

伊立替康脂质体的血浆药物含量检测及药动学研究

倪利锋¹, 曾义英², 曾昭武², 周晓晓², 张娜娜², 陈枢青^{1*} (1. 浙江大学药学院, 杭州 310000; 2. 杭州师范大学, 杭州 310000)

摘要: 目的 考察伊立替康脂质体大鼠血浆药物浓度随时间变化趋势和药动学参数, 并与伊立替康注射液进行比较, 评价伊立替康脂质体药动学特性。方法 大鼠尾静脉注射给予伊立替康脂质体注射液, 给药剂量分别为 5, 10, 20 mg·kg⁻¹, 对照组给予伊立替康注射液 20 mg·kg⁻¹。采用 HPLC 检测大鼠血浆中伊立替康含量。采用 DAS 3.0 软件, 按药动学模块非房室模型计算分析药动学参数。采用 SPSS 18.0 软件进行药动学参数的统计分析。结果 伊立替康血浆对照品溶液在 0.20~100.02 μg·mL⁻¹ 内线性良好, $r=0.999\ 3$ 。与伊立替康注射液相比, 伊立替康脂质体注射液的血浆达峰浓度 $C_{\max}$ 显著提高(82 倍), 平均滞留时间 $MRT_{(0-t)}$ 显著延长(14.6 倍), 半衰期 $t_{1/2}$ 显著延长(6.5 倍), 总伊立替康血浆暴露量极大提高(748.5 倍), 经统计学分析均有显著性差异。结论 伊立替康脂质体注射液的药动学参数与伊立替康注射液相比有显著改善, 可达到增强药效的目的。

关键词: 伊立替康; 高效液相色谱法; 脂质体; 药动学; 血药浓度

中图分类号: R917.101 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2019)05-0551-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.05.008

引用本文: 倪利锋, 曾义英, 曾昭武, 等. 伊立替康脂质体的血浆药物含量检测及药动学研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(5): 551-557.

Study of Drug Content Detection Method in Plasma and Plasma Pharmacokinetic of Irinotecan Liposome

NI Lifeng¹, ZENG Yiyang², ZENG Zhaowu², ZHOU Xiaoxiao², ZHANG Nana², CHEN Shuqing^{1*} (1. College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310000, China; 2. Hangzhou Normal University, Hangzhou 310000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the plasma drug concentration and pharmacokinetic parameters in rats after intravenous injection of irinotecan liposome, and to evaluate the pharmacokinetic characteristics of irinotecan liposome compared with irinotecan injection. **METHODS** The dosages of irinotecan liposome injection were 5, 10 and 20 mg·kg⁻¹, respectively. The dose of irinotecan injection in the control group was 20 mg·kg⁻¹. The HPLC method was used to detect the irinotecan content in the rat plasma. The pharmacokinetic parameters were calculated by the non-atrioventricular model of the pharmacokinetic template in DAS 3.0 software. The statistical analysis of pharmacokinetic parameters was carried out with SPSS 18.0 software. **RESULTS** The control solution of irinotecan in plasma was well linear in the range of 0.20–100.02 μg·mL⁻¹, $r=0.999\ 3$. Compared with irinotecan injection at the same dose, the plasma peak concentration $C_{\max}$ of the irinotecan liposome was significantly increased(82 times), the average residence time $MRT_{(0-t)}$ was significantly prolonged(14.6 times), the half-life $t_{1/2}$ was prolonged(6.5 times), and the total irinotecan plasma exposure was greatly increased(748.5 times). And they had significant difference by statistics analysis. **CONCLUSION** Compared with irinotecan injection, the pharmacokinetics of irinotecan liposome are significantly improved, may enhance the efficacy of irinotecan.

KEYWORDS: irinotecan; HPLC; liposome; pharmacokinetics; plasma concentration

伊立替康是临床上常用的化疗药物, 最早用于标准化疗方案失败后的转移性结直肠癌的治疗, 目前已广泛应用于结直肠癌、胃癌、胰腺癌、肺癌、生殖系统肿瘤的治疗, 其安全性和有效性被认为比现有临床药物更佳。近年来国内外学者对伊立替康做了大量的临床前和临床应用研究^[1-2]。伊立替康属于水溶性半合成喜树碱类衍生物, 是 DNA 拓扑异构酶 I(Topo I)抑制剂, 作用于细胞周

