

• 研究简报 •

新型替加氟前体脂质体大鼠灌胃给药后的体内分布

高晓黎^{1*}, 木拉提·克扎衣别克², 温浩¹

(1. 新疆医科大学 药剂学教研室, 新疆 乌鲁木齐 830054; 2. 新疆中药民族药研究所, 新疆 乌鲁木齐 830002)

关键词: 前体脂质体; 片剂; 替加氟; HPLC; 体内分布

中图分类号: R943; R969.1 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2005)12 - 1139 - 05

In vivo distribution of a novel proliposomal preparation of tegafur following intragastric gavage to ratsGAO Xiao-li^{1*}, KZYBEK Murat², WEN Hao¹

(1. Department of Pharmaceutics, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China;

2. Xinjiang Institute of Chinese Materia Medica and Materia Medica of Ethnic Minorities, Urumqi 830002, China)

Abstract: Aim To evaluate *in vivo* distribution characteristics of a novel proliposomal preparation of tegafur in rats. **Methods** Concentrations of tegafur in tissues and plasma were measured by HPLC following intragastric gavage of the proliposomal preparation of tegafur (PL-FT207) or aqueous suspension of tegafur tablet (T-FT207) to rats. And the pharmacokinetic parameters including the area under the concentration-time curve (AUC), relative tissue efficiency and the maximum drug concentration were calculated. **Results** Following intragastric gavage of PL-FT207 or T-FT207 to rats, AUC was significantly increased in plasma, liver, kidney, colon and lung ($P < 0.01$) of PL-FT207 group in contrast to that of T-FT207 group, the relative tissue efficiencies of these tissues were 1.36 - 1.57, the maximum drug concentrations of brain and lung of PL-FT207 group were significantly declined ($P < 0.005$). **Conclusion** The novel proliposomal preparation of tegafur is able to promote drug absorption in gastro-intestine, increase drug distribution in kidney, liver, colon and lung, and decrease the maximum drug concentration in brain and heart, thus providing scientific basis for further studies on this preparation.

Key words: proliposome; tablet; tegafur; HPLC; *in vivo* distribution

前体脂质体 (proliposome), 又称重建脂质体, 系脂质体的前体形式, 用前与水水合即可分散成脂质体^[1]。经十几年的努力, 已有多种抗肿瘤药、抗生素、消炎镇痛药、生物制品、心血管系统用药及中药等制成前体脂质体制剂, 并取得良好效果。这些前体脂质体制剂主要是通过两种途径解决问题: ① 将脂质体混悬液加入适宜支撑剂经喷干或冻干制成干燥形式, 用前加水重建形成脂质体; ② 制备空白脂

质体前体, 作为水溶性药物载体, 用前与药物溶液混合, 形成含药脂质体。但这些方法使制备工艺更加复杂, 成本提高。

本课题组建立了一种全新的前体脂质体制备方法, 以适宜的溶剂、磷脂和附加剂, 以及适宜配比在无水状态下制备前体脂质体溶液, 服用前加水稀释或口服后进入体内, 接触体液, 即形成脂质体, 显示脂质体的优点。由于该前体脂质体在贮存过程中为无水状态的澄明液体, 是一种动力学稳定体系, 有效解决了脂质体的稳定性问题, 并且工艺简单, 成本降低, 应用价值增强, 可为前体脂质体的工业化生产奠定基础。

本研究选择抗肿瘤药替加氟为模型药。作者曾

收稿日期: 2005-02-15.

基金项目: 新疆维吾尔自治区高技术研究发展计划项目 (200311107).

