

紫杉醇注射液在小鼠体内的药代动力学及组织分布*

孟素蕊¹, 何景华¹, 庞雁^{2**}, 焦建杰¹, 李芹¹, 高洋¹

(1. 天津医科大学药理教研室, 天津 300070; 2. 天津市人民医院, 天津 300191)

摘要 目的: 建立血清中紫杉醇的分析测定方法, 进行紫杉醇注射液在小鼠体内的药代动力学研究。方法: 采用固相萃取方法进行血清样品预处理。色谱柱为 Intertex C₁₈ (150 mm × 4.6 mm 5 μm), 流动相为磷酸水溶液 (pH 3.0) - 乙腈 (50:50), 流速为 1 mL · min⁻¹, 检测波长为 227 nm。结果: 紫杉醇在血清和组织中的浓度范围分别为 0.39 ~ 100.00 μg · mL⁻¹ 和 0.39 ~ 25.00 μg · mL⁻¹, 准确度均在 85% ~ 115%, 稳定性 RSD 均小于 15%, 小鼠静脉注射紫杉醇注射液后在小鼠体内代谢符合三房室模型 ($W = 1/C^2$)。结论: 本方法简便快捷, 灵敏准确, 本文建立的紫杉醇血药浓度测定方法和紫杉醇注射液在小鼠体内的药代动力学参数, 为紫杉醇其他制剂的研究提供参考。

关键词: 红豆杉; 紫杉醇; 注射液; 高效液相色谱; 血清; 药代动力学

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254 - 1793(2011)06 - 1073 - 05

Study on pharmacokinetics and tissue distribution of paclitaxel injection in mice*

MENG Su - rui¹, HE Jing - hua¹, PANG Yan^{2**}, JIAO Jian - jie¹, LI Qin¹, GAO Yang¹

(1. Department of Pharmacology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Tianjin People's Hospital, Tianjin 300191, China)

Abstract Objective: To establish an RP - HPLC method for the determination concentration of paclitaxel in serum and tissues in mice. **Methods:** The Intertex C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm 5 μm) was used and the detection was carried out at the wavelength of 227 nm with UV detector. Diazepam and taxotere were used as the internal standard, the solid phase extraction (SPE) was used to extract the sample, the mobile phase consisted of phosphoric acid - acetonitrile (50:50) delivered at a flow rate of 1 mL · min⁻¹. **Results:** The linear range of paclitaxel in serum and tissue were 0.39 - 100.00 μg · mL⁻¹ and 0.39 - 25.00 μg · mL⁻¹, the accuracy were ranged from 85% to 115%, the RSD value of stability were all less than 15%. We found from the results that the concentration - time curve of paclitaxel injection in mice serum could be fitted to three - compartment model ($W = 1/C^2$). **Conclusion:** The method is simple, sensitive and accurate, these finding can provide reference during pharmacokinetics investigations for the other preparations of paclitaxel.

Key words: Taxus chinensis; paclitaxel; injection; HPLC; serum; pharmacokinetics

紫杉醇 (paclitaxel) 是从红豆杉的树皮及根茎中提取的一种有效的天然抗肿瘤药物, 它可以诱导和促进微管蛋白聚合, 抑制细胞分裂和增殖, 从而发挥抗肿瘤效应, 近年来已广泛应用于卵巢癌、乳腺癌、非小细胞肺癌和食管癌等的治疗。

目前紫杉醇的检测方法主要包括: HPLC、多元薄层色谱法 (multimodal thin layer chromatography, MTLTLC)、微管蛋白依赖的生物化学检测法 (tubulin - dependent biochemical assay)、串联质谱法 (tandem

mass spectrometry) 以及受体蛋白所介导的生物测定法 (receptor protein - based bioassay) [1, 2] 等, 色谱法因分离度好、灵敏度高、专属性强, 可以同时测定几种药物而普遍应用, 其中, 以 HPLC 方法在血药浓度测定中的应用最为广泛 [3]。本文优化了紫杉醇的测定方案, 并将其应用于紫杉醇注射液在小鼠体内的药代动力学与组织分布的研究, 取得了满意的结果。

* 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 资助项目 (2007AA021802)

