

# mPEG-DSPE 修饰的紫杉醇脂质体的制备及其药动学研究

张自强<sup>1,2</sup>, 覃斌<sup>1</sup>, 李战<sup>1,2</sup>, 姚静<sup>2\*</sup> (1. 南京长澳医药科技有限公司, 南京 210022; 2. 中国药科大学, 南京 210009)

**摘要:**目的 采用甲氧基聚乙二醇磷脂酰乙醇胺(mPEG-DSPE)修饰紫杉醇脂质体,并考察其在大鼠体内的药动学行为。方法 合成两亲线型聚合物 mPEG-DSPE;采用薄膜分散法制备 mPEG-DSPE 修饰的紫杉醇脂质体;并用 HPLC 测定紫杉醇在大鼠体内的血药浓度。结果 得到的紫杉醇脂质体粒径为(411.8±31.9) nm,包封率为(82.47±2.15)%。紫杉醇注射液和修饰后脂质体的  $t_{1/2\beta}$  分别为 1.48 和 10.48 h,后者 AUC 约为前者的 3.13 倍。结论 mPEG-DSPE 修饰的紫杉醇脂质体具有显著的长循环特性,并可提高其体内的利用度。

**关键词:**甲氧基聚乙二醇磷脂酰乙醇胺;脂质体;药动学;紫杉醇

中图分类号:R944 文献标识码:A 文章编号:1001-2494(2008)03-0199-04

## Preparation of Paclitaxel Liposomes Modified with mPEG-DSPE and Its Pharmacokinetics in Rats

ZHANG Zi-qiang<sup>1,2</sup>, QIN Bin<sup>1</sup>, LI Zhan<sup>1,2</sup>, YAO Jing<sup>2\*</sup> (1. Nanjing Changao Pharmaceutical Science and Technology Limited Company, Nanjing 210022, China; 2. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

**ABSTRACT; OBJECTIVE** To prepare the paclitaxel liposomes modified with mPEG-DSPE and study its pharmacokinetics in rats.

**METHODS** The mPEG<sub>2000</sub>-DSPE was synthesized and used to modify the lipid membrane. The paclitaxel liposomes were prepared by a thin-film dispersion method. The concentration of the paclitaxel in rat plasma was determined by HPLC method. **RESULTS**

The particle size of the resulting paclitaxel liposomes was (411.8±31.9) nm, and its encapsulation was (82.47±2.15)%. Pharmacokinetic study showed that  $t_{1/2\beta}$  of paclitaxel injection and paclitaxel liposomes were 1.48 and 10.48 h, respectively. The AUC value of the liposomes was increased. The AUC of liposomes was 3.13 times as that obtained after i. v. administration of the paclitaxel injection.

**CONCLUSION** The *in vivo* circulating time of the paclitaxel liposomes modified with the mPEG-DSPE could be lengthened, and the AUC has been improved in some extent.

**KEY WORDS:** mPEG-DSPE; liposome; pharmacokinetics; paclitaxel

近年来脂质体作为新型的药物载体备受关注,但在体内被快速清除的特性降低了非网状内皮系统(RES)的靶向性及其临床治疗效果。为解决这些问题,制备了长循环脂质体(long circulating liposomes, LCP),它通过增加脂质双分子膜的亲水性,来减少网状内皮系统(RES)对脂质体的识别摄取,以延长其体内循环时间,具有延缓药物代谢和增强靶向的作用<sup>[1-2]</sup>。紫杉醇(paclitaxel)是目前较热门的抗肿瘤药物,难溶于水。上市的注射液因以乙醇和聚氧乙烯蓖麻油(50:50)作为溶媒,过敏反应严重<sup>[2-3]</sup>。目前国内外对紫杉醇脂质体的研究较多,并尝试采用新型磷脂衍生物、壳聚糖衍生物等对脂质膜进行修饰,以达到增强药效、降低不良反应及靶向等作用,如紫杉醇磁性脂质体、紫杉醇阳离子脂质体等<sup>[4-6]</sup>。Campbell等<sup>[7]</sup>采用1,2-二油基-3-三甲氨基丙烷(DOTAP)阳性物质表面修饰脂质体,紫杉醇的载药量提高了10~12倍。目前国内已有注射用紫

