



# 羟喜树碱脂质体的制备及其大鼠体内组织分布的研究

赵志英<sup>1</sup>, 谢俊<sup>2\*</sup>, 刘文一<sup>2</sup>, 周建平<sup>3</sup>

(1. 中国药科大学 中药学院, 江苏 南京 210009; 2. 金陵药业股份有限公司技术中心, 江苏 南京 210009; 3. 中国药科大学 药剂教研室, 江苏 南京 210009)

**[摘要]** 目的: 研制小粒径羟喜树碱(hydroxycamptothecin, HCPT)脂质体并考察其在大鼠体内的组织分布。方法: 采用改良溶剂注入法制备 HCPT 脂质体, 考察其包封率、形态、粒径、Zeta 电位等; 利用荧光分光光度法进行胆固醇-磷脂比例筛选并进行脂质体相变温度的测定; 采用 LC-MS/MS 分别测定大鼠尾静脉注射 HCPT 脂质体和普通注射液后(5 mg·kg<sup>-1</sup>)不同时间点各组织中的药物浓度。结果: 在所选工艺条件下, HCPT 脂质体外观圆整呈球状, 平均粒径(180.5 ± 4.5) nm, Zeta 电位-(32.1 ± 1.3) mV, 包封率为(96.83 ± 2.32)%; 荧光测定结果显示, 最佳胆固醇-磷脂比例为 1.5:10, 制剂相变温度约为 32.5 °C; 与市售注射液相比, HCPT 脂质体在主要靶器官内的药物浓度显著增高, 且作用持续时间显著延长。结论: 采用改良溶剂注入法制备的 HCPT 脂质体粒径小、包封率高, 体内长循环特征明显。

**[关键词]** 羟喜树碱; 溶剂注入法; 组织分布; 粒径

羟喜树碱(hydroxycamptothecin, HCPT)属植物来源类细胞毒抗肿瘤药物, 可选择性的抑制拓扑异构酶 I, 具有活性高、抗瘤谱广等特点。因该药物水溶性较差, 早期临床使用的 HCPT 制剂是通过内酯开环形成水溶性钠盐而达到临床治疗浓度, 不但降低了疗效, 而且会导致严重的毒副作用<sup>[1]</sup>。因此寻找有效的药物传递系统弥补药物自身缺陷就显得尤为重要。脂质体由于具有增加药物溶解度、保护药物活性结构、延长血浆滞留时间以及减少毒性等诸多优点而引起人们的广泛关注。

鉴于脂质体制剂属微粒给药系统研究范畴, 制剂粒径大小是影响其体内分布的关键因素之一<sup>[2-3]</sup>。故本研究采用改良溶剂注入法制备了小粒径 HCPT 脂质体, 并以市售制剂为对照进行了大鼠体内组织分布研究, 旨在进一步研究 HCPT 脂质体粒径变化对药物在体内的分布变化情况。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Zetasizer Nano ZS90 型激光粒度仪(英国马尔文公司); LC-2010C 型高效液相色谱仪(日本岛津); ATS-AH110D 型高压均质机(意大利 ATS 公司); Mini Pellicon 超滤系统(美国 Millipore 有限公司); F96 型荧光分光光度计(上海棱光技术有限公司); Quattro

micro 液相色谱-质谱联用仪(美国 Waters 公司); SpeedVac 2010 型离心浓缩系统(美国 Thermo 公司)。

### 1.2 试剂与动物

HCPT 原药(湖北浩信药业有限公司, 含量 > 98.8%), 注射用大豆磷脂(上海太伟制药有限公司, PC 含量 > 80%); 胆固醇(南京新百药业有限公司); HCPT 对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 100526-200301); CPT(内标, 中国药品生物制品检定所, 批号 100532-200401); 市售 HCPT 注射剂(湖北华源世纪药业有限公司, 标示量为 99.1%, 规格 2 mg/支); 甲醇、乙腈为色谱纯, 其余试剂均为市售分析纯。

