

卡巴他赛脂质体的制备及其大鼠药动学

张丽¹, 李亚平^{1,2}, 陈伶俐^{2*}

(1. 江苏大学药学院, 江苏镇江 212013; 2. 中国科学院上海药物研究所药物制剂中心, 上海 201203)

摘要: 选用氢化大豆磷脂 (HSPC)、胆固醇、二硬脂酰磷脂酰甘油 (DSPG) 为辅料, 采用薄膜分散-高压均质法制备卡巴他赛脂质体。以透射电镜观察其形态、动态光散射法测定粒径分布及 ζ 电位、葡聚糖凝胶柱色谱法测定包封率; 采用透析法测定脂质体在体外的释放行为、并测定脂质体在大鼠体内的药动学行为。结果显示, 所制得的样品外观和形态较佳、平均粒径为 (68.04 ± 1.73) nm、多分散系数为 0.213 ± 0.015 、 ζ 电位为 (-57.7 ± 1.2) mV、包封率为 $(86.7 \pm 1.5)\%$ 。卡巴他赛脂质体在 0.05% Tween-80 水溶液中的48 h 累积释放率为 74% , 释放速率比注射液(20 h 累积释放率为 80%) 缓慢。卡巴他赛注射液及其脂质体在大鼠体内的 $AUC_{0-\infty}$ 为 (696.89 ± 0.16) 和 $(4\ 210.07 \pm 0.19)$ ng·ml⁻¹·h, $t_{1/2}$ 为 (5.85 ± 0.32) 和 (7.28 ± 0.40) h, 提示脂质体有延缓药物释放的作用。

关键词: 卡巴他赛; 脂质体; 薄膜分散-高压均质法; 体外释放; 药动学

中图分类号: R944.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-8255(2017)06-0874-05

DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2017.06.016

前列腺癌是由于前列腺腺泡细胞异常无序生长而造成的上皮性恶性肿瘤, 前期治疗多采用雄激素去除, 但多数转变成去势抵抗性前列腺癌 (CRPC), 此时去势药物的疗效已十分有限。卡巴他赛 (cabazitaxel, **1**) 是一种紫杉醇衍生物, 为白色结晶性粉末, 几乎不溶于水, 溶于乙醇等有机溶剂; 它对 CRPC 有明显的治疗作用, 主要通过微管蛋白结合进而组装成微管来抑制细胞的有丝分裂, 发挥药效。但处方中的 Tween-80 可能会引起严重的溶血过敏反应^[1-3]。

脂质体独特的磷脂双分子层结构决定了它的靶向性、低毒性和长效性。将 **1** 制备成脂质体可减轻其不良反应并提高疗效。制备脂质体的主要方法包括主动载药法和被动载药法。薄膜分散法作为被动载药法的一种, 易操作, 适用于脂溶性药物的制备。

1 仪器与试剂

e2695/2998 型高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司); Nano-ZS90 型粒度测定仪 (英国 Malvern 公司); M-110 型

高压均质机 (苏州微流纳米生物技术有限公司); Tecnai G2 F20 型透射电镜 (美国 FEI 公司); API 4000 型三重四极杆串联质谱仪 (美国 Applied Biosystems 公司); ZLXS 5003Y 型纯水仪 (美国 Millipore 公司); 透析袋 (截留相对分子量 8 000 ~ 14 000, 国药集团化学试剂有限公司)。

1 原料药 (上海佰世凯化学科技有限公司, 含量 >99%, 批号 20150701); **1** 注射液 (自制, 称取卡巴他赛原料药 60 mg, 加入 Tween-80 1.5 ml 和 13% 乙醇 5.7 ml 溶解, 再稀释至 2 mg/ml, 批号 20160721); 多西他赛 (内标, 上海新亚药业有限公司, 含量 99.0%, 批号 20160916); 氢化大豆磷脂 (HSPC, 批号 525600-2150562-01) 和二硬脂酰磷脂酰甘油 (DSPG, 批号 560400-2150367-01) (上海东尚生物科技有限公司); 胆固醇 (上海艾韦特医药科技有限公司, 批号 B41239); 葡聚糖凝胶 Sephadex G-50 (美国 GE 公司); 乙腈、甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