期 S 期, 阻止 Topo I 对 DNA 断链的修复。与传统的酶抑制剂不同, 它并不阻碍 Topo I 的结合, 而是通过阻断酶与 DNA 反应的最后一步, 即 DNA 在切口部位的重新结合而起效。Topo I 抑制剂进入细胞后, 不能与 DNA 直接发生作用, 而是与 Topo-DNA 复合物共价结合形成 Topo-药物-DNA 复合物, 并稳定这一复合体, 抑制 DNA 重连步骤, 导致 DNA 链的断裂, 进而出现细胞凋亡^[3]。因而

作者简介: 倪利锋, 女, 硕士生 Tel: (0571)86886885 Email: nlf@hznu.edu.cn
(0571)88208411 E-mail: chenshuqing@zju.edu.cn

*通信作者: 陈枢青, 男, 博士, 教授, 博导 Tel:

Topo I 的浓度越高,对药物越敏感。伊立替康作为前体药物进入人体后,一部分经过羧酸酯酶转化为活性代谢物 7-乙基-10-羟基喜树碱(SN-38),其活性比伊立替康强 100~1 000 倍,细胞毒性约为伊立替康的 200~2 000 倍^[4-5]。目前已上市的伊立替康氯化钠注射剂和冻干粉制剂在临床应用中存在的主要问题是半衰期短,内酯环对 pH 敏感,降解开环后抗肿瘤活性降低,不良反应严重,如白细胞和血小板减少,严重腹泻等胃肠道症状^[6]。

脂质体是由脂质双分子层所形成的一种超微球形载体制剂,是纳米载药系统的典型代表。脂质体能够保护药物避免其在血浆中降解、绕开外排转运蛋白,有利于药物靶向进入肿瘤组织,显著增加肿瘤药物浓度^[7],是药物研发的重要方向。近年来,人们将多种制剂工艺、方法加以综合,制备出具有更佳稳定性和靶向性的新型脂质体,如膜融合脂质体、柔性脂质体、修饰脂质体等^[8]。虽然美国 FDA 已有批准的伊立替康脂质体注射液上市,但是相比伊立替康氯化钠注射剂和冻干粉制剂,其治疗肿瘤的范围较窄。有多家药厂正在进一步研究开发伊立替康脂质体,期望通过脂质体膜对药物的包封和缓释作用,延长其在体内的存留时间,提高其治疗多种肿瘤的药效。伊立替康脂质体在体内的药动学比较复杂,需要进行大量的实验研究,确定更精准的检测方法。本研究探讨伊立替康脂质体在血浆中的药物含量检测方法,以及伊立替康脂质体在大鼠体内血浆的药动学行为,为伊立替康脂质体药物的开发和临床研究提供参考。

1 仪器与试剂

126 型 Agilent 高效液相色谱仪(美国 Agilent 科技公司);色谱柱[月旭科技(上海)股份有限公司,Ultimate PFP 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)];Iecmicrocl 17 型离心机(美国 Thermofisher Scientific 公司);WH-861 型旋涡混合器(中国华利达实验设备公司);PB-10 型 pH 计(赛多利斯公司);Centrifuge 5418 型离心机(德国 Eppendorf 公司)。

盐酸伊立替康三水合物对照品(上海创诺制药有限公司,批号:Day056-2-170101;纯度:99.9%);乙腈、甲醇均为色谱级,购自百灵威科技有限公司;醋酸铵(分析纯,Alfa Aesar 公司);三乙胺、磷酸均为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司;伊立替康脂质体(Ipsen Biopharmaceuticals Inc,

批号:160204A);伊立替康注射液(自制,批号:18011001)。SD 大鼠[28 只,杭州师范大学实验动物中心提供,许可证号:SYXK(浙)2016-0014]。

2 方法

2.1 流动相配制

称取醋酸铵 7.7 g,置于 1 L 烧杯,加入纯水 800 mL 和三乙胺 10 mL 混匀,用磷酸调节 pH 至 4.0,配成缓冲液。取缓冲液 450 mL 加入甲醇 550 mL,乙腈 100 mL,超声脱气 30 min,即得。

2.2 色谱条件

Ultimate PFP 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);紫外双波长(254/370 nm)检测,进样量 10 μL,柱温 30 ℃,流速 1 mL·min⁻¹,检测时长 15 min。以 254 nm 波长的峰面积计算药物含量。

2.3 伊立替康对照品储备液的制备

500.00 μg·mL⁻¹对照品储备液的配制:称取盐酸伊立替康三水合物对照品 57.71 mg(含伊立替康游离碱为 50 mg),精密称定,置于 100 mL 量瓶中,加流动相至刻度,70 ℃加热 15 min,超声 15 min,置冷,摇匀,即得。同法制备 100.00, 10.00 μg·mL⁻¹对照品储备液。

