

替莫唑胺白蛋白纳米粒

金 滔, 彭花楠, 姚金娜, 戴东波, 李范珠*

(浙江中医药大学药学院, 浙江杭州 310053)

摘要 :以牛血清白蛋白为载体, 采用高压均质法制备替莫唑胺白蛋白纳米粒, 并运用脑微透析技术, 考察该纳米粒经大鼠尾静脉注射给药后的脑内递药特性。结果表明, 白蛋白纳米粒形态圆整, 平均粒径为 (117.60 ± 3.40) nm, ζ 电位为 (-14.70 ± 3.51) mV, 包封率与载药量分别为 $(52.16 \pm 2.23)\%$ 和 $(5.33 \pm 0.10)\%$ 。替莫唑胺白蛋白纳米粒组的 t_{\max} 和 $AUC_{0 \rightarrow t}$ 比其溶液剂组显著提高, 但 c_{\max} 无显著差异。结果提示本品可延长药物在脑内的持续时间, 促进药物的脑内吸收, 有望成为替莫唑胺脑部递药的有效载体。

关键词 :替莫唑胺; 白蛋白纳米粒; 高压均质法; 脑内递药; 脑微透析技术

中图分类号: R944.9 文献标志码: A 文章编号: 1001-8255(2013)01-0041-05

Preparation and Brain Delivery Evaluation of Temozolomide-loaded Albumin Nanoparticles

JIN Tao, PENG Huanan, YAO Jinna, DAI Dongbo, LI Fanzhu*

(College of Pharmaceutical Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053)

ABSTRACT: Temozolomide-loaded albumin nanoparticles were prepared by high pressure homogenization method with bovine serum albumin as carrier material. The brain delivery behaviors of the prepared nanoparticles iv administrated to rats were investigated by brain microdialysis technique. The results showed that the products were spherical with the average diameter of (117.60 ± 3.40) nm, ζ poteineal of (-14.70 ± 3.51) mV, encapsulation efficiency of $(52.16 \pm 2.23)\%$ and drug loading of $(5.33 \pm 0.10)\%$. The t_{\max} and $AUC_{0 \rightarrow t}$ of temozolomide-loaded albumin nanoparticles were significantly improved compared with the temozolomide solution, while c_{\max} had no significant difference. The results suggested that the nanoparticles could extend the retention time in brain and increased the drug absorption in cerebral fluids. Albumin nanoparticles could be a potentially effective carrier for brain delivery of temozolomide.

Key Words: temozolomide; albumin nanoparticle; high pressure homogenization method; brain delivery; brain microdialysis technique

替莫唑胺 (temozolomide, **1**) 是用于治疗成人顽固性多形性脑胶质细胞瘤的烷化剂类药物^[1]。但由于 **1** 在血液中半衰期只有 1.6 ~ 1.8 h, 须以较高频率给药才能达到治疗效果, 同时还会引起微射流

不良反应, 如骨髓抑制、咽疮风、恶心、呕吐及头痛等, 故临床应用受限^[2,3]。白蛋白纳米粒 (albumin nanoparticles) 系一种应用较广的抗肿瘤药载体, 易被肿瘤组织和炎症组织摄取, 不仅有缓释、靶向作用, 还具有无免疫原性、生物相容性好、安全低毒等优点^[4]。载药白蛋白纳米粒具有实体瘤组织高通透性和滞留效应 (EPR 效应), 可促进其在肿瘤组织的选择性分布, 增加药效并减轻不良反应^[5]。本研究以牛血清白蛋白 (BSA) 为载体材料, 采用高压均质法^[6] 制备 **1** 白蛋白纳米粒, 并采用脑微透析技术^[7], 研究其脑内递药特性。

