基于聚乙二醇双硬脂酸酯的注射用载多西他赛液晶纳米粒的研制

王熙临，许欣媛，陈黎明，潘 颋，翁伟宇*
（华东理工大学药学院，上海市新药设计重点实验室，上海 200237）

摘要：本研究旨在考察将聚乙二醇双硬脂酸酯作为液晶材料制备载药液晶纳米粒（LCNPs）的可行性。分别合成了 2 种液晶材料，甲氧基聚乙二醇（mPEG）双硬脂酸酯（mPEG$_{350}$-DS）和聚乙二醇（PEG）双硬脂酸酯（S-PEG$_{400}$-S）。所得的 2 种材料遇水均可形成溶致液晶，其中 S-PEG$_{400}$-S 液晶可被稳定地分散而得到 LCNPs。以多西他赛为模型药，添加适量卵磷脂后可获得具有良好负载能力的 LCNPs，其粒径为 137.9 nm、ζ 电位为 －19.7 mV、包封率 96.5%、载药量为 3.4%、含量为标示量（2 mg/mL）的 98.2%。载药 LCNPs 在体外抑瘤试验和体内药动学研究中显示出优于市售注射液（泰索帝）的抑瘤效果和显著的长循环特征。根据偏光显微镜、小角 X 射线散射和冷冻透射电镜的观察结果，推测该 LCNPs 中的液晶相态为海绵（L_3）相。上述试验结果表明，S-PEG$_{400}$-S 具备成为载药 LCNPs 材料的良好潜力。

关键词：聚乙二醇衍生物；硬脂酸酯；液晶纳米粒；海绵相；多西他赛；注射剂；药物动力学
中图分类号：R944.9 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-8255(2023)12-1731-07
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2023.12.007

Preparation of PEG Distearate-based Liquid Crystalline Nanoparticles Loaded with Docetaxel for Injection

WANG Xilin, XU Xinyuan, CHEN Liming, PAN Ting, WENG Weiyu*
(*Shanghai Key Lab. of New Drug Design, School of Pharmacy, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237*)

ABSTRACT: The aim of this study was to investigate the feasibility of using polyethylene glycol (PEG) distearate as liquid crystalline (LC) materials to prepare drug-loaded LC nanoparticles (LCNPs). Two LC materials, mPEG distearate (mPEG$_{350}$-DS) and PEG distearate (S-PEG$_{400}$-S), were respectively synthesized. Both obtained derivatives could form lyotropic LC in water, and the LC of S-PEG$_{400}$-S could be stably dispersed to prepare LCNPs. With docetaxel as the model drug, the LCNPs with good drug-loading capacity were obtained by adding appropriate amount of lecithin into the formula. The particle size, ζ potential, encapsulation efficiency, loading capacity, and content of the docetaxel-loaded LCNPs were 137.9 nm, －19.7 mV, 96.5%, 3.4%, and 98.2% of the labeled amount (namely 2 mg/mL), respectively. The docetaxel-loaded LCNPs showed better antitumor effects and remarkably longer blood circulation time than the commercially available injection (Taxotere®) in *in vitro* antitumor experiment and *in vivo* pharmacokinetic study. The LC phase in the LCNPs was inferred to be sponge (L_3) phase according to the observations of polarizing microscopy, small angle X-ray scattering and cryo-transmission electron microscopy. In conclusion, the S-PEG$_{400}$-S showed a good prospect for LCNPs-based drug delivery system.

Key Words: polyethylene glycol derivative; stearate; liquid crystalline nanoparticle; sponge phase; docetaxel; injection; pharmacokinetics

液晶纳米粒（liquid crystalline nanoparticles，LCNPs）是由两亲性材料在水中自组装形成的具有液晶态结构的纳米分散体系[1]。作为一种较新颖的药物载体，LCNPs 可用于递送亲水性或疏水性小分

收稿日期：2023-02-06
作者简介：王熙临(1998—)，女，硕士研究生，专业方向：制剂处方工艺。
通信作者：翁伟宇(1971—)，男，博士，副教授，从事制剂新剂型、新技术的研究。
E-mail：wyweng@ecust.edu.cn

子化合物、多肽、蛋白质、RNA 和 DNA 等，具有良好的发展前景[2—4]。然而，目前可供药用的液晶材料较匮乏，报道的材料多局限于单油酸甘油酯、二油酸甘油酯、植烷三醇和磷脂[4]。因此，开发新的可药用的液晶材料有助于拓展 LCNPs 的应用。

本实验室前期合成了一系列两亲性双尾型聚乙二醇（PEG）双硬脂酸酯[5]，观察到当 PEG 相对分子质量低于 600 时，疏水性衍生物在水中可形成液晶。在此基础上，本研究选用 2 种具有结构代表性的 PEG 双硬脂酸酯，即甲氧基聚乙二醇单侧链接双硬脂酸酯的衍生物（$mPEG_{350}$-DS）和聚乙二醇两侧链接硬脂酸酯的衍生物（$S\text{-}PEG_{400}$-S），研究它们作为液晶材料在 LCNPs 中应用的可能性。以优选材料制备负载多西他赛（docetaxel，**1**）的 LCNPs，并考察制品的体外释放特征、溶血性、细胞毒性及大鼠体内药动学特征。

