

交联环糊精金属有机骨架负载甲氨蝶呤缓释微粒的制备及体内外评价

王 勤^{1,2}, 王彩芬², 伍 丽², 陈晓锦^{1,2}, 孙宏宇², 桂双英¹, 张继稳^{1,2*}

(1. 安徽中医药大学, 安徽 合肥 230012; 2. 中国科学院上海药物研究所, 上海 201210)

摘要: 甲氨蝶呤 (methotrexate, MTX) 注射给药的半衰期短, 毒副作用大。为了改善 MTX 注射给药的缺陷, 本研究将 MTX 装载在交联环糊精金属有机骨架 (crosslinked cyclodextrin metal-organic framework, COF) 中, 得到载药微粒 MTX@COF, 采用溶剂蒸发法将阳离子脂质材料 (2,3-二油酰基-丙基)-三甲胺 [(2,3-dioleoyl-propyl)-trimethylamine, DOTAP] 包裹在 MTX@COF 表面, MTX@COF@DOTAP 的微粒形态没有显著改变, 但具有不同的表面电荷特征。以水和磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 为释放介质考察缓释微粒的体外释放, 并通过大鼠药代动力学评价其体内释放特征。体外释放结果显示, 在水中 MTX、MTX@COF 和 MTX@COF@DOTAP 于 6 h 的累积释放量分别为 92.70%、36.31% 和 18.19%; 在磷酸盐缓冲液中 MTX、MTX@COF 和 MTX@COF@DOTAP 于 4 h 的累积释放量分别为 90.82%、79.37% 和 58.30%, 表明 MTX@COF 可显著延缓 MTX 的释放, 经 DOTAP 修饰后的 MTX@COF 可进一步延缓 MTX 的释放。大鼠药代动力学研究结果显示, 皮下注射 MTX@COF@DOTAP 组与 MTX@COF 组及 MTX 组相比, 其平均滞留时间 $MRT_{(0-\infty)}$ 和达峰时间 T_{max} 明显延长, 且 MTX@COF@DOTAP 组的药时曲线下面积 $[AUC_{(0-\infty)}]$ 是 MTX 组的 1.8 倍。本研究制备的 MTX@COF@DOTAP 微粒经皮下注射给药具有一定的缓释效果, 并提高了 MTX 的生物利用度, 为 MTX 的新剂型开发提供一个新思路。

关键词: 交联环糊精金属有机骨架; 甲氨蝶呤; 阳离子脂质材料; 缓释制剂; 体外释放; 药代动力学

中图分类号: R943 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)06-1712-07

Preparation and evaluation of methotrexate sustained-release particles using crosslinked cyclodextrin metal-organic frameworks

WANG Qin^{1,2}, WANG Cai-fen², WU Li², CHEN Xiao-jin^{1,2}, SUN Hong-yu²,
GUI Shuang-ying¹, ZHANG Ji-wen^{1,2*}

(1. Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China; 2. Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201210, China)

Abstract: Methotrexate (MTX) injection has a short half-life and significant toxic side effects. In order to overcome the demerits of MTX injection, MTX@COF was prepared for subcutaneous injection by loading MTX in crosslinked cyclodextrin metal-organic framework (COF) in this study. The cationic lipid material (2, 3-dioleoyl-propyl)-trimethylamine (DOTAP) was then coated on the MTX@COF surface by solvent evaporation. Different surface charge characteristics were observed in the coated MTX@COF@DOTAP with no significant change in particle morphology. The *in vitro* release behaviors of sustained-release particles were investigated in water and phosphate buffer (pH 7.4), and the *in vivo* release characteristics were evaluated for pharmacokinetics in rats. The *in vitro* release results showed that the cumulative release of MTX, MTX@COF and MTX@COF@DOTAP within

收稿日期: 2021-02-06; 修回日期: 2021-03-12.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81773645, 81803441); “重大新药创制”科技重大专项“新辅料关键技术研究及产业化生产” (2018zx09721002-009).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-21-20231980, E-mail: jwzhang@simm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-0216

6 h was 92.70%, 36.31% and 18.19% in water, respectively; the cumulative release of MTX, MTX@COF and MTX@COF@DOTAP within 4 h was 90.82%, 79.37% and 58.30% in phosphate buffer, respectively; the results showed that MTX@COF can significantly delay the release of MTX, the modification to MTX@COF by DOTAP can further delay the release of MTX. Pharmacokinetic studies in rats showed that the mean retention time [MRT_(0-t)] and the time to peak (T_{max}) of the subcutaneous injection of MTX@COF@DOTAP group were significantly prolonged compared with the MTX@COF group and the MTX group. The area under the concentration-time curve [AUC_(0-t)] of the MTX@COF@DOTAP subcutaneous injection group was 1.8 times high as that of the MTX group. In this study, MTX@COF@DOTAP particles had a certain sustained-release effect, and could prolong the bioavailability of MTX by subcutaneous injection, which provided a new idea for the development of new MTX dosage forms.

