

## 高压均质机制备醋酸地塞米松聚乙二醇化纳米粒

胡亚立, 周兆熊, 解旭品, 张柏根, 孙黎, 张纪蔚

**[摘要]** **目的:** 制备醋酸地塞米松聚乙二醇(PEG)化纳米粒, 并测定其在兔体内的药动学参数。**方法:** 以高压均质法制备醋酸地塞米松 PEG 化纳米粒, 用扫描电镜观察纳米颗粒的形态, 用激光粒度分析仪测定粒径。建立检测血浆中醋酸地塞米松浓度的 HPLC 法, 以醋酸地塞米松溶液和普通纳米粒作为对照, 测定醋酸地塞米松 PEG 化纳米粒在兔体内的药动学参数。**结果:** PEG 化纳米粒平均粒径为(180±7) nm。体内半衰期为 4.79 h, AUC<sub>0-12</sub> 为 11.81 mg# min# L<sup>-1</sup>, 平均滞留时间为 31.15 h, 重要药动学参数比普通纳米粒及溶液剂增加近 1 倍。**结论:** 醋酸地塞米松 PEG 化纳米粒可以延长醋酸地塞米松在兔体内的半衰期, 达到体内长循环的目的; 其表现特征与普通载药纳米粒无明显差异。

**[关键词]** 醋酸地塞米松; 纳米粒; 聚乙二醇类; 药代动力学; 色谱法, 高压液相

**[中图分类号]** R 944.9, R 965 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1671-2838(2010)05-0377-04

### Preparation and in vivo pharmacokinetics of polyethylene glycol-modified nanoparticles loaded with dexamethasone acetate

HU Ya li<sup>1</sup>, ZHOU Zhao xiong<sup>1</sup>, XIE Xupin<sup>1</sup>, ZHANG Baigen<sup>1</sup>, SUN Li<sup>2</sup>, ZHANG Jiw ei<sup>2</sup> (1. Department of Vascular Surgery, Renji Hospital affiliated to School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200001, China; 2. Department of Pharmacy, Renji Hospital affiliated to School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200001, China)

**[ABSIRACT]** **Objective:** To prepare polyethylene glycol(PEG)-modified nanoparticles loaded with dexamethasone acetate and investigate its in vivo pharmacokinetics in rabbits. **Methods:** The nanoparticles were prepared by high pressure homogenization method. Their morphology was observed with scanning electron microscope and grain size was determined by laser grain size analyzer. HPLC method was employed to determine the plasma concentration of dexamethasone acetate. The pharmacokinetics of PEG-modified nanoparticles of dexamethasone acetate in rabbits were studied with dexamethasone acetate solution and general nanoparticles as control samples. **Results:** Grain sizes of the PEG-modified nanoparticles of dexamethasone acetate were (180±7) nm. The main pharmacokinetic parameters were as follows: t<sub>1/2β</sub> 4.79 h, AUC<sub>0-12</sub> 11.81 mg# min# L<sup>-1</sup> and mean retain time (MRT) 3.15 h. They were almost twice as those of the solution and the general nanoparticles. **Conclusion:** There is no significant difference in the apparent characteristics between general and PEG-modified nanoparticles of dexamethasone acetate. PEG modification can prolong the in vivo circulation time of dexamethasone acetate nanoparticles.

**[KEY WORDS]** dexamethasone acetate; nanoparticles; polyethylene glycols; pharmacokinetics; chromatography, high pressure liquid

[Pharm Care Res, 2010, 10(5): 377-380]

血管腔内成形术、自体静脉或人工血管旁路转流术是治疗动脉闭塞性疾病的主要方法, 然而血管内膜增厚导致血管再狭窄是影响血管重建术远期通畅率的主要原因。研究发现, 抑制平滑肌细胞增殖是防止和治疗血管再狭窄的主要策略<sup>[1]</sup>。在众多抑制内膜增生的药物中, 地塞米松是一种具有代表性的糖皮质激素类抗炎药。醋酸地塞米松是地塞米松