SD 清洁级大鼠, 雌性, 体重 180 ~ 220 g, 中国药科大学动物室, 合格证号 SYXK(苏)2004-0010。

## 2 方法

### 2.1 脂质体包封率的测定

按已报道的葡聚糖凝胶分离法进行测定<sup>[3]</sup>, 按下式计算包封率(entrapment efficiency, EE):

$$EE = M_E / M_C \times 100\%$$

式中:  $M_E$  为包封于脂质体中的羟喜树碱的药物浓度,  $M_C$  为脂质体中包封与未包封的羟喜树碱的总药物浓度。所有样品均平行测定 3 次, 取其平均值。

### 2.2 HCPT 脂质体的制备

精密称取 HCPT 和辅料以一定比例溶于适量乙醇中, 置旋转蒸发器中干燥成膜后, 于 40 °C 保温条件下加入适量乙醇洗膜, 将所得类脂溶液匀速的注入 4 °C 的磷酸缓冲盐溶液(pH 4.5)中, 恒温搅拌 15

[稿件编号] 20100817003

[通信作者] \* 谢俊, Tel/Fax: (025) 83118529, E-mail: pisces314@

sohu.com



min,超滤法除去少量乙醇,得乳白色 HCPT 脂质体混悬液。将 HCPT 脂质体混悬液取出,置高压均质机中,采用 80 MPa 压力循环 5 次,使粒径达到要求,即得 HCPT 脂质体混悬液。

### 2.3 药脂比的筛选

按照 2.2 项下方法制备 HCPT 脂质体,固定其他因素不变,分别考察药脂比分别为 1:30,1:40,1:50,1:75,1:100 时脂质体的包封率,以确定合适的药脂比。

### 2.4 胆固醇/磷脂比例的筛选

鉴于 HCPT 具有荧光性质,故在处方 HCPT 50 mg,PC 2.5 g 基础上,采用荧光光谱法分别考察胆固醇/磷脂比例为 0.5:10,1:10,1.5:10,2:10 时所制 HCPT 脂质体样品的情况。测定条件<sup>[4]</sup>:激发波长 381 nm,发射波长 550 nm,狭缝 10 nm。

### 2.5 工艺验证

按最佳处方比例按照 2.2 项下方法制备 3 批 HCPT 脂质体混悬液,取样测定其包封率、粒径和 Zeta 电位。

### 2.6 脂质体相变温度的测定

取 HCPT 脂质体混悬液加水稀释制成含 HCPT 2 mg · L<sup>-1</sup> 的溶液,分别吸取该溶液 2.5 mL 于各密闭容器中,于不同温度条件下放置 12 h,取样按 2.4 项下方法测定其荧光强度变化。

### 2.7 脂质体形态观察

取 HCPT 脂质体混悬液,滴于带有支持膜的铜网上,放置几分钟后,用滤纸在边缘处吸去余液并晾干;再次用滴管吸取脂质体溶液,滴于铜网上并用滤纸在铜网边缘处吸去余液,待铜网自然干燥后进行投射电镜观察。

### 2.8 大鼠体内组织分布研究

**2.8.1 色谱条件<sup>[5]</sup>** 液相条件:Waters XTerra C<sub>18</sub> 色谱柱(2.0 mm × 150 mm,5 μm);流动相甲醇-10 mmol · L<sup>-1</sup> 醋酸铵(含 0.2% 冰醋酸)(55:45),等度洗脱;流速 0.2 mL · min<sup>-1</sup>;柱温 35 °C;进样量 5 μL。

质谱条件:反应离子检测(MRM),正离子模式;电喷雾离子化离子源(ESI);毛细管电压 3.50 kV;二级锥孔电压 3.00 V;透镜电压 Lens 0.1 V;离子源温度 120 °C;脱溶剂气温度 400 °C;锥孔气流量 50 L · h<sup>-1</sup>;脱溶剂气流量 500 L · h<sup>-1</sup>;碰撞室压力 0.35 MPa。

**2.8.2 血浆及组织样品处理** 大鼠眼眶取血后脱椎处死,血液直接收集到肝素抗凝管内备用;用生理盐

水洗净心、肝、脾、肺、肾、肠等组织浮血,滤纸吸干。各组织称重,其中肝、脾、肾按 0.05 L · g<sup>-1</sup> 加生理盐水匀浆,心、肺、肠按 0.02 L · g<sup>-1</sup> 加生理盐水匀浆。

