

- [13] KATAOKA K, MATSUMOTO T, YOKOYAMA M, *et al.* Doxorubicin-loaded poly (ethylene glycol) poly (L-benzyl-L-aspartate) copolymer micelles: their pharmaceutical characteristics and biological significance[J]. *J Controlled Release*, 2000, 64 (1-3): 143-153.
- [14] NATALYA R. Physical stimuli-responsive polymeric micelles for anti-cancer drug delivery[J]. *Prog Polym Sci*, 2007, 32 (8-9): 962-990.
- [15] KWON G S, KATAOKA K. Block copolymer micelles as long-circulating drug vehicles[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 1995, 16 (2-3): 295-309.
- [16] SHAO Y, LU L J, RONG L, *et al.* Biocompatibility of poly (L-lactide) /poly (L-lactide) surface grafted hydroxyapatite composite[J]. *J Jilin Univ (Med Ed)* (吉林大学学报:医学版), 2007, 33 (1): 57-60.
- [17] FENG M, PAN S R, WU W R. Haemolytic evaluation of amphotericin B loaded PEG-b-PBLA nanospheres[J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2004, 35 (3): 263-266.
- [18] CAO Y B, JIANG Y Y, WANG N, *et al.* *In vitro* antifungal activity study of terbinafine, a new triazole antifungal agent, by broth microdilution testing[J]. *Chin J Antibiotics* (中国抗生素杂志), 2000, 25 (3): 183-187.

(收稿日期: 2009-09-27)

紫杉醇囊泡的研制及大鼠体内的药动学特征

朱铨, 扶艳, 苏美琴, 阮航, 张真, 梁信芳 (厦门大学医学院药理学系, 福建 厦门 361005)

摘要:目的 制备紫杉醇囊泡, 对其进行表征, 进一步研究其在大鼠体内的药动学特征及组织分布情况。方法 以司盘 (Span) 和胆固醇 (CH) 为主要膜材, 用薄膜分散法制备紫杉醇囊泡, 采用正交实验进行处方优化, 用透射电镜考察其形态和构造, 用激光粒度仪测定囊泡的粒径大小和电位, 按 7.5, 15, 30 mg · kg⁻¹ 3 个剂量大鼠颈静脉给药后检测一定时间点的血药浓度, 对照为 15 mg · kg⁻¹ 的紫杉醇注射液。结果 紫杉醇囊泡的平均粒径为 (157 ± 16) nm, 冻干后紫杉醇囊泡的平均粒径为 (189 ± 23) nm; 冻干后的紫杉醇囊泡在贮存 6 个月的时间内包封率没有明显变化, 粒径略有增大。紫杉醇囊泡相对于紫杉醇注射液体内半衰期显著延长, 生物利用度提高; 组织分布结果显示明显的肝脾靶向性。结论 成功研制了紫杉醇囊泡, 囊泡有望成为紫杉醇新的剂型。

关键词: 囊泡; 包封率; 紫杉醇; 药动学; 组织分布

中图分类号: R944 文献标识码: A 文章编号: 1001 - 2494 (2010) 05 - 0365 - 07

Preparation and Pharmacokinetics of Paclitaxel Niosomes

ZHU Xuan, FU Yan, SU Mei-qin, RUAN Hang, ZHANG Zhen, LIANG Xin-fang (Department of Pharmacy, Medical College of Xiamen University, Xiamen 361005, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To prepare and characterize the paclitaxel niosomes, and to study the pharmacokinetics and tissue distribution in rats. **METHODS** The paclitaxel niosomes were prepared with Span and cholesterol using thin-film hydration method. The vesicles were visualized by transmission electron microscopy and sized by laser particle analyzer on a Malvern Mastersizer. The prescription was optimized by using orthogonal design. The pharmacokinetic parameters of paclitaxel were determined in rats after intravenous paclitaxel niosomes (7.5, 15, 30 mg · kg⁻¹) and intravenous Taxol (15 mg · kg⁻¹) to rats. **RESULTS** The given niosomes were the suspension finely dispersed in aqueous solution. The mean size of the vesicles was 157 nm. After freeze-drying, the mean size of the vesicles was 189 nm. There was no significant change in encapsulation efficiency for six months. The niosomes significantly increased the biological half-life of paclitaxel after intravenous injection in rats. The tissue distribution showed high accumulation of the drug in liver and spleen tissues. **CONCLUSION** Paclitaxel niosomes may be considered as an effective anticancer drug delivery system for cancer chemotherapy.

