h \cdot mg \cdot L^{-1}$	4.79 ± 1.13	$8.25 \pm 2.76^{**}$	$11.60 \pm 2.00^{**}$
MRT_{0-t}	h	2.12 ± 0.22	$3.42 \pm 0.43^{**}$	$3.02 \pm 0.72^{**}$
$t_{1/2}$	h	1.64 ± 0.42	$5.85 \pm 2.00^{**}$	$5.75 \pm 3.29^{**}$
t_{max}	h	0.93 ± 0.10	0.73 ± 0.23	0.82 ± 0.19
CL	$L \cdot h^{-1} \cdot kg^{-1}$	0.35 ± 0.08	$0.21 \pm 0.07^{**}$	$0.14 \pm 0.03^{**}$
V_z	$L \cdot kg^{-1}$	0.82 ± 0.30	$1.83 \pm 0.96^*$	1.18 ± 0.74
C_{max}	$mg \cdot L^{-1}$	2.82 ± 0.55	3.39 ± 1.19	$4.93 \pm 1.29^*$

表 3 Beagle 犬静脉滴注 NCTD-LM 3.2 mg/kg 各项毒动学参数

Table 3 Toxicokinetic parameters of NCTD after iv administration of 3.2 mg/kg NCTD-LM to Beagle's dog

参数	单位	1 d (<i>n</i> = 8)	44 d (<i>n</i> = 8)	90 d (<i>n</i> = 6)
AUC _{0-t}	h·mg·L ⁻¹	13.40±3.60	12.40±2.60	23.50±3.90**
AUC _{0-∞}	h·mg·L ⁻¹	13.50±3.70	12.60±2.70	24.00±3.90**
MRT _{0-t}	h	2.29±0.40	3.51±0.31**	3.71±0.46**
<i>t</i> _{1/2}	h	1.98±0.25	5.58±2.42**	5.84±2.45*
<i>t</i> _{max}	h	0.91±0.11	0.90±0.09	0.92±0.20
CL	L·h ⁻¹ ·kg ⁻¹	0.26±0.09	0.26±0.06	0.14±0.03**
<i>V</i> _z	L·kg ⁻¹	0.73±0.23	2.01±0.70**	1.18±0.65
<i>C</i> _{max}	mg·L ⁻¹	6.93±1.32	4.77±0.97**	8.73±1.31*

表 4 Beagle 犬静脉滴注 NCTD-I 2.4 mg/kg 各项毒动学参数

Table 4 Toxicokinetic parameters of NCTD after iv administration of 2.4 mg/kg NCTD-I to Beagle's dog

参数	单位	1 d (<i>n</i> = 8)	44 d (<i>n</i> = 8)	90 d (<i>n</i> = 6)
AUC _{0-t}	h·mg·L ⁻¹	9.07±2.09	11.60±2.00*	14.10±3.00**
AUC _{0-∞}	h·mg·L ⁻¹	9.14±2.09	11.60±2.10*	14.20±3.10**
MRT _{0-t}	h	2.17±0.26	2.99±0.27**	3.00±0.49**
<i>t</i> _{1/2}	h	2.84±1.34	3.25±1.27	3.53±1.26
<i>t</i> _{max}	h	0.85±0.04	0.91±0.09	0.88±0.27
CL	L·h ⁻¹ ·kg ⁻¹	0.27±0.06	0.21±0.04*	0.18±0.04**
<i>V</i> _z	L·kg ⁻¹	1.12±0.55	0.95±0.22	0.88±0.28
<i>C</i> _{max}	mg·L ⁻¹	4.80±1.20	6.05±1.67	5.76±1.13