杉醇脂质体上市,商品名为力朴素。

本实验采用两步反应制备了 mPEG-DSPE,以此表面修饰紫杉醇脂质体,以延长其血浆中的滞留时间,并考察了该长循环脂质体在大鼠体内的药动学行为。

### 1 仪器与药品

#### 1.1 仪器

高效液相色谱仪(Shimadzu LC-10AT,日本岛津,包括SPD-10A紫外检测器);N2000色谱工作站(浙江智达);Zetasizer 3000激光粒子测定仪(英国马尔文);AVANCE-300核磁共振仪(德国BRUKER)。

#### 1.2 材料

紫杉醇(上海三维制药有限公司,含量98.6%);大豆磷脂(德国Lipoid公司);二硬脂酸磷脂酰胆碱乙醇胺(DSPE,德国Lipoid公司);胆固醇(中国惠兴生化试剂有限公司);紫杉醇对照品(中

作者简介:张自强,男,博士 \* 通讯作者:姚静,女,博士 Tel:(025)83271272 Fax:(025)83301606 E-mail:yaoj3@163.com

国药品生物制品检定所,含量 99.08%); 炔诺酮对照品(中国药品生物制品检定所,批号:200604); 紫杉醇注射液(北京协和药厂,批号 051107); 甲醇、乙腈均为色谱醇,其他试剂为分析纯。

### 1.3 动物

SD 大鼠,(200 ± 10) g,雌雄各半(中国药科大学动物中心)。

## 2 方法

### 2.1 mPEG-DSPE 的合成<sup>[8-9]</sup>

将 4.5 g(2.25 mmol) mPEG 溶解在吡啶、二氯甲烷和乙腈混合溶液(1:5:2)中,然后加入 1.4 g(5.47 mmol) DSC,搅拌反应过夜。得到的溶液倒入冷乙醚 100 mL 中,将所得沉淀物用乙酸乙酯重结晶后干燥,即得 mPEG-SC 4.6 g(2.15 mmol),收率为 95.6%。

将 0.32 g(0.15 mmol) mPEG-SC 溶解在氯仿 2 mL 中,依次加入 0.12 g(0.16 mmol) DSPE 和三乙胺 1 mL,反应 10 min 后蒸去溶剂;再加入乙腈 6 mL,溶解于 4 °C 放置过夜,3 000 r · min<sup>-1</sup> 离心取上清液后,蒸去乙腈,将所得固体减压干燥,得 mPEG-DSPE 0.35 g(0.13 mmol),收率为 86.7%。

### 2.2 mPEG-DSPE 修饰紫杉醇脂质体的制备

采用薄膜分散法制备紫杉醇脂质体。精密取处方量紫杉醇、大豆磷脂、mPEG-DSPE 和胆固醇置茄形瓶中,加入 20 mL 乙醇,超声使药物和脂材溶解,于 45 °C 蒸发除去乙醇。加入适量水 30 °C 水合 10 min,探头超声 300 s,过 0.45 μm 微孔滤膜,即得紫杉醇脂质体混悬液。

### 2.3 粒径测定

取制备的脂质体混悬液适量,以水为分散介质,稀释约 20 倍后,用激光粒度测定仪测定样品的平均粒径。

### 2.4 包封率的测定

采用葡聚糖凝胶(Sephadex G-50)柱过滤法分离未包封药物,取脂质体混悬液 0.5 mL 上柱分离,以水为洗脱液洗脱,分管接收洗脱液,含脂质体的接收液合并后以无水乙醇破乳,稀释至一定浓度后,测定含量,按以下公式计算包封率:

包封率 = 脂质体含药量 / (脂质体含药量 + 游离药物量) × 100%。

### 2.5 药动学实验

**2.5.1 色谱条件** 色谱柱 Diamonsil C<sub>18</sub>(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相:乙腈-甲醇-水(14:35:51); 流速:1.5 mL · min<sup>-1</sup>; 检测波长:217 nm。

**2.5.2 血样预处理<sup>[10-11]</sup>** 取大鼠血浆 300 μL 于离心管中,加入 10 μL 内标炔诺酮液(0.1 g · L<sup>-1</sup>),混合 30 s,加入 4 mL 乙醚涡旋 1 min,3 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 10 min,吸取上层乙醚于 40 °C 水浴氮气吹干,100 μL 甲醇溶解后,取 20 μL 高效液相色谱法测定。