Key words: crosslinked cyclodextrin metal-organic framework; methotrexate; cationic lipid material; sustained-release preparation; release *in vitro*; pharmacokinetics

化疗药物甲氨蝶呤 (methotrexate, MTX) 用于治疗急性白血病^[1,2]、绒毛膜上皮癌^[3]和肺癌^[4]等, 但注射用 MTX 存在半衰期短、生物利用度低^[5,6]和毒副作用大等缺陷^[7,8]。已有许多关于 MTX 给药系统的研究, 用于改善 MTX 注射给药的缺陷, 目前延缓 MTX 释放的给药系统包括植入剂、微球和聚合物胶束等。Liu 等^[9]通过热熔挤出法制备 MTX 缓释植入剂, 可在大鼠皮下持续释放 15 天。Modu 等^[10]采用 O/W 溶剂挥发法制备 MTX 微球, 可在体外持续释放 30 天, 明显延缓 MTX 的释放。Madhwi 等^[11]通过甘氨酸系聚乳酸聚合物胶束递送甲氨蝶呤, 包载在纳米结构中的 MTX 在大鼠中生物利用度增加了约 4 倍, 保留时间增加了 2 倍。以上方法制备的 MTX 缓释微粒虽具有显著的缓释效果, 但制备工艺相对复杂。本研究拟采用溶剂孵育法将 MTX 装载入水稳定的新型骨架材料中, 而 MTX 几乎不溶于所有的有机溶剂。因此, 制备 MTX@COF 缓释微粒是本研究的一个难点。

环糊精金属有机骨架 (cyclodextrin metal-organic framework, CD-MOF) 是一类新型的多孔超分子材料, 具有比表面积大、负载能力高和生物相容性好等^[12,13]特点, 作为药物载体显示出巨大的发展潜力, 成功包载了阿齐沙坦^[14]、布地奈德^[15]、丹皮酚^[16]和地塞米松^[17]等药物, 用于改善药物的溶解性、吸收度和实现肺部递药。但 CD-MOF 遇水不稳定, 在潮湿环境中会迅速崩解, 不利于肿瘤药物的递送。基于 CD-MOF 上的羟基可进一步修饰和功能化的特点, 采用碳酸二苯酯作为交联剂, 通过化学反应将碳酸酯键与 CD-MOF 上的羟基交联制备交联环糊精金属有机骨架 (crosslinked cyclodextrin metal-organic framework, COF)。该方法提高了 CD-MOF 在水中的稳定性且不影响颗粒的大小和形状, 在水中放置 24 h 后仍保持其立方体结构, 拓展了其在药物递送方面的应用^[18]。另外, COF 由环糊精组

成, 具有良好的生物相容性, 在生物应用方面具有独特的优势。研究确证 COF 具有高度的肺靶向功能, 由靶头 RGD 多肽和 COF 组成的新型肺癌靶向递药系统, 可以显著抑制肺癌的生长和转移, 降低多柔比星的给药剂量和毒副作用^[19]。作为一种药物储库, COF 负载多柔比星类抗肿瘤药物的能力较环糊精海绵提高了 8 倍^[18]。另外, 脂质材料的修饰在延缓药物的释放方面发挥了很大的作用, 但制备脂质体工艺相对复杂^[20-23]。阳离子脂质材料 (2,3-二油酰基-丙基)-三甲胺 [(2,3-dioleoyl-propyl)-trimethylamine, DOTAP] 是一种非病毒载体, 在体内可生物降解, 能通过静电作用与带负离子的基团相互作用, 是一种良好的缓释材料^[24,25]。

本文采用溶剂孵育法将 MTX 装载在稳定性较好的 COF 孔隙中制备 MTX@COF 载药微粒, 并通过溶剂蒸发法将 DOTAP 包裹在 MTX@COF 微粒表面, 延缓 MTX 的体内外释药。

材料与方法

仪器 Agilent 1260 高效液相色谱仪、G6460A 三重四级杆质谱仪 (美国安捷伦科技有限公司); S3400N 扫描电子显微镜 (日本日立公司); Nicolet 6700 傅里叶变换红外光谱仪 (美国赛默飞世尔科技公司); PYRIS 1 热重分析仪 (美国珀金埃尔默公司)。

药品与试剂 γ -环糊精 (γ -CD, 广州泰龙化学有限公司); 甲氨蝶呤 (纯度 $\geq 98\%$, 武汉润泽伟业科技有限公司); 乙腈 (色谱纯)、*N,N*-二甲基甲酰胺 (*N,N*-dimethyl formamide, DMF) (北京百灵威科技有限公司); 碳酸二苯酯 (diphenyl carbonate, DPC, 99%, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 三乙胺 (triethylamine, TEA)、氢氧化钾、聚乙二醇 20000、盐酸、柠檬酸、无水磷酸氢二钠、氢氧化钠和生理盐水购自国药集团试剂有限公司, 所有试剂均为分析纯; (2,3-二油酰基-丙基)-三甲胺