2.4 伊立替康对照品溶液的配制

分别精密移取伊立替康 500.00 μg·mL⁻¹对照品储备液 0, 10, 8, 6, 4, 2 mL 置于 50 mL 量瓶中,加流动相至刻度,配成 0, 100.00, 80.00, 60.00, 40.00, 20.00 μg·mL⁻¹伊立替康对照品溶液。分别精密移取 100.00 μg·mL⁻¹对照品储备液 5, 4, 3, 2, 1 mL 置于 50 mL 量瓶中,加流动相至刻度,配成 10.00, 8.00, 6.00, 4.00, 2.00 μg·mL⁻¹伊立替康对照品溶液。分别精密移取 10.00 μg·mL⁻¹对照品储备液 5, 4, 3, 2, 1.5, 1 mL 置于 50 mL 量瓶中,加流动相至刻度,配成 1.00, 0.80, 0.60, 0.40, 0.30, 0.20 μg·mL⁻¹伊立替康对照品溶液。各浓度对照品溶液用 0.22 μm 一次性过滤器过滤,进样检测。

2.5 伊立替康血浆对照品溶液的配制

精密称取盐酸伊立替康三水合物 103.90, 83.13, 62.35, 41.57, 20.81 mg,加流动相稀释至 10 mL,70 ℃加热 15 min,超声 15 min,置冷,摇匀,配制成 9 001.48, 7 202.05, 5 401.75, 3 601.46, 1 802.89 μg·mL⁻¹对照品溶液。取上述伊立替康对照品溶液适量,用流动相稀释,分别配制成 900.15, 720.20, 540.18, 360.15, 180.29,

90.01, 72.02, 54.02, 36.01, 27.01, 18.03, 9.01, 4.51 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 伊立替康对照品溶液。

血浆对照品溶液的配制: 取空白血浆 0.2 mL 于 2 mL 离心管中, 分别加入上述伊立替康对照品溶液 20 μL , 混匀, 再加入甲醇 1.28 mL, 涡旋振荡 2 min, 离心, 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 30 min, 取上清液 1 mL, 加入 0.2 mL 5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl, 静置 10 min, 过滤, 进样检测。最终伊立替康血浆对照品溶液浓度分别为 100.02, 80.02, 60.02, 40.02, 20.03, 10.00, 8.00, 6.00, 4.00, 2.00, 1.00, 0.80, 0.60, 0.40, 0.30, 0.20, 0.10, 0.05 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.6 方法学验证

2.6.1 专属性试验 取空白血浆、对照品溶液、伊立替康注射液血浆样品溶液、伊立替康脂质体血浆样品溶液进样检测, 观察空白血浆对样品有无干扰。采用高效液相软件计算理论板数, 分离度。

2.6.2 线性范围考察 取 0.20~100.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 伊立替康对照品溶液进样检测, 建立伊立替康对照品溶液标准曲线。取 0.20~100.02 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 伊立替康血浆对照品溶液进样检测, 建立伊立替康血浆对照品溶液标准曲线。

2.6.3 药物残留 在高浓度对照品溶液检测完后配制流动相样品, 在高浓度伊立替康标准血浆样品检测完后配制空白血浆样品, 进样检测, 评估药物残留。

2.6.4 定量限与检测限 取伊立替康对照品溶液 0.05, 0.20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 各配制 5 个样品, 进样检测。取伊立替康血浆对照品溶液 0.05, 0.20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 各制备 6 个样品, 进样检测。

2.6.5 精密度与回收率检测 伊立替康对照品溶液精密度检测: 每天配制 20.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 伊立替康对照品溶液 6 个样品, 分别于第 1 天, 第 2 天, 第 3 天进样检测。

伊立替康对照品溶液回收率检测: 分别取伊立替康对照品溶液 10.00, 20.00, 30.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 1 mL 与 20.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 1 mL 混匀, 配制 3 个样品。进样检测。

伊立替康血浆对照品溶液精密度与回收率检测: 取空白血浆 0.2 mL 于 2 mL 离心管中, 分别加入伊立替康对照品溶液 20 μL (浓度分别为 18.03, 180.29, 720.20, 1 802.89, 7 202.05 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 每个浓度配制 5 个样品), 混匀, 再按血浆对照品溶液配制方法处理, 进样检测。另外配制对照样

品: 取纯水 0.2 mL 于 2 mL 离心管中, 其余操作同上, 进样检测。计算日内精密性与批内回收率。按上述方法每天配制样品, 一共检测 3 批, 计算日间精密性与批间回收率。

2.6.6 稳定性 伊立替康对照品溶液稳定性: 配制伊立替康对照品溶液 20.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 3 个样品, 于室温下放置 0, 24, 48 h 后检测。

