

文章编号: (2008)01-0025-05

齐多夫定两亲前药自组装体系在家兔血浆中稳定性研究

齐宁宁^{1,2}, 金义光², 于善江³, 陈大为¹

(1. 沈阳药科大学 药学院, 辽宁 沈阳 110016; 2. 军事医学科学院 放射与辐射医学研究所, 北京 100850;

3. 中国生物技术发展中心, 北京 100081)

摘要: **目的** 考察齐多夫定两亲性前药(PDDZ)自组装体系在家兔血浆中的稳定性, 预测其自组装体系的体内行为。**方法** 在室温条件下, 用 HPLC 法测定 PDDZ 自组装体系在体积分数为 20%(φ)的家兔血浆中的降解情况。在不同流动相条件下测定齐多夫定(AZT)和 PDDZ 的含量。

结果 PDDZ 在体积分数为 20%(φ)的家兔血浆中的降解半衰期为 210 min, 降解产物为 AZT。**结论** PDDZ 自组装体系可在体外环境中较快地降解出原药。

关键词: 药剂学; 稳定性; 齐多夫定; 前药; 双头基两亲分子; 自组装体系

中图分类号: R943

文献标志码: A

双头基两亲前药自组装体系(self-assembled systems of bolaamphiphilic prodrugs, SASBP)是在药质体(pharmacosomes)研究基础上设计的一种新型的自组装药物传递系统(SADDS)^[1-3], 其原理是极性药物分子连接在脂质分子两端, 共价结合成双头基两亲分子(bolaamphiphiles), 后者易在水溶性环境中发生自组装, 形成胶束、单分子层泡囊、纳米管等稳定的有序结构^[4-7]。但 SASBP 作为一种新型给药系统, 其前药需在体内转化为原药才能发挥作用^[8-9], 因此, 本文作者设计的双头基两亲前药在形成自组装体系后, 需要在体内环境中进行降解。

齐多夫定(zidovudine, AZT)是美国 FDA 批准上市的第一个抗艾滋病药物, 是治疗晚期 HIV 感染的一线用药。但在长期使用中发现, AZT 存在剂量依赖性。当血浆中药物浓度较大时会引发贫血和白细胞减少, 低剂量时在靶细胞尤其是脑中的浓度较小。另外, AZT 半衰期短(约 1 h), 需要频繁给药以维持治疗剂量^[10]。而双头基两亲性前药自组装体系除具有药质体的高度分散性和靶向性的特点之外, 还能实现高载药量和高给药量的目的。本文作者在合成了 AZT 的双头基两亲性前药并形成自组装体系的基础上, 研究了该自组装体系在动物血浆中的稳定性, 以预测前药在体内的降解行为。

1 仪器与材料

高效液相色谱仪(包括 LC-10Avp 输液泵、SPD-10Avp 紫外可见检测器、SCL-10Avp 系统控制器、CLASS-VP6.02 色谱工作站, 日本岛津公司); 高速台式离心机(TGL-16B 型, 上海安亭科学仪器厂); 涡旋混合器(GL-88B 型, 江苏海门麒麟医用仪器厂); 电热恒温水浴锅(HW.SY 系列, 北京市长风仪器仪表公司); 透射电子显微镜(CM120, Philips 公司)。

收稿日期: 2007-05-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(30672542)

作者简介: 齐宁宁(1981-), 女(汉族), 河北新乐人, 硕士研究生; 金义光(1973-), 男(汉族), 河南清丰人, 副研究员, 博士, 主要从事新型药物传递系统的研究, Tel. 010-66931220, E-mail jinyg@sina.com; 陈大为(1959-), 男(汉族), 辽宁海城人, 教授, 博士生导师, 主要从事口服固体制剂及中药新剂型的研究, Tel. 024-23986306 E-mail cdw2002yd@sina.com。

齐多夫定(上海迪赛诺化学制药有限公司,批号:20031219);胸腺嘧啶(Acrose 公司,批号:20061116);十五碳二酸双齐多夫定酯(简称 PDDZ,自制并经结构确证,纯度为 96%,批号:20060916);PDDZ 自组装体系(自制,批号:20061028);甲醇(色谱纯,天津市西华特种试剂厂)。

雄性日本大耳白家兔(军事医学科学院动物中心提供),体质量 1.9 ~ 2.6 kg。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Diamonsil™ ODS 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);检测波长为 266 nm; 20 μL 样品环;柱温为室温(20)。