* 通讯作者 Tel: 86 - 991 - 4362442, Fax: 86 - 991 - 4365980, E-mail: gxl@tefeng.com

对新型替加氟前体脂质体水合成脂质体后的形态、粒径分布、包封率和小肠吸收等进行了研究^[2-4]。

替加氟 (tegafur, FT-207) 是口服途径有效的抗代谢类抗肿瘤药, 在体内转变为氟脲嘧啶而起作用, 中国药典 (1995 版) 首次收载其原料及片剂, 目前替加氟片剂是临床应用最为广泛的口服抗肿瘤药之一。替加氟是时间依存性抗癌药, 即药物杀灭癌细胞的效能与接触细胞时间长短有关^[5], 因此, 延长替加氟在血、组织内滞留是有利的。为了增强替加氟疗效, 减少毒副作用, 国内外曾报道^[5] 制备了微乳、磁性微球、白蛋白微球等剂型, 但由于制备工艺复杂, 至今尚未推广应用。前体脂质体的研究为解决这个问题开拓了广阔的前景。

本文以替加氟片的混悬液为对照, 采用高效液相色谱法考察了替加氟前体脂质体灌胃给药后在大鼠体内的分布情况。

材料与amp;方法

仪器 Agilent 1100 型反相高效液相色谱系统, G1314A 型紫外检测器, G1316A 型柱温箱, Chemstation Revision-A. 09. 03 色谱数据处理系统, Kromasil ODS-1 填料柱 (4. 6 mm × 250 mm, 5 μm)。

药品与试剂 替加氟原料 (天津河北制药厂, 批号: T000418); 替加氟前体脂质体制剂 (自制, 澄清的橙黄色液体, 以下简称 PL-FT207); 替加氟片 (山东齐鲁兴华制药厂, 批号: 0303004, 以下简称 T-FT207); 甲醇 (色谱纯, 美国 BAKER), 其余试剂均为分析纯。

实验动物 Wistar 健康大鼠, 清洁 II 级, 雌雄兼用, (216. 1 ± 17. 8) g, 由新疆医科大学实验动物中心提供, 动物合格证号: 医动字第 16-003 号。

色谱条件 色谱柱: Kromasil ODS-1 填料柱 (4. 6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相: 甲醇-水 (24: 76), 流速: 1. 0 mL · min⁻¹, 柱温: 25 °C, 检测波长: 270 nm, 进样体积: 5 μL。

样品预处理方法选择 组织剖取后用蒸馏水清洗 3 遍, 滤纸充分吸干表面的水分, 每次精密称取组织同一部位 0. 50 g, 精确加入 3 倍量的等渗磷酸盐缓冲液 (pH 7. 4), 匀浆, 匀浆物离心 10 min (1 430 × g), 定量取匀浆物上清液或血浆 0. 4 mL, 转移至 10 mL 具塞离心管, 再加入等渗磷酸盐缓冲液 (pH 7. 4) 0. 5 mL 和乙酸乙酯 5. 0 mL, 振荡混合 30 s, 离心 10 min (1 430 × g), 上层有机相定量取 4. 0 mL, 移至另一 5 mL 玻璃离心管, 于 (80. 0 ± 1. 0) °C 水浴

挥干, 残渣加入流动相 100 μL, 震荡 1 min, 高速离心 10 min (10 000 × g), 进样 5. 0 μL。

标准溶液的配制 精密称取干燥恒重的替加氟原料药 (纯度 > 99%) 0. 100 g 于 100 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 配成 1 mg · mL⁻¹ 标准储备液, 再加水稀释成 0. 5, 1. 0, 2. 0, 10. 0, 20. 0, 80. 0 和 250. 0 μg · mL⁻¹ 系列标准溶液, 置于冰箱 (4 °C) 备用。

标准曲线的制作 取血浆或组织匀浆物 0. 4 mL, 精密加入替加氟标准溶液, 配成终质量浓度为 0. 125, 0. 5, 5. 0, 20. 0 和 62. 5 μg · mL⁻¹ 的血浆样品和终质量浓度为 0. 5, 1. 0, 2. 0, 10. 0, 20. 0 和 80. 0 μg · g⁻¹ 的组织样品, 按预处理方法处理后, 进行色谱分析, 以各样品替加氟的峰面积 (x) 对浓度 (y) 进行回归, 用加权最小二乘法计算 (权重因子 W = 1 / C)^[6], 得标准曲线方程。

