

莪术油明胶微球用于肝动脉栓塞

邓 嵘¹, 陈济民^{1*}, 姚崇舜¹, 吴万垠²

(1. 沈阳药科大学药剂教研室, 辽宁 沈阳 110015; 2. 广东省中医院中心实验室, 广东 广州 510020)

摘要: 目的 制备符合肝动脉栓塞要求的莪术油明胶微球(ZT-GMS)。方法 用正交设计优化了微球的制备工艺, 对微球的制备工艺、粉体学性质、体外释药、初步稳定性和初步药效进行了研究。结果 球径在 40~160 μm 的微球占 97.16%, 平均产率为 89.73%, 平均含药量为 2.13%, 平均包封率为 19.36% (均以莪术醇计)。体外释药 12 h 达 80%, 符合一级动力学模型, 释药机理为溶蚀加扩散。稳定性考察实验结果表明其稳定性较好。肝动脉栓塞荷瘤大鼠实验结果表明大鼠平均生存率显著延长 ($P < 0.01$), 肿瘤体积显著减小 ($P < 0.01$)。结论 微球的制备工艺及粒径分布较好, 体外释药有明显的缓释作用, 有一定疗效。

关键词: 莪术油; 明胶微球; 肝动脉栓塞; 体外释药; 药效

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2000)07-0539-05

近年来, 肝动脉栓塞治疗肝癌已成为不能手术的肝癌患者的首选疗法。微球作为栓塞载体, 由于其特有的性质, 目前研究较多, 但都局限于单一的化疗药物。莪术为我国传统中药莪术的根茎, 有止血、化瘀等作用, 莪术油为从其根茎中提取的有效成分, 已有报道^[1]有抗癌活性, 临床上局部瘤体注射莪术油, 治疗宫颈癌, 已取得显著疗效。作者将莪术油制备成肝动脉栓塞用明胶微球, 治疗肝癌, 国内外尚未见报道。

实验部分

仪器 精密电动搅拌器(广州市富城科教仪器厂); HHS-11.2 型电热恒温水浴锅(上海医疗器械三厂); 80-2 型离心沉淀机(上海手术器械厂); YHK-II 型液体快速混合器(江西医疗器械厂); Olympus 光学显微镜(日本), Armary-1000 B 扫描电子显微镜(中科院科学研制中心); Waters 真空泵(美国); 100 目、300 目标准筛(辽阳金属制品厂); LDB-M 蠕动泵(浙江象山定山仪器厂); HL-3 恒流泵(上海市沪西仪器厂); 78 H W-1 型恒温磁力搅拌

器(杭州仪表电机厂); 岛津 GC-9A 气相色谱仪(日本); 岛津 CR-3A 数据处理仪(日本)。

试剂 莪术油(浙江瑞安制药厂); 碱法明胶(生化试剂, 沈阳化学试剂厂); 其他试剂均为市售分析纯。

动物 ♂ Wistar 荷瘤大鼠(上海医药工业研究院)。

1 莪术油明胶微球(ZT-GMS)制备工艺的优选

ZT-GMS 的制备工艺以乳化交联法为基础, 即以莪术油的明胶初乳为分散相, 液体石蜡为连续相, 加入乳化剂, 电动搅拌制得复乳, 甲醛交联固化, 异丙醇脱水。对 4 因素、两水平, 并考虑交互作用, 用 $L_8(2^7)$ 进行正交设计, 正交设计因素与水平见表 1, 正交设计安排与结果见表 2。

Tab 1 Factors and levels of orthogonal design

Factor	A	B	C	D
	Stirring rate/ $r \cdot \text{min}^{-1}$	Emulsifying time/ min	Gelatin solution concentration / %	Ratio of water phase to oil phase
Level 1	400(A1)	10(B1)	20(C1)	4:1(D1)
Level 2	500(A2)	15(B2)	25(C2)	6:1(D2)

对不同处方制得的微球的含药量($S_1 = \text{含药量} \times 10000$)及载体收得率($S_2 = \text{载体收得率} \times 100$)进行综合评分, 使结果数字化, 从表 2 可看出各因素对指标影响大小的次序是: $A > B \times C > A \times B > A \times C > B, D > C$ 。

