

· 论 著 ·

疏水改性白及多糖自组装载紫杉醇纳米粒子在大鼠体内药动学研究

张琦¹, 赵文萃², 刘洋³, 张公良³, 成念⁴, 侯吉华¹ (1. 江西中医药大学, 江西 南昌 330004; 2. 解放军 208 医院, 吉林 长春 130062; 3. 长春干休所, 吉林 长春 130052; 4. 延边大学, 吉林 延吉 133000)

[摘要] **目的** 建立一种简便、灵敏的测定大鼠尾静脉和灌胃给予胆甾醇琥珀酰基白及多糖载紫杉醇纳米粒子后的血浆药物浓度的 HPLC 方法, 并评价其药动学特征。**方法** 以酮康唑为内标, 采用 AgilentTC-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以甲醇-乙腈-水 (45:20:35) 为流动相, 流速为 1.0 ml/min, 采用统计矩法计算药动学参数, 评价药动学特征。**结果** 紫杉醇在大鼠血中浓度在 0.5~20 μg/ml 范围内线性关系良好 ($r=0.9997$), 准确度和精密度均符合生物样品分析要求。尾静脉注射 3 种不同取代度的自制纳米粒和紫杉醇注射液后的 $t_{1/2}$ 分别为 3.86、3.76、3.35 和 2.62 h; 灌胃给予自制紫杉醇纳米粒溶液和紫杉醇混悬液后的 $t_{1/2}$ 分别为 5.28 和 3.72 h。**结论** 该测定方法可用于紫杉醇纳米粒子在大鼠体内的药动学研究, 且载紫杉醇自组装纳米粒子在体内的滞留时间比紫杉醇注射液和紫杉醇混悬液有明显延长。

[关键词] 白及多糖; 紫杉醇; 纳米粒子; 药动学

[中图分类号] R943

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2017)06-0504-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.06.006

Pharmacokinetics of paclitaxel loaded nanoparticles made with hydrophobically modified *Rhizoma Bletillae* polysaccharide in rats

ZHANG Qi¹, ZHAO Wencui², LIU Yang³, ZHANG Gongliang³, CHENG Nian⁴, HOU Jihua¹ (1. Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China; 2. No. 208 Hospital of PLA, Changchun 130062, China; 3. Changchun Cadres' s Sanatorium, Changchun 130052, China; 4. Yanbian University, Yanji 133000, China)

[Abstract] **Objective** To establish a simple and sensitive method for the determination of plasma drug concentration in rats after intragastrical and intravenous administration of paclitaxel loaded nanoparticles and to evaluate its pharmacokinetic characteristics. **Methods** AgilentTC-C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used for HPLC at the flow rate 1 ml/min with ketoconazole as internal standard and methanol acetonitrile water (45:20:35) as the mobile phase. The statistical moment method was applied to calculate the pharmacokinetic parameters and to evaluate pharmacokinetic characteristics. **Results** There was a good liner relationship ($r=0.9997$) when rat blood concentration of Paclitaxel ranged from 0.5 to 20 μg/ml. The accuracy and precision were in line with the requirements of biological sample analysis. The $t_{1/2}$ were 3.86, 3.76, 3.35 and 2.62 h after intravenous injection of three lab-made paclitaxel nanoparticles and paclitaxel solution *via* rat tail vein. The $t_{1/2}$ were 5.28 and 3.72 h respectively after intragastrical administration of lab-made paclitaxel nanoparticles and paclitaxel suspension. **Conclusion** This method can be used for the pharmacokinetic study of paclitaxel nanoparticles in rats. The paclitaxel loaded nanoparticles exhibited significantly longer *in vivo* retention time than paclitaxel injection and paclitaxel suspension.

[Key words] *Rhizoma Bletillae* polysaccharide; paclitaxel; nanoparticles; pharmacokinetics

传统中药白及富含白及多糖, 是天然的药物载体, 但其水溶性过强, 结构上缺少疏水基团, 故易于溶解, 不利于控释和包载难溶性药物。但通过胆甾

醇琥珀酰基修饰, 可形成两亲性分子, 进而经自组装形成载药纳米粒子。在疏水改性合成反应时, 因胆甾醇琥珀酰基用量不同, 可产生不同取代度的两亲性分子, 而取代度可影响纳米粒子的载药量。本实验用 3 种不同取代度的载紫杉醇纳米粒子在大鼠体内进行药动学研究。