伊立替康血浆样品-20 $^{\circ}\text{C}$ 稳定性: 取空白血浆 0.2 mL 于 2 mL 离心管中加入 1 802.89 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 伊立替康对照品溶液 20 μL , 混匀, 配制 9 个样品, 分别放置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱 0, 24, 48 h, 取出复温后, 按血浆对照品溶液配制方法处理, 进样检测。

伊立替康血浆样品室温稳定性: 取空白血浆 0.2 mL 于 2 mL 离心管中加入 1 802.89 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 伊立替康对照品溶液 20 μL , 混匀, 配置 9 个样品, 分别放置于室温 0, 24, 48 h, 按血浆对照品溶液配制方法处理, 进样检测。

伊立替康血浆样品瓶溶液稳定性: 取上述室温 0 h 配制好的血浆样品瓶 3 个, 室温放置 0, 24, 48 h 后检测。

2.6.7 基质效应 取来自于 6 只不同大鼠的空白血浆 0.2 mL 于 2 mL 离心管中, 加入甲醇 1.3 mL, 涡旋振荡 2 min, 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 30 min, 取上清液 1 mL, 分别加入伊立替康对照品溶液 20 μL (分别加入 3 个浓度 36.01, 720.20, 5 401.75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 每只大鼠的血浆制备 3 个浓度的样品), 再加入 0.18 mL 5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl, 静置 10 min, 过滤, 进样检测。取纯水 0.2 mL 代替空白血浆 0.2 mL, 其余操作同上, 进样检测。计算基质效应及 RSD。

2.6.8 耐用性 取 20.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 伊立替康对照品溶液和 20.03 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 伊立替康血浆对照品溶液进样, 分别按下列条件: 规定色谱条件, 色谱柱流速 0.98, 1.02 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 柱温 29, 31 $^{\circ}\text{C}$, 流动相缓冲液 pH 值 3.9 和 4.1, 流动相中乙腈-缓冲液-甲醇的比例为 95:450:550, 流动相中乙腈体积比例为 105:450:550, 共 8 种条件, 每种条件每个样品进样 3 次。通过计算条件改变后的峰面积与规定条件下峰面积的 RSD 来评价耐用性。

2.7 大鼠药动学试验

取 21 只 SD 大鼠, 分 3 组, 每组 7 只, 尾静脉注射给予伊立替康脂质体注射液, 给药剂量分别为 5, 10, 20 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 给药后按不同时间点(0,

0.17, 0.5, 1, 2, 4, 8, 10, 24, 26, 28, 30, 34, 48 h)从眼眶静脉取血 0.5 mL, 用抗凝管收集, 4 000 r·min⁻¹离心 10 min, 取血浆, -20 ℃保存待测。取 7 只 SD 大鼠, 尾静脉注射给予伊立替康注射液, 给药剂量为 20 mg·kg⁻¹, 给药后按不同时间点(0, 0.17, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 24, 26 h)从眼眶静脉取血 0.5 mL, 用抗凝管收集, 4 000 r·min⁻¹离心 10 min, 取血浆, -20 ℃保存待测。

2.8 血浆样品处理

吸取 0.2 mL 血浆, 加入 1.3 mL 甲醇, 涡旋振荡 2 min 后离心, 12 000 r·min⁻¹离心 30 min, 然后吸取上清液 1 mL, 分别加入 0.2 mL 5 mol·L⁻¹

HCl, 静置 10 min 后用 0.22 μm 一次性过滤器过滤, 进样, 采用 HPLC 检测药物浓度。

2.9 药动学参数计算

采用 DAS 3.0 软件, 按药物代谢动力学模块非房室模型进行计算分析。采用 SPSS 18.0 软件中的 *t* 检验进行药动学参数的统计分析。

3 结果

3.1 方法学验证

3.1.1 伊立替康血浆样品专属性 血浆对伊立替康的检测没有干扰, 专属性良好。伊立替康保留时间在 5.2 min 左右, 理论板数>4 000, 分离度>1.5, 符合要求。见图 1。

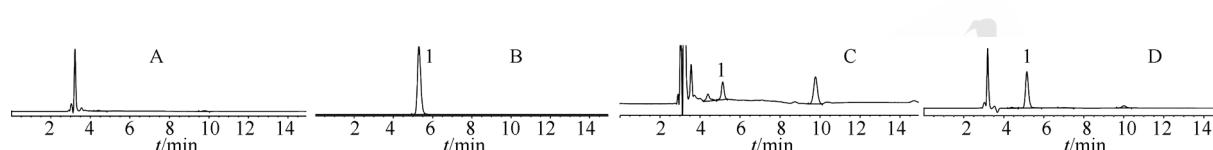


图 1 高效液相色谱图

A-空白血浆; B-对照品溶液(20.00 μg·mL⁻¹); C-伊立替康注射液血浆样品溶液(0.5 h); D-伊立替康脂质体血浆样品溶液(0.5 h); 1-伊立替康。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-blank plasma sample; B-standard solution(20.00 μg·mL⁻¹); C-plasma sample solution of irinotecan injection(0.5 h); D-plasma sample solution of irinotecan liposome(0.5 h); 1-irinotecan.