1 仪器与试药

收稿日期: 2012-07-25

基金项目: 浙江省新世纪151人才工程、浙江省卫生高层次创新人才培养工程

作者简介: 金 滔(1987-), 男, 硕士研究生, 专业方向: 药物新剂型与新技术研究。

Tel: 0571-86633173

E-mail: jin77523@sina.com

通信联系人: 李范珠(1964-), 男, 教授, 博士生导师, 从事药物新剂型与新技术研究。

Tel: 0571-86633030

E-mail: lifanzhu@zjtcn.net

微射流高压均质机(上海惠翼代理www.huiyi-fluid.com)型台式冻干机(美国Labconco公司); PSS型激光粒度测定仪(上海惠翼代理www.huiyi-fluid.co)透析袋(上海绿鸟科技发展有限公司, 截留分子量8 000~14 000); 微透析脑立体定位架及实验装置系统和微透析脑探针

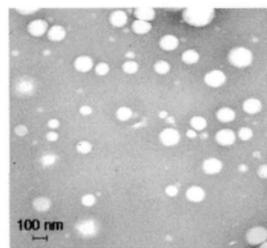


图 1

图 1 1 白蛋白纳米粒的透射电镜照片(×40 000)

1 原药(武汉富驰生物科技有限公司, 含量>99%, 批号110415); BSA(北京索莱宝科技有限公司, 含量>98%, 批号109K1542); 中碳链三甘酯(GTCC, 北京凤礼精求商贸有限责任公司, 批号20100423); 人工脑脊液/mg·ml⁻¹: NaCl 8.059, NaHCO₃ 0.084, KCl 0.373, CaCl₂·2H₂O 0.147, MgCl₂·6H₂O 0.203, NaH₂PO₄ 0.138, pH 7.4; 复方氯化钠溶液(杭州民生药业有限公司, 规格500 ml, 批号31107291); 甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

清洁级SD大鼠[(250±10)g, 雄性, 本校实验动物中心, 合格证号SCXK(沪)2007-0005]。所有动物试验均按照本校动物饲养和使用指南进行。

2 方法与结果

2.1 1 白蛋白纳米粒的制备

称取BSA 2.5 g溶于水50 ml中, 加0.05 mol/L枸橼酸调至pH 5.4, 构成水相, 并加入过量**1**溶解至饱和; 另取**1**原药150 mg、二氯化碳2 ml和GTCC 200 mg混合后构成油相。将水相快速加至油相中, 搅匀后制得初乳。置高压均质机中, 750 psi压力下循环10次。减压蒸除溶剂, 冻干即得**1**白蛋白纳米粒。

2.2 形态与粒径

1白蛋白纳米粒冻干品外观为疏松的粉末状, 用生理盐水复溶后, 将其滴于铜网上, 静置10 min后用滤纸片吸干, 再滴加2%磷钨酸溶液负染2 min, 自然挥干, 透射电镜下观察纳米粒形态, 结果显示**1**白蛋白纳米粒形态圆整, 大小均匀, 见图1。

室温条件下, 用PSS激光粒度测定仪(上海惠翼代理www.huiyi-fluid.com)测得3批**1**白蛋白纳米粒的平均粒径为(117.60±3.40) nm, 为(0.08±0.01), ζ电位为(-14.70±3.51) mV。

2.3 包封率与载药量的测定

2.3.1 分析方法的建立

色谱柱 Agilent Extend C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm,

5 μm) 1.0 ml/min; 柱温 25 °C; 检测波长 329 nm; 进样量 20 μl。

标准曲线: 精密称取减压干燥至恒重的**1** 10 mg, 置 100 ml 量瓶中, 用 0.5% 乙酸溶解并定容, 得 100 μg/ml 的**1** 标准贮备液, 再用 0.5% 乙酸稀释成 2、5、10、20、50 和 70 μg/ml 系列浓度的标准溶液。按“2.3.1”项下色谱条件测定, 以峰面积 *A* 为纵坐标, **1** 浓度 *c* 为横坐标进行线性回归, 得标准曲线方程为 $A=61.091 5c-5.375 4$, $r=0.999 9$, 表明药物浓度在 2~100 μg/ml 范围内与峰面积线性关系良好。

