

多西他赛长循环脂质体的制备与大鼠体内药动学评价

崔强¹ 侯明明² (1. 大连市妇女儿童医疗中心药剂科 辽宁大连 116037; 2. 大连市旅顺口区人民医院药剂科)

摘要 目的: 制备多西他赛长循环脂质体, 并评价大鼠尾静脉给药的药动学特性。方法: 采用薄膜分散-挤出法制备多西他赛长循环脂质体, 并对其粒径分布、Zeta 电位和微观形态进行表征。将 12 只 Wistar 大鼠随机分为多西他赛注射液组和多西他赛长循环脂质体组, 尾静脉给药剂量均为 $7.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 采用 HPLC 法测定大鼠血中多西他赛的药物浓度, 采用 3P97 程序计算多西他赛大鼠体内药动学参数。结果: 多西他赛长循环脂质体平均粒径为 $(109.2 \pm 28.6) \text{ nm}$, Zeta 电位为 $(-15.8 \pm 2.7) \text{ mV}$ 。多西他赛注射液和多西他赛长循环脂质体在大鼠体内的 $t_{1/2(\alpha)}$ 分别为 $(0.19 \pm 0.05) \text{ h}$ 和 $(0.36 \pm 0.07) \text{ h}$; $t_{1/2(\beta)}$ 分别为 $(1.82 \pm 0.33) \text{ h}$ 和 $(17.93 \pm 1.37) \text{ h}$; AUC_{0-t} 分别为 $(4.42 \pm 0.76) \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 和 $(33.73 \pm 3.52) \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。结论: 多西他赛长循环脂质体与市售多西他赛注射液相比, 延长了药物在血浆中的滞留时间, 能达到长循环目的。

关键词 多西他赛; 长循环; 脂质体; 薄膜分散-挤出法; 药动学

中图分类号: R944.9; R969.1 文献标识码: A 文章编号: 1008-049X(2016)12-2254-04

Preparation and Pharmacokinetics in Rats of Docetaxel Long-circulating Liposomes

Cui Qiang¹, Hou Mingming² (1. Department of Pharmacy, Dalian Municipal Women and Children's Medical Center, Liaoning Dalian 116037, China; 2. Department of Pharmacy, Lvshunkou People's Hospital of Dalian)

ABSTRACT Objective: To prepare docetaxel long-circulating liposomes and evaluate pharmacokinetics in rats after tail-vein injection administration. **Methods:** The membrane dispersion followed by extrusion method was used to prepare docetaxel long-circulating liposomes. The liposomes were characterized by particle size, zeta potential and morphology. Totally 12 Wistar rats were randomly divided into docetaxel injection group and docetaxel long-circulating liposomes group, and the drug dose of tail-vein injection was $7.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. The docetaxel concentration in plasma was determined by HPLC. The pharmacokinetic parameters of docetaxel in rats were obtained by using 3P97 software. **Results:** The particle size and zeta potential was $(109.2 \pm 28.6) \text{ nm}$ and $(-15.8 \pm 2.7) \text{ mV}$, respectively. The $t_{1/2(\alpha)}$ of docetaxel injection and docetaxel long-circulating liposomes was $(0.19 \pm 0.05) \text{ h}$ and $(0.36 \pm 0.07) \text{ h}$, $t_{1/2(\beta)}$ was $(1.82 \pm 0.33) \text{ h}$ and $(17.93 \pm 1.37) \text{ h}$, and AUC_{0-t} was $(4.42 \pm 0.76) \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ and $(33.73 \pm 3.52) \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, respectively. **Conclusion:** Compared with that of docetaxel injection, the residence time of docetaxel long-circulating liposomes in plasma is prolonged resulting in improved bioavailability of docetaxel.