** 通讯作者 Tel: 13752623584; E - mail: pangyancn@yahoo.com.cn

1 仪器与试剂

Agilent 1100 HPLC 工作系统,包括 Agilent 1100 型高效液相色谱仪, DAD G1315B 二极管阵列检测器, 荧光 G1321A(1200) 荧光检测器, G1379A 在线脱气机, G1311A 四元泵, G1329A 自动进样器, G1316A 柱温箱; 紫杉醇对照品(纯度 99.5%, HPLC 方法分析, 天津医科大学附属肿瘤医院提供); 紫杉醇注射液(北京华素制药股份有限公司, 批号 0810272); 甲醇、乙腈为色谱纯(天津市康科德科技有限公司); 石油醚、磷酸为分析纯。

内标: 多西紫杉醇(江苏恒瑞医药股份有限公司, 批号 09030512); 地西洋原料药(大同制药厂, 批号 20071124)。

实验动物: 小鼠, 昆明种, 雌雄各半, 体重 22 ~ 24 g, 由天津实验动物中心提供, 合格证号: 2005 - 0001。

2 对照品溶液的配制

准确称取紫杉醇对照品 1.0 mg, 以甲醇溶解并定容于 10 mL 量瓶中, 配制成 $100.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液, 采用倍半稀释的原则依次以甲醇配制成浓度分别为 50.00, 25.00, 12.50, 6.25, 3.125, 1.56, 0.78, 0.39 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品系列溶液。

3 样品采集

3.1 血清样品采集 取昆明种小鼠 84 只, 随机分为 6 组, 每组 14 只, 称重, 按照 $9.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量, 以 0.15 mL/10 g 的标准给小鼠尾静脉注射紫杉醇注射液, 取血时间为给药前、给药后即刻及 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 20, 40, 60, 120 min。各时间点摘眼球取血, 置于离心管中, $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 分离血清。

3.2 组织样品采集 取昆明种小鼠 42 只, 随机分为 6 组, 每组 7 只。称重, 按 $9.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量尾静脉注射紫杉醇注射液, 分别于 0.5, 2, 5, 9, 20, 40 min(仅取肝脏), 60 min 取小鼠脏器(心、肝、肺、肾), 用生理盐水洗净其表面浮血, 滤纸吸干后备用。

4 样品预处理

4.1 血清样品预处理 样品预处理采用固相萃取法, 2 mL 甲醇和 2 mL 水依次重力滤过平衡萃取柱, 加入血清 200 μL , 地西洋溶液 100 μL , 多西紫杉醇 100 μL , 醋酸盐缓冲液(pH = 5.0) 500 μL , 混匀后上样, 2 mL 水重力滤过, 1 mL 石油醚重力滤过, 注入空气, 换收集管, 2 mL 乙腈重力滤过, 把收集液用氮气吹干, 残留物用 200 μL 流动相复溶。

4.2 组织样品预处理 取小鼠组织, 称重后, 按照 1

g: 10 mL 的比例加入生理盐水, 于高速分散器上制成组织匀浆, $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清后 $6000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清, 预处理方案同“血清样品预处理”, 组织匀浆上清上样量为 600 μL 。

5 方法与结果

5.1 色谱条件 色谱柱: Intertex C_{18} (150 mm \times 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 磷酸溶液(pH = 3.0) - 乙腈(50:50); 流速: $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 检测波长: 227 nm; 柱温: 25 $^{\circ}\text{C}$; 内标为多西紫杉醇和地西洋(三者的结构式见图 1)。

