

紫杉醇-索拉非尼-聚乳酸-羟基乙酸载药栓塞微球的制备及体外释药特性研究^Δ

陈鑫^{1*},李翔^{2#},罗晓健^{1,2},刘微^{1,2}(1.江西中医药大学药学院,南昌 330006;2.江西中医药大学创新药物与高效节能降耗制药设备国家重点实验室,南昌 330038)

中图分类号 R944;R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)10-1327-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.10.07

摘要 目的:制备紫杉醇-索拉非尼-聚乳酸-羟基乙酸(PLGA)载药栓塞微球,建立其含量的测定方法,并考察其体外释药特性。方法:采用乳化-溶剂挥发法制备紫杉醇-索拉非尼-PLGA载药栓塞微球。采用高效液相色谱法测定微球中紫杉醇、索拉非尼的含量并计算载药量及包封率,色谱柱为Agilent TC-C₁₈,流动相为水-乙腈(40:60, V/V),流速为1.0 mL/min,检测波长为228 nm,柱温为28 ℃,进样量为10 μL。采用光学显微镜、扫描电镜观察微球的形态,采用激光粒度仪测定微球的粒径;采用高效液相色谱法测定生理温度(37 ℃)下紫杉醇、索拉非尼的释放度;采用阿伦尼乌斯方程预测37 ℃下的反应速率常数,并与实测(37 ℃)值进行比较。结果:紫杉醇、索拉非尼的检测质量浓度线性范围均为2.0~400.0 μg/mL(*r*均为0.999 6);定量限分别为1.902 6、1.890 2 μg/mL,检测限分别为0.985 5、1.264 5 μg/mL;精密性、稳定性、重复性试验的RSD均小于2%;回收率分别为99.00%~102.91%(RSD=1.12%,*n*=9)、98.39%~102.96%(RSD=1.94%,*n*=9)。所得微球形态圆整,表面光滑无粘连、无突起,平均粒径为(139±1.16) μm;紫杉醇、索拉非尼的载药量分别为1.12%、0.85%,包封率分别为73.11%、58.65%;在37 ℃下,41 d内累积释放度分别为(71.83±3.96)%、(81.44±6.02)%;紫杉醇、索拉非尼预测反应速率常数与实测值相对标准偏差的RSD<10%,相似因子分别为83.53、73.95。结论:成功制得紫杉醇-索拉非尼-PLGA载药栓塞微球,其形态较好,且具有较好的缓释作用;预测释放度曲线与实测释放度曲线相关性较好;所建含量测定方法操作简便、稳定性较好。

关键词 紫杉醇;索拉非尼;聚乳酸-羟基乙酸;载药栓塞微球;体外释药

Study on Preparation of Paclitaxel-sorafenib-PLGA-loaded Embolic Microspheres and *in vitro* Drug Release Characteristics

CHEN Xin¹, LI Xiang², LUO Xiaojian^{1, 2}, LIU Wei^{1, 2} (1. School of Pharmacy, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330006, China; 2. State Key Laboratory of Innovative Drugs and High Efficiency, Energy Saving and Consumption Reducing Pharmaceutical Equipment, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330038, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To prepare Paclitaxel-sorafenib-PLGA-loaded embolic microspheres, and to establish a method for the content determination and investigate their *in vitro* drug release characteristics. METHODS: Paclitaxel-sorafenib-PLGA-loaded embolic microspheres were prepared by emulsification-solvent evaporation method. HPLC method was used to determine the contents of paclitaxel and sorafenib in Paclitaxel-sorafenib-PLGA-loaded embolic microspheres; drug-loading amount and encapsulation efficiency were calculated. The determination was performed on Agilent TC-C₁₈ column with mobile phase consisted of water-acetonitrile (40:60, V/V) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 228 nm, and column temperature was 28 ℃. The sample size was 10 μL. The morphology of the microspheres was observed by optical microscopy and scanning electron microscopy. The particle size and granularity distribution of microspheres were measured by laser granularity

酸、二苯乙烯苷正交配伍调控BMP2、Smad1、4诱导BMSCs成骨分化的影响[J].世界科学技术:中医药现代化,2014,16(5):1094-1102.

[22] ABDOLLAH S, MACIAS-SILVA M, TSUKAZAKI T,

Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81603054);江西省青年科学基金资助项目(No.20171ACB21074);江西省杰出青年人才资助计划(No.20171BCB23097);江西省卫生计生委中医药科研课题项目(No.2016A008)

* 硕士研究生。研究方向:药物新制剂与新剂型。电话:0791-87119661。E-mail:1757647300@qq.com

通信作者:副教授,博士。研究方向:药物新制剂与新剂型。电话:0791-87119661。E-mail:sterlinghawk@163.com

et al. TβRI phosphorylation of Smad2 on Ser465 and Ser467 is required for Smad2-Smad4 complex formation and signaling[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(44):27678-27685.

[23] 莘晓陶,李曦光,毕贤峰,等. Smad7在兔下颌骨牵张成骨过程中的表达[J].中国组织工程研究与临床康复,2010,14(20):3633-3636.

[24] 孙效棠,赵黎,胡蕴玉,等.磷酸钙骨水泥载药核心的块型重组异种骨体内缓释及修复兔长段感染性骨缺损的研究[J].中国修复重建外科杂志,2005,19(3):165-169.