SD 大鼠 [雄性, (250±10) g, 中国科学院上海药物研究所动物中心, 合格证编号: SCXK(沪)2013-0018]。

2 方法与结果

2.1 处方及工艺

称取 **1** 60 mg、HSPC 1 200 mg、胆固醇 120 mg 和 DSPG 120 mg, 用氯仿: 甲醇 (2 : 1) 40 ml 超声溶解完全, 65 °C 条件下减压旋蒸至完全除去有机溶剂。用水 30 ml 水化, 高速剪切分散后形成脂质体初乳, 再经微射流高压均质机以 137.9 MPa 均

收稿日期: 2016-11-22

作者简介: 张丽 (1992—), 女, 硕士研究生, 专业方向: 药物制剂。

E-mail: zhangli0919@163.com

通信联系人: 陈伶俐 (1978—), 女, 高级工程师, 从事创新药物与制剂研发。

Tel: 021-20231000×1521

E-mail: linglichen1872@hotmail.com

质 8 次，得到澄清透明的脂质体溶液。

2.2 脂质体的形态及粒度分布

2.2.1 脂质体的形态

取 **1** 脂质体适量，浓度稀释成 0.075 mg/ml，用 1% 磷钨酸溶液负染后，滴在特制的铜网上，在透射电镜下观察形态。可见脂质体呈球形或近球形分布，形状和大小均一（图 1）。

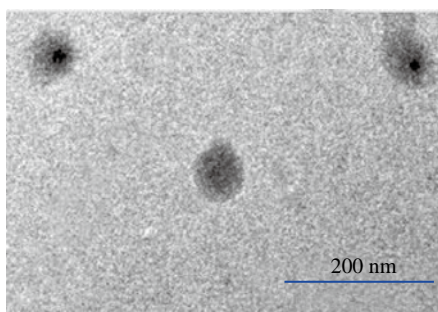


图 1 **1** 脂质体的透射电镜照片 (×20 000)

Fig.1 TEM Image of **1** Liposomes (×20 000)

2.2.2 脂质体的粒度分布及 ζ 电位测定

取上述 **1** 脂质体适量，用水稀释到适当的浓度，测量粒径和 ζ 电位。结果表明，脂质体的平均粒径为 $(68.04 \pm 1.73) \text{ nm}$ ($n=3$)；多分散系数 (PDI) 为 0.213 ± 0.015 ($n=3$)，提示粒度分布较均一；平均 ζ 电位为 $(-57.7 \pm 1.2) \text{ mV}$ ($n=3$) (见图 2)。

2.3 脂质体的包封率测定^[4]

2.3.1 色谱条件

色谱柱 Waters XBridge C₁₈ 柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm)；流动相 60% 乙腈；检测波长 230 nm；柱温 30 °C；流速 1.0 ml/min；进样量 10 μl。

2.3.2 洗脱曲线的绘制

取充分溶胀（冷水中浸泡 12 h 以上）的葡聚糖凝胶 Sephadex G-50，装填于色谱柱内，制备凝胶柱 (32 cm×1 cm)，共制备 2 根。一根以水为洗脱液，精密量取“2.1”项下所得脂质体样品 0.5 ml 上样，用 EP 管收集洗脱液，每管 2 ml。带有乳光的洗脱液用 10 倍体积的甲醇破乳后按“2.3.1”项下条件测定峰面积；澄清透明的溶液直接进样测定。另配制 2 mg/ml 的 **1** 无水乙醇溶液，精密量取 0.5 ml 上样，以 40% 乙醇为洗脱液，用 EP 管收集洗脱液，每管 2 ml；收集的洗脱液直接按“2.3.1”项下条件测定峰面积。结果表明，脂质体集中在 5 ~ 11 管，药物集中在 13 ~ 20 管。脂质体和游离药物能完全分开（图 3）。

2.3.3 包封率的测定

按“2.3.2”项下方法制备葡聚糖凝胶柱，以水为洗脱液，精密量取脂质体 0.5 ml 上样，用 EP 管收集洗脱液 5 ~ 11 管，置 50 ml 量瓶中，加甲醇超声破乳后定容，按“2.3.1”项下条件测定，得脂质体中被包封药物的含量。另精密量取脂质体 0.5 ml，置 50 ml 量瓶中，同法操作，得脂质体中药物的总量，计算得 **1** 脂质体的平均包封率为 $(86.7 \pm 1.5) \%$ ($n=3$)。