44 天时, 相应剂量的 AUC_{0-∞} 比均约为 1:3:4; 连续给药第 90 天后, 相应剂量的 AUC_{0-∞} 比均约为 1:3:6。此结果表明 NCTD 在 Beagle 犬体内, 在 0.8~3.2 mg/kg 的剂量内符合非线性动力学特征。此外, NCTD-LM 以低、中剂量给药时, 其在 Beagle 犬体内药动学行为基本相似; 而高剂量组, 其药物消除速度略见减慢但无显著性差异, 提示当 NCTD 以高剂量给药时应密切关注其毒性反应。此结果与文献报道结果较为相似, 前期研究结果显示^[10]NCTD 脂质微球和 NCTD-I 在大鼠体内, 在 1.35~4.05 mg/kg 剂量内均呈现非线性动力学特征; Liu 等^[13]研究发现在 0.38~1.6 mg/kg 剂量内静脉注射给予 Beagle 犬 NCTD-I, 药物呈现非线性动力学特征; 且随着给药剂量的增加, 药物消除速度显著降低。魏春敏^[14]研究结果显示 NCTD 在人体内 24 h 后约有 30% 的药物从尿中以原形排泄; ig 给予小鼠 2 h 后, 血清中原型药物比例仅为 10%, 另 2 种主要代谢产物比例分别为 30% 和 40%; ig 给予大鼠后尿液中可检测到原型药物 (NCTD) 和其代谢产物 (环氧化物水合酶作用下的水合产物)^[15]。上述文献结果显示 NCTD 在体内主要以代谢消除为主, 由于目前尚无关于 NCTD 体内非线性药动学机制的研究, 其体内代谢机制仍需进一步深入研究。

Beagle 犬以 0.8 mg/kg 连续 90 d 静脉滴注 NCTD-LM, 经 *t* 检验, 其连续给药 44、90 d 与首次给药相比, AUC_{0-t}、AUC_{0-∞}、MRT_{0-t}、*t*_{1/2}、CL 和 *V*_z 均具有显著性差异 (*P*<0.05、0.01)。*t*_{max}、*C*_{max} 随用药时间延长无显著性差异 (*P*>0.05)。CL 随给药时间延长而呈现减小趋势, 并且在给药过程中, 前一天给药结束后 24 h (即开始给药后 25 h, 次日给药前 0 h) 的血药浓度也随着用药时间的延长而增加。Beagle 犬以 1.6 mg/kg 连续 90 d 静脉滴注 NCTD-LM, 经 *t* 检验, 其连续给药 44、90 d 与首次给药相比, AUC_{0-t}、AUC_{0-∞}、MRT_{0-t}、*t*_{1/2} 和 CL 均具有显著性差异 (*P*<0.05、0.01), *t*_{max} 无显著性差异 (*P*>0.05), CL 随给药时间延长而呈现减小趋势。Beagle 犬以 3.2 mg/kg 连续 90 d 静脉滴注 NCTD-LM, 经 *t* 检验, 其连续给药 44、90 d 与首次给药相比, MRT_{0-t}、*t*_{1/2} 和 *C*_{max} 均具有显著性差异 (*P*<0.05、0.01), CL 随给药时间延长而呈现减小趋势。但在停药 15 和 30 d 后, 即在第 105、120 天, 低、中、高各剂量组 Beagle 犬体内的血药浓度均低于定量下限, 未检测到药物的存在。表明 NCTD-LM 以 0.8、1.6 和 3.2 mg/kg 剂量连续静脉给予 Beagle 犬 90 d, 其在 Beagle 犬体内动力学特征虽有一定的变化, 药物清除速度减慢, 但在停药后其在 Beagle

犬体内无蓄积作用。

Beagle 犬以 2.4 mg/kg 连续 90 d 静脉滴注给予 NCTD-I, 连续给药 44、90 d 与首次给药相比, AUC_{0-4} 、 $AUC_{0-\infty}$ 、 MRT_{0-4} 和 CL 均具有显著性差异 ($P < 0.05$ 、 0.01), CL 随给药时间延长而呈现减小趋势; 并且在给药过程中, 前一天给药后 24 h (即开始给药后 25 h, 次日给药前 0 h) 的血药浓度也随着用药时间的延长而增加, 说明 NCTD-I 2.4 mg/kg 连续给药 90 d 后其清除速度显著减慢。但在停药 15 和 30 d 后, 即在第 105、120 天给药, Beagle 犬体内的血药浓度均低于定量下限, 未检测到药物的存在。表明其停药一段时间后药物可代谢完全。

以上主要动力学参数的变化和血药浓度的比较说明在增加给药剂量且连续给药的过程中, NCTD 在 Beagle 犬体内的代谢动力学发生了一定变化, 药物消除速度均不同程度减慢, 以 NCTD-LM 3.2 mg/kg 和 NCTD-I 2.4 mg/kg 减慢最为显著。推测可能原因为: ①在连续给药过程中, 与 NCTD 代谢相关的代谢酶部分饱和, 使 Beagle 犬体内的药物代谢功能受到影响, 导致随着给药时间延长, 药物消除速度减慢; ②与药物排泄相关的转运载体存在饱和效应, 随着给药时间的延长, 有效转运载体逐渐减少, 导致药物转运速度下降; ③药物分布相关血浆/组织蛋白存在饱和效应, 随时间的延长, 可供药物有效结合的蛋白减少, 导致分布速度减慢。在以高剂量给药时, 上述与药物分布、代谢和排泄相关的代谢酶及转运载体系统更易达到饱和, 因此高剂量连续给药时, 药物消除速度减慢更为显著。

