

双修饰壳聚糖载丝裂霉素 C 纳米粒在大鼠体内的药动学研究

谢黎崖¹, 詹传明², 侯振清², 陈月¹, 吴永良^{1*} (1.厦门大学附属第一医院, 福建 厦门 361003; 2.厦门大学生物医学工程研究中心, 福建 厦门 361005)

摘要: 目的 研究双修饰壳聚糖载丝裂霉素 C 纳米粒在大鼠体内的药动学特征。方法 2 组大鼠分别静脉注射 4 mg·kg⁻¹ 丝裂霉素 C 纳米粒和丝裂霉素 C 注射剂后, 采用高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS)测定给药后不同时间点血浆中丝裂霉素 C 的浓度, 计算主要药动学参数。结果 丝裂霉素 C 的线性范围 20~1 000 μg·L⁻¹, 最低定量限为 20 μg·L⁻¹, 提取回收率均>95%, 日内、日间精密度 RSD 均<15%。双修饰壳聚糖载丝裂霉素 C 纳米粒和丝裂霉素 C 注射剂 $t_{1/2}$ 分别为 (2.64±0.11)h、(0.49±0.049)h; AUC_{0-∞} 分别为 (2.01±0.11)mg·h⁻¹·L⁻¹、(0.93±0.075)mg·h⁻¹·L⁻¹; Vz 分别为 (1.52±0.18)L、(0.63±0.065)L; CL 分别为 (6.95±0.70)mL·min⁻¹、(15.47±1.89)mL·min⁻¹, 2 者均有显著性差异。结论 该方法灵敏、准确、专一, 适用于丝裂霉素 C 的药动学研究。与丝裂霉素 C 注射剂相比, 双修饰壳聚糖载丝裂霉素 C 纳米粒具有缓释和长循环的作用。

关键词: 丝裂霉素 C; 壳聚糖; 纳米粒; 高效液相色谱-质谱联用; 药动学

中图分类号: R965.2

文献标志码:

文章编号: 1007-7693(2014)03-0313-04

Pharmacokinetics of Dual Conjugated Chitosan-mitomycin C Nanoparticles in Rats

XIE Liya¹, ZHAN Chuanming², HOU Zhenqing², CHEN Yue¹, WU Yongliang^{1*} (1.First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen 361003, China; 2.Research Center of Biomedical Engineering of Xiamen University, Xiamen 361005, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the pharmacokinetics of dual conjugated chitosan-mitomycin C nanoparticles (CS-MMC-NPs) in rats. **METHODS** The two groups of rats were injected with CS-MMC-NPs and MMC injection at the dose of 4 mg·kg⁻¹. The concentrations of MMC in plasma at different time were determined by HPLC-MS and the main pharmacokinetic parameters were calculated. **RESULTS** The calibration curves were linear over the range of 20~1 000 μg·L⁻¹. The limit of quantitation was 20 μg·L⁻¹. The within day and day to day relative standard deviation(RSD) was <15%. The main pharmacokinetic parameters of CS-MMC-NPs and MMC injection were as follows: $t_{1/2}$ were (2.64±0.11)h and (0.49±0.049)h, AUC_{0-∞} were (2.01±0.11)mg·h⁻¹·L⁻¹ and (0.93±0.075)mg·h⁻¹·L⁻¹, Vz were (1.52±0.18)L and (0.63±0.065)L, CL were (6.95±0.70)mL·min⁻¹ and (15.47±1.89)mL·min⁻¹. The differences of parameters were significant between two preparations. **CONCLUSION** The method is sensitive, accurate, specific for the pharmacokinetic study of CS-MMC-NPs. Compared with MMC injection, CS-MMC-NPs has a controlled releasing rate, a high level of blood concentrations and a long blood circulation time, which benefits the control of acute toxicity of MMC for the rats.