KEY WORDS Docetaxel; Long-circulating liposomes; Membrane dispersion followed by extrusion method; Pharmacokinetics

多西他赛(docetaxel)是在紫杉醇(paclitaxel)结构基础上改造合成出来的新型紫杉醇类似物,其作用机制与紫杉醇相同,都是通过抑制微管蛋白解聚,促进微管双聚体装配成微管,阻滞细胞进入 G 和 M 期,从而破坏肿瘤细胞的有丝分裂^[1],临床上主要用于治疗晚期乳腺癌、卵巢癌、非小细胞肺癌。多西他赛抗癌效果明显,其产品多西他赛注射液(商品名:艾素[®])已上市多年。但是,由于多西他赛溶解度较低^[2],对体内正常组织毒性较大,严重影响了其应用范围和临床疗效,因此开发新的高效、低毒制

剂一直是多西他赛研究的热点^[3-5]。本研究将多西他赛制备成聚乙二醇(PEG)衍生物修饰的长循环脂质体,并考察大鼠尾静脉给药的药动学行为,为后续临床应用奠定理论基础。现报道如下。

1 仪器与材料

LF-1 脂质体挤出器(加拿大 ATS 工业系统有限公司); Waters 2695 型高效液相色谱仪(沃特世公司); Mastersizer 2000 激光粒度分析仪(英国马尔文公司); Zetasizer Nano 电位分析仪(英国马尔文公司); JEM-2100 透射电镜(日本电子公司); GL-22M

通讯作者: 崔强 Tel: 15840627251 E-mail: 657459418@qq.com

- 5 Xu B, Broome U, Ericzon BG, et al. High frequency of autoantibodies in patients with primary sclerosing cholangitis that bind biliary epithelial cells and induce expression of CD4 + 4 and production of interleukin 6[J]. *Gut*, 2002, 51(1): 120-127
- 6 Crippin JS. Motion-Patients with primary sclerosing cholangitis should undergo early liver transplantation: Arguments against the motion[J].

Can J Gastroenterol, 2002, 16(10): 700-702

7 中国药典[S]. 2015 年版. 四部. 121

8 日本厚生省医药安全局. 熊去氧胆酸[DB/OL]. <http://www.cde.org.cn/recommend.do?method=view&id=156>, 2010-01-27/2013-06-28

(2016-05-27 收稿 2016-08-27 修回)

高速冷冻离心机(南京莱步科技实业有限公司);聚偏二氟乙烯膜(PVDF膜,规格:0.1 μm/0.22 μm,密理博中国公司);DF2101S集热式恒温加热磁力搅拌器(河南巩义英峪予华仪器厂);DS-7510DT超声波清洗仪(上海生析超声仪器有限公司)。

多西他赛原料药(上海新亚药业有限公司,批号:20150916,含量:99.0%);多西他赛对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100666-201403,含量:99.5%);多西他赛注射液(法国赛诺菲-艾万特制药公司,规格:0.5 ml:20 mg,批号:20150012);蛋黄卵磷脂(PL-100M,上海艾韦特医药有限公司,批号:E54144002);胆固醇(日本油脂公司,批号:29810);二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000(DSPE-PEG 2000,德国Lipoid公司,批号:P39482B1001);无水乙醇(国药集团化学试剂有限公司,批号:20150617)。

Wistar大鼠,清洁级,雌雄各半,体质量200~220 g,由大连医科大学动物中心提供,动物合格证号:DCXK(辽)2014-006)。

2 方法与结果

2.1 多西他赛长循环脂质体的制备^[6]

依次称取处方量的多西他赛、蛋黄卵磷脂、胆固醇、DSPE-PEG 2000加入到250 ml梨形瓶中,再加入适量氯仿轻轻振摇溶解;梨形瓶按转到旋转蒸发仪上,50℃水浴温度下减压除去氯仿,在瓶内形成一层透明状均匀薄膜,继续抽真空4 h,完全除尽氯仿;向瓶中加入pH为6.8的磷酸盐缓冲液,50℃水浴温度下搅拌水化磷脂膜一定时间即形成乳白色的长循环脂质体混悬液;使用带有0.1 μm PVDF膜的脂质体挤出器将脂质体混悬液挤出即可得到带有淡蓝色乳光的多西他赛长循环脂质体混悬液;采用0.22 μm PVDF膜过滤除菌,充氮、轧盖密封,即得多西他赛长循环脂质体。