1　仪器与试药

Zetasizer Nano 型激光粒度仪（英国马尔文仪器有限公司）；Vitrobot 型冷冻机（美国 FEI 公司）；Glacios 型冷冻透射电镜（cryo-TEM，美国赛默飞世尔科技公司）；1260 Infinity 型高效液相色谱仪［安捷伦科技（中国）有限公司］；Ascend 400M 型核磁共振波谱仪、NanoSTAR 型小角 X 射线散射（SAXS）仪（德国布鲁克分析仪器公司，包括 Vantec-2000 型二维面探测器）；JY92- Ⅱ型超声波细胞粉碎仪（宁波新芝科器股份有限公司）；DM750P 型偏光显微镜（德国 Leica 公司）；SpectraMax i3x 型酶联免疫检测仪（美国 Molecular Device 公司）。

1（萨恩化学技术上海有限公司，含量 >99%，批号 E060142）；**1** 注射液［赛诺菲（杭州）制药有限公司，商品名为泰索帝，规格 0.5 mL ∶ 20 mg，批号 8F176A］；PEG_{400}（上海国药集团化学试剂有限公司）；$mPEG_{350}$、硬脂酰氯、吡啶（麦克林生化科技有限公司）；*N*,*N*'- 羰基二咪唑（CDI）、（*R*）-3- 氨基 -1,2- 丙二醇（APD）、二氯甲烷、乙醇（上海泰坦科技股份有限公司）；泊洛沙姆 188、泊洛沙姆 407、15- 羟基硬脂酸聚乙二醇酯（HS15）（德国 BASF 有限公司）；Tween-80（注射级，南宁赢创美诗药业有限公司）；大豆卵磷脂（上海太伟药业股份有限公司，纯度 >98%）；无菌脱纤维羊血（北京金克隆生物有限公司）；乙腈、甲醇为色谱纯；其余试剂均为分析纯。

健康 SD 大鼠（130 ～ 150 g，雌雄各半，上海雷根生物有限公司，动物合格证编号 20230112Aazz0100000322），12 只，适应性饲养 1 周，自由饮水、饮食。

小鼠乳腺癌细胞（4T1 细胞，浙江如耀生物有限公司）。

2　方法与结果

2.1　材料的合成与氢谱表征

2.1.1　$S\text{-}PEG_{400}$-S 的合成与表征

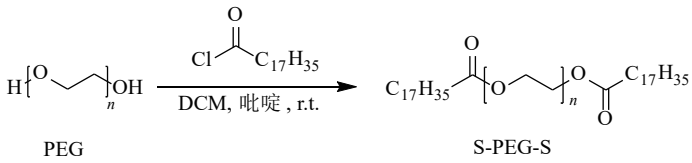
$S\text{-}PEG_{400}$-S 的合成路线如图 1 所示。取 PEG_{400}（4.0 g，10 mmol，含—OH 20 mmol）溶于二氯甲烷（60 mL）中，加入吡啶（2.4 g，30 mmol）混匀，置冰水浴中使溶液温度降至室温以下。将硬脂酰氯（9.1 g，30 mmol）缓慢滴加到上述 PEG 溶液中。加毕继续置冰水浴中反应 30 min，恢复至室温再反应 12 h。反应液过滤后，取滤液加入 1 mol/L 盐酸 30 mL，充分振摇。离心，有机层用饱和氯化铵溶液反复洗涤数次。分层，有机层用无水硫酸镁脱水后减压干燥得粗产物。粗产物中加入约 20 倍质量的乙腈，加热振摇使完全溶解，冷却至室温。待硬脂酸充分析出，抽滤，取滤液减压干燥得白色蜡状固体 $S\text{-}PEG_{400}$-S（收率约 86%）。^{1}H NMR（400 MHz，$CDCl_3$）δ: 4.23（t, *J*=4.8 Hz, PEG 的 OCH_2, 4H）, 3.70（t, *J*=4.8 Hz, PEG 的 CH_2, 4H）, 3.65（s, PEG, 26H）, 2.32（t, *J*=7.6 Hz, $COCH_2$, 4H）, 1.62（t, *J*=7.2 Hz, CH_2, 4H）, 1.25（s, CH_2, 56H）, 0.88（t, *J*=6.8 Hz, CH_3, 6H）。

