

紫杉醇-油酸和鸦胆子油分子配型组装纳米乳给药系统研究

张宽云, 马 燕*

广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006

摘要: 目的 优化紫杉醇-油酸 (PTX-OA) 和鸦胆子油 (BJO) 分子配型组装纳米乳给药系统 (PTX-OA/BJO CMNEs) 的处方及制备工艺。方法 通过酯化反应制备得 PTX-OA 并建立检测 PTX-OA 的 HPLC 方法。采用超声乳化法制备 PTX-OA/BJO CMNEs。单因素实验选出对 PTX-OA/BJO CMNEs 粒径影响较大的 3 个因素, $L_{16}(4^3)$ 正交试验以这 3 个因素油相质量浓度 (A)、聚山梨酯-80 用量 (B) 和超声功率 (C) 为考察因素, 以平均粒径为评价标准, 优选 PTX-OA/BJO CMNEs 的处方及制备工艺。对优选条件制备的 PTX-OA/BJO CMNEs 进行制剂学评价及体外细胞毒实验。结果 HPLC 法检测 PTX-OA 在 5~25 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好, 回归方程 $Y=12.709X+6.2520$, $r=0.9995$ 。最优处方为油相质量浓度为 6.50 mg/mL, 聚山梨酯-80-油相比为 3.5:6.5, 超声乳化功率为 120 W。制备的 PTX-OA/BJO CMNEs 外观良好, 平均包封率为 $(100.6\pm1.9)\%$, 平均粒径 (108.7 ± 2.3) nm, 多分散系数 (PDI) 为 0.232 ± 0.038 。透射电子显微镜 (TEM) 形态观察表明 PTX-OA/BJO CMNEs 粒径接近 100 nm, 分布较均一; 其体外释放度在 48 h 达到 67%。PTX-OA/BJO CMNEs 溶液置于 4 $^{\circ}\text{C}$, 避光环境下保存 60 d, 包封率、粒径基本保持不变, 稳定性较好。体外细胞毒实验显示, BJO 与 PTX-OA 联用对 HepG-2 细胞生长抑制具有一定的协同作用。结论 优化后的 PTX-OA/BJO CMNEs 制备工艺简单易行, 且药物之间具有增强细胞毒作用, 为 PTX 和 BJO 联合用药的抗肿瘤作用机制的研究奠定了基础。

关键词: 紫杉醇; 鸦胆子油; 分子配型组装纳米乳给药系统; 正交试验; 稳定性; 超声乳化法; 包封率; 细胞毒作用

中图分类号: R283.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2017)08-1544-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.08.011

Study on paclitaxel-oleic acid and *Brucea javanica* oil core-matched nanoemulsions drug delivery

ZHANG Kuan-yun, MA Yan

School of Chinese Material Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

Abstract: **Objective** To optimize the preparation method of paclitaxel-oleic acid (PTX-OA)/*Brucea javanica* oil (BJO) core-matched nanoemulsions (CMNEs). **Methods** PTX-OA/BJO was synthesized by esterification of PTX and OA, and determined by HPLC. Ultrasonic emulsification was used to prepare the PTX-OA/BJO CMNEs. The concentration of oil phase (A), quality of polysorbate 80 (B), and ultrasonic power (C) were selected as the significant factors after single-factor experiments and applied in $L_{16}(4^3)$ orthogonal array design with the average particle size as criterion. In addition, the physicochemical properties and cytotoxicity of PTX-OA/BJO CMNEs were tested. **Results** Linear range of PTX-OA was 5—25 $\mu\text{g/mL}$, $Y=12.709X+6.2520$, $r=0.9995$. The optimized conditions of PTX-OA/BJO CMNEs were as follows: The concentration of oil phase was 6.50 mg/mL, the mass ratio of polysorbate 80 to oil phase was 3.5:6.5 and the ultrasonic power was 120 W. The CMNEs prepared by the optimal conditions showed an entrapment efficiency of $(100.6\pm1.9)\%$ and the nanoscale particle size was (108.7 ± 2.3) nm, PDI was 0.232 ± 0.038 . The morphology of CMNEs examined by TEM exhibited a uniform and spherical shape. *In vitro* drug release was up to 67% after 48 h. After PTX-OA/BJO CMNEs sealed in a bottle were stored at 4 $^{\circ}\text{C}$ for 60 h, the average particle size and entrapment efficiency had no significant change. The cytotoxicity *in vitro* showed that the combined PTX-OA/BJO CMNEs could obviously inhibit the proliferation of HepG-2 cells. **Conclusion** The current study demonstrates the feasibility of incorporating PTX-OA and BJO into a single CMNEs for the synergism in cancer therapy. Furthermore, the preparation of PTX-OA/BJO CMNEs has the advantages of practicability and

收稿日期: 2016-11-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81403109); 广东省科技计划项目 (2016A020217017); 广东省卫生与计划生育委员会项目 (A2015596)

作者简介: 张宽云 (1990—), 男, 在读硕士, 研究方向为制剂新技术与新剂型研究。E-mail: 214220713@qq.com

*通信作者 马 燕 (1977—), 女, 博士生导师, 副教授, 研究方向为制剂新技术与新剂型研究。Tel: (020)39358043 E-mail: mygzhtcm@163.com

simple operation, as well lays the foundation for the further mechanism research of the combined paclitaxel and BJO in oncotherapy.

