

新型“硬核软膜”结构纳米缓释制剂对瑞戈非尼的载药实验研究

刘丹, 王宏远, 王晶华, 范兴君, 王强, 刘佳维, 佟雷, 翟凤国*, 于凤波* (牡丹江医学院, 黑龙江 牡丹江 157011)

摘要:目的 建立的一种新型的、以聚丁二酰亚胺(polysuccinimide, PSI)与羟基磷灰石(hydroxyapatite, HAP)为基本构成成分的纳米缓释递药系统 PSI-HAP, 并抗肿瘤药物瑞戈非尼的载药释药能力进行研究。方法 本实验合成了制剂所需辅料 HAP 与 PSI; 建立了紫外分光光度法对瑞戈非尼的含量进行检测; 采用单因素结合响应面曲线法(box-behnken design, BBD)对不同方式制备的瑞戈非尼纳米缓释递药系统的处方与工艺进行考察; 对制剂的载药与释药能力、制剂形态、Zeta 电位与粒径等制剂学性质进行了考察。采用荧光染料尼罗红对载药 PSI-HAP 纳米粒进行标记, 通过小动物活体成像技术观察纳米粒在小鼠体内的分布情况。结果 经紫外扫描确定瑞戈非尼检测波长为 264 nm, 标准曲线为 $A = 94.461\rho + 0.0304$, $r^2 = 0.9998$, 精密准确度实验显示, 瑞戈非尼在 $0.002 \sim 0.02 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好; BBD 确定采用乳液法制备瑞戈非尼 PSI-HAP 制剂处方为药物浓度 $7.28 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, HAP 与药物质量比为 0.63, PSI 与 HAP 质量比为 3.93; 体外释放实验结果显示, 该递药系统具备 pH 敏感性, 在 pH 值大于 7 时, 药物会得到较为完全的释放。扫描电镜(SEM)结果显示, 制剂粒径在 300 nm 上下, Zeta 电位为负, 与人体生物膜荷电性相同。体内分布实验结果显示, PSI-HAP 制剂可显著延长制剂在动物体内的滞留时间。结论 本实验建立的新型纳米递药系统的制备工艺极其简单, 易于灭菌, 无需高压、挤压、过滤等工艺即可制备出粒径均一的纳米粒子, 药物释放平稳且具备 pH 敏感性, PSI 与纳米 HAP 都具有抗肿瘤细胞增殖的作用, 非常适用于抗肿瘤药物的体内递送。

关键词:“硬核软膜”结构; 纳米缓释; 瑞戈非尼; pH 敏感; 单因素结合响应面曲线法

doi: 10.11669/cpj.2024.04.004 中图分类号: R944 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2024)04-0311-13

A Novel Nano Sustained-Released Drug Delivery System Encapsulated Regorafenib with a Hard Core-Soft Film Structure

LIU Dan, WANG Hongyuan, WANG Jinghua, FAN Xingjun, WANG Qiang, LIU Jiawei, TONG Lei, ZHAI Fengguo*, YU Fengbo* (Mudanjiang Medical University, Mudanjiang 157011, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a nano sustained release drug delivery system polysuccinimide (PSI) and hydroxyapatite (HAP) with a hard core-soft coating structure and study the delivery of anti-tumor drug regorafenib. **METHODS** HAP and PSI were synthesized in the article. The optimal formulation and preparation process of the regorafenib-PSI-HAP was determined by single factor analysis and the box-behnken design (BBD) response surface method. The encapsulation efficiency, drug loading capacity, drug release *in vitro*, particle size and distribution, Zeta potential and SEM images of regorafenib-PSI-HAP were examined. **RESULTS** The UV spectrophotometry results showed that the maximum absorption wave of the regorafenib was at 264 nm, the standard curve was $A = 94.461\rho + 0.0304$, $r^2 = 0.9998$. Meanwhile, between the $2 \sim 20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ of the regorafenib solutions possessed a good linear relationship at this wave. The optimal formulation prepared using MEM detected by BBD was that the concentration of regorafenib was $7.28 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, the mass ratio of HAP to regorafenib was 0.63, and the mass ratio of PSI to HAP was 3.93. The *in vitro* drug release test showed that PSI-HAP exhibited pH-sensitive drug release, the regorafenib-PSI-HAP can be released totally above pH 7 solution. The PSD was around 300 nm, and Zeta potential was between -10 and -17 mV which was similar to the human cell membrane. **CONCLUSION** The proposed drug delivery system can be integrated into non-agglomerated spherical nanoparticles of uniform size through a facile preparation process. The particles are easy to sterilize, and large-scale production may be achieved easily. The drug release of PSI-HAP is pH sensitive and stable. Both PSI and nano HAP possess the effect of anti-tumor cell proliferation which is very suitable for the delivery of anti-tumor drugs such as regorafenib *in vivo*.

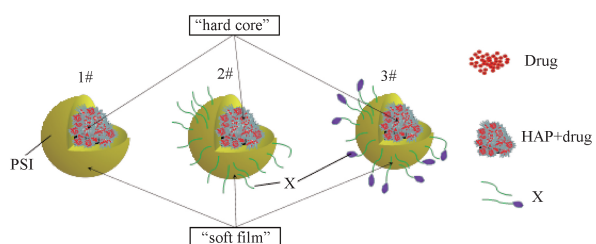
KEY WORDS: “hard core-soft film” structure; nano sustained-release drug delivery system; regorafenib; pH sensitivity; box-behnken design response surface method

基金项目: 中国博士后科学基金面上项目资助(2021M692734); 广东省中医药局科研项目资助(20221447); 黑龙江省教育厅省属高等学校基本科研业务费科研项目资助(2019-KYYWFMY-0003); 牡丹江医学院博士科研启动基金资助(2021-MYBSKY-046)

作者简介: 刘丹, 女, 硕士研究生 研究方向: 新型纳米递药系统的研究 * **通讯作者:** 翟凤国, 女, 博士, 教授, 硕士生导师 研究方向: 新药药理学 Tel: (0453)6984669; 于凤波, 女, 博士, 副教授, 硕士生导师 研究方向: 新型纳米递药系统的研究 Tel: (0453)6984683

瑞戈非尼 (regorafenib) 是一种新型的多激酶抑制剂,能抑制肿瘤组织血管形成和调控肿瘤微环境,具有良好的抗肿瘤活性^[1]。临床研究证实,瑞戈非尼可用于经标准方案治疗失败的转移性结直肠癌和转移性胃肠道间质瘤的治疗,可显著延长此类患者的疾病无进展存活期和总存活期^[2-3]。临床研究报道,在瑞戈非尼治疗组中有 2.3% 的患者因药物相关不良反应而停止治疗,而在安慰剂组患者则为 1.5%^[4]。接受瑞戈非尼片治疗的最明显的毒性反应为药物性肝损伤、出血、皮肤毒性(掌足红肿和皮疹)、高血压、心脏缺血性反应及胃肠穿孔。发生最频繁的不良反应为疲乏、无力、食欲下降、进食量减少、掌足红肿综合征、腹泻、黏膜炎、感染、高血压及发声困难等^[5]。为减少上述药物应用产生的毒副作用,本实验拟通过新型纳米缓释递药系统的应用来改变瑞戈非尼的给药方式、人体吸收部位与药物释放等特性,以期达到降低药物使用量及毒副作用的目的。

聚丁二酰亚胺 (polysuccinimide, PSI)-羟基磷灰石 (hydroxyapatite, HAP) (PSI-HAP) 纳米缓释递药系统具备“硬核软膜”结构(图 1),其辅料基础主要为两种成分:一种是具备高吸附性能的羟基磷灰石作为制剂载药核心的“硬核”;一种是以聚丁二酰亚胺或其衍生物(X-PSI, X 为具备功能性的分子基团)作为衣膜材料的“软膜”。



PSI - 聚丁二酰亚胺; HAP - 羟基磷灰石; X - 功能性分子基团(例如: PEG, 抗体, 温敏或 pH 敏感等功能性分子基团)。

PSI - polysuccinimide; HAP - hydroxyapatite; X - a molecular group with different *in vivo* functions, e. g., PEG, antibody, ligand, temperature sensitive, pH sensitive or other functional molecular groups.