2.3.2 包封率与载药量

精密量取**1**白蛋白纳米粒混悬液2 ml, 置已处理的透析袋内, 放入0.5%乙酸100 ml中, 在室温下透析1 h后取透析液进样测定, 由标准曲线方程计算游离药物量。同时用新鲜等量释放介质替换原释放介质, 同法每隔2 h计算一次游离药物的量。结果透析7 h后透析液中药物浓度达到最大值, 表明游离药物已基本释放完全, 此时计算得到纳米粒中全部游离药物的量, 记作 W_1 。另精密量取**1**白蛋白纳米粒混悬液0.5 ml, 经胃蛋白酶反应, 用0.5%乙酸定容至100 ml, 测得纳米粒中的总药物量, 并折算成纳米粒混悬液2 ml中总药物量, 记作 W_0 。将**1**白蛋白纳米粒混悬液2 ml冻干后称重, 记作 W_t 。每个样品重复测定3次, 计算得**1**白蛋白纳米粒的包封率EE为(52.16±2.23)%, 载药量DL为(5.33±0.10)%。

2.4 脑内递药特性研究

2.4.1 脑透析液中**1**分析方法的建立

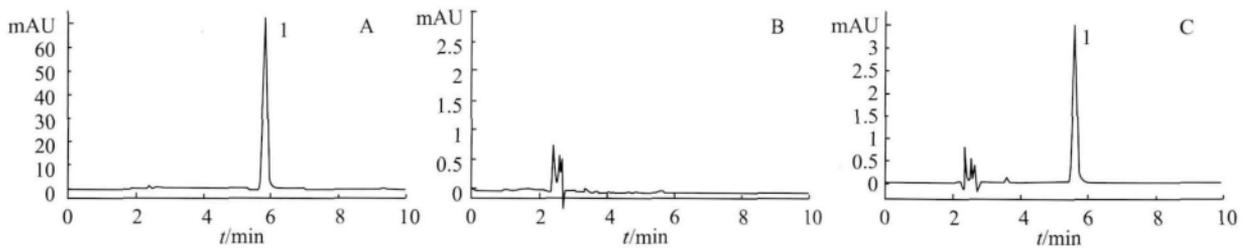
色谱条件同“2.3.1”项。

标准曲线: 精密称取减压干燥至恒重的**1** 2 mg,

置 100 ml 量瓶中，用 0.5% 乙酸溶解并定容，得 20 μg/ml 的 **1** 标准贮备液。以人工脑脊液将其稀释成 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1 和 2 μg/ml 系列浓度标准溶液，分别进样测定，以峰面积 *A* 为纵坐标，**1** 浓度 *c* 为横坐标进行线性回归，得标准曲线方程 $A=66.109\ 0c+1.306\ 5$ ， $r=0.997\ 8$ ，表明 **1** 在 0.1 ~

2 μg/ml 范围内与峰面积线性关系良好。

专属性考察：分别取 **1** 标准溶液、空白透析液和大鼠尾静脉给予 **1** 白蛋白纳米粒 30 min 后所收集的透析液样品进样测定，考察专属性。结果表明，透析液中内源性物质对样品的测定无干扰，方法专属性较好（见图 2）。



A: **1** 标准品溶液 (1 μg/ml), B: 空白透析液, C: 大鼠尾静脉给予 **1** 白蛋白纳米粒 30 min 后收集的透析液样品

1-1

图 2 HPLC 色谱图

精密度及方法回收率测定：精密移取低、中、高浓度 (0.2、0.6 和 1 μg/ml) 的含 **1** 透析液适量，按“2.3.1”项下色谱条件测定，分别在 1 d 内测定 5 次和连续 5 d 测定，计算得低、中、高浓度溶液的日内和日间 *RSD* 分别为 6.41%、2.44%、3.12% ($n=5$) 和 7.62%、1.71%、2.60% ($n=5$)；计算得样品方法回收率分别为 93.33%、94.73% 和 96.80%，*RSD* 分别为 2.95%、3.16% 和 1.71% ($n=3$)。

