

• 制剂与质量 •

紫杉醇透明质酸冻干制剂的制备和药动学研究

殷殿书¹, 葛志强¹, 刘昌孝^{1,2}, 元英进^{1*}(1. 天津大学化工学院 制药工程系, 天津 300072; 2. 天津药物研究院 天津药代动力学与药效学动力学
省部共建国家重点实验室, 天津 300193)

摘要:目的 以透明质酸为载体材料制备紫杉醇透明质酸冻干制剂,并考察冻干制剂在大鼠体内的药动学。方法 采用乳匀-冻干法制备冻干制剂;以透射电子显微镜观察其粒子形态;建立冻干制剂及其在血浆中紫杉醇的 HPLC 分析方法;以紫杉醇注射剂为对照,测定冻干制剂 10 mg/kg iv 给药后,大鼠体内的药动学参数。结果 在冻干制剂中,紫杉醇以球形包覆于透明质酸基质中;在溶液中,分散成平均粒径为 80 nm 的包覆微球;大鼠 iv 冻干制剂和紫杉醇注射剂的药物浓度-时间曲线符合二室模型,其药动学参数 AUC 分别为 $(37.68 \pm 6.36) \mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$ 和 $(27.54 \pm 5.88) \mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$;CL 分别为 $(0.26 \pm 0.04) \text{h}^{-1}$ 和 $(0.38 \pm 0.07) \text{h}^{-1}$ 。结论 透明质酸可能成为一种新的抗癌药物载体。

关键词:紫杉醇;透明质酸;冻干制剂;药动学

中图分类号:R286.02

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2005)02-0192-04

Paclitaxel lyophilized preparation with hyaluronic acid as a carrier and its pharmacokinetics

YIN Dian-shu¹, GE Zhi-qiang¹, LIU Chang-xiao^{1,2}, YUAN Ying-jin¹

(1. Department of Pharmaceutical Engineering, School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China; 2. Tianjin State Key Laboratories of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics at Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China)

Abstract: **Objective** To prepare paclitaxel lyophilized preparation with hyaluronic acid as a carrier and investigate its pharmacokinetics in rats *in vivo*. **Methods** The preparation was prepared by emulsion-homogenous lyophilization. The particle morphology was observed by transmission electron microscope and the HPLC analysis for the paclitaxel in lyophilized preparation and in plasma was established. Taking paclitaxel injection as control, the *in vivo* pharmacokinetics of lyophilized preparation by iv to rats at a dose of 10 mg/kg was studied. **Results** In lyophilized preparation the paclitaxel particles were wrapped spherically in hyaluronic acid matrix and were dispersed in wrapped-microsphere in mean diameter of 80 nm in solution. The concentration-time curve of lyophilized preparation and paclitaxel injection by iv to rats was identical with the two-compartment model and the pharmacokinetic parameters of AUC were (37.68 ± 6.36) and $(27.54 \pm 5.88) \mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$ and CL were (0.26 ± 0.04) and $(0.38 \pm 0.07) \text{h}^{-1}$, respectively. **Conclusion** Hyaluronic acid may be used as a novel and specific carrier of anti-tumor drug in the future.

Key words: paclitaxel; hyaluronic acid; lyophilized preparation; pharmacokinetics

紫杉醇是一种含二萜环的天然抗癌成分,主要用于乳腺癌和卵巢癌的治疗^[1]。由于它的强疏水性,所以原制剂用氢化蓖麻油和无水乙醇作为溶剂,该处方在临床使用中往往引起严重的过敏反应。因此,在使用前需进行抗过敏的预防治疗,这给临床用药及病人带来了极大的不便和痛苦。针对现制剂的不足,国内外开发了一系列新的制剂如脂质体^[2]、微乳^[3]、纳米微粒^[4]、环糊精包合物^[5]、PEG 前药^[6]等。透明质酸(hyaluronic acid)是存在于人体内的一种

多糖类物质。它通过与细胞表面的粘附受体 CD44 和 RHAMM 结合来调节细胞的各种生理作用^[7]。近年来的研究表明,在某些肿瘤细胞表面具有丰富的 CD44 和 RHAMM 受体^[8,9]。因此,利用透明质酸对肿瘤细胞的亲合性质可以提高抗癌药物的疗效。在以往的研究中,笔者对紫杉醇透明质酸冻干制剂的药效学进行了研究,发现透明质酸对紫杉醇有良好的增效作用。本实验考察了紫杉醇透明质酸冻干制剂的形态,并以紫杉醇临床制剂为对照,比较了冻干

