

PEG 修饰大蒜素长循环脂质体的制备及药物动力学研究

孙 萍, 邓树海, 于维萍

【摘要】 目的 研制 PEG 修饰大蒜素长循环脂质体并进行家兔体内药物动力学研究。方法 用聚乙二醇-2000 单甲醚合成聚乙二醇单甲醚磷脂酰乙醇胺衍生物 (PEG-PE), 采用 Szoka 改进逆相蒸发技术, 制备 PEG 修饰大蒜素长循环脂质体 (PEG-DATS-LCL), 以 HPLC 法测定大蒜素的包封率及家兔血浆中药物浓度。结果 长循环脂质体的平均粒径为 12.63 μm , 包封率为 90.77%; 长循环脂质体家兔静脉注射给药呈双室模型特征, $t_{1/2\beta}$ 为 41.04h, AUC 为 9.66 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, 均显著大于注射液和普通脂质体的 $t_{1/2\beta}$ 和 AUC。结论 本法制得的 PEG 修饰大蒜素长循环脂质体包封率高, 且延长了在血液中的循环时间, 可达缓释、长效。

【关键词】 大蒜素; PEG 修饰脂质体; 包封率; 药代动力学

【中图分类号】 R 943.41 R 945.1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1008-5971 (2006) 06-0454-03

Preparation of Long Circulation Allitridin PEG-Liposomes and Its Pharmacokinetics SUN Ping, DENG Shu-hai, YU Wei-ping, Department of Pharmaceutics, College of Pharmacy, Shandong University, Ji'nan 250012, China

【Abstract】 **Objective** To prepare long circulation allitridin PEG-liposomes (PEG-DATS-LCL) and study its pharmacokinetics. **Methods** To prepare PEG-PE with PEG2000-MM and DEEP. PEG-DATS-LCLs were prepared by Szoka converse vaporized method. To examine the entrapment efficiency of PEG-DATS-LCL. A method to determine allitridin in rabbit plasma by high performance liquid chromatography (HPLC) was established. **Results** The mean diameter of PEG-DATS-LCL was 12.63 μm . The entrapment efficiency was 90.77%. The pharmacokinetics was agreed to Two-Chamber Model. $t_{1/2\beta}$ of PEG-DATS-LCL was 41.04h, AUC was 9.66 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. They obviously higher than those in injectins and common liposomes. **Conclusion** By this way, the liposomes with high entrapment efficiency could be prepared. The liposomes were modified by PEG-PE could raise the AUC and prolong the resident time of the drug in the blood circulating system.

【Key words】 Allitridin; PEG-DATS-LCL; Entrapment efficiency; Pharmacokinetics

国内外大量流行病学资料证实:大蒜可以降低某些肿瘤的患病率^[1-5];实验研究亦证明大蒜抗癌活性成分大蒜素(DATS)不仅能抑制致癌物的致瘤作用,而且对肿瘤细胞增殖有抑制作用^[6]。目前已制成大蒜素注射液应用于临床^[7]。大蒜素为油状液体,对人体黏膜有较强刺激性,具有浓烈大蒜气味,性质不稳定,在光、热及碱性条件下均易氧化失效,生物半衰期短,体内清除快。采用现代药物制剂新技术,研制聚乙二醇(PEG)修饰大蒜素长循环脂质体,改变大蒜素药理学性质,延长生物半衰期;将大蒜素包封于 PEG 修饰的脂质双分子层,可显著提高稳定性,降低刺激性,且具有靶向、缓释长效作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器 RV-S 型旋转蒸发器(上海申科精密仪器有限公司);高效液相色谱仪(日本岛津 LC-10A, SPP-10A 紫外检测器);AE2000 电子分析天平(瑞士);5200H 超声振荡器(上海科岛超声仪器有限公司);80-2 型离心沉淀机(江苏金坛市中大仪器厂);Olympus BH-2 型光学显微镜及显微摄影仪(日本);JY92-II 型超声波细胞粉碎机(宁波新芝科器研究所);尤尼柯 UV-2102PCS 型紫外可见分光光度仪

(上海尤尼柯仪器公司);ETEC-auto scan 扫描电镜(SIEMENS)。

1.1.2 试药 合成大蒜素(DATS,江苏清江药业有限公司,批号 20030427);大豆卵磷脂(EPC,上海源聚生物制品有限公司进口分装,批号 020729);胆固醇(Chol,上海源聚生物制品有限公司,批号 030211);二棕榈酰磷脂酰乙醇胺(DPPE, Sigma 公司);聚乙二醇 2000-MM (PEG2000-MM, Sigma 公司);1,1'-羰基二咪唑(Sigma 公司);乙腈(TE-DIA 公司, INC USA);甲醇为色谱纯;其他试剂均为分析纯;水为双蒸水。

