

78

T315I 突变^[1], 且对加速期耐药性白血病也有一定的临床效果。药理学试验证明, 泊那替尼通过与三磷酸腺苷(ATP)竞争 BCL-ABL 融合蛋白中结合位点, 从而抑制融合蛋白的表达^[2]。但目前泊那替尼上市制剂为仅为口服速释片, 其不良反应率高, 严重限制了其临床应用范围^[3-4]。固体脂质纳米粒(SLN)是近年来兴起的以类脂材料为核心的纳米粒给药体系^[5]。其脂质材料具有良好的生物相容性和靶向性, 缓控释效果显著, 可降低药物的毒副作用^[6-7], 且具有较好的稳定性, 可用于多种不同的给药途径, 并可进行大规模工业生产等优点, 应用前景广泛^[8-10]。为促进泊那替尼更安全、有效地用于临床, 本研究中拟将前期制备的泊那替尼固体脂质纳米粒(P-SLN)混悬液进行家兔体内药代动力学试验, 探讨新剂型在体内的缓控释效果及生物利用度, 为开发泊那替尼新剂型提供研究基础。现报道如下。

1 仪器、试剂与动物

1.1 仪器

岛津 L20 型高效液相色谱仪(UV 检测器, 日本岛津公司); TG328A 型电子分析天平(上海天平仪器厂); Vortex-2 型涡旋仪(上海沪析实业有限公司); 3K30 型冷冻高速离心机(德国 Sigma 公司)。

1.2 试剂

泊那替尼(武汉星耀艾克生物医药有限责任公司, 批号为 06771, 含量 99.0%); 泊那替尼对照品(上海翰香生化制品有限公司, 批号为 20121226, 含量 99.3%); 泊那替尼固体脂质纳米粒(自制); 肝素钠注射液(天津市生物化工制药厂); 甲醇、乙腈均为高效液相色谱(HPLC)纯(美国天地公司); 水为超纯水(实验室自制); 其他试剂均为分析纯。

1.3 动物

新西兰兔 12 只, 体质量(2.0 ± 0.5)kg, 雌雄各半, 购自武汉大学动物实验中心, 动物实验合格证号为 SCXK<Hubei>2014-0201。动物实验符合动物实验伦理委员会《实验动物福利伦理原则》要求。

2 方法与结果

2.1 P-SLN 制备

取泊那替尼 10 mg、单硬脂酸甘油酯 50 mg、蛋黄卵磷脂 100 mg, 精密称定, 于(75 ± 2)℃水浴溶于 5 mL 的无水乙醇形成有机相。另取 150 mg 泊洛沙姆 188, 溶于 10 mL 蒸馏水中, 构成水相。将有机相加入水相中, 于 10 000 r/min 高速乳化 10 min, 并于等温 1 000 r/min 继续搅拌 15 min, 除去有机相。随后快速分散于比例为 1:5 的 0~2℃水分散相中, 于 10 000 r/min 高速均质 10 min, 即得 P-SLN 混悬液。制备的 P-SLN 平均粒径为(155.1 ± 4.32) nm, PDI 为(0.152 ± 0.009), Zeta 电

位为(-22.0 ± 1.71) mV, 包封率为(67.73 ± 1.84)% ($n=3$)。

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件

据预试验及参考文献^[11], 确定检测条件。色谱柱: Agilent Zorbax Extend C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.2% 三乙胺乙酸缓冲盐(78:22, pH=7); 检测波长: 280 nm; 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 30℃; 进样量: 20 μL。

2.2.2 溶液制备

取泊那替尼对照品 10 mg, 精密称定, 置 100 mL 容量瓶中, 加入适量无水乙醇上下振荡溶解, 定容至刻度, 即为 100 μg/mL 的对照品贮备液, 分别取适量, 置 10 mL 容量瓶中, 配制成质量浓度为 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 μg/mL 系列质量浓度梯度的对照品溶液。取一定量的泊那替尼对照品, 精密称定, 加入适量 0.5% 羟甲基纤维素钠(CMC-Na)溶液, 涡旋混匀, 即得对照组泊那替尼对照液, 作为对照组动物灌胃液。精密量取一定量 P-SLN, 直接加入生理盐水配制成均匀溶液, 即制剂组 P-SLN 溶液, 作为给药组动物灌胃液。