Key words: paclitaxel; *Brucea javanica* oil; core-matched nanoemulsions; orthogonal test; stability; ultrasonic emulsification; encapsulation efficiency; cytotoxicity assay

紫杉醇 (paclitaxel, PTX) 是目前抗肿瘤最有效的药物之一, 其适应症由治疗卵巢癌, 扩展到肺癌、胃癌、乳腺癌等多种恶性肿瘤^[1-4]。虽然 PTX 具有良好的抗肿瘤活性, 但其水溶性差, 临床应用易产生多药耐药性 (multidrug resistance, MDR)^[5-6]。这些缺陷限制了 PTX 的使用, 为此研究者采用多种制剂技术改善其药剂学性质^[7-10]。

鸦胆子油 (*Brucea javanica* oil, BJO) 主要活性成分为油酸和亚油酸^[11-13], 广泛用于治疗肺癌、肝癌、前列腺癌等多种恶性肿瘤^[13-17]。据报道, BJO 可能通过下调 MDR mRNA 表达水平或抑制 Topo II 活性以逆转肿瘤细胞 MDR^[18-19]。因此, 本研究选择 BJO 与 PTX-油酸 (PTX-OA) 联合用药, 利用分子配型组装纳米技术^[20] (core-matched nanotechnology, CMT) 构建多功能 BJO 分子配型组装纳米乳给药系统 (core-matched nanoemulsions, CMNEs)。PTX 经油酸修饰后含有与 BJO 主要化学成分结构相同的链段, 有利于提高二者相容性, 提高药物在油相的溶解度和稳定性。采用单因素考察和正交试验对制备处方和工艺进行优化并进行一系列体外评价, 为 PTX 和 BJO 联合用药的深入研究奠定了基础。

1 仪器与材料

MTDE-8222 型真空干燥箱, 上海精宏实验设备有限公司; 超声波细胞粉碎机 JY92-IIN, 宁波新芝生物科技股份有限公司; TLE 型 NewClassic 电子天平, 梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司; Zetasizer 1000-HA 粒径仪, 英国马尔文有限公司; KQ5200DE 型数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; Agilent 1260 LC, 安捷伦科技有限公司; H-300 型透射电子显微镜, 日本日立集团; TGL-16B 台式离心机, 上海安亭科学仪器厂; Nanosep[®] 50KDa 离心超滤管, 美国 PALL 公司; XK96-3 型微量振荡器, 江苏新康医疗器械有限公司; SW-CJ-2D 型单人净化工作台, 苏州净化设备有限公司; BPN-BOCH 型二氧化碳培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; Multiskan GO1510 全波长酶标仪, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

甲醇 (色谱纯), 批号 150940, Fisher Science;

聚山梨酯-80, 批号 20140301, 天津市百世化工有限公司; 聚乙二醇 (PEG)-400, 批号 130607B02, 德国巴斯夫; 聚氧乙烯蓖麻油, 批号 A1506033, 阿拉丁试剂 (上海) 有限公司; Pluronic F68, 批号 WPE1566D, 德国巴斯夫; 油酸, 批号 140109, 洛阳市化学试剂厂; 精制 BJO, 批号 141103, 广州明兴制药有限公司; PTX, 批号 F1420035, 阿拉丁试剂 (上海) 有限公司; PTX-OA 对照品, 由沈阳药科大学刘丹教授合成并提供, 质量分数 $\geq 98\%$; RPMI Medium 1640 basic 培养基, 批号 8115090, 上海立菲生物技术有限公司; 磷酸盐缓冲液, 批号 NZM1284, 赛默飞世尔生物化学制品 (北京) 有限公司; 四季青胎牛血清, 批号 140809, 浙江天杭生物科技有限公司; Trypsin 0.25% 胰酶, 批号 1565739, 美国 Life Technology 公司; MTT, 批号 1425B38, 美国 Sigma 公司; 其余试剂均为分析纯。2.0% 磷钨酸溶液, 批号 DZ0035, 北京雷根生物技术有限公司; 水杨酸钠, 批号 20141008, 天津市大茂化学试剂厂; 十二烷基硫酸钠 (SDS), 批号 21040819, 天津市广成化学试剂有限公司; 透析袋, 截留相对分子质量为 5 000, 北京博奥拓达科技有限公司; HepG-2 细胞购于中山大学医学院细胞库。

2 方法与结果

2.1 PTX-OA 合成路线

由沈阳药科大学刘丹教授提供。反应分 3 步进行, 第 1 步以油酸为起始原料, 在 *N,N'*-二环己基碳二亚胺 (DCC)、二硫苏糖醇 (DTT)、2,2'-二硫二吡啶 (aldrithiol) 等参与下经催化还原和酯化反应生成产物 I; 第 2 步是 PTX 经酯化反应生成产物 II; 第 3 步是产物 I 和 II 在甲醇溶液中反应生成终产物 PTX-OA。合成反应路线如图 1 所示。

2.2 PTX-OA 分析方法的建立

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 FeiniGen C₁₈ 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相为甲醇; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 $^{\circ}$ C; 检测波长 227 nm; 进样量 20 μ L。在此色谱条件下, HPLC 法专属性强, 见图 2。

2.2.2 溶液的制备

(1) PTX-OA 对照品储备液: 精密称取 64.65 mg PTX-OA 对照品于 50 mL 量瓶内, 甲醇溶解、定容,

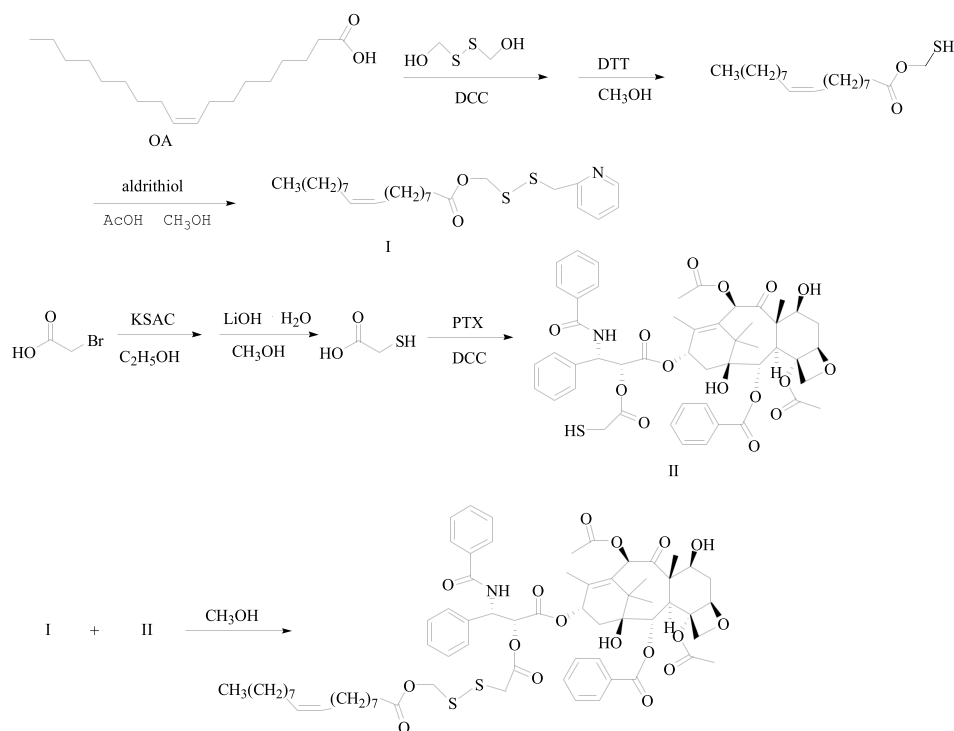
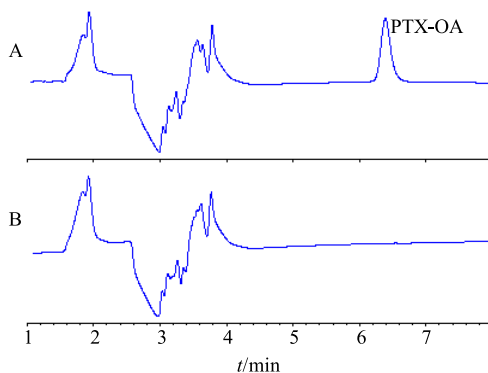