图 1 聚丁二酰亚胺-羟基磷灰石 (PSI-HAP) 的结构示意图

Fig. 1 The structure of PSI-HAP

本课题组前期研究首次发现并已证实 PSI 或 X-PSI 与 HAP 在溶液状态下,经简单混合后,即可自发形成粒径均一的纳米粒子 PSI-HAP 或 X-PSI-HAP,这一过程无需复杂的工艺制备条件,仅需超声和搅拌条件即可迅速完成,易于灭菌与生产转化。

图 1 中的 1 号小球即是以 PSI 作为衣膜材料制备的,2,3 号小球是以 X-PSI 为衣膜材料制备的,其中 X 基团可以是制剂学中常用的诸如聚乙二醇(PEG)基团、具备温敏、光敏等作用的分子基团,或是具有主动寻靶功能的配体、抗体等功能性分子基团。X-PSI 的制备也非常的简单,仅需将分子末端带有伯氨基的功能性分子 X 与 PSI 在溶液中混合一定时间,无需加入催化剂就可将 X 基团接入 PSI 从而制备 X-PSI。该递药系统可用于口服、吸入、植入及注射等体内多途径给药。

递药系统中的 HAP 是一种微溶于水的弱碱性磷酸钙盐,是人体骨骼和牙齿的主要构成成分,HAP 表面同人体组织可通过键合作用达到完全的亲和,并逐步被体液溶解和组织吸收而导致解体,具有出色的生物相容性、骨传导性、良好的细胞黏附性、优良生物降解性与非炎性特性^[6-7]。HAP 制备方法众多,合成所需原材料成本低廉、易得。据文献^[8]报道,纳米 HAP 能通过癌细胞细胞膜通道,进入癌细胞内部,进而抑制癌细胞的生长。

PSI 是一种可生物降解的无毒无定形聚合物,可通过无有机溶剂方法从天冬氨酸单体经脱水直接缩聚而成,反应符合绿色化学原则^[9],生产转化难度很低。PSI 在水溶液中会与 OH⁻ 发生开环反应,生成水溶性聚天冬氨酸(PAA),这种水溶性衍生物具有蛋白质样结构,可以在体内溶酶体酶的存在下发生生物降解^[10]。PSI 衍生物常被用于 pH 敏感型及控释型凝胶载药^[11-14]、pH 敏感兼具温敏性凝胶载药^[15]、pH 敏感及控释型胶束载药^[16-18],以及 CO₂ 响应型凝胶载药^[19] 等等。PSI 极性较低,是一种易于渗透到肿瘤细胞中的膜向性聚合物,进入细胞后,PSI 的酰亚胺键的水解会显著改变肿瘤细胞内 pH 值,导致肿瘤细胞代谢凋亡的主要酶途径被阻断,从而达到抑制肿瘤发生、发展的作用,其抗肿瘤作用在多种肿瘤细胞体内外实验中得到验证^[20]。此外,PSI 的酰亚胺环在不需催化剂的存在下,即可与-NH₂基团发生反应,引入新的修饰性基团,同时保留其生物降解性与生物相容性^[21],因此可不通过催化剂的使用,就可以将一端带有-NH₂基团的 PEG 分子接入到 PSI 结构中制备衣膜材料(图 1 中 2,3 号小球的制备)。

鉴于这两种制剂辅料皆具备抗肿瘤作用,理论上尤其适合抗肿瘤药物瑞戈非尼的载药。本研究主要报道了瑞戈非尼 PSI-HAP (1 号小球) 制剂的制备,该制剂可经口服给药在肠道内释放,也可通过静

脉注射全身给药。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

瑞戈非尼(20210509,上海升德医药科技有限公司); Tween-80(EZ5679B162,德国 BioFroxx 有限公司); 甲苯,氨,磷酸,无水乙醇,无水碳酸钠,结晶氯化钙,磷酸氢二钠,氢氧化钠,*N,N*-二甲基甲酰胺,硝酸钙,磷酸氢二铵,氢氧化钙,*L*-天冬氨酸均为试剂纯。

分析天平(AUX200,日本岛津公司);磁力控温搅拌器(RCH-1000,东京理化器械株式会社,日本);实验室超纯水机(QRHO-100L,东莞市谦和水处理工程有限公司);超声波清洗器(KQ-100DB,昆山市超声仪器有限公司);恒温水浴锅(B260,上海亚荣生化仪器厂);旋转蒸发器(R-205,上海申胜生物技术有限公司);精密定时电动搅拌器(JJ-1,常州融化工器制造有限公司);水平摇床(TS-1000,其林贝尔仪器制造有限公司);高速离心机(TGL-16G,上海安亭科学仪器厂);真空冷冻干燥机(ZD-F12,南京载智自动化设备有限公司);紫外可见分光光度计[UV-1800,岛津仪器(苏州)有限公司];傅里叶变换红外光谱仪(Nicolet is5,赛默飞世尔科技公司);扫描电镜(TEM,JEOL2100F,日本电子);场发射扫描电子显微镜(SEM,Merlin,德国蔡司公司);激光粒度仪(ZS90,马尔文公司);小动物活体成像仪(LB983NC100,德国伯托 Berthold 公司)。

1.2 瑞戈非尼分析方法的建立

1.2.1 标准曲线的建立 精密称取瑞戈非尼原料 25.0 mg,置 25 mL 量瓶中,加适量无水乙醇溶液超声(50 W,40 kHz)溶解,定容,制得质量浓度 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的瑞戈非尼储备液。精密量取瑞戈非尼储备液 0.5 mL,置于 50 mL 量瓶中,用无水乙醇溶液定容至刻度,制得质量浓度为 $0.010 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的瑞戈非尼对照液,190~1100 nm 波长范围内对其进行扫描,确定检测紫外吸收的波长。配置质量浓度为 0.002、0.004、0.006、0.008、0.010、0.012、0.020 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准溶液测定吸光度(*A*),绘制标准曲线。

1.2.2 回收率实验 精密量取瑞戈非尼原料药,配置成高、中、低 3 个质量浓度(20,10,2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)储备液各 25 mL,按照处方量加入空白 PSI-HAP 制剂,以无水乙醇溶液作空白,在 264 nm 处连续测定 3 次,计算测定结果平均值与真实值之差及

其可信度,测定方法的回收率。

1.2.3 精密度实验 重复性:配制瑞戈非尼溶液 6 份($10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,每份 10 mL),以无水乙醇溶液作空白对照,于 264 nm 处测定吸光度,计算相对标准偏差(RSD)值,测定方法的重复性。

日内及日间精密度:每次配制高、中、低 3 个质量浓度瑞戈非尼溶液(20,10,2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)10 mL,1 d 内重复测定 5 次,计算日内精密度;不同溶液样品连续测定 5 d,计算日间精密度。

1.2.4 溶液稳定性实验 配制高、中、低质量浓度瑞戈非尼溶液(20,10,2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)各 25 mL,置于室温环境中放置,以无水乙醇溶液作空白,分别于 0,6,12 h 测定吸光度值,计算相对标准偏差(RSD)值,测定测试样品的溶液稳定性。

1.3 “硬核”HAP 的制备

本研究主要考察了以下 4 种方式制备的 HAP 在瑞戈非尼 PSI-HAP 制剂中的载药情况。

1.3.1 乳液法(micro-emulsion method, MEM)

5 mL 的 Tween-80 溶于 25 mL 的甲苯中,加入到 60 mL 的 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Na_2CO_3 溶液中,超声 20 min ($60 \text{ }^\circ\text{C}$,35 kW)。将得到的溶液转移到滴定管中,搅拌,缓慢滴加到 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl_2 的室温溶液中,得到沉淀。过滤沉淀物,用蒸馏水洗涤, $80 \text{ }^\circ\text{C}$,干燥 12 h,得 CaCO_3 粉末。将 1.0 g 合成的 CaCO_3 粉末加入 200 mL 蒸馏水中,搅拌形成悬浮液, $60 \text{ }^\circ\text{C}$, $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度滴入 Na_2HPO_4 (200 mL, $0.03 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)溶液中。 $200 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ NaOH 水溶液调节 pH 值至 11, $60 \text{ }^\circ\text{C}$,继续搅拌 1 h。过滤收集产物,用蒸馏水洗涤至中性后,再用乙醇洗涤便于干燥, $80 \text{ }^\circ\text{C}$ 干燥 12 h 后,于 $650 \text{ }^\circ\text{C}$ 煅烧 30 min,得 HAP 固体。

1.3.2 液相中和法(liquid phase reaction, LPR) 将 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 H_3PO_4 水溶液向高速搅拌下的 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 悬浮液中滴加,维持体系的 pH 值在 9~12 的范围。将反应后的沉淀在 $-25 \text{ }^\circ\text{C}$ 下冻结后,置于 $0 \text{ }^\circ\text{C}$ 真空干燥得 HAP 粉末。

1.3.3 共沉淀法(precipitation method, PM) 在室温条件下,将 $60 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Na_2HPO_4 水溶液缓慢滴加到 CaCl_2 溶液中,用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaOH 调节溶液 pH 为 9 左右,搅拌反应 6 h。反应结束后将反应体系放在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 环境中陈化 4 d,得到 HAP 沉淀,将沉淀离心洗涤 3 次,干燥研磨得到干燥的 HAP 粉末。

1.3.4 水热法(hydrothermal method, HM) 分别

配制 $0.50 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 水溶液和 $0.30 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 水溶液,并用氨水分别调节溶液的 $\text{pH} = 10.5$,按 $\text{Ca}/\text{P} = 1.67$ (摩尔比)的比例,在搅拌条件下将 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 水溶液逐滴滴入 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 水溶液中,滴加过程中用氨水维持反应体系的 pH 为 10.5 。物料滴加完毕后,将白色溶液转移到 100 mL 圆底烧瓶中,密封并在 $180 \text{ }^\circ\text{C}$ 下水热处理 6 h 。自然冷却至室温后经抽滤,蒸馏水洗后, $80 \text{ }^\circ\text{C}$ 烘箱干燥 24 h 得到 HAP 固体粉末。