**2.5.3 专属性考察** 取空白大鼠血浆 300 μL,按“2.5.2”项下操作,考察空白血浆对药物及内标有无干扰。

**2.5.4 血浆标准曲线** 精密吸取不同浓度的对照品溶液 50 μL 及内标溶液 10 μL,氮气吹干后,加入空白血浆 300 μL,分别制成含紫杉醇质量浓度为 0.1,0.25,0.5,1,2.5,5,10,20 mg · L<sup>-1</sup> 的血浆样品,按“2.5.2”项下方法处理。

**2.5.5 精密度实验** 制备 0.25,2.5,10 mg · L<sup>-1</sup> 的血浆样品各 5 份,按“2.5.2”项下处理,考察日内、日间精密度。

**2.5.6 萃取回收率** 制备 0.25,2.5,10 mg · L<sup>-1</sup> 的血浆样品各 5 份,按“2.5.2”项下处理后测定得峰面积 A<sub>1</sub>,另取相同浓度的紫杉醇溶液直接进样测定得峰面积 A<sub>2</sub>。计算萃取回收率。

**2.5.7 药动学实验** 取 SD 大鼠 10 只,随机分为 2 组,一组给予自制修饰的脂质体混悬液,另一组给予市售紫杉醇注射液。以 10 mg · kg<sup>-1</sup> 剂量经大鼠尾静脉缓慢推注,给药后分别于 0.083,0.5,2,4,6,8 h 和 0.085,0.5,2,4,6,8,12,24 h 眼底静脉丛取血 0.8 mL,4 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 10 min 分离血浆,取 0.3 mL 血浆按照“2.5.2”项下处理后,用 HPLC 分析,将所得数值代入标准曲线求得血药浓度。

## 2.6 数据处理

血药浓度数据采用 DAS 2.0 进行处理,求得药动学参数。参数之间进行 *t* 检验。

## 3 结果

### 3.1 PEG-DSPE 的合成

采用核磁共振仪对 mPEG-DSPE 进行结构分析。确证合成产品为 mPEG-DSPE。

mPEG-DSPE:<sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>) δ:0.83(6H, m, 2 × CH<sub>3</sub>), 1.21(56H, s, CH<sub>2</sub>), 1.28(9H, s, tBu), 3.60(166H, s, PEG), 3.91(5H, m, CH<sub>2</sub>), 4.15(3H, m, CH<sub>2</sub>O-P), 5.17(1H, brs, CH)。

<sup>13</sup>C-NMR(CDCl<sub>3</sub>) δ:14.0(CH<sub>3</sub>), 22.6(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 24.8(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C=O), 29.7(polyCH<sub>2</sub>), 31.9(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 34.0, 32.2(CH<sub>2</sub>C=O), 42.0(HNCH<sub>2</sub>C=O), 45.7(HNCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 62.8(CH<sub>2</sub>

CONH), 63.6 and 63.7 (CH<sub>2</sub>O-P), 64.5 and 64.6 (CH<sub>2</sub>CONH), 69.6 (CHOC=O), 70.6 (PEG), 169.2 (C=O), 173.0 and 173.4 (C=O)。

### 3.2 脂质体的粒径和包封率

得到的脂质体粒径分布较均匀,平均粒径为(411.8 ± 31.9) nm,多分散系数为0.436。测得脂质体的包封率为(82.47 ± 2.15)%。

### 3.3 体内方法学验证

#### 3.3.1 专属性考察

焓诺酮和紫杉醇的保留时间分别为4.215和5.898 min,分离较好;大鼠血浆中未见对紫杉醇和焓诺酮有干扰峰存在,色谱图见图1。

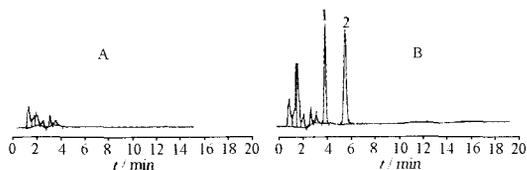


图1 紫杉醇在血浆中的HPLC色谱图

A - 空白血浆; B - 含药血浆; 1 - 内标; 2 - 紫杉醇

Fig. 1 Chromatograms of paclitaxel in rat plasma

A - blank plasma; B - plasma spiked with paclitaxel and norethisterone; 1 - IS; 2 - paclitaxel