KEY WORDS: niosomes; encapsulation efficiency; paclitaxel; pharmacokinetics; tissue distribution

紫杉醇 (paclitaxel, PTX) 是一种天然植物类抗肿瘤新药, 紫杉醇注射液于 1992 年 12 月获得 FDA

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目 (2008J0115); 福建省新世纪优秀人才计划资助

作者简介: 朱铨, 男, 副教授 研究方向: 新剂型与药动学 Tel: (0592) 2188681 Fax: (0592) 2188676 E-mail: zhuxuan@xmu.edu.cn

批准上市,商品名为 Taxol(泰素),现已在世界上 50 多个国家上市。紫杉醇脂质体也于 2003 年被批准上市,商品名为力朴素。紫杉醇是细胞抑制剂类抗肿瘤药物,可干扰癌细胞的微管蛋白合成从而发挥抗癌作用,它对正常细胞基本无影响。它对大多数实体瘤有强力抑制作用,尤其对晚期卵巢癌、乳腺癌、非小细胞肺癌和卡波西肉瘤的疗效确切、副作用较小,故上市以来销量一直很好。紫杉醇脂质体虽然避免了注射液中聚氧乙基代蓖麻油(cremophor EL)与无水乙醇复合溶媒带来的严重不良反应,但是脂质体本身稳定性不好以及构成膜材的磷脂价格昂贵导致产品的保质期较短以及价格偏贵^[1-3]。

非离子表面活性剂囊泡是在脂质体基础上发展起来的一种新型微粒给药系统。它是以无毒的非离子表面活性剂代替两性离子表面活性剂磷脂为主要膜材所构成的一种脂质双分子层微型囊泡,可将药物包封于该双分子层中制成单室或多室超微型载体给药系统。囊泡是由非离子形式的两亲性物质和胆固醇在亲水介质中自组装形成的具有闭合双分子层膜结构的封闭体系^[4]。利用非离子表面活性剂囊泡包裹药物可以减少药物在达到有效部位前被破坏、延长药物的半衰期、从而延长药物的作用时间以及降低毒副作用,改变药物在体内的分布,达到被动靶向作用等,在加入适当特殊辅料后也可以达到主动靶向的作用。与脂质体相比,非离子表面活性剂囊泡的载体材料不含磷脂,避免了磷脂的氧化降解,生产和贮存皆不需特殊条件,可使工艺简化、成本降低,是一种极有希望的新型药物载体^[5]。由于非离子表面活性剂毒性较小,具有生物相容性和可降解性,不解离,不发生氧化水解,易大量生产,且可根据用途设计其结构,因此近年来对其研究的人越来越多^[6]。

紫杉醇目前研究的制剂形式有脂质体、聚酯微粒、聚合物胶囊、环糊精包合物、微球、微乳及磁性囊泡等新型制剂或制剂前体形式^[7],本实验结合非离子表面活性剂囊泡的特点和紫杉醇的药理特性,研制一种新型的制剂形式——紫杉醇囊泡。本实验进行了紫杉醇囊泡的处方筛选,研究了紫杉醇囊泡在大鼠体内的药动学特征以及紫杉醇囊泡在大鼠体内的组织分布情况。

1 材料

1.1 药品与试剂

紫杉醇原料药(宁波市医药技术研究有限公司,批号:080315);紫杉醇对照品(Signa公司,批

号:080911);紫杉醇注射液(北京协和药厂,批号:090518);地西洋(中国药品生物制品检定所,批号:081213);胆固醇、司盘(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);异丙醇、甲醇为 HPLC 级;PBS 缓冲溶液(800 mL 去离子水中溶解 8.0 g NaCl、0.2 g KCl、1.44 g Na_2HPO_4 、0.42 g KH_2PO_4 ,用 NaOH 溶液调 pH 至 7.4,再加水定容至 1 000 mL);水为乐百氏纯净水;其他试剂均为分析纯。

1.2 实验仪器

透析袋(8 000 - 14 000,上海绿鸟科技发展有限公司);DF-101Z 集热式恒温加热磁力搅拌器(郑州长城科工贸有限公司);LC-20A 液相色谱仪(日本岛津);液相色谱-质谱联用仪(API 3200 Q TRAP);Scientz-D 超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司);透射电镜(JEM-200cx,日本 Joel 公司);多功能氮吹仪(TIL-DC,北京同泰联科技有限公司);冷冻离心机(TGL20M,长沙湘智离心机仪器有限公司);激光粒度分布仪(Nano ZS ZEN3500,英国 Malvern 公司);色谱柱:Hypersil ODS2(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm ,大连依利特)。

1.3 实验动物

SD 大鼠,雌雄各半,体重 200 ~ 250 g(上海实验动物中心)。

2 实验方法

2.1 紫杉醇囊泡的制备

采用薄膜水化-超声法制备囊泡,用氯仿-乙醇(4:1)^[8]配制非离子表面活性剂和胆固醇浓度均为 0.10 mol \cdot L⁻¹的溶液备用。称取适量紫杉醇药品置于 500 mL 圆底烧瓶中,按一定体积比量取非离子表面活性剂和胆固醇溶液共 15 mL 溶解药品,再在水浴下于旋转蒸发器中减压蒸发除去有机溶剂使在瓶壁形成薄膜,置真空干燥器内 24 h 以除去剩余的有机溶剂。加入 15 mL 水化介质^[7]旋转水化 10 min。在一定温度下超声一定时间即得包载有紫杉醇的囊泡。这样制得的囊泡粒径较大,还需经超声波细胞粉碎机粉碎数分钟才能最后得到粒径较小的载药囊泡^[9]。

