

## 奥沙利铂聚乙二醇修饰脂质体的制备及其大鼠体内的药动学

赵 雁, 贺 宁, 陶 涛

(中国医药工业研究总院, 药物制剂国家工程研究中心, 上海 200437)

**摘要**: 采用逆相蒸发-挤出法制备奥沙利铂聚乙二醇(PEG)修饰脂质体, 处方中蛋黄卵磷脂 E80-胆固醇-聚乙二醇修饰二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(PEG 2000-DSPE)重量比为 100 : 25 : 34, 药脂比为 1 : 10。所得制品平均粒径为 140 nm, 封装率 97.5%。采用 HPLC 法测定大鼠血浆中的奥沙利铂, 考察奥沙利铂 PEG 修饰脂质体静注给予大鼠的药动学情况, 并与奥沙利铂溶液相比较。结果显示, 奥沙利铂 PEG 修饰脂质体组的  $c_{\max}$  和  $AUC$  均显著大于溶液组 ( $P < 0.05$ ); 平均滞留时间 (MRT) 比溶液组延长了约 20 倍。说明奥沙利铂 PEG 修饰脂质体能延长药物在大鼠体内的循环时间。

**关键词**: 奥沙利铂; PEG 修饰脂质体; 制备; 药动学

中图分类号: R944.9; R979.1 文献标志码: A 文章编号: 1001-8255(2012)11-0913-04

## Preparation and Pharmacokinetics of Oxaliplatin PEGylated Liposomes in Rats

ZHAO Yan, HE Ning, TAO Tao

(National Pharmaceutical Engineering Center, China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 200437)

**ABSTRACT**: Oxaliplatin PEGylated liposomes were prepared by reverse phase evaporation-extrusion method. The liposomal membranes consisted of egg yolk lecithin E80, cholesterol and polyethylene glycol 2000-distearoyl-phosphatidylethanolamine (PEG 2000-DSPE) with weight ratio of 100 : 25 : 34. And drug-to-lipid ratio was 1 : 10. The average particle size of the product was about 140 nm with the encapsulation efficiency of 97.5%. The concentration of oxaliplatin in rat plasma was determined by HPLC. The pharmacokinetics of oxaliplatin PEGylated liposomes in rats after iv administration was investigated with oxaliplatin solution as the control. The results showed that the  $c_{\max}$  and  $AUC$  of the liposomes group were significantly higher than those of the solution group ( $P < 0.05$ ). Compared with the solution group, the mean residence time (MRT) of liposomes group was increased by about 20 times. It indicated that the oxaliplatin PEGylated liposomes could prolong the circulation time in rats.

**Key Words**: oxaliplatin; PEGylated liposome; preparation; pharmacokinetics

结肠直肠癌是最常见的恶性肿瘤之一, 近 20 年来发病率逐渐增加。美国现有 120 万结肠直肠癌患者, 预计 2012 年将新增 143 460 病例<sup>[1]</sup>。奥沙利铂 (oxaliplatin, 1) 是第三代铂类抗肿瘤药, 活性高、抗肿瘤谱广, 2004 年 FDA 批准注射用 1 与氟尿嘧啶和亚叶酸联合用于进展期结肠直肠癌的一线治疗<sup>[2]</sup>。1 临床最常见的不良反应是剂量限制性的外周神经毒性, 包括急性及慢性神经毒性。研究

表明, 急性神经毒性是由于其代谢产物草酸盐和钙离子的螯合作用改变了神经元电压依赖钠离子通道所引起的, 而慢性神经毒性还与铂在外周神经系统的蓄积有关<sup>[3-5]</sup>。由于 1 在人体内的半衰期仅为 14.1 min<sup>[6]</sup>, 因此延长 1 原形药在体内的滞留时间, 延缓其生物转化, 则是降低其毒性的直接而有效的策略。聚乙二醇 (PEG) 修饰脂质体可在循环系统中长期滞留而不被网状内皮系统捕获, 并可借助实体瘤的高通透性和滞留效应 (enhanced permeability and retention effect, EPR) 富集于肿瘤组织, 实现对肿瘤的被动靶向、降低药物毒性<sup>[7]</sup>。为此, 本研究制备了 1 的 PEG 修饰脂质体, 并采用 HPLC 法测定大鼠血浆中的原形药物以评价其在大鼠体内的