1.1.3 动物 健康家兔,体重(2.5 \pm 0.5)kg,雌雄各半,由山东大学实验动物中心提供。

1.2 实验方法

1.2.1 PEG 修饰大蒜素长循环脂质体(PEG-DATS-LCL)的制备

1.2.1.1 聚乙二醇 2000 二棕榈酰磷脂酰乙醇胺衍生物(PEG-PE)的合成与纯化 按文献方法^[8],将 PEG2000-MM①溶于分子筛干燥的苯中,然后以 1:1.1 摩尔比加入 1,1'-羰基二咪唑②,充入氮气,75 $^{\circ}\text{C}$ 下加热 16h,得到 PEG 衍生物③冷却后,真空蒸干。DPPE④溶于氯仿(CHCl_3)后,以 1:2 的比例加入到③中,真空蒸干 CHCl_3 ,以 1:1 的比例加入已溶于苯的三乙胺⑤,95 $^{\circ}\text{C}$ 下加热 6h。产物 PEG-PE⑥冷却,透析 5d,然后冻干。

作者单位:250012 山东省济南市,山东大学药学院药物制剂研究所(孙萍,邓树海);山东中医药大学附属医院(于维萍)

1.2.1.2 大蒜素脂质体的制备 取卵磷脂、胆固醇和 PEG-PE 以 1:0.8:0.07 摩尔比精密称重后溶于氯仿,置于 100ml 磨口梨形烧瓶中,恒温水浴上用旋转蒸发器在减压条件下蒸除有机溶剂,形成均匀类脂薄膜;加入乙醚溶解,制得类脂溶液;将 0.25g 大蒜素溶于无水乙醇,加入类脂溶液,然后再加入 pH 6.8 的磷酸缓冲液,超声分散,恒温 35℃ 的条件下除去有机溶剂,加适量的水合介质,超声 3min,即得 PEG 修饰大蒜素脂质体。同法制备普通大蒜素脂质体 (DATS-CL),不同的是载体材料中不含 DPPE-PE。

1.2.1.3 长循环脂质体的形态、粒径及分布测定 取适量的长循环脂质体混悬液,稀释至一定倍数,滴于铜网上,用磷钨酸进行负染,置透射电镜下,观察脂质体的形态并拍照。另取适量长循环脂质体混悬液用光学显微镜进行观察并拍照,计数 500 个以上,考察脂质体的粒径大小和分布。根据公式 $d_{av} = \sum nd / \sum n$ 计算算术平均径。绘制粒径分布图。以中间粒径 D_{50} 表示脂质体大小,以跨度 $(D_{90} - D_{10}) / D_{50}$ 作指标,评价脂质体粒度分布的均匀性。

1.2.1.4 游离药物的分离 精密量取长循环脂质体溶液 0.2ml,加至预先以 0.9% 氯化钠溶液平衡的 Sephadex G-50 凝胶柱 (1.0cm × 20cm),以 0.9% 氯化钠溶液进行洗脱,流速为 0.5ml/min,分次收集洗脱液,每次 0.5ml,以硅胶 G 薄层色谱监测洗脱液。合并 PEG 修饰大蒜素脂质体流份,稀释至 50ml。

1.2.1.5 包封率的测定 用反向高效液相色谱法。流动相:乙腈-水-四氢呋喃 (70:27:3);检测波长 240nm;柱温:30℃;流速:1.0ml/min。精密量取脂质体溶液 0.2ml,用溶剂溶解定溶于 50ml,作为测定大蒜素长循环脂质体总的药物含量 C_t ,以上述分离后的纯脂质体的溶液测定包封药物的含量 C_e ,按下面公式计算其包封率。

$$\text{包封率} (\%) = C_e / C_t \times 100\%$$

1.2.1.6 体外释放实验 取长循环脂质体混悬液 1ml 置半透膜中,放于释放池,以释放介质 (甲醇:水 = 1:1) 作为接收液,搅拌速度为 1000r/min,置 37℃ 恒温水浴中,分别于 0、0.25、0.5、1、2、4、8、16、24、48、60、72、168、336、672 h 精密量取释放液 1ml,同时补充 1ml 释放液,用 HPLC 法测定药物的含量。同样方法测定对照大蒜素原料药体外释放。