方法回收率 分别吸取血浆或组织空白匀浆 0. 4 mL 于干燥离心管中, 加入低 (2. 0 μg · mL⁻¹)、中 (20. 0 μg · mL⁻¹)、高 (80. 0 μg · mL⁻¹) 3 种浓度的替加氟标准溶液, 配成不同浓度的血浆或组织样品, 按样品预处理法进行处理, 5. 0 μL 进样, 按标准曲线回归方程计算替加氟浓度, 测得浓度与加入浓度之比即为方法回收率。

精密度 分别吸取空白血浆或组织匀浆 0. 4 mL 于离心管中, 加入低 (2. 0 μg · mL⁻¹)、中 (20. 0 μg · mL⁻¹)、高 (80. 0 μg · mL⁻¹) 3 种浓度替加氟标准溶液, 分别配成不同浓度的血浆或组织样品, 经处理后以 5. 0 μL 进样, 计算日内及日间变异。

萃取率试验 分别吸取血浆或组织空白匀浆 0. 4 mL 于干燥离心管中, 加入低 (2. 0 μg · mL⁻¹)、中 (20. 0 μg · mL⁻¹)、高 (80. 0 μg · mL⁻¹) 3 种替加氟标准溶液 100 μL, 配成不同浓度的血浆或组织样品, 按样品预处理法进行处理, 最后残渣加入流动相 100 μL 溶解, 5. 0 μL 进样, 测定峰面积, 取平均值 A₁。上述替加氟标准液直接以 5. 0 μL 进样后测定峰面积 A₂。按公式 $E(\%) = A_1/A_2 \times 100\%$ 计算萃取回收率。

稳定性试验 含相同药量的各组织匀浆和血浆各数份, 置于冰箱中 (-20 °C), 分别于 0 和 30 d 取出, 按样品预处理和测定方法进行操作, 对前后测量值进行 t 检验。

大鼠组织分布试验 Wistar 大鼠 80 只, 随机分成 A、B 两组, 禁食 24 h 后 A 组灌胃给予水合后的 PL-FT207 混悬液 (以替加氟计, 54 mg · kg⁻¹), B 组灌胃给予 T-FT207 混悬液 (以替加氟计, 54 mg ·

kg^{-1}),分别在给药后 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 12.0 和 24.0 h 摘眼球取血,剖取肝、肾、脑、心、肺、结肠等组织,按样品预处理法处理后,测定血浆或各组织中的替加氟浓度,绘药-时曲线并计算相关药代动力学参数。

体内分布定量评价 采用曲线下面积、相对摄取率和最高药物浓度等^[7-10]参数来衡量两种制剂的体内分布特征。

比较曲线下面积和平均滞留时间 用 3P87 药代动力学程序,按统计矩法计算各种组织内药物经时变化曲线下面积 $\text{AUC}_{0-\infty}$ 和平均滞留时间 MRT,并用 PEMS 软件将两组数据进行两组 *t* 检验(方差不齐,则用 *t* 检验)。

计算相对摄取率 相对摄取率用于比较两种制剂对某一组织的靶向性,按统计矩法计算药物浓度-时间曲线平均值的曲线下面积 $\text{AUC}_{0-\infty}$,按公式^[11]计算相对摄取率。

比较组织中最高药物浓度 分析体内分布用的最高组织浓度可从药-时曲线中直接读出,用 PEMS 软件对平均数进行两组 *t* 检验(方差不齐,则用 *t* 检验)。

结果

1 方法学考察

1.1 色谱条件的选择 在本文的色谱条件下,替加氟具有良好的分离度,保留时间 $t_R = 7.4 \sim 7.6$ min,

空白血浆或组织样品的色谱图在替加氟出峰位置未见其他杂质峰,说明生物样品中内源性物质或其他杂质成分对替加氟的测定无任何干扰,各含药样品色谱图见图 1。

1.2 标准曲线 按标准曲线制备项下操作测定,得到血浆及各组织样品的标准曲线方程 ($y = A + Bx$),其 *A*, *B*, *r* 和线性范围见表 1。