收稿日期: 1999-10-08

基金项目: 国家中医药局九五课题资助项目(96-906-07-04)

* 联系人 Tel: (024) 23843711 - 3536, Fax: (024) 23896576,

E-mail: Chen-jm@hotmail.com

Tab 2 Design and results of orthogonal design

	A	B	A×B	C	A×C	B×C	D	S1	S2	S(S1 + S2 - 200)
1	1	1	1	1	1	1	1	161	42	3
2	1	1	1	2	2	2	2	130	47	-23
3	1	2	2	1	1	2	2	137	46.5	-16.5
4	1	2	2	2	2	1	1	153	74.5	27.5
5	2	1	2	1	2	2	2	184	78.5	62.5
6	2	1	2	2	1	1	1	119	54.5	26.5
7	2	2	1	1	2	1	1	151	61	12
8	2	2	1	2	1	2	2	131	85	16
K1	-9	69	8	61	29	109	69			
K2	117	39	100	47	79	-1	39			
k1	-4.5	34.5	4	30.5	14.5	54.5	34.5			
k2	58.5	19.5	50	23.5	39.5	-0.5	19.5			
Δk	63	15	46	7	25	55	15			

K1, K2 are the sum score of level 1, level 2 for the different factors; k1, k2 are the average sum score of level 1, level 2 for the different factors; Δk is the difference between the average sum score of level 1, level 2 for the different factors

其中 A, B, C 和 D 因素各选取 A2, B1, C1 和 D1 水平, 综合考虑各因素得最佳工艺条件为: 转速 500 r·min⁻¹, 乳化时间 10 min, 明胶质量浓度为 25%, 油水相比为 4:1。确定其制备工艺: 在不断搅拌下 (500 r·min⁻¹), 将初乳 (25% 明胶溶液 10 mL, 莪术油 2.5 mL, 大豆磷脂 0.05 g), 加入 60℃ 的液状石蜡 40 mL 中 (内含 1% span 80), 乳化 10 min 后, 将整个系统置于 (0~5)℃ 冰浴中, 继续搅拌 (500 r·min⁻¹), 待明胶胶凝完全, 约 1 h 后, 加入甲醛 2.5 mL 固化 1 h, 再加入 (0~5)℃ 异丙醇 40 mL, 脱水 5 min, 抽滤, 依次用异丙醇 (0~5)℃、石油醚洗涤, 干燥, 筛分, 即得微球。按最佳工艺制备 3 批微球, 平均产率为 89.73%。

2 ZT-GMS 的一些性质

在光学显微镜下, 用测微尺目测 ZT-GMS 的球径大小与分布 (n=3), 每批不少于 500 个。大部分微球分布在 40~160 μm, 占 97.15%, 其中 70~100 μm 占 60.15%, 平均算术径 d_{av} 为 85.41 μm, 平均体积径 d_v 为 91.33 μm。采用量筒法测定堆密度为 0.7480 g·mL⁻¹; 固定漏斗法测定休止角为 32.87°; 固体粉末法测定吸湿平衡值为 70%; 微观电泳测定微球表面带负电荷, ξ 电位为 27.36 mV。

3 体外释药实验

莪术油含有多种成分, 作者以其主要有效成分莪术醇考察其体外释放行为, 莪术醇既无紫外吸收也无荧光吸收, 采用气相色谱法进行定量。

气相色谱条件 玻璃柱: 1 m×5 mm ID; 固定相: PEG 20 M; 担体: Shimalite W (NAW)(101), 60

~80 目; 氮气流速: 55 mL·min⁻¹; 空气流速: 500 mL·min⁻¹; 氢气流速: 50 mL·min⁻¹; 柱温: 165℃; 气化室温度: 220℃; 检测器: FID; 量程范围: 10²; 记录器灵敏度: 2⁰; 纸速: 1 mm·min⁻¹。