收稿日期: 2012-03-12; 修回日期: 2012-07-29

基金项目: 2010 年度上海市科技启明星 (B 类) (10QB1404100)、2009 年上海市自然科学基金项目 (09ZR1430900)

作者简介: 赵 雁 (1980-), 女, 博士, 从事靶向给药系统研究。

Tel: 021-55514600×122

E-mail: clarezhaoyan@hotmail.com

长循环特性。

## 1 仪器与试剂

Nicom 380 ZLS 型  $\zeta$  电位 / 粒度激光散射测定仪 (美国 PSS 公司); 10A 型高效液相色谱仪 (日本 Shimadzu 公司); LiposoFast-Basic 型脂质体挤出器和聚碳酸酯膜 (孔径 0.2 和 0.1  $\mu\text{m}$ , 加拿大 Avestin 公司); 透析袋 ( $M_w$  30 000, 美国联合碳化公司); 超滤管 ( $M_w$  50 000, Millipore 公司)。

1 原药 (江苏恒瑞医药股份有限公司, 含量 99.9%, 批号 190803031); 蛋黄卵磷脂 E80、胆固醇及聚乙二醇修饰二硬脂酰磷脂酰乙醇胺 (PEG 2000-DSPE) 均购自德国 Lipoid 公司; 乙腈为色谱纯, 水为去离子水, 其他试剂均为分析纯。

雄性 SD 大鼠 [体重 180 ~ 220 g, 中国科学院上海实验动物中心上海斯莱克实验动物有限责任公司, 合格证号 SCXK(沪)2007-0005] 饲养于正压净化通风动物房, 温度 (25 $\pm$ 2)  $^{\circ}\text{C}$ , 自由进食与饮水。

## 2 方法和结果

### 2.1 1-PEG 修饰脂质体的制备

取蛋黄卵磷脂 E80 200 mg、胆固醇 50 mg 和 PEG 2000-DSPE 68 mg, 加入氯仿 - 乙醚 (1 : 4) 20 ml 溶解, 加入 1 溶液 [6 mg/ml, 用 pH 6.5 磷酸盐缓冲液 (PBS) 溶解制成] 4 ml, 冰浴超声得 w/o 型乳剂, 旋转蒸除 (25  $^{\circ}\text{C}$ , -0.07 MPa) 有机溶剂, 经孔径为 0.2 和 0.1  $\mu\text{m}$  的聚碳酸酯膜各挤出 10 次, 再用 5% 葡萄糖溶液透析去除游离药物, 即得 1-PEG 修饰脂质体。

### 2.2 1-PEG 修饰脂质体的表征

#### 2.2.1 粒径测定

将脂质体用 5% 葡萄糖溶液稀释 25 倍后用仪器测定粒径, 测定参数为 23  $\mu\text{m}$ 、折光率 1.333。结

果测得 3 批 1-PEG 修饰脂质体平均粒径为 (140 $\pm$ 11) nm。

#### 2.2.2 包封率测定

色谱条件<sup>[8]</sup>: 色谱柱 Diamonsil  $C_{18}$  柱 (4.6 mm $\times$ 200 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 流动相 甲醇 - 水 (1 : 9); 检测波长 250 nm; 流速 1 ml/min; 进样量 20  $\mu\text{l}$ 。本色谱条件下, 1 浓度在 2 ~ 100  $\mu\text{g/ml}$  范围内线性关系良好 ( $R^2=0.9999$ )。

取脂质体 0.4 ml, 置超滤管中, 离心 (1 360 $\times g$ ) 10 min, 测定滤液中 1 的浓度。另精密量取脂质体 0.2 ml 置 5 ml 量瓶中, 加入等体积 2% Triton X-100 和适量乙酸, 超声破膜后用流动相定容, 摇匀后取样测定, 记录色谱图, 按外标法以峰面积计算脂质体药物含量。计算得 1-PEG 修饰脂质体包封率为 (97.5 $\pm$ 2.1)% ( $n=3$ )。