的醋酸酯, 在体内能够转化为地塞米松起作用, 具有良好脂溶性, 能较好包被于纳米脂质层中, 通过纳米载体直接输送。本研究以磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000(phosphatidyl ethanolamine-polyethylene glycol 2000, PE-PEG2000) 对醋酸地塞米松纳米粒进行表面修饰, 考察修饰后的纳米粒与普通纳米粒体内药动学的差异。

### 1 材料

1.1 仪器和试剂 高压均质机(美国 PSS, 吉能纳米代理); VG-130BP 超声细胞破碎仪(美国 Sonics 公司); Rotavapor R200 旋转蒸发器(德国 Bochi 公司); A vant i 3D 低温高速离心机(美国 Beckman 公司); 240/70 型 HPLC 仪(美国 Waters 公司); Diamonsil C<sub>18</sub> 色谱柱(迪马公司);

**基金项目** 上海市科学技术委员会 科研计划资助项目(No. 0852nm05100)

**作者简介** 胡亚立(女), 硕士生. E-mail: hyl8090@tom.com

**通讯作者:** 张纪蔚, E-mail: zhangjiwei001@sina.com **作者单**

**位** 200001 上海, 上海交通大学医学院附属仁济医院血管外科(胡亚立, 周兆熊, 解旭品, 张柏根, 张纪蔚), 药剂科(孙黎)

THG-D台式恒温震荡仪(江苏省太仓市实验仪器厂)。胆固醇、卵磷脂(美国Sigma公司);醋酸地塞米松原料(上海通用药业有限公司);醋酸地塞米松标准品(含量99.6%,批号100122-200805)和地塞米松标准品(含量99.6%,批号100129-200804)购自中国药品生物制品检定所;2-丙二醇(分析纯)、三氯甲烷(分析纯)、甲醇(色谱纯)、乙腈(色谱纯)由国药集团化学试剂公司提供;PE-PEG2000(上海摩尔实验室合成)。

1.2 动物 雄性新西兰白兔,体重2.0~2.5 kg(复旦大学医学动物实验中心提供,动物合格证号:SCXK20070007)。

## 2 方法和结果

2.1 纳米粒的制备 (1) PEG化醋酸地塞米松纳米粒:参考文献[2,3]的方法,采用高压均质机(美国PSS,吉能纳米代理)均质法制备PEG化纳米粒。精密称取醋酸地塞米松原料

100 mg,分别加入卵磷脂1.2 g、胆固醇0.6 g、PE-PEG2000 0.623 g(即2 wt%,wt表示摩尔数与质量的比值)<sup>[4]</sup>和三氯甲烷约30 ml,在通风橱内充分振荡溶解。溶液在旋转蒸发器中35℃水浴制成均匀药膜,再加入去离子水,在恒温30℃振荡仪中充分水化后定容至100 ml,置于细胞破碎仪内超声振荡(功率17 w)4 min。之后将溶液置于高压均质机(美国PSS,吉能纳米代理)内,低压(0.7 kPa)循环3 min,高压(1.5 kPa)循环6 min,得到PEG化载药纳米粒。(2)普通醋酸地塞米松纳米粒:制备方法与PEG化纳米粒相同,只是未添加PE-PEG2000。(3)醋酸地塞米松溶液剂:将适量醋酸地塞米松原料溶于5%的2-丙二醇生理盐水溶液,制成5%(w/v)的溶液。

2.2 粒径的测定 取100 μl纳米液加溶剂至2 ml,超声分散5 min,制得分散液。用激光粒度仪测定粒径,条件为:He、Ne激光波长633 nm,电位梯度10 V/cm,散射角90°,测定温度20℃。测得PEG化醋酸地塞米松纳米粒和普通纳米粒的粒径分布均呈单峰样正态分布,平均粒径分别为(180±7)和(168±8) nm,无统计学差异(P>0.05)。