3.1.2 伊立替康对照品溶液与血浆对照品溶液标准曲线 伊立替康对照品溶液在 0.20~100.00 μg·mL⁻¹内线性良好, 回归方程为 $y=32.4063x+0.6806$, $r=0.99995$ 。且回算浓度的准确度在 95%~110%之间, 符合要求。

伊立替康血浆对照品溶液在 0.20~100.02 μg·mL⁻¹内线性良好, 回归方程为 $y=32.3676x+0.30334$, $r=0.9993$ 。且回算浓度的准确度在 94%~110%之间, 符合中国药典关于标准曲线“校正标样回算的浓度一般应该在标示值的±15%以内, 定量下限处应该在±20%内”的要求。

3.1.3 残留 在高浓度对照品溶液进样分析后, 流动相样品的峰面积小于定量下限的 20%; 在高浓度血浆对照品溶液进样分析后, 空白血浆样品的峰面积小于定量下限的 20%, 说明本方法无残留效应。

3.1.4 伊立替康对照品溶液与血浆对照品溶液的定量限与检测限 伊立替康对照品溶液检测限为 0.5 ng, 定量限为 2 ng。伊立替康血浆对照品溶液检测限为 0.5 ng, 定量限为 2 ng。

3.1.5 伊立替康对照品溶液与血浆对照品溶液的精密性与回收率 伊立替康对照品溶液日内精密

度 RSD 为 0.55%, 日间精密度 RSD 为 0.52%。伊立替康对照品溶液平均加样回收率为 99.76%, RSD 为 0.76%。符合要求。

伊立替康从低到高 5 个浓度的血浆对照品的日内精密度分别为 2.12%, 2.00%, 0.28%, 0.70%, 1.05%, 平均日内精密度 RSD 为 1.23%。伊立替康从低到高 5 个浓度的血浆对照品的日间精密度分别为 7.08%, 4.73%, 2.08%, 1.02%, 0.94%, 平均日间精密度为 3.17%。符合中国药典精密度一般不得超过 15%, 定量下限的精密度不得超过 20%的要求。

伊立替康 5 个浓度的血浆对照品, 从低到高平均批内回收率为 104.78%, 100.96%, 96.50%, 99.21%, 99.37%; 总平均批内回收率为 100.17%, RSD 为 3.04%。血浆对照品各浓度从低到高平均批间回收率为 100.65%, 96.30%, 95.27%, 95.55%, 97.31%, 总平均批间回收率为 97.02%, RSD 为 2.25%。符合中国药典关于回收率均值应在 85%~115%, 定量下限回收率应在 80%~120%的要求。

3.1.6 稳定性试验 伊立替康对照品溶液 24 h 与 0 h 相比, RSD 为 0.89%。48 h 与 0 h 相比, RSD

为 0.88%，符合要求。伊立替康血浆样品-20 ℃ 24 h 的 RSD 为 2.31%。血浆样品-20 ℃ 48 h 的 RSD 为 2.33%。血浆样品室温 24 h 的 RSD 为 1.76%。血浆样品室温 48 h 的 RSD 为 4.73%。血浆样品瓶溶液 24 h 的 RSD 为 0.63%，血浆样品瓶溶液 48 h 的 RSD 为 0.64%。RSD 值均<5%。说明伊立替康对照品溶液在室温 48 h 内稳定，伊立替康血浆样品在-20 ℃和室温 48 h 内稳定，伊立替康血浆样品瓶溶液在室温 48 h 内稳定，符合要求。

3.1.7 基质效应 伊立替康标准血浆样品低中高浓度的基质因子分别为 99.85%，102.56%，100.59%，平均基质因子为 101.00%。低中高浓度的基质因子 RSD 分别为 3.51%，1.26%，3.02%，平均基质因子 RSD 为 2.84%。说明血浆基质对该方法的含量检测无明显影响，基质因子的变异系数≤15%，符合要求。