2.2 包封率的测定

色谱柱:岛津 Shim VP-ODS C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水(50:50);流速:1.0 ml · min⁻¹;检测波长:232 nm;柱温:25℃;进样量:20 μl。

称取10 mg多西他赛对照品置于100 ml量瓶中,加乙腈适量,水浴超声(400 W, 50 kHz)溶解,冷却至环境温度,加入流动相稀释至刻度,摇匀,作为多西他赛对照品贮备液(100 mg · L⁻¹)。精密量取多西他赛对照品贮备液定量稀释成含多西他赛为0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0 mg · L⁻¹的系列标准溶液,分别精密量取溶液按上述色谱条件进样测定,

以多西他赛峰面积(A)对其浓度(C, mg · L⁻¹)进行加权最小二乘法回归拟合,所得标准曲线方程为: $A = 43\ 291C + 2\ 793$ ($r = 0.999\ 9$),表明多西他赛在0.5~20.0 mg · L⁻¹范围内峰面积与浓度呈良好的线性关系。高、中、低3个浓度的平均回收率为99.8% $RSD = 0.92\%$ ($n = 9$);日内精密度 RSD 为0.74% ($n = 6$);日间精密度 RSD 为1.41% ($n = 6$)。

多西他赛长循环脂质体的包封率采用低温超速离心法^[7]进行测定,具体操作如下:取2.0 ml多西他赛长循环脂质体溶液加入到超速离心管中,在50 000 r · min⁻¹的条件下离心1 h,离心温度为4℃,上层为含有游离药物的澄清溶液,下层为脂质体沉积液,仔细吸取上层上清液转移到10 ml量瓶中,加入流动相定容至刻度;另外,同时精密移取多西他赛长循环脂质体0.5 ml于10 ml量瓶中,用乙腈破坏脂质体并定容至刻度。分别取上述两种溶液的续滤液采用HPLC法进行测定。多西他赛长循环脂质体的包封率计算公式为: $EE(\%) = (1 - W_{\text{游离}} / W_{\text{总}}) \times 100\%$ 。其中: $W_{\text{游离}}$ 代表脂质体溶液中未被包封多西他赛的浓度; $W_{\text{总}}$ 代表脂质体溶液中多西他赛的总浓度。经测定多西他赛长循环脂质体中药物的包封率为(95.4 ± 1.5)%。

2.3 脂质体粒径及Zeta电位的测定

取多西他赛长循环脂质体溶液适量,加入适量蒸馏水稀释后用Malvern激光粒度测定仪测定脂质体的粒径分布和Zeta电位。由图1可知,多西他赛长循环脂质体的平均粒径为(109.2 ± 28.6) nm, Zeta电位为(-15.8 ± 2.7) mV。

2.4 透射电镜观察

取多西他赛长循环脂质体溶液少量均匀铺展在铜网上,滴加2%的磷钨酸水溶液负染10 min,自然干燥后,取出铜网,在透射电镜下观察多西他赛长循环脂质体的表面形态与结构,并拍摄照片。由图2可知,多西他赛长循环脂质体大小较为均匀,呈圆整、规则球形,未见多西他赛结晶出现。

2.5 多西他赛长循环脂质体的体外释放考察

采用透析法考察多西他赛长循环脂质体的体外释放行为,释放介质选择pH 6.8磷酸盐缓冲液(含0.2%吐温80),释放介质体积为100 ml,释放介质温度(37 ± 0.5)℃,桨速50 r · min⁻¹。操作方法:精密移取2.0 ml多西他赛长循环脂质体置于经预先处理的透析袋(截留相对分子质量:12 000 Da)中,挤出空气并扎紧袋口,缚于溶出仪的浆叶底部,平行6份。分别于0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24 h吸取3 ml释放介质(同时补加等温释放介质3 ml)经0.45 μm微