(收稿日期:2018-09-07 修回日期:2019-04-02)

(编辑:段思怡)

analyzer. The release rates of paclitaxel and sorafenib were determined by HPLC under physiological temperature (37 °C). The reaction rate constants were predicted by Arrhenius equation at 37 °C, and compared with the measured value (37 °C). RESULTS: The linear range of paclitaxel and sorafenib were 2.0-400.0 μg/mL (both $r=0.9996$). The quantitative limits were 1.9026 and 1.8902 μg/mL, and detection limits were 0.9855 and 1.2645 μg/mL, respectively. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2%. The recoveries were 99.00%-102.91% (RSD=1.12%, $n=9$) and 98.39%-102.96% (RSD=1.94%, $n=9$). The surface of the microspheres were spherical, smooth and no protuberance and no adhesions. The average particle size was (139 ± 1.16) μm. Drug-loading amounts of paclitaxel and sorafenib were 1.12% and 0.85%, respectively. The encapsulation efficiency were 73.11% and 58.65%, respectively. Accumulative release rates were $(71.83 \pm 3.96)\%$ and $(81.44 \pm 6.02)\%$ within 41 d at 37 °C. RSDs for relative standard deviation of prediction reaction rate constant to measured value were less than 10% for paclitaxel and sorafenib. The similarity factors were 83.53 and 73.95. CONCLUSIONS: Paclitaxel-sorafenib-PLGA-loaded embolic microspheres are successfully prepared. The microspheres have good morphology and sustained release. The predicted release curve is well correlated with the measured release curve. Established determination method is simple and stable.

KEYWORDS Paclitaxel; Sorafenib; PLGA; Drug-loaded embolic microspheres; Drug release *in vitro*

原发性肝癌(Hepatocellular carcinoma, HCC)是全球癌症发病率居于第5位的常见肿瘤,我国HCC患者数约占世界总数的50%以上^[1]。经导管动脉栓塞术是治疗中、晚期HCC的首选方法^[2]。有研究认为,HCC治疗的新策略是将经导管动脉栓塞术与化疗药物灌注相结合,该策略既能选择性阻断肿瘤细胞血供,又可导致肿瘤细胞缺少必要的营养供应而坏死,增强药物对肿瘤细胞的杀伤力,同时降低药物的系统毒性^[3]。索拉非尼是被证实有效的第一个系统应用于晚期肝癌的多靶点、多激酶抑制剂^[4],具有抑制血管新生的作用。紫杉醇能够与微管蛋白结合,有效促进微管聚合,从而通过抑制微管解聚使肿瘤细胞有丝分裂终止,最终导致肿瘤细胞凋亡^[5]。于在庆等^[6]发现,紫杉醇联合索拉非尼经导管动脉栓塞术治疗中晚期肝癌的疗效显著优于紫杉醇单一化疗,且安全性较好。但市售的紫杉醇多为注射剂,易引起严重的过敏反应,索拉非尼多为口服制剂,不良反应较多。因此,对于两种药物新剂型的研究已成为热点。

载药栓塞微球是一种以高分子材料为载体,将药物包裹成直径为1~500 μm的微小球状实体,可直接经动脉管导入,阻塞在肿瘤细胞血管,其既可阻断肿瘤细胞血供,所释放的药物又可抑杀肿瘤细胞,具有双重抗肿瘤的作用^[7];此外,还可减少给药次数,提升患者用药的方便性和依从性,减少不良反应。载药栓塞微球的释放度是其质量控制的关键指标之一。为提高患者用药的依从性,减少给药次数,本研究以紫杉醇和索拉非尼为模型药,聚乳酸-羟基乙酸(PLGA)为微球材料,制备了紫杉醇-索拉非尼-PLGA载药栓塞微球,并对其表征及体外释药特性进行了考察,旨在为肝癌的治疗提供更多的参考。

1 材料

1.1 仪器

1260型高效液相色谱仪,包括四元泵、自动进样器、二极管阵列检测器、Rev.B.04.03 色谱工作站(美国Agilent公司);ZNCL-G型磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限责任公司);3000型激光粒度仪(英国Malvern公司);CX31型光学显微镜(日本Olympus株式会社);FEI

Quanta 250型扫描电子显微镜(美国FEI公司);SHZ-82A型气浴恒温振荡器(金坛市白塔新宝仪器厂);KQ-5200型超声波清洗机(巩义市予华仪器有限责任公司);HC-3018R型离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司);AB204-S型十万分之一电子分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司)。

1.2 药品与试剂

紫杉醇原料药(江苏红豆杉药业有限公司,批号:20160819,纯度:99.50%);索拉非尼原料药(台州市鸿耀化工有限公司,批号:20170331,纯度:99.49%);紫杉醇对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100382-201603,纯度:99.90%);索拉非尼对照品(德国Bayer公司,批号:PY637215,纯度:99.50%);PLGA[山东省医疗器械研究所,批号:20170316,分子量:10 000 Da、20 000 Da、30 000 Da,丙交酯(LA)-乙交酯(GA)(50:50,摩尔比)];甲醇、乙腈均为色谱纯;二水合磷酸二氢钠盐、十二水合磷酸氢二钠盐、聚山梨酯80、聚乙烯醇1788等均为分析纯;水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 载药栓塞微球的制备