图 1 PTX-OA 合成反应路线

Fig. 1 Synthetic route of PTX-OA

图 2 PTX-OA/BJO CMNEs (A) 和空白乳 (B) 的 HPLC
Fig. 2 HPLC of PTX-OA/BJO CMNEs (A) and blank nanoemulsion (B)

制备得 1.293 mg/mL 的对照品储备液，备用。

(2) PTX-OA/BJO CMNEs 供试品溶液：精密量取 PTX-OA/BJO CMNEs 溶液 0.1 mL，置 10 mL 量瓶中，加适量甲醇超声 5 min，冷却，加甲醇定容至刻度，摇匀，微孔滤膜滤过，取续滤液，即得。

(3) 空白 CMNEs 供试品溶液：精密量取空白 CMNEs 溶液 0.1 mL，置 10 mL 量瓶中，加适量甲醇超声 5 min，冷却，加甲醇定容至刻度，摇匀，微孔滤膜滤过，取续滤液，即得。

2.2.3 线性关系考察 从 PTX-OA 对照品储备液中取一定体积的溶液于 5 mL 量瓶内定容，制备得质

量浓度为 5、10、15、20、25 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液。各质量浓度供试品溶液过微孔滤膜，取续滤液进液相色谱测定药物峰面积。以 PTX-OA 质量浓度为横坐标 (X)，峰面积为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线，得线性回归方程 $Y=12.709X+6.2520$ ， $r=0.9995$ ，结果显示，PTX-OA 在 5~25 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

2.2.4 精密度试验 取质量浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液，按照“2.2.1”项下色谱条件在 1 d 内测定 6 次并连续测定 6 d，计算日内精密度和日间精密度。结果显示，对照品溶液的日内与日间精密度 RSD 分别为 0.80%、2.24%。日内和日间精密度都小于 5%，符合精密度的要求。

2.2.5 稳定性试验 取 PTX-OA/BJO CMNEs 按“2.2.2”项下制得供试品溶液（质量浓度为 15 $\mu\text{g/mL}$ ），分别于 0、6、12、24、48 h 进行 HPLC 测定，记录各时间点对应的峰面积，计算 PTX-OA 峰面积的 RSD。结果表明，各时间点峰面积的 RSD 为 1.86%，供试品溶液在 48 h 内稳定。

2.2.6 重复性试验 取平行制备的 PTX-OA/BJO CMNEs 6 份，按“2.2.2”项下制得供试品溶液，按“2.2.1”项色谱条件进样分析，测定峰面积，计算 PTX-OA 质量浓度的 RSD 为 1.54%，表明方法重复性高。

2.2.7 加样回收率试验 平行制备的空白 CMNEs 6 份, 各取 0.1 mL 于 10 mL 量瓶内, 分别精密加入 PTX-OA 对照品储备液 0.1 mL, 加适量甲醇超声溶解 5 min 后, 按“2.2.1”项色谱条件进样分析, 计算 PTX-OA 加样回收率, 结果 PTX-OA 的平均加样回收率为 98.4%, RSD 为 1.63%。

2.3 PTX-OA/BJO CMNEs 处方工艺单因素考察

2.3.1 溶液的配制 分别精密称取一定量油酸、BJO、乳化剂, 用三氯甲烷溶解, 定容, 制成质量浓度分别为油酸 50.00 mg/mL、BJO 50.00 mg/mL、乳化剂 50.00 mg/mL 的溶液, 备用。

2.3.2 CMNEs 的制备

(1) PTX-OA/BJO CMNEs 的制备: 分别精密取 PTX-OA 对照品储备液 1 160 μ L, BJO 65 μ L, 油酸 65 μ L, 聚山梨酯-80 70 μ L 于试管内, 氮气吹干三氯甲烷, 残留的少量三氯甲烷于真空干燥箱内挥去。取出样品加入 1 mL 蒸馏水, 在超声时间为 3 s, 超声间隔 3 s, 超声总时间 2 min 的条件下进行乳化。

(2) PTX-OA CMNEs 的制备: 分别精密取 PTX-OA 储备液 1 160 μ L, 油酸 65 μ L, 聚山梨酯-80 70 μ L 于试管内, 其余操作同 PTX-OA/BJO CMNEs 的制备。

(3) BJO CMNEs 的制备: 分别精密取 BJO 65 μ L, 油酸 65 μ L, 聚山梨酯-80 70 μ L 于试管内, 其余操作同 PTX-OA/BJO CMNEs 的制备。

(4) 空白 CMNEs 的制备: 分别精密取油酸 130 μ L, 聚山梨酯-80 70 μ L 于试管内, 其余操作同 PTX-OA/BJO CMNEs 的制备。