(DOTAP, 上海艾伟拓医药科技有限公司)。

实验动物 18只雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠购自上海实验动物中心, 体重 250~270 g。所有动物实验参照中国科学院上海药物研究所“实验动物管理和使用委员会 (IACUC)”规定, 实验动物的 IACUC 审批号为 2020-04-ZJW-27。

色谱条件 色谱柱 Dikma Diamonsil C18 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 保护柱 Phenomenex C18 (4 mm×3.0 mm, 5 μm); 流速 1 mL·min⁻¹; 柱温 25 °C; 进样量 10 μL; 检测波长 302 nm; 流动相: 乙腈-7.0% 枸橼酸溶液-2.0% 无水磷酸氢二钠溶液为 10:10:80 (v/v/v, pH 6.0)。

交联环糊精金属有机骨架的制备 根据本课题组前期报道的方法^[26]合成 CD-MOF。按照 $n_{\text{CD-MOF}}:n_{\text{DPC}}$ 的投料摩尔比为 1:7, 将收集的 CD-MOF 晶体与 DPC 加入到 DMF 中孵育, 以适量 TEA 作为催化剂加速反应, 400 r·min⁻¹, 80 °C 反应 24 h。交联反应完成后, 冷却至室温, 加入等体积的 95% 乙醇终止反应, 离心, 弃上清, 沉淀用等体积的纯水和丙酮各洗涤 2 次, 最后在 40 °C 真空干燥箱中干燥 4 h。

MTX@COF 的制备与含量测定 按照 MTX:COF 的投料摩尔比为 5:1, 称取 MTX 1.80 g, 溶于 30 mL 0.1 mol·L⁻¹ 碳酸铵溶液, 加入相应质量的 COF, 25 °C、400 r·min⁻¹ 条件下, 搅拌 4 h 后, 离心, 弃上清。沉淀中加入适量 10% 乙酸石油醚溶液, 调节 pH, 石油醚洗涤 3 次后, 于真空干燥箱 40 °C 干燥 12 h。称取适量 MTX@COF, 加入 1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶解 COF 后, 再加入等量盐酸溶液中和, 滤过, 按照上述“色谱条件”项下要求测定 MTX 含量。MTX 的载药量按公式 (1) 计算。

$$W = \frac{M_{\text{MTX}}}{M_{\text{MTX@COF}}} \times 100\% \quad (1)$$

其中, W 为甲氨蝶呤的载药量, M_{MTX} 为 MTX 的测得量, $M_{\text{MTX@COF}}$ 为 MTX@COF 的称样量。

MTX@COF@DOTAP 的制备 称取 MTX@COF 200 mg 于烧杯中, 少量多次加入 DOTAP 乙醇溶液 (DOTAP 20 mg 溶于 0.3 mL 无水乙醇) 0.3 mL, 快速搅拌均匀后于 60 °C 鼓风干燥箱中干燥。包裹后的载药量同 MTX@COF 中载药量测定和计算。

粉体表征

扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM) 取少量样品粉末固定于样品台, 喷金, 以加速电压 10 kV 进行扫描并采集图像。

热重分析 (thermogravimetric analyzer, TGA) 和差示扫描量热法 (differential scanning calorimetry, DSC) 将 5~10 mg 样品粉末放入铂金坩埚中, 设定升温范围为 25~400 °C, 升温速度为 10 °C·min⁻¹, N₂ 流速为

20 mL·min⁻¹。

傅里叶变换红外光谱 (Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR) 分别将 MTX、COF、MTX@COF、物理混合物 MTX&COF (PM) 和 MTX@COF@DOTAP 与溴化钾 (1:100) 混合均匀, 置于压片装置上压制均匀透明的薄片。设置扫描参数为红外显微镜光栏 10 μm×10 μm, 光谱范围 400~4 000 cm⁻¹, 分辨率 4 cm⁻¹。

Zeta 电位 分别吸取 1 mg·mL⁻¹ 的待测样品混悬液 (分散介质为纯水) 1 mL, 运用动态光散射法测定 COF、MTX@COF 和 MTX@COF@DOTAP 混悬液的 zeta 电位。

体外释放研究 分别称取 MTX、MTX@COF 和 MTX@COF@DOTAP (相当于 MTX 含量 1 mg) 于 50 mL 离心管中, 加入磷酸盐缓冲介质 (pH 7.4) 30 mL, 置于 50 r·min⁻¹, 37 °C 的恒温摇床, 分别于 0、0.5、1、2、4、6、8 和 12 h 取样 1 mL, 并补加等体积溶出介质。吸取样品溶液, 过滤后, 经 HPLC 法测定, 记录峰面积, 外标法计算 MTX 的累积释放量。