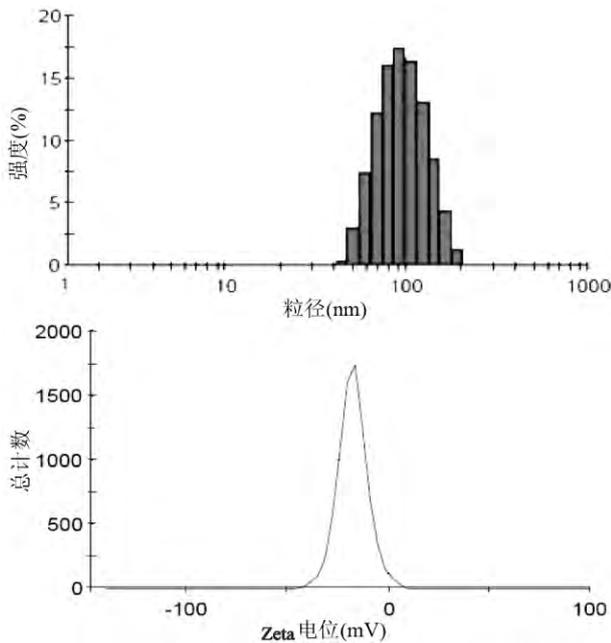


图1 多西他赛长循环脂质体粒径分布和 Zeta 电位图

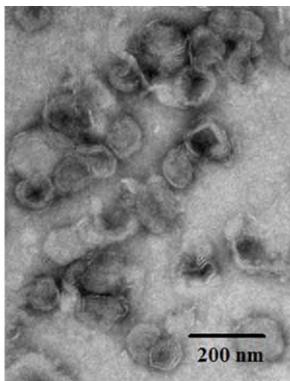
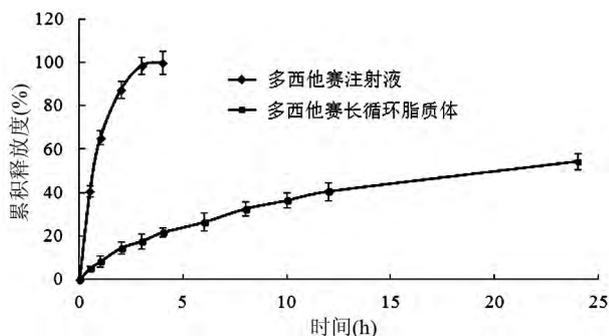


图2 多西他赛长循环脂质体透射电镜图

孔滤膜过滤,弃去初滤液,采用 HPLC 法测定多西他赛含量。另取多西他赛注射液置于透析袋内,同上进行释放试验,计算多西他赛注射液的累积释放度。

图3 多西他赛长循环脂质体体外释放曲线($n=6$)

由图3可知,多西他赛长循环脂质体释放缓慢,原因可能是由于脂质双分子层中的胆固醇对磷脂膜起到了稳定的作用^[8],可减缓药物从膜内向膜外释放。

2.6 药动学研究

2.6.1 血浆中多西他赛的含量测定方法

2.6.1.1 血浆样品的处理与测定 取大鼠全血约 0.5 ml 置肝素化的 1.5 ml 试管中,以 4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取血浆 200 μl 置 5.0 ml 的具塞玻璃管中,加入 10 μl 内标地西洋溶液(15.0 μg·ml⁻¹),涡旋振荡 2 min 混匀,然后加提取溶剂叔丁基甲醚 2.5 ml 涡旋 2 min,以 4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上层溶液 2 ml 置离心试管中,40 °C 氮气吹干。残余物加 100 μl 流动相,涡旋 1 min 溶解,以 4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,移取上清液 20 μl 按“2.2.2”项下色谱条件进样分析,记录多西他赛峰面积(A_s)和内标峰面积(A_i),计算 A_s 与 A_i 的比值,根据标准曲线计算血药浓度。