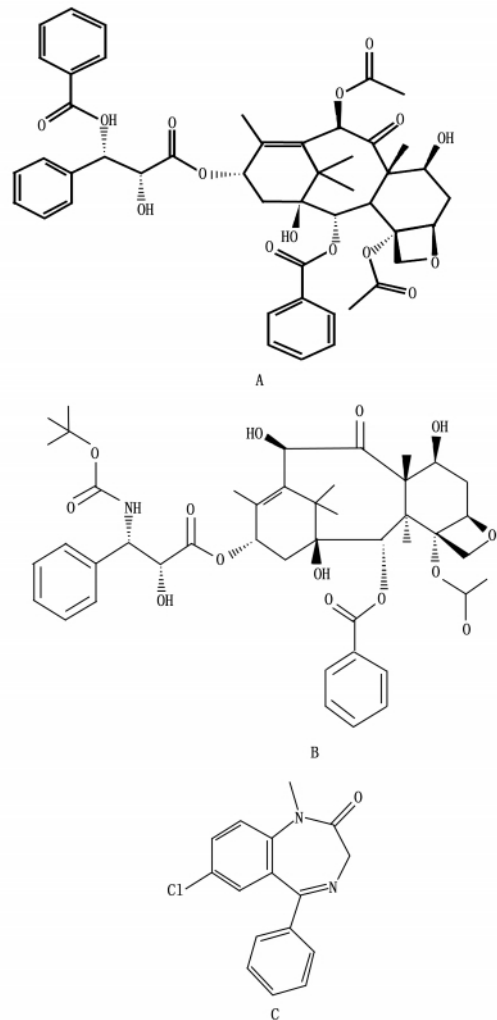


图 1 结构式

Fig 1 Structures

A. 紫杉醇(paclitaxel) B. 多西紫杉醇(docetaxel) C. 地西洋(diazepam)

5.2 专属性考察 将空白血清色谱图和血清样品色谱图进行比较, 结果表明血清样品预处理后, 其中的内源性物质不干扰紫杉醇和内标的测定, 见图 2, 在此色谱条件下紫杉醇、多西紫杉醇和地西洋的保留时间分别为 8.404, 6.945, 5.359 min。

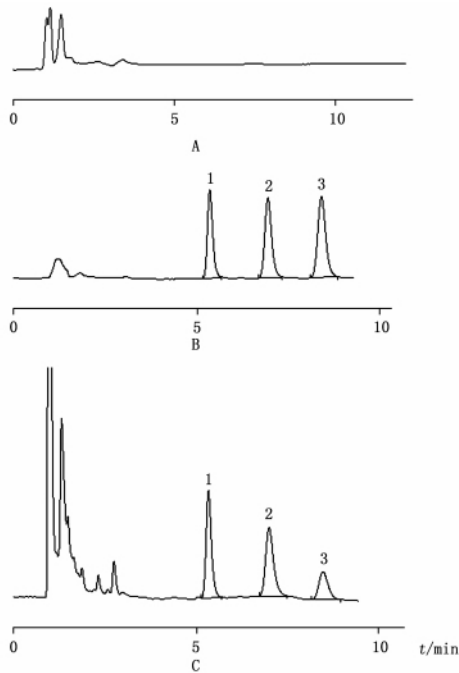


图2 高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms

A. 空白血清 (blank serum) B. 对照品溶液 (30 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) (standard solution) C. 小鼠静脉注射紫杉醇注射剂 40 min 后血清样品 (serum sample 40 min after mice administrated paclitaxel injection intravenously)

1. 地西泮 (diazepam) 2. 多西紫杉醇 (taxotere) 3. 紫杉醇 (paclitaxel)

5.3 最低检测限与最低定量限 紫杉醇浓度由高到低逐渐稀释,测定出最低检测限为 $0.19 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,最低定量限为 $0.78 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,每个浓度重复测定 5 次。

5.4 标准曲线与线性范围

5.4.1 血清样品 样品预处理同“血清样品预处理”,进样,测定后以浓度为横坐标,以紫杉醇与内标的峰面积比值为纵坐标,绘制标准曲线,按照加权最小二乘法计算线性关系式为:

$$Y = 13.32X + 0.8519 \quad R^2 = 0.9993$$

线性范围为 $0.39 \sim 100.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

5.4.2 组织样品 样品预处理同“组织样品预处理”,测定结果按照加权最小二乘法得出紫杉醇浓度与峰面积比值的线性关系式见表 1。

5.5 准确度与精密度 按“血清样品预处理”方法制备 $0.78, 6.25, 50.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 3 个浓度的紫杉醇血清对照品,进行测定,测定值与真实值的相对误差为方法的准确度;相同条件下 5 次测定结果的符合程度为精密度,结果显示 $0.78, 6.25, 50.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 3 个浓度的准确度均在 $85\% \sim 115\%$ 之间,精