1.4 “软膜”PSI 的制备

在 250 mL 圆底烧瓶中混合 L-天冬氨酸 (10.0 g),磷酸 (体积分数 85% , 6 mL) 和蒸馏水 (1 mL), $170 \text{ }^\circ\text{C}$,真空反应 1 h 。反应结束后,降温至 $100 \text{ }^\circ\text{C}$,加入 60 mL 的 *N,N*-二甲基甲酰胺溶解。搅拌条件下 ($700 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$),将溶液缓慢滴入 500 mL 蒸馏水中,过滤收集产物,蒸馏水和二氯甲烷或正丁醇等洗涤至 pH 中性后, $80 \text{ }^\circ\text{C}$ 干燥。

1.5 载药制剂的处方及工艺的确定

1.5.1 不同浓度瑞戈非尼对 PSI-HAP 包封率和载药量的影响 课题组前期实验已经证实了采用 MEM 制备 PSI-HAP 时,PSI 与 HAP 质量比(可成球比)在 $3:1$ 至 $5:1$ 间可形成均匀的纳米球形粒子,而这个比值对 LPR 制备的 HAP 来说是在 $8:1$ 左右,PM 和 HM 在 $20:1$ 左右。因此,在上述实验基础上,本实验首先固定 PSI 与 HAP 的质量比,MEM $4:1$,LPR $8:1$,PM 与 HM $20:1$,来考察瑞戈非尼浓度对 PSI-HAP 包封率与载药量的影响。

在室温条件下,分别称量不同质量瑞戈非尼加入 10 mL 水溶液,配制质量浓度为 $1, 5, 10, 15, 20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 药物混悬液,按照 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 加入 HAP 后,在搅拌条件 ($800 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 下,滴入含有 PSI 的二甲基甲酰胺溶液 (约 $100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$),滴加完毕后,高速离心,收集上清液,无水乙醇溶液进行多次洗涤,将未包载药物充分溶解于洗涤液后,合并洗涤液与上清液,定容,测定 A 值,计算包封率与载药量。

1.5.2 HAP 浓度对包封率与载药量的影响 在室温条件下,固定瑞戈非尼质量浓度为 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,选取 MEM 制备 HAP 进行实验,固定 PSI 与 HAP 质量比 $4:1$,考察 HAP 质量浓度 ($1, 5, 10, 15, 20, 25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 对制剂载药与包封能力的影响,实验操作同“1.5.1”项。

1.5.3 制备条件对包封率与载药量的影响 PSI 浓度:确定药物的质量浓度为 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, HAP

$10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($m_{\text{药物}} - m_{\text{HAP}} = 1:2$),固定上述已确定制备条件,考察 PSI 溶液质量浓度 ($25, 50, 100, 150, 200 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 对瑞戈非尼的包封与载药能力影响。

制备工艺条件:本实验考察了搅拌加超声的双重条件下,是否会对药物的包封达到有益的效果,在维持上述已确定实验条件同时,考察超声对制备工艺的影响。

温度:在确定上述制备条件的基础上,考察制备温度对包封率与载药量的影响。

1.5.4 响应面曲线法确定瑞戈非尼 PSI-HAP 处方与工艺 根据单因素考察结果,以药物浓度、HAP 与药物质量比、PSI 与 HAP 质量比为主要影响因素,采用 BBD 响应面曲线法进行实验设计,绘制响应面曲线图 (Design-Expert 8.0),确定最终的处方与工艺。按照最终确定的处方与工艺,放大投样量 (100 倍),制备 3 批样品,测定其包封率与载药量、制剂形态、粒径及 Zeta 电位等制剂学性质。

1.6 瑞戈非尼 PSI-HAP 制剂体外释放实验

取“1.5.4”项下制备的含瑞戈非尼的 PSI-HAP 100 mg 于离心管中,加入 30 mL 不同 pH 值的磷酸盐缓冲液 (PBS) 溶液中 [含 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 十二烷基硫酸钠 (SDS), $\text{pH} = 2.0, 4.5, 6.8, 7.4, 8.0$],将离心管置于恒温摇床内 [$(37 \pm 0.5) \text{ }^\circ\text{C}$, 转速 $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$],于 $1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120 \text{ h}$ 取样 5 mL ,再补加 5 mL ($n = 3$),离心,无水乙醇洗涤,合并洗涤液与上清液,测定 A 值,按照所建立的标准曲线计算药物浓度与释放量,绘制药物释放曲线。

1.7 瑞戈非尼 PSI-HAP 制剂的动物体内分布实验

配制尼罗红溶液 ($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$),按照“1.6”项下确定的处方及工艺加入 HAP 与瑞戈非尼药物,混匀后,滴入 PSI 溶液,滴加完毕后,离心洗涤干燥,制备瑞戈非尼 PSI-HAP 的含尼罗红制剂。取小鼠 12 只,雌性,SPF 级, $4 \sim 6$ 周龄,体重 $25 \sim 30 \text{ g}$,随机分为 4 组:灌胃空白组 (3 只),尾静脉空白组 (3 只),灌胃给药组 (3 只),尾静脉给药组 (3 只);空白组给予 $9 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 生理盐水混悬尼罗红,给药组给予 PSI-HAP 制剂 ($200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。小鼠于给药前 12 h 禁食、不禁饮。给药后,在 $0.5, 1, 2, 3, 6, 9, 12, 24, 48 \text{ h}$ 等不同时间点,对小鼠进行麻醉 (异氟烷吸入),进行小动物活体成像,观察药物在体内分布情况及存留时间。设置仪器参数如下:选择模式 (荧光光谱成像),固定激发波长 (530 nm),用发射波长 (600 nm) 扫描。

2 结果与讨论

2.1 瑞戈非尼分析方法的建立

2.1.1 标准曲线的建立 紫外扫描结果(图 2)显

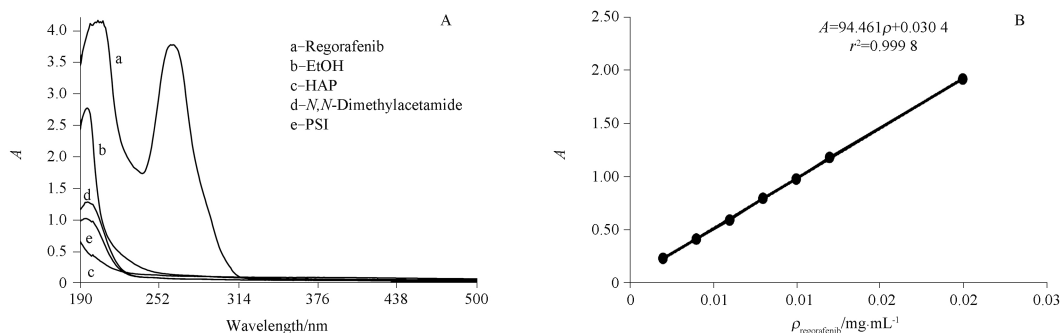


图 2 瑞戈非尼紫外扫描图(A)和标准曲线(B)

Fig. 2 Ultraviolet scanning spectrum(A) and standard curve of regorafenib(B)

2.1.2 回收率实验结果 结果表明, RSD < 2%, 该方法回收率符合要求, 见表 1。

表 1 瑞戈非尼回收率实验测定结果

Tab. 1 Results of recovery rate of regorafenib

$\rho_{\text{regorafenib}}$ / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	$\rho_{\text{regorafenib, Detected}}$ / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	Recovery /%	RSD /%
2	2.023	101.15	0.837
	2.012	100.62	
	1.990	99.51	
10	9.870	98.70	0.297
	9.909	99.09	
	9.928	99.28	
20	20.11	100.58	0.478
	20.09	100.46	
	20.27	101.34	

表 2 瑞戈非尼日内精密度与日间精密度实验测定结果

Tab. 2 Results of the intra-day and inter-day precision of regorafenib

Intra/Inter-day	$\rho_{\text{regorafenib}}/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	1	2	3	4	5	$\bar{x} \pm s$	RSD/%
Intra-day	2	2.014	2.012	2.011	2.019	2.017	2.015 ± 0.003	0.153
	10	9.891	9.888	9.886	9.888	9.940	9.898 ± 0.023	0.234
	20	19.99	19.98	19.95	19.97	19.96	19.97 ± 0.014	0.069
Inter-day	2	2.012	2.020	2.029	2.039	1.996	2.019 ± 0.017	0.821
	10	9.886	9.938	9.834	9.912	9.803	9.875 ± 0.056	0.564
	20	20.00	19.90	20.02	19.86	20.05	19.97 ± 0.082	0.410

表 3 瑞戈非尼稳定性实验测定结果

Tab. 3 Results of the solution stability of regorafenib

t/h	$\rho_{\text{regorafenib}}/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$		
	2	10	20
0	1.993	9.970	20.67
6	2.057	9.870	21.07
12	2.023	10.15	20.92
RSD/%	1.570	1.433	0.987

示, 瑞戈非尼在 264 nm 处有最大吸收, 瑞戈非尼在 0.002 ~ 0.02 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内, 线性关系良好, 标准曲线为 $A = 94.461\rho + 0.0304$, $r^2 = 0.9998$ 。