2.1.1 紫杉醇-索拉非尼-PLGA载药栓塞微球的制备

采用乳化-溶剂挥发法制备紫杉醇-索拉非尼-PLGA载药栓塞微球^[8-9]。分别精密称取紫杉醇原料药、索拉非尼原料药各适量,置于小烧杯中,加二甲基亚砜0.5 mL溶解,后加PLGA(10 000 Da)适量,加二氯甲烷5 mL溶解,超声(功率:200 W,频率:40 kHz,下同)处理5 min使其完全溶解,作为油相。另配制含聚乙烯醇1788的水溶液作为水相,于0 °C冰浴条件下将油相缓慢滴入水相,以400 r/min磁力搅拌,滴加完毕后继续搅拌0.5 h,再于25 °C条件下继续搅拌6 h,待有机溶剂挥发完全,微球固化,经0.8 μm微孔滤膜滤过,收集膜表面微球,以水洗3次后,干燥24 h,得紫杉醇-索拉非尼-PLGA载药栓塞微球,共制备3批(批号:20180622、20180623、20180624)。

2.1.2 空白微球的制备 不加紫杉醇原料药、索拉非尼原料药,按“2.1.1”项下方法制备空白微球。

2.2 紫杉醇、索拉非尼的含量测定

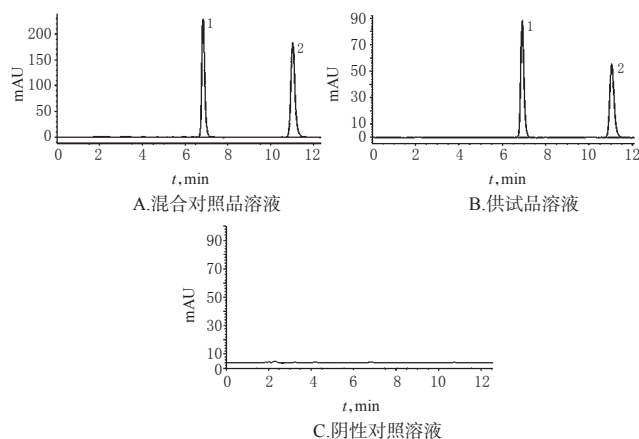
2.2.1 色谱条件 色谱柱: Agilent TC-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 水-乙腈 (40:60, V/V); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 228 nm; 柱温: 28 °C; 进样量: 10 μL。

2.2.2 混合对照品溶液的制备 分别精密称取干燥至恒质量的紫杉醇对照品、索拉非尼对照品各 20.00 mg, 精密称定, 置于同一 10 mL 棕色量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 摇匀, 得混合对照品贮备液, 取上述混合对照品贮备液 2 mL, 置于 10 mL 棕色量瓶中, 加甲醇定容, 摇匀, 即得紫杉醇、索拉非尼质量浓度均为 0.40 mg/mL 的混合对照溶液。精密量取上述混合对照溶液 2.5 mL, 加甲醇定容, 得紫杉醇、索拉非尼质量浓度均为 0.10 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取“2.1.1”项下紫杉醇-索拉非尼-PLGA 载药栓塞微球约 40 mg, 精密称定, 置于 10 mL 量瓶中, 加二氯甲烷适量, 超声处理 5 min 使载药栓塞微球完全溶解, 加甲醇定容, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.2.4 阴性对照溶液 取“2.1.2”项下空白微球适量, 按“2.2.3”项下方法制备阴性对照溶液。

2.2.5 系统适用性试验 取上述混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各适量, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图, 详见图 1。由图 1 可知, 在该色谱条件下, 各成分均能达到基线分离, 分离度 > 1.5, 理论板数以紫杉醇和索拉非尼峰计均不低于 3 000, 保留时间分别为 6.91、11.04 min, 阴性对照溶液对测定无干扰。



注: 1. 紫杉醇; 2. 索拉非尼

Note: 1. paclitaxel; 2. sorafenib

图 1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.2.6 线性关系考察 分别精密量取“2.2.2”项下混合对照溶液 0.05、0.1、0.25、0.5、5、10 mL, 加甲醇定容至 10 mL, 制成质量浓度分别为 2.0、4.0、10.0、20.0、200.0、400.0 μg/mL 的系列线性关系工作溶液。分别取上述系列线性关系工作溶液 10 μL, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以待测成分质量浓度(x, μg/mL)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归, 得紫杉

醇、索拉非尼回归方程分别为 $y=22.196x+22.031$ ($r=0.9996$)、 $y=24.925x+30.445$ ($r=0.9996$), 结果表明, 紫杉醇、索拉非尼检测质量浓度线性范围均为 2.0~400.0 μg/mL。

2.2.7 定量限与检测限考察 取“2.2.2”项下混合对照溶液适量, 倍比稀释, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 以信噪比 10:1、3:1 分别计算定量限、检测限。结果, 紫杉醇、索拉非尼的定量限分别为 1.902 6、1.890 2 μg/mL, 检测限分别为 0.985 5、1.264 5 μg/mL。

2.2.8 精密度试验 取“2.2.6”项下系列线性关系工作溶液 (质量浓度为 4.0、10.0、200.0 μg/mL) 适量, 按“2.2.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次, 记录峰面积并计算日内精密度; 按“2.2.1”项下色谱条件连续进样 5 d, 记录峰面积并计算日间精密度。结果, 紫杉醇、索拉非尼峰面积的日内 RSD 分别为 0.28%、0.92% ($n=6$); 紫杉醇、索拉非尼峰面积的日间 RSD 分别为 0.44%、1.08% ($n=5$), 表明日内和日间精密度均较好。

