

## HPLC 法测定壳聚糖-聚天冬氨酸-5-FU 纳米粒子在小鼠肝脏中的浓度

张丹瑛<sup>1</sup> 朱新宇<sup>1</sup> 董玲<sup>1Δ</sup> 王吉耀 沈锡中<sup>1</sup> 郑永丽<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 复旦大学附属中山医院消化科 上海 200032; <sup>2</sup> 复旦大学高分子科学系-聚合物工程教育部重点实验室 上海 200433)

**【摘要】** 目的 建立测定小鼠肝脏药物浓度的 HPLC 法, 比较凝胶化法制备的壳聚糖-聚天冬氨酸-5-氟尿嘧啶(CTS-Pasp-5-FU)纳米粒与 5-氟尿嘧啶原药在小鼠肝脏中药物浓度。方法 雄性健康昆明小鼠(KW)分为 2 组, 分别灌胃给予 5-FU 原药及其 CTS-Pasp 纳米粒, 灌胃后 0.25、1、2、4、6、8、12、16、24 和 48 h 10 个时间点取小鼠肝脏, 匀浆液用乙酸乙酯提取, 氮气挥干, 残渣用甲醇溶解后进样, HPLC 法测定 2 组给药组肝脏内药物浓度。结果 5-FU 原药组在肝脏中的药物峰浓度出现在灌胃后 2 h 左右。此后肝脏药物浓度逐渐降低, CTS-Pasp-5FU 纳米粒组经小鼠灌胃后, 肝脏药物浓度呈现出三峰型, 在 0.25 h 即达到一个药物峰浓度, 此后峰浓度分别出现在 4 h 和 16 h 左右, 16 h 时候达到最高峰, 此后逐渐下降, CS-Pasp-5FU 纳米粒的肝脏中药物峰浓度( $C_{max}$ )降低, 肝脏中药物浓度时间曲线下面积(AUC)明显增加。结论 CS-Pasp-5FU 纳米粒能延缓 5-FU 在肝脏内的分布。

**【关键词】** 5-氟尿嘧啶; 壳聚糖; 聚天冬氨酸; 高效液相色谱法, 肝脏药物浓度

**【中图分类号】** R 969.1 **【文献标识码】** A

### Determination of 5-fluorouracil level in mouse liver after intragastric administration of chitosan-polyaspartic acid-5-fluorouracil nanoparticles by means of HPLC

ZHANG Dan-ying<sup>1</sup>, ZHU Xin-yu<sup>1</sup>, DONG Ling<sup>1Δ</sup>,

WANG Ji-yao<sup>1</sup>, SHEN Xi-zhong<sup>1</sup>, ZHENG Yong-li<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> Department of Gastroenterology, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China;

<sup>2</sup> Key Laboratory of Molecular Engineering of Polymers, Ministry of Education- Department  
of Macromolecular Science, Fudan University, Shanghai 200433, China)

**【Abstract】 Objective** To establish HPLC assay for the determination of chitosan-polyaspartic acid-5-fluorouracil (5-FU) in mice liver, and to compare the drug concentration between 5-FU and CTS-Pasp-5FU in the liver. **Methods** One hundred and twenty Kunming mice were randomly divided into two groups. Each group was administrated with 5-FU or its CTS-Pasp nanoparticles. The liver samples were taken after 0.25, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 24 and 48 h. Then they were extracted with ethyl acetate and the solvent was evaporated to dryness with N<sub>2</sub>. The residue was dissolved with methanol. The separation was performed on a Dikma Inertsil ODS column (3.5 μm, 250 mm × 4.6 mm) with the mobile phase of acetonitrile-water (3:97) at a flow rate of 0.8 mL/min. UV detection wavelength was set at 273 nm. The internal standard was 5-Bru. **Results** The  $C_{max}$  of 5-FU group occurred within 2 h and decreased. The CTS-Pasp-5FU nanoparticles group's concentration curve was triple-apex, the apexes occurred around 0.25 h, 4 and 16 hours after the administration, then the concentration decreased. The nanoparticles groups'  $C_{max}$  of 5-FU in liver was lower than the 5-FU group, The half-life times( $t_{1/2}$ ) was prolonged and the areas under curve (AUC) were higher. **Conclusions** Compared to 5-FU, its

chitosan nanoparticles can improve the disposition in liver of 5-FU.