Table 1 Calibration equations of tegafur in plasma and tissues

Tissue	A	B	r	Linear range / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ or $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$
Plasma	0.038 5	0.025 1	0.999 8	0.12 - 62
Brain	0.043 9	0.100 2	0.995 2	0.5 - 80
Heart	0.072 1	0.098 7	0.997 9	0.5 - 80
Lung	0.165 7	0.094 9	0.991 9	0.5 - 80
Liver	- 0.126 5	0.096 7	0.998 9	0.5 - 80
Kidney	- 0.381 0	0.107 7	0.999 1	0.5 - 80
Colon	- 0.098 4	0.107 5	0.998 1	0.5 - 80

1.3 回收率与精密度 血浆、脑、心、肺、肝、肾和结肠中药物在低、中、高 3 个水平上的平均回收率 (%) 分别为 105.22, 100.25, 97.26, 115.57, 102.10, 104.80 和 104.13, 相对标准偏差 (%) 分别为 4.23, 9.62, 6.22, 5.68, 5.66, 5.13 和 8.96。以上样品的日内精密度 RSD: 0.21% ~ 5.00% ($n = 5$), 日间精密度 RSD: 0.66% ~ 12.29% ($n = 5$)。

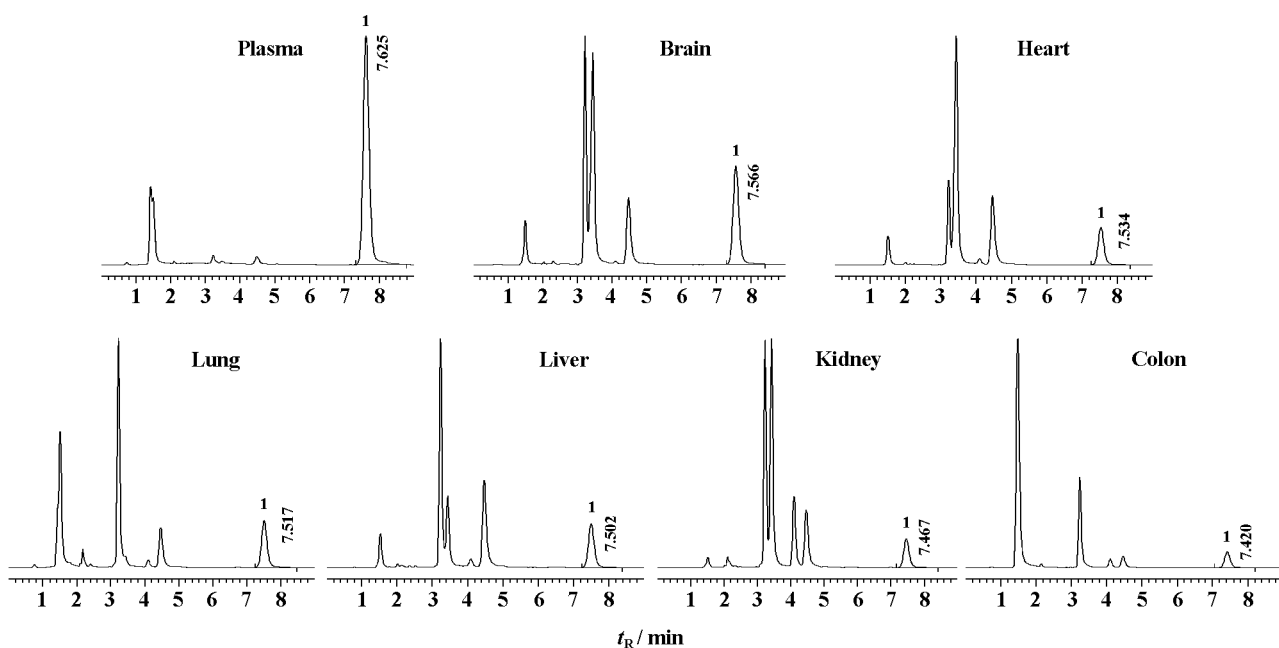