2.4 体外释放试验

分别取脂质体样品和注射液（均约 2 mg/ml）各 1 ml，置透析袋中，两端扎紧，置 0.05% Tween-80 水溶液 13 ml 中。在摇床中 (37 °C, 100 r/min) 振摇，分别于 0.5、1、2、3、4、6、8、10、12、24、48、72 和 96 h 取释放液 0.5 ml，同时补充同温等量的释

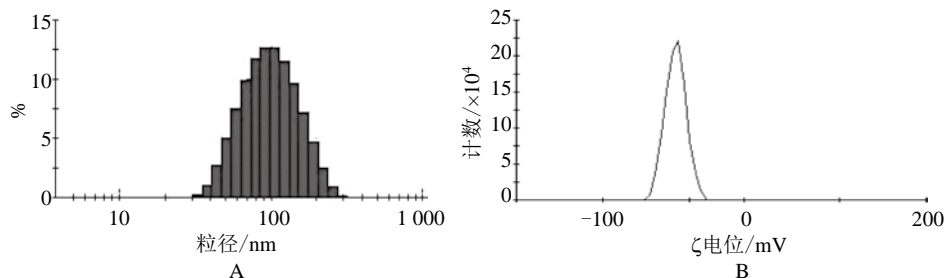


图 2 **1** 脂质体的粒度分布 (A) 及 ζ 电位分布 (B) 图

Fig.2 Particle Size Distribution (A) and ζ Potential Distribution (B) of **1** Liposomes

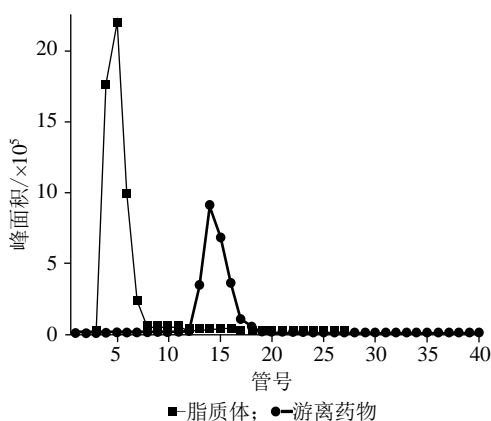


图3 1 脂质体的洗脱曲线

Fig.3 Elution Curve of 1 Liposomes

放介质^[5]。按“2.3.1”项下条件测定，计算累积释放率(Q)。结果表明，1注射液在20 h内的累积释放率已达到80%，而1脂质体在48 h的累积释放率为74% (图4)。

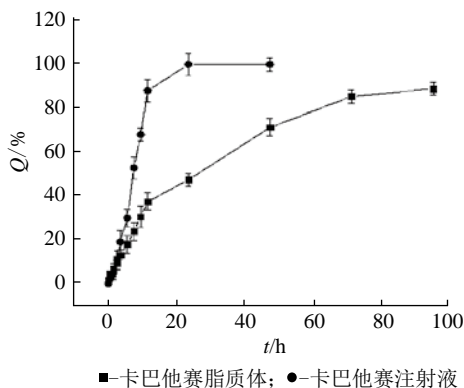


图4 1 注射液和脂质体的累积释放曲线 (n=3)

Fig.4 Release Curves of 1 Injection and 1 Liposomes (n=3)

2.5 脂质体的药动学参数测定

2.5.1 给药方案

取健康雄性SD大鼠8只，随机分成2组，试验期间自由饮水和进食。以5 mg/kg的剂量分别静脉注射给予1脂质体和1注射液(浓度均为2 mg/ml)。分别于给药后于0.08、0.17、0.25、0.5、1、2、4、6、8、10、12、24和36 h经眼眶取血0.3 ml，置有肝素钠的EP管中，离心(8 000×g)10 min，取上清液100 μl，-80 °C 贮存待用^[6]。

2.5.2 样品预处理

向内标溶液(多西他赛, 50.0 ng/ml)25 μl中依次加入血浆样品25 μl、甲醇25 μl、水100 μl和甲基叔丁基醚800 μl，涡旋5 min，4 °C离心(10 000×g)5 min。取上清液800 μl，氮气流条件下吹干后用50%乙腈150 μl复溶，进行LC-MS/MS分析。

2.5.3 色谱质谱条件

色谱条件：色谱柱 Phenomenex Eclipse Plus C₁₈柱(2.1 mm×50 mm, 1.8 μm)；流动相 0.3%甲酸水溶液：乙腈(45 : 55)；柱温 40 °C；自动进样器温度 4 °C；流速 0.3 ml/min；进样量 5 μl。