**【Key words】** 5-fluorouracil; polyaspartic acid; chitosan; high performance liquid chromatography; liver concentration

壳聚糖是天然多糖中唯一的碱性多糖,具有生物相容性,生物降解性,生物黏附性等特点<sup>[1]</sup>,其独特的理化、生物学性质使它非常适合作为药物控释的载体材料<sup>[2]</sup>,其纳米微粒极具应用前景<sup>[3]</sup>。既往研究表明聚天冬氨酸亦同样具有良好的生物相容性,生物体内可降解性且无毒副作用,也是一种理想的药物载体<sup>[4]</sup>,5-氟尿嘧啶(5-FU)是广谱的抗代谢类抗肿瘤药物,对消化道肿瘤有确切疗效<sup>[5]</sup>,临床上广泛用于消化道肿瘤的治疗,5-FU经胃肠吸收后,由肝门静脉系统进入肝脏,经单核巨噬细胞系统吞噬后再释放入全身血液循环。但其体内半衰期短(仅5~10 min),需要大剂量长期静脉滴注给药才能维持体内有效浓度。我们前期研究表明,采用离子凝胶化方法制备的壳聚糖-聚天冬氨酸-5-氟尿嘧啶(CTS-Pasp-5-FU)纳米粒,有效浓度时间延长<sup>[6]</sup>,半衰期为12.36 h,有可能克服5-FU半衰期短、短时间内血液浓度高所导致的毒副作用。为进一步验证CTS-Pasp-5-FU纳米粒子在肝脏内浓度是否与血药浓度有相似性,CTS-Pasp-5-FU在肝脏内是否有缓释作用,本实验建立了测定小鼠肝脏药物浓度的HPLC法,比较凝胶化法制备的CTS-Pasp-5-FU纳米粒与5-FU原药在小鼠肝脏中药物浓度差异。

## 材料和方法

**试剂与药品** 5-FU(纯度99%,上海旭东海普药业有限公司);5-溴尿嘧啶(5-BrU)(纯度98% Sigma公司);乙腈(色谱纯);乙酸乙酯(分析纯);CS-Pasp-5-FU纳米粒子(实验室自制)。

**实验动物** 健康雄性昆明小鼠120只,体重20~25 g,复旦大学上海医学院实验动物中心提供。

**色谱条件** 高效液相色谱仪:LC-4A HPLC。色谱柱 Dikma Inertsil ODS;5  $\mu$ m 250  $\times$  4.6 mm,紫外检测器:Shimadzu SPD-10A;流动相:乙腈-水(3:97),流速:0.8 mL/min,检测波长为273 nm,柱温:40  $^{\circ}$ C;,以5-BrU为内标,内标法定量,进样量80  $\mu$ L。

**动物模型的建立** 将小鼠随机分为2组:5-FU原药组,CS-Pasp-5-FU纳米粒组,每组60只,5-FU剂量为0.6 mg/只灌胃<sup>[7]</sup>。灌胃后0.25、1、2、4、6、8、12、16、24和48 h,共10个时间点,每组6只小鼠

处死取肝脏组织,-20  $^{\circ}$ C冰箱保存。

**标准曲线的制备** 取空白肝脏5个,生理盐水漂洗后用滤纸吸干,每份精密称重0.5 g,按2:1(2 mL/g)加入生理盐水后匀浆备用。分别加入50  $\mu$ g/mL 5-BrU内标液200  $\mu$ L,浓度分别为2、4、8、10、和40  $\mu$ g/mL的5-FU溶液200  $\mu$ L,乙酸乙酯3 mL于试管中,涡旋混合器振动10 min,高速离心(4 000 r/min)20 min,取上层乙酸乙酯层,氮气吹干,加入甲醇200  $\mu$ L溶解残渣,取80  $\mu$ L进样,平均操作3份,每个浓度测3次,记录峰面积,以5-FU浓度为横坐标,5-FU与5-BrU的峰面积比为纵坐标绘制标准曲线( $n=5$ )。