#### 3.3.2 血浆标准曲线的制备

以样品峰面积 $A_s$ 对内标峰面积 $A_i$ 的比值 $A_s/A_i$ 作为纵坐标,以样品质量浓度 $\rho$ 作横坐标,进行线性回归,血浆标准曲线为: $\rho = 0.8818 A_s/A_i - 0.0298$  ( $r = 0.9992, n = 5$ )。线性范围为0.1 ~ 20 mg · L<sup>-1</sup>。

#### 3.3.3 精密度和萃取回收率实验

表1中结果显示,药物在血浆中的日内、日间差均小于15%,符合生物样品测定的要求。

表1 紫杉醇在大鼠血浆中的精密度和萃取回收率,  $n = 5, \bar{x} \pm s$

Tab. 1 Precision and extraction recovery of paclitaxel in rat plasma.  $n = 5, \bar{x} \pm s$

Added /mg · L <sup>-1</sup>	Intra-day		Inter-day		Recovery /%	RSD /%
	Found /mg · L <sup>-1</sup>	RSD /%	Found /mg · L <sup>-1</sup>	RSD /%		
0.25	0.241	9.26	0.247	13.26	88.50	6.16
2.5	2.455	4.62	2.491	5.86	89.61	4.39
10	9.639	3.10	9.569	3.64	91.42	4.02

### 3.4 大鼠体内药动学结果

#### 3.4.1 血药浓度经-时曲线

自制紫杉醇脂质体和市售紫杉醇注射液的血药浓度经-时曲线见图2。

#### 3.4.2 主要药动学参数

将所得血液经-时数据用DAS 2.0药动学程序拟合,结果表明,修饰的紫杉醇脂质体和紫杉醇注射液在大鼠体内均符合二室模型,其药动学参数见表2。

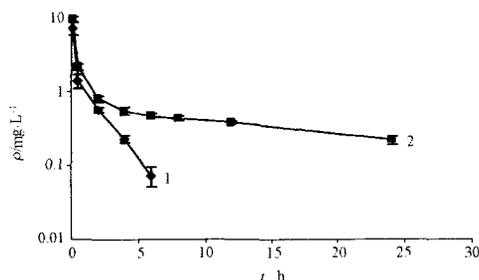


图2 紫杉醇长循环脂质体在大鼠中的血药浓度经-时曲线。 $n = 5, \bar{x} \pm s$

1 - 紫杉醇注射液; 2 - 紫杉醇脂质体

Fig. 2 Concentration-time profiles of paclitaxel in plasma after i. v. administration of paclitaxel injection and paclitaxel liposomes, respectively.  $n = 5, \bar{x} \pm s$

1 - paclitaxel injection; 2 - paclitaxel liposome

表2 紫杉醇脂质体和注射液大鼠尾静脉给药(10 mg · kg<sup>-1</sup>)后的药动学参数.  $n = 5, \bar{x} \pm s$

Tab. 2 Pharmacokinetic parameters of paclitaxel injection and paclitaxel liposomes in rats.  $n = 5, \bar{x} \pm s$

Parameters	Reference	Test
A/mg · L <sup>-1</sup>	11.53 ± 1.02	12.07 ± 1.30
$\alpha$ /h <sup>-1</sup>	8.89 ± 3.50	4.36 ± 0.38
B/mg · L <sup>-1</sup>	1.45 ± 0.20	0.79 ± 0.10 <sup>1)</sup>
$\beta$ /h <sup>-1</sup>	0.47 ± 0.046	0.067 ± 0.009 <sup>1)</sup>
$t_{1/2\alpha}$ /h	0.086 ± 0.029	0.16 ± 0.01 <sup>1)</sup>
$t_{1/2\beta}$ /h	1.48 ± 0.14	10.48 ± 1.34 <sup>1)</sup>
$\rho_{max}$ /mg · L <sup>-1</sup>	7.04 ± 1.37	9.16 ± 0.71
AUC <sub>0-24</sub> /mg · h · L <sup>-1</sup>	5.11 ± 0.77	13.59 ± 0.70 <sup>1)</sup>
AUC <sub>0-∞</sub> /mg · h · L <sup>-1</sup>	5.75 ± 0.85	18.01 ± 0.92 <sup>1)</sup>
CL/L · h <sup>-1</sup> · kg <sup>-1</sup>	1.791 ± 0.314	0.556 ± 0.018
$k_{10}$ /h <sup>-1</sup>	2.30 ± 0.42	0.71 ± 0.05 <sup>1)</sup>
$k_{12}$ /h <sup>-1</sup>	5.64 ± 2.69	3.39 ± 0.36
$k_{21}$ /h <sup>-1</sup>	1.42 ± 0.51	0.33 ± 0.03 <sup>1)</sup>