2.2.9 稳定性试验 取“2.2.3”项下供试品溶液 (批号: 20180624) 适量, 分别于室温下放置 0、2、4、6、8、12、24、48 h 时按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果, 紫杉醇、索拉非尼峰面积的 RSD 分别为 1.14%、1.21% ($n=8$), 表明供试品在室温下放置 48 h 内稳定性良好。

2.2.10 重复性试验 取“2.1.1”项下紫杉醇-索拉非尼-PLGA 载药栓塞微球 (批号: 20180624) 适量, 共 6 份, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 并以回归方程计算样品含量。结果, 紫杉醇、索拉非尼的平均含量分别为 11.20、8.51 mg/g, RSD 分别为 0.67%、0.86% ($n=6$), 表明本方法重复性良好。

2.2.11 回收率试验 取“2.1.2”项下空白微球适量, 共 9 份, 加入一定量的混合对照溶液, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积并计算回收率, 结果见表 1。

2.2.12 样品含量测定 取“2.1.1”项下 3 批紫杉醇-索拉非尼-PLGA 载药栓塞微球适量, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 并以回归方程计算样品中紫杉醇、索拉非尼的含量, 结果见表 2。

2.3 载药量和包封率的测定

按“2.1.1”项下方法分别制备以 3 种不同分子量 PLGA 为载体的紫杉醇-索拉非尼-PLGA 载药栓塞微球。分别精密称取上述紫杉醇-索拉非尼-PLGA 载药栓塞微球 40 mg, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积并按回归方程计算样品中紫杉醇、索拉非尼的含量, 进而计算 3 种微球中紫杉醇、索拉非尼的载药量和包封率, 详见表 3。载药量 (%) = (微球中药物质量/微球的总质量) × 100%; 包封率 (%) = (微球中药物质量/药物的投药量) × 100%。

表1 回收率试验结果(n=9)

Tab 1 Results of recovery tests(n=9)

待测成分	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	平均回收率,%	RSD,%
紫杉醇	0.402 0	0.398 0	99.00	101.5	1.12
	0.403 0	0.413 2	102.53		
	0.407 0	0.410 6	100.88		
	0.506 0	0.515 6	101.90		
	0.503 0	0.509 7	101.33		
	0.503 0	0.508 6	101.11		
	0.601 0	0.612 7	101.95		
	0.600 0	0.611 3	101.88		
	0.602 0	0.619 5	102.91		
索拉非尼	0.403 0	0.397 3	98.59	100.26	1.94
	0.401 0	0.399 0	99.50		
	0.405 0	0.417 0	102.96		
	0.502 0	0.514 2	102.43		
	0.503 0	0.495 7	98.55		
	0.505 0	0.516 4	102.26		
	0.603 0	0.593 3	98.39		
	0.601 0	0.591 5	98.42		
	0.605 0	0.612 4	101.22		

表2 样品含量测定结果(n=3,mg/g)

Tab 2 Results of content determination of samples(n=3,mg/g)

批号	紫杉醇	索拉非尼
20180622	10.87	8.24
20180623	11.25	8.55
20180624	11.02	8.50
平均	11.05	8.43

表3 不同分子量PLGA的紫杉醇-索拉非尼-PLGA载药栓塞微球的载药量和包封率(n=3,%)

Tab 3 Drug-loading amount and encapsulation efficiency of Paclitaxel-sorafenib-PLGA-loaded embolic microspheres with different molecular weights(n=3,%)

分子量	紫杉醇载药量	紫杉醇包封率	索拉非尼载药量	索拉非尼包封率
30 000 Da	1.02	63.56	0.82	46.88
20 000 Da	1.07	66.62	0.83	49.40
10 000 Da	1.12	73.11	0.85	58.65

由表3可知,随着PLGA分子量的减小,紫杉醇、索拉非尼的包封率呈现递增趋势,其原因可能为PLGA为直链线性分子,随着其分子量的增加,PLGA链段的分子链长度随之增加,其与二氯甲烷有机相黏度也随之增加^[10]。PLGA的分子量对亲水性药物和疏水性药物的载药量、包封率影响不同,对于亲水性药物,增加PLGA的分子量,微球的载药量和包封率增加,但疏水性药物则相反。综合考虑,选择PLGA分子量为10 000 Da。

2.4 紫杉醇-索拉非尼-PLGA载药栓塞微球的表征

2.4.1 粒径及粒径分布 采用激光粒度仪以湿法^[11-12]测定紫杉醇-索拉非尼-PLGA载药栓塞微球的粒径,粒径分布见图2。

由图2可知,紫杉醇-索拉非尼-PLGA载药栓塞微球的平均粒径为(139±1.16)μm,微球粒径分布集中,粒径比较均一。

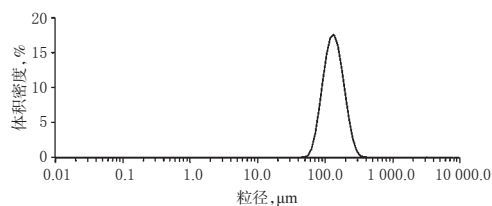


图2 紫杉醇-索拉非尼-PLGA载药栓塞微球的粒径分布

Fig 2 Particle size distribution of Paclitaxel-sorafenib-PLGA-loaded embolic microspheres