2.1.2　$mPEG_{350}$-DS 的合成与表征

按文献[5]方法合成 $mPEG_{350}$-DS，采用“**2.1.1**”项下的后处理方法收集和纯化产物。所得 $mPEG_{350}$-DS 为淡黄色蜡状半固体，收率约为 52%。^{1}H NMR（400 MHz, $CDCl_3$）δ: 5.11 ～ 5.07（m, CHOCO, 1H）, 4.26（dd, *J*=12.4、4.4 Hz, APD 的 CH_2, 1H）, 4.20（br s, $CONCH_2$, 2H）, 4.12（dd, *J*=12.0、5.6 Hz, APD 的 CH_2, 1H）, 3.63（s, PEG, 28H）, 3.37（s, OCH_3, 3H）, 2.31（td, *J* =7.6、2.4 Hz, CH_2CH_2C=O, 4H）, 1.64 ～ 1.57（m, $2CH_2$, 4H）, 1.24（s, CH_2, 56H）, 0.86（t, *J*=6.8 Hz, CH_3, 6H）。氢谱数据中除 δ 3.63 处的氢数量不同外，其余与文献[5]中基本一致。

2.2　溶致液晶的形成及织构观察

取上述 2 种材料各 50 mg，分别加入无水乙醇 100 μL，搅拌溶解，通过 1 mL 注射器注入水中，

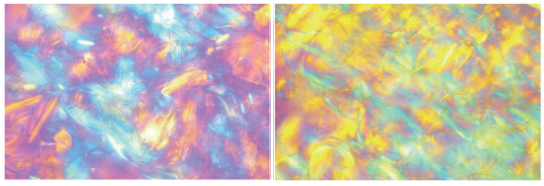


PEG　　S-PEG-S

图 1 S-PEG$_{400}$-S 的合成路线

Fig.1 Synthetic Route of S-PEG$_{400}$-S

可观察到 2 种材料的乙醇溶液均在接触水的瞬间发生相转变，形成凝胶，mPEG$_{350}$-DS 形成的凝胶几乎透明，S-PEG$_{400}$-S 形成的凝胶为半透明状。将上述材料的乙醇溶液注入水中孵育 24 h，然后取凝胶置偏光显微镜下观察，均可见如图 2 所示的液晶织构，说明均具有各向异性的光学特性。根据试验结果可认定，上述 2 种材料遇水可形成溶致液晶。



A　　B

A—mPEG$_{350}$-DS；B—S-PEG$_{400}$-S。

图 2 所得液晶凝胶的偏光显微照片（×400）

Fig.2 Polarization Microscopy Images of the Obtained Liquid Crystal Gels (×400)

2.3 LCNPs 分散剂的筛选

为了将液晶材料高度分散在水溶液中形成稳定的纳米体系，LCNPs 的配方中必须加入适宜的分散剂[6]。分别以 mPEG$_{350}$-DS 和 S-PEG$_{400}$-S 为液晶材料，考察常用的 LCNPs 分散剂及实验室自制的 mPEG$_{1000}$-DS（按文献[5]方法合成）的分散效果。取液晶材料 100 mg、分散剂 50 mg，加入无水乙醇 200 μL，振摇溶解，搅拌下加入生理盐水并定容至 2 mL，室温水浴探针超声（220 W，工作 5 s，间隔 3 s）20 次，静置，定时目视观察溶液的状态，结果如表 1 所示。所考察的几种分散剂均无法使 mPEG$_{350}$-DS 形成稳定的 LCNPs，而 S-PEG$_{400}$-S 搭配 mPEG$_{1000}$-DS 制得的 LCNPs 稳定性较好，因此后续载药 LCNPs 试验选用 S-PEG$_{400}$-S 为液晶材料、mPEG$_{1000}$-DS 为分散剂。

表 1 分散剂的筛选

Tab.1 Screening of Dispersants

分散剂	液晶材料	
	mPEG$_{350}$-DS	S-PEG$_{400}$-S
泊洛沙姆188	可分散，1 h后有固体析出	无法良好分散
泊洛沙姆407	可分散，1 h后有固体析出	可分散，12 h后有固体析出
Tween-80	可分散，1 h后有固体析出	可分散，12 h后有固体析出
HS15	可分散，3.5 h后有固体析出	可分散，12 h后有固体析出
大豆卵磷脂	无法良好分散	无法良好分散
mPEG$_{1000}$-DS	可分散，10 h后有固体析出	可分散，24 h内无明显析出

2.4 载药 LCNPs 的制备及表征

2.4.1 载药 LCNPs 的制备

以 **1** 为模型药物，试制载药 LCNPs。取 S-PEG$_{400}$-S 100 mg、大豆卵磷脂 50 mg、mPEG$_{1000}$-DS 75 mg、**1** 4 mg，加至无水乙醇 200 μL 中，照“**2.3**”项下方法制备 LCNPs。所得液体置冰水浴中冷却 20 min，经 0.22 μm 微孔滤膜过滤，即得 **1** 标示量为 2.0 mg/mL 的载药 LCNPs。同法制备空白 LCNPs。