注:与注射组相比,<sup>1)</sup> $P < 0.05$

Note: <sup>1)</sup> $P < 0.05$ , vs reference

由表2可知,紫杉醇注射液和修饰后紫杉醇脂质体的 $t_{1/2\beta}$ 分别为1.48和10.48 h,且后者的AUC是前者的3.13倍。结果显示,相对于普通注射液,采用mPEG-DSPE修饰的紫杉醇脂质体可显著影响药物的体内行为,具有长循环效果,同时在一定程度上可提高紫杉醇在大鼠体内的生物利用度。

## 4 讨论

聚乙二醇(PEG)修饰的磷脂在国外常用作脂质体长循环的修饰膜材,价格昂贵,通常采用高温加热及大量有机试剂的使用<sup>[8]</sup>。本实验中我们采用两步反应合成得到,避免了反应过程中高温加热和充氮保护。该方法目前国内尚未报道,收率达到82.9%,成本较进口mPEG-DSPE大幅降低。

mPEG-DSPE为两亲性线型聚合物,一端PEG链为亲水性,另一端为亲脂性。在脂质体形成过程中,DSPE端可与磷脂膜结合,达到表面修饰的效

果。PEG 的长链结构可在脂质体表面形成“构象云”，降低血中调理蛋白的吸附使脂质体表面暴露出一些亲水性的多羟基基团，减少与血浆中调理成分的结合，从而增加其在血液中的稳定性<sup>[12]</sup>。

紫杉醇注射液和普通脂质体在小鼠体内的  $t_{1/2\beta}$  分别为 2.47 和 5.40 h<sup>[13]</sup>。本实验中市售注射液的  $t_{1/2\beta}$  为 1.48 h，与文献报道相当。采用了 mPEG-DSPE 修饰的脂质体与市售紫杉醇注射液相比， $t_{1/2\beta}$  由 1.47 h 延长至 10.48 h，体内滞留时间显著延长。这是因为采用 mPEG-DSPE 表面修饰脂质体，降低了血液成分对脂质体的清除率，其血浆清除率仅为注射液的 1/3 左右。另外，静脉注射后脂质体的 AUC 大于注射液的 AUC，也是其血浆清除率减小的结果。有文献<sup>[14]</sup>报道，以 PEG<sub>5000</sub>-DPPE 表面修饰的脂质体消除半衰期在小鼠体内可延长至 48.76 h，两者之间的差异提示 PEG 链长对脂质体在体内循环时间有较大的影响。

REFERENCES

[1] MEI L, SUN H F, SONG C X. Advances in paclitaxel liposome [J]. *China Pharm J* (中国药理学杂志), 2006, 41(18): 1366-1370.  
 [2] FJALLSKOG M L, FRJJ L, BERGH J. Is cremophor EL solvent for paclitaxel, cytotoxic? [J]. *Lancet*, 1993, 342(8875): 873.  
 [3] ZHANG J Q, ZHANG Z R, QIN S R. Study on long circulating magnetoliposome entrapped paclitaxel [J]. *China Pharm J* (中国药理学杂志), 2003, 38(7): 520-522.  
 [4] SUN P, DENG S H, YU W P. Preparation of long circulation al-litridin PEG-Liposomes and its pharmacokinetics [J]. *Prad J*

