

## 研究论文

## 5- 氟尿嘧啶控释植入剂在小鼠肿瘤组织的分布

周明瑶, 任小娇, 李汉文, 卢闻\* (西安交通大学医学院, 西安 710061)

**摘要:** 目的 建立 5- 氟尿嘧啶 (5-Fu) 在小鼠肿瘤组织中的分析方法, 并用于考察 5-Fu 控释植入剂在小鼠肿瘤组织的分布。方法 荷瘤小鼠瘤周植入分别由 PLGA 50/50 和 PLGA 75/25 为载体制备的 5-Fu 控释植入剂, RP-HPLC 测定小鼠肿瘤组织中的药物浓度。结果 肿瘤组织中 5-Fu 的线性范围为  $0.5 \sim 15.4 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ , 准确度为 97.5% ~ 104.0%, 提取回收率为 81.9% ~ 88.3%, 日内 RSD 均 < 2.0%, 日间 RSD 均 < 7.6%。以 PLGA50/50、PLGA75/25 为载体的 5-Fu 控释植入剂在荷瘤小鼠体内的药动学参数:  $t_{\max}$  分别为 9、15 d;  $C_{\max}$  分别为 3.79、2.83  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ; AUC 分别为 41.15、43.50 ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )  $\times$  d。结论 该分析方法可用于 5-Fu 在肿瘤组织中的分布行为研究, 2 种载体的 5-Fu 控释植入剂均能维持小鼠肿瘤组织中较长时间的药物分布, 延长药效作用时间。

**关键词:** 5- 氟尿嘧啶; 控释植入剂; 高效液相色谱法; 肿瘤组织分布

中图分类号: R944.9

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2012)09-0641-03

doi:10.3969/j.issn. 1672.2981.2012.09.001

## Distribution of 5-fluorouracil controlled release implant in tumor bearing mice

ZHOU Ming-yao, REN Xiao-jiao, LI Han-wen, LU Wen\* (School of Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061)

**Abstract: Objective** To establish an assay of 5-fluorouracil (5-Fu) in tumor bearing mice, and to investigate the distribution of 5-Fu controlled release implant in the tumor. **Methods** The 5-Fu controlled release implant prepared by PLGA 50/50 and PLGA75/25 as carriers was inserted around the tumor. The concentrations of 5-Fu in the tumor were determined by RP-HPLC. **Results** The linearity of 5-Fu in the tumor was  $0.5 - 15.4 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ . The accuracy and the extraction recovery were 97.5% - 104.0% and 81.9% - 88.3%. The intra-day and inter-day RSD were less than 2.0% and 7.6%, respectively. The  $t_{\max}$ ,  $C_{\max}$  and AUC for PLGA 50/50 implant were 9 d,  $3.79 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  and  $41.15 (\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}) \times \text{d}$ , respectively. The  $t_{\max}$ ,  $C_{\max}$  and AUC for PLGA 75/25 implant were 15 d,  $2.83 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  and  $43.50 (\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}) \times \text{d}$ , respectively. **Conclusion** The method is reliable in the study of distribution of 5-Fu in tumor bearing mice. The 5-Fu controlled release implant prepared with 2 kinds of polymers could extend the duration of drugs in the tumor.

**Key words:** 5-fluorouracil; controlled release implant; HPLC; tumor tissue distribution

5- 氟尿嘧啶 (5-fluorouracil, 5-Fu) 多年来始终作为抗代谢药首选用于临床治疗胃癌、乳腺癌等癌症, 但其在体内代谢快, 半衰期短, 临床上为了达到有效的体内血药浓度, 往往采用大剂量、持续或反复多次给药, 这大大增加了 5-Fu 的毒副作用<sup>[1-2]</sup>。另外, 5-Fu 胃肠道吸收不完全, 普通片的生物利用度很低, 药效不理想。局部缓释化疗有望提高化疗效力, 从而受到越来越多的关注<sup>[3]</sup>。目前, 已有人采用植入剂作为 5-Fu 局部给药的新剂型来改善药效<sup>[4]</sup>, 并且对其在血液中的药代动力学进行了研究<sup>[5-8]</sup>, 但是文献中鲜有报道 5-Fu 在肿瘤部位的分布。本试验建立一种检测肿瘤中 5-Fu 浓度的反相高效液相色谱法, 研究了由 2 种不同比例载体制备的 5-Fu 控释植入剂在小鼠肿瘤中的分布。