3.1.8 耐用性 伊立替康对照品溶液按“2.6.8”项下液相条件改变时，与规定色谱条件的峰面积比较，RSD 分别为 1.52%，0.69%，0.09%，0.10%，0.05%，0.09%，0.41%，0.42%。伊立替康血浆对照品溶液按“2.6.8”项下液相条件改变时，与规定色谱条件的峰面积比较，RSD 分别为 1.40%，0.92%，0.04%，0.19%，0.09%，0.28%，0.14%，0.07%。结果显示伊立替康对照品溶液和伊立替康血浆对照品溶液的耐用性 RSD 均<2%，符合要求，色谱参数的略微改变对伊立替康对照品溶液和伊立替康血浆对照品溶液的检测结果无明显影响，其中色谱柱流速对药物含量检测影响稍大。

表 1 伊立替康脂质体与伊立替康注射液的血浆药动力学参数比较

Tab. 1 Comparison of plasma pharmacokinetic parameters of irinotecan liposome with irinotecan injection

参 数	伊立替康脂质体 5 mg·kg ⁻¹	伊立替康脂质体 10 mg·kg ⁻¹	伊立替康脂质体 20 mg·kg ⁻¹	伊立替康注射液 20 mg·kg ⁻¹	20 mg·kg ⁻¹ 脂质体与 注射液药动力学参数比值
AUC _(0-t) /mg·L·h ⁻¹	872.741±378.082	3 158.919±255.517	6 759.674±435.250	9.031±1.950	748.5
AUC _(0-∞) /mg·L·h ⁻¹	1 211.145±517.725	3 235.207±215.176	6 871.463±477.741	12.805±3.570	536.6
MRT _(0-t) /h	6.490±2.742	10.573±1.265	12.278±0.446	0.840±0.060	14.6
MRT _(0-∞) /h	11.193±1.389	11.586±0.837	13.011±0.787	1.609±0.283	8.1
VRT _(0-t) /h ²	34.326±31.411	94.469±19.639	120.164±8.674	0.305±0.011	394.0
VRT _(0-∞) /h ²	129.931±42.596	137.109±8.546	152.864±26.774	2.367±0.787	64.6
C _{last} /mg·L ⁻¹	26.904±27.784	7.088±4.231	11.065±4.300	2.431±0.779	4.6
t _{1/2} /h	7.487±1.615	7.407±0.435	6.727±0.998	1.042±0.168	6.5
T _{max} /h	1.335±1.819	0.253±0.165	0.170±0	0.453±0.125	0.4
V _d /L·kg ⁻¹	0.205±0.088	0.066±0.006	0.028±0.003	2.438±0.497	0.011
CL _R /L·h ⁻¹ ·kg ⁻¹	0.020±0.012	0.006±0.001	0.003±0	1.651±0.377	0.002
C _{max} /mg·L ⁻¹	142.852±96.525	340.027±132.622	539.458±45.916	6.566±1.541	82.2
C ₀ /mg·L ⁻¹	107.345±63.448	366.282±289.943	556.684±51.181	4.829±1.725	115.3

3.2 伊立替康脂质体与伊立替康注射液的血浆药时曲线

伊立替康脂质体的峰浓度明显比伊立替康注射液的峰浓度高，半衰期明显延长。见图 2。

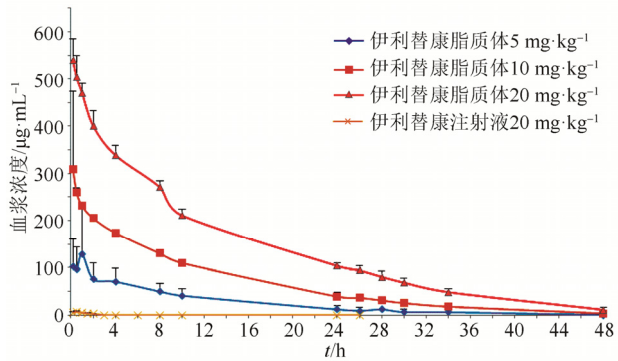


图 2 伊立替康脂质体与伊立替康注射液的血浆药时曲线
Fig. 2 Plasma sample solution of irinotecan liposome

3.3 伊立替康脂质体的血浆药动力学参数

与相同给药剂量的伊立替康注射液(20 mg·kg⁻¹)相比，伊立替康脂质体的血浆达峰浓度 C_{max} 为伊立替康注射液的 82 倍，2 组 C_{max} 数据采用对数转换后进行统计分析，有显著性差异，t=36.763，P<0.01。平均滞留时间 MRT_(0-t)显著长于伊立替康注射液(12.278 h vs 0.84 h，14.6 倍)，有显著性差异，t=70.515，P<0.01。半衰期(t_{1/2})显著长于伊立替康注射液剂(6.727 h vs 1.042 h，6.5 倍)；有显著性差异，t=20.202，P<0.01。总伊立替康血浆暴露量[AUC_(0-t)]为伊立替康注射液的 748.5 倍，有显著性差异，t=60.043，P<0.01。脂质体在大鼠血浆中浓度的个体差异性略大。

