

· 综述 ·

清蛋白作为药物载体的 PEG 化修饰研究进展

周琴琴^{1,2}, 陈建明² (1. 福建中医药大学药学院药物制剂教研室 福建 福州 350108; 2. 第二军医大学药学院药剂学教研室 上海 200433)

[摘要] 清蛋白(白蛋白)是一种理想的药物载体,但由于其在体内半衰期短以及易被酶降解等缺点限制了其应用,然而根据其具有多个修饰位点的结构特点,可通过 PEG 修饰延长循环时间,阻碍酶的作用等。目前,PEG 修饰清蛋白仍处于研究阶段,已有较多关于 PEG 修饰清蛋白的研究,例如 PEG 修饰所起的作用、对清蛋白及其制剂的影响,以及修饰位点的选择等。本文对清蛋白的 PEG 化修饰的相关研究进行综述。

[关键词] 清蛋白; PEG 化; 半衰期; 药剂学性质; 修饰位点

[中图分类号] R945 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2014)04-0241-06

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2014.04.001

Research advances of PEGylation modification of albumin as drug carrier

ZHOU Qinqin^{1,2}, CHEN Jianming² (1. Department of Pharmaceutical Preparations, School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, China; 2. Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] Albumin is an ideal drug carrier, but its application was limited because of the shortcomings of short half-life and susceptible to enzymatic degradation in vivo. However, according to its structural features, albumin has a plurality of modification sites, which can be modified by PEG modifier to extend the cycle time and obstruct the action of the enzyme. Currently, the PEG-modified albumin is still in the research stage, and there have been many studies about PEG-modified albumin, such as the role of PEG modification, the effects on albumin and its preparations and the modification sites selection. The article reviewed the related studies about the PEGylation of albumin.

[Key words] albumin; PEGylation; half-life; pharmaceutical characterization; modification sites

清蛋白(白蛋白)是指相对分子质量为 6.65×10^4 的血浆蛋白,含 585 个氨基酸残基的单链多肽,分子中含 17 个二硫键和 1 个游离的巯基。人血清清蛋白(HSA)为人体内源性物质,具有安全无毒、无免疫原性、可生物降解、生物相容性好等优点。清蛋白分子中存在多个不同药物的结合位点,利于大量药物结合到清蛋白上,例如,紫杉醇(PTX),一个清蛋白分子能与 7 个紫杉醇分子结合,又如,一个清蛋白分子能与 7 条长链脂肪酸以不同的亲和力结合^[1],可作为理想的药物载体,常用的清蛋白包括 HSA 和 BSA。但清蛋白作为药物载体也存在一些缺点,如体内半衰期短、易被酶降解快速释药等。然而,清蛋白分子中存在多种可被化学修饰的功能基团,如氨基、巯基、羧基,以及高亲和力或低亲和力的非共价结合位点,可以利用此结构特点对其进行表面修饰得以改善。

聚乙二醇(PEG)修饰是延长体内循环时间最常用的方法,它具有生物相容性好、高亲水性、无毒无免疫原性等多种优点,且被 FDA 认可。在长循环脂质体、纳米囊、纳米粒等纳米药物传递系统中都有较广泛的应用,PEG 修饰清蛋白以改善清蛋白作为药物载体的应用也备受研究者的关注,本文对清蛋白的 PEG 化修饰作一综述。

1 清蛋白 PEG 化分类

清蛋白的 PEG 化主要分为两类,即对清蛋白纳米粒的修饰和对清蛋白溶液本身的修饰。在已有的报道中,清蛋白作为药物载体的 PEG 化主要偏向于对已制备好的清蛋白纳米粒进行 PEG 修饰^[2-4],对于清蛋白溶液的 PEG 化修饰的研究目前主要是关于 PEG 修饰清蛋白的制备,以及修饰后 PEG-清蛋白溶液与原清蛋白溶液的结构、功能或药动学比较的研究^[5-7],而以 PEG-清蛋白为原料制备载药纳米粒的研究与在清蛋白纳米粒上接 PEG 相比则很有限。目前,对于不同的修饰方式并没有优劣比较,但

[作者简介] 周琴琴,硕士研究生. E-mail: wcrzqq2009@126.com.

[通讯作者] 陈建明. E-mail: yjcjm@163.com.