2.4.2 粒径和 ζ 电位

取载药 LCNPs 和空白 LCNPs，用水适当稀释后，用动态光散射法测定平均粒径、多分散性指数（PDI）和 ζ 电位，结果如表 2 所示。二者都可以形成大小较均一且带负电荷的纳米粒，且载药后粒径明显增大。

2.4.3 包封率和载药量

精密量取载药 LCNPs 500 μL，置超滤离心管（截留分子量 3 000）中，离心（8 000×*g*）10 min，弃去底部滤液及超滤管中液体，另加入新鲜载药 LCNPs 500 μL，重复上述操作 3 次，使超滤膜达到吸附饱和。取第 4 次滤液，用甲醇适当稀释后按文献[5]中的 HPLC 法检测游离 **1** 浓度。色谱条件：色

表 2 载药和空白 LCNPs 的粒径、PDI 和 ζ 电位
($\bar{x}\pm s$，n=3)

Tab.2 Particle Size, PDI and ζ Potential of the **1**-Loaded and Blank LCNPs ($\bar{x}\pm s$, n=3)

样品名称	平均粒径/nm	PDI	ζ电位/mV	含量(标示量%)/%
载药LCNPs	137.9±1.3	0.20±0.02	－19.7±0.7	98.2±0.2
空白LCNPs	111.2±2.5	0.19±0.02	－12.4±0.6	—

谱柱 Luna C_{18} 柱 (4.6 mm×150 mm，5 μm)；流动相乙腈和水(体积比 60 ∶ 40)；检测波长 230 nm；流速 1.0 mL/min；柱温 25 ℃；进样量 20 μL。本法线性范围为 0.5 ～ 100 μg/mL，方法准确度为 98.1%～104.1%，精密度均小于 4%。另取载药 LCNPs 100 μL 用甲醇适当稀释后进样，测定 **1** 总浓度。计算得包封率为 (96.5±0.7)%，载药量为 (3.4±0.3)%(n=3)，说明 LCNPs 对 **1** 的包封率和载药量较高。

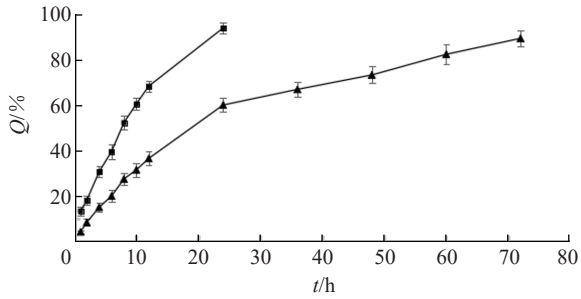
2.4.4 体外释放

采用动态透析法考察载药 LCNPs 的体外释放行为。取市售 **1** 注射液，按说明书规定先用专用稀释液稀释，再用生理盐水稀释成 **1** 质量浓度为 0.8 mg/mL 的溶液。以含 0.5% Tween-80 的磷酸盐缓冲液 (6.7 mmol/L，pH 7.4) 为释放介质。分别量取载药 LCNPs 0.4 mL、**1** 注射液稀释液 1 mL，各置透析袋(截留分子量 25 000) 内，再分别加入不含 Tween-80 的磷酸盐缓冲液 3.6 和 3 mL，扎紧袋口，置释放介质 50 mL 中，于 (37±0.5) ℃、避光、转速 100 r/min 条件下试验。分别于 1、2、4、6、8、10、12 、24、36、48、60 和 72 h 时取样 2 mL(同时补充同温等量新鲜释放介质)，用 HPLC 法[5]测定 **1** 浓度，计算累积释放率 (Q)，绘制释放曲线，结果如图 3 所示。与市售 **1** 注射液相比，载药 LCNPs 的缓释效果明显，且呈现双相释放，前 24 h 释放速率相对较快，24 h 后释放速率变慢，至 72 h 基本释放完全 (>90%)。

2.5 LCNPs 的液晶态研究

2.5.1 液晶织构

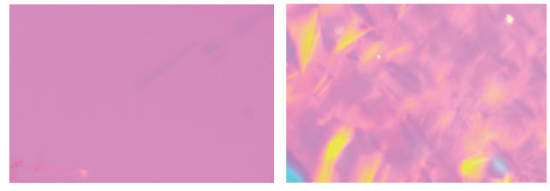
取“**2.4.1**”项下制备的空白 LCNPs 置偏光显微镜下观察，仅显示单一色调，未发现织构(图 4A)。考虑到 LCNPs 中的液晶材料处于高度分散状态，使用普通偏光显微镜可能无法观察到织构，按空白 LCNPs 的配方比例，将 S-PEG_{400}-S、大豆卵磷脂和 $mPEG_{1000}$-DS 溶于乙醇，加生理盐水后不超声分散，室温静置孵育过夜，取凝胶置偏振光显微镜下观察，结果如图 4B 所示。与单独由 S-PEG_{400}-S 形成的液晶偏光照片(图 2B) 相比，由 S-PEG_{400}-S、大豆卵磷脂和 $mPEG_{1000}$-DS 混合形成的凝胶中的液晶织构不明显，提示由这 3 种材料形成的凝胶内部的长程有序性减弱[7]。