KEY WORDS: mitomycin C; chitosan; nanoparticles; HPLC-MS; pharmacokinetics

丝裂霉素 C(mitomycin C, MMC)是一种高效广谱抗肿瘤药, 但其口服吸收差, 对骨髓、心脏和胃肠道的毒性大, 直接给药能非选择性地杀死正常细胞。而且, MMC 的半衰期很短, 只有大约 30 min, 因此需要经常反复给药^[1-2]。这些缺点大大地限制了它在临床上的应用。纳米制剂为近些年发展起来的新型载体, 其作为药物靶向控释载体具有提高药物在体内的半衰期, 降低药物不良反应等优点^[3-5]。

为了制备较好的 MMC 纳米粒, 本研究选择可

降解的高分子生物材料壳聚糖(chitosan, CS), 采用离子诱导结合化学交联法, 先利用三聚磷酸钠(sodium tripolyphosphate, STPP)用离子凝胶法制备物理交联的 CS 纳米粒, 然后加入化学交联剂戊二醛(GA)进行固定, 对 CS 进行活性开环聚合和改性, 得到稳定化学交联的纳米粒。接着在盐酸碳二亚胺(EDC)和琥珀酰亚胺丙酸酯(SPA)作用下进行叶酸(FA)和聚乙二醇(PEG)化学修饰, 得到双修饰的 CS 纳米粒。FA 修饰能提高肿瘤细胞对粒子的摄取, PEG 修饰可以延长粒子在血液中的停

基金项目: 厦门市科学技术计划项目资助项目(3502Z20114007)

作者简介: 谢黎崖, 女, 硕士, 副主任药师 Tel: (0592)8851312 (0592)2139563 E-mail: wyl.xm@163.com

E-mail: xly885@163.com

*通信作者: 吴永良, 男, 主任药师 Tel:

留时间,使得双修饰具有缓释和长循环的作用。之后选择 MMC 作为模型药物,通过丁二酸酐对药物进行改性,将药物偶联到双修饰的 CS 纳米粒上,制得双修饰壳聚糖载 MMC 纳米粒(CS-MMC-NPs),并对其抗肿瘤的靶向性进行了初步研究,得到较为理想的结果^[6-7]。

为了考察自制的 CS-MMC-NPs 在动物体内的缓释和长循环效果,将载药粒制成注射剂,采取大鼠动脉插管的方法,以高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS)联用法检测 MMC 浓度^[8],进行药动学研究,进一步为临床应用提供理论依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

API3000 液相色谱-质谱联用仪(美国应用生物系统公司),液相色谱仪包括:LC-10Advp 输液泵 2 台、DGU-14AM 在线脱气仪、SIL-HTc 自动进样器(日本岛津公司);BS200S-WE 电子天平(北京塞多利斯天平有限公司);2-16P 离心机(厦门精艺兴业有限公司);TTL-DC 多功能氮吹仪(北京同泰联科技有限公司);Finnpipette 移液枪(美国 Thermo 公司);MS3 漩涡混合仪(德国 IKA 公司)。

1.2 材料

注射用 CS-MMC-NPs(自制,规格:10 mg·瓶⁻¹,批号:111008);注射用 MMC(浙江海正药业股份有限公司,规格:10 mg·瓶⁻¹,批号:110402);MMC 对照品(纯度 HPLC \geq 98%,中国药品生物制品检验所,批号:130438-201002);肝素钠(南京新百药业有限公司,规格:12 500 单位·支⁻¹,批号:110613);对氨基苯乙酮(上海阿拉丁公司,分析纯);乙腈(上海化学试剂研究所,色谱纯);甲醇(上海化学试剂研究所,色谱纯);乙酸乙酯(国药集团化学试剂有限公司,分析纯)。

SPF 级 SD 大鼠 12 只,♀♂ 各半,体质量(200 \pm 20)g,由厦门大学医学院实验动物中心提供,实验动物使用许可证号:SYXK(闽)2011-0004。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱: Hypersil GOLD C₁₈ 柱(150 mm \times 4.6 mm, 5 μ m)(美国 Thermo 公司);流动相:乙腈-水(25:75);流速:1.0 mL·min⁻¹;柱温:25 $^{\circ}$ C;进样量:20 μ L。

2.2 质谱条件

离子源为电喷雾离子化电离源(ESI);毛细管

电压:4 000 V;干燥气体温度:350 $^{\circ}$ C;干燥气流速:10.0 L·min⁻¹;雾化气压力:20 kPa;碰撞电压:150 eV;正离子方式检测;通过实验检查确定 MMC 与对氨基苯乙酮的检测条件,MMC 选择性检测[M+H]⁺离子对为 m/z 335.0 \rightarrow 242.0;对氨基苯乙酮的选择性检测[M+H]⁺离子对为 m/z 136.1 \rightarrow 94.1。