**肝脏样品的制备和预处理** 取不同时间点的2组肝脏组织,按上述方法匀浆,置灭菌离心管内,各加入50  $\mu$ g/mL 5-BrU内标液200  $\mu$ L,3 mL乙酸乙酯,涡旋混合器充分震荡10 min,高速离心(TL-5.0台式离心机,内腔直径: $\phi$ 350 mm)(4 000 r/min)20 min,取乙酸乙酯层,氮气吹干,加入甲醇200  $\mu$ L溶解残渣,取80  $\mu$ L进样。

**回收率测定** 在空白肝脏匀浆液试管中加入50  $\mu$ g/mL 5-BrU 200  $\mu$ L及浓度分别为4、20和40  $\mu$ g/mL的5-FU溶液200  $\mu$ L(各5支),按上述肝脏样品处理方法及色谱条件进行测定5-FU峰面积和5-BrU峰面积比值,代入标准曲线算出HPLC测得的5-FU浓度,计算实验方法的回收率。

回收率 = 测得的肝脏组织5-FU浓度/实际5-FU肝脏浓度  $\times$  100%

**提取率测定** 在1 mL的小鼠肝脏匀浆液中加入浓度分别为4、20和40  $\mu$ g/mL的5-FU溶液200  $\mu$ L(各5支),涡旋混合,按上述处理方法及色谱条件进行测定,与相同浓度的5-FU溶液峰面积比较,计算实验方法的提取率。

提取率 = 提取后峰面积/未提取峰面积  $\times$  100%

## 结 果

**方法的专属性** 将空白肝脏的色谱图、5-FU加内标5-BrU的色谱图与空白肝脏加5-FU和内标5-BrU的色谱图进行比较,可知在上述色谱条件下,肝脏中的内源性物质不干扰样品5-FU的测定。5-FU的出峰时间在5.5 min左右,5-BrU的出峰时间在11 min左右,样品峰和内标峰分离良好,本方

法具有良好的专属性。

结果表明,5-FU 浓度在 2~40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  内线性关系良好,最低检出限为 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。回归方程为:  $Y = 0.0566X - 0.0870$ , 两者相关系数  $r = 0.1004$ 。

回收率 低、中、高 3 种浓度 5-FU 标准液的回收率见表 1,符合方法学要求。

表 1 低、中、高 3 种浓度 5-FU 标准液的回收率

Concentration ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Measured value ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Recovery rate (%)	Mean recovery rate (%)	RSD (%)
4	3.69	92.26 ± 0.46		0.50
20	19.61	98.03 ± 1.64	96.41	1.67
40	39.57	98.94 ± 2.33		2.35

提取率 低、中、高 3 种浓度 5-FU 标准液的提取率见表 2,符合方法学要求。

表 2 低、中、高 3 种浓度 5-FU 的提取率

Concentration ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Peak area ratio in liver	Peak area ratio in solution	Extraction ratio (%)	Mean extraction ratio (%)	RSD (%)
4	0.1679	0.1877	89.45		3.35
20	1.0229	1.0660	95.96	94.46	6.25
40	2.1527	2.1973	97.97		14.29

肝脏中药物分布 2 种 5-FU 制剂肝脏药物浓度-时间曲线见图 1,表 3。单独 5-FU 灌胃后,  $C_{\text{max}}$  出现在 2 h 左右,达 27  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,此后肝脏药物浓度逐渐降低,6 h 后维持在一个较低的浓度水平,CTS-Pasp-5-FU 纳米粒子组经小鼠灌胃后,肝脏浓度呈现三峰型,第 1 个药物浓度高峰出现在 0.25 h,达到 44.12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,远远大于单独 5-FU 灌胃后肝脏药物浓度,至 4 h 时,出现第 2 个药物浓度高峰,且浓度超过单药 5-FU 灌胃时的药物浓度峰,此后逐渐下降,至 16 h 时再次到达药物最高峰,最高峰时浓度远高于单药的肝脏浓度峰。此后浓度逐渐下降。至 48 h 时,壳聚糖-聚天冬氨酸-5-FU 纳米粒的肝脏药物浓度仍比单药治疗的肝脏药物浓度高。药时曲线下面积(AUC)纳米粒子组为 925.87,