2.3.3 乳化剂种类的选择 考察乳化剂 PEG-400、F-68、EL-40、聚山梨酯-80 对 PTX-OA/BJO CMNEs 平均粒径和 PDI 的影响。这 4 种乳化剂含有和油酸相同的链段或官能团。油酸作为油相, 乳化剂与油酸质量比为 1:9、2:8、3:7、4:6, 总取样量为 200 μ L。氮气吹干三氯甲烷, 残留的少量三氯甲烷于真空干燥箱内挥去。取出样品加入 1 mL 蒸馏水, 在超声时间为 3 s, 超声间隔 3 s, 功率 240 W, 超声总时间 3 min 的条件下进行乳化。

用激光粒度测定仪测定 PTX-OA/BJO CMNEs 平均粒径和多分散系数 (PDI)。结果见表 1。由表 1 可看出, 聚山梨酯-80 的乳化效果比其他的乳化剂要好, 在乳化剂与油酸质量比为 3:7 和 4:6 时, PDI 比其他乳化剂低, 粒径接近 100 nm, 故选聚山梨酯-80 为制备 BJO CMNEs 的乳化剂。

2.3.4 乳化剂与油相质量比考察 选定聚山梨酯-

表 1 不同乳化剂制备的 CMNEs 粒径和 PDI

Table 1 Particle size and PDI of CMNEs prepared with different emulsifiers

乳化剂与油酸 质量比	PEG-400		F-68		EL-40		聚山梨酯-80	
	粒径/nm	PDI	粒径/nm	PDI	粒径/nm	PDI	粒径/nm	PDI
1:9	202.9 $\pm$ 8.6	0.993 $\pm$ 0.051	225.8 $\pm$ 11.3	0.932 $\pm$ 0.043	223.4 $\pm$ 7.8	0.989 $\pm$ 0.010	352.8 $\pm$ 10.8	0.756 $\pm$ 0.043
2:8	199.9 $\pm$ 5.1	0.866 $\pm$ 0.036	195.9 $\pm$ 6.3	0.405 $\pm$ 0.032	222.9 $\pm$ 6.3	0.615 $\pm$ 0.052	293.7 $\pm$ 6.7	0.390 $\pm$ 0.029
3:7	177.9 $\pm$ 1.9	0.228 $\pm$ 0.020	208.1 $\pm$ 5.1	0.573 $\pm$ 0.021	222.2 $\pm$ 8.4	0.649 $\pm$ 0.050	123.8 $\pm$ 3.8	0.193 $\pm$ 0.018
4:6	198.7 $\pm$ 2.5	0.556 $\pm$ 0.015	207.3 $\pm$ 3.6	0.213 $\pm$ 0.020	194.0 $\pm$ 5.9	0.652 $\pm$ 0.033	102.0 $\pm$ 3.7	0.317 $\pm$ 0.015

80 为乳化剂, 油酸作为油相, 考察乳化剂与油酸质量比例对 PTX-OA/BJO CMNEs 平均粒径和 PDI 的影响。聚山梨酯-80 与油酸质量比为 2.5:7.5、3:7、3.5:6.5、4:6, 其余操作同“2.3.3”项下。平均粒径测定结果分别为 (150.1 $\pm$ 10.3)、(120.5 $\pm$ 4.6)、(99.6 $\pm$ 2.1)、(98.3 $\pm$ 4.2) nm, PDI 分别为 0.200 $\pm$ 0.047、0.193 $\pm$ 0.014、0.172 $\pm$ 0.033、0.217 $\pm$ 0.089。实验结果表明, 随着乳化剂用量的增加, PTX-OA/BJO CMNEs 平均粒径呈逐渐减小的趋势。当乳化剂与油相质量比超过 3.5:6.5 时粒径变化不明显。选择的比例为 3.5:6.5 而不是 4:6 是考虑到乳化剂有一定的毒性, 不利于后续的实验进行。而此时

3.5:6.5 的平均粒径已经为 99.6 nm, 达到了 CMNEs 的要求, 故选择此比例的油乳比。

2.3.5 不同油相质量浓度考察 选定聚山梨酯-80 为乳化剂, 油酸作为油相, 聚山梨酯-80 和油相的比例为 3.5:6.5, 考察油相质量浓度对 PTX-OA/BJO CMNEs 平均粒径和 PDI 的影响。其中油相的质量浓度分别为 1.08、3.25、6.50、9.75、13.00 mg/mL, 其余操作同“2.3.3”项下。平均粒径测定结果分别为 (90.6 $\pm$ 6.5)、(95.8 $\pm$ 2.8)、(107.8 $\pm$ 8.8)、(156.7 $\pm$ 12.8)、(203.9 $\pm$ 5.8) nm, PDI 分别为 0.273 $\pm$ 0.030、0.358 $\pm$ 0.048、0.217 $\pm$ 0.056、0.347 $\pm$ 0.014、0.534 $\pm$ 0.007。研究显示, PTX-OA/BJO

CMNEs 平均粒径随着油相质量浓度的增加而增大。只考察平均粒径和 PDI, 1.08 mg/mL 的结果较好, 但考虑到载药量, 应该选择 6.50 mg/mL。理论上, 油相质量浓度与载药量呈正比关系。在符合条件的情况下, 选择 6.50 mg/mL 的油相质量浓度可以减少制剂的服用量。

2.3.6 油相中油酸、BJO 不同质量比考察 选定聚山梨酯-80 为乳化剂, 聚山梨酯-80 和油相的质量比为 3.5 : 6.5, 考察 BJO 的用量对 PTX-OA/BJO CMNEs 平均粒径和 PDI 的影响。油相中油酸与 BJO 质量比为 1 : 0、2 : 1、1 : 1、1 : 2、0 : 1, 其余操作同“2.3.3”项下。粒径测定结果分别为(95.2±3.1)、(86.4±3.6)、(90.2±2.5)、(82.9±4.7)、(121.3±6.0) nm, PDI 分别为 0.388±0.019、0.417±0.038、0.440±0.031、0.555±0.030、0.501±0.092。油酸与 BJO 质量比在低于 1 : 2 时, 平均粒径均小于 100 nm, PDI 随着 BJO 用量增加而增大。在含有油酸的条件下, 随着 BJO 的用量上升, PTX-OA/BJO CMNEs 平均粒径减小。1 : 2 比例的平均粒径最小, 但 PDI 比 1 : 1 比例的大。1 : 1 比例的平均粒径接近 1 : 2 比例的。综上所述, 选择油酸与 BJO 为 1 : 1 的比例较合适。