2.3 标准溶液的配制

精密称取 MMC 对照品溶解于甲醇中,配制成 100 mg·L⁻¹ 的单标贮备液,保存于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中。取适量的 MMC 贮备液稀释成适当浓度的标准液。将 12 500 单位肝素钠(相当于 100 mg),加入生理盐水进行溶解,用量瓶定容至 500 mL,配制成 0.02% 肝素钠溶液。取 10.0 mg 对氨基苯乙酮,加入生理盐水进行溶解,最后配成 2 mg·L⁻¹,作为内标液。

2.4 给药方案和血样采集

将 12 只大鼠随机分成实验组和对照组,每组 6 只。实验组注射 CS-MMC-NPs,对照组注射 MMC 针剂。大鼠提前 1 d 禁食,麻醉后进行颈部动静脉插管。按照 4 mg·kg⁻¹ 剂量从静脉给药。分别在 1, 5, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 360, 480, 720, 1 440 min 从动脉处采血,每次采血 0.3 mL,并给动物补足等量的生理盐水(含 0.02% 肝素钠)。血样置于肝素抗凝管中,3 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,分离血浆,血浆冷冻保存。

2.5 血浆样品的处理

血样在各点采集后(前 2 点先用空白血浆稀释 6 倍),取 0.1 mL 血浆样品置于 1.5 mL 离心管中,加入内标溶液使其浓度为 100 μ g·L⁻¹,漩涡震荡 1 min(3 000 r·min⁻¹),混匀。加入 0.5 mL 乙酸乙酯,3 000 r·min⁻¹ 漩涡震荡 2 min,4 $^{\circ}$ C 下 6 000 r·min⁻¹ 离心 6 min,取上清液置于 5 mL 离心管中,反复萃取 4 次,合并上清液,40 $^{\circ}$ C 以下氮气吹干。提取物加 0.08 mL 流动相,漩涡震荡溶解,4 $^{\circ}$ C 下 13 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液置于内衬管中,待检测。

2.6 数据处理

将 CS-MMC-NPs 与 MMC 测得的各血药浓度绘制药时曲线,然后分别运用 WinNonlin Professional Edition Version 2.1 软件,采用统计矩法计算出各药代动力学参数,并将所得的参数进行配对 t 检验。

3 结果与讨论

3.1 方法学考察

3.1.1 专属性试验 取空白血浆样品 0.1 mL, 按“2.5”项下方法处理并分析, 得空白样品质谱图; 同法得到 MMC 标准液加入空白血浆的质谱图、内标溶液加入空白血浆的质谱图, 结果见图 1。待测物 MMC 的保留时间为 2.55 min。结果表明, 空白血浆中内源性物质及代谢产物不干扰 MMC, 且内标与 MMC 也能很好的分开。

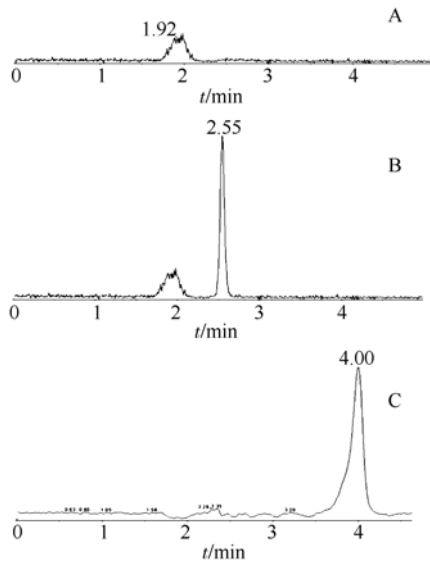


图 1 质谱色谱图

A-空白血浆; B-丝裂霉素 C; C-对氨基苯乙酮

Fig 1 Mass spectrogram

A-blank plasma; B-MMC; C-4-aminoacetophenone

3.1.2 标准曲线和线性范围 在 0.5 mL 空白血浆中, 加入标准液和内标液, 使 MMC 浓度分别为 20, 40, 100, 400, 700, 1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。内标液浓度为 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。漩涡震荡混匀后, 分别取 0.1 mL 血浆液按“2.5”项下方法操作, 以血检样品浓度(x)为横坐标, MMC 与内标面积比值(y)为纵坐标, 得到标准曲线, 进行线性回归分析, 得方程为 $y=0.164x-0.0612$, $r=0.9996$ 。线性范围为 20~1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 最低定量限为 20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

3.1.3 精密度试验 按“3.1.2”项下方法制低、中、高 3 个浓度(20, 100, 1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)的 MMC 血浆样品, 各浓度 6 份, 并处理测定, 由标准曲线回归方程计算出的 MMC 浓度为检出量。1 d 重复测定 5 次得日内差异, 连续测定 3 d 得日间差异。日内和日间精密度符合生物样品分析要求, 结果见表 1。