收稿日期:2004-07-08

作者简介:殷殿书(1965—),男,河北省馆陶县人,高级工程师,博士,主要从事药物新型制剂的研究。E-mail: dshyin@eyou.com

* 通讯作者 Tel: (022) 27403888 E-mail: yiyuan@tju.edu.cn

制剂在大鼠体内的药动学行为。

1 材料与仪器

紫杉醇注射剂(自制,批号:021220),紫杉醇冻干制剂(自制,批号:021221),紫杉醇(自制,纯度不低于98.5%);Cremophor EL®(BASF, Ger.),透明质酸(山东福瑞达生物化工有限公司);乙腈、甲醇、乙醚(色谱纯);安定(北京制药厂);Waters600 高效液相色谱仪;冻干机(Christ Alphal-2, Ger.);JEM-100CX II 型透射电子显微镜(Japan);ESEM XL-30 型扫描电子显微镜(philip);光子相关光谱仪(PCS)(Brookhaven, USA)。SD 大鼠,(220±10)g,由中国医学科学院实验动物繁育中心提供。

2 方法与结果

2.1 紫杉醇冻干制剂的制备^[10]:于搅拌下,将透明质酸溶于纯水中,使形成0.5%的水溶液,按1:5

的比例加入葡萄糖,充分溶解后,再加入紫杉醇微乳液,于匀化器中充分匀化后,在-20℃下预冻24h,再于-40~-45℃冷冻干燥36h,制成紫杉醇透明质酸冻干制剂。

2.2 紫杉醇冻干制剂粒径分析和形态观察:取样品适量,在扫描电子显微镜下观察冻干制剂的形态;另取样品适量,用生理盐水溶解后于透射电子显微镜下观察粒子的形态;取适量样品用生理盐水溶解后,除尘,使用光子相关光谱仪测定粒径。使用BI-9000AT 相关器,BI-200SM 光度计于514.5 nm、25℃下测定粒径,采用CONTIN 数据进行处理,得到分散粒子大小的分布。见图1。可以看出紫杉醇以球形存在于透明质酸基质中,紫杉醇与透明质酸基质以包覆的球形微粒存在于溶液中,冻干制剂在溶液中的平均粒径为80 nm。

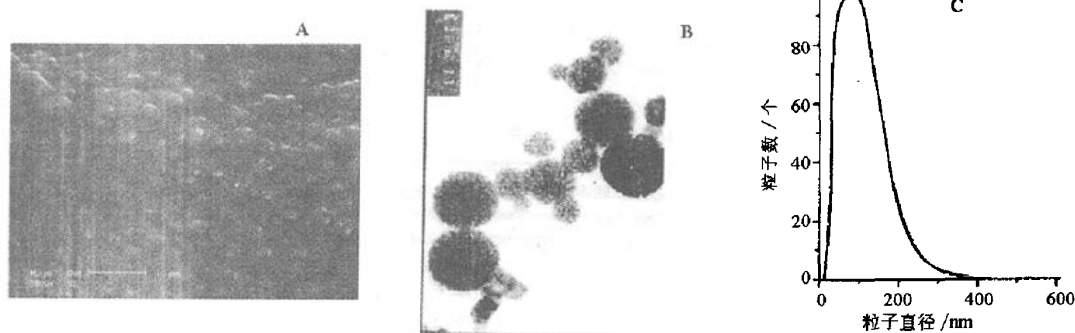


图1 冻干制剂的扫描电镜图(A, Bar=10 μm)、透射电镜图(B, ×10⁵倍)和粒子大小及粒径分布图(C)

Fig. 1 Scanning electron micrograph (A, Bar=10 μm), transmission electron micrograph (B, amplified ×10⁵), and determined particle size and distribution (C) of lyophilized preparation

2.3 体内方法学研究

2.3.1 色谱条件:色谱柱为C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-乙腈-水(20:45:35),体积流量为1.0 mL/min,紫外检测波长227 nm,灵敏度为0.02 AUFS。