表 3 CTS-Pasp-5-FU 纳米粒子组与 5-FU 原药组不同时间点肝脏内药物浓度

Group	0.25	1	4	8	12	16	24	48 h
CTS-Pasp-5FU	44.12 ± 6.01	18.00 ± 1.74	35.56 ± 4.19	11.06 ± 6.07	10.86 ± 2.45	48.06 ± 6.72	11.46 ± 13.05	16.71 ± 8.07
5-FU	10.45 ± 6.87	7.65 ± 3.55	15.61 ± 7.93	8.31 ± 0.81	8.51 ± 4.72	12.53 ± 2.40	7.16 ± 2.30	5.75 ± 1.60

本次实验将 5-FU 原药及其 CTS-Pasp 包被的纳米粒子进行比较,由肝脏药物浓度-时间曲线可知,经 CTS-Pasp 包被的 5-FU 制剂口服灌胃后,在单核巨噬细胞丰富的肝脏中有理想分布,同一时间点肝脏药物

原药组为 414.71,纳米粒子组的药时曲线下面积明显大于原药组,因此可知 CTS-Pasp-5FU 纳米粒子组比原药组生物利用度高。

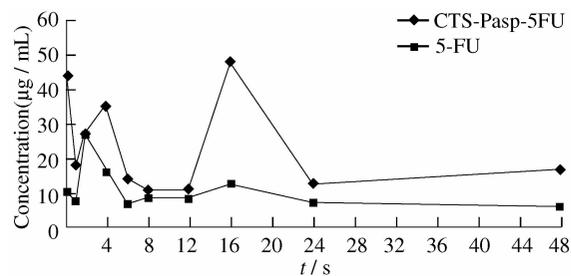


图 1 5-FU 肝脏药物浓度-时间曲线

Fig 1 Liver concentration-time curves of 5-FU

## 讨 论

高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 是在经典液相色谱法的基础上,于 20 世纪 60 年代后期引入了气相色谱理论而迅速发展起来的。HPLC 与经典液相色谱相比速度更快,灵敏度更高,分辨率更高,且柱子可以反复使用,需要样品量少,容易回收。由于 HPLC 上述种种优点,本课题采用应用 HPLC 检测小鼠肝脏中 5-FU 浓度,其提取率,回收率等方法学考察结果均符合要求。本实验首先对 5-FU 进行紫外全波长扫描,发现其在 273 nm 处灵敏度最好。且 5-FU 及 5-BrU 的出峰时间分别在 5.5 min 和 11 min 左右,出峰时间稳定,分离良好,肝脏中虽有杂质物质,但色谱图中 5-FU 及内标周围无明显干扰峰。5-BrU 结构与 5-FU 相似,实验测定可知 5-BrU 出峰稳定,且 5-BrU 出峰时间与 5-FU 相近但不干扰,与肝脏残存杂质分离良好,是较合适的内标物。回收率及提取率试验的结果表明,本方法准确、可靠,适用于检测、评价动物肝脏内 5-FU 浓度。在小鼠的肝脏预处理中考察了乙腈、乙酸乙酯不同萃取剂的萃取率,结果表明乙酸乙酯的萃取效果最为理想,杂质峰少,萃取率高。

浓度纳米粒子组显著高于 5-FU 原药组,浓度在 16 h 时仍然能达到高峰,比较而言,5-FU 组由于组织靶向性差,且半衰期短,因此 2 h 后肝脏中浓度即逐渐减低。我们的前期研究表明,5-FU 原药组的血液药物峰浓度