标准曲线的建立 精密称定莪术醇, 配制系列浓度的溶液, 加入内标液 (100 μg·mL⁻¹ 十六醇石油醚溶液), 按释放度测定方法处理, 进样, 以莪术醇与内标峰面积比值 $Y(A_s/A_i)$ 对相应的莪术醇浓度 $X(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$ 进行回归处理, 得回归方程 $Y = 0.0103 X - 0.0248, r = 0.9998 (n = 6)$ 。结果表明, 莪术醇在 4~160 μg·mL⁻¹ 线性关系良好。日内与日间 RSD 小于 5%, 平均加样回收率大于 95%, 平均萃取回收率大于 90%。

释放度测定方法 用自制释药装置 (图 1) 对微球的体外释放进行考察。释放管为带夹套的玻璃柱, 夹套内充满 37℃ 的恒温水, 恒温水由恒流泵供给。精密称定微球 100 mg 置于玻璃柱内的 0.8 μm 微孔滤膜上, 释放介质通过蠕动泵以一定流速进入玻璃柱, 浸泡样品, 释放出的药物用接收管分次收集, 取释放介质 0.5 mL, 加入内标液 0.5 mL, 在液体快速混合器上剧烈振荡 5 min, 离心 5 min (3 000 r·min⁻¹), 置冰箱冷冻, 取上层有机相 2 μL 进样, 按上述测定方法进行测定, 得莪术醇与内标峰面积比值, 代入标准曲线方程计算释药量和累积释放百分率, 12 h 累积释放百分率达 80%。释药规律符合一级动力学模型: $\ln(100 - Q) = -0.2182 t + 4.5913, 0 \leq t \leq 12, r = 0.9916 (n = 3)$ 。释药前后的电镜图见图 2, 3。

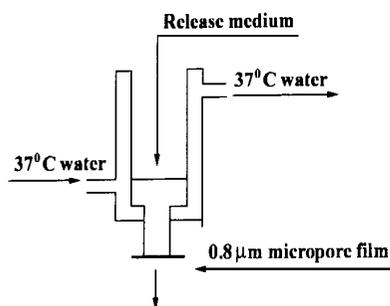
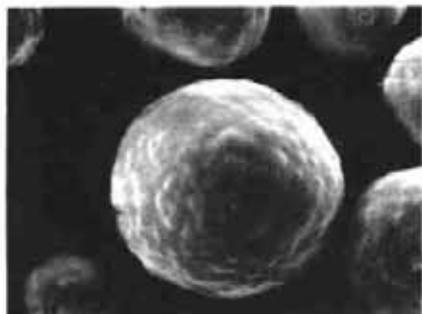


Fig 1 Apparatus of drug release

Fig 2 Scanning electronic micrograph of zedoary turmeric oil gelatin microspheres (ZT-GMS) before drug release ($\times 500$)Fig 3 Scanning electronic micrograph of ZT-GMS after drug release ($\times 500$)

由图 2 和图 3 可知释药机理为溶蚀加扩散。

4 ZT-GMS 含量测定

用气相色谱法对莪术油中的主要成分莪术醇进行测定。气相色谱条件同前。精密称取微球 20 mg

于 10 mL 具塞试管中,加水 0.2 mL,置于 80 °C 水浴中,放置 3 h,取出,加内标液($100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 十六醇乙醇溶液) 5 mL,置液体快速混合器上剧烈振荡 15 min,离心 15 min ($3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$),取上清液 2 μL 进样,得莪术醇与内标峰面积比值,代入标准曲线方程计算含药量。测定 3 批微球,平均含药量为 $2.13\% \pm 1.56\%$,平均包封率为 $19.36\% \pm 1.78\%$ (均以莪术醇计, $n=3$)。

5 ZT-GMS 的稳定性考察

将 ZT-GMS 密封于 2 mL 安瓿内,分别置冰箱 ($4 \text{ }^\circ\text{C}$)、室温与 $40 \text{ }^\circ\text{C}$ RH75% 条件下,每月检查其外观、流动性、粒径分布、含药量(表 3)及体外释药(表 4),3 个月内几乎无变化。