药代动力学考察 18 只雄性健康 SD 大鼠 (250 ± 20 g) 随机分成 3 组, 每组 6 只。于大鼠右侧背部皮下注射给药, 给药组分别为 MTX 原料药组、MTX@COF 组和 MTX@COF@DOTAP 组, 给药体积约 0.3 mL, 给药剂量为 5 mg·kg⁻¹ (以 MTX 计)。实验动物在给药 12 h 前禁食, 实验期间自由饮水。MTX 原料药组、MTX@COF 组和 MTX@COF@DOTAP 组分别于给药前和给药后 0.5、1、1.5、2、3、4、6 和 8 h 眼眶后静脉取血; 血样置肝素化的离心管中, 3 500 r·min⁻¹ 离心 10 min, 分离血浆, 冻存待测。

血浆样品前处理 取血浆样品 50 μL, 加二硫苏糖醇 (10 mg·mL⁻¹)、抗氧化剂溶液 (含柠檬酸、抗坏血酸和二硫苏糖醇, 其浓度均为 100 μg·mL⁻¹) 和内标 (叶酸溶液 400 ng·mL⁻¹) 各 10 μL, 涡旋 60 s, 加入乙腈 120 μL, 涡旋 120 s, 12 000 r·min⁻¹ 离心 20 min。将上清液转移至干净的离心管中, 并在 37 °C 的温和氮气下吹干, 用 50 μL 上述抗氧化剂溶液复溶, 并精密移取样品 20 μL, 注入 HPLC-MS/MS 分析。

HPLC-MS/MS 条件 色谱柱 Phenomenex XB-C18 (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 保护柱 Phenomenex C18 (4 mm×3.0 mm); 流速 0.7 mL·min⁻¹; 柱温 25 °C; 进样量 20 μL; 流动相为 0.2% 甲酸和 0.2% 乙酸水溶液 (A)-甲醇 (B); 梯度洗脱: 0~2 min, 2% B; 2~5 min, 2%~70% B; 5~5.9 min, 70% B; 5.9~6 min, 70%~95% B; 6~8 min, 95% B; 8~8.1 min, 95%~2% B; 8.1~13 min, 2% B。采用正离子电喷雾电离模式检测, 检测模式为多反应监测, 毛细管电压 3.5 kV; 雾化器压力 35 psi; 鞘气温度 350 °C; 干燥气体温度 300 °C; 鞘气和干燥气体的

流速均为 $10 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ 。叶酸的检测条件为 m/z 442.1 \rightarrow 295.1, 碰撞能量为 12 eV; MTX 的检测条件为 m/z 455.1 \rightarrow 308.1, 碰撞能量为 16 eV。

统计学方法 实验数据以平均值 \pm 标准差表示, 样本均数间比较采用 t 检验。使用 DAS 2.0 软件通过非房室分析来计算分析药代动力学参数。 $P < 0.05$ 时被认为具有统计学意义。

结果与讨论

1 载药量与粉体表征

1.1 载药量 COF 中的碳酸酯键在强碱环境中易被破坏, 为准确测定 MTX@COF 的载药量, 本研究采用适量 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠将其溶解, 加入等量的盐酸调节, 以保护色谱柱。溶剂孵育法制备的 MTX@COF 载药量为 $(9.62 \pm 0.19)\%$ 。COF 超分子中存在氢键、疏水相互作用和范德华力等多种相互作用, 使得其对难溶性药物表现出极强的亲和力。本文采用溶剂孵育法, 反应 4 h, 使得 MTX 分子与 COF 充分接触, 强亲和力使得 MTX 分子进入 COF 空腔。DOTAP 带正电, 可以与带负电的载体相互作用, 通过静电吸附作用可包裹在 MTX@COF 的表面, 经 DOTAP 修饰后, MTX@COF@DOTAP 载药量为 $(9.18 \pm 0.04)\%$, 表明 DOTAP 的修饰对 MTX@COF 的载药量基本无影响。

1.2 SEM 以 CD-MOF 为基础, DPC 作为交联剂制备出的 COF 微粒呈立方结构, 不仅保持了 CD-MOF 原本的形态及粒径, 还可以提高粉体在水中的稳定性^[18]。SEM 图中 COF、MTX@COF 和 MTX@COF@DOTAP 粉体粒径均在 $2 \mu\text{m}$ 左右, 且 COF 在负载 MTX 前后的形态未发生明显变化, 仍保持立方形态; DOTAP 包裹后 MTX@COF 粒子边缘圆润, 可能是由于 DOTAP 涂层紧密贴合在 MTX@COF 表层所致 (图 1A~C)。