AZT 脂质前药 PDDZ 的脂溶性很强,在 ODS 色谱柱上吸附较强,与 AZT 的保留行为差别很大。流动相中甲醇的用量小于 95%(φ)时,PDDZ 出峰时间延长至 30 min 以后,而 AZT 的出峰时间仍在 3 min 左右,后者无法避开血浆杂质的干扰。由于前药和原药的极性差别太大,故无法选择同一种流动相进行分离;若采用梯度洗脱的方法,则可能会由于选择的流动相的极性和组成比例相差太大,使得分离时间延长。因此,最终选择两种流动相系统对 AZT 和 PDDZ 分别进行分析。

2.2 PDDZ 自组装体系的制备

用 100 μL 的微量注射器将 5 mg·mL⁻¹ 的 PDDZ 甲醇溶液注入到注射用水中,再注入 10 mg·mL⁻¹ 的吐温-20 水溶液,37 减压旋转蒸发除去甲醇,进一步浓缩,得到淡蓝色均匀混悬液,其质量浓度为 1.3 mg·mL⁻¹。通过负染法透射电子显微镜观察 PDDZ 自组装体系的结构(见图 1),PDDZ 分子通过氢键和疏水作用,在水溶液中自组装,形成有序的聚集体:类圆形的泡囊结构。

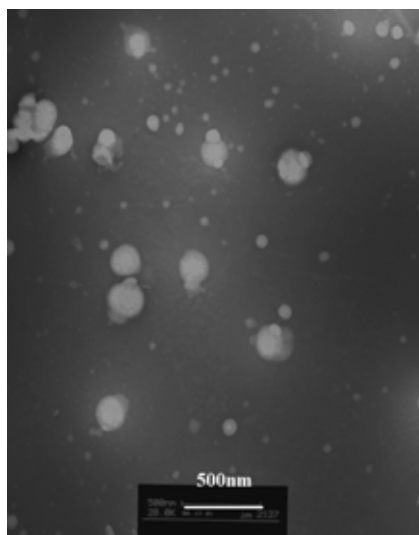


Fig. 1 TEM images about PDDZ self-assembled system ($C=1.36 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)

2.3 样品的处理

取空白家兔血浆 10 μL,分别加 AZT 对照品溶液和 PDDZ 的对照品溶液 10 μL,以 80 μL 甲醇沉淀蛋白。旋涡混合 1 min,10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液 20 μL 进样。PDDZ 和 AZT 的 HPLC 测定方法采用的流动相及条件分别为甲醇-水(体积比为 95:10),流速为 1 mL·min⁻¹;甲醇-水(体积比

为 40:60), 流速为 $0.7 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。结果显示: 本实验条件下, 血浆中杂质不干扰样品峰(见图 2)。AZT 的保留时间为 11.941 min, PDDZ 的保留时间为 7.709 min。

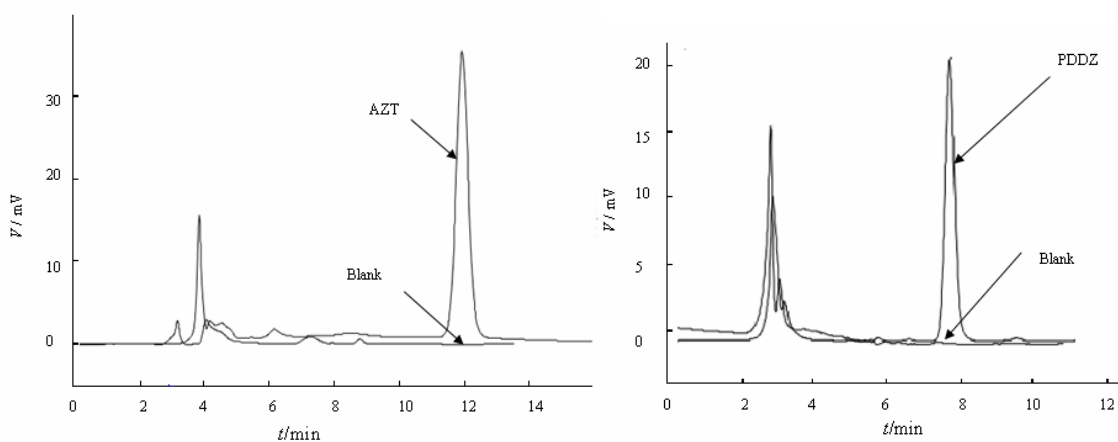


Fig. 2 Chromatography of zidovudine and PDDZ

2.4 血浆标准曲线的制备

取家兔空白血浆 $10 \mu\text{L}$, 分别加入 AZT、PDDZ 的标准溶液适量, 旋涡混合均匀, 再用蛋白沉淀剂甲醇依次稀释至 100、50、20、5、2、1、 $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。样品处理同“2.3”项下的操作。以样品峰面积 A 分别对 AZT 和 PDDZ 质量浓度 C 进行线性回归, 得标准曲线方程, 见表 1。