### 2.3 大鼠血浆中 1 的测定

#### 2.3.1 色谱条件

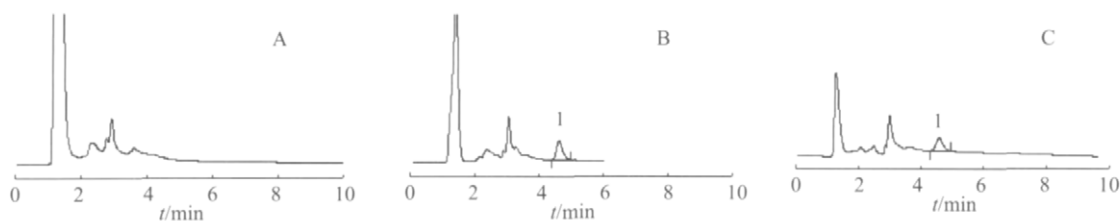
色谱柱 YWG  $C_{18}$  柱 (4.6 mm $\times$ 250 mm, 10  $\mu\text{m}$ ); 流动相 乙腈 - 水 - 冰乙酸 (98 : 2 : 0.01); 流速 1.5 ml/min; 检测波长 250 nm; 柱温 40  $^{\circ}\text{C}$ ; 进样量 100  $\mu\text{l}$ 。

#### 2.3.2 血浆样品处理

精密量取血浆 100  $\mu\text{l}$ , 置 0.5 ml 塑料离心管中, 精密加入 6% 高氯酸溶液 80  $\mu\text{l}$ , 涡旋振荡 30 s, 离心 (13 160 $\times g$ ) 2 min, 取上清液进样测定, 以峰面积按外标法定量。

#### 2.3.3 专属性试验

大鼠空白血浆、空白血浆加药物和大鼠给药后血浆的色谱图见图 1。可见, 1 保留时间约为 4.5 min, 分离度符合检测要求, 无内源性物质干扰。



A: 空白血浆, B: 空白大鼠血浆 + 1 (50  $\mu\text{g/ml}$ ), C: 1-PEG 修饰脂质体给药后 12 h 时采集的大鼠血样

1-1

图 1 典型色谱图

2.3.4 线性范围

精密量取空白血浆约 100 μl，分别加 1 贮备液 (2.5 mg/ml，用水溶解配制) 及系列浓度溶液使 1 浓度为 2、5、10、20、50、200 和 500 μg/ml，按“2.3.2”项下方法处理后进样测定。以 1 浓度 *c* 为横坐标，峰面积 *A* 为纵坐标进行线性回归，得回归方程为  $A=9\ 915c+26\ 193$  ( $R^2=0.997\ 5$ )，血浆中 1 浓度在 2 ~ 500 μg/ml 范围内线性关系良好。

2.3.5 方法回收率试验

配制低、中、高浓度 (10、50 和 200 μg/ml) 的血浆质控样品，按“2.3.2”项下方法处理后进样测定。通过测得量与加入量的比值求得方法回收率，结果低、中、高浓度样品的方法回收率分别为 (88.59±2.25)%，(97.45±4.14)% 和 (101.02±1.07)% ( $n=3$ )，符合生物样品的分析要求。

2.3.6 精密度试验

在同一天内配制低、中、高浓度 (10、50 和 200 μg/ml) 的血浆质控样品，按“2.3.2”项下方法处理后进样测定，计算日内精密度。连续 3 d 测定，计算日间精密度。结果，低、中、高浓度样品的日内 *RSD* 分别为 2.54%、4.25% 和 1.06%，日间 *RSD* 分别为 10.56%、4.97% 和 4.43%，符合测定要求。

2.4 大鼠体内药动学研究

2.4.1 试验设计

取雄性 SD 大鼠 6 只，随机分为 2 组，每组 3 只，分别经尾静脉给予 1 溶液 (用 5% 葡萄糖溶液溶解并配制成 1.7 mg/ml 的溶液) 和 1-PEG 修饰脂质体。大鼠称重后按 Meeh-Rubner 公式计算体表面积，两种剂型给药剂量均为 130 mg/m<sup>2</sup>。溶液组静注后在 0.5、2、5、15、30、60、120、180 和 240 min；PEG 修饰脂质体组在给药后 2、5、15、30、60、120、240、360、480、720、1 440 和 2 880 min，于眼眦静脉丛采血 0.4 ml。血样置含肝素钠的离心管中，离心 (9 668×*g*) 2 min，取血浆于 0 °C 保存，1 h 内测定。