### 1 仪器与材料

HPLC (LC-10ATvp 色谱泵, SPD-10Avp 紫外检测器, SHIMADZU, 日本); ANASTAR 色谱工作站 (天津奥泰科技有限公司); KDC-16H 高速离心机 (科大创新股份有限公司); SB-5200DTD 超声波清洗仪 (宁波新芝生物科技股份有限公司); 真空离心浓缩仪 5301 (德国艾本德 Eppendorf); QL-901 涡旋振荡器 (海门市其林贝尔仪器制造有限公司); LGJ-10D 冷冻真空干燥机 (北京四环科学仪器厂)。

5-Fu (南通制药有限公司, 批号: 20090612, 含量: 99.0%); 5- 溴尿嘧啶 (5-Bru, 如东县丰利医药化工厂, 批号: 20091001, 含量: 99.8%); 5-Fu 控释植入剂 (实验室自制, 规格: 10 mm  $\times$  10 mm  $\times$  1 mm, 含药 7.2 mg); PLGA50/50

基金项目: 陕西省科技计划项目 (编号: 2011K12-03-04)。

作者简介: 周明瑶, 女, 硕士研究生, 主要从事药物体内过程分析, Tel: 13629200899, E-mail: zhoumingyao825@stu.xjtu.edu.cn \* 通讯作者:

卢闻, 女, 讲师, 主要从事缓释制剂研究, Tel: (029) 82657740, E-mail: lvlu2004@mail.xjtu.edu.cn

( $\eta = 0.37 \text{ dl} \cdot \text{g}^{-1}$ ), PLGA75/25 ( $\eta = 0.37 \text{ dl} \cdot \text{g}^{-1}$ ) (济南岱罡生物材料有限公司); 甲醇(色谱纯,天津市科密欧化学试剂有限公司); 试验用水为超纯蒸馏水; 其他试剂均为分析纯。

ICR 雄性小鼠, 体重 18 ~ 22 g [西安交通大学医学实验动物中心(SCXK 陕 2007-001)]。健康的 ICR 小鼠置于温度为(25 ± 1), 相对湿度 50% 的干净室内, 自由饮食、饮水。

## 2 方法与结果

### 2.1 5-Fu 控释植入剂的制备

采用聚二甲基硅氧烷(polydimethylsiloxane, PDMS) 模板<sup>[9]</sup>制备 PLGA 载体结构, 将乳酸-羟基乙酸比例为 50:50 或 75:25 的 PLGA 以 15% (w/v) 的比例溶解于丙酮中, 得到澄清溶液后倒入 PDMS 模具中, 于 60 的热板上烘烤 3 ~ 4 h 后冷却, 即得 PLGA 微结构载体和覆膜, 将 5-Fu 研成细粉, 填入 PLGA 微腔结构中, 将覆膜盖于 PLGA 微结构上, 即得。

### 2.2 色谱条件

色谱柱: Ecosil HPLC COLUMN C<sub>18</sub> 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水 (3:97); 检测波长: 270 nm; 流速: 0.7 mL · min<sup>-1</sup>; 柱温: 25; 进样量: 10 μL。

### 2.3 对照品溶液的制备

**2.3.1 5-Fu 对照品溶液** 精密称定 5-Fu 10.0 mg, 置 10 mL 容量瓶, 加超纯蒸馏水加热溶解并稀释至刻度。制成 1.00 mg · mL<sup>-1</sup> 的溶液。

**2.3.2 5-Bru 对照品储备溶液** 精密称定 5-Bru 10.0 mg, 置 10 mL 容量瓶, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 制成浓度为 1.00 mg · mL<sup>-1</sup> 的溶液。临用时用甲醇稀释。

### 2.4 肿瘤组织样品处理

取小鼠肿瘤组织, 滤纸拭净, 置于冷冻干燥仪中 - 20 低压预冻 24 h, - 40 冻存 4 h, 得到冻干肿瘤组织。将冻干肿瘤组织研成粉末, 精密称取 10.0 mg, 加入 20 μL 的内标 5-Bru 对照品溶液 (8.0 μg · mL<sup>-1</sup>), pH 6.0 缓冲液 130 μL, 涡旋 20 s, 超声 15 min, 12 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 吸取上清液 0.1 mL, 加饱和硫酸铵溶液 60 μL, 涡旋 20 s, 加入提取溶剂 (乙酸乙酯-异丙醇 = 85:15) 提取 2 次, 离心, 合并提取溶剂, 蒸干, 加入甲醇溶解, HPLC 测定。