取各组织匀浆液 0.5 mL(血液样品取 0.25 mL),分别加入内标溶液(0.4 g · L<sup>-1</sup> 的喜树碱甲醇溶液)30 μL,涡旋 60 s,加 0.5 mol · mL<sup>-1</sup> 盐酸 20 μL,涡旋 10 s,加乙酸乙酯 3 mL,涡旋 2 min,4 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 10 min,取上清液 1.5 mL,氮气吹干(45 °C),剩余物加流动相 200 μL 溶解,震荡 1 min。14 000 r · min<sup>-1</sup> 高速离心 5 min,取上清液 5 μL 进样分析。

**2.8.3 标准曲线及质量控制样品的制备** 分别量取 HCPT 系列浓度标准溶液 0.5 mL,各置 1.5 mL 离心管中,氮气吹干,精密量取各空白大鼠组织匀浆液 0.5 mL 及空白血浆 0.25 mL,配制成相当于 HCPT 浓度分别为 1,2,5,20,100,200,500,1 000 μg · L<sup>-1</sup> 的系列标准血浆及组织匀浆样品,按 2.8.2 项下方法操作后进样测定,记录峰面积,以 HCPT 与内标峰面积的比值  $R(A_i/A_j)$  为纵坐标,HCPT 浓度  $c(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$  为横坐标进行线性回归,求得各样品的标准曲线。同法制备 HCPT 在血浆及组织样品中的低(20 μg · L<sup>-1</sup>)、中(200 μg · L<sup>-1</sup>)、高(500 μg · L<sup>-1</sup>)3 个浓度的质量控制(QC)样品。

**2.8.4 试验设计** 取 SD 大鼠 36 只,随机分为 6 组,每组 6 只,分别设 5 min,1,3 h 3 个时间点,每个时间点含 HCPT 脂质体和 HCPT 注射液各一组。各大鼠尾静脉注射 5 mg · kg<sup>-1</sup> 试药后 5 min,1,3 h 时大鼠眼眶取血于肝素抗凝管内,取血后立即处死并剖取各组织脏器,包括心、肝、脾、肺、肾和肠,用生理盐水洗去表面浮血及内容物后用滤纸吸干。照 2.8.2 项下处理后,按上述测定方法进行检验,并计算各生物样品中药物浓度。

## 3 结果与讨论

### 3.1 处方中药脂比的确立

不同药脂比所制得的脂质体的包封率测定结果见表 1。

随磷脂用量的增加,脂质体包封率逐步提高;当 HCPT-PC 为 1:50 时,脂质体包封率可达 80% 以上;随药脂比的进一步增加,制剂包封率未见明显改善,故选取药脂比为 1:50 展开进一步处方筛选并考虑加入适量的膜稳定剂-胆固醇。

### 3.2 胆固醇/磷脂比例的筛选

表1 不同药脂比条件下的 HCPT 脂质体  
包封率( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

HCPT-PCEE	包封率/%
1:30	67.1 ± 2.8
1:40	76.5 ± 3.1
1:50	83.8 ± 2.5
1:75	82.6 ± 3.7
1:10	85.3 ± 2.3

随体系中胆固醇比例的变化,药物荧光强度呈规律性变化,见图1。当处方中未加入胆固醇时,脂质双层结构流动性较大,药物受激发后的荧光强度最强;当胆固醇/磷脂比例在 0.5:10 ~ 1.5:10 依次递增时,脂质双分子层趋于致密,膜流动性的降低,致使药物的荧光量子效率降低,而相应的荧光强度亦逐渐降低;当胆固醇/磷脂比例进一步提高时,药物荧光强度又有所增加,说明胆固醇用量较大时可能引起脂质双分子层膜的不对称性增加,定向排列的脂质膜紧密程度降低,膜的结构趋于松散。故确立本制剂处方最终选用胆固醇-磷脂为 1.5:10。