Figure 1 HPLC chromatograms of blank plasma or tissues spiked with $20 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ tegafur. The retention time was 7.4 - 7.6 min (peak 1: tegafur)

1.4 萃取率 血浆、脑、心、肺、肝、肾和结肠中药物在低、中、高 3 个水平上的平均萃取率 (%) 分别为 72.00, 70.72, 69.30, 83.09, 76.99, 71.64 和 70.35, 相对标准偏差 (%) 分别为 6.60, 8.45, 5.52, 8.54, 4.60, 9.86 和 8.06。

1.5 稳定性试验 对 d0 和 d30 的测定结果进行 t 检验, 差异无统计学意义, 说明药物在血浆或组织中至少可稳定 1 个月。

2 体内药物经时过程

PL-FT207 和 T-FT207 两种制剂以 0.02 mL·g⁻¹ 灌胃给予 Wistar 大鼠, 24 h 内取血浆、脑、心、肺、肝、肾、结肠等组织, 按样品处理法进行处理, 用 HPLC 法测定血浆或组织内替加氟的浓度经时变化, 结果见图 2。

3 药物体内分布特征的评价

3.1 曲线下面积和平均滞留时间 PL-FT207 组和

T-FT207 组各组织平均 AUC 和 MRT 见表 2。

3.2 相对摄取率 替加氟在两组动物血浆或组织中的相对摄取率见表 3。

Table 3 Relative targeting efficiency (τ_c) between PL-FT207 and T-FT207

Tissue	AUC _{0-∞} / μg·h·mL ⁻¹ or μg·h·g ⁻¹		τ_c
	PL-FT207	T-FT207	
Plasma	618	423	1.46
Brain	253	247	1.02
Heart	322	297	1.08
Lung	278	204	1.36
Liver	399	273	1.46
Kidney	462	295	1.57
Colon	256	188	1.36