[基金项目] 国家自然科学基金 (81173559); 吉林省卫生计生委基金 (2015ZC040)

[作者简介] 张琦, 博士, 副主任药师, 研究方向: 药剂学, Email: zqi8229@126.com

[通讯作者] 侯吉华, 学士, 实验师, 研究方向: 中西医结合、神经生物学, Email: 794706902@qq.com

1 仪器与材料

1.1 实验仪器 LC-10ATVP 高效液相色谱仪 (日本岛津制作所), 包括泵和 SPD-10A 紫外检测器;

N-2000 双通道色谱工作站。

1.2 药品与试剂 自制取代度分别为 6.55% (载药量 10.28%)、7.30% (载药量 10.68%)、8.91% (载药量 8.51%) 的载紫杉醇纳米粒,制备方法如下:采用透析法制备自组装载药纳米粒,精密称取紫杉醇原料药 3 mg,溶于 1 ml 无水乙醇中,在磁力搅拌时,将其加入精密称取不同取代度胆甾醇琥珀酰基白及多糖(CHSB)的二甲基亚砜(DMSO)溶液中(其中 CHSB 10 mg, DMSO 5 ml),充分混匀后,加水 30 ml,继续搅拌 24 h,将溶液转移至透析袋(M_w10 000)放置于 2 L 大烧杯中,用蒸馏水透析 48 h,在此期间前 12 h 每隔 6 h 换一次水,后 36 h 每隔 9 h 换一次水,将 DMSO 溶剂彻底透析干净。透析完毕后,取出透析袋内溶液,在冰浴条件下用探头超声仪小功率超声 2 min,重复 2 次,冷冻干燥后得到不同取代度的 CHSB 自组装载药纳米粒。紫杉醇原料药(江苏红豆杉药业有限公司,批号:20140914),紫杉醇注射液(江苏奥赛康医药有限公司,规格为 5 ml:30 mg,批号:20130701),酮康唑(中国食品药品检定研究院,批号:20150107),甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为市售分析纯。

紫杉醇混悬液(自制):取 5 mg 原料药以适量乙醇完全溶解即可,再加入 300 mg 吐温-80,混匀后于 75 °C 水浴上缓慢滴加 3 ml 蒸馏水,混合均匀。混悬液组成成分为紫杉醇、乙醇、吐温-80 和蒸馏水,无影响药物吸收的成分。

1.3 实验动物 Wistar 健康大鼠 24 只,雌雄各半,体重(250±20) g,购自吉林大学动物实验中心,动物合格证号:SCXK(吉)2015-0001。

2 方法

2.1 色谱条件 Agilent TC-C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-乙腈-水(45:20:35);流速:1.0 ml/min;柱温:30 °C;检测波长:227 nm。

2.2 血浆样品处理 取大鼠全血 0.25 ml, 10 000 r/min 离心 5 min,吸取血浆 100 μl,加入内标酮康唑溶液(25 μg/ml)50 μl 混合 30 s 后,用 1 ml

乙醚涡旋提取 5 min, 10 000 r/min 离心 10 min,取上层萃取液,连续萃取 3 次,合并萃取液,于 37 °C 水浴上挥干,残留物加入 100 μl 甲醇溶解后,进样 20 μl,进行 HPLC 测定。

2.3 专属性考察 取空白大鼠血浆 100 μl,按“2.2”项下操作,考察空白血浆对药物及内标有无干扰。

2.4 溶液的配制

2.4.1 紫杉醇标准溶液 精密称取紫杉醇对照品 10 mg 置于 50 ml 量瓶中,以甲醇配成质量浓度为 200 μg/ml 的紫杉醇标准溶液,并以甲醇逐级稀释配成一系列浓度的紫杉醇标准溶液,4 °C 冰箱保存。

2.4.2 血浆样品 精密吸取不同浓度的对照品溶液 50 μl 加入 4 ml 的离心管中,挥干后,加入空白血浆 100 μl 和内标溶液 50 μl,分别制成含紫杉醇质量浓度为 0.5、1、2.5、5、10、20 μg/L 的血浆样品,按“2.2”项下方法处理。

2.5 精密度与方法回收率实验 制备 1、5、20 μg/L 的血浆样品各 5 份,按“2.2”项下处理,考察低、中、高 3 个浓度的日内及连续 5 d 的日间精密度和方法回收率。