2.4.2 大鼠脑微透析手术

SD 大鼠以 10% 水合氯醛 (300 mg/kg) 腹腔注射麻醉，将头固定于大鼠脑立体定位仪上，暴露颅骨，定位前囟，并以前囟为微透析探针定位的参考点。在前囟后 5.2 mm、矢状线右旁开 5.1 mm 的骨表面处，用牙科高速钻机在颅骨上钻开一能嵌入微透析探针底座 (MD-2251) 的小口。将微透析探针埋入脑骨表面下 4.0 mm，即右侧海马，并用牙托粉和颅骨螺钉将底座固定于颅骨上。术后大鼠单笼生理恢复 7 d [温度 (25±1) °C；相对湿度 50%~70%；昼夜 12 h 人工交替；自由饮食和饮水]。

2.4.3 微透析脑探针在体回收率的测定

运用反微透析法^[8]测定 **1** 脑微透析探针的在体回收率。按“2.4.2”项下方法操作，以含 **1** 浓度

分别为 0.2、0.6 和 1.0 μg/ml 的人工脑脊液对大鼠进行灌流，流速为 2 μl/min，每 30 min 收集透析液 60 μl，共收集 8 h。按“2.3.1”项下色谱条件测定 **1** 浓度，按下式计算探针于右侧海马部位的在体回收率。

$$\text{在体回收率} / \% = \frac{c_{\text{per}} - c_{\text{dia}}}{c_{\text{per}} - c_{\text{BIF}}} \times 100\%$$

其中， c_{per} 、 c_{dia} 和 c_{BIF} 分别为透析液、灌流液和脑组织间液中 **1** 的浓度。在反微透析过程中，假设探针周围脑组织间液中 **1** 浓度近似为零 ($c_{\text{BIF}} \approx 0$)。所得 **1** 的平均在体回收率为 (19.09±1.15)%，用于脑内海马部位透析液中实际药物浓度的校正。

2.4.4 给药方案及样品采集

取“2.4.2”项下恢复后的大鼠 6 只，随机分为 2 组，每组 3 只，给药前禁食 12 h，自由饮水，两组分别尾静脉给予 **1** 溶液剂 (即 **1** 的乙酸溶液, pH 5) 和 **1** 白蛋白纳米粒混悬液 (**1** 白蛋白纳米粒冻干品加生理盐水复溶得到)，剂量以 **1** 计均为 8 mg/kg。以 5 μl/min 的流速向微透析脑探针内灌流复方氯化钠溶液，平衡 30 min 后，流速调为 2 μl/min，用自动恒温冷冻收集器每隔 15 min 连续收集透析液 9 h。收集结束后，麻醉大鼠，用 4% 多聚甲醛溶液心脏

灌注固定。取大鼠大脑 4 μm 冠状切片，显微镜下观察右侧海马部位。植入部位不正确的数据不予使用。透析液样品按“2.3.1”项下色谱条件测定，经过 1 的在体回收率校正后，得到各时间点的 1 实际浓度，绘制 1 在海马部位的药-时曲线，见图 3。

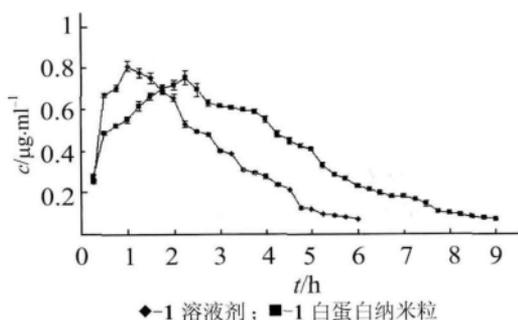


图 3 1 溶液剂和 1 白蛋白纳米粒经大鼠尾静脉注射给药后在海马部位的药-时曲线 (n=3)