2.4.2 外观形态 取紫杉醇-索拉非尼-PLGA载药栓塞微球适量,用水分散后,置于光学显微镜下观察。结果,紫杉醇-索拉非尼-PLGA载药栓塞微球形态圆整,表面光滑无粘连,分散性良好,详见图3。另取适量紫杉醇-索拉非尼-PLGA载药栓塞微球,均匀分散在贴有导电胶的载样台喷金后,采用扫描电子显微镜(电子束强度为10 kV)观察微球表面形态。结果,微球表面光滑无突起,无明显药物结晶存在,提示药物被包裹于载体材料中,详见图4。

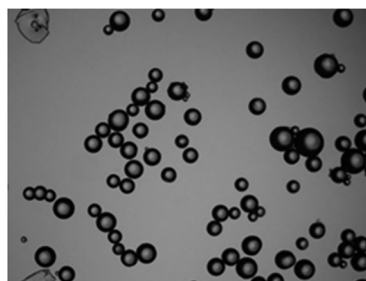


图3 紫杉醇-索拉非尼-PLGA载药栓塞微球的显微镜图(×40)

Fig 3 Micrograph of Paclitaxel-sorafenib-PLGA-loaded embolic microspheres (×40)

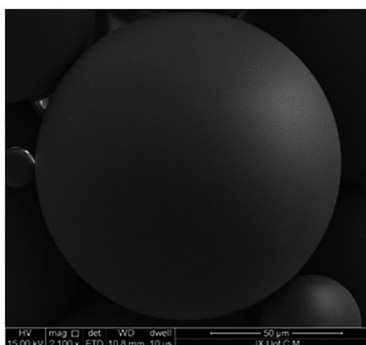


图4 紫杉醇-索拉非尼-PLGA载药栓塞微球的扫描电镜图(×2 100)

Fig 4 Scanning electron microscopy of Paclitaxel-sorafenib-PLGA-loaded embolic microspheres(×2 100)

2.5 紫杉醇-索拉非尼-PLGA载药栓塞微球的体外释放度试验

取紫杉醇-索拉非尼-PLGA载药栓塞微球约100 mg,共168份(分别设置70、60、50、37℃4个温度,每个

温度设14个取样点,平行3份),精密称定,放入释放瓶中,加释放介质(10 mmol/L磷酸盐缓冲液,pH 7.4;含1%聚山梨酯80)150 mL(符合漏槽条件),分别置于气浴恒温振荡器中,转速75 r/min,进行体外释放试验。分别于1、2、3、4、6、8、12、15、18、21、26、31、36、41 d时取出释放瓶,以0.8 μm微孔滤膜滤过,分离得到微球,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.3”项下含量测定方法测定微球中剩余药物的含量,并计算紫杉醇、索拉非尼的累积释放度(Q , Q =药物累积释放量/初始微球中药物总质量×100%)^[13],以时间(t , d)为横坐标、药物累积释放度(Q , %)为纵坐标绘制释放曲线,结果见图5、图6。结果显示,紫杉醇-索拉非尼-PLGA载药栓塞微球在70℃下,4 d内紫杉醇的 Q 为(93.65±5.64)%,索拉非尼的 Q 为(90.17±4.37)%;在60℃下,12 d内紫杉醇的 Q 为(91.20±6.28)%,索拉非尼的 Q 为(94.03±6.38)%;在50℃下,15 d内紫杉醇的 Q 为(81.5±3.04)%,索拉非尼的 Q 为(84.84±7.89)%;在37℃下,41 d内紫杉醇的 Q 为(71.83±3.96)%,索拉非尼的 Q 为(81.44±6.02)%,提示在较高温度下,微球中的紫杉醇、索拉非尼可在短时间内接近完全释放,而在37℃下具有良好的缓释作用。

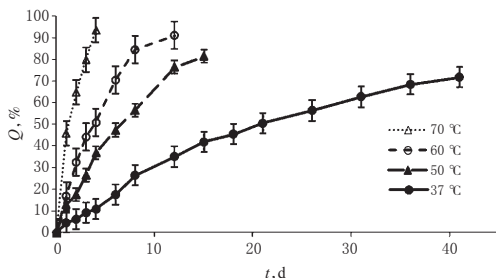


图5 不同温度下紫杉醇-索拉非尼-PLGA载药栓塞微球中紫杉醇的体外释放曲线

Fig 5 Release curves of paclitaxel from Paclitaxel-sorafenib-PLGA-loaded embolic microspheres prepared at different temperatures

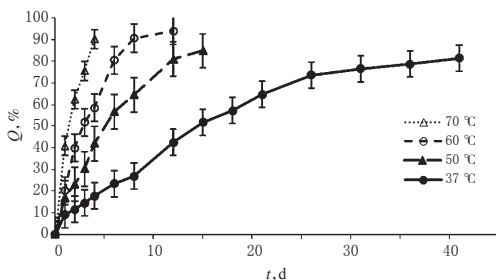


图6 不同温度下紫杉醇-索拉非尼-PLGA载药栓塞微球中索拉非尼的体外释放曲线

Fig 6 Release curves of sorafenib from Paclitaxel-sorafenib-PLGA-loaded embolic microspheres prepared at different temperatures