2.3 纳米粒的形态 将载玻片放入30%双氧水与浓硫酸(1B3)的混合液中,煮沸20 min,用无水乙醇和去离子水分别漂洗干净。将纳米样品滴在玻片上,令其自由扩散,室温下干燥。然后将纳米样品负压(0.1 mPa)干燥5 min,充气后喷金4次,每次间隔30 s,以扫描电镜观测纳米粒的外观形态,扫描倍数为2.0×10<sup>3</sup>~5.0×10<sup>4</sup>倍。扫描结果显示两种纳米粒均呈类圆形,大小均匀,表面无药物结晶(见图1)。

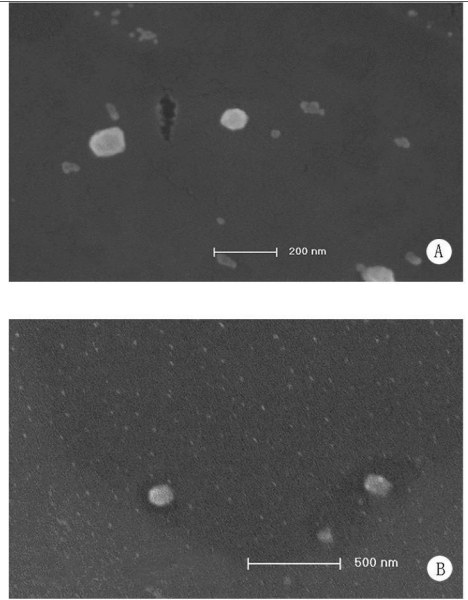


图1 醋酸地塞米松纳米粒的扫描电镜照片 Figure 1 Scanning electron microscope photographs of dexamethasone acetate nanoparticles  
A:普通醋酸地塞米松纳米粒; B:PEG化醋酸地塞米松纳米粒

2.4 包封率 (1) 标准曲线的制备 色谱条件<sup>[5]</sup>: Diamonsil C<sub>18</sub>色谱柱(150 mm@4.6 mm, 5 μm), 流动相: 甲醇-水=74:26, 检测波长240 nm, 流速为1 ml/min。精密称取醋酸地塞米松标准品约10 mg, 置于50 ml容量瓶内, 用甲醇溶解并稀释至刻度。精密移取该溶液适量, 分别用流动相稀释, 得到系列浓度为56、28、14、7、3.5和11.75 μg/ml的标准品溶液, 各取20 μl进样。以醋酸地塞米松的峰面积(A)对浓度(c)进行线性回归, 得到标准曲线方程为: A=38415+46653c(r=0.9998, n=5), 表明在11.75~56 μg/ml峰面积与药物浓度呈良好线性关系。(2) 包封率(EE)的测定 取制备的纳米粒100 μl, 加入900 μl甲醇, 充分振荡溶解, 以HPLC法检测醋酸地塞米松含量, 计算纳米粒载药总量(E<sub>1</sub>)。取1 ml纳米样品置于微量离心管, 6.4×10<sup>3</sup> g离心1 h。色谱条件同上, 取上清液以HPLC法检测游离药物总量(E<sub>2</sub>)。EE=(E<sub>1</sub>-E<sub>2</sub>)/E<sub>1</sub>。结果测得普通纳米粒包封率为(97.6±0.7)%(n=5), PEG化纳米粒包封率为(97.5±1.0)%(n=5)。两种纳米粒包封率无统计学差异。

## 2.5 体内药动学

2.5.1 给药方案和血样采集 取雄性新西兰白兔9只, 随机分为3组, 每组3只, 以1 mg/kg的剂量分别静脉注射醋酸地塞米松溶液、普通纳米粒和PEG化纳米粒稀释液(浓度均为0.1 mg/ml), 于5、15、30 min, 1、2、4、6、8、10、12 h耳缘静脉取血