2.4.2 药-时曲线和药动学参数

大鼠血浆药-时曲线见图 2，1 溶液静脉给药，消除较快，1 h 时药物浓度即降至 *c*<sub>max</sub> 的 1/10，3 h

时血浆中不能检出药物。而 1-PEG 修饰脂质体给药后血浆药物浓度高于溶液组，24 h 时血浆中仍有较高浓度，48 h 时血浆中尚能检出药物。

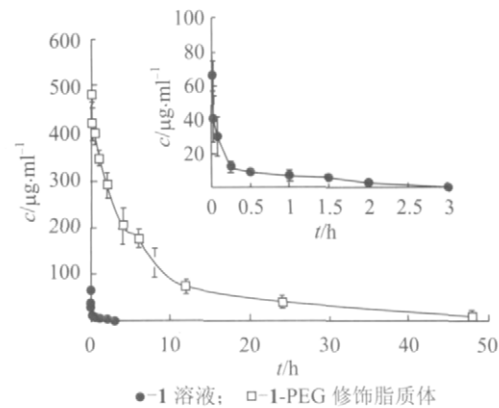


图 2 药-时曲线 ( $n=3$ )

用药动学软件 Kinetica 4.4 计算  $AUC_{0-\infty}$ 、 $t_{1/2}$  和  $MRT$ ， $t_{max}$ 、 $c_{max}$  用实测值表示，药动学参数见表 1。均数的两两比较采用 *t* 检验进行统计分析。1-PEG 修饰脂质体静脉注射后血浆中 1 的  $c_{max}$  和  $AUC$  均显著大于溶液组 ( $P<0.05$ )； $AUC$  为溶液组的 135 倍，平均滞留时间 ( $MRT$ ) 比溶液组延长了约 20 倍。

表 1 主要药动学参数 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

参数	1 溶液	1-PEG 修饰脂质体
$t_{max}/min$	0.5±0.0	2.0±0.0
$c_{max}/\mu g\cdot ml^{-1}$	65.9±9.0	511.5±14.9 <sup>1)</sup>
$AUC_0-\infty/\mu g\cdot ml^{-1}\cdot min$	1 425.7±280.2	192 460.3±40 885.7 <sup>1)</sup>
$t_{1/2}/min$	33.5±17.2	758.6±300.9
$MRT/min$	44.2±20.4	946.3±339.6

注：<sup>1)</sup> 与 1 溶液比较， $P<0.05$

3 讨论

预试验采用单因素法考察了 1- 脂质材料重量比、卵磷脂-胆固醇摩尔比、卵磷脂浓度和水相的种类对包封率的影响 (见图 3)。结果表明，降低药脂比、卵磷脂-胆固醇摩尔比，或增加卵磷脂浓度均能增加包封率；当药脂比降至 1 : 10 以下及卵磷脂浓度大于 50 mg/ml 时则包封率增加不显著。此外，用 pH 7.4 PBS 配制的含药水相制备的脂质体用 5% 葡萄糖溶液稀释后会出现沉淀，而用 pH 6.5