■—**1** 注射液稀释液；▲—载药LCNPs。

图 3 体外释放曲线 (n=3)

Fig.3 *In vitro* Release Profiles (n=3)



A　　B

A—空白 LCNPs；B—S-PEG_{400}-S、大豆卵磷脂和 $mPEG_{1000}$-DS 的混合凝胶。

图 4 偏光显微照片 (×400)

Fig.4 Polarization Microscopy Images (×400)

2.5.2 SAXS 分析

采用 SAXS 仪进一步确定 LCNPs 中液晶的相态。将空白 LCNPs 放入直径 1.5 mm 的毛细管中，封好后在 Cu K_α X 射线 (50 kV，0.6 mA，λ=0.154 nm)、3 针孔准直光路的条件下测试，采用二维面探测器，样品至探测器的距离为 1 050 mm，测试前经过山嵛酸银 (silver behenate) 标样校准。为降低空气散射的影响，整个光路需处于真空环境 (0.03 ～ 0.04 kPa)，在室温下测试。信号收集时间

600 s，使用仪器生产商提供的 SAXS 程序对扣除背景后得到的二维散射图进行 Chi 积分，积分时散射角 2θ 范围选择 0.1° ～ 3.2°，积分步长选择 0.012，得到散射强度 I 对散射矢量 q 的一维曲线，结果如图 5 所示，可见除在 0.1 nm^{-1} 附近的曲线稍有波动外，未检测到尖锐的散射峰，该结果进一步说明空白 LCNPs 缺乏长程有序性。

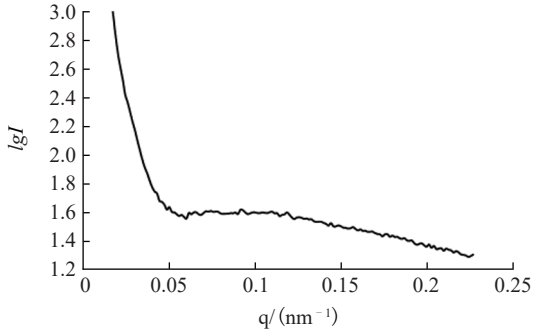


图 5 空白 LCNPs 的 SAXS 曲线
Fig.5 SAXS Curve of the Blank LCNPs

2.5.3 冷冻透射电镜（cryo-TEM）

采用 cryo-TEM 观察空白 LCNPs 的微观结构。将空白 LCNPs 置铜网上进行亲水化处理，放入冷冻机中，设置 blot time 5 s、blot force 3 s、wait time 3 s，随后转移至液态乙烷中速冻。将冷冻后的样品置透射电镜样品杆上，预抽真空 2 min，在真空度低于 10 时开始观测 LCNPs 形态，结果如图 6 所示。空白 LCNPs 微观结构呈现为双分子层（图 6 中箭头所示）的组合体，近似于文献 [8] 中预测的海绵态液晶结构。

综合上述偏光显微镜、SAXS 和 cryo-TEM 的结果可知，空白 LCNPs 中有众多双分子层结构且缺乏长程有序性，这些特征与文献 [9] 中液晶海绵相态的特征相吻合，故推测空白 LCNPs 中的液晶为海绵相，又称 L_3 相。

2.6 细胞毒性试验

采用 CCK-8 法测定市售 **1** 注射液稀释液、载药 LCNPs 和空白 LCNPs 对 4T1 细胞的毒性。收集对数生长期的 4T1 细胞，调整细胞悬液浓度，以每孔 5 000 个细胞的密度接种于 96 孔培养板中，十字

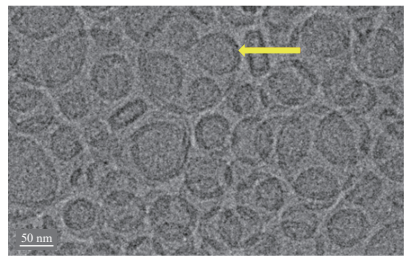


图 6 空白 LCNPs 的冷冻电镜照片（×120 000）
Fig.6 cryo-TEM Image of the Blank LCNPs (×120 000)

摇匀后置 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 24 h。加入市售 **1** 注射液稀释液、载药 LCNPs，使试验组中 **1** 的质量浓度为 0.1、0.5、1、5 μg/mL；空白 LCNPs 的加入量与载药 LCNPs 相同；另加入等体积无菌水作为阴性对照组。继续孵育 48 h，随后向每孔中加入 CCK-8 溶液 20 μL，再继续培养 4 h，用酶标仪在 450 nm 处测量各孔的吸光值，计算抑制率。结果如图 7 所示，可见不同质量浓度的载药 LCNPs 对 4T1 细胞的抑制率均高于市售 **1** 注射液稀释液，高浓度的空白 LCNPs 对 4T1 细胞也有一定的抑制。