紫杉醇-索拉非尼-PLGA载药栓塞微球体外释放数据分别采用零级动力学方程、一级动力学方程、Higuchi方程进行拟合,发现两药均符合一级动力学方程($r >$

0.99),详见表4。

表4 紫杉醇-索拉非尼-PLGA载药栓塞微球体外释放数据的模型拟合结果

Tab 4 Model fitting results of *in vitro* release data of Paclitaxel-sorafenib-PLGA-loaded embolic microspheres

温度	拟合模型	紫杉醇拟合方程	r	索拉非尼拟合方程	r
70℃	零级动力学方程	$Q=22.123t+12.6765$	0.9607	$Q=21.509t+10.764$	0.9685
	一级动力学方程	$\ln(100-Q)=-0.568t+4.6006$	0.9968	$\ln(100-Q)=-0.504t+4.6037$	0.9979
	Higuchi方程	$Q=46.807(t-0.046)^{1/2}$	0.9998	$Q=45.983(t-0.207)^{1/2}$	0.9997
60℃	零级动力学方程	$Q=7.617t+14.6246$	0.9479	$Q=7.731t+19.6599$	0.9188
	一级动力学方程	$\ln(100-Q)=-0.203t+4.6178$	0.9973	$\ln(100-Q)=-0.252t+4.6173$	0.9968
	Higuchi方程	$Q=28.899(t-0.651)^{1/2}$	0.9934	$Q=30.801(t-0.411)^{1/2}$	0.9857
50℃	零级动力学方程	$Q=5.408t+8.9070$	0.9792	$Q=5.518t+13.1053$	0.9626
	一级动力学方程	$\ln(100-Q)=-0.111t+4.6067$	0.9977	$\ln(100-Q)=-0.131t+4.6185$	0.9976
	Higuchi方程	$Q=22.557(t-1.443)^{1/2}$	0.9892	$Q=23.102(t-0.628)^{1/2}$	0.9941
37℃	零级动力学方程	$Q=1.809t+6.8561$	0.9763	$Q=2.066t+11.1006$	0.9642
	一级动力学方程	$\ln(100-Q)=0.033t+4.5970$	0.9979	$\ln(100-Q)=0.046t+4.6215$	0.9966
	Higuchi方程	$Q=11.680(t-2.659)^{1/2}$	0.9955	$Q=13.699(t-1.674)^{1/2}$	0.9878

2.6 体外释放曲线的预测与实测

采用阿伦尼乌斯方程计算70、60、50、37℃温度下紫杉醇、索拉非尼的反应速率常数 k ,以 $\lg k$ 对 $1/T$ 绝对温度(T)绘制标准曲线,同时预测37℃温度下紫杉醇、索拉非尼的反应速率常数 k_1 ,并与实测(k_0)进行比较,结果见图7、表5。采用一级动力学方程绘制37℃下紫杉醇、索拉非尼不同时间点的预测释放度曲线,同时采用DD-solver 1.0药物溶出度数据处理软件将预测(37℃)曲线与实测(37℃)曲线进行相似因子(f_2)拟合,结果见图8。

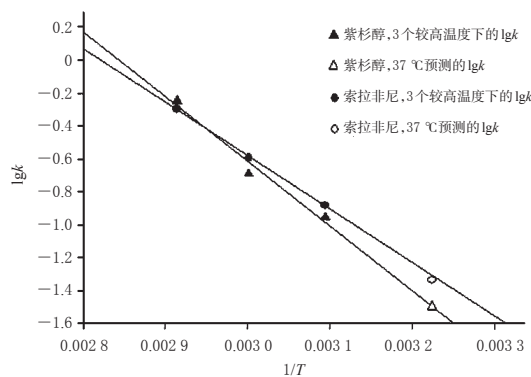


图7 不同温度下紫杉醇、索拉非尼反应速率常数的预测值与实测值曲线

Fig 7 Predicted and measured value curves of reaction rate constant of paclitaxel and sorafenib at different temperatures

表5 37℃温度下紫杉醇、索拉非尼反应速率常数的预测值与实测值

Tab 5 Predicted and measured value curves of reaction rate constant of paclitaxel and sorafenib at 37℃

成分	预测 k_1	实测 k_0	RSD, %
紫杉醇	0.032	0.033	3.13
索拉非尼	0.049	0.046	6.12

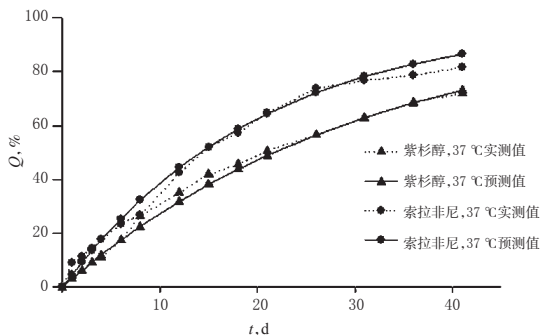


图8 37 °C温度下紫杉醇、索拉非尼释放度的预测值与实测值曲线

Fig 8 Predicted and measured value curves of release rate of paclitaxel and sorafenib at 37 °C

由图7、表5可知,在37 °C下紫杉醇、索拉非尼 k_1 与 k_0 的RSD小于10%,提示所建动力学模型可行。

由图8可知,相关数据经DDsolver 1.0药物溶出度数据处理软件处理后,得到紫杉醇、索拉非尼的 f_2 分别为83.53、73.95,提示紫杉醇、索拉非尼在37 °C下的实测释放曲线与预测释放曲线的 f_2 符合 $50 \leq f_2 < 100$ 的要求^[14],模型拟合成功,两条曲线具有相似性。