是,从已有的研究分析可以看出,对清蛋白溶液进行 PEG 化,以 PEG-清蛋白制备纳米粒,PEG 化修饰会对清蛋白纳米粒的制备产生一定的影响,如空间位阻使药物难以被包载,阻滞药物结合位点等。而对清蛋白纳米混悬液进行 PEG 化修饰,由于纳米混悬液的稳定性限制,在 PEG 化过程中涉及到长时间搅拌等条件,可能会导致纳米粒不稳定,使药物泄露、析出。因此,对于清蛋白或其纳米粒的 PEG 化方式的选择,仍有待更进一步的研究。

2 清蛋白经 PEG 化后的作用

2.1 改善体内稳定性及循环半衰期

清蛋白在体内半衰期短主要是以下两方面原因造成:一方面,清蛋白在体内不稳定、快速释放药物,是因为人体内存在多种酶,清蛋白进入体内易被酶降解,如在酸性条件下(pH 2)被胃蛋白酶快速降解,中性条件下,被胰蛋白酶、蛋白水解酶 K、组织蛋白酶 B 以及蛋白酶(胰酶)降解,以至于其中的药物快速释放,并很快从体内消除;另一方面,清蛋白进入体内后易被血浆调理蛋白吸附,进而被网状内皮系统(RES)识别、吞噬,以至于快速从血液循环中消除,富集于肝、脾等 RES 丰富的组织,不仅导致药物无法继续通过血液循环到达病变部位,而且对肝、脾产生严重毒副作用。

清蛋白经 PEG 化后之所以能改善这些缺点,是由于在其表面形成亲水性的空间位阻。PEG 化不改变清蛋白的二、三级结构^[5],但是由于其空间位阻的存在,故能:①阻碍体液中酶的降解及与其他蛋白质的作用,从而提高其在体内的稳定性,使药物从纳米粒中释放减慢;②阻碍调理素吸附,躲避网状内皮系统的识别和吞噬作用,从而改善在体内的分布,并延长在体内的半衰期。

目前已有较多关于清蛋白经 PEG 化后由于 PEG 亲水性空间位阻存在而对药物释放、体内分布与体内循环时间产生较大影响的报道。Wu 等^[8]通过药物释放试验结果表明,由于 PEG 的修饰形成亲水空间位阻,阻碍了酶对清蛋白纳米粒的降解,使得药物 RB 从纳米粒中释放速率降低。Hasan 等^[2]经体外药物释放试验也表明 mPEG-BSA 纳米粒中 5-氟尿嘧啶的释放速率较牛血清清蛋白(BSA)纳米粒慢。Franco 等^[9]通过小鼠体内实验表明 mPEG 偶合物较游离药物分布更慢、消除更慢,且 HSA-PTX 经 PEG 化后肝和脾中分布减少,而血浆中分布增加且消除更慢。Pedro 等^[10]比较了 HSA(浓度分别为 5%、10%)和 PEG-HSA(浓度为 4%)用于出血性休克复苏术对系统参数和微血管血流动力学的影响,结果显示 PEG-HSA 组系统和微血管的恢复最好、最

快,且只有 PEG-HSA 的恢复作用持续超过 90 min,说明 PEG 修饰起到了长循环的作用。Zhao 等^[6,7]研究显示,PEG-HSA 的半衰期是原 HSA 半衰期的 2.2 倍,另一方面,¹²⁵I-PEG-HSA 的清除比原来减少 2/3,AUC 也明显增加,这些结果都表明 PEG-HSA 在血液循环中保留的时间更长。

2.2 降低非 HSA 的免疫原性

面对 HSA 原料紧张、价格昂贵及血源感染等难题,虽然有制备 rHSA 替代,但用 BSA 代替 HSA 是一种较可靠的解决方法,然而,BSA 用于人体具有一定的免疫原性,目前已有研究表明 PEG 化可以降低甚至消除其免疫原性。Moghimi^[11]通过免疫扩散研究结果显示,抗 BSA 抗体与 BSA 发生强烈反应,但不和 BSA-mPEG 反应,表明 mPEG 化掩蔽 BSA 的抗原位点,降低甚至消除 BSA 的免疫原性。周莉等^[12]用 mPEG-1900 修饰牛血清清蛋白游离氨基数在 90% 左右时,可使牛血清清蛋白完全丧失免疫原性,用 mPEG-5000 修饰时,修饰率达 50% 左右便可使牛血清清蛋白在动物体上失去产生免疫抗体的能力,一些生物指标检查结果证明,修饰后牛血清清蛋白有可能成为临床人血清清蛋白制剂的代用品。