4 讨论

现有的伊立替康浓度测定方法主要包括紫外法、HPLC、荧光法、LC-MS 和 HPLC-MS/MS^[9-14], 其中质谱分析方法的样本前处理过程较为复杂, 且受仪器成本较高的影响, 不利于在临床上大规模推广。

采用高效液相色谱检测伊立替康的含量是目前通用的方法, 常用的液相条件为^[15]: 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂; 流动相为甲醇-乙腈-磷酸盐缓冲液(55:5:45, 磷酸盐缓冲液: 6.8 g 磷酸二氢钾以水 800 mL 溶解, 加入 10 mL 三乙胺, 以磷酸溶液调节 pH 值至 4.0, 加水至 1 000 mL); 检测波长为 254 nm。笔者在此基础上加以改良, 采用醋酸铵代替磷酸二氢钾, 2 种体系分析性能相近, 但由于醋酸铵溶于甲醇和乙腈, 提高了缓冲盐在有机溶剂中的相容性, 可以有效防止缓冲盐在色谱管路中的沉积, 从而保护液相色谱仪及其管路; 略微提高乙腈的比例, 有助于流动相对脂质体中磷脂等有机物的洗脱, 使峰形良好, 基线平稳。在血浆样品处理中, 采用甲醇沉淀血浆蛋白可基本去除蛋白等杂质, 有效提取药物, 血浆伊立替康的平均回收率为 97.02%, RSD 为 2.25%, 符合要求。伊立替康在不同 pH 条件下存在内酯型与羧酸型的转化^[15], 笔者发现采用纯水作为伊立替康的溶解介质进样检测时会出现双峰, 导致结果不好计算。而采用流动相或甲醇盐酸体系作为伊立替康的溶解介质时为单峰, 笔者发现采用 254 nm/370 nm 双波长检测时, 伊立替康 370 nm 与 254 nm 峰面积比值为 78%左右, 含量检测稳定。因此, 采用流动相作为对照品溶液的配制介质; 采用盐酸酸化把血浆中的伊立替康转化为同一构型, 从而保证药物浓度的一致性, 同时, 可以很方便而准确地对血浆中的伊立替康进行定性。采用本研究方法检测伊立替康含量, 并进行了方法学验证, 发现伊立替康对照品溶液和伊立替康血浆对照品溶液的线性良好, 残留、检测限、定量限、精密度、回收率、稳定性、基质效应和耐用性等均符合要求, 可以用于血浆伊立替康的检测。

动物体内药动力学研究设置 3 个剂量组, 主要考察在所定剂量范围内, 药物的体内动力学过程是属于线性还是非线性, 以利于解释药效学研究中的发现, 并为新药的进一步开发和研究提供信

息^[16]。参考相关文献资料及人体的给药剂量并结合动物试验中最大耐受剂量, 确定高剂量为 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 中、低剂量按 2 倍的剂量梯度设置为 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。采用大鼠尾静脉给药后于不同时间点采血检测血浆中伊立替康的浓度, 计算其药动力学参数, 结果发现, 在大鼠血浆药物浓度和药动力学参数研究中 3 个剂量组的血浆清除率和表观分布体积随伊立替康脂质体剂量的提高无明显的变化, 血药浓度-时间下曲线面积与浓度成线性。伊立替康注射液注射后在大鼠体内含量很低, 而将伊立替康包封于脂质体后, 大大增加了其在体内的稳定性和在体内循环时间, 给药 48 h 后血中仍能保持一定的浓度分布。相同给药剂量的伊立替康脂质体与伊立替康注射液相比, 伊立替康脂质体的 $C_{\max}$ 提高 82 倍, $\text{MRT}_{(0-t)}$ 延长 14.6 倍, $t_{1/2}$ 延长 6.5 倍, 总伊立替康血浆暴露量极大提高(748.5 倍), 将上述 4 个主要药动力学参数经过对数转换后进行统计学分析, 发现均有显著性差异。说明伊立替康脂质体相比伊立替康注射液的药动力学显著改善, 可达到增强药效的目的。脂质体在大鼠血浆中浓度的个体差异性略大。 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的脂质体药时曲线在给药后 1 h 左右出现一个浓度高峰, 笔者推测是由于脂质体在血浆中代谢较为复杂, 个体差异较大导致。