2.2 制剂方法学考察

2.2.1 色谱条件 流动相为甲醇-水(70:30);色谱柱为 Hypersil ODS2(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm);流速为 1.0 mL \cdot min⁻¹;进样量 10 μL ;检测波长为 227 nm。

2.2.2 线性 精密称取紫杉醇对照品 10 mg,置 10

mL量瓶中,加入适量甲醇溶解后,用甲醇定容至刻度,制得 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 储备液。用甲醇稀释储备液,配成质量浓度分别为 $1, 5, 10, 20, 50, 100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的紫杉醇梯度溶液,进样 $10\text{ }\mu\text{L}$,记录峰面积,以峰面积 (Y)和样品浓度 (X)做线性回归(权重系数为 $1/X$),得标准曲线。

2.3 动物实验方法学

2.3.1 色谱条件 同“2.2.1”,进样量 $30\text{ }\mu\text{L}$ 。

2.3.2 质谱条件 离子源为电喷雾离子化电离源(ESI),干燥气流速: $10.0\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$,雾化气压力: 20 Pa ,干燥气温度: $350\text{ }^\circ\text{C}$,毛细管电压: $4\text{ }000\text{ V}$,碰撞电压: 150 eV ,正离子方式检测,紫杉醇选择性检测离子对为 $876.6/307.9\text{ [M+H]}^+$;地西洋的选择性检测离子对为 $285.9/194.0\text{ [M+H]}^+$ 。

2.3.3 血浆样品处理 精密吸取 $50\text{ }\mu\text{L}$ 内标溶液置 5 mL 具塞离心管中,氮气流下挥干,加入待测血浆 $100\text{ }\mu\text{L}$,混匀,加入 2 mL 乙酸乙酯漩涡混合 2 min , $4\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min ,吸取上层清液 1.5 mL 置另一离心管中,于 $40\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中氮气流下挥干残留物以 $100\text{ }\mu\text{L}$ 流动相溶解,进样 $30\text{ }\mu\text{L}$ 。

2.3.4 组织样本预处理 大鼠处死取血于肝素抗凝管内,再取其心、肝、脾、肺、肾、脑各脏器,用双蒸水冲净后以滤纸吸去水分,称取 1 g 各组织脏器(不足 1 g 的脏器全取,称取实际质量),按 $3\text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ 加入生理盐水, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 组织捣碎得组织匀浆液。分别取各组织脏器匀浆液 1 mL (血样本取全血 1 mL),加入 $10\text{ }\mu\text{L}$ 内标地西洋溶液 ($200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 后涡旋混匀 30 s ,加入 2 mL 乙酸乙酯漩涡混合 2 min , $4\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min ,取上层清液,加入 2 mL 乙酸乙酯于沉淀中重复提取 1 次,混合 2 次上清液于 $40\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴上氮气流吹干,残留物加入 $200\text{ }\mu\text{L}$ 硫酸锌溶液 (0.5 g 硫酸锌和 1 mL 乙二醇溶于 100 mL 甲醇溶液)溶解后进样 $50\text{ }\mu\text{L}$ 。

2.3.5 药动学线性 取 $100\text{ }\mu\text{L}$ 紫杉醇系列质量浓度 ($7.5, 15, 30, 75, 300, 750, 3\text{ }000, 7\text{ }500\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 $50\text{ }\mu\text{L}$ 地西洋内标标准溶液 ($2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 氮气流下挥干后分别加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 空白血浆涡旋,按“2.3.3”项下同法操作,进样,记录色谱图。以待测物质量浓度 (X) 为横坐标,待测物与内标物的峰面积比值 (Y) 为纵坐标,用加权最小二乘法进行回归计算,求得线性回归方程。

2.3.6 组织分布线性 分别取空白全血及心、肝、脾、肺、肾匀浆样品 1 mL ,精密加入不同含量的紫杉醇溶液和内标地西洋溶液 ($200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 各 $10\text{ }\mu\text{L}$,

按“2.3.5”项下方法进行处理,记录色谱峰与内标峰的峰面积 A_x 和 A_s ,峰面积之比 $Y = A_x/A_s$,对 X (μg) 进行线性回归,得到血浆及各组织样品的线性关系和回归方程。

2.4 包封率的测定^[10]

精密移取 $500\text{ }\mu\text{L}$ 紫杉醇囊泡于透析袋中,两端夹紧后放入装有 200 mL PBS缓冲液的烧杯中,室温条件下置于磁力搅拌器上搅拌,透析 12 h 后,取出透析袋,将袋内的液体完全转移至 10 mL 量瓶中,用甲醇-异丙醇 ($3:1$) 溶剂破囊并定容至刻度,测定被包封药物含量 w 。另取 $500\text{ }\mu\text{L}$ 紫杉醇囊泡直接破囊测定包封和未包封的药物总量 w_0 ,计算包封率 (EE, %)。