2.3.2 血样预处理:精密吸取血浆样品150 μL,准确加入10 μg/mL 安定内标液50 μL,涡旋振荡2 min 混匀后,加入乙醚2 mL,涡旋振荡2 min。3 000 r/min 离心10 min,取上层有机层,于40℃水浴中氮气吹干。加入流动相150 μL 复溶,取50 μL 采用HPLC 法测定。记录紫杉醇及安定的峰面积,计算两者之比,计算血浆药物质量浓度。

2.3.3 血浆中紫杉醇标准工作曲线的建立:取大鼠空白血浆150 μL,精密加入不同质量浓度的紫杉醇溶液。再于各样品中精密加入安定内标液50 μL,如前述血样预处理方法操作,记录紫杉醇及安定的峰

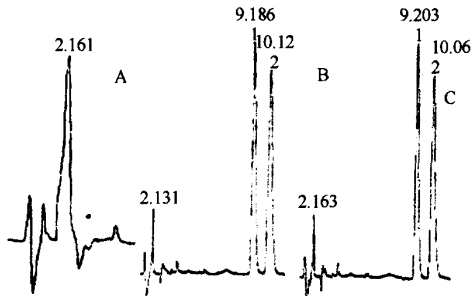
面积,计算两者之比,用质量浓度对峰面积比作线性回归,得到测定血浆中紫杉醇的标准工作曲线。紫杉醇在0.1~100 μg/mL 时,质量浓度(C)与峰面积之比(R)线性关系良好, $C=8.3679R-0.415$, $r=0.9994$ ($n=5$)。

2.3.4 方法回收率的测定:取空白大鼠血浆150 μL,精密加入不同量的紫杉醇甲醇溶液,使其质量浓度分别为1、8、80 μg/mL。按前述血样预处理方法操作处理后,采用HPLC 法测定紫杉醇的峰面积(A₁);另配制等质量浓度的紫杉醇甲醇溶液直接采用HPLC 法测定紫杉醇的峰面积(A₂)。计算A₁/A₂,得方法回收率。紫杉醇3个质量浓度(1、8、80 μg/mL)的回收率分别为94.37%、97.85%、98.52%。

2.3.5 方法精密度的测定:取空白大鼠血浆150 μL,精密加入不同量的紫杉醇甲醇溶液,使其质量

浓度分别为 1、8、80 $\mu\text{g/mL}$ 。按前述血样预处理方法操作处理后。采用 HPLC 法于 1 d 内测定 5 份样品和 5 d 连续进行紫杉醇的测定,计算出日内和日间 RSD 分别为 2.32%、2.18%、1.85%和 2.76%、1.87%、2.42%。

体内药物浓度分析结果显示,建立的大鼠血浆中紫杉醇质量浓度的测定方法专属性较好,血浆中杂质及制剂辅料对测定没有影响(图 2)。紫杉醇的保留时间约为 10.1 min,安定的保留时间约为 9.2 min,最低检测质量浓度为 0.04 $\mu\text{g/mL}$ 。



1-安定 2-紫杉醇
1-Diazepam 2-paclitaxel

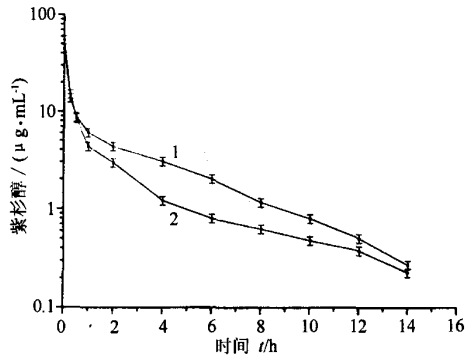
图 2 空白血浆(A)、给药紫杉醇注射液(B)、冻干制剂(C)大鼠血浆的 HPLC 图谱

Fig. 2 HPLC chromatograms of blank plasma (A), rat plasma with paclitaxel injection (B), and with lyophilized preparation (C)