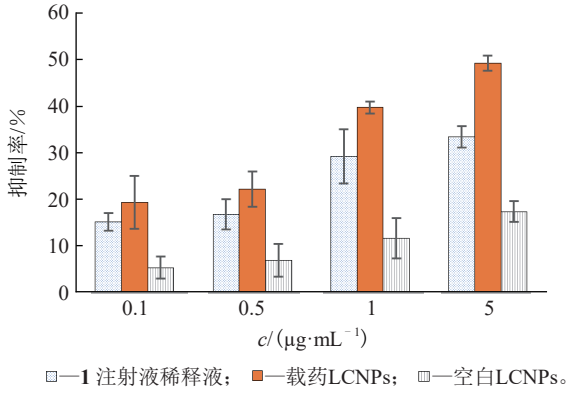
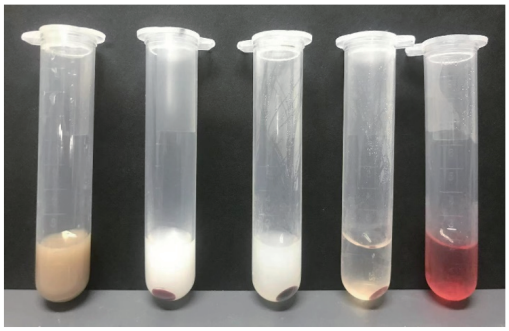


图 7 不同样品对 4T1 细胞的抑制率结果（n=3）
Fig.7 Inhibition Rate Results of Different Samples against 4T1 Cells (n=3)

2.7 载药 LCNPs 的溶血试验

将经无菌脱纤维处理的山羊血用生理盐水洗涤数次，所得红细胞用生理盐水配成体积分数为 2% 的红细胞混悬液。向离心管中分别加入 1、0.33 和 0.2 mL 的载药 LCNPs，加生理盐水稀释至 1 mL，混匀，再加入红细胞混悬液 1 mL，混匀，于 37 ℃

孵育 3 h 后取出，置冰水浴中结束反应。样品离心（250×*g*）10 min 后，目视观察液体颜色和底部红细胞的沉积量。另取 1 mL 的生理盐水和水，同法操作，作为阴性和阳性对照。结果如图 8 所示，未经稀释的载药 LCNPs 导致完全溶血，底部无红细胞沉积。稀释 3 倍后的载药 LCNPs 不产生溶血，底部的红细胞沉积量与阴性对照相近，上层液体部分为白色。该结果提示载药 LCNPs 有一定的溶血性，但稀释或缓慢注射可以有效避免溶血。



注：从左至右依次为未经稀释载药 LCNPs、稀释 3 倍的载药 LCNPs、稀释 5 倍的载药 LCNPs、阴性对照和阳性对照。

图 8　溶血试验结果

Fig.8　Results of Hemolysis Test

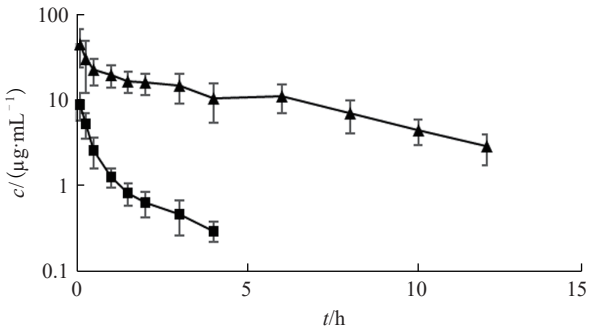
2.8　大鼠体内药动学研究

2.8.1　给药及取血方案

将 12 只 SD 大鼠随机分成 2 组，每组 6 只，雌雄各半。试验前 12 h 禁食，可自由饮水。试验当日先取空白血样，再尾静脉缓慢注射市售 **1** 注射液稀释液及载药 LCNPs，给药剂量按 **1** 计为 15.5 mg/kg。分别于给药后 0.08、0.25、0.5、1、1.5、2、3、4、6、8 和 12 h 时自尾静脉取血约 0.2 mL，置肝素化的 EP 管中，离心（8 000×*g*）10 min，分取血浆，采用 HPLC 法 [5] 测定血浆中 **1** 的浓度。

2.8.2　大鼠体内药动学特征

大鼠尾静脉注射市售 **1** 注射液稀释液及载药 LCNPs 后的平均血药浓度 - 时间曲线如图 9 所示。采用 Kinetica 5.1 药动学软件中的非房室模型计算药动学参数，所得药动学参数经对数转换后用方差分析法计算组间差异，结果如表 3 所示。市售 **1** 注射液稀释液静注后，大鼠血药浓度下降迅速，4 h 后已低于线性下限（0.2 μg/mL）；载药 LCNPs 则长循环效果明显，在 12 h 仍有较高血药浓度，MRT 和 AUC 显著增大，V_z 和 Cl 显著减小。