2.1.3 精密度实验 重复性与精密度实验结果显示, RSD < 2%, 见表 2, 表明该方法稳定可靠。

2.1.4 稳定性实验 稳定性实验 RSD < 2%, 表明待测试的样品溶液在室温条件下放置 12 h 内进行检测是稳定的(表 3)。

2.2 制剂处方与工艺确定

2.2.1 不同浓度瑞戈非尼对 PSI-HAP 包封率和载药量的影响 经 PSI 包衣后, 不同制备方式制备的瑞戈非尼 PSI-HAP 制剂的红外图谱主要呈现的是 PSI 的红外特征峰: 3445 cm^{-1} , -CO-N-伸缩振动峰; 2952 cm^{-1} , -CH₂-伸缩振动峰; 1716 cm^{-1} , R-CO-R'酰胺键的羰基伸缩振动峰; 1394 cm^{-1} , -C-N-伸缩振动峰(图 3)。当制剂制备体系中的 HAP 浓度固定时, 药物质量浓度在 5 与

10 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 制剂的包封率较高, 当药物浓度继续增加后, 包封率不增反降(表 4)。分析可能的原因是, 当制剂制备体系中的辅料 HAP 与 PSI 的用量一定时, PSI-HAP 制剂对瑞戈非尼的药物包封能力是有一定限度的。因此, 当体系中, 药物浓度过高时, 对制剂的整体包封率的提高是不利的, 但药物浓度的增加对载药量的提高有一定的益

处,只是这种载药量的提高与包封率的显著下降相比,所得益处并不明显。综合来看,MEM制备的瑞戈非尼 PSI-HAP 制剂在载药量与包封率上都具备明显的优势,这与课题组前期 PSI-HAP 对水溶性药物载药研究的实验结果是相同的。因此,在制备 PSI-HAP 制剂时,无论是对水溶性药物还是对水难溶性药物来说,当采用不同方式制备 HAP 时,随着 PSI 用量的增加,药物的包封率虽然会有所提高,但是这种包封率的提高并不显著,且还会

导致制剂整体载药量的明显下降,因此,目前来说,对于 PSI-HAP 制剂的制备,MEM 制备的 HAP 由于其成球比较低,因此所需 PSI 用量较少(PSI 与 HAP 质量比在 3:1 至 5:1 间),是最为适合用来制备 PSI-HAP 制剂的方法。这也间接地证明了,在 PSI-HAP 制剂制备过程中,对药物负载的关键是 HAP 的存在,PSI 用量的增加虽然对药物的包封有一定的益处,但对制剂整体载药量的增长是起到相反作用的。

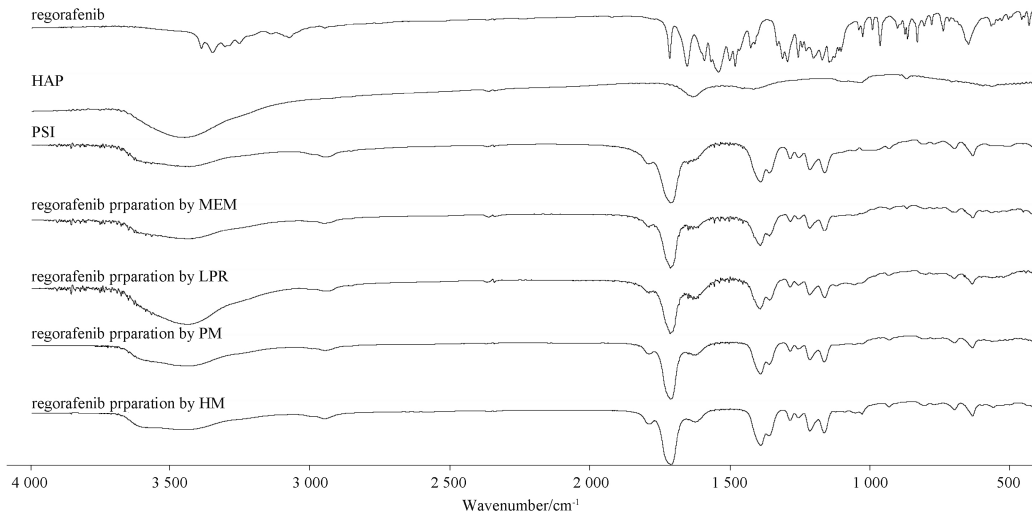


图 3 载有瑞戈非尼的 PSI-HAP 制剂红外光谱图

Fig. 3 FT-IR spectra of regorafenib-loaded PSI-HAP prepared using different methods

2.2.2 HAP 浓度对包封率与载药量的影响 根据“2.1”项下实验结果,确定瑞戈非尼质量浓度 5 mg ·

mL⁻¹,考察 HAP 浓度对 MEM 制备 PSI-HAP 制剂的影响,结果见表 5。

表 4 瑞戈非尼 PSI-HAP 制剂对不同浓度药物的包封率(EE)和载药量(DLC). n = 3, $\bar{x} \pm s$

Tab. 4 Encapsulation efficiency (EE) and drug loading capacity(DLC) of regorafenib-PSI-HAP prepared with different methods for different concentration of drug. n = 3, $\bar{x} \pm s$

$\rho_{\text{regorafenib}}$ /mg · mL ⁻¹	MEM		LPR		PM		HM	
	EE/%	DLC/%	EE/%	DLC/%	EE/%	DLC/%	EE/%	DLC/%
1	59.22 ± 0.59	1.20 ± 0.03	59.13 ± 0.56	0.67 ± 0.01	66.60 ± 1.04	0.32 ± 0.01	46.43 ± 1.05	0.23 ± 0.01
5	66.00 ± 0.97	6.18 ± 0.06	68.99 ± 1.11	3.69 ± 0.06	73.37 ± 1.17	1.72 ± 0.02	74.24 ± 1.21	1.73 ± 0.03
10	47.08 ± 1.70	8.59 ± 0.27	55.89 ± 1.49	5.85 ± 0.14	60.93 ± 1.09	2.82 ± 0.06	67.03 ± 1.66	3.10 ± 0.08
15	40.12 ± 0.76	10.72 ± 0.19	51.64 ± 0.81	7.94 ± 0.12	57.54 ± 0.55	3.94 ± 0.04	54.51 ± 0.87	3.75 ± 0.06
20	34.72 ± 0.69	12.20 ± 0.23	32.14 ± 0.95	6.67 ± 0.20	36.39 ± 1.19	3.35 ± 0.11	31.83 ± 1.06	2.94 ± 0.10

从表 5 可以看出,当瑞戈非尼药物浓度固定时,随着 HAP 浓度的增加,包封率会有所提高,但当体系中 HAP 的浓度达到 15 mg · mL⁻¹后,HAP 浓度的增加对制剂的包封率影响已经不明显。当制备体系中 HAP 质量浓度较低时(1 mg · mL⁻¹),对瑞戈非尼药物的包封能力也是较弱的。从载药量的角度来

看,随着 HAP 用量的增长,PSI 用量也会增加,因此,HAP 浓度的增加对制剂载药量的影响是负面的。

2.2.3 制备条件对 HAP 吸附药物的影响 PSI 浓度:确定药物的质量浓度为 5 mg · mL⁻¹,HAP 的质量浓度为 10 mg · mL⁻¹,固定上述已确定制备条件,考察 PSI 溶液质量浓度(25、50、100、150、200 mg ·

mL⁻¹)对 MEM 制备 PSI-HAP 制剂的包封与载药能力。结果见表 6。

表 5 HAP 浓度对瑞戈非尼 PSI-HAP 制剂的 EE 和 DLC 的影响. $n = 3, \bar{x} \pm s$

Tab. 5 Effects of HAP concentration on EE and DLC of regorafenib-PSI-HAP. $n = 3, \bar{x} \pm s$

$\rho_{\text{HAP}}/\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	EE/%	DLC/%
1	21.63 ± 1.20	17.78 ± 0.72
5	57.50 ± 1.23	10.09 ± 0.59
10	66.38 ± 1.07	5.99 ± 0.45
15	70.46 ± 0.80	4.32 ± 0.134
20	71.57 ± 0.70	3.31 ± 0.29
25	73.52 ± 1.03	2.74 ± 0.26

表 6 PSI 溶液浓度对瑞戈非尼 PSI-HAP 制剂 EE 和 DLC 的影响. $n = 3, \bar{x} \pm s$

Tab. 6 Effects of PSI concentration on the EE and DLC of regorafenib-PSI-HAP. $n = 3, \bar{x} \pm s$

$\rho_{\text{PSI}}/\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	EE/%	DLC/%
25	70.88 ± 1.07	6.65 ± 0.15
50	69.55 ± 0.90	6.49 ± 0.11
100	66.12 ± 0.98	6.19 ± 0.07
150	65.10 ± 0.76	6.14 ± 0.07
200	65.69 ± 0.88	6.19 ± 0.06

从实验结果看,PSI 浓度较低时,对包封率的提高有一定的益处,但这种包封率的提高对整体的载药量的影响并不明显。因此,可综合成本及有机溶剂去除难易等角度等考虑选择 PSI 浓度,本研究后续实验确定采用 PSI 的质量浓度为 50 mg · mL⁻¹ 左右。