2.6.1.2 标准曲线 取大鼠空白血浆 200 μl 共 6 份,分别加入多西他赛系列对照品溶液 20 μl,配制浓度为 0.02, 0.05, 0.20, 1.0, 5.0, 10.0 μg·ml⁻¹ 的系列血浆标准溶液,药物浓度按“2.2.2”项下色谱条件测定,记录多西他赛峰面积(A_s)和内标峰面积(A_i),计算 A_s 与 A_i 的比值,以浓度(C , μg·ml⁻¹)为横坐标,以(A_s/A_i)的比值为纵坐标,采用加权最小二乘法进行回归,所得回归方程为: $A_s/A_i = 0.2215C - 0.0124$ ($r = 0.9953$)。结果表明:血浆中多西他赛在 0.02 ~ 10.0 μg·ml⁻¹ 浓度范围内 A_s/A_i 与 C 呈良好的线性关系。

2.6.1.3 精密度和提取回收率 取大鼠大鼠空白血浆 200 μl,配制多西他赛低、中、高 3 个浓度(0.02, 1.0, 10.0 μg·ml⁻¹)的血浆样品,按“2.6.1.1”项下方法处理,将血浆样品中药物测定浓度与配制浓度相对照,考察方法的日内、日间精密度和提取回收率。结果显示,测定方法日内精密度 $RSD \leq 4.01\%$,日间精密度 $RSD \leq 3.65\%$,能够满足方法学的要求;低、中、高 3 个浓度多西他赛血浆样品的提取回收率分别为 93.3%、92.7%、94.6%,同法考察内标的提取回收率为 94.1%,均达到了 90% 以上,符合生物样品分析方法指导原则的有关规定,该法可用于大鼠血浆中多西他赛含量的测定。

2.6.2 大鼠体内药动学试验 取 12 只 Wistar 大鼠,随机分为 A、B 组,每组 6 只,实验前禁食一夜。A 组大鼠为对照组,尾静脉注射市售多西他赛注射液(临用前用生理盐水稀释至 1.0 mg·ml⁻¹) 1.5 ml(给药剂量均为 7.5 mg·kg⁻¹),B 组大鼠为实验组,尾静脉注射多西他赛长循环脂质体注射液(1.0 mg·ml⁻¹) 1.5 ml(给药剂量均为 7.5 mg·kg⁻¹),分别在给药后 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 由大鼠

眼眶后静脉丛取血 0.5 ml,置于预先肝素化的 1.5 ml离心试管中,4 000 r · min⁻¹离心 10 min,精密吸取上层血浆 200 μl,置另一离心试管中,冰箱中冷冻保存,测定前按“2.6.1.1”项下方法处理后,取 20 μl 进样,以当日的标准曲线计算各时间点样品中多西他赛的浓度。

2.6.3 结果 将得到的血药浓度-时间数据结果采用 3P97 拟合分析并计算其药动学参数,根据 AIC 和拟合度判断两者的模型归属。实验数据经 SPSS 18.0 统计软件处理分析,样本间比较,采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。结果表明,多西他赛两种制剂在大鼠体内的药动学过程符合双隔室模型。多西他赛注射液和多西他赛长循环脂质体注射液的药动学参数见表 1。

表 1 多西他赛注射液与多西他赛长循环脂质体大鼠尾静脉注射给药后药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

| 参数 | 单位 | 多西他赛注射液 | 多西他赛长循环脂质体注射液 |
|-------------------|---|-------------|---------------------------|
| $t_{1/2(\alpha)}$ | h | 0.19 ± 0.05 | 0.36 ± 0.07 |
| $t_{1/2(\beta)}$ | h | 1.82 ± 0.33 | 17.93 ± 1.37 ^a |
| AUC_{0-4} | μg · ml ⁻¹ · h ⁻¹ | 4.42 ± 0.76 | 33.73 ± 3.52 ^a |
| $AUC_{0-\infty}$ | μg · ml ⁻¹ · h ⁻¹ | 4.56 ± 0.63 | 34.16 ± 2.41 ^a |
| CL | ml · h ⁻¹ | 1.78 ± 0.32 | 0.21 ± 0.04 ^a |
| V | — | 0.72 ± 0.10 | 0.35 ± 0.05 ^a |