2.3.7 不同超声间隔考察 选定聚山梨酯-80 为乳化剂, 聚山梨酯-80 和油相的比例为 3.5 : 6.5, 油相质量浓度为 6.50 mg/mL, 油相中油酸、BJO 质量比为 1 : 1, 考察超声间隔对 PTX-OA/BJO CMNEs 平均粒径和 PDI 的影响。超声间隔设为 3 s 和 1 s, 其余操作同“2.3.3”项下。结果超声间隔 3 s 和 1 s 平均粒径分别为(107.3±3.7)、(110.1±1.3) nm, PDI 分别为 0.346±0.018、0.341±0.038。超声间隔对粒径和 PDI 影响不大。

2.3.8 超声时间考察 选定聚山梨酯-80 为乳化剂, 聚山梨酯-80 和油相的比例为 3.5 : 6.5, 油相质量浓度为 6.50 mg/mL, 油相中油酸与 BJO 质量比为 1 : 1, 超声间隔为 3 s, 考察超声时间对 PTX-OA/BJO CMNEs 平均粒径和 PDI 的影响。超声时间分别设为 1、2、3 min, 其余操作同“2.3.3”项下。结果粒径分别为(117.3±7.1)、(106.4±2.8)、(116.5±8.9) nm, PDI 分别为 0.251±0.008、0.233±0.015、0.269±0.015。粒径较小的超声时间是 2 min。

2.3.9 超声功率考察 选定聚山梨酯-80 为乳化剂, 聚山梨酯-80 和油相质量比为 3.5 : 6.5, 油相质量浓度为 6.50 mg/mL, 油相中油酸与 BJO 质量比为 1 :

1, 超声间隔为 3 s, 超声时间为 2 min, 考察超声功率对 PTX-OA/BJO CMNEs 平均粒径和 PDI 的影响。超声功率设为 240、210、180、150、120、90 W, 其余操作同“2.3.3”项下。结果平均粒径分别为(127.8±4.1)、(114.7±7.3)、(111.4±2.4)、(111.6±4.5)、(104.6±2.7)、(107.9±1.6) nm, PDI 分别为 0.238±0.024、0.227±0.021、0.211±0.002、0.211±0.052、0.248±0.013、0.290±0.039。结果表明, 240~120 W 时 PTX-OA/BJO CMNEs 平均粒径呈逐渐减小的趋势, 但功率低于 120 W 时粒径开始增大。

2.4 正交实验优选 PTX-OA/BJO CMNEs 处方

2.4.1 正交试验设计与结果 根据之前单因素考察的结果, 选出对 PTX-OA/BJO CMNEs 平均粒径和 PDI 影响最大的 3 个因素, 分别是油相质量浓度(A, 油酸作为油相)、聚山梨酯-80-油相质量比(B)、超声功率(C)。采用 3 因素 4 水平正交设计表^[21]安排实验(表 2), 按各水平取相应的油相、聚山梨酯-80 于对应试管内, 其余操作和“2.3.3”项下步骤相同, 由于粒径与 PDI 值为非正相关, 故只以平均粒径为评价指标。方差分析见表 3。

对考察指标进行直观分析及方差分析, 结果显示 3 个影响因素中对 PTX-OA/BJO CMNEs 平均粒径的影响大小顺序为 B>A>C。方差分析(表 3)表明, 因素 A 和 B 对平均粒径均具有显著性影响, 其中因素 B 对平均粒径的影响极显著($P<0.01$)。结合预试验的结果, 确定最佳制备工艺为 A₁B₄C₃, 即油相质量浓度为 3.25 mg/mL, 聚山梨酯-80-油相质量比为 4 : 6, 超声功率为 150 W。

2.4.2 最优处方的验证 根据最优条件(油相质量浓度为 3.25 mg/mL, 聚山梨酯-80-油相质量比为 4 : 6, 超声功率为 150 W)制备空白 CMNEs 和 PTX-OA/BJO CMNEs, 测定包封率。

各取 100 μL CMNEs 同时加入 400 μL 蒸馏水进行稀释, 混合均匀后取 100 μL 于 EP 管中, 加入 900 μL 甲醇超声破乳 5 min, 滤过, 进液相色谱测定, 测得质量浓度标记为 C₁。剩下的 CMNEs 在 4 000 r/min 条件下离心 5 min, 均匀取上清液 100 μL 于另外 EP 管中, 加入 900 μL 甲醇超声破乳 5 min, 滤过, 进液相色谱仪测定, 测得质量浓度标记为 C₂。另取上清液 100 μL 在 10 000 r/min 条件下超滤离心 20 min, 进液相色谱仪测定, 测得质量浓度标记为 C₃。根据标准曲线算出最终质量浓度, 按照公式包封率=(C₂-C₃)/C₁ 计算包封率结果, 其中 C₂ 为除