2.5 囊泡粒径及 电位测定

将新制备的囊泡混悬液和冻干后再水化的囊泡混悬液稀释至适当倍数,用激光粒度仪测定脂质体的粒径大小及分布和 电位。

2.6 囊泡形态观察

取一定量的紫杉醇囊泡溶液加水稀释后,再超声 5 min ,往 230 目的铜网上滴一滴囊泡溶液,放置 2 min ,用滤纸角吸去铜网上多余的溶液,再往铜网上滴一滴 2% 的醋酸双氧铀溶液染色 3 min ,去掉多余的溶液,将铜网在空气中干燥保存,将干燥的铜网置于透射电镜下观察囊泡的形态。

2.7 处方的优化

影响囊泡包封率的因素有表面活性剂类型,表面活性剂和胆固醇用量比,药物浓度,超声时间和温度等。在单因素考察预实验基础上,考察表面活性剂类型 (A)、表面活性剂与胆固醇物质的量之比 (B)、投药量 (C, mg)、超声时间 (D, min) 和超声温度 (E, $^\circ\text{C}$) 5 个主要因素对包封率的影响。每个因素取 4 水平,按均匀设计 $L_{16}(4^5)$ 表设计实验,考察因子和水平情况见表 1。以包封率为评价指标,安排及测定结果。

2.8 紫杉醇冻干囊泡的制备

将按最优处方所制得的囊泡混悬液用注射器转

表 1 正交设计的因素和水平

Tab. 1 Factors and levels in orthogonal design

Factor	Level			
	1	2	3	4
A	Span20	Span40	Span60	Span80
B	9 1	8 2	7 3	6 4
C/mg	10	15	20	30
D/min	20	30	40	50
E/	30	40	50	60

入小西林瓶中,加入一定量的蔗糖作为冻干保护剂,封灌氮气,-50℃预冻5h,-50℃抽真空10h,-50℃自由升温至室温并抽真空干燥24h,即得。将每份紫杉醇冻干囊泡(含紫杉醇约30mg)中加入10mL注射用水,在涡旋振荡器上振荡30s,即可得水化后的紫杉醇囊泡混悬液。

2.9 稳定性实验

将冻干后的紫杉醇囊泡贮存在25℃6个月,分别于第1,2,3,6个月的时候取一定量的样品出来检测包封率和囊泡的粒径。

2.10 药动学实验

取SD大鼠20只,随机分成4组,其中1,2,3组分别按7.5,15,30mg·kg⁻¹低、中、高3个剂量给予自制紫杉醇囊泡,第4组以15mg·kg⁻¹给予市售紫杉醇注射液,大鼠经乙醚麻醉后进行颈动脉和颈静脉插管,颈静脉给药,颈动脉取血。给药后分别于1,3,5,10,20,30min,1,2,3,4,6,8,10,12,24h颈动脉取血0.3mL,7000r·min⁻¹离心5min分离血浆,按照“2.3.3项下处理后,作LC-MS分析,将所得数值代入随行标准曲线求得血浆药物浓度,血浆药物浓度超出标准曲线线性范围的先用空白血浆稀释至线性范围内再处理。

2.11 组织分布

大鼠30只,随机分成6组,每组5只。设30min,3,8h3个时间点^[11],每个时间点含紫杉醇囊泡和紫杉醇注射液各1组,按15mg·kg⁻¹的剂量由尾静脉给药,给药30min,3,8h后分别处死大鼠取血及脏器(心、肝、脾、肺、肾、脑),按“2.3.4”项下处理后进行HPLC测定,记录色谱图。将测定的紫杉醇与地西洋峰面积的比值代入标准曲线,经计算得出各时间点大鼠组织中含有紫杉醇的量。

3 结果

3.1 线性关系

3.1.1 制剂学线性 以峰面积(*Y*)为纵坐标,以质量浓度($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)为横坐标,得回归方程 $Y=20974-12974X$, $r=0.9999$,表明紫杉醇在1~100mg·L⁻¹内与峰面积的线性关系良好。检测限和定量限分别约为0.05和0.08mg·L⁻¹。

3.1.2 药动学线性 以待测物质量浓度($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)为横坐标,待测物与内标物的峰面积比值(*Y*)为纵坐标,用加权最小二乘法进行回归计算,求得的线性回归方程: $Y=0.1512+0.1962X$, $r=0.9998$,紫杉醇的线性范围为7.5~480 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。定量限为7.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