2.6 绝对回收率 制备 1、5、20 μg/L 的血浆样品各 5 份,按“2.2”项下方法处理后测得紫杉醇与内标峰面积之比 R,另取相同浓度的紫杉醇溶液直接进样测定,得峰面积 A₂,计算绝对回收率。

3 结果

3.1 方法专属性试验 按上述方法处理含药血浆和空白血浆样品后,进样得到 HPLC 图,紫杉醇和内标峰的保留时间分别为 20.28 和 32.12 min,分离度较好,大鼠血浆中未见对紫杉醇和内标峰的干扰峰,色谱图见图 1。

3.2 线性关系和检测限考察 血浆中紫杉醇在 0.5~20 μg/ml 浓度范围内呈良好的线性关系,标准曲线方程为 $C=24.75R+0.097$, $r=0.9997$, $n=6$,式中 C 为血药浓度, R 为紫杉醇与内标物的峰面积之比。

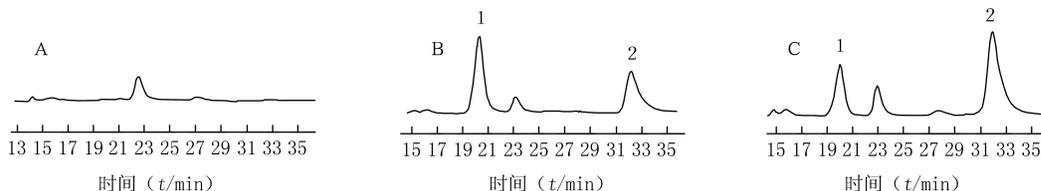


图 1 紫杉醇在血浆中的 HPLC 图

A. 空白血浆; B. 空白血浆+紫杉醇+内标; C. 紫杉醇+内标; 1. 紫杉醇; 2. 内标

以信噪比(SN)≥3 计算,本色谱条件下紫杉醇的最低检测质量浓度为 50 ng/ml。

3.3 精密度及方法回收率考察 低、中、高 3 个浓度的日内和连续 5 d 的日间精密度结果如表 1 所示,日内和日间误差均小于 15%,符合生物样品测定要求。

表 1 紫杉醇在大鼠血浆中的精密度和绝对回收率(n=6,%)

质量浓度 ($\rho_B/\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	日内		日间		提取回收率	RSD
	测得量	RSD	测得量	RSD		
1	98.4	4.36	99.1	5.02	80.1	8.2
5	99.3	3.4	97.7	1.08	78.3	6.51
20	102.7	1.02	101.8	3.08	83.1	4.52

3.4 绝对回收率 低、中、高 3 个浓度下大鼠血浆中紫杉醇的绝对回收率见表 1,均大于 75%,符合生物样品测定要求。

3.5 尾静脉注射药动学研究 取 Wistar 大鼠 24 只,随机分为 4 组,其中 1 组给予市售紫杉醇注射液(用生理盐水稀释成为含紫杉醇 1.88% 的溶液),剩下 3 组分别给予取代度为 6.55% (载药量 10.28%)、7.30% (载药量 10.68%)、8.91% (载药

量 8.51%) 的载紫杉醇纳米粒(用生理盐水配成含紫杉醇 1.88% 的溶液)。分别以 7.5 mg/kg 剂量经大鼠尾静脉缓慢推注,给药后于 0.167、0.5、1、2、3、4、5、6、7、9、12、24 h 从眼底静脉丛取血 0.25 ml,10 000 r/min,离心 10 min,分离血浆。取 0.1 ml 血浆按照“2.2”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。分别于尾静脉注射紫杉醇注射液和纳米粒测得血药浓度-时间曲线,见图 2。将体内药物浓度数据用统计矩法进行处理,得到非隔室模型参数见表 2。

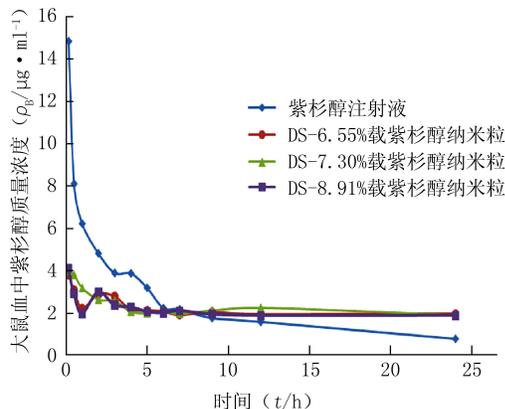


图 2 紫杉醇纳米粒和注射液给药后的血药浓度-时间曲线

表 2 大鼠尾静脉给予紫杉醇及其纳米粒注射液后的药动学参数($\bar{x}\pm s, n=6$)