3.3 组织中最高药物浓度 两种制剂灌胃给予大鼠后血浆或组织中最高药物浓度见表 4。

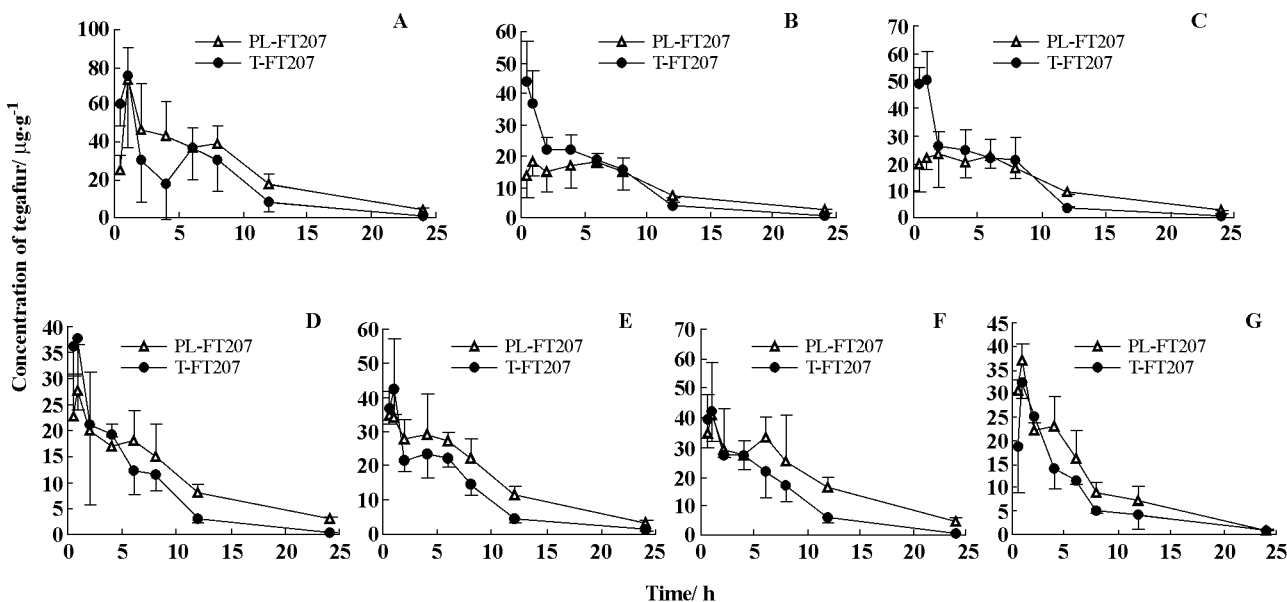


Figure 2 Tissue (or plasma)-concentration vs time curves after ig administration of PL-FT207 or T-FT207 to rats (n=5). A: Plasma; B: Brain; C: Heart; D: Lung; E: Liver; F: Kidney; G: Colon

Table 2 Comparison of AUC and MRT between PL-FT207 and T-FT207 (n=5, $\bar{x} \pm s$)

Tissue	AUC _{0-∞} / μg·h·mL ⁻¹ or μg·h·g ⁻¹		p	MRT/h		p
	PL-FT207	T-FT207		PL-FT207	T-FT207	
Plasma	618 ± 68	423 ± 59	<0.002	8.6 ± 1.1	5.4 ± 1.2	<0.002
Brain	253 ± 37	247 ± 19	>0.5	10.5 ± 1.6	5.6 ± 0.4	<0.001
Heart	322 ± 35	297 ± 38	>0.2	9.8 ± 0.8	5.3 ± 0.7	<0.001
Lung	278 ± 34	204 ± 15	<0.005	10.1 ± 1.5	5.2 ± 0.4	<0.001
Liver	399 ± 58	273 ± 28	<0.005	9.3 ± 1.2	6.5 ± 0.5	<0.002
Kidney	462 ± 100	295 ± 29	<0.01	10.3 ± 1.6	5.7 ± 0.4	<0.001
Colon	256 ± 19	188 ± 30	<0.002	6.7 ± 0.7	6.9 ± 0.4	>0.5

Table 4 Comparison of maximum drug concentration between PL-FT207 and T-FT207 ($n=5$, $\bar{x} \pm s$)

Tissue	$C_{max} / \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ or $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$		P
	PL-FT207	T-FT207	
Plasma	73 \pm 4	77 \pm 12	>0.5
Brain	22 \pm 5	47 \pm 12	<0.005
Heart	29 \pm 7	54 \pm 6	<0.001
Lung	32 \pm 9	44 \pm 9	>0.05
Liver	42 \pm 12	44 \pm 4	>0.5
Kidney	47 \pm 10	47 \pm 8	>0.5
Colon	37 \pm 4	32 \pm 3	>0.05

讨论

本实验采用高效液相色谱法测定血浆和组织内的药物浓度,研究药物在大鼠体内的分布特征。经过方法学考察,该方法灵敏度高、重现性好、专属性强、萃取率较高,而且生物样品在贮存过程中较稳定,完全可以满足替加氟体内分析的要求。