此外在连续给药过程中, NCTD-LM 低、中、高剂量组均未见动物死亡, 但 NCTD-I 2.4 mg/kg 剂量组引起 1 例动物死亡, 因此在高剂量连续使用 NCTD-LM 时需密切关注其毒性反应, 防止药物蓄积。

参考文献

- [1] McCluskey A, Ackland S P, Bowyer M C, *et al.* Cantharidin analogues: synthesis and evaluation of growth inhibition in a panel of selected tumour cell lines [J]. *Bioorg Chem*, 2003, 31(1): 68-79.
- [2] 常城, 朱尤庆, 梅娟娟. 去甲斑蝥素对人肝癌 HepG2 细胞生长抑制作用的实验观察 [J]. *实用癌症杂志*, 2010, 25(5): 450-452.
- [3] Liao H F, Chen Y J, Chou C H, *et al.* Norcantharidin induces cell cycle arrest and inhibits progression of human leukemic Jurkat T cells through mitogen-activated protein kinase-mediated regulation of interleukin-2 production [J]. *Toxicol In Vitro*, 2011, 25(1): 206-212.
- [4] 杜恒飞, 于路佳, 蒙艳凤, 等. 去甲斑蝥素抗骨髓瘤作用及其机制研究 [J]. *中草药*, 2011, 42(12): 2479-2483.
- [5] Chang C, Zhu Y, Tang X, *et al.* The anti-proliferative effects of norcantharidin on human HepG2 cells in cell culture [J]. *Mol Biol Rep*, 2011, 38(1): 163-169.
- [6] Chen Y J, Chang W M, Liu Y W, *et al.* A small-molecule metastasis inhibitor, norcantharidin, downregulates matrix metalloproteinase-9 expression by inhibiting Sp1 transcriptional activity in colorectal cancer cells [J]. *Chem Biol Interact*, 2009, 181(3): 440-446.
- [7] Chen Y J, Tsai Y M, Kuo C D, *et al.* Norcantharidin is a small-molecule synthetic compound with anti-angiogenesis effect [J]. *Life Sci*, 2009, 85(17/18): 642-651.
- [8] Ma J, Teng H, Wang J, *et al.* A highly stable norcantharidin loaded lipid microspheres: preparation, biodistribution and targeting evaluation [J]. *Int J Pharm*, 2014, 473(1/2): 475-484.
- [9] Wang L, He H, Tang X, *et al.* A less irritant norcantharidin lipid microspheres: formulation and drug distribution [J]. *Int J Pharm*, 2006, 323(1/2): 161-167.
- [10] Lin X, Zhang B, Zhang K, *et al.* Preclinical evaluations of norcantharidin-loaded intravenous lipid microspheres with low toxicity [J]. *Ext Opin Drug Deliv*, 2012, 9(12): 1449-1462.
- [11] Zheng Y, Hu X, Zhai Y, *et al.* Pharmacokinetics and tissue distribution study of camellianin A and its major metabolite in rats by liquid chromatography with tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2015, 997: 200-209.
- [12] Zhang G, Qi W, Xu L, *et al.* Pharmacokinetics of irisolidone and its main metabolites in rat plasma determined by ultra performance liquid chromatography / quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2015, 1005: 23-29.
- [13] Liu M, Ma X, Jin Z, *et al.* Determination and pharmacokinetic study of the diacid metabolite of norcantharidin in beagle plasma by use of liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2013, 405(28): 9273-9283.
- [14] 魏春敏. ^3H -去甲斑蝥素正常小鼠/荷瘤小鼠药代动力学与组织分布及去甲斑蝥素片人体血/尿药代动力学 [D]. 济南: 山东大学, 2006.
- [15] 张蕊. 去甲斑蝥素钠体内处置过程及其脂质体制剂的研制 [D]. 济南: 山东大学, 2009.