1.3 TGA 样品在 $25\sim 100 \text{ }^\circ\text{C}$ 时均约有 14% 的质量损失, 这可能是由于 MTX、MTX@COF 和 MTX@COF@DOTAP 微粒中的自由水脱水造成的。MTX 的主要质量损失在 $230\sim 280 \text{ }^\circ\text{C}$; COF 负载 MTX 后, 在相同温度下质量损失速率减缓, 且热稳定性高于 COF, 表明 MTX 被成功载入 COF 空腔; 而相应物理混合物 MTX&COF (PM) 质量损失速率较 COF 加快, 可能是由于 MTX 原料不受 COF 保护, 表现出典型的混合物质量损失特征; DOTAP 修饰 MTX@COF 后, 在相同温度下质量损失速率较 MTX 减缓, 但弱于 MTX@COF, 可能是由于 DOTAP 本身的热稳定性较低所致 (图 1D)。

1.4 DSC 采用 DSC 获取负载 MTX 前后的热行为, MTX 在 $132.48 \text{ }^\circ\text{C}$ 具有显著的吸热峰; 在 MTX@COF 中, MTX 的吸热峰消失, 此结果表明药物分子以非晶态的

形式分布在 COF 中 (图 1E); 而物理混合物 MTX&COF (PM) 在 $137.03 \text{ }^\circ\text{C}$ 出现小的吸热峰, 表明两种物质之间相互作用力较弱, 没有产生新的物质; MTX@COF@DOTAP 在 $156.86 \text{ }^\circ\text{C}$ 有一个显著的吸热峰, 可能是 DOTAP 固有的吸热分解峰。

1.5 FTIR 在 FTIR 光谱中, MTX 的酰胺键的特征峰在 1602.84 cm^{-1} 和 1645.73 cm^{-1} 处; MTX@COF 中 MTX 在 1602.84 cm^{-1} 处的特征峰减弱, 在 1645.73 cm^{-1} 的特征峰转移到 1640.67 cm^{-1} , 表明 MTX 被成功负载到 COF 分子空腔中; 而 MTX&COF (PM) 中 MTX 的特征峰与 MTX@COF 几乎一致, 可能是测定样品研磨过程中部分药物被载入 COF 中所致; DOTAP 包裹 MTX@COF 后, MTX 在 1640.67 cm^{-1} 处的特征峰减弱 (图 1F)。

1.6 Zeta 电位 DOTAP 带正电, 可以与带负电的载体相互作用, 考察 COF、MTX@COF 及 MTX@COF@DOTAP zeta 电位的变化, 评价 DOTAP 的包裹效果。COF 分散在纯水中, zeta 电位约为 -43 mV , MTX@COF 在纯水中的 zeta 电位上升到 -16.9 mV , DOTAP 修饰后 MTX@COF 的 zeta 电位上升至 -0.04 mV 。Zeta 电位的上升表明 DOTAP 包裹在 MTX@COF 的表面, 改变了 MTX@COF 表面的荷电特征。

2 体外释药测定

MTX 体外累积释放曲线表明 MTX@COF 和 MTX@COF@DOTAP 的缓释特征。MTX 原料药以水为释放介质, 0.5 h 时即释放 43.23%, 6 h 后达到 92.70%, 而 MTX@COF 在 6 h 时仅释放 36.31%, 表明 COF 负载 MTX 后可显著延缓 MTX 于水中的释放; 经 DOTAP 进一步修饰后, MTX@COF@DOTAP 在 6 h 仅释放 18.19% (图 2A), 释放速度进一步延缓。为更好地模拟体内释放情况, 采用磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 为释放介质, MTX 在磷酸盐缓冲介质中 0.5 h 即释放 78.38%, 4 h 后达到 90.82%; MTX@COF 在 0.5 h 释放 43.08%, 4 h 为 79.37%; MTX@COF@DOTAP 在 0.5 h 释放 24.95%, 4 h 仅为 58.30%, 表明 DOTAP 修饰的 MTX@COF 较 MTX 原料药有显著的缓释效果 (图 2B)。

3 SD 大鼠药代动力学研究

3.1 SD 大鼠血浆样品方法学 采用内标法测定血浆中 MTX 的含量, 以 MTX 浓度为横坐标 x , MTX 与内标物的峰面积比值为纵坐标 y , 用加权 ($W = 1/x^2$) 最小二乘法进行回归运算, MTX 的线性回归方程为 $y = 0.0070x + 0.1121$ ($r = 0.9973$), 表明该方法在 $5.00\sim 1000.00 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内有良好的线性关系。最低定量限达到 $5.00 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。低、中、高 3 个浓度的质控样品日内 RSD $\leq 15\%$, 准确度在 $84.93\%\sim 95.79\%$ 之间, 提取回收率为 $79.48\%\sim 84.35\%$, 基质效应为 $97.96\%\sim 101.59\%$,