■—**1** 注射液稀释液；▲—载药LCNPs。

图 9　载药 LCNPs 与市售 1 注射液稀释液静注后大鼠的平均血药浓度 - 时间曲线（*n*=6）

Fig.9　Average Plasma Concentration-time Profiles of Rats after Intravenous Injection of **1**-Loaded LCNPs and Diluted Commercially Available **1** Injection（*n*=6）

表 3　主要药动学参数（$\bar{x}\pm s$，*n*=6）

Tab.3　Main Pharmacokinetic Parameters（$\bar{x}\pm s$, *n*=6）

参数	样品	
	市售**1**注射液稀释液	载药LCNPs
$t_{1/2}$/h	1.87±0.59	3.16±0.91
$AUC_{0\to t}$/(mg·h·L^{-1})	5.39±1.55	134.41±40.89[1)]
$AUC_{0\to\infty}$/(mg·h·L^{-1})	6.15±1.48	147.37±42.20[1)]
MRT/h	1.74±0.49	5.28±0.98[1)]
V_z/(L·kg^{-1})	7.43±3.78	0.55±0.37[1)]
Cl/(L·kg^{-1}·h^{-1})	2.63±0.62	0.11±0.04[1)]

注：[1)] 与市售 **1** 注射液稀释液相比，有极显著差异（*P*<0.01）。

3　讨论

根据 $mPEG_{350}$-DS 和 S-PEG_{400}-S 的乙醇溶液遇水形成的凝胶状态及偏光显微镜下显示的织构，说明这 2 种材料均可以在水中形成液晶，均有用于制备 LCNPs 的潜力。由于目前未找到适合于 $mPEG_{350}$-DS 的分散剂，无法得到稳定的 LCNPs，故本研究以 S-PEG_{400}-S 为液晶材料、$mPEG_{1000}$-DS 为分散剂制备 LCNPs。S-PEG_{400}-S 为聚氧乙烯脂肪酸酯非离子型表面活性剂，常作为乳化剂使用。此类表面活性剂的商品名为卖泽（Myrj），其中的聚氧乙烯硬脂酸酯通常被认为是无毒、无刺激性的物质，安全性良好。

以 S-PEG$_{400}$-S 为液晶材料、mPEG$_{1000}$-DS 为分散剂可以制得稳定的 LCNPs。然而，在研究负载 **1** 的 LCNPs 配方时，观察到单独使用 S-PEG$_{400}$-S 为液晶材料制备的 LCNPs 对 **1** 的负载能力和增溶效果不佳，放置后 **1** 易析晶。添加适量的大豆卵磷脂可以显著改善 LCNPs 对 **1** 的增溶效果。当采用本研究中的载药 LCNPs 配方时，制剂中 **1** 的质量浓度可以达到 2 mg/mL，显著高于市售 **1** 注射液的最大临床使用浓度 (0.8 mg/mL)。后续可在此基础上继续优化负载 **1** 的 LCNPs 配方。

由于载药 LCNPs 的配方中添加有分散剂和磷脂，可能会改变 S-PEG$_{400}$-S 本身的液晶相态，故采用偏光显微镜、SAXS 及 cryo-TEM 来表征 LCNPs 的液晶态。综合 3 项试验的表征结果，并与文献[9]报道的结果相比对，推测 LCNPs 的液晶相态为海绵相（L_3 相）。海绵相是一种不太常见的液晶相态，一般出现于由立方相向层状相转变的过程中[10]，或者立方相用水稀释的过程中[8]。海绵相结构为双分子层沿着 3 个空间方向延伸形成的聚集体[9]，内部无长程有序性结构，故海绵相在偏光显微镜下无明显织构，在 SAXS 曲线上不显示尖锐的散射峰，在 cryo-TEM 照片中可见双分子，与本研究中观察到的结果一致。海绵相液晶中含有大量的含水通道，因此其除可包载脂溶性药物外，还可能是水溶性大分子的理想载体[8]。目前对于海绵相 LCNPs 的研究很少，本研究为海绵相纳米递送系统提供了一种新的配方。

药动学试验结果显示载药 LCNPs 相比于市售 **1** 注射液有非常显著的长循环效果。这一方面是由于 LCNPs 中药物的释放本就较慢，另一方面是由于载药 LCNPs 主要由聚乙二醇衍生物组成，外层有亲水性 PEG 链的保护，能避免被网状内皮系统 (RES) 摄取，因此循环时间显著延长。市售 **1** 注射液稀释液中含有由 Tween-80 形成的载药胶束，注射后胶束会被血液大量稀释，Tween-80 也易被代谢酶水解[11]，这都会引发胶束快速解聚，使释放的 **1** 快速从体内消除。