表 2 正交试验设计与结果

Table 2 Design and results of orthogonal test

试验号	A/(mg·mL ⁻¹)	B	C/W	空白 1	空白 2	平均粒径/nm
1	3.25 (1)	2.5 : 7.5 (1)	90 (1)	(1)	(1)	149.7±5.6
2	3.25 (1)	3 : 7 (2)	120 (2)	(2)	(2)	125.5±3.5
3	3.25 (1)	3.5 : 6.5 (3)	150 (3)	(3)	(3)	95.8±5.0
4	3.25 (1)	4 : 6 (4)	180 (4)	(4)	(4)	90.9±3.2
5	6.50 (2)	2.5 : 7.5 (1)	120 (2)	(3)	(4)	166.1±2.1
6	6.50 (2)	3 : 7 (2)	90 (1)	(4)	(3)	134.0±3.6
7	6.50 (2)	3.5 : 6.5 (3)	180 (4)	(1)	(2)	107.8±5.0
8	6.50 (2)	4 : 6 (4)	150 (3)	(2)	(1)	98.3±2.3
9	9.75 (3)	2.5 : 7.5 (1)	150 (3)	(4)	(2)	162.4±3.7
10	9.75 (3)	3 : 7 (2)	180 (4)	(3)	(1)	142.2±1.5
11	9.75 (3)	3.5 : 6.5 (3)	90 (1)	(2)	(4)	128.7±3.6
12	9.75 (3)	4 : 6 (4)	120 (2)	(1)	(3)	126.0±4.3
13	13.00 (4)	2.5 : 7.5 (1)	180 (4)	(2)	(3)	162.9±7.3
14	13.00 (4)	3 : 7 (2)	150 (3)	(1)	(4)	143.2±4.5
15	13.00 (4)	3.5 : 6.5 (3)	120 (2)	(4)	(1)	147.9±5.1
16	13.00 (4)	4 : 6 (4)	90 (1)	(3)	(2)	143.9±3.6
<i>K</i> ₁	461.9	641.1	556.3	526.7	538.1	
<i>K</i> ₂	506.2	544.9	565.5	515.4	539.6	
<i>K</i> ₃	559.3	480.2	499.7	548.0	518.7	
<i>K</i> ₄	597.9	459.1	503.8	535.2	528.9	
<i>R</i>	136.0	182.0	65.8	32.6	20.9	

表 3 方差分析

Table 3 Analysis of variance

方差来源	偏差平方和	自由度	<i>F</i> 值	显著性
A	2 666.482	3	25.164	<i>P</i> <0.05
B	5 016.262	3	47.339	<i>P</i> <0.01
C	887.362	3	8.374	
空白 1	142.017	3		
空白 2	69.912	3		
误差	211.929	6		

$$F_{0.05}(3, 3) = 9.28 \quad F_{0.01}(3, 3) = 29.50$$

去水中游离药物后的质量浓度, *C*₃ 为溶于水的药物质量浓度。

结果表明, 空白 CMNEs 平均粒径为 (74.0±4.1)nm, PDI 是 0.375±0.032; PTX-OA/BJO CMNEs 平均粒径为 (148.9±9.3) nm, PDI 是 0.545±0.098, 包封率为 (89.4±1.7) %。

正交最优处方试验结果显示, 制备的 CMNEs 平均粒径在 150 nm 左右, 包封率偏小而平均粒径

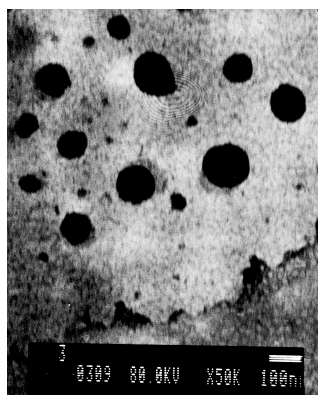
和 PDI 偏大, 粒径不均一, 正交最优处方结果不理想。尝试采用单因素中优选的处方条件与之对比, 即油相质量浓度为 6.50 mg/mL, 聚山梨酯-80-油酸质量比为 3.5 : 6.5, 功率为 120 W。结果表明空白乳粒径为 (82.9±5.1) nm, PDI 是 0.375±0.024, PTX-OA/BJO CMNEs 粒径为 (108.7±2.3) nm, PDI 是 0.232±0.038, 包封率为 (100.6±1.9) %。由结果可知, 最优处方是油酸质量浓度为 6.50 mg/mL, 聚山梨酯-80-油相质量比为 3.5 : 6.5, 功率为 120 W, 选此处方进行后续实验。

2.5 形态观察

取适量 PTX-OA/BJO CMNEs 滴于铜网上, 静置 10 min 后用滤纸片吸干, 再滴加 2.0%磷钨酸溶液于铜网上负染 5 min, 自然挥干, 用透射电子显微镜 (TEM) 观察 PTX-OA/BJO CMNEs 形态。结果见图 3。如图 3 可见, PTX-OA/BJO CMNEs 粒径约为 100 nm, 粒度较均一。

2.6 体外释放度

以 0.2 mol/L 水杨酸钠-4% SDS-PBS (pH 7.4)

图 3 PTX-OA/BJO CMNEs 的 TEM 图 ($\times 50\,000$)Fig. 3 TEM of PTX-OA/BJO CMNEs ($\times 50\,000$)

为释放介质^[22]。用透析袋法进行试验,预处理后的透析袋(截留相对分子质量 5 000)装入 0.5 mL PTX-OA/BJO CMNEs 溶液置于 150 mL 释放介质中,转速 100 r/min,温度 37 ℃,分别于 0、1、2、3、5、8、12、24、36、48 h 取 2 mL 样品,同时补充同体积的等温释放介质,样品溶液经 0.22 μm 微孔滤膜滤过后,取续滤液测定,计算 PTX-OA/BJO CMNEs 在不同时间的累积释放率。结果见图 4。由图 4 可看出,CMNEs 在释药 2 h 后累积释放率接近 20%,48 h 累积释放率为 67%,表明 CMNEs 具有缓释功能。体外释放度试验的测量时间在 48 h 后,测得的浓度呈下降趋势,可能是因为 PTX-OA 在水中发生了降解。故没有 48 h 后时间点的累积释放率。

2.7 稳定性实验

2.7.1 高温稳定性实验 按“2.4.2”项下最优处方制备得到的 PTX-OA/BJO CMNEs 在 40 ℃条件下存放 10 d,分别于第 0、5、10 天取样测定其平均粒径、PDI 和包封率。结果见表 4。结果说明 CMNEs 在 40 ℃条件下稳定性差。40 ℃避光条件下保存 10 d,CMNEs 粒径基本保持不变,但包封率的变化较明显,RSD 值为 7.1%,原因可能是 PTX-OA 在高温下分解了。此后可以对 PTX-OA 的结构或处方进