质谱条件：离子源 电喷雾电离源(ESI源)，正离子检测；源喷射电压 4 000 V；离子源温度 170 °C；离子源气体1(N₂) 413.7 kPa；离子源气体2(N₂) 482.6 kPa；气帘气体(N₂) 241.3 kPa；扫描方式 多反应监测(MRM)；扫描时间 80 ms；碰撞气压力 62.1 kPa。去簇电压、碰撞能量及用于定量分析的离子反应见表1。

表1 去簇电压、碰撞能量及用于定量分析的离子反应
Tab.1 Decluster Voltage, Collision Energy and Ion Reactions for Quantitative Analysis

分析物	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	去簇电压/V	碰撞能量/V
1	836.0	555.2	80	12
多西他赛(内标)	808.2	527.2	80	13

2.5.4 数据处理

大鼠血浆中的药物浓度-时间曲线见图5。采用WinNonlin 5.3软件(美国Pharsight公司)计算大鼠体内的药代动力学参数。主要药动学参数见表2。结果显示，1注射液和1脂质体的AUC_{0-∞}为(696.89±0.16)和(4 210.07±0.19) ng·ml⁻¹·h，1脂质体的AUC_{0-∞}约为注射液的6倍。

表2 主要药动学参数 (x̄±s, n=4)
Tab.2 Main Pharmacokinetic Parameters (x̄±s, n=4)

参数	1脂质体	1注射液
AUC _{0-∞} /ng·ml ⁻¹ ·h	3 637.89±0.26 ¹⁾	646.23±0.12
AUC _{0-∞} /ng·ml ⁻¹ ·h	4 210.07±0.19 ¹⁾	696.89±0.16
MRT _{0-∞} /h	4.94±0.32	3.71±0.28
t _{1/2} /h	7.28±0.40	5.85±0.32

注：¹⁾ 与注射液组相比, P<0.05

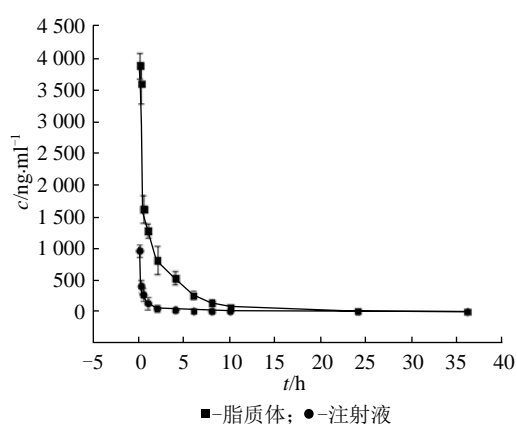


图5 1注射液和脂质体的药-时曲线 ($n=4$)

Fig.5 Drug Concentration-time Curves of 1 Injection and 1 Liposomes ($n=4$)

3 讨论

考虑到**1**的理化性质,采用薄膜分散法-高压均质法制备其脂质体,该法操作简单,所得脂质体粒径小且均匀,包封率高,药物浓度可达2 mg/ml。因中性脂质体存放过程中会聚集沉淀,在处方中加入DSPG,使脂质体荷负电,增加了脂质体稳定性。

包封率的测定方法有超滤法、葡聚糖凝胶法、柱色谱法等。本试验采用葡聚糖凝胶柱色谱法,利用相对分子质量的差异来分离脂质体和游离药物,避免了其他方法分离效果差,测量不准确的问题。体外释放试验采用透析法测定,与**1**注射液相比,**1**脂质体释放较为缓慢,可能因为**1**脂质体结构较为稳定,可减缓**1**从膜内向膜外释放,表明脂质体

有延缓药物释放的作用。

虽然**1**注射液中含有的Tween-80可与**1**形成胶束,但经血液无限稀释后,胶束结构可能部分被破坏;而药物被脂质体包裹后,稍延长了药物在体内的滞留,使得其在血液中的清除较注射液慢且保持较高的血药浓度,大大提高了脂质体的AUC,造成了二者在大鼠体内药动学特征的差异。

参考文献:

- [1] 周爱萍,房虹,李长岭,等.去势抗拒前列腺癌治疗新药卡巴他赛[J].中国新药杂志,2013,22(19):373—374.
- [2] 徐长庚,张杰.去势抵抗性前列腺癌治疗新药卡巴他赛[J].世界临床药物,2014,35(2):80—83.
- [3] Castellano D, Antón Aparicio LM, Esteban E, *et al.* Cabazitaxel for metastatic castration-resistant prostate cancer: safety data from the Spanish expanded access program [J]. *Expert Opin Drug Saf*, 2014, 13(9): 1165—1173.
- [4] 付盟,龚伟,张慧,等.多西他赛热敏脂质体的制备及含量和包封率的测定[J].军事医学,2012,36(3):196—198.
- [5] 张涛,孙莉,封华,等.盐酸多柔比星脂质体体外释放度测定[J].中国药业,2008,17(10):48—49.
- [6] de Bruijn P1, de Graan AJ, Nieuweboer A, *et al.* Quantification of cabazitaxel in human plasma by liquid chromatography/triple-quadrupole mass spectrometry: a practical solution for non-specific binding [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2012, 59(3): 117—122.

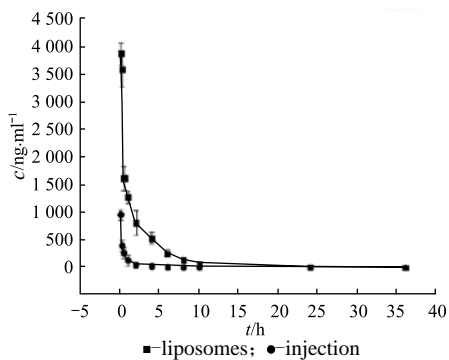
Preparation and Pharmacokinetics in Rats of Cabazitaxel Liposomes by Film Dispersion Method

ZHANG Li¹, LI Yaping^{1,2}, CHEN Lingli^{2*}

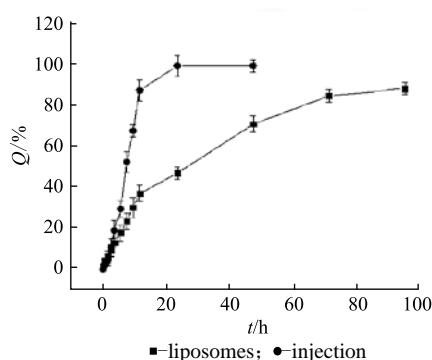
(1. School of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang 212013; 2. Center for Formulations System, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203)

ABSTRACT: Liposomes can be aggregated through the enhanced permeability and retention (EPR) effect in the target site, enhance the accumulation of drugs, so as to improve efficacy and reduce the side effects. Hydroxylated soybean phosphatidylcholine (HSPC), cholesterol and distearoyl phosphatidylglycerol (DSPG) were used as raw materials to prepare the liposomes by film dispersion-high pressure homogenization method. The morphology of the liposomes was observed by transmission electron microscopy. The particle size and distribution were determined by laser scattering method. The encapsulation efficiency was determined by dextran gel column chromatography. The *in vitro* release behavior of liposomes was determined by dialysis method. The results showed that the average particle size, polydispersion index, ζ potential and entrapment efficiency of the liposomes were (68.04 ± 1.73) nm, 0.213 ± 0.015 , (-57.7 ± 1.2) mV and $(86.7 \pm 1.5)\%$, respectively. The obtained negatively charged liposomes were able to avoid aggregation. In 0.05% Tween-80 solution, the cumulative amount at 48 h of cabazitaxel liposomes was 74%, while for its injection was 80% at 20 h. It demonstrated that the release rate of cabazitaxel liposomes was slower than that of its injection. Furthermore, the pharmacokinetic behaviors of the above two preparations were compared with male SD rats as the animal models. The results showed that the $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ values for cabazitaxel injection group and cabazitaxel liposome group were (696.89 ± 0.16) and $(4\ 210.07 \pm 0.19)$ ng·ml⁻¹·h, and $t_{1/2}$ were (5.85 ± 0.32) and (7.28 ± 0.40) h, suggesting that liposomes had a role in delaying drug release.

Key Words: cabazitaxel; liposome; film dispersion-high pressure homogenization method; *in vitro* release; pharmacokinetics



Comparison of Cabazitaxel Injection and Liposomes *in vivo*



Comparison of Cabazitaxel Injection and Liposomes *in vitro*