密度 RSD 均小于 15% 。

表 1 组织样品的标准曲线

Tab 1 The standard curve of the paclitaxel in tissue

组织 (tissue)	标准曲线 (standard curve)	R^2	线性范围 (range of linearity) / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
心(heart)	$Y = 15.93X - 0.1193$	0.9999	0.39 ~ 25.00
肝(liver)	$X = 15.98X - 0.2217$	0.9999	0.39 ~ 25.00
肾(kidney)	$Y = 14.47X + 0.0273$	0.9999	0.39 ~ 25.00
肺(lung)	$Y = 17.80X - 0.0097$	0.9999	0.39 ~ 25.00

5.6 血清对照品的稳定性 考察了高 ($50.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、中 ($6.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、低 ($0.78 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 3 个浓度的紫杉醇血清对照品 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存 20 d,反复冻融 3 次以及预处理后 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存 10 d 的稳定性。结果见表 2,均符合方法学要求。

表 2 紫杉醇血清对照品保存的稳定性

Tab 2 Stability of paclitaxel in serum sample (n = 5)

$C/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	RSD/%		
	$4 \text{ }^\circ\text{C}, 10 \text{ d}$	$-20 \text{ }^\circ\text{C}, 20 \text{ d}$	冻融 3 次 (three freeze - thawing)
0.78	9.3	9.3	5.3
6.25	6.9	11.7	2.1
50.00	7.4	8.0	4.9

6 药代动力学研究

按照“血清样品采集”和“血清样品预处理”项下操作,对健康昆明种小鼠 1 次尾静脉注射给药后,分别于不同时间点取血,按照建立的方法测定血药浓度,不同时间点血药浓度经 DAS 2.0 药动学软件处理,运用 DAS 2.0 药动学程序对血药浓度 - 时间进行房室模型拟合,结果小鼠尾静脉注射紫杉醇注射液后在体内的代谢符合三房室模型,药代动力学参数见表 3,药时曲线见图 3。

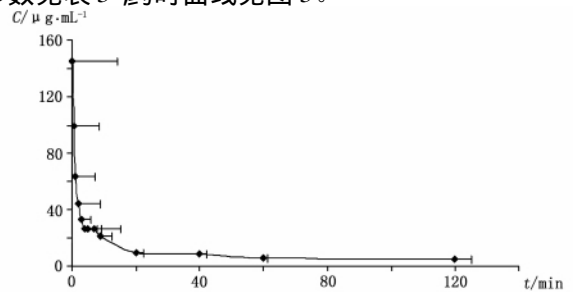


图 3 紫杉醇注射液 ($9.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 在小鼠体内的平均血药浓度 - 时间曲线 ($n = 6$)

Fig 3 Average serum concentration - time curve of paclitaxel injection ($9.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)

表3 紫杉醇注射液在小鼠体内的药代动力学参数 ($n=6$)
Tab 3 The main pharmacokinetic parameters of paclitaxel injection in mice

参数(parameter)	$\bar{x} \pm s$
T_{max}/min	0.08 ± 0.20
$C_{max}/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	151.72 ± 26.71
$T_{1/2}/\text{min}$	68.04 ± 58.93
$CL_z/\text{L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$	0.006 ± 0.001
$AUC_{(0-\infty)}/\text{mg} \cdot (\text{L} \cdot \text{min})^{-1}$	1523.74 ± 322.66
$AUC_{(0-t)}/\text{mg} \cdot (\text{L} \cdot \text{min})^{-1}$	1191.50 ± 221.68
$AUMC_{(0-t)}$	45305.76 ± 21878.45
$AUMC_{(0-\infty)}$	163060.6 ± 159030.3
$MRT_{(0-\infty)}/\text{min}$	95.15 ± 68.82
$MRT_{(0-t)}/\text{min}$	36.78 ± 9.49
$VRT_{(0-\infty)}/\text{min} \cdot \text{min}$	15323.05 ± 26901.04
$VRT_{(0-t)}/\text{min} \cdot \text{min}$	1332.89 ± 419.65