从药代动力学参数中可看出,前体脂质体与普通片剂混悬液相比,相同剂量给药后,药物在血、肝、肾、结肠、肺的曲线下面积(AUC)显著增高(分别为 $P < 0.002$, $P < 0.005$, $P < 0.005$, $P < 0.01$, $P < 0.002$),相对摄取率 1.36 ~ 1.57,说明前体脂质体可明显提高药物在这些组织器官中的分布,而两种制剂在脑和心的 AUC 无明显差异 ($P > 0.5$ 和 $P > 0.2$),相对摄取率接近于 1,但前体脂质体组脑和心内最高药物浓度显著低于片剂组(分别为 $P < 0.005$ 和 $P < 0.001$),说明前体脂质体制剂与普通片剂的混悬液相比明显增加了替加氟的胃肠道吸收,而且在肾、肝、肺、结肠等脏器组织中的分布亦明显增加;同时有效地降低了脑和心中最高药物浓度。

药物在肝、肾、肺等网状内皮系统和结肠中的曲线下面积的增加有利于提高其在这些组织中的抗肿瘤作用,达到高效的目的。而脑和心中最高药物浓度的明显下降可能有利于降低替加氟对神经系统和心脏的毒性,由于替加氟有一定的神经毒性,因而阻止药物向脑的转运降低药物在脑的分布必然是降低毒性的重要手段。

从 MRT 参数中可见前体脂质体组在血浆、脑、心、肝、肺、肾的平均滞留时间均明显大于片剂混悬液组,表明脂质体缓释性很好,但同时也提示需慎重研究和设计脂质体给药方案,避免药物在体内的蓄积。

脂质体常规的用药途径是注射给药,有很多研究显示,脂质体制剂注射给予动物或人体后具有明显的组织靶向性,而本研究结果表明,口服脂质体制剂不但改善药物的胃肠道吸收还可改变药物在组织中的分布,达到提高疗效,降低毒副作用的目的,为该制剂的进一步研究提供了科学依据。

References

- [1] Suk JC. Future drug delivery research in South Korea [J]. *J Control Release*, 1999, **62**(1-2): 73-79.
- [2] Gao XL, Ji XM. Determining the trap efficiency of liposome using sephadex column chromatography [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2003, **38**(7): 515-517.
- [3] Gao XL, Ji XM. Study on small intestinal absorption of tegafur new proliposome in rat [J]. *Northwest Pharm J* (西北药学杂志), 2003, **18**(5): 214-215.
- [4] Gao XL, Ji XM, Xie YY. Discussion on method of employing transmission electron microscope (TEM) to observe particle medication agents [J]. *J Xinjiang Med Univ* (新疆医科大学学报), 2003, **26**(2): 108-110.
- [5] Zhao ZD, Liang GY, Zhou YK, et al. Preparation of tegafur albumin microspheres [J]. *Guangdong Pharm J* (广东药学), 2000, **10**(3): 19-22.
- [6] Zhong DF. Several problems involved in establishing standard curve for biological samples analysis using weighted least square method [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1996, **16**(5): 343-345.
- [7] Townsend RW, Zutshi A, Bekersky I. Biodistribution of 4- ^{14}C cholesterol-ambisome following a single intravenous administration to rats [J]. *Drug Metab Dispos*, 2001, **29**(5): 681-685.
- [8] Krishna R, Webb MS, Onge GS, et al. Mayer liposomal and nonliposomal drug pharmacokinetics after administration of liposome-encapsulated vincristine and their contribution to drug tissue distribution properties [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001, **298**(3): 1206-1212.
- [9] Jin F, Krzyzanski W. Pharmacokinetic model of target-mediated disposition of thrombopoietin [J]. *AAPS Pharm Sci*, 2004, **6**(1): 1-8.
- [10] Yang K, Wen YM, Wang CM, et al. The study of cucurbitacin BE poly(lactic acid) nanoparticles delivering cucurbitacin BE to metastasized cervical lymph nodes in mice with oral cancer [J]. *West China J Stomatology* (华西口腔医学杂志), 2003, **21**(6): 477-480.
- [11] Bi DZ. *Pharmaceutics* (药剂学) [M]. 4th Ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2001. 450.