*Cardiac Cereb Pneum Vase Dis* (实用心脑血管病杂志), 2006, 14(6): 454-456.  
 [5] ZHANG X J, ZHANG P. Advances in clinical research and development of new form of paclitaxel [J]. *Oncol Prog* (癌症进展), 2007, 5(1): 66-72.  
 [6] YANASE M, SHINKAI M, HONDA H, et al. Antitumor immunity induction by intracellular hyperthermia using magnetite cationic liposome [J]. *Jpn J Cancer Res*, 1998, 89(7): 775-782.  
 [7] CAMPBELL R B, BALASUBRAMANIAN S V, STRAUBINGER R M. Influence of cationic lipids on the stability and membrane properties of paclitaxel containing liposomes [J]. *J Pharm Sci*, 2001, 90(8): 1091-1105.  
 [8] MIRON T, WILCHEK M. A simplified method for the preparation of succinimidyl carbonate polyethylene glycol for coupling to proteins [J]. *Bioconjug Chem*, 1993, 4(6): 568-569.  
 [9] ALEXANDER L K, KAZUO M, VLADIMIR P T. Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes [J]. *FEBS Lett*, 1990, 268(1): 235-237.  
 [10] SHARMA A, CONWAY W D, STRAUBINGER R M. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic determination of taxol in mouse plasma [J]. *J Chromatogr B Biomed Appl*, 1994, 655(2): 315-319.  
 [11] MARTIN N, CATALIN J, BLACHON M F, et al. Assay of paclitaxel (taxol) in plasma and urine by high-performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 1998, 709(2): 281-288.  
 [12] AWASTHI V D, GARCIA D, GOINS B A, et al. Circulation and biodistribution profiles of long-circulating PEG-liposomes of various sizes in rabbits [J]. *Int J Pharm*, 2003(1-2): 121-132.  
 [13] ZHOU W, LU Q, WENG G Y. Pharmacokinetics of taxol-liposome in rat [J]. *J Chin Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2000, 31(6): 443-446.  
 [14] CROSASSO P, CERUTI M, BRUSA P, et al. Preparation, characterization and properties of sterically stabilized paclitaxel-containing liposomes [J]. *J Controlled Release*, 2000, 63(1-2): 19-30.  
 (收稿日期: 2007-04-12)

中国药学会主办期刊 7 篇论文荣获第五届中国科协期刊优秀学术论文

为进一步提高中国药学会各编辑出版部门学术期刊质量，激励广大药学人员不断创新，响应中国科协倡导和鼓励高水平的学术论文在国内学术期刊发表的宗旨，中国药学会选送了一部分优秀药学学术论文，参加了中国科协开展的第五届中国科协期刊优秀学术论文评选活动。经过中国科协优秀论文评审委员会评审，中国药学会选送的《芳烷醇哌嗪类化合物的合成及抗抑郁活性》等 7 篇文章被评选为优秀学术论文。

希望荣获第五届中国科协期刊优秀学术论文的作者、编辑出版单位再接再厉，高举中国特色社会主义伟大旗帜，深入贯彻落实科学发展观，为促进我国学术繁荣和人才成长，提高我国自主创新能力，建设创新型国家做出新的贡献。

作者	题目	年期	杂志名
李建其、黄丽瑛、董文心等 9 人	芳烷醇哌嗪类化合物的合成及抗抑郁活性	2006-05	中国药物化学杂志
聂爱华、肖宁海、廖国超等 6 人	基于 FKBP52 结构的药物发现: 2-氮-双环[2.2.1]庚-5-烯-3-羧酸衍生物的设计、合成及其神经营养活性	2006-06	中国药物化学杂志
李忠红、倪坤仪、廖学威等 4 人	GC 和 GC-MS 法对小续命汤石油醚总提取物成分及有效成分的快速鉴定	2006-05	药物分析杂志
樊钰虎、冯瑄、杨晓燕等 4 人	抗菌肽 Cecropin B-肿瘤血管生长抑制因子 Kringle5 融合蛋白表达载体的构建及其表达	2005-05	药物生物技术
丁小余、王峥涛、徐红等 5 人	枫斗类石斛 rDNA ITS 区的全序列数据库及其序列分析鉴别	2002-07	药学报
陈大兵、杨天智、吕万良等 4 人	紫杉醇长循环固态脂质纳米粒的制备和体内外研究	2002-01	药学报
戴珪、刘秀均、甄永苏	抗 IV 型胶原酶单抗与平阳霉素新型免疫偶联物的抗肿瘤作用	2006-01	药学报

[本刊讯]