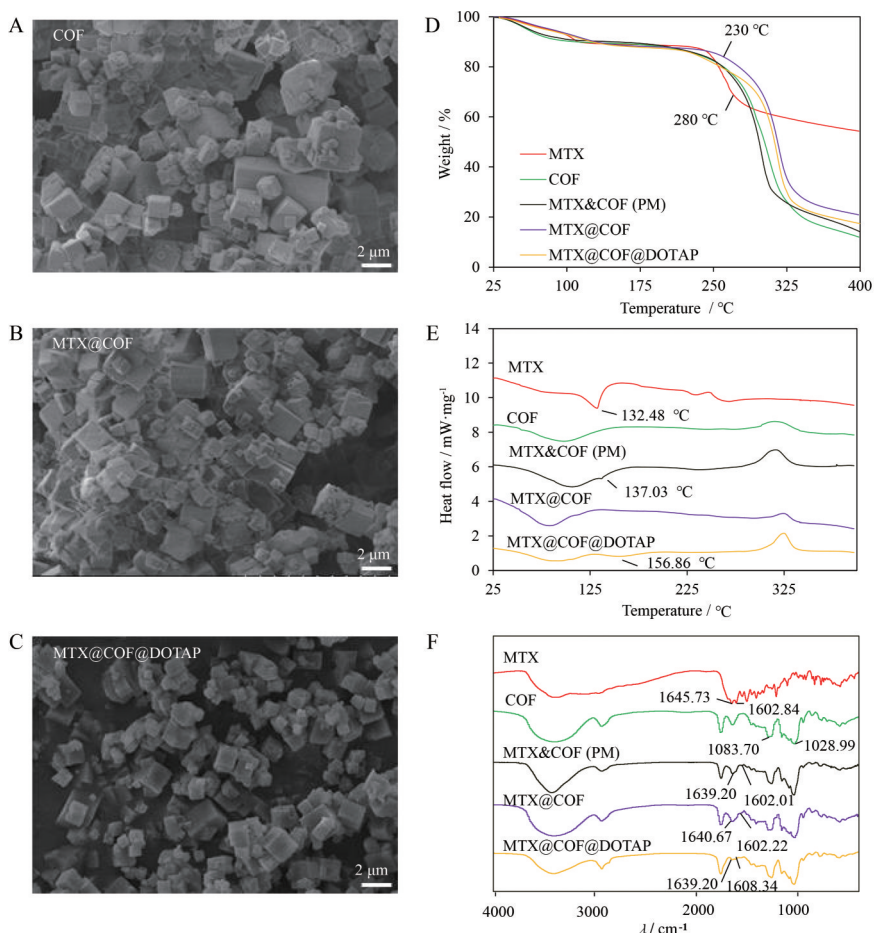


Figure 1 Characterizations of methotrexate (MTX), crosslinked cyclodextrin metal-organic framework (COF), MTX loaded in COF particles (MTX@COF), physical mixture of MTX and COF particles [MTX&COF (PM)] and MTX loaded in COF particles coated with DOTAP (MTX@COF@DOTAP). A, B, C: Scanning electron microscope (SEM) images; D: Thermogravimetric analyzer (TGA) curves; E: Differential scanning calorimetry (DSC) thermograms; F: Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

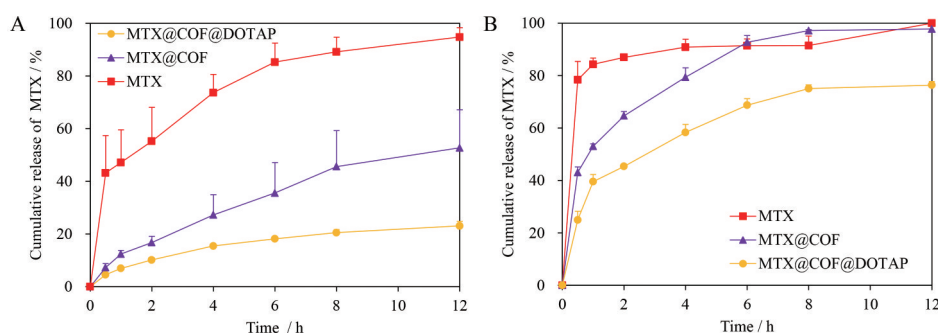


Figure 2 Release profiles of MTX, MTX@COF and MTX@COF@DOTAP in water (A) and phosphate buffer (B). $n = 3, \bar{x} \pm s$

符合生物样品分析方法的要求。

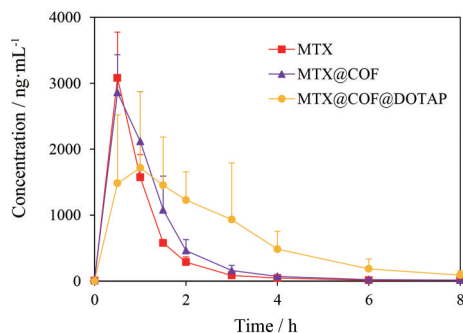
3.2 MTX 缓释微粒的药代动力学 为评价 COF 载药及 DOTAP 修饰载药微粒 MTX@COF 后, MTX 在体内的缓释行为, 选择 SD 大鼠为动物模型, 采用相同的给药剂量, 测定其药时曲线 (图 3), MTX@COF@DOTAP 的药代动力学曲线显示出明显的缓释特征。