3 PEG 化对清蛋白制剂性质的影响

PEG 化使清蛋白或其制剂表面存在亲水性的空间位阻,虽然对半衰期、释药以及分布等都有一定的改善,同时对于其他性质也有或大或小、或利或弊的影响,如清蛋白制剂(主要包括清蛋白微球、清蛋白纳米粒)的粒径、 ζ 电位、载药量、稳定性及释药特性等。

3.1 粒径

理论上讲,如果在清蛋白纳米粒上接有 PEG 链,伸展的 PEG 链应该会使纳米粒的粒径有明显的增加,但研究显示,PEG 化清蛋白纳米粒粒径与原纳米粒无明显变化^[2]。对于这一奇怪现象,研究发现,PEG 链在纳米粒表面的存在状态包括伸展的“刷子”构型和折叠的“蘑菇云”构型,主要取决于接的 PEG 密度,当纳米粒表面 PEG 密度较低时,PEG 链形成“蘑菇云”构型,相反则伸展为“刷子”结构^[13],见图 1。当 PEG 以蘑菇云构型包裹在纳米粒表面时,对纳米粒的粒径没有明显的影响,而当其在纳米粒表面以“刷子”结构伸张开时,纳米粒粒径明显增加。因此,PEG 化纳米粒粒径变化情况,主要取决于 PEG 链在纳米粒表面的存在状态。

当 PEG 链以“蘑菇云”的构型存在时,在缓冲溶液条件下,PEG 化对纳米粒粒径没有明显的改变,PEG 化前 BSA 纳米粒粒径为 210 nm,而 PEG 化后为 217 nm,仅有微弱的变化^[2]。而在血浆中,因蛋白质对纳米粒的吸附作用不同,未 PEG 化的清蛋白与血

浆中蛋白质的相互作用较强,较多的吸附使粒径较在缓冲溶液中增大,而PEG化后其亲水的空间位阻使其吸附作用减弱,粒径增大相对较少。例如,Wu等^[14]研究显示,未修饰的清蛋白纳米球在含有大鼠血浆的溶液中孵育,随着血浆浓度的增加,粒径明显增加,相反,经PEG修饰后的清蛋白纳米球,粒径仅发生了微弱的变化。孙诚谊等^[15]比较了PEG修饰与未修饰磁性5-氟尿嘧啶清蛋白微球的粒径,分别为 $(1.32 \pm 0.17) \mu\text{m}$ 和 $(1.28 \pm 0.14) \mu\text{m}$,也几乎没有变化。

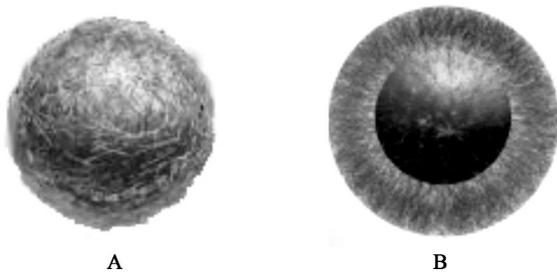


图1 PEG链在纳米粒表面的构型
A. “蘑菇云”构型; B. “刷子”构型

3.2 电位 纳米粒电位的明显改变是影响纳米粒稳定性的主要因素之一,纳米粒表面较高的电荷以保证纳米粒间的静电斥力,防止纳米粒的聚集、沉降。清蛋白或清蛋白-聚合物偶联物经PEG化后,部分电荷被屏蔽,双电层的剪切面发生移动,电位绝对值明显减小,特别是相对于粒径的改变而言,PEG化后纳米粒 ζ 电位的改变更为明显。例如,BSA纳米粒电位 -31.7 mV ,而mPEG-BSA纳米粒却增加到 -14 mV ^[2],PEG-PEI-BSA纳米粒电位较PEI-BSA纳米粒电位绝对值减小^[3]。另外,Wu等^[14]研究显示,mPEG 5 000质量比为20%和50%时,清蛋白纳米粒的 ζ 电位无明显差异,而当mPEG 5 000质量比为20%时的 ζ 电位绝对值却为mPEG 2 000质量比为40%时的1/2,可见,清蛋白纳米粒PEG化到一定程度时,增加其修饰程度对 ζ 电位将不再有明显的影 响,而PEG链长似乎是纳米粒 ζ 电位更重要的影响因素。