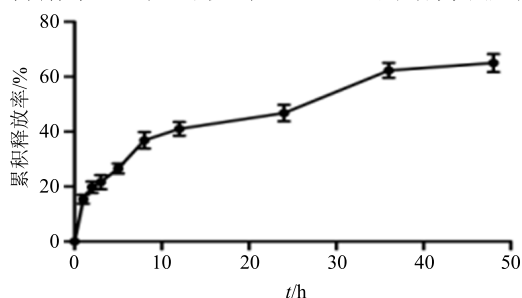


图 4 PTX-OA/BJO CMNEs 体外释放度曲线

Fig. 4 Drug release of PTX-OA/BJO CMNEs

表 4 PTX-OA/BJO CMNEs 高温稳定性试验中粒径和 PDI 的变化

Table 4 Particle size and PDI of PTX-OA/BJO CMNEs about thimble test

时间/d	粒径/nm	PDI	包封率/%
0	106.9 $\pm$ 4.3	0.275 $\pm$ 0.032	102.8 $\pm$ 1.8
5	105.9 $\pm$ 5.1	0.319 $\pm$ 0.033	104.0 $\pm$ 1.2
10	109.6 $\pm$ 4.8	0.451 $\pm$ 0.091	91.3 $\pm$ 2.7

一步研究以提升高温稳定性。同时也提示,现阶段制备好的 CMNEs 须置于冷藏室避光保存。

2.7.2 长期稳定性实验 按“2.4.2”项下最优处方制备得到的 PTX-OA/BJO CMNEs 在 4 ℃冰箱长期避光存放,分别于第 1、7、14、21、28、60 天取样测定平均粒径、PDI 和包封率。结果见表 5。

表 5 PTX-OA/BJO CMNEs 长期稳定性试验中粒径和 PDI 的变化

Table 5 Particle size and PDI of PTX-OA/BJO CMNEs about long-time stability

时间/d	粒径/nm	PDI	包封率/%
1	108.7 $\pm$ 3.3	0.232 $\pm$ 0.023	100.6 $\pm$ 1.1
7	108.1 $\pm$ 2.5	0.263 $\pm$ 0.026	103.5 $\pm$ 1.6
14	109.1 $\pm$ 3.6	0.395 $\pm$ 0.025	97.5 $\pm$ 2.8
21	105.0 $\pm$ 4.3	0.370 $\pm$ 0.065	99.1 $\pm$ 0.8
28	108.8 $\pm$ 3.3	0.368 $\pm$ 0.035	99.7 $\pm$ 1.1
60	121.4 $\pm$ 6.5	0.462 $\pm$ 0.045	101.6 $\pm$ 2.0

稳定性实验结果表明 PTX-OA/BJO CMNEs 在 4 ℃避光环境下保存 60 d 稳定性较好。

2.8 体外细胞毒实验

将培养瓶中对数生长期的 HepG-2 细胞转移到 96 孔细胞培养板中,每孔加细胞液 200 μL ,细胞数约 5×10^3 个,37 ℃、5% CO_2 条件下继续培养 24 h。分别设 PTX-OA/BJO CMNEs 组、PTX-OA CMNEs 组、BJO CMNEs 组、空白 CMNEs 组,然后将药物分别加入实验孔中,每种药物设浓度为 5、50、100、250、1 000 nmol/L,每组设 6 个复孔,另设不加药的正常细胞为阴性对照组。继续培养 24、48 h,每孔加入 20 μL MTT,孵育 4 h 后,弃去上清,再加入 160 μL DMSO 振荡 10 min,按常规方法用酶标仪在 570 nm 处测吸光度 (A) 值,计算细胞生长抑制率,结果见表 6。

$$\text{细胞生长抑制率} = (A_{\text{阴性对照}} - A_{\text{药物}}) / A_{\text{阴性对照}}$$

采用 GraphPad Prism 5 软件作图,PTX-OA/BJO

表 6 各 CMNEs 作用 24 h 和 48 h 的细胞生长抑制率
Table 6 Inhibitory rates of CMNEs with 24 h and 48 h

组别	作用时间/h	细胞生长抑制率/%				
		5 nmol·L ⁻¹	50 nmol·L ⁻¹	100 nmol·L ⁻¹	250 nmol·L ⁻¹	1 000 nmol·L ⁻¹
PTX-OA/BJO CMNEs	24	0.2±1.5	11.6±2.1**	36.0±2.1*	58.4±3.6*	62.7±3.2
	48	11.7±2.1**	16.0±2.6**	54.0±2.8**	75.5±1.1	75.8±3.1
PTX-OA CMNEs	24	3.5±0.9	2.1±1.0	23.5±3.2	47.4±2.9	63.5±4.6
	48	0.8±0.65	3.9±1.3	36.2±2.2	76.8±3.0	78.0±4.3
BJO CMNEs	24	0.0±2.0	2.1±1.3	1.9±0.8	11.3±2.2	28.7±2.9
	48	1.2±2.0	2.5±1.9	2.3±2.3	3.0±2.6	15.7±4.0
空白 CMNEs	24	1.6±1.4	2.3±0.7	2.3±1.1	5.0±3.0	6.7±2.3
	48	1.3±2.1	1.8±3.0	2.1±1.3	3.6±1.8	8.8±3.6

与 PTX-OA CMNEs 组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs PTX-OA CMNEs group

CMNEs 组和 PTX-OA CMNEs 组在低浓度范围内 (5~100 nmol/L) 的抑制率存在显著性差异。24 h 50 nmol/L 实验结果中, PTX-OA/BJO CMNEs 组抑制率为 11.6%, PTX-OA CMNEs 组为 2.1%, 2 组抑制率存在明显差异 ($P<0.01$)。48 h 的实验结果显示, 在浓度低于 100 nmol/L 时 2 组抑制率差异有明显统计学意义 ($P<0.01$)。实验结果表明 BJO 与 PTX-OA 的联用对细胞生长的抑制具有一定的协同作用。

3 讨论

化疗能直接杀伤或抑制肿瘤细胞, 在解决癌症致病方面具有明显优势, 但受限于骨髓抑制、神经毒性等毒副作用和不良反应^[23-24]。中药能发挥扶正的治疗效果, 减少化疗的副作用, 增强化疗疗效和机体免疫功能。同时, 中药分子的多样性显示了其多靶点、多环节效应的特性。因此, 在肿瘤治疗中中药与化疗药联用可以发挥优势互补作用^[25-26]。