2.2.3 血清样品处理

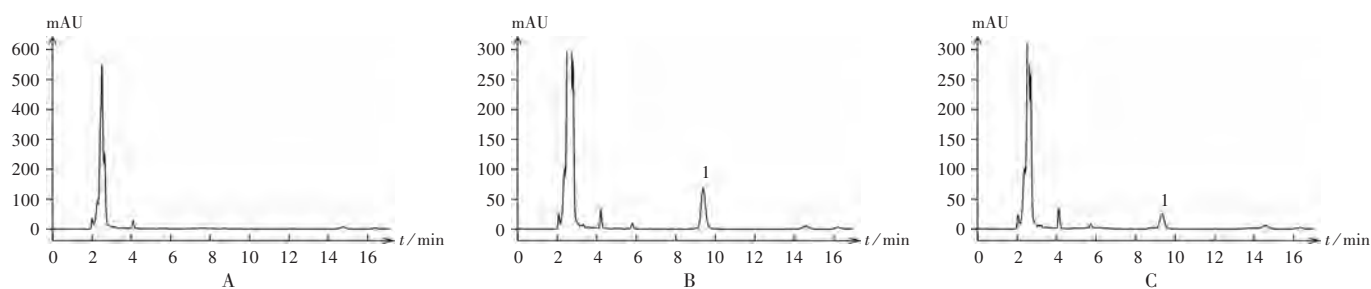
取新西兰兔全血, 置经肝素钠处理后的离心管中, 于低温 4℃下, 10 000 r/min 冷冻离心 10 min, 取离心后的上清液, 作为空白血清样品。精密量取 200 μL 血清样品, 加入 200 μL 冷甲醇沉淀蛋白, 涡旋振荡混合 5 min, 于 10 000 r/min 离心 15 min, 取上清液 20 μL 过 0.45 μm 尼龙膜滤过后进样。

2.2.4 方法学考察

专属性试验: 取新西兰兔空白血样、空白血样, 加适量泊那替尼对照品溶液和给药后血样样品, 按照 2.2.3 项下方法处理后, 按拟订色谱条件进样, 得色谱图(见图 1)。结果表明, 在此条件下, 空白血样对样品含量测定无干扰, 该方法专属性好。

线性关系考察: 精密量取适量质量浓度的对照品溶液, 置试管中, 氮气吹干, 取空白血样 200 μL, 涡旋混匀, 制成血药浓度为 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 μg/mL 的样品, 按 2.2.3 项下方法处理后, 按拟订色谱条件进样, 记录色谱图, 计算峰面积。以测定血样峰面积平均值(A)对血样浓度(C, μg/mL)进行线性回归, 得回归方程 $A = 20\,067C - 1\,347$, $r = 0.9994$ ($n=5$)。结果表明, 泊那替尼血样质量浓度在 0.2~10.0 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验: 取适量泊那替尼对照品溶液, 氮气吹干, 加入空白血浆, 分别精密配制高、中、低(5.0, 1.0, 0.2 μg/mL)3 种不同质量浓度的血样溶液, 按 2.2.3 项



1. 泊那替尼

A. 空白血样 B. 空白血样+泊那替尼 C. 给药后血样样品

图1 高效液相色谱图

下方法处理后,按拟订色谱条件进样,于1 d内连续进样5次,不同天内,每天进样1次,连续5 d,记录色谱图进行计算。结果日内精密度的 RSD 分别为 1.14%, 0.90%, 1.83% ($n=5$), 日间精密度的 RSD 为 0.25%, 1.25%, 1.37% ($n=5$)。

提取回收率试验:取适量泊那替尼对照品溶液,氮气吹干,加入空白血浆,分别精密配制高、中、低(5.0, 1.0, 0.2 $\mu\text{g/mL}$) 3种不同质量浓度的血样溶液,按2.2.3项下方法处理后,按拟订色谱条件进样,记录色谱图。同时,取相同质量浓度未经过处理的对照品溶液进样,记录色谱图。计算提取回收率,每个试验重复3次。结果平均加收率分别为 85.69%, 87.95%, 86.45%, RSD 为 3.40%, 6.32%, 5.92%, 表明该方法提取回收率满足生物样品测定要求。

方法回收率试验:取适量泊那替尼对照品溶液,氮气吹干,加入空白血浆,分别精密配制高、中、低(5.0, 1.0, 0.2 $\mu\text{g/mL}$) 3种不同质量浓度的血样溶液,按2.2.3项下方法处理后,按拟订色谱条件进样,记录色谱图,代入标准曲线,得到对应质量浓度,与加入的已知质量浓度相比,计算方法回收率,每个试验重复3次。结果平均加收率分别为 97.02%, 103.13%, 105.33%, RSD 为 2.17%, 5.50%, 3.52%, 表明方法回收率满足生物样品测定要求。

2.3 药代动力学试验

将12只健康新西兰兔,雌雄各半,随机分为2组,每组6只。给药前,动物均禁食12 h,按15 mg/kg剂量分别给对照组和给药组动物灌胃给药泊那替尼对照品溶液和P-SLN溶液。给药后,分别于0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0, 24.0 h耳缘静脉取血2.0 mL。所取的全血样品置肝素化的离心管中,于低温4 $^{\circ}\text{C}$ 下10 000 r/min冷冻离心10 min,取上清液保存于-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内。