应用非房室模型计算药代动力学参数 (表 1)。结

果表明, MTX 原料药组皮下注射后, 达峰时间 T_{max} 仅为 0.50 h, 平均滞留时间 $MRT_{(0-t)}$ 为 1.06 h, 药物被快速吸收分布, 血药浓度迅速下降; MTX@COF 组皮下注射后血液浓度下降相对缓慢, T_{max} 为 0.67 h, $MRT_{(0-t)}$ 延长至 1.22 h, 表明 MTX@COF 微粒可延长 MTX 在体内的滞留时间; MTX@COF@DOTAP 组的 T_{max} 达到 1.42 h, $MRT_{(0-t)}$ 延长至 2.36 h, 其中 $MRT_{(0-t)}$ 较 MTX@COF 组延

Table 1 Pharmacokinetic parameters of MTX, MTX@COF and MTX@COF@DOTAP. $n = 6, \bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs MTX group

Parameter	MTX	MTX@COF	MTX@COF@DOTAP
$AUC_{(0-t)}$ / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}$	3 023.86 \pm 525.44	3 705.69 \pm 683.36	5 365.07 \pm 2 099.88
$MRT_{(0-t)}$ / h	1.06 \pm 0.08	1.22 \pm 0.13*	2.36 \pm 0.55***
$t_{1/2z}$ / h	1.07 \pm 0.31	1.11 \pm 0.24	1.49 \pm 0.39
T_{max} / h	0.50 \pm 0.00	0.67 \pm 0.26	1.42 \pm 0.92
C_{max} / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	3 081.84 \pm 694.20	3 039.87 \pm 478.42	2 125.51 \pm 974.13

**Figure 3** Plasma drug level-time profiles of MTX, MTX@COF and MTX@COF@DOTAP in rats. $n = 6, \bar{x} \pm s$

长1.9倍,较MTX原料药组延长2.2倍,与MTX原料药相比具有显著性差异,表明DOTAP修饰MTX@COF后,显著延长MTX在体内的释放时间,与体外释放结果一致,且MTX@COF@DOTAP组 $AUC_{(0-t)}$ 为MTX组的1.8倍,即DOTAP修饰MTX@COF后可显著提高MTX的生物利用度。

结论

MTX结构的特殊性导致MTX缓释制剂的开发存在很大难度。本研究通过溶剂孵育法将MTX装载在COF中制备MTX@COF,并用阳离子脂质材料DOTAP修饰MTX@COF来制备MTX的缓释微粒,从而达到MTX的双重缓释效果。本研究分别以水和磷酸盐缓冲液为释放介质考察缓释微粒的体外释放特征,MTX@COF和MTX@COF@DOTAP的体外释放结果表明,两者均有显著的缓释作用,其中MTX@COF@DOTAP比MTX@COF的缓释作用更明显。大鼠药代动力学研究结果显示,皮下注射后MTX@COF@DOTAP组的 $MRT_{(0-t)}$ 比MTX组延长了2.2倍。本研究制备的MTX@COF@DOTAP微粒可以延长药物在体内的驻留时间,并能够有效提高药物的生物利用度,其缓释机制和应用价值有待深入研究。