制备工艺条件:在单因素考察基础上,以瑞戈非尼药物浓度 5 mg · mL⁻¹, HAP 10 mg · mL⁻¹, PSI: HAP 质量比 4:1, PSI 浓度 50 mg · mL⁻¹ 分别考察搅拌速度、搅拌与超声(50 W, 35 kHz)同时使用条件下对制剂载药的影响。结果见表 7。

表 7 搅拌和超声条件对瑞戈非尼 PSI-HAP 制剂 EE 和 DLC 的影响. $n = 3, \bar{x} \pm s$

Tab. 7 EE and DLC of regorafenib-PSI-HAP prepared under different stirring and sonication conditions. $n = 3, \bar{x} \pm s$

Stirring rate /r · min ⁻¹	Without sonication		Under sonication	
	EE/%	DLC/%	EE/%	DLC/%
500	68.93 ± 1.01	6.46 ± 0.09	72.99 ± 1.13	6.81 ± 0.12
800	69.55 ± 0.90	6.49 ± 0.11	72.54 ± 0.83	6.78 ± 0.09
1 000	70.41 ± 1.07	6.62 ± 0.11	73.21 ± 1.02	6.81 ± 0.09
1 500	70.42 ± 1.12	6.61 ± 0.14	73.57 ± 0.93	6.84 ± 0.07
2 000	70.22 ± 1.21	6.57 ± 0.14	73.61 ± 0.87	6.88 ± 0.07

由结果可见,总体上来看超声对提高瑞戈非尼制剂的包封率是有益的,尤其是搅拌速率较低时,当搅拌速率达到 1 000 r · min⁻¹后,这种对包封率的提高就不再明显,但整体上来看,无论是搅拌还是超声条件的加入,对载药量的影响并不明显。本研究最终确定在制备过程中采用超声加 1 000 r · min⁻¹ 搅拌速度。

温度影响:确定上述所有制备条件后,考察制备温度对制备制剂的影响,结果见表 8。

表 8 温度对瑞戈非尼 PSI-HAP 制剂 EE 和 DLC 的影响. $n = 3, \bar{x} \pm s$

Tab. 8 Effects of temperature conditions on the EE and DLC of regorafenib-PSI-HAP. $n = 3, \bar{x} \pm s$

T/°C	EE/%	DLC/%
25	73.21 ± 1.02	6.81 ± 0.09
60	73.09 ± 0.88	6.83 ± 0.11
80	73.05 ± 1.14	6.83 ± 0.16

温度对 PSI-HAP 制剂的包封率和载药量影响不大,这与其他药物在 PSI-HAP 制剂的制备过程中产生现象相似。因此,选择室温(25 °C 左右)条件制备即可。总体上来看,PSI-HAP 制剂对制备过程中的工艺条件并不十分敏感,在一定范围内都不会影响制剂的包封和载药。因此,十分适合大规模的生产转化。

2.3 响应面曲线确定处方

根据单因素考察结果,以药物质量浓度(1 ~ 10 mg · mL⁻¹)、药物与 HAP 质量比(3:1 ~ 1:3)、PSI 与 HAP 质量比(3:1 ~ 5:1)为主要影响因素,采用 Design-Expert 8.0 软件设计,药物浓度、HAP: 瑞戈非尼质量比、PSI: HAP 质量比(表 9)为影响因素进行实验设计,绘制响应面曲线图,确定最终的处方与工艺。

表 9 Box-Behnken 设计制备瑞戈非尼制剂的实验条件

Tab. 9 Experimental conditions of Box-Behnken design for preparation of PSI-HAP

Independent variables	Process factors	Level		
		Low	Middle	High
$\rho_{\text{regorafenib}}/\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	A	1	5.5	10
$m_{\text{HAP}}/m_{\text{regorafenib}}$	B	3:1	1:1	1:3
$m_{\text{PSI}}/m_{\text{HAP}}$	C	3:1	4:1	5:1

从表 10 可以看出,一次项 A(药物浓度), B(HAP 与药物质量比), 二次项 A², B² 的

F 值 < 0.001 , 说明药物的浓度以及药物与 HAP 的质量比对包封率的影响极显著, 其他因素不显著, 从 F 值的大小可以看出对包封率影响因素顺序为: $B > A > C$ (PSI 与 HAP 质量比), 说明对包封率影响最为明显的是药物与 HAP 的质量比, 而 PSI 与 HAP 对包封率的影响不显著。而对于载药量来说, 一次项 A, B, 二次项 A^2 的 F 值 < 0.001 , 对载药量来说影响

是极显著的, 一次项 C, 交互项 AB, 二次项 C^2 对载药量的影响显著, 其他因素不显著, 对载药量影响的因素顺序为: $B > A > C$, 表明所考察的 3 个因素变化都会对载药量的变化产生显著性影响。其中, 药物与 HAP 的比例对包封率和载药量变化都起到至关重要的作用, PSI 与 HAP 的比例对包封率没有显著性影响, 但是对载药量的影响较为显著。

表 10 分别用于表示不同模型的显著性和拟合度的选定响应 ANOVA 和统计参数汇总

Tab. 10 Summary of ANOVA and statistical parameters respective to selected responses indicating significance and fitting of different models

Parameter	Source	Sum of squares	df	Mean square	F value	P value	Interpretation
EE	Model	7 577.11	9	841.9	118.21	< 0.0001	Significant
	A - C (SCE)	1 043.94	1	1 043.94	146.58	< 0.0001	Significant
	B - $m(\text{HAP}) : m(\text{SCE})$	4 553.76	1	4 553.76	639.39	< 0.0001	Significant
	C - $m(\text{PSI}) : m(\text{HAP})$	18.66	1	18.66	2.62	0.1496	Not significant
	AB	0.14	1	0.14	0.02	0.8924	Not significant
	AC	14.88	1	14.88	2.09	0.1916	Not significant
	BC	4.72	1	4.72	0.66	0.4423	Not significant
	A^2	1 377.67	1	1377.67	193.44	< 0.0001	Significant
	B^2	7.36	1	7.36	1.03	0.3432	Not significant
	C^2	440.56	1	440.56	61.86	0.0001	Significant
	Residual	49.85	7	7.12	-	-	-
	Lack of fit	30.69	3	10.23	2.14	0.2385	Not significant
	Pure error	19.16	4	4.79	-	-	-
	Cor total	7 626.96	16	-	-	-	-
DLC	Model	258.02	9	28.67	46.03	< 0.0001	Significant
	A - C (SCE)	51.29	1	51.29	82.36	< 0.0001	Significant
	B - $m(\text{SCE}) : m(\text{HAP})$	123.59	1	123.59	198.43	< 0.0001	Significant
	C - $m(\text{PSI}) : m(\text{HAP})$	7.75	1	7.75	12.44	0.0096	Significant
	AB	22.31	1	22.31	35.81	0.0006	Significant
	AC	0.000 188 2	1	0.000 188 2	0.000 302 2	0.986 6	Not significant
	BC	0.053	1	0.053	0.086	0.778 2	Not significant
	A^2	40.23	1	40.23	64.59	< 0.0001	Significant
	B^2	0.62	1	0.62	1	0.350 1	Not significant
	C^2	8.94	1	8.94	14.36	0.006 8	Significant
	Residual	4.36	7	0.62	-	-	-
	Lack of fit	3.62	3	1.21	6.56	0.050 4	Not significant
	Pure error	0.74	4	0.18	-	-	-
	Cor total	262.38	16	-	-	-	-

从表 11 可以看出, 对于包封率和载药量来说, 多元相关系数 r^2 都在 95% 以上, 说明二者的相关性都非常好。Adj r^2 和 Pred r^2 二者的差值皆小于 0.2, 较为接近, 说明该 BBD 方法建立的回归模型能充分说明工艺过程。变异系数 (CV) $< 10\%$, 表明实验的可信度和精确度高。精密度是有效信号与噪声的比值, 大于 4 视为合理。从表 11 可以看出, 拟合的回归方程符合以上检验原则, 适应性较好。

图 4 显示了最佳处方为药物质量浓度 (A) 为

$7.28 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $m_{\text{药物}} - m_{\text{HAP}} (B) = 0.63$, $m_{\text{PSI}} - m_{\text{HAP}} (C) = 3.93$, 预测 EE = 59.12%, DLC = 12.81%。确定的制备工艺为: 在室温条件下, 按处方称量 HAP, 加入到水溶液中制备 HAP 混悬液, 在超声 (50 W, 35 kHz) 与搅拌条件下 ($1\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$), 加入药物, 待药物与 HAP 混合 1 min 后, 滴入 PSI 二甲基甲酰胺或二甲基乙酰胺溶液 ($50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 滴加完毕后, 高速离心, 收集上清液, 无水乙醇溶液进行多次洗涤, 洗涤次数不低于 5 次, 收集样品, $70 \text{ }^\circ\text{C}$ 干燥 4 h。

表 11 包封率和载药量的模型摘要统计

Tab. 11 Model summary statistics of EE and DLC

Response	r^2	Adj r^2	Pred r^2	Adequate precision	CV/%
EE	0.993 5	0.985 1	0.931 7	34.475	5.47
DLC	0.983 4	0.962 0	0.774 7	22.148	8.87