7 组织分布

按照“组织样品采集”和“组织样品预处理”项下操作,对健康昆明种小鼠尾静脉给药后,所得的不同组织中药物浓度-时间变化趋势见图4。

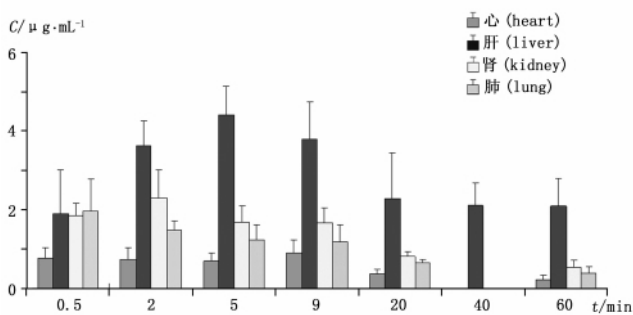


图4 小鼠静脉注射紫杉醇注射液($9.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)后的组织分布情况($n=6$)

Fig 4 The distribution of paclitaxel injection after administrated intravenously ($9.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) in mice

8 讨论

紫杉醇的预处理方法^[4,5]有直接蛋白沉淀法、液液萃取法、固相萃取法。直接蛋白沉淀法简单、快速,但需要所测定的样品中紫杉醇的浓度较高,而紫杉醇发挥抗癌效应的浓度较低^[6]($50 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 相当于 $44.5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),因此直接蛋白沉淀法未考虑液液萃取的方法中空白血清对紫杉醇和内标的干扰较大,固相萃取方法简便、准确,空白血清干扰少且回收率高,因此,本实验选择固相萃取的方法。

目前紫杉醇测定所需流动相除了本实验所用流动相外^[7-10],还有以甲醇-乙腈-水、甲醇-乙腈-磷酸盐缓冲液、乙腈-磷酸盐缓冲液等不同比例进行测定,采用甲醇-乙腈-水的比例组合时紫杉

醇及内标的峰形较宽,出现平顶峰,比例不变改为甲醇-乙腈-磷酸盐缓冲液($\text{pH}=4.0$)后保留时间基本相同,但峰形变尖锐。研究发现,随着缓冲溶液 pH 的增大,紫杉醇及内标的保留时间缩短,但此流动相不能对紫杉醇和多西紫杉醇进行很好的分离,二者的保留时间随流动相比比例的变化而有相似的改变;用磷酸水溶液-乙腈(50:50)可以对三者有很好的分离,且保留时间短,节省资源,所以,建议测定紫杉醇的含量应以磷酸水溶液($\text{pH}=3.0$)-乙腈(50:50)为流动相。

紫杉醇测定所选择的内标国内文献报道多采用地西洋,国外文献报道多采用 baccatin III 和 3'-p-hydroxypaclitaxel,本实验采用地西洋和多西紫杉醇同时作为内标对紫杉醇进行测定,优化了紫杉醇浓度的测定方法;此实验条件也可应用于多西紫杉醇的测定:即以地西洋和紫杉醇为内标,按照本实验提供的预处理方案和色谱条件进行测定;也可以以地西洋为内标同时测定血清中紫杉醇和多西紫杉醇的含量。

尾静脉注射紫杉醇注射液在小鼠体内的药代动力学过程符合三房室模型,文献报道^[11]为二房室模型,原因尚待进一步研究;分布相半衰期 $t_{1/2\alpha}$ 为 0.536 min ,说明药物在体内能迅速从血液分布到各个组织器官,此实验结果与文献报道相近;消除半衰期为 6.427 min ,说明药物在体内很快被消除,此研究结果提示紫杉醇能迅速到达靶器官但作用时间较短,今后可以改变紫杉醇的剂型来延长紫杉醇的作用时间,以达到更好的药效。

尾静脉注射紫杉醇注射液后药物迅速分布到各个器官,在肝脏分布最多,其次是肾脏,说明紫杉醇主要经肝脏、肾脏代谢,在心脏的分布最少,说明紫杉醇可能对心脏的亲水性较小,毒性也较小,研究发现,紫杉醇在肝脏的分布出现2个高峰,分别在 5 min 和 40 min ,说明紫杉醇在代谢过程中可能存在肝肠循环,此研究有待于进一步深入。

参考文献

- Suno M, Ono T, Iida S, et al. Improved high-performance liquid chromatographic detection of paclitaxel in patient's plasma using solid-phase extraction and semi-micro-bore C_{18} separation and UV detection. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 2007, 860: 141
- Gardner ER, Dahut W, Figg WD. Quantitative determination of total and unbound paclitaxel in human plasma following Abraxane treatment. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 2008 862: 213