高压均质机—吉能纳米科技有限公司

service@jnanotech.com TEL: 13567926035

1.5 ml, 置肝素抗凝离心管中, 3 000 r/min(离心半径为 8 cm)离心 10 min, 分取血浆于-70℃冰箱中保存待测。

2.5.2 血浆的处理 (1) 血浆样品<sup>[6]</sup>: 在 0.5 ml 血浆样品中加入 3 ml 乙酸乙酯, 涡旋振荡 5 min 后, 4.5 @ 10<sup>3</sup> g 离心 10 min, 分取乙酸乙酯层 1.5 ml, 于 50℃水浴下通氮气挥干, 残留物加 150 μl 甲醇复溶后, 804196 g 离心 10 min, 取上清液进样。(2) 标准血浆样品: 由于醋酸地塞米松在体内可能会部分转化为地塞米松, 因此为了准确测定药物浓度, 应同时测量

醋酸地塞米松和地塞米松浓度。取 0.5 ml 空白血浆, 分别加入 100 μl 不同浓度的醋酸地塞米松和地塞米松标准品溶液(0.109 4、0.218 8、0.437 5、0.875、1.175、3.5、7、14、28 Lg/ml), 配制不同浓度的标准血浆样品, 按血浆样品相同的方法处理后进样。

2.5.3 药物血浆浓度检测 色谱条件<sup>[7]</sup>: 色谱柱为 Diamonsil C<sub>18</sub>柱(150 mm @ 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈/乙酸铵缓冲液(pH=4.85, 45 B55), 检测波长 246 nm, 流速 1 ml/min, 进样量 20 μl。取空白血浆和标准血浆样品分别进样, 得到色谱图见图 2。

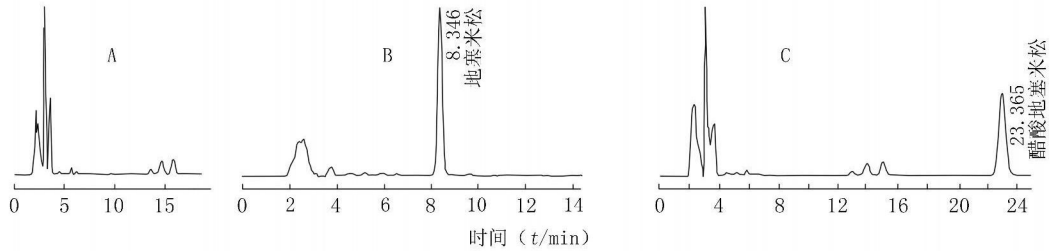


图 2 地塞米松和醋酸地塞米松的 HPLC 谱图

Figure 2 HPLC photographs of dexamethasone and dexamethasone acetate  
A: 空白血浆; B: 空白血浆+地塞米松标准品; C: 空白血浆+醋酸地塞米松标准品

2.5.4 标准曲线的制备 取 2.5.2 项下标准血浆样品进样测定, 以峰面积(A)对浓度(c)线性回归, 得到地塞米松标准线性方程:  $A = 25\,675.5c - 1\,571.5$ ,  $r = 0.999\,8$  ( $n = 5$ ); 醋酸地塞米松标准线性方程为:  $A = 16\,981.6c + 637.9$ ,  $r = 0.999\,2$  ( $n = 5$ )。地塞米松和醋酸地塞米松的血浆浓度在 0.109 4~28 Lg/ml 范围内, 峰面积与浓度呈良好线性关系。

2.5.5 回收率实验 分别配制低、中、高 3 个浓度(0.219、1.175、7.00 Lg/ml)的醋酸地塞米松和地塞米松标准血浆样品, 按 2.5.2 项下方法处理, 并测定含量, 以含量测定值与实际值的比值计算得到相对回收率。结果醋酸地塞米松低、中、高 3 个浓度的相对回收率分别为(105.20 ± 7.25)%、(91.98 ± 4.82)%和(102.37 ± 2.15)%; 地塞米松低、中、高 3 个浓度的相对回收率分别为(103.28 ± 6.42)%、(106.54 ± 3.47)%和(101.24 ± 1.37)% ( $n = 3$ )。