3.1.3 组织分布线性 各组织的标准曲线见表2。

3.2 囊泡粒径分布和电位

本法制备的紫杉醇囊泡为均一、稳定的有淡蓝色乳光的混悬液,冻干前后的粒径均呈正态分布,见图1。平均粒径为(157±16)nm,冻干后紫杉醇囊泡的平均粒径为(189±23)nm,见表3。冻干前紫杉醇囊泡的平均电位为-34.6mV,冻干后紫杉醇囊泡的平均电位为-32.8mV,囊泡带负电荷,具有一定的稳定性。

3.3 囊泡的形态

从电镜图片上可以看出囊泡为形态规则的圆形或椭圆形粒子,含药囊泡的粒径比空白囊泡略大,见图2。

表2 各组织的标准曲线

Table 2 Standard curve of paclitaxel noisome in biological samples

Organize	Standard curve	<i>r</i>
Heart	$Y=0.0882X+0.0338$	0.9992
Liver	$Y=0.0937X-0.0304$	0.9993
Spleen	$Y=0.0947X-0.0244$	0.9996
Lung	$Y=0.0820X+0.0494$	0.9998
Kidney	$Y=0.0707X+0.0820$	0.9993
Brain	$Y=0.1072X+0.0013$	0.9998
Blood	$Y=0.0765X+0.0178$	0.9991

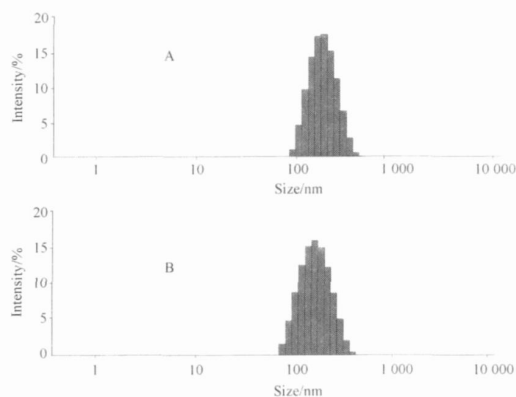


图1 囊泡粒径分布图

A - 冻干前囊泡; B - 冻干后囊泡

Fig. 1 Intensity of noisome size and size distribution

A - before freeze-drying; B - after freeze-drying

表3 囊泡的理化性质, $n=3, \bar{x} \pm s$

Table 3 Physicochemical properties of paclitaxel noisome. $n=3, \bar{x} \pm s$

Parameter	Before freezing-dry	After freezing-dry
Entrapment efficiency/%	92.2 ± 0.9	91.3 ± 1.5
Size/nm	157 ± 16	189 ± 23
Zeta-potential/mV	-34.6 ± 1.3	-32.8 ± 2.2

3.4 制备工艺考察

3.4.1 正交实验结果 用三因素四水平的正交实验考查紫杉醇囊泡的包封率结果(表 4)。根据正交实验 r 值结果,最佳处方为: 1.35×10^{-3} mol Span 60, 1.5×10^{-4} mol TH, 30 mg 紫杉醇, 超声温度 50, 超声时间 50 min。按最佳处方制备 3 批囊泡样品,其包封率为 94.67%, 92.08% 和 93.77%,表明该正交实验的准确性和可靠性。

3.4.2 不同介质对囊泡包封率的影响 按正交设计得到的最佳处方,以不同的分散介质制备囊泡,测定包封率。结果显示,以 3% Tween 80 作为分散介质所制得的囊泡包封率最高。其他的几个处方,由于浓度或缓冲液的影响,导致包封率偏低(表 5)。

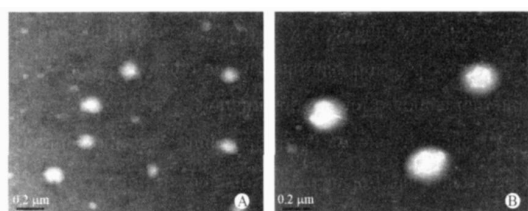


图 2 空白囊泡 (A) 和紫杉醇囊泡 (B) 的透射电镜图片 ($\times 50\ 000$)

Fig. 2 Transmission electron micrographs of blank niosome (A) and paclitaxel niosome (B) ($\times 50\ 000$)

表 4 正交设计和结果

Tab. 4 Orthogonal design and results

No.	Factor					EE /%
	A	B	C	D	E	
1	1	1	1	1	1	83.60
2	1	2	2	2	2	61.43
3	1	3	3	3	3	75.32
4	1	4	4	4	4	90.26
5	2	1	2	3	4	71.91
6	2	2	1	4	3	78.24
7	2	3	4	1	2	83.55
8	2	4	3	2	1	80.90
9	3	1	3	4	2	85.69
10	3	2	4	3	1	81.41
11	3	3	1	2	4	79.70
12	3	4	2	1	3	80.56
13	4	1	4	2	3	85.77
14	4	2	3	1	4	67.76
15	4	3	2	4	1	62.92
16	4	4	1	3	2	73.21
k1	77.65	81.74	78.69	78.87	77.21	
k2	78.65	72.21	69.21	76.95	75.97	
k3	81.84	75.37	77.42	75.46	79.97	
k4	72.42	81.23	85.25	79.28	77.41	
r	9.43	9.53	16.04	3.82	4.00	