出现在灌胃后 15 min 之内,此后血药浓度迅速降低。CS-Pasp-5-FU 纳米粒子组的血药浓度曲线呈双峰形,药物峰浓度分别出现在灌胃后 2 h 左右和 16 h 左右,24 h 后下降。CTS-Pasp-5FU 纳米粒子的血药峰浓度( $C_{max}$ )降低,半衰期( $t_{1/2}$ )延长,血药浓度时间曲线下面积(AUC)明显增加<sup>[6]</sup>。比较而言,CTS-Pasp-5FU 的肝脏药物浓度第一个高峰在 15 min 时即达到,但同样的在 16 h 时纳米粒子在血液和肝脏里同时又到达另一个高峰,此后逐渐下降。考虑 CTS-Pasp-5FU 纳米粒子到达肝脏后,一部分 5-FU 立刻从纳米粒子中释放出来,另一部分 5-FU 逐步从纳米粒子中释放,当 16 h 时,5-FU 原药组在肝脏中药物浓度已较低,而 CTS-Pasp-5FU 纳米粒子组中的 5-FU 仍然维持在较高浓度,考虑 16 h 时再次达到一个释放高峰。本实验结果表明,经凝胶化法制备的壳聚糖-聚天冬氨酸-5FU 纳米粒子可明显改善 5-FU 在肝脏中的分布情况,使其肝脏靶向性显著增高,能延长 5-FU 在肝脏内的药物浓度,在 16 h 时仍能达到药物浓度高峰。但本实验仅考察了药物在肝脏内的浓度变化,仍需进一步实验研究药物在其他脏器中的分布情况,以更全面地了解其药代动力学及脏器分布情况。

#### 参 考 文 献

[1] Prabaharan M, Mano JF. Chitosan-based particles as con-

trolled drug delivery systems[J]. *Drug Deliv*, 2005, 12(1): 41-57.

- [2] Shahidi F, Abuzaytoun R. Chitin, chitosan, and co-products: chemistry, production, applications, and health effects[J]. *Adv Food Nutr Research*, 2005, 49:93-135.
- [3] Vila A, Sanchez A, Janes K, *et al.* Low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for nasal vaccine delivery in mice[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2004, 57:123-231.
- [4] Hidetoshi A, Yuichi O, Tatsuro O. Formation of Core-Shell Type Biodegradable Polymeric Micelles from Amphiphilic Poly(aspartic acid)-block-Polylactide Diblock Copolymer[J]. *Bio Molecules*, 2005, (6):720-725.
- [5] Cheng AL, Yeh KH, Lin JT, *et al.* Cisplatin, etoposide, and weekly high-dose 5-fluorouracil and leucovorin infusion (PE-HDFL)-a very effective regimen with good patients' compliance for advanced gastric cancer[J]. *Anticancer Res*, 1998, 18(2B):1 267-1 272.
- [6] 吴莉莉,郑永丽,沈锡中.壳聚糖-聚天冬氨酸-5 氟尿嘧啶纳米的小鼠体内药理学[J]. *复旦学报:医学版*, 2006, 33(6):767-770.
- [7] Moehler M, Teufel A, Galle PR. New chemotherapeutic strategies in colorectal cancer[J]. *Recent Results Cancer Res*, 2005, 165:250-259.

(收稿日期:2007-11-07;编辑:张秀峰)

#### (上接第 422 页)

- [11] Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, *et al.* Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts[J]. *Nature*, 2004, 428(6983):664-668.
- [12] Yang J, Zhou W, Zheng W, *et al.* Effects of myocardial transplantation of marrow mesenchymal stem cells transfected with vascular endothelial growth factor for the improvement of heart function and angiogenesis after myocardial infarction [J]. *Cardiol*, 2007, 107(1):17-29.
- [13] Kang HJ, Kim HS, Koo BK, *et al.* Intracoronary infusion of the mobilized peripheral blood stem cell by G-CSF is better than mobilization alone by G-CSF for improvement of cardiac function and remodeling: 2-year follow-up results of the myocardial regeneration and angiogenesis in myocardial infarction

with G-CSF and intra-coronary stem cell infusion (MAGIC Cell) 1 trial [J]. *Am Heart J*, 2007, 153(2):237. e1-e8.

- [14] Tura BR, Martino HF, Gowdak LH, *et al.* Multicenter randomized trial of cell therapy in cardiopathies-MiHeart Study [J]. *Trials*, 2007, 8:2.
- [15] Chien KR. Stem cells: lost in translation [J]. *Nature*, 2004, 428(6983):607-608.
- [16] Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, *et al.* Haematopoietic stem cell adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium [J]. *Nature*, 2004, 428(6983):668-673.

(收稿日期:2007-06-12;编辑:张秀峰)