2.4.5 数据分析

1 溶液剂和 1 白蛋白纳米粒的 t_{max} 和 c_{max} 以实测值计， $AUC_{0 \rightarrow t}$ 用梯形法计算。并采用统计学软件 SPSS 17.0 进行检验，比较组间差异，见表 1。

表 1 1 溶液剂和 1 白蛋白纳米粒经大鼠尾静脉注射给药后脑内药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

参数	1 溶液剂	1 白蛋白纳米粒
t_{max}/h	1.08±0.14	2.33±0.14 ¹⁾
$c_{max}/\mu g \cdot ml^{-1}$	0.82±0.02	0.76±0.03
$AUC_{0 \rightarrow t}/\mu g \cdot ml^{-1} \cdot h$	2.37±0.01	3.09±0.02 ²⁾

注：与 1 溶液剂相比，¹⁾ $P < 0.05$ ，²⁾ $P < 0.01$

3 讨论

本研究采用 高压均质法制备白蛋白纳米所运用的 NabTM 技术是以白蛋白作为基质和稳定剂，而非乳化剂。该技术利用高剪切力作用下产生的局部高热生成能使聚合物交联的超氧化物离子，氧化 BSA 中的二硫键，使其交联形成新的二硫键，从而在水不溶性药物周围形成交联的聚合物壳体，以此包裹药物而形成纳米粒^[9]。它可在没有任何表面活性剂或聚合物核心存在的情况下制备载药白蛋白纳米粒。

本处方中引入 GTCC 的目的是用作稳定剂。由于 1 在油、水中溶解性均较差，在制备完成后纳米粒混悬液不稳定，易出现沉淀，且该纳米粒的包封率较差，药物析出较多。若在油相中加入 GTCC，所得纳米粒混悬液体系均一、稳定，且包封率提高。这是由于纳米粒形成过程中，GTCC 作为油相在水中的分散较慢，包含药物的油相不易向外水相扩散，与 BSA 很少接触，白蛋白可在油滴周围交联形成包衣^[10]。

脑内递药试验结果显示，与 1 溶液剂相比，1 白蛋白纳米粒经 SD 大鼠尾静脉注射给药后，药物在脑内的 t_{max} 为 2.33 h，大于 1 溶液剂组的 1.08 h，说明药物包裹在纳米粒内释放相对缓慢，其达峰时间延迟，在脑内的持续时间延长；两种剂型的 c_{max} 没有显著性差异，可能是粒径较小的 1 白蛋白纳米粒与 1 原药均可跨血脑屏障^[11]，携带药物入脑量近似。而该纳米粒的 $AUC_{0 \rightarrow t}$ 为 3.09 $\mu g \cdot ml^{-1} \cdot h$ ，较 1 溶液剂组 2.37 $\mu g \cdot ml^{-1} \cdot h$ 增大，说明该纳米粒可促进药物在脑内的吸收。

微透析取样技术可在动物活体状态下连续采样，透析液样品无需处理，可直接快速、实时地检测药物浓度变化，减少了 1 在较长时间样品采集和处理过程中的降解损失，使检测结果更准确。海马区是脑胶质瘤主要病变部位之一，而脑微透析探针埋植于海马区是一种通用、可靠的方法^[12]。故本试验采用脑微透析在海马部位取样技术，考察 1 的脑内递药特性。文献^[13,14] 报道目前市售的脑微透析探针在体平均回收率为 10%~20%，本法在体回收率约 19%，符合条件。

参考文献：

[1] Stupp R, Gander M, Leyvraz S, et al. Current and future developments in the use of temozolomide for the treatment of brain tumours [J]. *Lancet Oncol*, 2001, 2(9): 552-560.
 [2] Patel M, McCully C, Godwin K, et al. Plasma and cerebrospinal fluid pharmacokinetics of intravenous temozolomide in non-human primates [J]. *J Neurooncol*, 2003, 61(3): 203-207.
 [3] Trinh VA, Patel SP, Hwu WJ. The safety of temozolomide