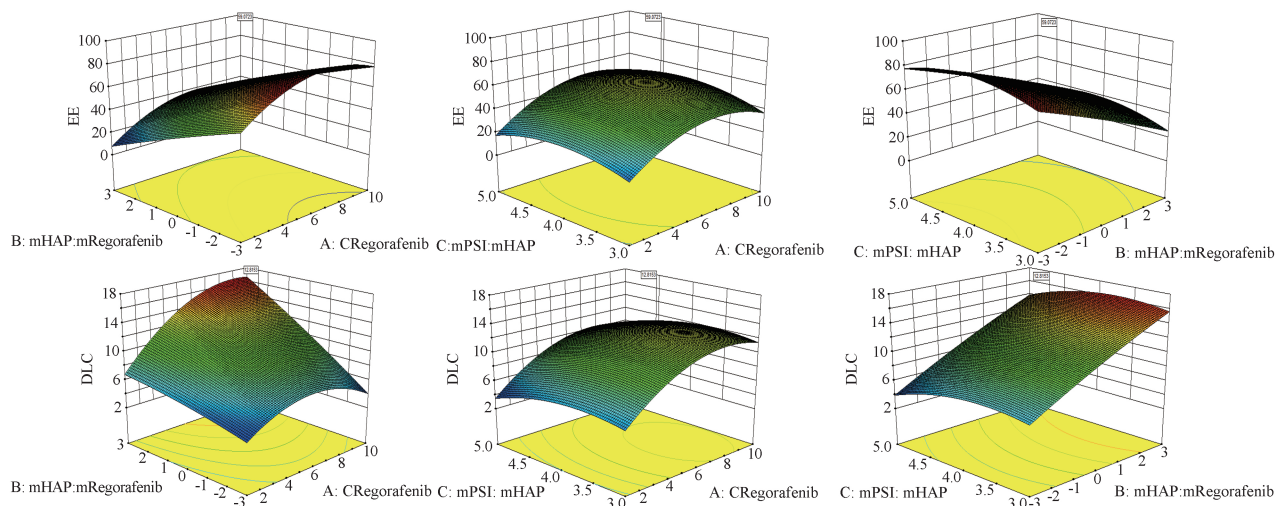


图 4 制备配方优化的 3D 响应面图

Fig. 4 3D-response surface plot for optimization of the prepared formulations

2.4 制剂包封率与载药量

按照上述所确定处方与工艺制备 3 批样品 (1 000 mL), 测定包封率与载药量, 并进行药物释放研究。

由表 12 可以看出, 处方放大 100 倍后, 所制备的制剂包封率与载药量与响应面曲线实验预测的结果低。产生的原因, 一方面可能是由于实验设计方法产生的误差; 一方面可能是由于样品放大后, 实验室仪器设备不能满足大量的样品制备, 这种误差在课题组对水溶性药物五味子提取物的负载实验中更为明显。因此, 在 PSI-HAP 制剂的制备过程中, 当制备的样品量放大后, 需要对制备的工艺条件等重新进行细致的摸索。但鉴于 PSI-HAP 制剂所需的辅料和制备工艺都非常简单, 因此, 在工艺放大过程中, 所需考虑的因素也非常少, 十分利于制剂的生产转化。

表 12 瑞戈非尼 PSI-HAP 终制剂的 EE 和 DLC. $n=3, \bar{x} \pm s$

Tab. 12 EE and DLC of the final regorafenib-PSI-HAP preparations. $n=3, \bar{x} \pm s$

Samples	EE/%	DLC/%
1	47.5	13.27
2	51.31	14.19
3	55.14	15.08
$\bar{x} \pm s$	51.32 \pm 3.82	14.15 \pm 0.91

2.5 药物体外释放

PSI-HAP 的药物释放具备 pH 敏感性, 当 pH 较低时 (2.0, 4.5), 药物的释放水平较低, 120 h 内的药物释放量在 30% 以下, 当溶液 pH 值接近 7 左右时, 药物释放量开始加大, pH 6.8 溶液环境下, 120 h 的药物释放量可达到 74%, 当 pH 达到 7.4 以上时, 120 h 内的释放量可达到 90% 以上 (图 5)。从图 5 中本研究还可以看出, pH 7.4 与 8.0 溶液环境下, 药物的释放规律大体一致, 在 12 h 内药物的释放速度较快, 之后, 趋于缓慢与平稳。此外, 与前期水溶性药物的实验结果相比较, PSI-HAP 对瑞戈非尼的释放时间有所延长。

2.6 瑞戈非尼制剂 Zeta 电位与粒径

载入药物后, 3 批瑞戈非尼制剂的粒径维持在 300 nm 左右, Zeta 电位分别是 -10.6, -10.1, -17.8 mV, 整体为负值, 与人体的生物膜相同, 其中第 3 组制剂的 Zeta 电位比第 1 和第 2 组偏离较大 (图 6), 分析原因可能是制备过程中清洗不完全, 造成制剂表面吸附部分药物, 或者是由于测试仪器的误差造成。此外, 第 2 组和第 3 组测试样品中在 5 μm 处还存在少量的较大粒子峰, 分析原因可能是由于放大后, 实验室的超声 (实验室仅有固定频率的超声仪 1 台) 和搅拌仪器无法满足大量样品的制备, 使 PSI 加入溶液后, 无法快速在溶液中分布均匀, 从而导致局部浓度过高, 产生少量样品的聚集, 而

整个 PSI-HAP 制剂的制备过程中,又从未进行任何的过滤操作,因此导致产生了部分大颗粒的样品。这种现象,在实验室制备的其他药物的 PSI-

HAP 制剂中也同样存在。这也提示,在 PSI-HAP 的实际生产过程中,需要对制备工艺条件中的搅拌和超声条件重新进行考察。

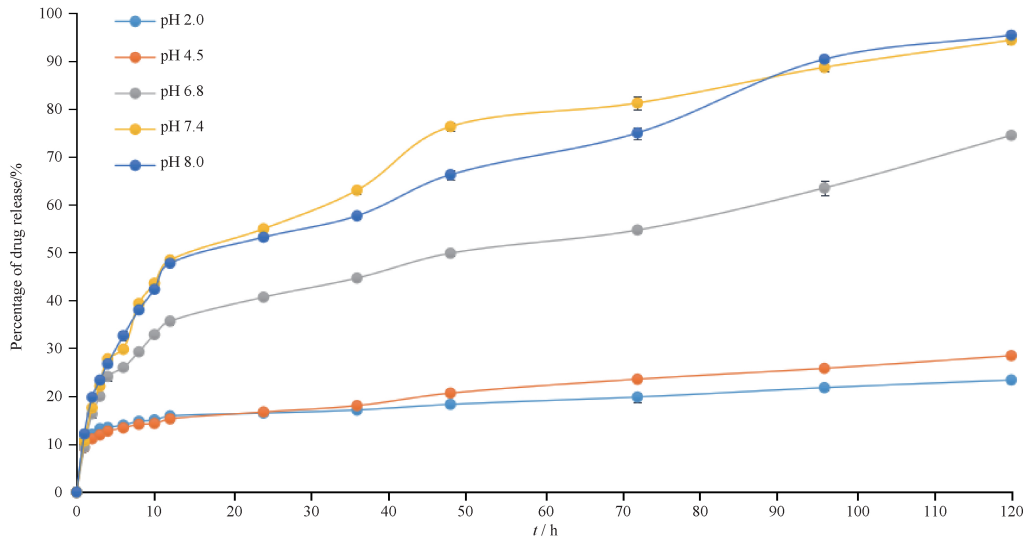


图 5 瑞戈非尼 PSI-HAP 制剂的体外释放曲线. $n = 3, \bar{x} \pm s$
 Fig. 5 Release curves of regorafenib-PSI-HAP *in vitro*. $n = 3, \bar{x} \pm s$