### 2.5 方法学考察

**2.5.1 方法专属性** 取小鼠未给药的肿瘤组织、给药后的肿瘤组织及质控样品, 参照“2.4”项下方法进行处理, 其中质控样品为未给药的肿瘤组织处理中再同时加入 5-Fu 对照品溶液, HPLC 法测定, 所得色谱图见图 1。从图可知, 空白肿瘤样品在 5-Fu 保留时间附近无干扰峰存在, 表明肿瘤组织中内源性物质不干扰 5-Fu 的测定。

**2.5.2 标准曲线** 取空白肿瘤组织的冻干粉 10 mg, 分别加入浓度为 1.0、2.0、8.0、16.0、32.0 μg · mL<sup>-1</sup> 的 5-Fu 标准溶液 20 μL, 每个浓度下设 3 个样本。参照“2.4”项下方法处理, 按“2.2”项下色谱条件进行测定。以检测响应值 ( $A_{Fu}/A_{Bru}$ ) 与 5-Fu 浓度 (C) 进行线性回归。得回归方程:  $A_{Fu}/A_{Bru} = 0.240 7C - 0.028 1$ ,  $r^2 = 0.999 8$ , 在 0.5 ~ 15.4 μg · g<sup>-1</sup> 线性关系良好。

**2.5.3 精密度和准确度** 取空白肿瘤冻干粉, 按“2.5.2”项下的方法配制 0.5、3.8、15.4 μg · g<sup>-1</sup> 的质控样品, 每一质量浓度进行 5 样本分析, 将峰面积代入标准曲线方程, 计算质控样品浓度, 根据质控样品的结果计算本法的准确度和精密度。结果方法的相对回收率分别为 98.9%、104.0%、

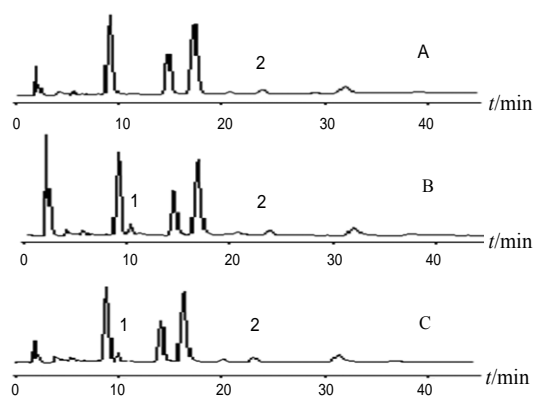


图 1 小鼠肿瘤组织样品的高效液相色谱图

Fig 1 High performance liquid chromatogram of tumor tissue in mice

A. 空白肿瘤样品加内标 (blank tumor sample with the internal standard); B. 质控样品 (quality control sample); C. 给药肿瘤样品 (tumor samples after peritumoral administration of 5-Fu implant) (5-Fu: 3.84 μg · g<sup>-1</sup>); 1. 5-Fu; 2. 5-Bru

97.5%。日内 RSD 值分别为 2.0%、1.4%、1.2%, 日间 RSD 值分别为 5.7%、7.6%、3.8%。

**2.5.4 提取回收率** 取空白肿瘤冻干粉, 分别加入浓度为 1.0、8.0、32.0 μg · mL<sup>-1</sup> 的 5-Fu 标准溶液各 20 μL, 同时, 加入 8.0 μg · mL<sup>-1</sup> 的 5-Bru 内标 20 μL, 制备高、中、低 3 个浓度的质控样品, 每一浓度 5 份样品, 按“2.4”项下方法处理; 同时取 3 个相同浓度的 5-Fu 标准溶液, 将溶剂挥干, 100 μL 甲醇复溶, 同法测定, 以质控样品中 5-Fu 的峰面积与标准溶液中 5-Fu 峰面积进行比较, 计算提取回收率。5-Fu 的提取回收率分别为 81.9%、88.3%、86.9%。

**2.5.5 样品稳定性** 样品稳定性的考察包括 20 储存稳定性, - 20 储存稳定性, 3 次冷冻-融解循环后稳定性。取“2.5.2”项下的高、中、低 3 个浓度的肿瘤质控样品, 于 20 储存 10 h, - 20 储存 4 周, 3 次冷冻 (- 20) - 融解 (20) 循环后, 将测定浓度与初始浓度相比, 所得结果以百分比表示, 结果表明质控样品在室温 20 储存 10 h, - 20 储存 4 周, 3 次冷冻 (- 20) - 融解 (20) 循环后稳定 (见表 1)。

表 1 5-Fu 在肿瘤样品中的稳定性 (n = 3)

Tab 1 Stability of 5-Fu in the tumor sample (n = 3)