表 1 精密度试验结果

Tab 1 Determination results of precisions of MMC

加入量/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	日内(n=5)		日间(n=3)	
	$\bar{x} \pm s$	RSD/%	$\bar{x} \pm s$	RSD/%
20	19.60±0.37	1.91	20.00±0.18	0.91
100	99.83±0.40	0.40	100.19±0.22	0.22
1000	999.89±0.60	0.06	999.62±0.47	0.05

3.1.4 回收率试验 按“3.1.2”项下方法制成低、中、高 3 个浓度(20, 100, 1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)的 MMC 血浆样品, 各制备 6 份, 同法进行处理测定, 由标准曲线回归方程计算出的 MMC 浓度为检出量。MMC 的检出量与加入量的比值即为方法回收率, 每个浓度测量 3 次。3 个浓度的回收率分别为 98.20%, 99.84% 与 99.97%, 平均回收率为 99.34%, 结果见表 2。

表 2 MMC 的方法回收率(n=6)

Tab 2 Determination results of recovery rate of MMC (n=6)

MMC 加入量/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	MMC 平均 检测量/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	标准偏差	平均回收率/ %	RSD/ %
20	19.64	0.43	98.20	2.17
100	99.84	0.61	99.84	0.61
1000	999.68	0.73	99.97	0.07

3.1.5 稳定性考察 分别考察低、中、高 3 个浓度(20, 100, 1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)的 MMC 血浆样品在室温放置 24 h、自动进样器室温放置 8 h、4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱条件下放置 15 d 的稳定性。以立即测定的药物量为基准(100%), 按剩余含药量为评价指标进行考察, 结果表明 MMC 血浆样品在上述条件下均稳定。

以上通过方法学验证, 建立了用 HPLC-MS 测定大鼠血浆中 MMC 浓度的方法。该方法回收率高, 重现性好, 日内日间精密度均合格, 符合生物样品分析要求。在内标选择时考察了 MMC 和氨基苯乙酮的分离效果, 表明氨基苯乙酮与样品各组分能完全分离、与待测物保留时间相近、与待测物峰的大小相近, 且不与待测物中各组分起化学反应, 故选择氨基苯乙酮作为内标。在血浆样品处理中, 选择沉淀剂时, 考察了甲醇、乙腈、乙酸乙酯的沉淀效果, 发现样品和内标物在乙酸乙酯中溶解度较高, 且杂质不影响成分测定, 因此选用乙酸乙酯。

3.2 药动学研究

3.2.1 药时曲线 为了揭示 CS-MMC-NPs 和

MMC 在大鼠体内的动态变化规律,说明它们的动力学特征,通过测定给药后大鼠 13 个时间点的血药浓度,利用 HPLC-MS 测得 2 者的药时曲线,结果见图 2。

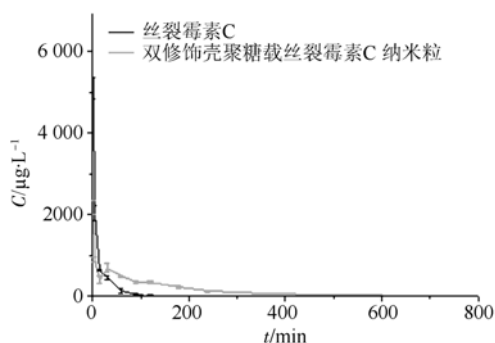


图 2 MMC 与 CS-MMC-NPs 的血药浓度-时间曲线
Fig 2 Drug concentration-time curves of MMC and CS-MMC-NPs

由图 2 可以看出,CS-MMC-NPs 和 MMC 在体内的行为明显不同,具有缓释的效果。CS-MMC-NPs 的血药-时间曲线出现双峰现象,这主要是由于 CS 纳米粒静脉注入血后,先是吸附的药物释放入血,形成最初的药物浓度,然后药物在体内迅速分布,导致血药浓度急速下降。随后纳米粒上化学交联的药物在血液酰胺水解酶的作用下开始逐渐释放,释出的 MMC 慢慢在血液中分布与代谢。由于释药前相释药速度大,MMC 的消除速度小于释药速度,则血浆中 MMC 浓度就上升,到释药后相释药速度低于消除速度,血中 MMC 浓度下降,出现双峰现象。