1.2.1.7 稳定性考察 制备 3 批 PEG 修饰大蒜素长循环脂质体,分装于 5ml 安瓿中,充氮气熔封。置冰箱冷藏 (2~8℃) 6 月,于实验期间的 0、1、3、6 个月末取样,考察其外观、pH 值、包封率、粒径及含量变化。

1.2.2 家兔体内药物动力学实验

1.2.2.1 血样品预处理 取 0.7ml 血浆加入 10% 三氯醋酸溶液 0.2ml,振荡 1min,精密加入正己烷 1ml,涡旋 3min 提取药物,4000r/min 离心 15min,取上清液,0.45μm 微孔率膜过滤,进样 20μl。

1.2.2.2 标准曲线制备 取兔空白血浆 0.7ml,分别加入 40μg/ml 适量,混匀,配成浓度为 0.05、0.1、0.2、0.4、1、2、4μg/ml 的含药标准血浆,按上法预处理,进行色谱分析。以峰面积 (A) 对大蒜素浓度 (C) 回归得到大蒜素在血浆中的标准曲线回归方程。

1.2.2.3 动物实验 取健康家兔 9 只,随机分成 3 组,每组 3 只。均于耳缘静脉给药,分别给予 DATS 注射液、PEG-DATS-LCL 和 DATS-CL,剂量 1.25mg/kg (按大蒜素计算),给

药前禁食 12h,自由饮水。第一组为对照组,注射 DATS 注射液,第二组为长循环脂质体组,注射 PEG-DATS-LCL 混悬液,第三组为普通脂质体组,注射 DATS-CL 混悬液,对照组于给药前后 10min、20min、30min、1h、2h、3h、6h、10h、12h、24h 自兔子另一侧耳缘采静脉血约 2ml,长循环脂质体组于给药前及给药后 15min、30min、1h、2h、4h、6h、8h、10h、12h、24h、48h、72h 自兔子另一侧耳缘采静脉血约 2ml,普通脂质体组于给药前及给药后 10min、20min、30h、1h、2h、4h、8h、10h、12h、24h、自兔子另一侧耳缘采静脉血约 2ml,加入抗凝试管中,2500rpm 离心,取上层血浆,-20℃ 冰箱保存待测。

1.3 数据处理 按血样品预处理方法和测定方法进行处理和测定,并绘制对照组、长循环脂质体组和普通脂质体组平均血药浓度-时间曲线,结果用药代动力学程序处理,求得药物动力学参数。

2 结果

2.1 PEG-DATS-LCL 形态和粒径分布 本法制备的大蒜素长循环脂质体为均一、稳定的混悬液,在电镜下观察,粒子圆整,分布较均匀。脂质体粒径的算术平均值为 12.63μm,粒径分布在 5~30μm 范围内占总数目的 91.8%。电镜照片见图 1,粒径分布见图 2。

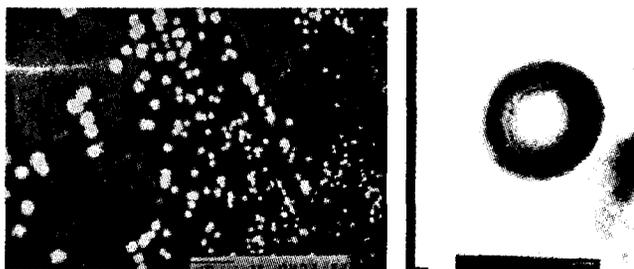


图 1 透射电镜下的 PEG-DATS-LCL

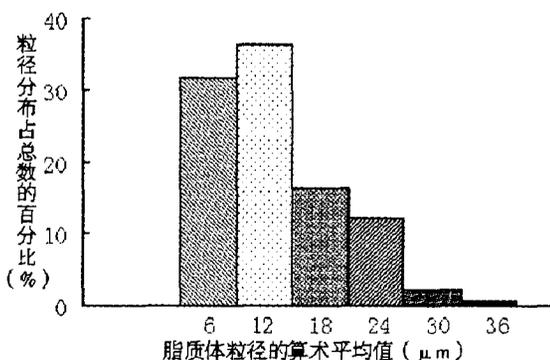


图 2 PEG-DATS-LCL 的粒径分布

2.1.2 包封率的测定 实验结果表明,浓度在 2.5~100μg/ml,大蒜素的浓度 C 和峰面积 a 之间有良好的线性关系,标准曲线方程为 $Y = 1.47 \times 10^{-4} X - 0.653$, $r = 0.9997$ ($n = 6$)。大蒜素的 3 个浓度 (5.33、21.34、53.37μg/ml) 的回收率分别为 98.3%、100.4%、97.6%;6 次测定的相对标准偏差 (RSD) 分别为 1.08%、0.91%、0.76%、0.96%、0.89%、1.05%。3 批大蒜素长循环脂质体样品的平均包封率为 $(90.77 \pm 2.14)\%$ 。