3.3 载药量 载药量是纳米粒制剂学考察的重要指标之一,一种理想的药物载体必须能达到较高的载药量。但是清蛋白经PEG化后载药量明显减小^[8],之所以如此,一方面是由于空间位阻的阻碍作用,另一方面,也由于PEG化使清蛋白的活性结合位点发生了改变。Bitten等^[5]研究表明,BSA具有高亲和力和低亲和力的结合位点,而PEG-BSA仅具有低亲和力结合位点。Wu等^[8]用微量量热法研究

表明HSA和药物RB间的相互作用为三级配体结合模式,而HSA-mPEG与RB仅为二级结合模式。可见,mPEG修饰清蛋白使其部分活性结合位点被阻滞。基于此,目前已有的改善载药量的方法是在PEG化的清蛋白中加入一定量未修饰的清蛋白,Wu等^[15]实验结果显示,在PEG化的BSA中加入一定量的未修饰BSA,基本可以达到未修饰BSA的载药量,同时也能满足药物的缓慢释放。虽然如此,关于PEG化后清蛋白载药量减小及其解决办法的相关研究仍然需要有更多的实验进行探讨,特别是有效提高其载药量的研究目前还很欠缺,亦或者存在更好的PEG化方式,以尽可能减少对清蛋白与药物相互作用的影响,都有待于进一步、更系统全面的研究探讨。

3.4 稳定性 制剂能否在一定的时间内稳定存在会直接影响其质量及应用。清蛋白纳米粒或微球经PEG化后, ζ 电位绝对值明显降低,不利于其稳定存在,但表面PEG的空间位阻又有利于其稳定性。可见,PEG化修饰对于纳米粒或微球稳定性的影响是一个复杂的过程,受多种因素共同作用。因此,在制备PEG化的清蛋白制剂时,当有利因素与不利因素达到平衡后,清蛋白制剂仍然可以在一定时间内稳定存在,甚至更稳定,如5-氟尿嘧啶清蛋白微球经PEG修饰后,因亲水性增加,在生理盐水中稳定性增高^[15]。Zhang等^[3]研究显示,PEI-BSA纳米粒随着PEG加入量的改变,PEG-PEI-PEG或稳定存在,或发生聚集。另外,从体内方面考虑,PEG化形成的空间位阻,妨碍酶对纳米粒或微球的快速降解和血浆蛋白在纳米粒表面的吸附,增加纳米粒在体内的稳定性,从而有利于控制药物的释放及在体内的滞留。

以PEG-清蛋白作为药物载体制备PEG化的清蛋白纳米制剂也是纳米制剂PEG化方式之一,PEG化对清蛋白稳定性的影响也将直接影响到后续纳米制剂的制备。有关研究表明^[5],PEG化将影响清蛋白对温度的敏感性,使得清蛋白结构的折叠或展开状态随温度的变化发生改变,很可能影响其荷载药物的稳定性,出现药物泄露等情况。Beatriz等^[16]研究显示,大分子的PEG(M_r 为8 000~10 000)能稳定清蛋白本身的紧密状态,但PEG与清蛋白间相互作用,在热力学上处于不利状态。因此对于清蛋白连接PEG后其稳定性的变化情况,以及将对其他性质、制剂制备等过程产生怎样的影响也是必须考虑的因素。

4 清蛋白PEG化修饰位点及修饰剂的选择

清蛋白结构中存在多种PEG化修饰位点,但

PEG本身不具有反应活性,在此之前需对其进行活化,获得相应的活性PEG修饰剂。清蛋白PEG化位点的选择主要包括氨基PEG化、巯基PEG化、C端PEG化等^[17],目前应用较多的为 $-NH_2$ 和 $-SH$ 的PEG化,其中 $-NH_2$ 修饰包括非特异氨基修饰和特异的N末端氨基修饰。