样品 (sample)	初始浓度 (initial concentration) / μg · g <sup>-1</sup>	测定浓度 / 初始浓度 (measured concentration/initial concentration) %		
		20 储存 10 h (stored for 10 h)	- 20 储存 4 周 (stored for 4 weeks)	3 次冷冻-融解循环 (freeze-thawing for 3 times)
肿瘤组织	0.5	91.88	96.72	98.61
	3.8	95.24	97.29	96.90
	15.4	96.32	98.06	97.75

### 2.6 5-Fu 在小鼠肿瘤组织中分布

**2.6.1 荷瘤小鼠模型建立** 将购自第四军医大学实验动物中心的鼠类肉瘤 S180 细胞皮下注射于 ICR 小鼠腹腔, 接种 7 d 后, 将生长旺盛, 无溃破且健康良好的 S180 荷瘤小鼠颈椎脱臼处死。75% 乙醇消毒后, 用一次性无菌注射器从腹腔抽取乳白色浓稠腹水, 无菌生理盐水 1:3 稀释。无菌条件下接种细胞

悬液于小鼠左侧腋窝皮下，每只 0.2 mL，细胞数为  $5 \times 10^5$  个  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>，每日固定时间记录小鼠活动情况及体重变化。

**2.6.2 荷瘤小鼠体内植药及 5-Fu 瘤内分布测定** 小鼠接种 3 d 后，取荷瘤小鼠随机分成 A、B 2 组，A 组 35 只，植入以 PLGA50/50 为载体的植入剂；B 组 45 只，植入以 PLGA75/25 为载体的植入剂。将小鼠左侧背部去毛，75% 乙醇灭菌，剪开 1 cm 左右的开口，植入灭菌处理后的 5-Fu 控释植入剂（每片含药为 7.2 mg），再将其缝合。A 组给药后分别于 2、3、6、9、12、15、18 d，B 组给药后分别于 3、6、9、12、15、18、21、24、27 d，各取 5 只小鼠肿瘤组织，用滤纸擦干肿瘤组织并称重。参照“2.4”项下方法进行处理，按“2.2”项下色谱条件进样，测定不同时间点肿瘤中 5-Fu 的浓度。测得肿瘤中 5-Fu 的浓度与时间曲线见图 2。

将肿瘤的药物浓度 - 时间数据用药动学分析软件进行分析，所得药动学参数见表 2。

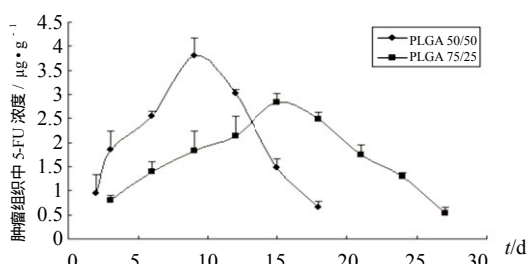


图 2 给予 2 种控释植入剂后小鼠肿瘤中 5-Fu 浓度随时间的变化曲线 (n = 5)

Fig 2 5-Fu concentration-time curve of tumor tissue in mice after peritumoral administration of 2 kinds of 5-Fu controlled-release implants (n = 5)

表 2 给予 2 种控释植入剂后小鼠肿瘤中 5-Fu 的药动学参数 (n = 5)

Tab 2 Pharmacokinetic parameters of 5-Fu in tumor tissues in mice after peritumoral administration of 2 controlled-release implant (n = 5)

药动参数 (pharmacokinetic parameter)	单位 (unit)	5-Fu 控释植入剂 (controlled-release implants of 5-Fu)	
		PLGA50/50 (A)	PLGA75/25 (B)
$t_{max}$	d	9	15
$C_{max}$	$\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	3.79	2.83
$t_{1/2}(k_a)$	d	3.09	4.54
$t_{1/2}(k_e)$	d	3.84	6.57
AUC	$\mu\text{g} \cdot \text{d} \cdot \text{g}^{-1}$	41.15	43.50
CL	$\text{mL} \cdot \text{d}^{-1}$	8.75	8.28
V	mL	48.44	74.42

图 2 可知，2 种 5-Fu 控释植入剂在小鼠肿瘤组织的分布趋势是相似的，而以 PLGA50/50 为载体的植入剂在肿瘤组织中分布较快，于植药后第 9 d 达到峰浓度，早于以 PLGA75/25 为载体的给药组近 6 d 时间，且峰浓度为后者的 1.3 倍。该组药物在肿瘤组织的消除也较快，给药 18 d 后，已检测不到药物，而 PLGA75/25 给药组可维持 27 d 的肿瘤组织药物分布。