3.2.2 药动学参数计算 将药时曲线经房室拟合,应用拟合度法及 AIC 判别法判断模型,结果表明房室模型为二房室开放模型,结果见表 3。

表 3 MMC 与 CS-MMC-NPs 的药动学参数($n=6, \bar{x} \pm s$)
Tab 3 Pharmacokinetic parameters of MMC and CS-MMC-NPs($n=6, \bar{x} \pm s$)

参数	MMC	CS-MMC-NPs
$T_{1/2}/h$	0.49±0.049	2.64±0.11 ¹⁾
$C_{max}/mg \cdot L^{-1}$	0.51±0.060	1.48±0.11 ¹⁾
$AUC_{0-6}/mg \cdot h^{-1} \cdot L^{-1}$	0.90±0.072	1.98±0.10 ¹⁾
$AUC_{0-\infty}/mg \cdot h^{-1} \cdot L^{-1}$	0.93±0.075	2.01±0.11 ¹⁾
V_z/L	0.63±0.065	1.52±0.18 ¹⁾
$CL/mL \cdot min^{-1}$	15.47±1.89	6.95±0.70 ¹⁾
MRT/min	43.24±1.79	86.78±1.98 ¹⁾

注:与 MMC 对应各参数相比较,¹⁾ $P<0.05$
Note: Compared with parameters of MMC, ¹⁾ $P<0.05$

经 t 检验:CS-MMC-NPs 与 MMC 各参数比较,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。

由药动学参数可知,CS-MMC-NPs 和 MMC 的 $t_{1/2}$ 分别是 2.64 h 和 0.49 h, CL 分别是 6.95 和 15.47 $mL \cdot min^{-1}$, MRT 分别是 43.24 和 86.78 min,均存在统计学上的差异($P<0.05$),由此说明载药纳米粒在大鼠体内消除慢,具有一定的长循环作用。这是由于药物依靠载体进行运输,药物的释放需要一定的时间,而且纳米粒上接枝上了 PEG,使其不会很快进入肝巨噬细胞,提高了粒子在血液循环中的时间。CS-MMC-NPs 的 V_z 是 1.52 L,是 MMC 的 2.43 倍,说明前者的 MMC 在体内分布较 MMC 注射剂广,表明其排泄较慢,在体内存留时间较长,从侧面说明 CS-MMC-NPs 具有缓释的特点。CS-MMC-NPs 的 AUC 是 MMC 的 2.17 倍,表明药品以纳米粒子的形式存在,一定程度上提高了 MMC 在大鼠体内的利用率。

REFERENCES

- [1] BILENSOY E, SARISOZEN C, ESENDAGLI G, et al. Intravesical cationic nanoparticles of chitosan and polycaprolactone for the delivery of mitomycin C to bladder tumors [J]. Int J Pharm, 2009, 371(1/2): 170-176.
- [2] MUNGAN N, SARISOZEN C, DOGAN L, et al. Broadhesive coated nanoparticles loaded with mitomycin C for the effective chemotherapy of superficial bladder cancer [J]. Urology, 2008, 72(5). DOI:10.1016/j.urology.2008.08.171.
- [3] XU Y Y, CAI X J, YE X L, et al. Targeted study of rifampicin poly(lactic acid/glycolic acid) copolymer nanoparticles aerosol inhalation in lung [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2013, 30(7): 755-758.
- [4] BILENSOY E. Intravesical cationic nanoparticles of chitosan and polycaprolactone for the delivery of mitomycin C to bladder tumors [J]. Int J Pharm, 2009, 371(1): 170-176.
- [5] YUE L, YUE X, GUO H. Nanofibers containing mitomycin drug release [J]. Chin J Gerontol(中国老年学杂志), 2012, 32(23): 5208-5210.
- [6] HOU Z, ZHAN C, JIANG Q, et al. Both FA- and mPEG-conjugated chitosan nanoparticles for targeted cellular uptake and enhanced tumor tissue distribution [J]. Nanoscale Res Lett, 2011, 6(1): 563.
- [7] XIE L Y, HU Q, WU Y L, et al. Preparation and characterization of FA and PEG conjugated chitosan nanoparticles [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2013, 30(3): 284-289.
- [8] TANG Y, ZHANG S Q, LI X, et al. Determination of mitomycin C in rabbit plasma by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr(色谱), 2012, 30(2): 154-159.

收稿日期: 2013-06-17