综上所述，本研究为液晶给药系统提供了一类新的液晶材料以及利用该材料制备载药 LCNPs 的具体方案。mPEG$_{350}$-DS 和 S-PEG$_{400}$-S 等疏水性的 PEG 双硬脂酸酯衍生物在水中可以形成溶致液晶，其中 S-PEG$_{400}$-S 可用 mPEG$_{1000}$-DS 为分散剂制得 LCNPs，添加适量卵磷脂后可获得具有良好包封率与载药量的载 **1** LCNPs。载 **1** LCNPs 在体外试验中显示出优于市售注射液的缓释和抑瘤效果，在药动学试验中显示出显著的长循环特征。该 LCNPs 中的液晶相态呈现海绵相特征，可负载疏水性药物，也可能适用于亲水性的药物，值得进一步研究。

参考文献：

[1] SHAH S, JOGA R, KOLIPAKA T, *et al*. Paradigm of lyotropic liquid crystals in tissue regeneration [J]. *Int J Pharm*, 2023, **634**: 122633.

[2] CHAVDA V P, DAWRE S, PANDYA A, *et al*. Lyotropic liquid crystals for parenteral drug delivery [J]. *J Control Release*, 2022, **349**: 533-549.

[3] SHAN X, LUO L, YU Z, *et al*. Recent advances in versatile inverse lyotropic liquid crystals [J]. *J Control Release*, 2022, **348**: 1-21.

[4] ZHAI J, FONG C, TRAN N, *et al*. Non-lamellar lyotropic liquid crystalline lipid nanoparticles for the next generation of nanomedicine [J]. *ACS Nano*, 2019, **13**(6): 6187-6206.

[5] 杨玄琳, 徐晓珍, 郝 越, 等. 双尾型表面活性剂mPEG-二硬脂酸酯的合成及其在胶束给药系统中的应用[J]. 中国医药工业杂志, 2022, **53**(3): 345-351.

[6] 曾 馨, 刘 洁, 杨亚妮, 等. 脂质液晶纳米分散体在缓控释药物递送系统中的研究进展[J]. 中国医药工业杂志, 2018, **49**(5): 547-556.

[7] WANG X, ZHANG Y, GUI S, *et al*. Characterization of lipid-based lyotropic liquid crystal and effects of guest molecules on its microstructure: a systematic review [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2018, **19**(5): 2023-2040.

[8] VALLDEPERAS M, WIŚNIEWSKA M, RAM-ON M, *et al*. Sponge phases and nanoparticle dispersions in aqueous mixtures of mono- and diglycerides [J]. *Langmuir*, 2016, **32**(34): 8650-8659.

（下转第1744页）

T 37166—2018 [S]. 北京: 中国标准出版社，2018

[6] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局，中国国家标准化管理委员会. GB/T 29067—2012: 无损检测 工业计算机层析成像(CT)图像测量方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2018.

[7] 习早红, 杨高产, 张国杰, 等. 关于气雾剂产品抛射剂与内垫圈搭配的探讨[J]. 气雾剂通讯, 2010, (4): 1-5.

[8] US FDA. Draft guidance: metered dose inhaler(MDI) and dry powder inhaler(DPI) products - quality consideration [EB/OL]. [2023-02-07]. https://www.fda.gov/media/70851/download.

[9] 国家药品监督管理局药品审评中心. 吸入制剂质量控制研究技术指导原则[EB/OL]. (2007-10-23)[2023-02-07]. https://www.cde.org.cn/zdyz/domesticinfopage?zdyzIdCODE=ed73d62bf2ab063ce7645166fec6d77a.

[10] JUNG J K, KIM K T, BAEK U B, *et al*. Volume dependence of hydrogen diffusion for sorption and desorption processes in cylindrical-shaped polymers [J]. *Polymers* (Basel), 2022, **14**(4): 756.

[11] 张玉龙, 孙 敏. 橡胶品种与性能手册(第二版)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2013: 73-74.

[12] MYRDAL P B, SHETH P, STEIN S W. Advances in metered dose inhaler technology: formulation development [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2014, **15**(2): 434-455.

(上接第1737页)

[9] BHANSALI S H, MALIK A S, JARVIS J M, *et al*. The stability of L_3 sponge phase in acidic solutions [J]. *Langmuir*, 2006, **22**(9): 4060-4064.

[10] ZHAI J, TRAN N, SARKAR S, *et al*. Self-assembled lyotropic liquid crystalline phase behavior of monoolein-capric acid-phospholipid nanoparticulate systems [J]. *Langmuir*, 2017, **33**(10): 2571-2580.

[11] KERWIN B A. Polysorbates 20 and 80 used in the formulation of protein biotherapeutics: structure and degradation pathways [J]. *J Pharm Sci*, 2008, **97**(8): 2924-2935.