3 讨论

本研究采用高效液相色谱法测定了紫杉醇-索拉非尼-PLGA载药栓塞微球中紫杉醇和索拉非尼的含量,该方法稳定性较好,操作简便。

PLGA作为降解材料可长期使用,且在体内无蓄积,能延缓药物释放时间,降低药物毒性,是载药栓塞微球常用的载体材料之一^[15]。乳化-溶剂挥发法操作简单,在油相的选择上,二氯甲烷对PLGA的溶解性极好,且易于挥发,使微球固化成球^[16]。

紫杉醇是一种高度亲脂性药物,故其向外水相的扩散趋于最小化,而致紫杉醇的包封率与载药量均高于索拉非尼。有研究认为,肝脏使用的栓塞微球粒径应大于40 μm ,粒径偏小易通过侧枝循环分布到肺、脾等部位,而增加副作用^[17]。因此,粒径是载药栓塞微球质量控制的重要因素之一。

在37 °C下,为保证漏槽条件及释放介质体积较大,使释放在介质中的药物浓度较低,这不利于具有高灵敏度药物的含量测定。故本研究采用分离微球与释放介质,测定微球中剩余药物的含量,间接计算微球的释放度,以降低检测难度。

释放度在生理温度(37 °C)下进行,试验周期较长,需要数天、几个月甚至1年以上的的时间。因此,寻找一种具有良好相关性的体外释放度预测试验方法,可缩短处方工艺优化的周期,节约试验成本,对快速检测载药栓塞微球的质量具有重要的意义。有研究发现,纳曲酮-PLGA载药微球在生理温度下(37 °C)与高温状态下的释放曲线具有相关性^[18]。Aso Y等^[19]研究表明,孕酮的药物释放度可随温度的升高而显著增加。Zolnik BS

等^[20]研究表明,地塞米松 PLGA 载药微球高温状态下的释放度显著加快。本研究考察了紫杉醇-索拉非尼-PLGA载药栓塞微球在高温条件下的释药特性,通过升高介质温度,来达到加快载药栓塞微球释药的目的;通过对两药的累积释放度进行了预测,并将预测曲线与实测曲线进行拟合。结果表明,紫杉醇-索拉非尼-PLGA载药栓塞微球在较高温度(70、60、50 °C)下的释放度与药物生理温度(37 °C)下的释放度存在相关性,提示采用高温预测试验替代药物生理温度(37 °C)下释放试验具有一定的可能性,能有效缩短试验时间,尤其适用于降解周期较长的PLGA样品的降解试验^[17]。

综上所述,成功制得紫杉醇-索拉非尼-PLGA 栓塞微球,其形态较好,具有较好的缓释作用;预测释放曲线与实测释放曲线相关性较好;所建含量测定方法操作简便,稳定性较好。

参考文献

- [1] TORRE LA, BRAY F, SIEGEL RL, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(2): 87-108.
- [2] 何炯富. 163例原发性肝癌经导管肝动脉栓塞化疗后并发症分析[J]. *中国乡村医药*, 2014, 21(3): 16-17.
- [3] 侯志勇, 黄海波, 王立强. 动脉栓塞微球的研究进展[J]. *中国医药科学*, 2012, 2(16): 9-11.
- [4] 张明娟, 刘佳, 向晓星, 等. TACE联合索拉非尼治疗晚期肝癌的Meta分析[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2015, 22(2): 148-154, 160.
- [5] 金涛, 李铁晶, 吴桐, 等. 紫杉醇抗肿瘤机理与毒副作用[J]. *东北农业大学学报*, 2005, 36(6): 816-819.
- [6] 于在庆, 常阳. 紫杉醇联合索拉非尼治疗中晚期肝细胞癌效果分析[J]. *医学理论与实践*, 2018, 31(10): 1411-1413.
- [7] 沈天皓, 杨金祖. 肝癌介入治疗栓塞剂研究进展[J]. *黑龙江医学*, 2014, 38(3): 316-320.
- [8] WANG Y, MOLIN DG, SEVRIN C, et al. In vitro and in vivo evaluation of drug-eluting microspheres designed for transarterial chemoembolization therapy[J]. *Int J Pharm*, 2016, 503(1): 150-162.
- [9] FELDER CHB, BLANCO-PRÍETO MJ, HEIZMANN J, et al. Ultrasonic atomization and subsequent polymer desolvation for peptide and protein microencapsulation into biodegradable polyesters[J]. *J Microencapsul*, 2003, 20(5): 553-567.
- [10] 李晴宇, 叶晓莉, 陈玲, 等. 姜黄素 PLGA 纳米粒的制备及制剂学性质分析[J]. *实用药物与临床*, 2016, 19(6): 753-757.
- [11] 吴燕, 刘菁, 安彦, 等. 湿法测定甲基纤维素的粒度与粒度分布[J]. *天津药学*, 2018, 30(4): 18-20, 69.
- [12] 陈丹丹, 张晨夕, 徐禄. 马尔文 MS3000 粒度仪在碳酸钙粒径分析中的应用[J]. *黑龙江造纸*, 2018, 46(1): 32-34.
- [13] 蔡雁, 钦富华, 胡英, 等. 关节腔注射用双醋瑞因聚乳酸-羟基乙酸共聚物微球的制备及相关性质研究[J]. *中国药*