将上述采集的血样,按照2.2.3项下方法处理后,按拟订色谱条件进样,记录色谱图,代入标准曲线,测定不同时间点的血药浓度。以时间为横坐标(X)、血药浓

度为纵坐标(Y),作P-SLN的药-时曲线,详见图2。对所测得的血药浓度数据,采用DAS 2.0药代动力学软件进行拟合,得对照组和制剂组的药代动力学参数,详见表1。采用SPSS 20.0统计学软件对所得参数进行 t 检验。由图2和表1可见,与对照组比较,P-SLN溶液在口服后,其药时曲线下面积(AUC)是对照组的3.39倍, $AUMC$ 为14.87倍,平均滞留时间(MRT)是4.55倍,半衰期($t_{1/2}$)为4.44倍,清除率(CL)为0.29倍($P<0.001$)。结果显示,将泊那替尼制成固体脂质纳米粒后,其生物利用度显著提高,体内滞留时间增加,清除率降低,半衰期延长,缓释效果显著,达到了试验预期目标。

平均血药浓度/ $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$

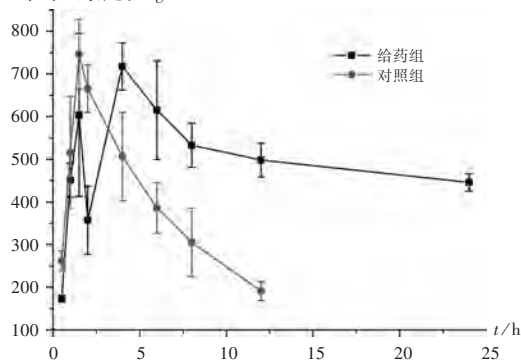


图2 P-SLN药-时曲线图($n=6$)

表1 P-SLN口服给药后药代动力学参数($\bar{X} \pm s, n=6$)

项目	对照组	给药组
$AUC[(\mu\text{g/mL}) \cdot \text{h}]$	3.53 ± 0.21	$11.98 \pm 0.74^*$
$AUMC(\mu\text{g/mL})$	9.38 ± 2.26	$139.44 \pm 6.75^*$
$MRT(\text{h})$	2.63 ± 0.59	$11.65 \pm 0.27^*$
$t_{1/2}(\text{h})$	1.82 ± 0.41	$8.08 \pm 0.19^*$
$CL[(\text{mg/kg})/\text{h}/(\mu\text{g/mL})]$	4.26 ± 0.24	$1.26 \pm 0.080^*$
$V(\text{L/kg})$	11.12 ± 1.92	$14.66 \pm 1.26^*$

注:与对照组相比,* $P<0.001$,# $P<0.01$ 。

3 讨论

泊那替尼作为一种全新的小分子药物,上市时间较短,目前对其在体内血药浓度检测的方法学报道较少。本研究在前期试验的基础上,进一步优化了检测条件,结果显示,优化后的HPLC法准确性、专属性和重复

性均表现良好。相较于 LC-MS 法^[12]及酶联免疫吸附法 (ELISA)^[13], 该方法避免了对精密仪器的依赖和昂贵专用试剂的使用, 操作简单, 成本较低, 适用于大规模临床血样浓度的测定。

本研究中, 血药浓度检测受到血样蛋白的干扰较大。根据参考文献[14], 主药泊那替尼与血清蛋白结合率为 99%, 故前期对蛋白的处理尤其重要。试验选用了不同比例的甲醇、乙腈、氯仿等多种溶剂沉淀血清蛋白, 结果显示, 等体积的甲醇除蛋白效果良好。一方面避免了样品过度稀释, 降低了检测限; 另一方面避免了高危溶剂的使用, 保护了试验者的安全。同时, 还研究了萃取法对试验影响, 结果显示, 液-液萃取降低了血药中的主药含量, 且相关蛋白未能除尽, 影响检测结果的准确, 故最终确定采用等体积甲醇处理样品。

药代动力学试验中, 给药组药-时曲线显示有 2 个吸收峰。第 1 个峰为吸附在纳米粒表面的泊那替尼释药吸收, 第 2 个峰为包封于固体脂质纳米粒核心的主药的释放^[15]。2 个吸收峰之间的峰谷, 可能与淋巴细胞的清除有关^[16]。在释药的后期, 给药组消除速率慢于对照组, 表明在内环境中, 纳米粒释药速率减慢, 药物的清除率降低, 滞留时间延长, 缓释效果明显^[17-18]。结果显示, 将泊那替尼制成固体脂质纳米可提高其在家兔体内的生物利用度。