4.1 非特异氨基修饰 非特异氨基修饰包括赖氨酸的 ϵ -氨基和N末端 α -氨基修饰,是清蛋白等多种蛋白质进行PEG化修饰最早采用的修饰方式,反应条件温和、易发生、迅速,常用的修饰剂为mPEG的琥珀酰亚胺活性酯(mPEG-NHS酯),如mPEG-SPA、mPEG-SC等,为酰基化PEG衍生物。以mPEG-NHS酯作为PEG化修饰剂修饰清蛋白或其他蛋白质的相关研究,例如,Hasan等^[2]、Marion等^[4]分别以mPEG-SPA(M_r 为5000)修饰BSA及HSA,徐超^[18]以mPEG-SC(M_r 为5000)修饰HSA,制备mPEG-HSA纳米微球。另外,Liu等^[19]、Hou等^[20]分别以mPEG-SC(M_r 为5000)、mPEG-SC(M_r 为20000)修饰胰蛋白酶和重组水蛭素。此种修饰反应一般在碱性条件下进行,增大pH值反应活性增加,但碱性越强,mPEG-NHS酯越易水解,生成不具有反应活性的mPEG,故反应一般选择pH=7~9条件下进行。然而,由于清蛋白等蛋白质中游离的氨基较多,均可参与到反应中,故非特异性氨基修饰所得的产物为复杂的随机多修饰与单修饰混合物,很难甚至于无法分离。但由于其反应易发生,产物稳定,且副产物为小分子、无毒,仍然是PEG化的一种重要方式。

4.2 特异的N末端氨基修饰 特异的N末端氨基修饰是一种常用的定点修饰,它利用N末端 α -氨基与赖氨酸残基的 ϵ -氨基pKa值不同。PEG与蛋白质上氨基酸残基的结合反应取决于氨基酸残基的亲核性,只有当蛋白质溶液的pH值接近于或高于残基的pKa时,反应才容易进行,而N末端 α -氨基pKa值约为8,赖氨酸 ϵ -氨基残基pKa值约为10^[17],故控制反应条件使赖氨酸 ϵ -氨基残基被质子化,且使用反应活性较低的PEG化试剂,可达到较好的N末端 α -氨基的特异性修饰。N末端修饰最常用的修饰剂为mPEG-醛(mPEG-AL),为烷基化PEG衍生物,在硼氢化钠的还原作用下,能较特异性地与N末端 α -氨基结合。Hu等^[22]在酸性条件下比较mPEG-AL和PEG-NHS的N末端修饰的特异性,结果显示PEG-AL具有更高的特异性。Zhao等^[7]用mPEG-丙醛(M_r 为20000)修饰HSA,通过SDS-PAGE分析原HSA和反应混合物,根据新出现条纹的分子大小可知,每个HSA分子上仅结合了一个PEG链。但此种修饰方式反应慢、耗时长,常需

几个甚至几十个小时,而且与质子化氨基处于平衡状态的游离 α -氨基的存在导致偶合物的形成,使得必须增加额外的纯化过程。

4.3 巯基($-SH$)定点修饰 巯基修饰即与半胱氨酸中游离的 $-SH$ 发生反应,清蛋白结构中存在一个游离的 $-SH$,未形成二硫键,可作为另一个特异的修饰位点。最常用的修饰剂为mPEG-mal,马来酰亚胺环双键与巯基反应形成硫醚键,但马来酰亚胺环的不稳定性,倾向于开环形成不具有反应活性的衍生物。另外,此反应的pH必须严格控制,因在碱性条件下(pH>8)清蛋白中的 $-NH_2$ 也能与马来酰亚胺反应。Zhao等^[6]用mPEG-mal修饰HSA,通过两步法——封闭 $-SH$ 和PEG化确定其修饰位点,实验结果表明,封闭 $-SH$ 后,HSA无法被mPEG-mal修饰。

然而,清蛋白中存在含Tyr84的环^[23],由于Tyr84的 $-OH$ 和Cys34的硫间形成氢键,两个环(Tyr84环和Cys34环)的束缚导致Cys34不易被接近^[23]。同时,清蛋白的结晶学研究显示Cys34被埋在浅的缝隙中(9.5 Å)^[23],故可能导致修饰率低,也解释了Cys34-SH的修饰在优化的工艺条件下仅约50%^[6]。但Octaaf等^[24]研究显示,在pH>8时,清蛋白的结构会发生转变,由N(中性)变为B(碱性)形式,整个蛋白结构会有松动,Cys34缝隙打开,巯基从一个被抑制的环境中移动到不受阻碍的环境中,从而使其反应活性增强。然而,如前所述,pH>8时,可能存在与 $-NH_2$ 的反应,使其特异性受到影响。如何提高修饰率且不影响其特异性仍然有待于更进一步研究。