2.5.6 精密度实验 配制低、中、高 3 个浓度(0.219、1.175、7.00 Lg/ml)的醋酸地塞米松和地塞米松标准血浆样品, 测定峰面积。每日制备随行标准曲线, 按当日标准曲线求算药物浓度。每种浓度一日测定 5 次, 计算日内 RSD。连续测定 5 d, 计算日间 RSD。结果低、中、高浓度醋酸地塞米松的日内 RSD 分别为 6.02%、3.57%和 1.97%, 日间 RSD 分别为 7.68%、5.32%和 2.95% ( $n = 5$ ); 低、中、高

浓度的地塞米松的日内 RSD 分别为 5.68%、2.72%和 1.25%, 日间 RSD 分别为 6.62%、3.78%和 2.31% ( $n = 5$ )。

2.6 药-时曲线和药动学参数 定时采集的血样按 2.5.3 项下色谱条件检测, 只检测到地塞米松药物峰。考虑到醋酸地塞米松是地塞米松的前体药物, 活体内醋酸地塞米松转化为地塞米松的过程可能加速, 在体内真正起作用的是地塞米松, 因此在后续计算中以地塞米松浓度反映药物浓度, 得到 3 种制剂的药-时曲线见图 3。血药浓度-时间曲线数据经药动学 3p87 软件拟合, 符合二房室模型。采用 SPSS 11.0 统计软件计算药动学参数, 数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用两独立样本 t 检验, 结果见表 1。

### 3 讨论

本研究以高压均质机(美国 PSS, 吉能纳米代理)均质法制备 PE-PEG2000 修饰的醋酸地塞米松纳米粒, 以改善载药纳米粒的亲水性, 并以 HPLC 法测定血浆样品中药物浓度<sup>[6]</sup>。血浆样品处理参照文献[7]的方法, 但是为了充分去除血浆蛋白, 延长了涡旋时间。结果发现, 醋酸地塞米松注射至体内后迅速代谢为地塞米松, 但在体外仍能长时间保持为醋酸地塞米松, 可能是因为血液中复杂的环境加速了醋酸地塞米松的代谢。Gref 等<sup>[4]</sup>研究发现, PEG 相对分子质量和 PEG 在纳米粒中的含量直接影响血浆蛋白对修饰后纳米粒的吸

高压均质机—吉能纳米科技有限公司

service@jnanotech.com TEL: 13567926035

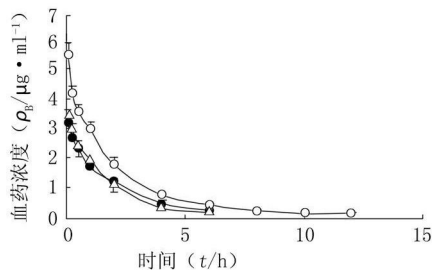


图3 静脉注射醋酸地塞米松3种制剂后的平均血药浓度-时间曲线

Figure 3 Mean plasma concentration-time curves of dexamethasone acetate after intravenous injection of three dexamethasone acetate preparations

○: PEG化纳米粒; ●: 普通纳米粒; ▽: 溶液剂

表1 三种醋酸地塞米松制剂的主要药动学参数

Table 1 Main pharmacokinetic parameters of dexamethasone acetate after intravenous administration of three dexamethasone acetate preparations

组别	V (L)	AUC (A/mg# min# L <sup>-1</sup> )	t <sub>1/2A</sub> (t/h)	t <sub>1/2B</sub> (t/h)	CL (L/h)	MRT (t/h)
醋酸地塞米松溶液	0.56?	6.53?	0.75?	2.02?	0.31?	1.57?
普通醋酸地塞米松纳	0.57?	6.33?	0.23?	1.81?	0.29?	1.75?
聚乙二醇化醋酸地塞米松纳米粒	0.40*	11.81?	1.20?	4.79?	0.17?	3.15?
米松纳米粒	0.04*	0.35*	0.09	0.19*	0.02*	0.07*