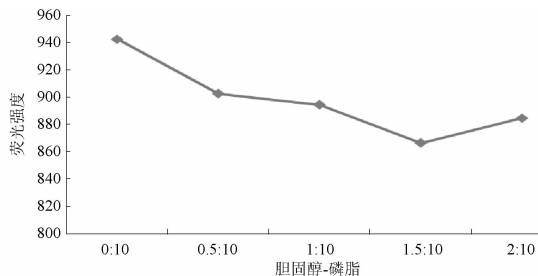


图1 不同胆固醇-磷脂比例条件下 HCPT 脂质体的荧光强度变化

### 3.3 工艺验证结果

按最佳处方工艺条件所得脂质体的平均包封率为(96.83 ± 2.32)%,平均粒径为(180.5 ± 4.5) nm,多分散指数 PDI 为(0.235 ± 2.2),Zeta 电位为-(32.1 ± 1.3) mV,表明上述最佳处方工艺条件可靠且所得脂质体粒径较小且均匀。

### 3.4 脂质体相变温度测定结果

结果显示,随孵化温度的升高,体系中药物的荧光强度逐渐增加,说明药物渗漏情况加剧。当体系温度达 32.5 °C 以上时,药物荧光强度无明显变化,提示脂质体相转变过程完成,而该制剂的相变温度亦相应为 32.5 °C 左右,见图2。

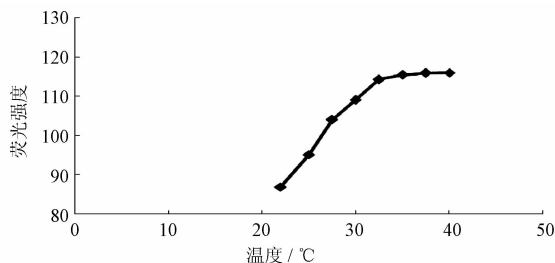


图2 HCPT 脂质体在不同温度条件下的荧光强度变化

### 3.5 脂质体电镜观察

透射电镜观察结果表明,脂质体样品外观圆整呈球状,脂质体特征明显,见图3。

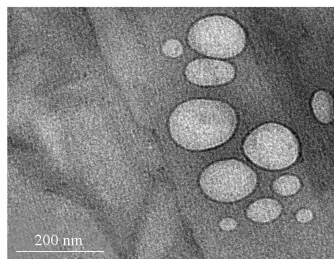


图3 HCPT 脂质体样品透射电镜图(×45 000)

### 3.6 大鼠体内组织分布研究

**3.6.1 方法专属性考察** 在本实验条件下,HCPT 及内标峰形良好,二者的保留时间分别为 3.0, 2.3 min,二者分离良好,且大鼠血浆及各组织中的内源性物质不干扰样品测定。

**3.6.2 标准曲线及线性范围** 以 HCPT 与内标峰面积的比值  $R(A_s/A_i)$  为纵坐标,HCPT 质量浓度  $C$  ( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 为横坐标进行线性回归,求得血浆及各组织标准曲线方程为:血浆  $R = 0.0196C + 0.0078$  ( $r = 0.9998$ );心  $R = 0.0195C + 0.0218$  ( $r = 0.9997$ );肝  $R = 0.0192C + 0.0113$  ( $r = 0.9998$ );脾  $R = 0.0188C + 0.0096$  ( $r = 0.9996$ );肺  $R = 0.0199C + 0.0135$  ( $r = 0.9999$ );肾  $R = 0.0202C + 0.0270$  ( $r = 0.9999$ );肠  $R = 0.0191C + 0.0353$  ( $r = 0.9998$ )。HCPT 检测线性范围 1 ~ 1 000  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,定量下限为标准曲线最低浓度点 1  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

**3.6.3 精密性与回收率** 大鼠血浆及各组织低、中、高(20,200,500  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )3个质量浓度的日内、日间精密密度 RSD 小于 9.75%,回收率大于 80%,见表2。