另外,顺便提一下清蛋白的其他修饰。除清蛋白的PEG化修饰外,根据病变部位的特点,针对性的对清蛋白进行修饰以提高其主动靶向性也是近年来备受关注的方向之一。其一,在某些肿瘤部位叶酸受体、表皮生长因子受体、整联蛋白 $\alpha v \beta 3$ 受体等过表达,利用配体-受体的高度特异性,将叶酸、表皮生长因子或RGD与清蛋白偶联,可以明显提高肿瘤部位的靶向性^[25-27];其二,由于血-脑屏障(BBB)的特殊结构,药物透过BBB到达脑病变部位非常困难,对清蛋白进行修饰以透过BBB,目前研究较多的主要有阳离子的吸附介导,载脂蛋白、转铁蛋白的受体介导等。将清蛋白阳离子化促进其与内皮细胞腔一侧负电荷的结合,不仅使药物在脑部积累量增加,而且不影响BBB的完整性^[28]。清蛋白与载脂蛋白结合后,通过低密度脂蛋白受体(LDLR)介导的内吞和穿细胞作用促进纳米粒的脑摄取,研究显示,将Apo-E结合到清蛋白纳米粒表面作为靶向

剂,一定时间在脑毛细血管内皮细胞和中枢神经系统中仅检测到共价结合 Apo-E 的清蛋白纳米粒,而不能检测到未结合 Apo-E 的清蛋白纳米粒^[29],而且药效试验结果显示,仅有用 Apo 修饰的载药 HSA 纳米粒达到明显的镇痛效果^[30]。同样,将 HSA 纳米粒共价结合转铁蛋白或转铁蛋白受体单克隆抗体(OX26 或 R17-217)用于洛哌丁胺(自身不能透过 BBB)的脑传递,结果显示共价结合转铁蛋白或转铁蛋白受体单克隆抗体(OX26 或 R17-217)的洛哌丁胺 HSA-NPs 静脉注射后具有明显的镇痛效应^[31]。

5 展望

清蛋白作为一种理想的药物载体,其功能化修饰更是备受关注,其中 PEG 化修饰作为延长体内半衰期最常用的方式,迄今为止已有较多的认识,并在不断提高。例如,PEG 修饰剂本身的纯度和质量都有了很大提高,种类不断增加,包括单链、多链,以及 PEG 末端经过不同的活化等;清蛋白的 PEG 化修饰由最初的随机修饰模式逐渐向特异性修饰发展,满足不同需要;另外,清蛋白的 PEG 化产物分离纯化技术、分析方法等也都在不断改善。清蛋白的 PEG 化修饰已经是一种应用普遍的技术,但仍存在许多未解决的问题,使其很难达到 PEG 修饰剂利用率高、清蛋白或其制剂修饰率高以及产物纯度高。而且,经 PEG 化修饰后,对纳米粒或微球电位、稳定性、载药量等的影响,也将进一步影响其作为药物载体的广泛应用,因此需要更深入的研究,清楚地认识其中的缺点并得出相应的解决方法。虽然仍存在上述诸多问题,但根据目前的认识及研究现状,对于提出新的解决方法奠定了可靠的基础。基于清蛋白 PEG 化修饰的必要性,以及已有的研究基础,深入研究清蛋白及其制剂的 PEG 化,以及不断解决存在的问题将具有很大的研究价值,经 PEG 化修饰的清蛋白及其制剂也将具有可观的应用前景。

【参考文献】

[1] Gong J, Huo M, Zhou J, *et al.* Synthesis, characterization, drug-loading capacity and safety of novel octyl modified serum albumin micelles[J]. *Int J Pharm*, 2009, 376(1-2): 161-168.
[2] Hasan K, Seyed AS, Amir M, *et al.* Optimization of PEGylation conditions for BSA nanoparticles using response surface methodology[J]. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2010, 11(3): 1206-1211.
[3] Zhang SF, Cezary K, Michael RD, *et al.* Polyethylenimine-PEG coated albumin nanoparticles for BMP-2 delivery[J]. *Biomaterials*, 2010, 31(5): 952-963.
[4] Marion GA, Mahler HC, Klaus L. Freeze drying of human serum albumin (HSA) nanoparticles with different excipients[J]. *Int J Pharm*, 2008, 363(1-2): 162-169.