\* P < 0.05, 与醋酸地塞米松溶液比较; \* P < 0.05, 与普通醋酸地塞米松纳米粒比较

附。相对分子质量在 2 000~ 5 000 的 PEG, 在纳米粒中含量为 2wt%~ 5wt%, 可最大限度减少血浆蛋白对纳米粒的吸附作用。因此, 本研究选取相对分子质量为 2 000 的 PEG, 结果 PEG 化修饰对载药纳米粒的药动学产生了明显影响。PEG 化修饰延长了醋酸地塞米松的体内循环时间, 可以提高药物的生物利用度, 从而有可能减少药物的用量, 降低药物不良反应发生率。另外, 连接的 PEG 分子还可以进一步被功能化修饰, PEG 末端可以与羧酸、氨基或巯基直接反应, 通过氨基键或二硫键与靶向配体连

接, 制备特异性靶向纳米粒<sup>[8]</sup>。本研究为进一步研发具有主动靶向性的纳米药物输送系统提供了实验依据。

=参考文献>

[1] Angela M T, Coleen A M. Regulation of vascular smooth muscle cell growth targeting- the final common pathway[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003, 23(10): 1717-1720.

[2] Cyrus T, Zhang Huiying, Allen J S, et al. Intramural delivery of rapamycin with alphavbeta3-targeted paramagnetic nanoparticles inhibits stenosis after balloon injury [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008, 28(5): 820-826.

[3] 周兆熊, 张柏根, 张皓, 等. 生物素化全氟碳纳米颗粒荷载药物体外释放和磁共振影像观察[J]. 中国新药与临床杂志, 2009, 28(4): 268-272.

Zhou Zhaoxiong, Zhang Baigen, Zhang Hao, et al. Sustained release of drug loaded within biotinylated perfluorocarbon nanoparticles and use in magnetic resonance imaging[J]. Chin J New Drugs Clin Rem, 2009, 28(4): 268-272. Chinese with abstract in English.

[4] Gref R, Lück M, Quellec P, et al. Stealth corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2000, 18(3-4): 301-313.

[5] Zhou Zhaoxiong, Zhang Baigen, Zhang Hao, et al. Drug packaging and delivery using perfluorocarbon nanoparticles for targeted inhibition of vascular smooth muscle cells[J]. Acta Pharmacol Sinica, 2009, 30(11): 1577-1584.

[6] Schild P N, Charles B G. Determination of dexamethasone in plasma of premature neonates using high-performance liquid chromatography[J]. J Chromatogr B Biomed Appl, 1994, 658(1): 189-192.

[7] Lamielle D, Vistelle R, Nguyen-Khac M, et al. High-performance liquid chromatographic determination of dexamethasone in cerebrospinal fluid and plasma in the rabbit[J]. J Chromatogr, 1988, 434(1): 315-319.

[8] Kaul G, Amiji M. Tumor-targeted gene delivery using poly(ethylene glycol)-modified gelatin nanoparticles: in vitro and in vivo studies[J]. Pharm Res, 2005, 22(6): 951-961.

[收稿日期] 2010-03-08

[修回日期] 2010-09-25

[本文编辑] 兰芬

5 药学服务与研究 6 网上交费系统正式开通

5 药学服务与研究 6 网上交费系统已经开通, 订阅期刊费、广告费、审稿费和版面费等均可通过该系统支付。付款时首先请登陆本刊网站主页: <http://www.pcarjournal.net.cn/main.aspx>, 点击/ 在线支付0 进入支付宝在线交费系统, 参照缴费说明逐项填写完成, 进入支付中心, 选择使用支付宝余额付款或使用网上银行付款。缴费成功后会有提示说明。具体操作步骤可见本期杂志封四的图示。