表2 回收率及精密度试验( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组织	20 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$		200 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$		500 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	
	回收率/%	RSD/%	回收率/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%
血浆	80.19 $\pm$ 5.33	6.61	83.96 $\pm$ 8.67	10.33	94.01 $\pm$ 4.15	4.41
心	92.09 $\pm$ 7.53	8.18	81.34 $\pm$ 5.88	7.23	102.29 $\pm$ 3.95	3.86
肝	87.11 $\pm$ 6.33	7.27	93.16 $\pm$ 6.83	7.33	98.89 $\pm$ 4.95	5.01
脾	93.29 $\pm$ 8.12	8.70	90.12 $\pm$ 4.98	5.53	101.15 $\pm$ 2.05	2.03
肺	84.07 $\pm$ 7.15	8.50	102.25 $\pm$ 7.87	7.70	91.25 $\pm$ 5.95	6.52
肾	90.23 $\pm$ 6.25	6.93	85.88 $\pm$ 5.65	6.58	104.21 $\pm$ 3.61	3.46
肠	88.55 $\pm$ 9.83	11.11	90.06 $\pm$ 5.07	5.63	94.01 $\pm$ 7.25	7.71

**3.6.4 稳定性考察** 大鼠血浆及各组织低、中、高(20,200,500  $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ )3个质量浓度样品反复冻融3次, -20  $^{\circ}\text{C}$ 冻存条件下10 d,室温放置24 h均稳定,RSD小于6.35%。

**3.6.5 大鼠体内组织分布** 大鼠尾静脉注射给药后血浆及组织中药物浓度的分布情况见表3。实验数据采用SPSS 13.0软件进行分析,2组间差异比较采用t检验。

表3 大鼠尾静脉注射HCPT脂质体和HCPT注射液后的组织分布情况( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组织	剂型	5 min	60 min	180 min
血浆	脂质体	3 776.7 $\pm$ 263.8 <sup>1)</sup>	194.4 $\pm$ 55.7 <sup>2)</sup>	19.4 $\pm$ 9.3 <sup>1)</sup>
	注射液	2 884.8 $\pm$ 133.2	75.6 $\pm$ 27.8	4.1 $\pm$ 2.8
心	脂质体	3 065.1 $\pm$ 268.4 <sup>2)</sup>	188.9 $\pm$ 57.5 <sup>2)</sup>	36.6 $\pm$ 24.7
	注射液	1 160.6 $\pm$ 251.2	74.3 $\pm$ 30.1	26.2 $\pm$ 15.2
肝	脂质体	25 743.0 $\pm$ 5 898.0 <sup>2)</sup>	2 891.7 $\pm$ 586.9 <sup>2)</sup>	921.2 $\pm$ 502.0 <sup>2)</sup>
	注射液	13 859.6 $\pm$ 4 118.4	607.5 $\pm$ 387.7	85.6 $\pm$ 25.7
脾	脂质体	32 125.3 $\pm$ 5 761.7 <sup>2)</sup>	1 723.6 $\pm$ 285.9 <sup>2)</sup>	605.0 $\pm$ 314.1 <sup>2)</sup>
	注射液	1 935.1 $\pm$ 511.4	289.3 $\pm$ 202.7	59.6 $\pm$ 57.1
肺	脂质体	5 733.2 $\pm$ 1 019.4 <sup>1)</sup>	438.4 $\pm$ 78.4 <sup>1)</sup>	207.3 $\pm$ 146.6 <sup>1)</sup>
	注射液	3 893.4 $\pm$ 973.6	224.5 $\pm$ 99.9	39.3 $\pm$ 16.0
肾	脂质体	22 642.1 $\pm$ 1 719.2 <sup>1)</sup>	1 619.7 $\pm$ 289.4 <sup>2)</sup>	130.0 $\pm$ 68.4 <sup>2)</sup>
	注射液	15 611.4 $\pm$ 3 296.4	862.9 $\pm$ 218.6	15.2 $\pm$ 23.9
肠	脂质体	3 339.2 $\pm$ 537.9 <sup>2)</sup>	823.9 $\pm$ 442.7	703.4 $\pm$ 728.0
	注射液	1 603.4 $\pm$ 314.2	371.9 $\pm$ 302.2	344.9 $\pm$ 224.8

注:与普通注射液组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ;血浆单位为 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,其他组织单位为 $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