Table 1 Standard curves of HPLC determination of AZT and PDDZ in rabbit plasma with methanol as precipitant

Drugs	Linear equation	r	Linear range/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
AZT	$A=48221C - 28084$	0.999 8	0.52–103.54
PDDZ	$A=19081C - 13609$	0.999 9	0.53–106.50

2.5 回收率和精密度实验

取家兔空白血浆 $10 \mu\text{L}$, 分别加入适量 AZT、PDDZ 的标准溶液, 旋涡混合均匀, 再用蛋白沉淀剂甲醇稀释至 100、50、 $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。样品处理同“2.3”项下的操作。测得 AZT 和 PDDZ 在家兔血浆中的精密度。并将上述 3 个质量浓度的测定结果与相应质量浓度标准液直接进样所得的结果进行比较, 求得提取回收率, 实验结果见表 2。

Table 2 Recovery and precision of AZT and PDDZ from rabbit plasma($n = 3$)

AZT			PDDZ		
$C/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	Recovery/%	RSD/%	$C/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	Recovery/%	RSD/%
0.52	97.29±2.48	2.55	0.53	93.39±2.22	2.38
51.76	105.24±1.92	1.83	53.25	89.01±0.37	0.41
103.54	103.61±0.90	0.87	106.50	99.89±0.68	0.68

由表 2 的数据可知, 家兔血浆中 AZT 和 PDDZ 的提取回收率均在 89%~105%, 日内 RSD 均小于 3%。说明该方法符合家兔血浆中 AZT 和 PDDZ 含量测定的要求。

2.6 稳定性实验

用高压灭菌的 Tris-HCl 缓冲液($20 \text{ mmol}\cdot\text{mL}^{-1}$, $\text{pH}=7.4$)稀释家兔血浆, 稀释液含 20%(φ)的原血

浆。取 PDDZ 自组装体系 200 μL 加到 400 μL 稀释血浆中，旋涡混合，室温放置，定时取 10 μL 样品，加 90 μL 甲醇沉淀蛋白，旋涡混合 1 min，10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min，取上清液 20 μL 进样。拟合一级速率方程，求得 PDDZ 的降解速率常数 k 和半衰期 $t_{1/2}$ 。结果表明，室温条件下，20%(φ)的家兔血浆中 PDDZ 的降解产物为 AZT，降解速率常数 $k = 0.0033 \text{ min}^{-1}$ ，降解半衰期 $t_{1/2} = 210 \text{ min}$ 。

3 讨论

a. 研究表明大鼠血浆对 PDDZ 降解速度非常快。将 PDDZ 自组装体系加入到大鼠血浆中后立即取样进行分析，PDDZ 已完全降解成原药 AZT，但它在家兔血浆中的降解速度稍慢，通常 1 h 内可全部降解，这是因为大鼠血浆中酯酶的活性比其他哺乳动物高 10 倍以上^[11-12]。在所设计的体内试验中，由于 PDDZ 自组装体系是以静脉注射方式给药，因此，需要了解其在血浆中的降解情况，在稳定性实验中使用 20%(φ)的家兔血浆，使 PDDZ 自组装体系在血浆中的降解速率放慢，这也为体内试验中模型动物的选择奠定了基础。

b. 文献[13]报道，AZT 很容易降解成胸腺嘧啶。在 37 的水浴中，PDDZ 自组装体系在家兔血浆中于 1 h 内完全降解成 AZT，而未检测到 AZT 的降解产物胸腺嘧啶。进一步的实验表明，PDDZ 的降解产物为 AZT，不生成 AZT 的降解产物胸腺嘧啶(图 3)，其原因是 PDDZ 自组装体系在家兔血浆中受酯酶进攻，断裂酯键，释放出原药 AZT。因为体内细胞中富含各种酶系统，所以推测 PDDZ 自组装体系在靶向单核巨噬细胞后，可以很快地释放原药 AZT，达到治疗浓度，但其靶向性及释药特点还需体内实验的进一步证明。