3.5 稳定性实验结果

紫杉醇囊泡的药物含量在 6 个月内没有明显的改变,这说明冻干制剂作为紫杉醇囊泡的贮存形式具有一定的稳定性,可以很好的保护囊泡中的紫杉醇药物,见图 3;但是贮存了 6 个月以后,冻干后再水化的囊泡的粒径从 157 nm 变到 189 nm,稍微有所变大,这可能跟少量的囊泡发生融合有关。

3.6 药动学研究

3.6.1 血药浓度经时曲线 自制紫杉醇囊泡和市售紫杉醇注射液经大鼠颈静脉注射后,血药浓度经时曲线见图 4。

表 5 不同分散介质的囊泡包封率. $n=3, \bar{x} \pm s$

Tab. 5 Encapsulation efficiencies of paclitaxel niosomes. $n=3, \bar{x} \pm s$

No.	Disperse	EE/%
1	H ₂ O	75.37 \pm 0.29
2	PBS	79.09 \pm 0.28
3	1% Tween 80	82.14 \pm 0.30
4	2% Tween 80	87.51 \pm 0.15
5	3% Tween 80	93.51 \pm 0.21

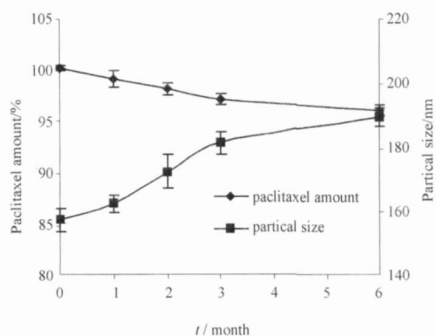


图 3 冻干后囊泡中所含药物及粒径的变化. $n=3, \bar{x} \pm s$

Fig. 3 Paclitaxel Amount and particle size of lyophilized niosomes as functions of time. $n=3, \bar{x} \pm s$

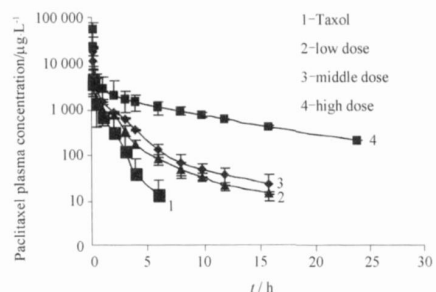


图 4 大鼠静脉给药后的血药浓度经时曲线. $n=5, \bar{x} \pm s$

Fig. 4 Plasma concentration profiles of paclitaxel after intravenous administration in rats. $n=5, \bar{x} \pm s$

3.6.2 药动学参数 将血药浓度经时数据用 WinNonlin Professional Edition Version 2.1 程序进行曲线拟合,结果表明,经大鼠颈静脉注射紫杉醇囊泡和紫杉醇注射液后,用 AIC 判据和 F 值检验综合判断 2 种制剂在大鼠体内均符合二房室模型,其药动学参数见表 6。

由药动学参数可知,自制紫杉醇囊泡和紫杉醇注射液的 $t_{1/2}$ 分别为 5.68 和 1.69 h,前者是后者的 4.3 倍;AUC 分别为 (9.28 ± 0.28) 和 (4.94 ± 0.67) $\text{mg} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$,前者是后者的 1.9 倍。由此说明紫杉醇囊泡比紫杉醇注射液在大鼠体内的消除慢,可能有一定的长循环作用。另外,紫杉醇囊泡比注射液

AUC 增大 1.9 倍,说明囊泡在一定程度上提高了紫杉醇在大鼠体内的利用度。另外,从高、中、低 3 个剂量的药动学参数来看:中、低剂量的药动学参数除了 AUC 后者大约是前者的 2 倍之外,其余的参数之间不存在显著性差异;高剂量与低、中剂量药动学参数比较,其中 AUC、MRT 以及 CL 都存在显著性差异 ($P < 0.05$),由此说明紫杉醇囊泡在高剂量时可能表现为非线性药动学特征。一些药物在较大剂量时的消除速率较低剂量时的消除速率低,是产物抑制所导致的非线性药动学的典型特征之一,所以紫杉醇囊泡的非线性动力学特征可能是由于产物抑制所导致。这一点在临床用药中应予以重视。

表 6 大鼠静脉注射紫杉醇注射液和囊泡后药动学参数 $. n = 5, \bar{x} \pm s$

Tab. 6 Pharmacokinetic parameters of paclitaxel after intravenous administration of Taxol ($15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ as paclitaxel) and paclitaxel niosomes ($7.5, 15, 30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ as paclitaxel respectively) in rats. $n = 5, \bar{x} \pm s$