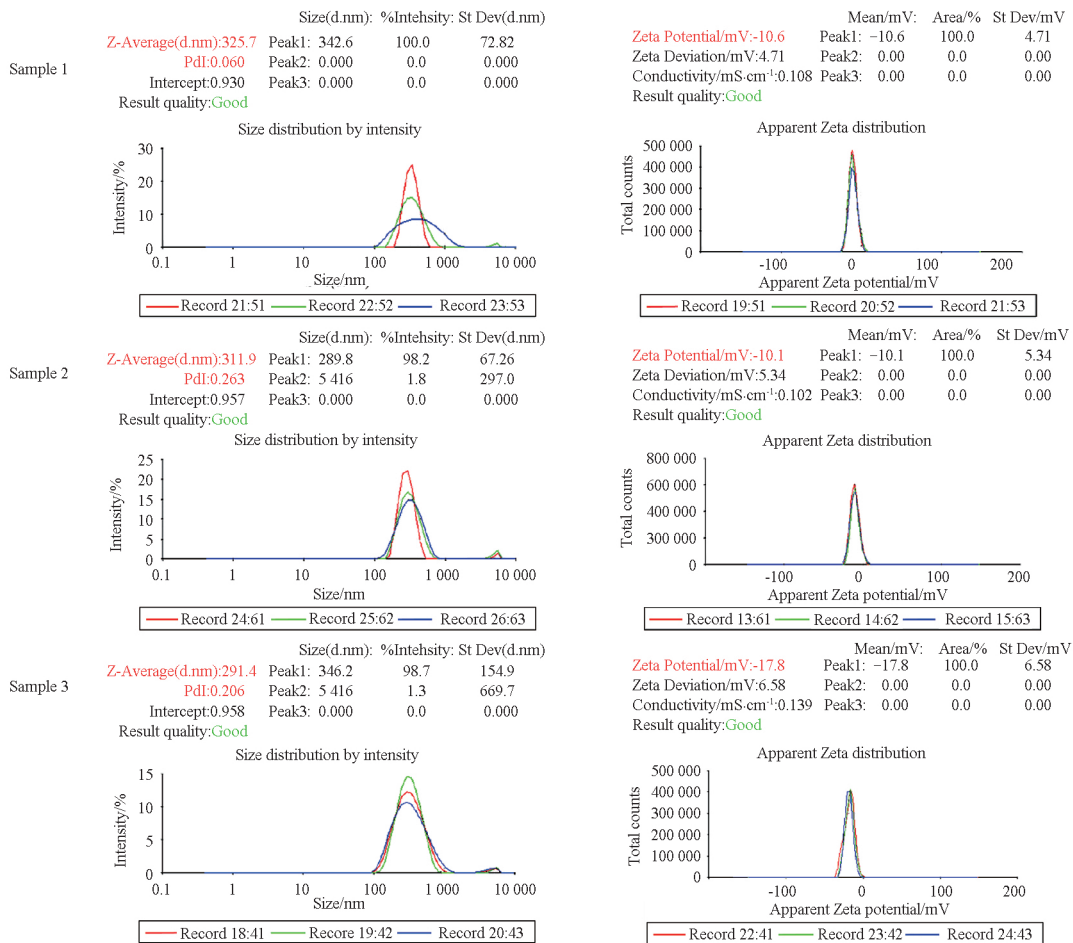


图 6 瑞戈非尼 PSI-HAP 制剂粒径分布及 Zeta 电位测试图谱
 Fig. 6 PSD and Zeta potential of regorafenib-PSI-HAP preparation

2.7 瑞戈非尼 PSI-HAP 制剂 SEM 图谱

与前期课题组制备的空白 PSI-HAP 制剂相比(空白粒径在 100 ~ 200 nm 之间),工艺放大生产及载药后,粒径有所增大,粒子以球形或类球形为主,整体粒子仍维持在纳米级别(图 7)。第 3 组样品有较大粒子存在,分析最可能的原因应该是制备过程中,超声或搅拌等条件不充分所导致的。

形为主,整体粒子仍维持在纳米级别(图 7)。第 3 组样品有较大粒子存在,分析最可能的原因应该是制备过程中,超声或搅拌等条件不充分所导致的。

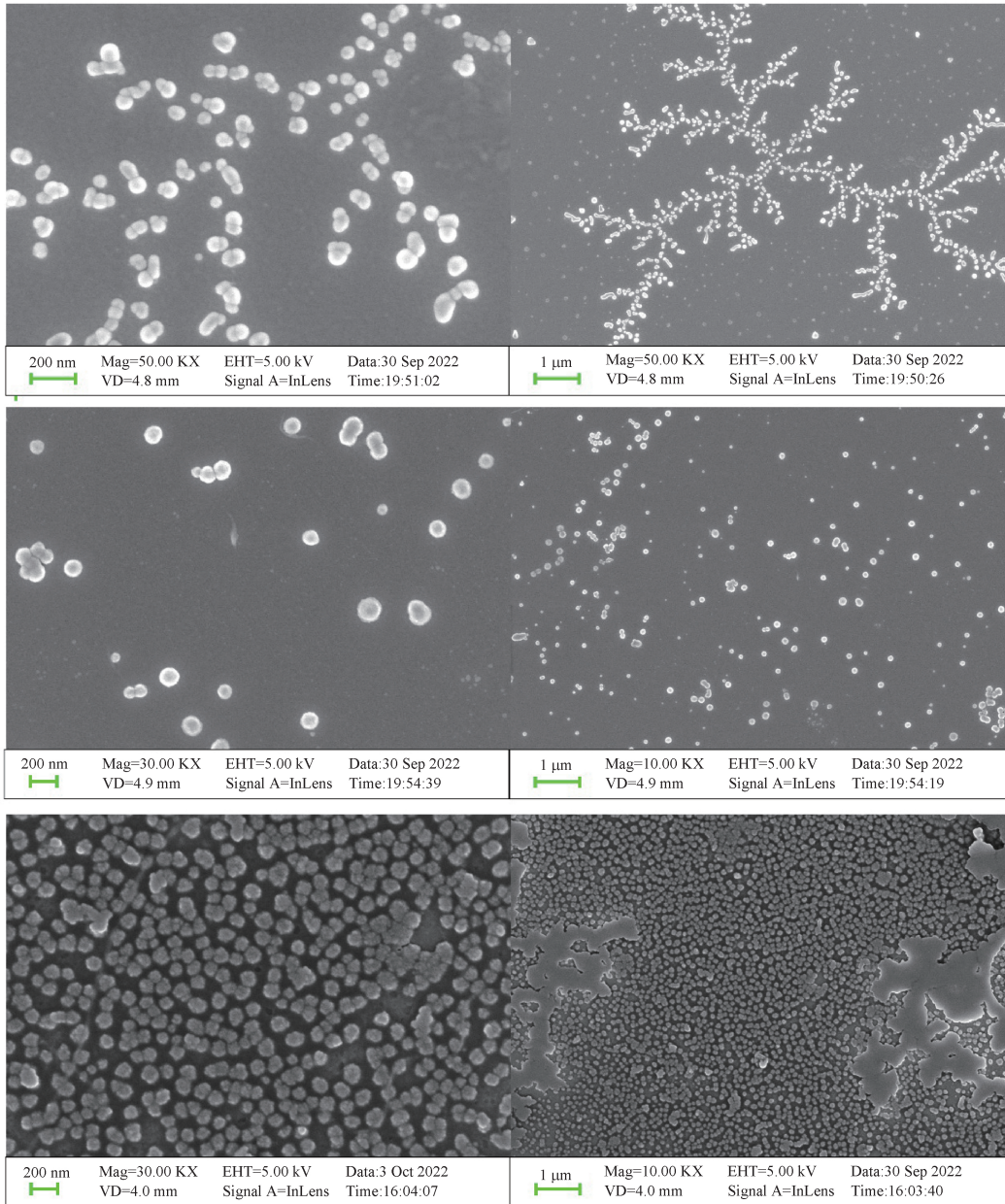


图 7 乳液法(MEM)制备的瑞戈非尼 PSI-HAP 制剂的扫描电镜(SEM)图像

Fig. 7 SEM images of regorafenib-PSI-HAP preparation using MEM

2.8 动物体内分布实验结果

空白给药组中的口服给药组(Saline ig)在 3 h,注射给药组(Saline iv)在 4 h 后,在体内即检测不到荧光分布。口服给药组(PSI-HAP ig)在 2 h 前的体内分布与空白组类似,在 2 h 后,至 9 h 之间,在体内各脏器中均可见较强的荧光分布,这种荧光分布

12 h 后开始消失(图 8)。注射给药组的体内荧光强度分布要远低于口服给药组,在给药后 2 h 后,首先在胸腔见微弱的荧光,3 h 后腹腔可见荧光分布,6 h 后荧光主要分布于胸腔,至 24 h 后消失。无论是口服给药还是注射给药,PSI-HAP 于动物体内分布时间都要比空白组得到明显的延长。