PBS 为水相则不会。综合考虑，确定优化处方为蛋黄卵磷脂 E80 浓度为 50 mg/ml，药脂比为 1 : 10，

卵磷脂 - 胆固醇摩尔比为 2 : 1，并用 pH 6.5 PBS 为水相配制药液。

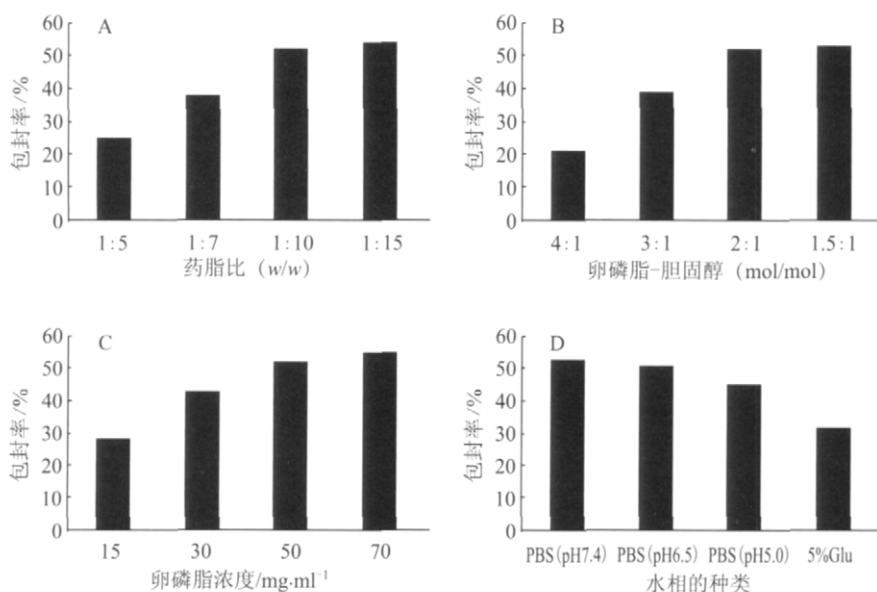


图 3 药脂比 (A)、卵磷脂 - 胆固醇摩尔比 (B)、卵磷脂浓度 (C) 和水相种类 (D) 对 1-PEG 修饰脂质体封装率的影响

1 入血后会迅速发生生物转化，文献一般通过测定生物样本中的铂来研究 1 的体内行为<sup>[9-11]</sup>。但由于 1 的代谢产物是引起急性神经毒性的主因，本研究通过测定大鼠血浆中的原形药物，考察 PEG 修饰脂质体对 1 原形药物的保护作用。结果显示，大鼠静脉给予 1-PEG 修饰脂质体的半衰期约 758 min，而 1 溶液仅约 33 min，表明 PEG 修饰脂质体能延长 1 原形药物在体内的循环时间，延缓药物的生物转化，减少代谢产物的蓄积，提示可能降低药物的神经毒性。一方面，可能是因为 1 被 PEG 修饰脂质体包裹后，药物的渗漏需要时间，可减缓药物与血浆成分的反应，即可提高体内 1 原形药物在血浆中的稳定性。另一方面，由于 PEG 修饰脂质体能有效躲避网状内皮系统的识别和吞噬，延长脂质体在血循环的滞留时间，进一步延缓了 1 的生物转化。此外，鉴于体外游离 1 在人和大鼠全血中会快速降解<sup>[6,12]</sup>，为准确测定血浆中的 1，还考察了体外大鼠血浆中 1 的稳定性，结果显示将含药血浆样品于 25℃ 保存 10 min 或 0℃ 保存 1 h 后再测定，含量下降均小于 5%，故确定研究中血样在 0℃ 条件保存，

1 h 内测定。

另外，1 为水溶性药物，制成脂质体存在封装率低及药物易渗漏的问题。采用逆相蒸发法制备的水溶性药物脂质体封装率较高，而利用适当孔径的聚碳酸酯膜可控制脂质体粒径，故选用逆相蒸发 - 挤出法制备 1-PEG 修饰脂质体，再经透析去除游离药物。并且，以 5% 葡萄糖溶液为释放介质在 37℃ 条件下进行体外释放试验，结果显示 1 水溶液在 30 min 内药物释放率 >95%，而 1-PEG 修饰脂质体 3 h 时药物释放率小于 1%。体内药理学试验结果显示其在体内具有保护药物的作用。

参考文献：

[1] Siegel R, Desantis C, Virgo K, *et al.* Cancer treatment and survivorship statistics, 2012 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2012, 62(4): 220-241.  
 [2] Ibrahim A, Hirschfeld S, Cohen MH, *et al.* FDA drug approval summaries: oxaliplatin [J]. *Oncologist*, 2004, 9(1): 8-12.

(下转第 926 页)

表 5 长期试验考察结果 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

考察指标	时间/月						
	0	3	6	9	12	18	24
4 h累积释放率/%	5.9±2.1	6.3±2.5	5.9±1.9	5.6±2.4	6.8±2.2	7.4±1.9	5.5±2.1
5 h累积释放率/%	25.6±2.5	23.7±3.2	25.9±2.9	27.3±3.1	21.5±2.6	28.3±3.3	24.7±3.0
14 h累积释放率/%	74.4±4.1	70.4±4.5	74.9±4.7	73.7±4.0	73.6±4.8	73.6±3.9	72.9±4.4
崩解时间/s	32±3.2	38±3.3	39±3.9	34±3.1	35±2.5	36±3.3	37±4.0