2.1.3 体外药物释放 实验结果表明, DATS 原料药的体外释药方程可用一级动力学方程描述,3h 药物已全部释放出来。而 PEG-DATS-LCL 的体外释药曲线可以用 Higuchi 方程动力学模型较好的拟合。其释药前期为快速释药,后期缓慢释药,

药物释放时间达 24h 以上。结果说明 PEG 修饰大蒜素长循环脂质体与 DATS 原料药相比体外释放具有明显的缓释作用 (见图 3、4)。

2.1.4 稳定性考察 3 批 PEG 修饰大蒜素长循环脂质体在 2~8℃ 条件下存放 6 个月后, 外观没有发生明显改变, 0~6 个月的 pH 值和药物含量没有变化; 0、1、3 和 6 个月包封率分别为 90.77%、90.36%、90.51%、90.14%; 平均粒径分别为 12.63μm、11.94μm、12.25μm、11.68μm。可以看出: 低温避光放置对 PEG 修饰大蒜素长循环脂质的 pH、包封率、粒径和含量都没有明显影响。

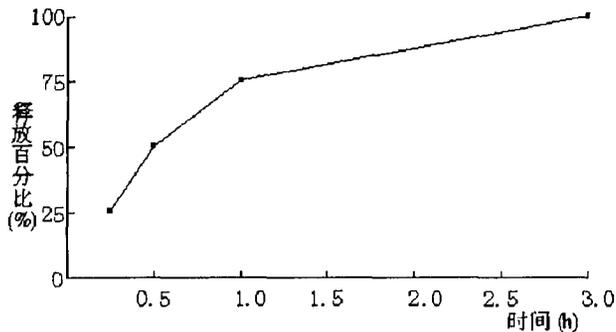


图3 DATA 的体外释放 (37℃)

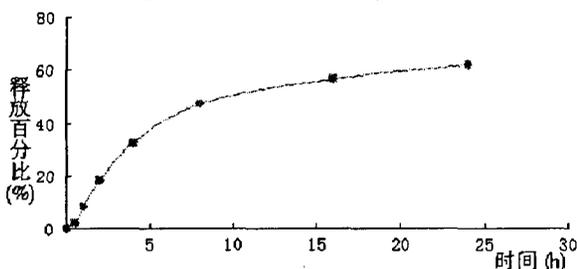


图4 PEG-DATS-LCL 体外释放 (37℃)

2.2 家兔体内的药物动力学实验 按上述体内分析方法分析兔血浆样品, 结果浓度在 0.05~8μg/ml 大蒜素的浓度 C 和峰面积 A 之间有良好的线性关系, 标准曲线方程为 $y = 20823x + 2030.6$, $r = 0.9998$ ($n = 6$), 最低检测限为 0.03μg/ml。大蒜素的 3 个浓度 (0.1、0.4、2μg/ml) 的回收率分别为 95.3%、99.8%、100.5%; 6 次测定的 RSD 分别为 1.46%、0.93%、0.82%、1.12%、0.87%、1.04%。采用此方法血浆中杂质峰对大蒜素峰无干扰, 大蒜素出峰时间为 6.80~7.20min。

家兔一次静注 1.25mg/kg DATS 注射液、PEG-DATS-LCL 和 DATS-CL 混悬液后, 血中药物浓度测定结果采用 3P97 实用药代动力学计算程序处理后, 根据动力学房室模型的判断方法, 分别按一、二、三室模型拟合, 根据拟合优度结合 AIC 进行模型判断, 上述 3 种液体在血中的动力学行为, 均可用双室模型描述, 动力学参数见表 1, 拟合曲线见图 5。