在动物实验过程中, 对照组动物表现为活动范围缩小、活动频率降低、欲望减弱, 并伴有腹泻现象。给药组未出现相关现象, 且在活动范围频率上表现为前后无明显差异, 同时未观测到有胃肠道不良反应发生, 表明将泊那替尼包封于脂质纳米粒内可降低其在体内的不良反应。另外, 本研究结果显示, 脂质纳米粒的生物利用度显著高于对照组, 可在保证相同的生物利用度上, 降低单次给药剂量, 且可进一步降低不良反应的发生率。

参考文献:

- [1] MOLOGNI L, REDAELLI S, MORANDI A, et al. Ponatinib is a potent inhibitor of wild-type and drug-resistant gatekeeper mutant RET kinase[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2013, 377(1-2):1-6.
- [2] KAYABASI C, OKCANOGLU TB, YELKEN BO, et al. Comparative effect of imatinib and ponatinib on autophagy and miRNome in chronic myeloid leukemia[J]. *Gene*, 2017, 637:173-180.
- [3] HEIBLIG M, REA D, CHRÉTIEN M, et al. Ponatinib evaluation and safety in real-life chronic myelogenous leukemia patients failing more than two tyrosine kinase inhibitors: the PEARL observational study[J]. *Experimental Hematology*, 2018, 67:41-48.
- [4] MÜLLER MC, CERVANTES F, HJORTH-HANSEN H, et al.

- Ponatinib in chronic myeloid leukemia (CML): Consensus on patient treatment and management from a European expert panel[J]. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2017, 120:52-59.
- [5] 王盈. 透皮用氟比洛芬固体脂质纳米粒和纳米结构脂质载体的性能比较[J]. *中国医药工业杂志*, 2016, 47(6):766.
 - [6] 陈娇婷, 王妙飞, 黄浩, 等. 蛇床子素固体脂质纳米粒制剂的制备[J]. *医药导报*, 2015, 34(7):952-954.
 - [7] 言慧洁, 刘伟, 夏青松, 等. 吡嗪酮-硬脂酸固体脂质纳米粒的制备及性能评价[J]. *中国医院药学杂志*, 2016, 36(14):1180-1184.
 - [8] 陈春燕, 徐萍, 袁弘. 口服聚乙二醇修饰固体脂质纳米粒的组织分布及抗肿瘤药效学研究[J]. *中国现代应用药学*, 2016, 33(5):586-592.
 - [9] 郭杰, 乔瑾, 闫明明, 等. 诺氟沙星-固体脂质纳米粒的制备及体外释药特性研究[J]. *中国药房*, 2018, 29(22):3068-3073.
 - [10] 夏爱晓, 周鹏, 林忠, 等. 伊曲康唑凝胶的制备及体外透皮性考察[J]. *医药导报*, 2019, 38(7):933-936.
 - [11] 熊远果, 张洪, 齐倩. 泊那替尼原料药两种含量测定方法比较[J]. *中国药业*, 2014, 23(14):48-50.
 - [12] SPARIDANS RW, KORT A, SCHINKEL AH, et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometric assay for ponatinib and N-desmethyl ponatinib in mouse plasma[J]. *Journal of Chromatography B*, 2016, 1023-1024:24-29.
 - [13] YAMAMOTO Y, SAITA T, SOGAWA R, et al. Development of a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for the quantification of ponatinib in serum[J]. *Analytical Biochemistry*, 2019, 571:14-20.
 - [14] ATTWA MW, KADI AA, DARWISH HW, et al. LC-ESI-MS/MS identification and characterization of ponatinib in vivo phase I and phase II metabolites[J]. *Clinica Chimica Acta*, 2018, 485:144-151.
 - [15] BURRA M, JUKANTI R, JANGA KY, et al. Enhanced intestinal absorption and bioavailability of raloxifene hydrochloride via lyophilized solid lipid nanoparticles[J]. *Advanced Powder Technology*, 2013, 24(1):393-402.
 - [16] RAO MP, MANJUNATH K, BHAGAWATI ST, et al. Bixin loaded solid lipid nanoparticles for enhanced hepatoprotection - Preparation, characterisation and in vivo evaluation[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2014, 473(1-2):485-492.
 - [17] 张洪, 张福明, 闫士君. 索拉非尼固体脂质纳米粒冻干粉制备及体外释药特性研究[J]. *中国药学杂志*, 2013, 48(3):196-202.
 - [18] VAGHASIYA H, KUMAR A, SAWANT K. Development of solid lipid nanoparticles based controlled release system for topical delivery of terbinafine hydrochloride[J]. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2013, 49(2):311-322.

(收稿日期:2019-07-30)