2015 年 FDA 批准伊立替康脂质体注射液与氟尿嘧啶和亚叶酸合用用于治疗已经使用吉西他滨化疗疗效不佳的晚期胰腺癌患者, 但其对于其他肿瘤的临床数据尚不够理想。伊立替康脂质体在血浆中的循环时间与临床药效有重要但并非唯一重要的关系。为了进一步研究开发伊立替康脂质体, 其在体内的药动力学情况值得关注。伊立替康脂质体采用了蔗糖八硫酸酯作为载药辅料, 其所用长循环辅料为 mPEG-DSPE $0.12 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; 而已上市的多柔比星脂质体采用硫酸铵作为载药辅料, mPEG-DSPE 含量为 $3.19 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 伊立替康脂质体采用的 mPEG-DSPE 用量比多柔比星脂质体低很多。本研究发现伊立替康脂质体的半衰期、AUC 值显著提高, 说明载药辅料蔗糖八硫酸酯对延长伊立替康脂质体的半衰期有显著作用, 同时也说明采用适当的载药辅料, 即使低剂量的 mPEG-DSPE 也可取得较好的药动力学参数, 这为研究更好的伊立替康脂质体提供了研究方向。

REFERENCES

- [1] CERSOSIMO R J. Irinotecan: A new antineoplastic agent for the management of colorectal cancer [J]. *Ann Pharmacother*, 1998, 32(12): 1324-1333.
- [2] 马钰, 胡静, 刘宝瑞, 等. 伊立替康的临床应用研究进展 [J]. *肿瘤基础与临床*, 2016, 29(6): 147-151.
- [3] YU Q Q, QIU H, ZHANG M S, et al. Predictive effects of bilirubin on response of colorectal cancer to irinotecan-based chemotherapy [J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(16): 4250-4258.
- [4] ROTHENBERG M L. Efficacy and toxicity of irinotecan in patients with colorectal cancer [J]. *Semin Oncol*, 1998, 25(5 Suppl 11): 39-46.
- [5] 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]. *Anticancer Drugs*, 2002, 13(10): 999-1004.
- [6] ZHANG X X, GAN Y, YANG X G, et al. Preparation of PEG-modified nanostructured lipid carriers loaded with hydroxycamptothecin and tissue distribution in mice [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2008, 43(1): 91-96.
- [7] REN L, CHEN S, LI H, et al. MRI-guided liposomes for targeted tandem chemotherapy and therapeutic response prediction [J]. *Acta Biomaterialia*, 2016, 35: 260-268.
- [8] 杨彤. 新型脂质体的研究进展 [J]. *医药学报*, 2009, 28(3): 336-338.
- [9] JU X Y, LUO X M, GE W H, et al. Determination of irinotecan and its active metabolite SN-38 in plasma by high performance liquid chromatography coupled with fluorescence detection [J]. *Pharm Clin Res(药学与临床研究)*, 2015, 23(3): 267-270.
- [10] YIN X L, WU H L, ZHANG X H, et al. Simultaneous determination of irinotecan and its metabolite 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin in biological fluids using excitation-emission matrix fluorescence coupled with second-order calibration method [J]. *Acta Chim Sin(化学学报)*, 2013, 71(4): 560-566.
- [11] WANG Y, HANG Q Q, XIE S G, et al. Content determination of irinotecan hydrochloride injection by GLPC [J]. *Chin Pharm(中国药业)*, 2014, 23(11): 38-39.
- [12] DANG H W, YANG F Y, ZHANG W P, et al. Determination of irinotecan and its metabolite SN-38 in nanoparticles by LC-MS/MS in rats whole blood [J]. *Chin Pharm J(中国药理学杂志)*, 2014, 49(5): 396-400.
- [13] YU C M, YANG X L, ZHENG X F, et al. Determination of the content and related substance of Irinotecan Hydrochloride injection by HPLC [J]. *China Pharm(中国药房)*, 2013(17): 1600-1602.
- [14] YIP V L, MARSON A G, JORGENSEN A L, et al. HLA genotype and carbamazepine-induced cutaneous adverse drug reactions: a systematic review [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2012, 92(6): 757.
- [15] LI Z, QIN B, ZHANG Z Q, et al. Effect of liposome encapsulation on Irinotecan lactone ring and on drug release *in vitro* [J]. *Chin Pharm J(中国药理学杂志)*, 2008, 43(13): 1003-1007.
- [16] LI C L, LI X B. Pharmacokinetic research of liposome containing pharmorubicin in rabbit [J]. *Chin J Mod Med(中国现代医学杂志)*, 2007, 17(12): 1523-1526.

收稿日期: 2018-01-30

(本文责编: 曹粤锋)