Parameters	Taxol	Low dose	Middle dose	High dose
AUC/ $\text{mg} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$	4.94 ± 0.67	4.23 ± 0.73	$9.28 \pm 0.28^{1)2)}$	$39.66 \pm 2.12^{2)3)}$
MRT/h	1.83 ± 0.44	1.31 ± 0.56	1.46 ± 0.38	$5.78 \pm 0.25^{2)3)}$
$t_{1/2}$ /h	0.16 ± 0.03	0.12 ± 0.02	0.16 ± 0.05	$0.34 \pm 0.07^{3)}$
$t_{1/2}$ /h	1.69 ± 0.17	5.53 ± 0.64	$5.68 \pm 0.27^{1)}$	$8.15 \pm 0.20^{2)}$
$CL/\text{mL} \cdot \text{h}^{-1}$	0.80 ± 0.19	0.45 ± 0.16	$0.45 \pm 0.08^{1)}$	$0.17 \pm 0.03^{2)3)}$

注: ¹⁾ $P < 0.05$, compared with Taxol; ²⁾ $P < 0.05$, compared with low dose; ³⁾ $P < 0.05$, compared with modest dose

Note: ¹⁾ $P < 0.05$, compared with Taxol; ²⁾ $P < 0.05$, compared with low dose; ³⁾ $P < 0.05$, compared with modest dose

3.7 组织分布

组织分布结果表明(图 5),制成囊泡后紫杉醇在大鼠体内的分布发生了变化,给予大鼠紫杉醇囊泡及紫杉醇注射液后在各个脏器的分布量均有显著性差异。紫杉醇囊泡在肝、脾分布较多,而在心脏、肾脏分布较少。紫杉醇囊泡在各组织脏器中与血药浓度变化趋势一致,组织内浓度迅速达峰,这表明其体内分布过程迅速。紫杉醇被囊泡封装后,主要被单核-巨噬细胞系统的巨噬细胞所吞噬而摄取,所以在肝、脾等单核-巨噬细胞较丰富的器官中浓集,而在心、肾中累积量比紫杉醇注射液要低得多。故紫杉醇囊泡可降低紫杉醇的心、肾毒性。由于在肾脏的分布减少,还可减少肾排泄和代谢而延长药物在血液中的滞留时间,使药物在体内缓慢释放,从而延长药物的作用时间。

4 讨论

4.1 很多国内外文献报道破坏囊泡用异丙醇或正丁醇^[10,12],本实验在测包封率时实验了这 2 种溶剂,结果发现都能有效的破坏囊泡,但是破囊以后的溶液经 HPLC 检测发现峰形很差,出现峰形前突甚

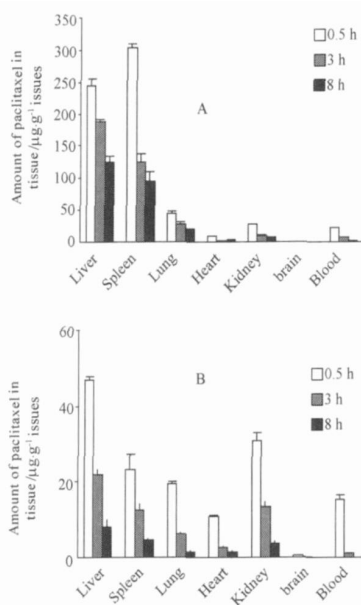


图 5 静脉注射紫杉醇注射液 (A) 和紫杉醇囊泡 (B) 0.5, 3, 8 h 后的组织分布 $. n = 5, \bar{x} \pm s$

Fig. 5 Biodistribution of paclitaxel after 0.5, 3 and 8 h of intravenous injection of (A) Taxol and (B) paclitaxel niosomes ($15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ as paclitaxel) in normal rats. $n = 5, \bar{x} \pm s$

至是双峰现象,考虑可能是异丙醇和正丁醇极性太强,对柱子的柱效产生影响,导致柱分离度降低。后来通过在破囊溶剂中加入一定比例的甲醇,这样既能保证囊泡被破坏,又能尽量减少异丙醇对柱子柱效的影响,最后确定异丙醇跟甲醇的最佳体积比是1:3,所以所有的破囊溶剂都是按这个比例配备的。

4.2 电位是表征粒子表面电荷情况的一个重要指标,且电位的大小对囊泡混悬液的稳定性也有影响。荷电的囊泡能够减少相互间的聚集和融合,增加稳定性。电位绝对值大于60 mV时,荷电粒子相当稳定,电位绝对值在30~60 mV之间时,荷电粒子比较稳定,在电位绝对值小于30 mV时,荷电粒子不稳定,容易聚集^[13]。本实验制备的囊泡冻干前和冻干后的电位均大于30 mV,因此比较稳定。冻干制剂在室温下贮存了6个月以后,药物含量和粒径均未明显变化。