- 3 GE Zhaoheng(葛召恒), LI Hua(李桦), XUE Jun-feng(薛俊峰) *et al.* Determination of taxol in dog plasma, mouse tissue, and urine, feces by HPLC(高效液相色谱法测定犬血浆和小鼠组织、体液中的紫杉醇). *Chin J Pharm Anal(药物分析杂志)*, 1997, 17(5): 301
 - 4 Koshkina NV, Waldrep JC, Roberts LE, *et al.* Paclitaxel liposome aerosol treatment induces inhibition of pulmonary metastases in murine renal carcinoma model. *Clin Cancer Res* 2001 7(10): 3258
 - 5 Wang XH, Zhao G, Yan S *et al.* Pharmacokinetics and tissue distribution of PGG-paclitaxel a novel macromolecular formulation of paclitaxel in nu/nu mice bearing NCI-460 lung cancer xenografts. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010 65: 515
 - 6 Liebmann JE, Cook JA, Lipschultz C *et al.* Cytotoxic studies of paclitaxel (Taxol) in human tumour cell lines. *Br J Cancer*, 1993 68(6): 1104
 - 7 Tije AJ, Verweij J, Loos WJ *et al.* Pharmacological effects of formulation vehicles: implications for cancer chemotherapy. *Clin Pharmacol Ther* 2003 72(7): 665
 - 8 Mohammadi A, Esmaili F, Dinarvand R, *et al.* Development and validation of a stability-indicating method for the quantitation of Paclitaxel in pharmaceutical dosage forms. *J Chromatogr Sci* 2009, 47(7): 599
 - 9 Soma D, Kitayama J, Ishigami H, *et al.* Different tissue distribution of paclitaxel with intravenous and intraperitoneal administration. *J Surg Res* 2009, 155(1): 142
 - 10 Sharma A, Mayhew E, Bolcsak L, *et al.* Activity of paclitaxel liposome formulations against human ovarian tumor xenografts. *Int J Cancer*, 1997 71(1): 103
 - 11 LIANG Yong-ju(梁永钜), WU Hai-ying(吴海鹰), SU Xiaodong(苏晓东) *et al.* Determination concentration of paclitaxel by RP-HPLC in mice plasma(反相高效液相色谱法测定紫杉醇在小鼠的血药浓度). *Chin J Clin Pharmacol(中国临床药理学杂志)* 2008 24(3): 249
- (本文于2010年9月6日收到)

《药物分析杂志》2011年编委会工作会议计划

一、预备会及编委会安排

2011年1月25日在北京开预备会,初步拟定形式和内容;2011年下半年召开编委会,讨论相关内容并形成决议。

二、编委会工作会议初步意见

1. 讨论编委会章程 编辑部起草章程

联系人: 粟晓黎 联系电话: 010-67095698; E-mail: xiaolisu@yahoo.com.cn

2. 讨论工作标准 编辑部起草工作标准

联系人: 陈立亚 联系电话: 010-67095868; E-mail: yfchenly@yahoo.com.cn

3. 讨论新增栏目(药物安全、涉药器械、食品、化妆品)

联系人: 粟晓黎 联系电话: 010-67095698; E-mail: xiaolisu@yahoo.com.cn

4. 讨论编委换届 编辑部根据近年工作情况提出方案

联系人: 刘小帅 联系电话: 010-67095201; E-mail: suxiaoli@nicpbp.org.cn

5. 听取编委意见,关于稿件分配、审稿时间、审稿费、刊出内容反馈、期刊管理、稿件质量等建议

联系人: 于宝珠 联系电话: 010-67095775; E-mail: ybz@nicpbp.org.cn

6. 汇报编委会工作、编辑部准备总结

联系人: 陈唯真 联系电话: 010-67095698; E-mail: chenwz23@yahoo.com.cn

7. 讨论五年规划 编辑部根据近年期刊发展情况起草规划

联系人: 粟晓黎 联系电话: 010-67095698; E-mail: xiaolisu@yahoo.com.cn

编辑部电话(传真): 010-67058427; 010-67012819 邮箱: ywfx@nicpbp.org.cn

诚请各位编委专家对以上各项计划内容提出您的宝贵建议,并向联系人提交书面意见。感谢您的支持!

《药物分析杂志》编辑部