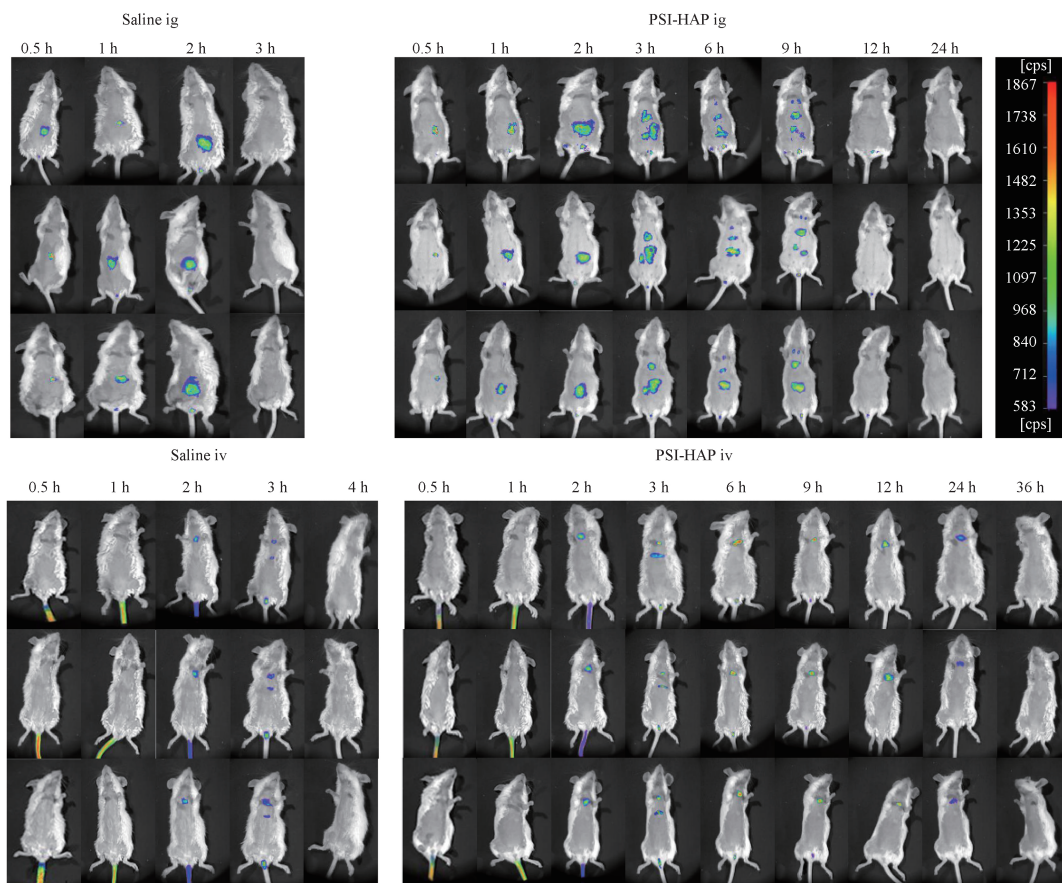


图8 瑞戈非尼制剂动物体内分布实验结果

Fig. 8 The results of the distribution *in vivo*

3 结论

本实验报道了一种新型的纳米缓释递药体系 PSI-HAP 的制备方法,该新型制剂具备“硬核软膜”的制剂结构,通过 PSI 与 HAP 的结合,既可避免无机材料 HAP 的突释和聚集,降低 HAP 粒径,又可进一步保护药物的稳定性,同时解决了有机聚合物 PSI 及其衍生物单独形成纳米胶束后物理稳定性差的问题,又增加了纳米制剂对药物的包封能力与载药量,二者相辅相成,缺一不可。通过衣膜 PSI 的修饰,还可使药物具备不同靶向性能。与脂质体制剂相比,制剂内核为强吸附性的固体核 HAP,对药物的负载能力理论上优于脂质体,外膜 PSI 及衍生物的存在可避免纳米粒子的聚集和药物在储存过程中的泄漏问题。该递药系统从设计理论上尤其适合作为核酸、蛋白质及抗肿瘤药物的体内递送载体,可潜在用于核酸类药物的载药当中,为核酸类药物的运送提供一种新的给药途径。该递药体系具有 pH 敏感性,在 pH 值高于 7 以上的液体环境中药物释放较为完全,PSI 及衍生物与 HAP 皆可体内降解吸收,适用于口服、植入、吸入与注射等多途径给药。该给

药系统制备过程简单、条件温和、易于灭菌操作、可进行冻干保存,制剂物理化学稳定性良好,具备很高的生产转化性,是一种安全可靠的且具备广泛应用潜力的可灭菌型纳米缓释递药系统,尤其适合抗肿瘤药物的体内运载。

REFERENCES

- [1] WILHELM S M, DUMAS J, ADNANE L, *et al.* Regorafenib (BAY73-4506) : a new oral multikinase inhibitor of angiogenic, stromal and onco-genic receptor tyrosine kinases with potent preclinical antitumor activity [J]. *Int J Cancer*, 2011, 129 (1) :245-255.
- [2] GROTHEY A, VAN CUTSEM E, SOBRERO A, *et al.* Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT) : an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial [J]. *Lancet*, 2013, 381 (9863) :303-312.
- [3] DEMETRI G D, REICHARDT P, KANG YK, *et al.* Efficacy and safety of regorafenib for advanced gastrointestinal stromal tumours after failure of imatinib and sunitinib (GRID) : an international, multicentre, randomized, placebo-controlled, phase 3 trial [J]. *Lancet*, 2013, 381 (9863) :295-302.
- [4] REICHARDT P, DEMETRI GD, JEFFERS M, *et al.* Mutational analysis of plasma DNA from patients (pts) in the phase III GRID study of regorafenib (REG) versus placebo (PL) in tyro-

- sine kinase inhibitor (TKI)-refractory GIST: Correlating genotype with clinical outcomes [J]. *Oncol Res Treat*, 2013, 37 (Suppl. 15):58. DOI:10.1016/s1553-3212(07)70243.1.
- [5] LI J. Research progress of new oral multikinase inhibitor regorafenib in the treatment of cancer[J]. *Chin Clin Oncol* (临床肿瘤学杂志), 2014, 19(5):6. DOI:CNKI:SUN:LCZL.O.2014-05-001.
- [6] SEVIL K, BERNA K, MERVE G, *et al.* Stem cell and advanced nano bioceramic interactions, in: H. J. Chun, K. Park, C. H. Kim, G. Khang (Eds.), *Novel Biomaterials for Regenerative Medicine* [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1077: 317-342. DOI:10.1007/978-981-13-0947-2_17.
- [7] SHAO R X, QUAN R F, ZHANG L, *et al.* Porous hydroxyapatite bioceramics in bone tissue engineering: current uses and perspectives[J]. *J Ceramic Soc Japan*, 2015, 123(1433):17-20.
- [8] LUO Y, LING Y, GUO W S, *et al.* Docetaxel loaded oleic acid-coated hydroxyapatite nanoparticles enhance the docetaxel-induced apoptosis through activation of caspase-2 in androgen independent prostate cancer cells[J]. *J Controlled Release*, 2010, 147(2):278-288.
- [9] VELAZCO-DE-LA-GARZA J, AVÉROUS L, SOSA-SANTILLÁN G J, *et al.* Biological properties of novel polysuccinimide derivatives synthesized via quaternary ammonium grafting[J]. *Eur Poly J*, 2020, 131: 109705. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2020.109705.
- [10] JALALVANDI E, SHAVANDI A. Polysuccinimide and its derivatives: degradable and water soluble polymers (review) [J]. *Eur Poly J*, 2018, 109: 43-54. DOI:10.1016/j.eurpolymj.2018.08.056.
- [11] VEGA-CHACON J, ARBELÁEZ M I A, JORGE H J, *et al.* pH-responsive poly(aspartic acid) hydrogel-coated magnetite nanoparticles for biomedical applications [J]. *Mater Sci Eng C*, 2017, 77: 366-373. DOI:10.1016/j.msec.2017.03.244.
- [12] GONG C, LU C C, LI B Q, *et al.* Injectable dopamine-modified poly(α , β -aspartic acid) nanocomposite hydrogel as bioadhesive drug delivery system[J]. *J Biomed Mater Res Part A*, 2017, 105 (4):1000-1008.
- [13] KIM M, CHA C Y. Graft architecture guided simultaneous control of degradation and mechanical properties of in situ forming and fast dissolving polyaspartamide hydrogels[J]. *Biomacromolecules*, 2020, 21(9):3693-3703.
- [14] DANG Q D, PARK J H, KIM J H, *et al.* Synthesis and characterization of novel multi-hydroxy polyaspartamide derivative and its crosslinked hydrogels [J]. *React Funct Polym*, 2020, 147: 104455. DOI:10.1016/j.reactfunctpolym.2019.104455.
- [15] VEGA-CHACON J, PIAZZA R D, MARQUES R C, *et al.* The influence of pH, hydrolysis and degree of substitution on the temperature-sensitive properties of polyaspartamides [J]. *Polyr Int*, 2019, 68(1):88-93.
- [16] ZHAO D P, LI B Q, HAN J M, *et al.* pH responsive polypeptide based polymeric micelles for anticancer drug delivery[J]. *J Biomed Mater Res Part A*, 2015, 103(9):3045-3053.
- [17] LIU N, HAN J M, ZHANG X C, *et al.* pH-responsive zwitterionic polypeptide as a platform for anti-tumor drug delivery[J]. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 2016, 145: 401-409. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2016.05.027.
- [18] LE T T, KIM D. Folate-PEG/Hyd-curcumin/C18-g-PSI micelles for site specific delivery of curcumin to colon cancer cells via Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *Mater Sci Eng C*, 2019, 101: 464-471. DOI:10.1016/j.msec.2019.03.100.
- [19] TRAN N B, KIM J Y, KIM Y C, *et al.* CO₂-responsive swelling behavior and metal - ion adsorption properties in novel histamine-conjugated polyaspartamide hydrogel[J]. *J Appl Poly Sci*, 2016, 133(16):43305. DOI:10.1002/app.43305.
- [20] OSTROVSKAYA L A, KORMAND B, VARFOLOMEEV S D, *et al.* Polysuccinimide: Experimental antitumor activity[J]. *Biophysics*, 2015, 60(2):298-302.
- [21] VEGA-CHACON J, PIAZZA R D, MARQUES R C, *et al.* The influence of pH, hydrolysis and degree of substitution on the temperature-sensitive properties of polyaspartamides[J]. *Polyr Int*, 2019, 68: 88-93. DOI:10.1002/pi.5699.

(收稿日期:2022-10-14)