- in the treatment of malignancies [J]. *Expert Opin Drug Saf*, 2009, **8**(4): 493-499.
- [4] Kratz F. Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles [J]. *J Controlled Release*, 2008, **132**(3): 171-183.
- [5] Maeda H, Wu J, Sawa T, *et al*. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review [J]. *J Controlled Release*, 2000, **65**(1-2): 271-284.
- [6] 泽诺尼 M, 玛施奥 S. 制备紫杉醇和白蛋白的纳米颗粒的方法: 中国, 1911446A[P]. 2007-02-14.
- [7] Li F, Feng J, Cheng Q, *et al*. Delivery of ¹²⁵I-cobrotoxin after intranasal administration to the brain: a microdialysis study in freely moving rats [J]. *Int J Pharm*, 2007, **328**(2): 161-167.
- [8] Bagger MA, Bechgaard E. The potential of nasal application for delivery to the central brain—a microdialysis study of fluorescein in rats [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2004, **21**(2-3): 235-242.
- [9] Wang YB, Wang JC, Meng M, *et al*. Preparation and evaluation of docetaxel-loaded albumin nanoparticles for intravenous administration [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2010, **17**(3): 214-222.
- [10] 石莉, 邓意辉, 董晓辉, 等. 超声法制备齐多夫定碳酸胆固醇酯牛血清白蛋白纳米粒 [J]. 沈阳药科大学大学学报, 2008, **25**(10): 759-764.
- [11] Wohlfart S, Gelperina S, Kreuter J. Transport of drugs across the blood-brain barrier by nanoparticles [J]. *J Controlled Release*, 2012, **161**(2): 264-273.
- [12] 潘越芳, 李范珠. 脑微透析技术及其在脑内药动/药效学研究中的应用 [J]. 中国药物与临床, 2008, **8**(1): 5-8.
- [13] Cheng Q, Feng J, Chen J, *et al*. Brain transport of neurotoxin-I with PLA nanoparticles through intranasal administration in rats: a microdialysis study [J]. *Biopharm Drug Dispos*, 2008, **29**(8): 431-439.
- [14] Feng J, Li F, Zhao Y, *et al*. Brain pharmacokinetics of tetramethylpyrazine after intranasal and intravenous administration in awake rats [J]. *Int J Pharm*, 2009, **375**(1-2): 55-56.



罗欣药业举行新闻发布会

2012年12月,在第68届广州全国药品交易会召开之际,罗欣集团举行了隆重的“罗欣药业新闻发布会暨客户答谢会”。

会上,罗欣药业发布了2012年新上市品种头孢西酮钠原料及粉针剂(0.5 g、1.0 g),及仿制药品种盐酸法舒地尔原料及注射液(2 ml : 30 mg)、奥沙利铂原料及冻干粉针(50 mg、0.1 g)、盐酸吉西他滨原料及冻干粉针(1.0 g、0.2 g)、拉米夫定片(0.15 g)。这是罗欣药业始终坚持“科技兴企”、不断加大科技投入的结果,是迈向科技化、规模化的一个里程碑!

罗欣药业在“十二五”期间,共取得了国家“重大新药创制”科技重大专项“十二五”计划等7项国家级和31项省级科技成果,获得了国家博士后科研工作站、国家综合性新药研发技术大平台(山东)产业化示范企业等9个平台的支持,同时还获得了20多项社会荣誉。

2012年是罗欣药业实施“十二五”规划的关键之年,也是面对挑战,加快发展的一年。在药物研发方面,增强和沈阳药科大学等科研院所的紧密合作,充分发挥公司科技队伍的技能,加大科技投入。在产品销售方面,公司面对挑战和机遇,及时调整销售管理模式,细化管理,改变市场服务职能,达到与合作伙伴携手共赢的目标。在企业发展的同时,也积极为社会做出贡献,2012年1~10月罗欣药业已向国家贡献税金4亿多元。

展望2013年,集团董事长刘保起先生表示:罗欣药业将会坚持“罗欣药业、传递健康”的理念,为发展医药事业、振兴民族经济做出新的、更大的贡献!