纳米乳给药系统在中药领域的使用尚处于初级阶段, 大多为单一有效成分的研究^[27]。但由于药物与油相相容性不理想, 传统纳米乳普遍存在载药量低、稳定性差的问题。本研究使用的 CMT 技术能提高二者相容性以及药物在油相的溶解度和稳定性。将 PTX-OA 与 BJO 联用制备成 CMNEs, 提高了药物的稳定性, PTX-OA/BJO CMNEs 缓慢释放, 能避免剂量的峰谷现象, 收获减毒增效的功效。研究采用单因素考察和正交试验对制备处方和工艺进行优化, 体外评价结果良好。

体外的细胞毒性结果显示, PTX-OA/BJO CMNEs 具有增强药效的作用, 但这些还是比较初步的研究。接下来还需要进一步研究细胞周期、凋

亡和体内实验以探索协同作用对肿瘤细胞的影响及药动学变化。

参考文献

- [1] Wu Z, Jiang Q, Clarke P R, *et al.* Phosphorylation of Crml by CDK1-cyclin B promotes Ran-dependent mitotic spindle assembly [J]. *J Cell Sci*, 2013, 126(15): 3417-3428.
- [2] Kuo T C, Lu H P, Chao C C K. The tyrosine kinase inhibitor sorafenib sensitizes hepatocellular carcinoma cells to taxol by suppressing the HURP protein [J]. *Biochem Pharmacol*, 2011, 82(2): 184-194.
- [3] Caceres G, Robey R W, Sokol L, *et al.* HG-829 is a potent noncompetitive inhibitor of the ATP-binding cassette multidrug resistance transporter ABCB1 [J]. *Cancer Res*, 2012, 72(16): 4204-4213.
- [4] 梁倩影, 彭大为. 复方苦参注射液联合紫杉醇与顺铂治疗晚期卵巢癌的临床疗效 [J]. *实用肿瘤杂志*, 2015, 30(5): 465-468.
- [5] 陈坤成, 冯思良, 刘克良. 紫杉烷类抗肿瘤药物临床研究进展 [J]. *国际药学研究杂志*, 2013, 3(40): 271-276.
- [6] Li W, Tang Y X, Wan L, *et al.* Effects of combining taxol and cyclooxygenase inhibitors on the angiogenesis and apoptosis in human ovarian cancer xenografts [J]. *Oncol Lett*, 2013, 5(3): 923-928.
- [7] 聂华, 梁香, 赵莹, 等. 酶促构建葡萄糖修饰靶向载紫杉醇脂质体制备处方及其工艺优化 [J]. *中草药*, 2016, 47(11): 1867-1874.
- [8] 魏丽莎. 紫杉醇纳米晶体的制备及抗肿瘤研究 [D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2014.
- [9] 张琳华, 何颖娜, 马桂蕾, 等. 叶酸靶向紫杉醇聚合物纳米囊泡的制备及其抗肿瘤活性研究 [J]. *中国药理学*

- 志, 2010, 45(22): 1742-1748.
- [10] 韩 静, 李 智, 岑 琴, 等. 紫杉醇固体脂质纳米粒的制备和质量评价 [J]. 中草药, 2008, 39(7): 996-999.
- [11] 刘 丹, 韩 飞, 李 伟, 等. GC法同时测定鸦胆子油中4种脂肪酸的含量 [J]. 沈阳药科大学学报, 2011, 11(28): 882-885.
- [12] 李福星. 鸦胆子脂溶性活性成分的研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2006.
- [13] 陈 钢, 张 晓, 卢 刚, 等. 鸦胆子油微囊-原位凝胶的制备及体外释药机制的研究 [J]. 中草药, 2012, 43(7): 1306-1309.
- [14] 张晓娇, 王雪莲, 赵 峰, 等. 鸦胆子油乳抑制肺癌NCI-H460细胞的增殖及其机制 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2011, 18(5): 519-523.
- [15] 陈 琳, 吴欢欢, 黄小丽, 等. 鸦胆子油交联环糊精包合物的制备及其急性毒性研究 [J]. 中草药, 2016, 47(16): 2843-2849.
- [16] 李滨萍, 林 曦, 廖嘉仪, 等. 鸦胆子油乳治疗H22肝癌荷瘤小鼠的时辰药理学研究 [J]. 广州中医药大学学报, 2015, 1(32): 111-115.
- [17] 陆景峰, 陈亚楠. 鸦胆子油乳注射液联合同步放化疗治疗中晚期食管癌临床观察 [J]. 实用中医药杂志, 2012, 28(9): 753.
- [18] 季春莲, 谢月英, 孙大兴. 鸦胆子油乳剂逆转K562/ADM细胞多药耐药的作用和机制 [J]. 浙江中医杂志, 2010, 45(6): 458-459.
- [19] 汤 涛, 蒙凌华, 陈陵际, 等. 鸦胆子油乳具有多药耐药逆转和拓扑异构酶 II 抑制作用 [J]. 中国药理学通报, 2001, 17(5): 534-539.
- [20] Ma Y, Liu D, Wang D, *et al.* Combinational delivery of hydrophobic and hydrophilic anticancer drugs in single nanoemulsions to treat MDR in cancer [J]. *Pharmaceutics*, 2014, 11(8): 2623-2630.
- [21] 滕海英, 祝国强, 黄 平, 等. 正交试验设计实例分析 [J]. 药学服务与研究, 2008, 8(1): 75-76.
- [22] 姚 瑶, 周 卫, 丁逸梅. 固相萃取-高效液相色谱法测定紫杉醇脂质纳米粒体外释放度 [J]. 中国药房, 2012, 23(7): 608-610.
- [23] 李荣荣, 憨 镔, 陈 晨, 等. 紫杉醇致周围神经毒性研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2014, 16(6): 88-90.
- [24] 杨晓燕. 化疗所致外周神经毒性中西医研究进展 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2013.
- [25] 冯永嘉. 中药联合化疗治疗恶性淋巴瘤的 Meta 分析 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2016.
- [26] 李京华. 中药防治化疗药草酸铂的周围神经毒性的临床观察 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2008.
- [27] 李文华, 王英姿, 骆声秀, 等. 苦参总碱纳米乳和苦参总碱纳米乳凝胶的透皮机制研究 [J]. 中草药, 2017, 48(3): 484-489.