结果显示,HPCT脂质体与市售注射液给药后的大鼠体内组织分布情况差异明显,主要靶器官内的药物浓度明显增高,且作用持续时间显著延长。给药后5 min,HCPT脂质体在脾脏中的富集作用最强,较普通注射液提高近16倍,而在其他组织脏器中的药物浓度均提高约1~2倍;于给药后1 h,HPCT脂质体主要的分布靶器官为肝、脾、肾,其药物浓度分别较普通制剂提高约4.7,5.9,1.8倍;给药后3 h,HPCT脂质体主要的分布靶器官为肝、脾、肠,其药物浓度分别较普通制剂提高约10,10.2,2倍。其原因可能是由于脂质体粒径的减小使其避免了被网状内皮系统摄取的可能,从而延长了其在血液系统中的滞留时间,进而增加了药物与各组织脏

器的接触时间所致<sup>[2]</sup>。

HCPT脂质体随粒径变化可使其体内的组织分布行为发生显著变化,对主要分布靶器官(如肝脏、肾脏和脾脏等)的组织特异性亦会发生相应改变。一般而言,大粒径HCPT脂质体具有明显的趋肝性,而小粒径HCPT脂质体则侧重于长循环特征的表现。研究结果也进一步说明,脂质体制剂的制备工艺选择及粒径控制手段对于药物的体内配置行为可能产生显著性的影响。

[参考文献]

[1] Zhou J J, Liu J, Xu B. Relationship between lactone ring forms of HC-PT and their antitumor activities[J]. Acta Pharm Sin, 2001, 22(9):827.



- [2] 周卫,平其能,王丽杰. 羟喜树碱脂质体的粒径对组织分布的影响[J]. 中国药科大学学报,2005,36(2):125.
- [3] Yu H Y, Liu R F. Hepatic uptake and tissue distribution of liposomes: influence of vesicle size[J]. Drug Dev Ind Pharm,1994,20(4):557.
- [4] 郭伟,谢俊,杨静,等. 羟基喜树碱脂质体的制备及质量评价研究[J]. 药学与临床研究,2008,16(4):275.
- [5] 刘文一,谢俊,周建平,等. 羟基喜树碱脂质体中药物对磷脂稳定性的影响[J]. 药学与临床研究,2009,17(4):306.
- [6] 苏佳,郝光涛,高洪志,等. HPLC-MS/MS 联用技术测定人血浆中9-硝基喜树碱的含量[J]. 解放军药学报,2008,24(3):223.

## Study on preparation and tissue distribution of hydroxycamptothecin liposomes

ZHAO Zhiying<sup>1</sup>, XIE Jun<sup>2\*</sup>, LIU Wenyi<sup>2</sup>, ZHOU Jianping<sup>3</sup>

(1. College of Traditional Chinese Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China;

2. Jinling Pharmaceutical Technology Center Co., Ltd., Nanjing 210009, China;

3. Department of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

[Abstract] **Objective:** To develop HCPT liposome with small diameter and to study the tissue distribution of the HCPT liposome in rats. **Method:** Modified solvent-injection method was used to prepare HCPT liposome. The entrapment efficiency, morphology, size and zeta potential were also investigated. The transformation temperature and the ratio of cholesterol to phospholipids were determined by fluorescence spectrophotometry. HCPT liposome and HCPT injection ( $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) were injected by tail vein in mice, respectively. The tissue concentrations of HCPT were determined by LC-MS/MS. **Result:** Under selected process conditions, the HCPT liposomes were spherical and integrated with the mean entrapment efficiency of  $(96.83 \pm 2.32)\%$ , the size of  $(180.5 \pm 4.5) \text{ nm}$  and the zeta potential of  $-(32.1 \pm 1.3) \text{ mV}$ . It showed that the optimum proportion of cholesterol to phospholipids was 1.5:10, the optimum transformation temperature was  $32.5 \text{ }^\circ\text{C}$ ; HCPT liposome at a dose of  $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  led to higher concentration and longer duration of action compared with HCPT injection on market. **Conclusion:** HCPT liposome prepared by solvent-injection method was characteristic of small mean diameter, high encapsulation efficiency and long circulation *in vivo*.

[Key words] HCPT; solvent-injection method; tissue distribution; particle size

doi:10.4268/cjmm20110415

[责任编辑 马超一]