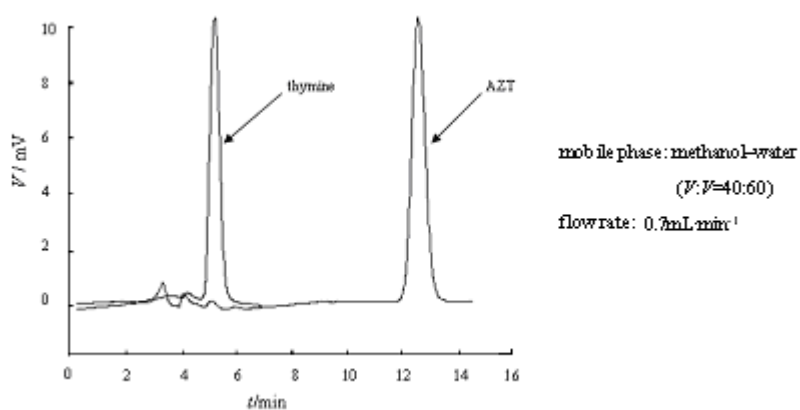


Fig. 3 Chromatograms of AZT comparing with thymine

4 结论

PDDZ 自组装体系克服了去羟肌苷胆固醇基前药(CS-ddI)药质体在体内不能有效地释放出原药，降解半衰期过长的缺点^[14]，在一定程度上证明了该设计思路的合理性。双头基两亲性前药自组装体系的高度分散特性使其易被巨噬细胞吞噬，靶向单核巨噬细胞系统；双倍的载药量使靶细胞内药物浓度增大，这一特点可显著改善 AZT 引起的毒副作用。双头基两亲性前药自组装体系作为一种新型的药物传递系统，为抗 HIV 感染的治疗提供了全新的思路。

参考文献:

- [1] 金义光, 艾萍, 李森, 等. 阿昔洛韦药质体的制备和性质[J]. 中国医药工业杂志, 2005, 36(10): 617-621.
- [2] 金义光, 艾萍, 佟丽, 等. 新型靶向制剂阿昔洛韦药质体的家兔体内的研究[J]. 中华临床医药, 2004, 5(22): 1-3.
- [3] 金义光, 候新朴. 基于脂质前药的自组装药物传递系统[J]. 中国医药工业杂志, 2005, 36(3): 185-189.
- [4] 吕庆, 贡浩飞, 刘鸣华. 双头基两亲分子研究进展[J]. 化学进展, 2001, 13(3): 161-166.
- [5] 赵小莉, 黄建滨, 李子臣, 等. Bola 型表面活性剂 1. 表面性质与胶团[J]. 日用化学工业, 2000, 30(5): 26-29.
- [6] 赵小莉, 黄建滨, 李子臣, 等. Bola 型表面活性剂 2. Bola 化合物囊泡[J]. 日用化学工业, 2000, 30(6): 20-25.
- [7] FUHRHOP J H, WANG T. Bolaamphiphiles[J]. Chem Rev, 2004, 104(6): 2901-2937.
- [8] 刘昌孝. 实用药物动力学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2003: 241-254.
- [9] JIN Yi-guang, TONG Li, AI Ping, et al. Self-assembled drug delivery systems 1. Properties and *in vitro/in vivo* behavior of acyclovir self-assembled nanoparticles (SAN) [J]. Int J Pharm, 2006, 309: 199-207.
- [10] GIAMMONA G, CAVALLARO G, FONTANA G, et al. Coupling of the antiviral agent zidovudine to polyaspartamide and *in vitro* drug release studies [J]. J Controlled Release, 1998, 54: 321-331.
- [11] JEMAL M, HAWATHORNE D J. Quantitative determination of BMS-186716, a thiol compound in rat plasma by high-performance liquid chromatography-positive ion electrospray mass spectrometry after hydrolysis of the methyl acrylate adduct by the native esterase [J]. J Chromatogr B, 1997, 698: 123-132.
- [12] GRUNDKER C. Cytotoxic luteinizing hormone-releasing hormone conjugates and their use in gynecological cancer therapy [J]. Eur J Endocrinol, 2000, 143: 569-572.
- [13] DUNGE A, SHARDA N, BALJNDER S, et al. Validated specific HPLC method for determination of zidovudine during stability studies[J]. J Pharm Biomed Anal, 2005, 37: 1109-1114.
- [14] 艾萍, 金义光, 陈大为. 去羟肌苷药质体的制备及其在大鼠体内行为的研究[J]. 中国药剂学杂志, 2005, 3(4): 227-234.

Stability of bolaamphiphilic prodrug of zidovudine in rabbit plasma

QI Ning-ning^{1,2}, JIN Yi-guang², YU Shan-jiang³, CHEN Da-wei¹

(1. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 2. Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China; 3. China National Center for Biotechnology Development, Beijing 100081, China)

Abstract: Objective To study the stability of self-assembled system of bolaamphiphilic prodrug of zidovudine(PDDZ) in rabbit plasma, and predict its behavior *in vivo*. **Methods** The degradation of self-assembled system of PDDZ in 20% rabbit plasma was studied at room temperature by HPLC methods. **Results** Half-life($t_{1/2}$) of PDDZ degradation in 20% rabbit plasma was 210 min and the parent drug AZT was the degradation product. **Conclusion** AZT is effectively released from self-assembled system of PDDZ *in vitro*.

Key words: pharmaceutics; stability; zidovudine; prodrug; bolaamphiphile; self-assembled systems

(本篇责任编辑: 秦 昕)