Tab 3 Drug content of ZT-GMS in stability test ($\bar{x} \pm s$)

Condition	Compared with the drug content before test / %		
	1 month	2 months	3 months
$4 \text{ }^\circ\text{C}$	98.7 ± 1.6	99.5 ± 2.0	101.5 ± 1.3
Room temperature	99.0 ± 0.1	100.0 ± 1.1	99.0 ± 1.5
$40 \text{ }^\circ\text{C}$ RH 75 %	99.9 ± 1.0	98.0 ± 1.2	99.0 ± 1.4

Tab 4 Release data of ZT-GMS in stability test after 3 months (%)

Condition	2 h	4 h	6 h	8 h	12 h
0 month	29.86	54.76	81.24	89.60	95.15
$4 \text{ }^\circ\text{C}$	28.76	52.65	81.40	90.00	99.49
Room temperature	29.58	53.58	80.84	91.86	94.23
$40 \text{ }^\circ\text{C}$ RH 75 %	28.51	51.89	79.94	87.77	98.56

6 ZT-GMS 的药效学实验

将荷瘤 Wistar 大鼠, δ , 50 只,随机分成 5 组,肝动脉分别灌注生理盐水(I, $0.2 \sim 0.3 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$), 莪术油(II, $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 空白微球(III, $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 低剂量莪术油明胶微球(IV, $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 高剂量莪术油明胶微球(V, $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 结果(表 5, 6)表明大鼠平均肿瘤生长抑制率为 94.5%, 平均生命延长率为 117.9%, 与对照组相比,能显著性抑制肿瘤生长 ($P < 0.01$) 和延长大鼠生存时间 ($P < 0.01$)。

Tab 5 The volume and average grow rate of tumor after arterial infusion (n = 10 , $\bar{x} \pm s$)

Group	Tumor volume / cm^3		P^a	Tumor growth rate/ %	Percent growth inhibition/ %	P^b
	Before infusion	After infusion				
I	0.059 ± 0.022	1.01 ± 0.47	< 0.01	22.43 ± 17.80	-	-
II	0.065 ± 0.020	0.67 ± 0.16	< 0.01	10.79 ± 4.47	51.87	< 0.1
III	0.065 ± 0.020	0.72 ± 0.15	< 0.01	11.52 ± 3.94	48.64	< 0.1
IV	0.079 ± 0.022	0.36 ± 0.08	< 0.01	4.85 ± 1.47	78.35	< 0.01
V	0.062 ± 0.016	0.074 ± 0.034	> 0.01	1.22 ± 0.65	94.5	< 0.01

Note: a. Comparison between before therapy and after therapy; b. Compared with I. V compared with II, III and IV, $P < 0.01$; IV compared with II and III, $P < 0.01$. I. Normal saline; II. Zedoary turmeric oil; III. Blank microspheres; IV. Low dosage zedoary turmeric oil gelatin microspheres; V. High dosage zedoary turmeric oil gelatin microspheres

Tab 6 The living days of the rats after arterial infusion (n = 10 , $\bar{x} \pm s$)

Group	Living days / d	P^*	Percent prolongation of life / %
I	11.70 ± 1.88		
II	14.80 ± 3.36	< 0.05	26.49
III	14.00 ± 2.58	< 0.05	19.65
IV	22.70 ± 3.91	< 0.01	94.0
V	25.50 ± 3.89	< 0.01	117.9

* Compared with I. V compared with II and III, $P < 0.01$; V compared with IV, $P > 0.01$; IV compared with II and III, $P < 0.01$; II compared with III, $P < 0.05$

讨 论

微球的制备方法^[2]有单凝聚法、溶剂-非溶剂法、辐射交联法、乳化缩聚法、流化床法及喷雾干燥法。各有各的特点及要求,作者就本实验室的条件对单凝聚法进行了考察,结果表明单凝聚法所形成的微球粒径较大,并且工艺过程不易控制。