注:与多西他赛注射液相比较,^a*P* < 0.05。

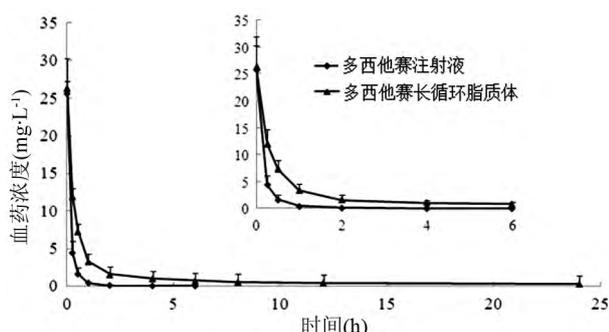


图 4 多西他赛注射液与多西他赛长循环脂质体大鼠尾静脉注射平均血药浓度-时间曲线 (*n* = 6)

3 讨论

脂质体不稳定的主要表现为粒径的增加,这主要是因为脂质体在制备和储存过程中不稳定的脂质体发生融合或聚集,或从脂质体中渗漏出来的难溶性药物发生自我聚集。脂质体平均粒径的增加通常会导致其被网状内皮系统摄取量相应增加,从而引

起脂质体的快速消除,产生较短的体内半衰期。因而,控制并维持小而均匀的粒径对于脂质体产品的临床应用非常重要。

从大鼠的药代动力学研究结果来看,多西他赛注射液经大鼠尾静脉注射后快速从大鼠体内清除,显示出双相模式,包括快速的分布相 $t_{1/2(\alpha)}$ 为 0.19 h 和快速的消除相 $t_{1/2(\beta)}$ 为 1.82 h,给药 6 h 后血浆中基本检测不到多西他赛;然而,多西他赛长循环脂质体显著改变了多西他赛在大鼠体内的药物动力学行为,其 $t_{1/2(\beta)}$ 和 *AUC* 值比多西他赛注射液显著提高,分别为 9.8 倍和 7.6 倍,体内清除率比多西他赛注射液降低了 8.5 倍。这是由于多西他赛长循环脂质体的 DSPE-PEG 2000 极性长链,可以增加脂质体膜的柔性和表面的空间位阻,避免被体内网状内皮系统 (RES) 吞噬和破坏,从而增加了脂质体的稳定性,延长了药物在血液中的循环时间^[9]。

参 考 文 献

- 1 路虹,王建东,孔为民. 多西他赛作为一线用药治疗卵巢癌研究进展[J]. 肿瘤防治杂志,2005,12(15):1194-1196
- 2 Engels FK, Mathot RA, Verweij J. Alternative drug formulations of docetaxel: a review [J]. *Anticancer Drugs*, 2007, 18(2): 95-103
- 3 Gao K, Sun JK, Liu X, et al. Preparation and characterization of a submicron lipid emulsion of docetaxel: submicron lipid emulsion of docetaxel [J]. *Drug Dev Ind Pharma*, 2008, 34(11): 1227-1237
- 4 Xu Z, Chen L, Gu W, et al. The performance of docetaxel loaded solid lipid nanoparticles targeted to hepatocellular carcinoma [J]. *Biomaterials*, 2009, 30(2): 226-232
- 5 Musumeci T, Ventura CA, Giannone I, et al. PLA/PLGA nanoparticles for sustained release of docetaxel [J]. *Int J Pharm*, 2006, 325(1-2): 172-179
- 6 张登山,刘留成. 叶酸受体介导盐酸小檗碱长循环脂质体制备及药效学研究[J]. 中国药师,2014,17(1): 8-13
- 7 杨涛,金大德,崔福德. 紫杉醇脂质体药物含量及包封率的测定[J]. 药物分析杂志,2008,28(2): 231-233
- 8 Gu XQ, Ma ZQ, Li HQ. Study on the polyphase liposomes - A new dosage form for anti-tumor drugs. Antitumor activity screening of polyphase liposome 139 and others [J]. *Clin Herb Med*, 1982, 13(1): 13-19
- 9 张亮,曹德英,王静. 主动靶向长循环脂质体的研究进展[J]. 中国医院药学杂志,2009,29(5): 407-408

(2016-06-18 收稿 2016-08-01 修回)