[5] Bitten P, Conan JF, Peter W, *et al.* Effects of PEG size on structure, function and stability of PEGylated BSA[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2011, 79(2): 399-405.
[6] Zhao T, Cheng YN, Tan HN, *et al.* Site-specific chemical modification of human serum albumin with polyethylene glycol prolongs half-life and improves intravascular retention in mice[J]. *Biolog Pharm Bull*, 2012, 35(3): 280-288.
[7] Zhao T, Yang Y, Zong AZ, *et al.* N-terminal PEGylation of human serum albumin and investigation of its pharmacokinetics and pulmonary microvascular retention[J]. *Biol Sci Trends*, 2012, 6(2): 81-88.
[8] Wu L, Martin CG, Stanley SD, *et al.* Preparation and characterization of rose bengal-loaded surface-modified albumin nanoparticles[J]. *J Contr Rel*, 2011, 71(1): 117-126.
[9] Franco D, Silvia A, Paola B, *et al.* Poly(ethylene glycol)-human serum albumin-paclitaxel conjugates: preparation, characterization and pharmacokinetics[J]. *J Contr Rel*, 2001, 76(1-2): 107-117.
[10] Pedro C, Amy GT, Ananda K. Volume resuscitation from hemorrhagic shock with albumin and hexaPEGylated human serum albumin[J]. *Resuscitation*, 2008, 79(1): 139-146.
[11] Moghimi SM. Chemical camouflage of nanospheres with a poorly reactive surface: towards development of stealth and target-specific nanocarriers[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1590(1-3): 131-139.
[12] 周莉, 罗贵民, 高蛛娟, 等. 聚乙二醇修饰牛血清白蛋白[J]. *吉林大学自然科学学报*, 1997, (4): 63-66.
[13] Jesse VJ, Tatsiana L, Richard NZ, *et al.* Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy[J]. *Nanomedicine*, 2001, 6(4): 715-728.
[14] Wu L, Martin CG, Etienne S, *et al.* Preparation and in vitro characterization of HSA-mPEG nanoparticles[J]. *Int J Pharm*, 1999, 189(2): 161-170.
[15] 孙诚谊, 刘建刚, 钱志勇, 等. 聚乙二醇修饰与未修饰磁性 5-氟尿嘧啶白蛋白微球体外性质的比较[J]. *消化肿瘤杂志*, 2008, 1(2): 110-113.
[16] Beatriz F, Bibiana N, Hernan DN, *et al.* Thermal features of the bovine serum albumin unfolding by polyethylene glycols[J]. *Int J Biol Macromol*, 1999, 26(1): 23-33.
[17] Gianfranco P, Francesco MV. State of the art in PEGylation: the great versatility achieved after forty years of research[J]. *J Contr Rel*, 2012, 161(2): 461-472.
[18] 徐超. 聚乙二醇修饰人血清白蛋白及其纳米微球制备[D]. 合肥工业大学, 2007.
[19] Liu W, Zhang ZQ, Liu CM, *et al.* Effect of molecular patch modification on the stability of dynamic high-pressure microfluidization treated trypsin[J]. *Innov Food Sci Emerg Tech*, 2012, 16: 349-354.
[20] Hou BB, Li SR, Li XH, *et al.* Design, preparation and in vitro bioactivity of mono-PEGylated recombinant hirudin[J]. *Chin J Chem Eng*, 2007, 15(6): 775-780.
[21] Veronese FM. Introduction and overview of peptide and protein PEGylation: a review of problems and solution[J]. *Biomaterials*, 2001, 22(5): 405-417.

(下转第 265 页)