表 1 DATS、PEG-DATS-LCL 和 DATS-CL 的药物动力学参数

参数	DATS 组	LCL 组	CL 组
$V_c [(mg/kg)/(\mu g/kg)]$	0.277	0.017	2.934
$t_{1/2\alpha} (h)$	0.263	0.786	1.699
$t_{1/2\beta} (h)$	7.053	41.040	13.120
$k_{21} (1/h)$	0.695	0.280	0.200
$k_{10} (1/h)$	0.373	0.050	0.108
$k_{12} (1/h)$	1.667	0.570	0.158
$AUC (\mu g \cdot ml^{-1} \cdot h^{-1})$	2.419	9.660	3.923
$CLs (mg \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1} (\mu g/ml))$	0.103	0.129	0.320

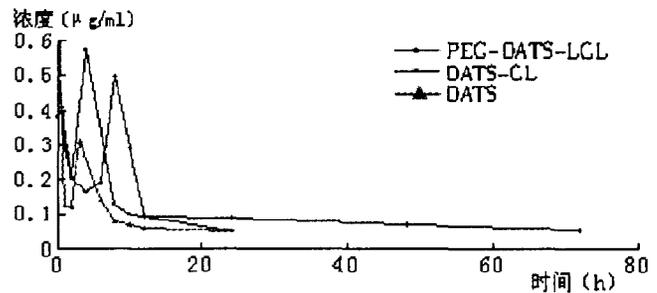


图5 DATS、PEG-DATS-LCL、DATS-CL 在家兔体内血药浓度-时间曲线 (1.25mg/kg, n=3)

3 讨论

3.1 本实验研制的大蒜素长循环脂质体, 其包封率高 (90.77%), 符合新药标准 (包封率不得小于 80%); 在控制成膜的均匀性和其他实验条件下, 使脂质体的粒径的算术平均值为 12.63μm, 粒径分布在 5~30μm 范围内占总数目的 91.8%, 以保证体内靶向的要求。

3.2 DATS 原料药 3h 药物已全部释放出来, PEG-DATS-LCL 释药前期为快速释药, 后期为缓慢释放, 说明长循环脂质体可以满足药物在体内迅速达到有效血药浓度以后维持较长的作用时间, 达到长效的目的。

3.3 由家兔体内的药代动力学结果可以看出: 将大蒜素制成 PEG-DATS-LCL 后, 改变了大蒜素在动物体内的配置, 使家兔体内药物动力学参数有显著改变。同大蒜素注射液和大蒜素普通脂质体相比, 三者均符合双室模型特征, 但大蒜素长循环脂质体在静脉注射后半衰期 ($t_{1/2\beta}$) 延长至 41.04h, 药时曲线下面积 AUC 为 9.66, 均大于注射液和普通脂质体的 $t_{1/2\beta}$ 和 AUC。说明在同样剂量条件下, 长循环脂质体在体内能够维持较长的循环时间, 使其有更多的机会达到靶部位, 实现靶向作用。长循环脂质体表观分布容积远低于注射液和普通脂质体, 说明长循环脂质体能够更好地浓集于靶组织。减少药物对其他组织的毒副作用。

参考文献

- 王坚, 何惠娟, 何承伟, 等. 大蒜素对膀胱癌的抗肿瘤效果 [J]. 中华中西医杂志, 2003, 4 (16): 142.
- 张志勉, 高海青, 王德斌, 等. 大蒜素对恶性肿瘤患者淋巴细胞免疫功能的影响 [J]. 山东大学学报 (医学版), 2002, 40 (2): 245-249.
- 刘锦华, 陈秀春, 周世昌. 大蒜素对小鼠巨噬细胞功能的影响 [J]. 山东大学学报 (医学版), 2002, 40 (3): 248.
- 扈启宽, 李文梅, 赵喜荣, 等. 大蒜素对胃癌细胞 NF-κB 活性的影响 [J]. 解放军药学报, 2002, 18 (1): 7.
- 张燕, 沈宜. 大蒜素抗肿瘤作用及其机制研究进展 [J]. 国外医学肿瘤学分册, 2005, 32 (7): 527.
- 杨艳梅, 高彦辉, 范春. 大蒜抗癌作用研究进展 [J]. 国外医学-中医中药分册, 2000, 22 (2): 67-75.
- 贾江滨, 刘静, 谭亚非. 大蒜化学成分研究进展 [J]. 广东药学, 1999, 9 (1): 1.
- 张俊梅, 杨红, 侯新朴. 长循环脂质体的研究 [J]. 生物化学杂志, 1995, 11 (5): 615.

(收稿日期: 2006-04-06)