参数	紫杉醇注射液	DL-6.55% 纳米粒	DL-7.30% 纳米粒	DL-8.91% 纳米粒
AUC _{0-t} [mg/(L·h)]	37.43±3.42	25.31±1.56**	24.12±1.14**	34.72±1.54**
AUC _{0-∞} [mg/(L·h)]	39.52±3.08	29.76±2.63**	27.84±1.57**	27.95±2.63**
t _{1/2} (t/h)	2.62±0.65	3.86±0.36*	3.76±0.48*	3.35±1.24
V(L/kg)	0.72±0.19	1.39±0.04**	1.46±0.15**	1.28±0.44*
c _{max} ($\rho_B/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	14.17±0.84	3.73±0.15**	3.91±0.49**	4.14±0.56**
MRT _{0-t} (t/h)	3.61±0.03	4.91±0.07**	4.46±0.12**	4.68±0.10**
MRT _{0-∞} (t/h)	4.28±0.41	6.78±0.42**	6.20±0.51**	6.13±0.83**

* P<0.05, ** P<0.01,与紫杉醇注射液组比较

由药动学参数可知,3 种不同取代度的自制纳米粒和紫杉醇注射液的 t_{1/2} 分别为 3.86、3.76、3.35 和 2.62 h,纳米粒的 t_{1/2} 是注射液的 1.28 倍以上,体内滞留时间是注射液的 1.24 倍以上(P<0.05)。由此可知,在同样剂量条件下,纳米粒可使药物在体内较长时间保持较高浓度,可在一定程度上延长体内停留时间,更有利于维持一定浓度的抗肿瘤药物与肿瘤细胞的接触时间,提示其可能产生更好的临床效果。

3.6 大鼠灌胃药动学研究 取 Wistar 大鼠 12 只,雌雄各半,随机分为两组,一组给予自制紫杉醇混悬

液,另一组给予以生理盐水溶解的取代度 DS-7.30% (载药量 10.13%) 的载紫杉醇纳米粒溶液,分别以 25 mg/kg 剂量灌胃,给药后于 0.25、0.5、1、2、3、4、5、6、7、9、12、24 h 眼底静脉丛取血 0.25 ml,10 000 r/min 离心 10 min 分离血浆,取 0.1 ml 血浆按照“2.2”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。大鼠分别灌胃紫杉醇混悬液和载药纳米粒后测得的血药浓度-时间曲线,见图 3。将体内药物浓度数据用统计矩法进行处理,得到非隔室模型参数,见表 3。

紫杉醇混悬液与纳米粒溶液的生物利用度比

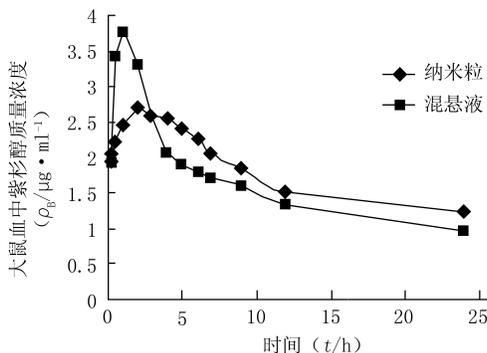


图3 大鼠灌胃紫杉醇纳米粒和混悬液后的血药浓度-时间曲线

表3 大鼠灌胃紫杉醇混悬液和DL-7.30%纳米粒后的主要药动学参数($\bar{x} \pm s, n=6$)

参数	混悬液	DL-7.30% 纳米粒
AUC ₀₋₁ [mg/(L·h)]	23.89±1.12	23.21±0.59
AUC _{0-∞} [mg/(L·h)]	27.81±1.27	30.98±1.27
t _{1/2} (t/h)	3.72±0.35	5.28±1.51*
V (L/kg)	4.83±0.57	6.05±0.96*
c _{max} (μg/ml)	3.78±0.34	2.64±0.70**
MRT _{0-t} (t/h)	4.77±0.13	5.09±0.46**
MRT _{0-∞} (t/h)	6.55±0.20	6.78±0.42*