2.4 药动学研究:SD 大鼠 10 只随机分成两组,每组 5 只,两组大鼠以 10 mg/kg 的剂量分别 iv 紫杉醇注射剂和冻干制剂。分别于 0、0.25、0.5、1、2、4、6、8、10、12、14 h 于眼眶取血,置于肝素化的试管中,4 000 r/min 离心 10 min,取血浆于冰箱中冷冻保存。按前述血样预处理方法处理样品,采用 HPLC 法测定紫杉醇的血药浓度。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间差异用 *t* 检验进行统计分析。紫杉醇注射剂和紫杉醇冻干制剂以 10 mg/kg 剂量 iv 给予大鼠体后的血药浓度-时间曲线见图 3。全部数据经 3P97 处理后,进行曲线拟合,两者均符合二室模型^[11],两种制剂的药动学参数比较见表 1。可以看出紫杉醇冻干制剂的 AUC 大于紫杉醇注射剂,而 CL 小于紫杉醇注射剂,两者具有统计学差异($P < 0.05$)。

3 讨论

透明质酸是人体内的一种内源性多糖,本研究利用透明质酸在溶液中呈螺旋状构型,使紫杉醇微乳嵌合到网状结构中,对药物起到了增效和缓释作



1-冻干制剂 2-紫杉醇注射剂
1-lyophilized preparation 2-paclitaxel injection

图 3 iv 紫杉醇注射剂和冻干制剂后紫杉醇在大鼠体内的平均血药浓度-时间曲线

Fig. 3 Mean blood concentration-time curve in rat *in vivo* of paclitaxel after iv paclitaxel injection and lyophilized preparation

表 1 SD 大鼠 iv 紫杉醇注射剂和冻干制剂的药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 1 Pharmacokinetic parameters of iv paclitaxel injection and lyophilized preparation to SD rats ($\bar{x} \pm s, n=5$)

参 数	冻干制剂	注射剂
$A/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	59.44 ± 49.25	55.71 ± 40.27
α/h^{-1}	7.29 ± 3.23	5.17 ± 2.51
$B/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	7.41 ± 0.84	4.18 ± 1.22
β/h^{-1}	0.23 ± 0.01	0.25 ± 0.05
$V_c/(\text{L} \cdot \text{kg}^{-1})$	0.24 ± 0.14	0.24 ± 0.12
$T_{1/2\alpha}/\text{h}$	0.12 ± 0.05	0.17 ± 0.07
$T_{1/2\beta}/\text{h}$	3.01 ± 0.16	2.94 ± 0.60
K_{21}/h^{-1}	1.14 ± 0.17	0.63 ± 0.20
K_{10}/h^{-1}	1.58 ± 0.98	2.04 ± 0.98
K_{12}/h^{-1}	4.79 ± 2.39	2.74 ± 1.52
$\text{AUC}/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h})$	$37.68 \pm 6.36^*$	27.54 ± 5.88
$\text{CL}/(\text{L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg})$	$0.26 \pm 0.04^*$	0.38 ± 0.07

与注射剂比 * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs paclitaxel injection

用。紫杉醇注射剂中的聚氧乙烯蓖麻油 Cremophor EL 是引起制剂严重过敏反应的主要原因。本实验中制备的透明质酸包合紫杉醇冻干制剂,由于透明质酸在药物表面形成了一层薄膜,使药物在体内的输送过程中泄漏很少,又可以使药物通过透明质酸的亲合介导作用富集在靶向细胞周围,使药效提高 30% 以上。

对紫杉醇透明质酸冻干制剂的药动学研究表明,冻干制剂的 AUC 大于注射剂,而 CL 小于注射剂,均说明在同样剂量条件下,冻干制剂在体内消除速度较慢并保持较高的血药浓度,从而提高药物的疗效。这与药效学实验结果相一致。冻干制剂的药

动力学特点可能与该制剂本身性质有关。一方面该冻干制剂形成了粒径很小的药物微粒,有利于提高药物在体内的循环和吸收,另一方面透明质酸在粒子表面形成一层膜,使药物在体内的释放减慢,消除速度变小,这有利于提高药物的疗效。具体机制有待进一步研究。

References:

- [1] Yuan Y J. *New Anticancer Drugs — Paclitaxel and Docetaxol* (抗癌新药紫杉醇和多烯紫杉醇) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2002.
- [2] Sharma A, Straubinger R M. Novel taxol formulations: preparation and characterization of taxol-containing liposomes [J]. *Pharm Res*, 1994, 11: 889-895.
- [3] Kan P, Chen Z B, Lee C J, et al. Development of nonionic surfactant/phospholipid O/W emulsion as vehicle for drug delivery [J]. *J Control Release*, 1999, 58(3): 271-278.
- [4] Feng S S, Huang G F. Effect of emulsifiers on the controlled release of paclitaxel from nanospheres of biodegradable polymer [J]. *J Control Release*, 2001, 71(1): 53-69.
- [5] Liu Y, Chen G S, Yuan Y J, et al. Inclusion complexation and solubilization of paclitaxel by bridged bis (beta-cyclodextrin) containing a tetraethylenepentaamino spacer [J]. *J Med Chem*, 2003, 46: 4634-4637.
- [6] Feng X, Yuan Y J, Wu J C. Synthesis and evaluation of water-soluble paclitaxel prodrugs [J]. *Bioorgan Med Chem Lett*, 2002, 12(22): 3301-3303.
- [7] Lee J Y, Spicer A P. Hyaluronan: a multifunctional, megaDton, stealth molecule [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2000, 12(5): 581-586.
- [8] Zeng C X, Bryan P, Shawn T, et al. Inhibition of tumor growth *in vivo* by hyaluronan oligomers [J]. *Int J Cancer*, 1998, 77(2): 396-401.
- [9] Ponta H, Sherman L, Peter A. Herrlich CD44: From adhesion molecules to signalling regulators [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, 4: 33-45.
- [10] Yuan Y J, Yin D S, Su W C, et al. Injection preparation of taxane [P]. CN: 1421201A, 2002-12-16.
- [11] Liu C X, Wei G L, Li Q S. Methodology study of validation for bioanalysis in studies on pharmacokinetics and bioavailability [J]. *Asian J Drug Metab Pharmacokin*, 2001, 1(4): 279-286.

温里药配伍对口服赤芍小鼠血浆中芍药苷的影响

杨祖贻¹,裴瑾²,刘荣敏¹,程佳¹,万德光²,胡荣²

(1. 四川省肿瘤研究所,四川 成都 610041; 2. 成都中医药大学药学院,四川 成都 610075)

摘要:目的 建立适用于7种温里药分别与活血药赤芍配伍后芍药苷血药浓度的RP-HPLC检测方法。探讨活血温里复方的药物配伍机制。方法 将胡椒、肉桂、小茴香、吴茱萸、花椒、丁香、干姜分别与赤芍配伍后ig小鼠,采用HPLC法测定各复方在小鼠血浆中芍药苷血药浓度。结果 胡椒、肉桂、吴茱萸、小茴香、花椒均能不同程度地提高芍药苷的血药浓度($P<0.01$),丁香、干姜对芍药苷的血药浓度提高不明显。结论 温里药胡椒、肉桂、小茴香、吴茱萸、花椒与活血药赤芍配伍均能提高赤芍主要有效成分芍药苷的血药浓度。

关键词:赤芍;芍药苷;温里药;血药浓度;高效液相色谱

中图分类号:R286.02 **文献标识码:**B **文章编号:**0253-2670(2005)02-0195-04

Effect of compatibility with warming-inside drugs on paeoniflorin in mouse plasma

YANG Zu-yi¹, PEI Jin², LIU Rong-min¹, CHENG Jia¹, WAN De-guang², HU Rong²

(1. Sichuan Cancer Institute, Chengdu 610041, China; 2. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China)

Abstract: Objective To establish a RP-HPLC method for the determination of the blood concentration of paeoniflorin which was produced by seven kinds of warming-inside drugs (WID) being used with the promoting-blood drugs (PBD) individually and to explore the mechanism of PBD and WID compound prescription. **Methods** The blood concentration of paeoniflorin in mouse plasma was determined by HPLC after ig seven kinds of WID being compatible with *Radix Paeoniae Rubra* (RPR) to mice separately. **Results** *Fructus Piperis* (FP), *Cortex Cinnamoni* (CC), *Fructus Evodiae* (FE), *Fructus Foeniculi* (FF), and *Pericarpium Zanthoxyli* (PZ) compound prescription with RPR can increase the blood concentration of paeoniflorin in different degrees ($P<0.01$). But *Flos Caryophylli* (FC) and *Rhizoma Zingiberis* (RZ) had obscure effect on it. **Conclusion** FP, CC, FF, FE, and PZ compound prescription with RPR separately can increase the blood concentration of paeoniflorin.