速、灵敏、准确度高,可作为牡丹皮质量控制的方法之一,同时为牡丹皮的药理学和临床药学研究提供

了化学物质基础信息。

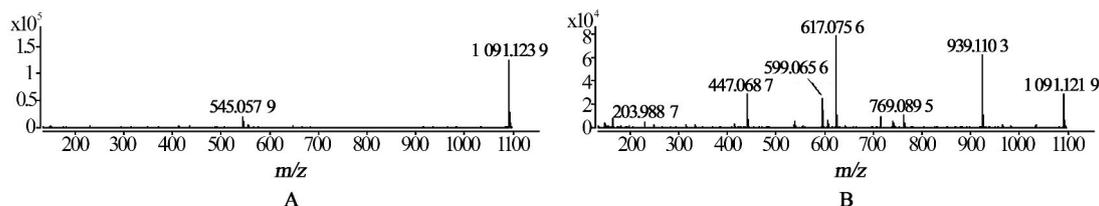


图2 较低(A)和较高(B)电压的质谱图

【参考文献】

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京: 化学工业出版社, 2010: 160-161.
- [2] Liu KY, Hu S, Chan BC *et al.* Anti-inflammatory and anti-allergic activities of Pentaherb formula, Moutan Cortex (Danpi) and gallic acid[J]. *Molecules*, 2013, 18(3): 2483-2500.
- [3] Lau CH, Chan CM, Chan YW, *et al.* Pharmacological investigations of the anti-diabetic effect of Cortex Moutan and its active component paeonol[J]. *Phytomedicine*, 2007, 14(11): 778-784.
- [4] Li TJ, Qiu Y, Mao JQ, *et al.* Protective effects of Guizhi-Fuling-Capsules on rat brain ischemia/reperfusion injury[J]. *J Pharmacol Sci*, 2007, 105(1): 34-40.
- [5] Xing G, Zhang Z, Liu J, *et al.* Antitumor effect of extracts from moutan cortex on DLD-1 human colon cancer cells *in vitro* [J]. *Mol Med Rep*, 2010, 3(1): 57-61.
- [6] He Q, Hu XJ, Cheng YY. Analysis of "SHUANGDAN" granules by high-performance liquid chromatography-diode array detection-electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal* 2006, 41(2): 485-492.
- [7] 许舜军, 杨柳, 张勉等. 牡丹皮化学成分的液相色谱-飞行时间串联质谱分析[J]. *药学报*, 2006, 41(9): 852-856.
- [8] Xu SJ, Yang L, Zeng X, *et al.* Characterization of compounds in the Chinese herbal drug Mu-Dan-Pi by liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2006, 20(22): 3275-3288.
- [9] He Q, Ge ZW, Song Y, *et al.* Quality evaluation of cortex moutan by high performance liquid chromatography coupled with diode array detector and electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2006, 54(9): 1271-1275.
- [10] Chen G, Zhang L, Zhu Y. Determination of glycosides and sugars in Moutan cortex by capillary electrophoresis with electrochemical detection [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2006, 41(1): 129-134.
- [11] Liu Z, Zhu D, Lv L, *et al.* Metabolism profile of timosaponin B-II in urine after oral administration to rats by ultrahigh-performance liquid chromatography/quadrupole-time-of-flight mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2012, 26(17): 1955-1964.
- [收稿日期] 2013-07-05 [修回日期] 2014-05-14
[本文编辑] 李睿旻
- (上接第245页)
- [22] Hu JL, Walter S. N-terminal specificity of PEGylation of human bone morphogenetic protein-2 at acidic pH [J]. *Int J Pharm*, 2011, 413(1-2): 140-146.
- [23] Stewart AJ, Blindauer CA, Berezenko S, *et al.* Role of Tyr84 in controlling the reactivity of Cys34 of human albumin [J]. *FEBS J*, 2005, 272(2): 353-362.
- [24] Octaaf JMB, Jan FAL, Marcel JEF, *et al.* The molecular mechanism of the neutral-to-base transition of human serum albumin [J]. *J Biol Chem*, 1989, 264(2): 953-959.
- [25] Kim SH, Jeong JH, Joe CO, *et al.* Folate receptor mediated intracellular protein delivery using PLL-PEG-FOL conjugate [J]. *J Contr Rel*, 2005, 103: 625-634.
- [26] 袁飞, 王树斌, 彭志平, 等. 表皮生长因子受体靶向纳米载体负载 c-erbB2 反义寡脱氧核苷酸对人乳腺癌 SK-BR3 细胞的摄取和滞留 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(16): 3084-3088.
- [27] Choi N, Kim SM, Hong KS, *et al.* The use of the fusion protein RGD-HSA-TIMP2 as a tumor targeting imaging [J]. *Biomaterials*, 2011, 32: 7151-7158.
- [28] Parikh T, Bommana MM, Squillante E. Efficacy of surface charge in targeting pegylated nanoparticles of sulphiride to the brain [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2010, 74: 442-450.
- [29] Zensi A, Begley D, Pontikis C, *et al.* Albumin nanoparticles targeted with Apo E enter the CNS by transcytosis and are delivered to neurons [J]. *J Contr Rel*, 2009, 137: 78-86.
- [30] Kreuter J, Hekmatara T, Dreis S, *et al.* Covalent attachment of apolipoprotein A-I and apolipoprotein B-100 to albumin nanoparticles enables drug transport into the brain [J]. *J Contr Rel*, 2007, 118: 54-58.
- [31] Ulbrich K, Hekmatara T, Herbert E, *et al.* Transferrin and transferrin-receptor-antibody modified nanoparticles enable drug delivery across the blood-brain barrier (BBB) [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2009, 71: 251-256.
- [收稿日期] 2013-08-11 [修回日期] 2013-12-25
[本文编辑] 李睿旻