速的崩解效果。MCC 的可压性依序为 KG-802≈UF-711>>PH-102，流动性依序为 PH-102≈UF-711>>KG-802，选用 UF-711 能兼顾可压性和流动性，在低压下也能得到硬度高、脆碎程度小的片剂，使与之共压的包衣小丸衣膜不易破裂。此外，处方中的聚丙烯酸树脂包衣膜也具有足够的柔韧性。因此，本研究所制口崩片可在较低压片压力下成型，避免脉冲控释小丸破碎，维持与压片前脉冲控释小丸相似的释放特性。这些性质对本品能否顺利过度到产业化非常重要<sup>[7]</sup>。

参考文献：

[1] Beckert TE, Lehmann K, Schmidt PC. Compression of enteric-coated pellets to disintegrating tablets [J]. *Int J Pharm*, 1996, **143**(1): 13-23 .

[2] Roland Bodmeier. Tableting of coated pellets[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 1997, **43**(1): 1-8 .  
 [3] 梁超峰, 欧阳允, 杜燕昭, 等. 快速崩解茶碱包衣小丸骨架片的研制 [J]. 中国医药工业杂志, 2000, **31**(12): 536-538 .  
 [4] 高春生, 梅兴国. 微丸压片技术的研究进展 [J]. 中国药学杂志, 2006, **41**(3): 163-166 .  
 [5] 张媚媚, 韩珂, 吴传斌. 微丸压片工艺研究进展 [J]. 国际药学研究杂志, 2008, **35**(2): 128-132 .  
 [6] 梁超峰, 倪庆纯, 陈桐楷, 等. 多单元口崩脉冲控释片的研制. 盐酸地尔硫卓脉冲小丸口崩片的制备 [J]. 中国医药工业杂志, 2012, **43**(10): 832-836 .  
 [7] 梁超峰. 缓控释小丸的流化床中试生产 [C]// 第 38 届药物制剂论坛暨第 10 届固体制剂生产技术与质量控制专题研讨会资料. 第 38 届药物制剂论坛暨第 10 届固体制剂生产技术与质量控制专题研讨会. 广州: 中国医药生物技术协会, 2009.

( 上接第 916 页 )

[3] Grolleau F, Gamelin L, Boisdron-Celle M, et al. A possible explanation for a neurotoxic effect of the anticancer agent oxaliplatin on neuronal voltage-gated sodium channels [J]. *J Neurophysiol*, 2001, **85**(5): 2293-2297.  
 [4] Cavaletti G, Tredici G, Petruccioli MG, et al. Effects of different schedules of oxaliplatin treatment on the peripheral nervous system of the rat [J]. *Eur J Cancer*, 2001, **37**(18): 2457-2463.  
 [5] Krishnan AV, Goldstein D, Friedlander M, et al. Oxaliplatin and axonal Na<sup>+</sup> channel function in vivo [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, **12**(15): 4481-4484.  
 [6] Ehrsson H, Wallin I, Yachnin J. Pharmacokinetics of oxaliplatin in humans [J]. *Med Oncol*, 2002, **19**(4): 261-265.  
 [7] 顾 芑, 陈建明. PEG 化隐形纳米脂质体的研究进展 [J]. 药学与临床研究, 2011, **19**(1): 47-50.

[8] 国家药典委员会编. 国家药品标准新药转正标准第 35 册 [S]. 北京: 化学工业出版社, 2004.  
 [9] Delord JP, Umlil A, Guimbaud R, et al. Population pharmacokinetics of oxaliplatin [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2003, **51**(2): 127-131.  
 [10] Brouwers EE, Tibben MM, Joerger M, et al. Determination of oxaliplatin in human plasma and plasma ultrafiltrate by graphite-furnace atomic-absorption spectrometry [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2005, **382**(7): 1484-1490.  
 [11] Baur M, Drescher A, Gneist M, et al. Pharmacokinetics of oxaliplatin in patients with severe hepatic dysfunction [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2008, **61**(1): 97-104.  
 [12] Luo FR, Wyrick SD, Chaney SG. Biotransformations of oxaliplatin in rat blood in vitro [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 1999, **13**(3-4): 159-161.