* P<0.05, ** P<0.01, 与紫杉醇混悬液组比较

较,后者虽提高不明显,但 t_{1/2} 由 3.72 h 延长至 5.28 h,纳米粒的峰浓度仅为混悬液的 70% (P<0.05)。说明载药纳米粒明显延长了紫杉醇在大鼠体内的存在过程,具有较好的缓释作用,可以提高生物利用度。

4 结论

血浆中内源性物质均不干扰载紫杉醇纳米粒子的色谱峰和内标色谱峰;紫杉醇血药浓度在 0.5~20 μg/ml 浓度范围内呈良好的线性关系,线性相关系数 r=0.9997;日间和日内精密度试验 RSD 均小于 15%,回收率良好,说明此方法可靠。

本试验的前期研究中,从传统中药白及中提取白及多糖^[1],经多糖疏水改性^[2],在胆甾醇琥珀酰基白及多糖载紫杉醇纳米粒子的制备、性质表征和体内抗肿瘤试验^[3]的基础上,进一步研究载紫杉醇纳米粒子在大鼠体内的药动学过程。研究结果显示,无论是尾静脉注射还是灌胃给药,载紫杉醇纳米

粒子与紫杉醇注射液和自制紫杉醇混悬液比较,药物在体内的 t_{1/2} 均有明显的延长,表明载紫杉醇纳米粒子具有一定的缓释作用,可提高生物利用度。紫杉醇属难溶性药物,传统给药方式是用专门溶媒制成静脉注射剂静脉给药。本试验采用疏水改性的白及多糖自组装形成载紫杉醇纳米粒子,制备成溶剂,改为口服给药,能取得更好的药动学效果。这为难溶性药物制备成水溶性制剂开辟了新的途径。

【参考文献】

- [1] Kobayashi M, Sakamoto J, Namikawa T, et al. Pharmacokinetic study of paclitaxel in malignant ascites from advanced gastric cancer patients [J]. World J Gastroenterol, 2006, 12 (9):1412-1415.
- [2] 黄鑫,汤维维,江振洲,等. LC-MS/MS 法测定 Beagle 犬血浆中紫杉醇及其药代动力学研究[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(11):1868-1872.
- [3] 王竞,霍美蓉,周建平,等. 基于透明质酸-紫杉醇前药的载药胶束的制备及大鼠体内药代动力学[J]. 中国药科大学学报, 2013, 44(6):520-525.
- [4] 张澍,任宇鹏,尚德为,等. 紫杉醇种属间药动学相关性的荟萃分析[J]. 中国药学杂志, 2013, 48(7):546-552.
- [5] 周宏萍,刘耘. 紫杉醇治疗妇科恶性肿瘤的药代动力学与临床效果的关系研究[J]. 中国生化药物杂志, 2014, 34(7):84-86.
- [6] 武梦娇,王峰,宋丽杰,等. 紫杉醇脂质体或常规紫杉醇联合 S-1 治疗进展期胃癌:药代动力学、疗效及安全性的比较[J]. 肿瘤, 2016, 36(3):303-309.
- [7] 刘加涛,孙国平,陈小欢,等. 紫杉醇用于非小细胞肺癌的药代动力学与疗效、毒性反应关系研究[J]. 安徽医药, 2012, 16(9):1253-1256.
- [8] 宋依凝. 紫杉醇系列偶合物的 ADME 评筛及药代动力学研究[D]. 北京:中国人民解放军军事医学科学院, 2011.
- [9] 甘平平,王杨,钟美佐,等. Pretreatment of Shaoyao-Gancao-Tang alters pharmacokinetics of intravenous paclitaxel in rats [C]// 第十二次全国中西医结合实验医学专业委员会暨第七次湖南省中西医结合神经科专业委员会学术年会论文集. 2015:2.
- [10] Tekade RK. Extraction and RP-HPLC determination of taxol in rat plasma, cell culture and quality control samples [J]. J Biomed Res, 2013, 27(5):394-405.
- [11] Chen YH, Lu YM, Yang Y, et al. Determination of ginsenoside compound K in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry of lithium adducts [J]. Acta Pharm Sin B, 2015, 5(5):461-466.

【收稿日期】 2017-05-10 【修回日期】 2017-08-28

【本文编辑】 李睿旻