作者贡献: 王勤负责文献查阅、实验设计和实施、论文初稿撰写;伍丽、王彩芬、陈晓锦和孙宏宇参与实验设计、协助论文撰写和核对参考文献;张继稳和桂双英负责实验指导。

利益冲突: 本论文所有作者均不存在利益冲突。

References

- [1] Alsdorf W, Karagiannis P, Langebrake C, et al. Standardized supportive care documentation improves safety of high-dose methotrexate treatment [J]. *Oncologist*, 2020, 26: e327-e332.
- [2] Guo ZR. Chemical synthesis driven development of pemetrexed [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 2486-2490.
- [3] Boyce J, Tawagi K, Cole J. Primary colon adenocarcinoma with choriocarcinoma differentiation: a case report and review of the literature [J]. *J Med Case Rep*, 2020, 14: 220.
- [4] Barei M, Jei I, Simeti L, et al. Rituximab as a treatment option in a patient with rheumatoid arthritis and a history of malignancy-intracranial chondrosarcoma/osteochondroma-case based review [J]. *Rheumatol Int*, 2020, 41: 463-468.
- [5] Xing E, Du Y, Yin J, et al. Multi-functional nanodrug based on a three-dimensional framework for targeted photo-chemo synergistic cancer therapy [J]. *Adv Healthc Mater*, 2021, 10: e2001874.
- [6] Li J, Chen D, Zhang T, et al. Highly sensitive electrochemical determination of methotrexate based on a N-doped hollow nanocarbon sphere modified electrode [J]. *Anal Methods*, 2021, 13: 117-123.
- [7] Paroha S, Verma J, Dubey R, et al. Recent advances and prospects in gemcitabine drug delivery systems [J]. *Int J Pharm*, 2021, 592: 120043.
- [8] Zhao XF. Synthesis of pH-Sensitive Nanocomposite and Its Application in Drug Delivery (pH敏感的纳米复合材料合成及其在药物递送中的应用) [D]. Nanjing: Nanjing Normal University, 2019.
- [9] Liu XX, Gao L, Xia LY, et al. Methotrexate sustained-release implants for delay of sarcoma recurrence in mice [J]. *Chin New Drug J (中国新药杂志)*, 2017, 26: 2846-2852.
- [10] Modu LR, Chen H, Li XM, et al. Preparation and the *in vitro* and *in vivo* release of PLGA microspheres containing methotrexate for intra-articular injection [J]. *Chin New Drug J (中国新药杂志)*, 2007, 16: 1187-1191.
- [11] Madhwi, Kumar R, Kumar P, et al. *In vivo* pharmacokinetic studies and intracellular delivery of methotrexate by means of glycine-tethered PLGA-based polymeric micelles [J]. *Int J Pharm*, 2017, 519: 138-144.
- [12] He Y, Hou X, Liu Y, et al. Recent progress in the synthesis, structural diversity and emerging applications of cyclodextrin-based metal-organic frameworks [J]. *J Mater Chem B*, 2019, 7: 5602-5619.

- [13] Zhang W, Guo T, Wang C, et al. MOF capacitates cyclodextrin to mega-load mode for high-efficient delivery of valsartan [J]. *Pharm Res*, 2019, 36: 117.
- [14] He Y, Zhang W, Guo T, et al. Drug nanoclusters formed in confined nano-cages of CD-MOF: dramatic enhancement of solubility and bioavailability of azilsartan [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2019, 9: 97-106.
- [15] Hu X, Wang C, Wang L, et al. Nanoporous CD-MOF particles with uniform and inhalable size for pulmonary delivery of budesonide [J]. *Int J Pharm*, 2019, 564: 153-161.
- [16] Li H, Zhu J, Wang C, et al. Paeonol loaded cyclodextrin metal-organic framework particles for treatment of acute lung injury *via* inhalation [J]. *Int J Pharm*, 2020, 587: 119649.
- [17] Zhao K, Guo T, Wang C, et al. Glycoside scutellarin enhanced CD-MOF anchoring for laryngeal delivery [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2020, 10: 1709-1718.
- [18] Singh V, Guo T, Wu L, et al. Template-directed synthesis of a cubic cyclodextrin polymer with aligned channels and enhanced drug payload [J]. *RSC Adv*, 2017, 7: 20789-20794.
- [19] He Y, Xiong T, He S, et al. Pulmonary targeting crosslinked cyclodextrin metal-organic frameworks for lung cancer therapy [J]. *Adv Funct Mater*, 2020, 31: 2004550.
- [20] Pawar V, Manjappa A, Murumkar P, et al. Drug-fortified liposomes as carriers for sustained release of NSAIDs: the concept and its validation in the animal model for the treatment of arthritis [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2018, 125: 11-22.
- [21] San Roman B, Gomez S, Irache JM, et al. Co-encapsulated CpG oligodeoxynucleotides and ovalbumin in PLGA microparticles; an *in vitro* and *in vivo* study [J]. *J Pharm Pharm Sci*, 2014, 17: 541-553.
- [22] Ye L, Ye J, Lu J, et al. Co-loaded docetaxel and verapamil liposomes to reverse tumor drug resistance [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 1035-1041.
- [23] Ou G, Ma JQ, Zhu L, et al. Preparation of adenosine triphosphate liposome nasal gel and its anti-hypoxia effect [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 1288-1295.
- [24] N'Diaye M, Michel J, Rosilio V. Relevance of charges and polymer mechanical stiffness in the mechanism and kinetics of formation of liponanoparticles probed by the supported bilayer model approach [J]. *Phys Chem Chem Phys*, 2019, 21: 4306-4319.
- [25] Maity P, Saha B, Suresh Kumar G, et al. Effect of zwitterionic phospholipid on the interaction of cationic membranes with monovalent sodium salts [J]. *Langmuir*, 2018, 34: 9810-9817.
- [26] Liu B, Li H, Xu X, et al. Optimized synthesis and crystalline stability of γ -cyclodextrin metal-organic frameworks for drug adsorption [J]. *Int J Pharm*, 2016, 514: 212-219.