4.3 紫杉醇囊泡在大鼠体内的清除在高剂量时显示出非线性药动学特征。非线性药动学对于临床用药的安全性和有效性有着较大的影响。无论是吸收、代谢、结合还是排泄,任何过程被饱和产生非线性药动学,都会导致显著的临床效应和毒副作用,并且由于体内消除过程被饱和,清除率明显降低,半衰期延长,药物向体外的消除明显减慢。出现中毒以后即使采取解毒措施,解毒过程也会比较缓慢。因此由于非线性动力学而导致的血药浓度过高,可能产生严重的后果。大多数药物在治疗剂量范围内,一般不会出现非线性动力学现象,但由于患者的生理病理情况如肝功能损害、肾衰竭等,可能会发生在治疗剂量范围内出现非线性动力学现象的情况。这一点在临床用药中应予以重视。

4.4 由于囊泡本身的特性使紫杉醇囊泡在肝、脾和肺等网状内皮系统较发达的脏器分布较多,囊泡组比游离组在这些脏器的分布高2~12倍,并能长时间保持在较高的浓度。从而为解释药动学研究时出现的“紫杉醇囊泡大鼠给药后在分布相时紫杉醇的血浓度下降较快,但其消除相半衰期却得到明显延长

的情况提供了依据。可能因为此类脏器起到了药物储库的作用,将药物又缓缓释放回血液中。

目前的研究仅限于紫杉醇囊泡本身,下一步将对紫杉醇囊泡进行修饰,使紫杉醇囊泡直接靶向于肿瘤组织。

REFERENCES

- [1] SNGLA A K, GARG A, AGGARWAL D, *et al.* Paclitaxel and its formulations [J]. *Int J Pharm*, 2002, 235(122): 179-183.
- [2] MU L, FENG S S. A novel controlled release formulation for the anticancer drug paclitaxel (Taxol): PLGA nanoparticles containing vitamin E TPGS [J]. *J Controlled Release*, 2003, 86(1): 33-48.
- [3] MU L, FENG S S, VITAM N E. TPGS used as emulsifier in the solvent evaporation/extraction technique for fabrication of polymeric nanospheres for controlled release of paclitaxel (Taxol) [J]. *J Controlled Release*, 2002, 80(1-3): 129-144.
- [4] LUNDBERG B B, RISOVIC V, RAMASWAMY M, *et al.* A lipophilic paclitaxel derivative incorporated in a lipid emulsion for parenteral administration [J]. *J Controlled Release*, 2003, 86(1): 93-100.
- [5] STRAUBINGER R M, SHARMA A, MURRAY M, *et al.* Novel taxol formulations: Taxol containing liposomes [J]. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 1993, 25(15): 69.
- [6] WANG D L, SHENG K X, *et al.* Advances on research of niosomes as drug carriers [J]. *Chin Pharm J (中国药理学杂志)*, 1998, 29(5): 235-240.
- [7] LUAN L B, ZHU J B, YU W P. Studies on the preparation of camptothecin niosomes [J]. *Acta Pharm Sin (药理学学报)*, 2002, 37(1): 59-62.
- [8] YANG T, CUI F D, CHOIM K. Enhanced solubility and stability of PEGylated liposomal paclitaxel: *In vitro* and *in vivo* evaluation [J]. *Int J Pharm*, 2007, 338(2): 317-326.
- [9] ZHAO X Y, LI H, ZHANG X B. Preparation and evaluation of non-ionic surfactant based vesicle as a new drug delivery system [J]. *Int J Pharm*, 2007, 34(6): 439-443.
- [10] ZHANG W T, HUANG Q B, LIN L F, *et al.* Determination of the entrapment efficiency of docetaxel liposome [J]. *Chin Hosp Pharm J (中国医院药学杂志)*, 2008, 28(14): 1179-1181.
- [11] LIU H, TANG R, HE X X, *et al.* Effects of liposomes formulation and preparation method on the stability of acyclovir palmitate liposomes [J]. *Acta Pharm Sin (药理学学报)*, 2002, 37(5): 563-566.
- [12] MANOSROIA, WONGTRAKUL P, MANOSROI J, *et al.* Characterization of vesicles prepared with various non-ionic surfactants mixed with cholesterol [J]. *Colloid Surf B: Biointerf*, 2003, 30: 129-138.
- [13] ZHOU W, WENG G Y, CHEN W Z, *et al.* Tissue distribution of paclitaxel liposome in rats [J]. *Chin Pharm J (中国药理学杂志)*, 2005, 40(18): 1402-1404.

(收稿日期:2009-10-01)

关于推荐 2010年中国药学会 -赛诺菲安万特青年生物药物奖的通知

中国药学会赛诺菲安万特青年生物药物奖是中国药学会与赛诺菲-安万特公司共同设立的青年生物药物奖,旨在奖励致力于生物药物新药研究的中国优秀青年工作者。该奖项面向全国,从2009年起每年评选一次,每次奖励5至8名从事生物药物研究的青年学者,奖励金额为每人20000元人民币(含税),同时颁发奖杯和证书。可从中国药学会网站(www.cpa.org.cn)查询有关事宜。

[本刊讯]