莪术醇为莪术油中的主要有效抗癌成分,不同产地的莪术油中的莪术醇的含量不同,从0.26%到9.0%不等,温莪术中的莪术醇的含量约为7.0%^[3]。由于莪术醇在莪术油中的含量不高,水溶性较小,要提高其包封率,初乳是关键。对莪术油明胶微球而言,尽管以莪术醇计算的包封率不高,但对肝癌患者,仍能起到化学栓塞的作用,本文的药效学实验已证明这一点。

微球的体外释药研究方法^[4]有取样分离技术、膜扩散技术、定位取样和连续流动法等,由于微球的

粒径较小对分离技术要求较高,膜扩散技术不能满足漏槽条件,定位取样要求有较高灵敏度的检测手段,因此作者采用连续流动法进行体外释药实验,较好地模拟了体内实际情况。

ZT-GMS 为血管内给药,对有机溶剂残留量的要求更高。采用气相色谱法对异丙醇残留量进行定量,结果表明,ZT-GMS 中的异丙醇含量小于 1×10^{-6} ,甲醛质量浓度不大于 0.001%,符合有关规定^[5]。

REFERENCES:

- [1] Liu JY. Traditional Chinese medicine for tumor preventing and therapy — *Curcuma zedoaria* (Berg.) Rosc [J]. *Chin Tradit Herbal Drugs* (in Chinese), 1996,27(9):572.
- [2] Rudy LJ. Microparticulate drug carrier: liposomes, microspheres, and cells [A]. Joseph RR, Vincent H, L Lee. *Drug and the Pharmaceutical Sciences, Controlled Drug Delivery Fundamentals and Applications* [M]. Vol. 29. Second Edition, New York: Marcel Dekker Inc, 1987.555 - 559.
- [3] Fang HJ, Yu JG, Chen YH, et al. Studies on Chinese *Curcuma* I. Comparison of the chemical components of essential oils from Rhizome of five species medicinal *Curcuma* plants [J]. *Acta Pharm Sin* (in Chinese), 1982,17(6):441 - 447.
- [4] Vijay K, Gilbert SB. Target-oriented drug delivery systems [A]. Gilbet SB, Christopher JR. *Drug and Pharmaceutical Sciences, Modern Pharmaceutics* [M]. Vol. 72. Third Edition, New York: Marcel Dekker Inc, 1996.634 - 639.
- [5] *British Pharmacopoeia* [M]. Vol. II. London: HMSO, 1993.1280 - 1281.

ZEDOARY TURMERIC OIL GELATIN MICROSPHERES FOR HEPATICAL ARTERIAL EMBOLIZATION

DENG Rong¹, CHEN Ji Min¹, YAO Chong Sun¹, WU Wang Yin²

(1. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110015, China;

2. Traditional Chinese Medicine Hospital of Guangdong Province, Guangzhou 510020, China)

ABSTRACT: **AIM** To prepare the zedoary turmeric oil gelatin microspheres (ZT-GMS) for hepatic arterial embolization. **METHODS** Orthogonal design was used to optimize the technology of preparation with good yield. The appearance, particle size, drug content, drug release *in vitro*, stability, and pharmacodynamics of the obtained microspheres were examined. **RESULTS** The diameter of 97.16% of the ZT-GMS was in the range of 40~160 μm . The average yield, the average drug content and the average entrapment efficiency were 89.13%, 2.13% and 19.36% respectively (all referred to curcuminol). Release of curcuminol from the ZT-GMS became much slower and the drug release profiles could be described by first order dynamic model and the release mechanism was erosion and diffusion. Almost no changes were observed in size distribution, drug content, drug release after the ZT-GMS were stored at 40°C (RH 75%), room temperature and refrigeration (0~4°C). The rats treated with ZT-GMS had a significantly slower tumor growth ($P<0.01$) and longer survival time ($P<0.01$). **CONCLUSION** The technology of preparation was successful and drug release from ZT-GMS was slow. It can be used for the embolization for hepatic cancer.

KEY WORDS: zedoary turmeric oil; gelatin microspheres; hepatic arterial embolization; drug release; pharmacodynamics