药物动力学数据也表明，PLGA50/50 给药组在肿瘤组织的分布和消除均快于 PLGA75/25 给药组，前者的  $t_{1/2}(k_a)$  和  $t_{1/2}(k_e)$  均小于后者。2 组给药组的给药剂量相同，小鼠肿瘤组织分布趋势相似，因而药 - 时曲线下面积相近；而 PLGA50/50 给药组的分布浓度较大，其表观分布容积较小，V 值约为 PLGA75/25 给药组的 2/3。

### 3 讨论

本试验采取了冻干法制备肿瘤组织样品，相对于传统的生物样品制备方法，冻干法避免了繁杂的人工匀浆过程，减少了有机溶剂用量，便于室温放置，能够获得较高的提取回收率。后续的试验研究也表明，此方法可以满足荷瘤小鼠肿瘤中 5-Fu 的分析要求。

5-Fu 控释植入剂通过特定的载体对化疗药物在体内的释放速度进行了控制，延长了化疗药物在靶器官的作用时间，维持较长期的抗癌作用，减少不良反应的发生。2 种方法所得植入剂体内保留时间都较长，而且 B 组制得的 5-Fu 控释植入剂释药速度要慢一些，这是因为 A、B 2 组给药载体比例不同，乙交酯比例越大越易降解，由 Tabata 等<sup>[10-12]</sup> 试验发现，PLGA (50 : 50) 较为特殊，其降解速度较快，试验结果也表明，以 PLGA (50 : 50) 为载体的 5-Fu 控释植入剂相对于以 PLGA (75 : 25) 为载体的 5-Fu 控释植入剂，在肿瘤组织中药物的监测期短，达峰时间早，消除较快。

### 参考文献

- [1] Grem JL. 5-Fluorouracil: forty-plus and still ticking. A review of its preclinical and clinical development [J]. Invest New Drugs, 2000, 18 (4) : 299-313.
- [2] Sastre RL, Olmo R, Teijon C, et al. 5-Fluorouracil plasma levels and biodegradation of subcutaneously injected drug-loaded microspheres prepared by spray-drying poly (D, L-lactide) and poly (D, L-lactide-co-glycolide) polymers [J]. Int J Pharm, 2007, 338 (1-2) : 180-190.
- [3] Brem H, Ewend MG, Piantadosi S, et al. The safety of interstitial chemotherapy with BCNU-loaded polymer followed by radiation therapy in the treatment of newly diagnosed malignant gliomas: phase trial [J]. J Neurooncol, 1995, 26 (2) : 111-123.
- [4] LUB. New Techniques and New Dosage Forms of Drugs [M]. Beijing : People's Medicine Publishing House, 1998 : 503-515.
- [5] 张奇, 邓英杰, 罗国安. HPLC 研究 5-Fu 长循环脂质体大鼠体内药动学 [J]. 中国药理学杂志, 2002, 37 (5) : 380.
- [6] 师少军, 徐戎, 李忠芳, 等. 氟尿嘧啶磁性微球在小鼠体内的药动学 [J]. 中国医院药学杂志, 2008, 28 (5) : 333-335.
- [7] 洪艳艳, 陈振东, 张明军, 等. 氟尿嘧啶植入剂治疗恶性胸腹水的药代动力学研究 [J]. 中国临床药理学杂志, 2009, 25 (4) : 298-301.
- [8] 刘华顶, 王世亮, 俞敏, 等. 氟尿嘧啶植入剂胃癌术后腹腔缓释化疗药动学研究 [J]. 癌症进展, 2012, 10 (1) : 73-79.
- [9] Ren Y, Tianning C, Hualing C, et al. Microfabrication of biodegradable (PLGA) honeycomb-structures and potential applications in implantable drug delivery [J]. Sensors and Actuators B (Chemical), 2005, 106 (2) : 506-511.
- [10] Tabata Y, Ikada Y. Macrophage phagocytosis of biodegradable microspheres composed of L-lactic acid/ glycolic acid and copolymers [J]. J Biomed Mater Res, 1988, 22 : 837-858.
- [11] Tabata Y, Ikada Y. Protein precoating of polylactide microspheres containing a lipophilic immunopotentiator for enhancement of macrophage phagocytosis and activation [J]. Pharm Res, 1989, 6 : 296-301.
- [12] Tabata Y, Ikada Y. Phagocytosis of polymer microspheres by macrophages [J]. Adv Polym Sci, 1990, 94 : 107-141.

(收稿日期: 2012-05-29; 修回日期: 2012-07-12)