基于网络药理学探讨骨碎补治疗骨质疏松症的作用机制[△]

林 适^{1*}, 吴潇烁¹, 陈柏行¹, 陈 超¹, 吴宇航¹, 周琦石², 何才勇^{1,2#} (1. 广州中医药大学第一临床医学院, 广州 510006; 2. 广州中医药大学第一附属医院一骨科, 广州 510405)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)10-1333-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.10.08

摘要 目的: 探讨骨碎补治疗骨质疏松(OP)的作用机制。方法: 采用中药系统药理学成分分析平台(BATMAN-TCM)数据库获得骨碎补的活性化合物及其作用靶点, 再通过GeneCards数据库获得相关化合物靶点, 取两者交集得到骨碎补作用靶点。通过TTD、DrugBank、OMIM、GAD、PharmGKB、CTD数据库获得OP疾病相关靶点, 与骨碎补作用靶点取交集后获得骨碎补-OP疾病交集靶点。运用STRING在线数据库构建蛋白相互作用(PPI)网络, 再通过Cytoscape 3.6.1软件进行分析获得关键靶点, 并进行可视化展示。借助DAVID在线工具进行交集靶点的基因本体论(GO)分析。通过在线分析工具KOBAS进行KEGG通路富集分析, 筛选出显著富集的通路($P < 0.05$)。通过MCC算法进行关键基因的筛选。结果: 共获得骨碎补活性化合物7个, 骨碎补-OP疾病交集靶点136个。GO分析结果显示, 上述交集靶点的生物途径主要包括化学反应、类固醇代谢过程、细胞对化学刺激的应答等; 细胞组分主要包括细胞外间隙、胞外区部分、细胞质等; 分子功能主要有血红素结合、四吡咯结合、单氧酶活性等。KEGG通路富集结果显示, 上述靶点主要与骨代谢、内分泌、炎症、肿瘤、细胞凋亡等信号通路相关。通过MCC算法筛选得到关键基因30个, 包括ALB、AKT1、JUN等($P \leq 1.96 \times 10^{-9}$)。结论: 骨碎补治疗OP的作用机制呈多靶点、多系统的特性, 除了影响骨代谢相关途径还可影响体内多种代谢途径。

关键词 骨碎补; 骨质疏松症; 作用机制; 通路; 靶点; 网络药理学

Investigation of the Mechanism of Osteoporosis Treated by *Drynariae rhizoma* Based on Network Pharmacology

LIN Shi¹, WU Xiaoshuo¹, CHEN Baihang¹, CHEN Chao¹, WU Yuhang¹, ZHOU Qishi², HE Caiyong^{1,2} (1. First Clinical Medical College of Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510006, China; 2. First Dept. of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the mechanism of *Drynariae rhizoma* in the treatment of osteoporosis (OP). METHODS: The active compounds and targets of *D. rhizoma* were obtained by using Bioinformatics Analysis Tool for Molecular Mechanism of Traditional Chinese Medicine (BATMAN-TCM database). The targets of relevant compounds were also obtained by GeneCards database, and targets of *D. rhizoma* were obtained by the combination of the two. The disease targets corresponding to

- 房, 2018, 29(12):1600-1604.
- [14] 谢黎崖, 吴永良, 朱佩娟, 等. 载羟基喜树碱聚乳酸微球的制备与体外释药研究[J]. 中国新药杂志, 2012, 21(21): 2557-2561.
- [15] 王玉, 王东凯, 孙念. 聚丙烯酯乙交酯共聚物作为大分子药物载体的纳米及微米技术研究进展[J]. 中国药理学杂志(网络版), 2009, 7(3):205-211.
- [16] 孙美丽, 班俊峰, 黄思玉, 等. PLGA微球载药量和包封率的影响因素及控制[J]. 广东药学院学报, 2011, 27(6): 643-648.
- [17] 林红赛, 刘曦, 于少君, 等. 聚乙交酯丙交酯共聚物体外实时降解和加速降解的相关性研究[J]. 首都食品与医药, 2016, 23(12):26-28.
- [18] ANDHARIYA JV, CHOI S, WANG Y, et al. Accelerated in vitro release testing method for naltrexone loaded PLGA microspheres[J]. *Int J Pharm*, 2017, 520(1/2): 79-85.
- [19] ASO Y, YOSHIOKA S, LIWAN POA, et al. Effect of temperature on mechanisms of drug release and matrix degradation of poly(-lactide) microspheres[J]. *J Control Release*, 1994, 100(31):31-39.
- [20] ZOLNIK BS, LEARY PE, BURGESS DJ. Elevated temperature accelerated release testing of PLGA microspheres [J]. *J Control Release*, 2006, 112(3):293-300.

△ 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81674001)

* 硕士研究生。研究方向: 中医药治疗骨伤科疾病。电话: 020-36591317。E-mail: linshitongxue@163.com

通信作者: 副主任医师, 硕士生导师, 硕士。研究方向: 中医药治疗骨伤科疾病。电话: 020-36488481。E-mail: yuhuanpig@live.com

(收稿日期: 2018-12-18 修回日期: 2019-04-10)

(编辑: 陈 宏)