

乳酸-羟基乙酸共聚物载药纳米粒的制备及体外释药性**

徐伟华, 刘杰, 金成, 张福琴, 窦科峰

Preparation of drug-loaded poly (D, L-lactide-co-glycolide) nanoparticles and characterization of release behavior *in vitro*

Xu Wei-hua, Liu Jie, Jin Cheng, Zhang Fu-qin, Dou Ke-feng

Abstract

BACKGROUND: As a new drug delivery carrier, medical nanoparticle has currently become the focus of research in the field of medicine.

OBJECTIVE: To construct antitumor drug 5-fluorouracil (5-FU) loaded nanoparticles using the biodegradable material poly (D, L-lactide-co-glycolide) (PLGA).

METHODS: The PLGA nanoparticles were prepared by double emulsification solvent evaporation technique. The morphology and particle size distribution of nanoparticles were determined by field emission scanning electron microscope and laser particle size analyzer, respectively, and the granulation rate of nanoparticles was calculated. The drug loading, encapsulation efficiency of 5-FU and release *in vitro* were detected by ultraviolet spectrophotometer.

RESULTS AND CONCLUSION: The nanoparticles were spherical in shape with average diameter (186±14) nm. The granulation rate, drug loading and encapsulation efficiency was 70.8%, 6.6%, 28.1%, respectively. The nanoparticles exhibited initial burst release *in vitro*, releasing a cumulative 36.2% of 5-FU in 24 hours. The cumulative release reached 83.6% at the 10th day. The results suggested that the 5-FU-loaded PLGA nanoparticles were prepared successfully and have slow release function *in vitro*.

Xu WH, Liu J, Jin C, Zhang FQ, Dou KF. Preparation of drug-loaded poly (D, L-lactide-co-glycolide) nanoparticles and characterization of release behavior *in vitro*. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(16):2925-2928. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

Department of Hepatobiliary Surgery, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China

Xu Wei-hua★, Studying for master's degree, Department of Hepatobiliary Surgery, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Dou Ke-feng, Professor, Doctoral supervisor, Department of Hepatobiliary Surgery, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China gdwkgwx@fmmu.edu.cn

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 81000987*

Received: 2010-10-28
Accepted: 2010-12-30

摘要

背景: 医用纳米粒作为药物传递的新型载体, 目前已经成为医药领域研究的重点。

目的: 构建以生物可降解材料乳酸-羟基乙酸共聚物为载体, 负载抗肿瘤药物5-氟尿嘧啶的载药纳米粒。

方法: 利用复乳-溶剂挥发法制备乳酸-羟基乙酸共聚物载药纳米粒。场发射扫描电子显微镜观察纳米粒表面形态; 激光粒度分析仪测定粒径分布并计算成球率; 紫外分光光度计测定5-氟尿嘧啶载药量、封装率, 并对体外释药进行评估。

结果与结论: 纳米粒呈球形, 平均粒径为(186±14) nm, 成球率、载药量和封装率分别为70.8%、6.6%、28.1%, 体外释药有突释现象, 24 h内5-氟尿嘧啶累积释药量达36.2%, 10 d达83.6%。提示成功制备乳酸-羟基乙酸共聚物载药纳米粒, 其具有缓释效应。

关键词: 乳酸-羟基乙酸共聚物; 5-氟尿嘧啶; 纳米粒; 体外释药; 缓释

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.16.017

徐伟华, 刘杰, 金成, 张福琴, 窦科峰. 乳酸-羟基乙酸共聚物载药纳米粒的制备及体外释药性[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(16):2925-2928. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

乳酸-羟基乙酸共聚物[poly(D,L-lactide-co-glycolide), PLGA]是一种人工合成的高分子化合物, 其具有良好的生物降解性和生物相容性, 已被广泛用于制备纳米粒载药系统的载体。它们可将药物包裹其中形成载药纳米粒, 具有明显的缓释性和组织靶向性, 从而增加药物吸收、提高疗效和降低毒副作用, 减少对机体组织器官的损害^[1-5]。5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)是一种传统的化疗药物, 在临床上主要用于治疗胃癌、肝癌、结肠癌等多种癌症, 但其血浆半衰期较短, 中毒剂量与治疗剂量接近, 产生骨髓抑制、胃肠道不适等不良反应^[6-8]。本实验以PLGA为载体, 制备负载5-FU的载药纳

米粒, 并对其理化特性、体外释药性能观察, 为后续的生物实验提供可靠的依据。

1 材料和方法

设计: 重复测量设计。

时间及地点: 于2009-12/2010-09在解放军第四军医大学西京医院肝胆外科实验室完成。

材料: PLGA(50/50, 相对分子质量=22000)购自济南岱罡生物科技有限公司, 5-FU(批号为5402)购自上海晶纯试剂有限公司。

方法:

PLGA载药纳米粒的制备: 采用复乳-溶剂挥发法并加以改进^[9-12]。精确称取PLGA 100 mg溶于4 mL二氯甲烷(CH₂Cl₂)中, 在冰水浴条件下, 将1 mL 5-FU的NaOH溶液(20 g/L)作为内

解放军第四军医大学西京医院肝胆外科, 陕西省西安市 710032

徐伟华★, 男, 1985年生, 江苏省海门市人, 汉族, 解放军第四军医大学在读硕士, 主要从事肝癌靶向治疗的研究。
xwhuati@163.com

通讯作者: 窦科峰, 男, 教授, 博士生导师, 第四军医大学西京医院肝胆外科, 陕西省西安市 710032
gdwkgwx@fmmu.edu.cn

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2011)16-02925-04

收稿日期: 2010-10-28
修回日期: 2010-12-30
(20100609014/D·L)

水相缓慢滴入上述有机溶液中, 同时超声(50~55 W)分散1 min, 形成初乳(W1/O); 将上述初乳在冰水浴、超声(20~30 W)分散条件下, 缓慢注入至20 mL 1%PVA水相溶液中, 持续10 min, 形成复乳(W1/O/W2)。在室温下, 将此复乳磁力搅拌持续4~6 h, 直至有机溶剂完全挥发, 所得的溶液离心分离, 并用蒸馏水洗涤3次, 冷冻干燥, 经⁶⁰CO照射消毒后, 保存于4℃冰箱备用。

主要仪器、试剂及来源:

材料、试剂与仪器	来源
聚乙烯醇(PVA, 相对分子质量 30 000~70 000)	美国 sigma 公司
透析膜(D36 mm, 截留相对分子质量 8 000~14 400)	美国 Sonics 公司
VGX130PB 型超声细胞粉碎仪	德国 IKA 公司
加热磁力搅拌器	美国 sigma 公司
高速低温离心机	英国 Biochrom 公司
UV-1100pro 型紫外分光光度计	日本电子株式会社
JSM-6700F 型场发射扫描电子显微镜	北京博医康实验仪器有限公司
FD-1 型真空冷冻干燥机	英国 Malvern 公司
Mastersizer 2000 激光	

载药纳米粒的形态观察: 取少量冻干的PLGA载药纳米粒样品, 均匀涂抹于铜座表面, 在真空条件下对样品表面进行喷金处理后, 置于场发射扫描电子显微镜下观察。

载药纳米粒的粒径及分布: 称取一定量冻干的PLGA载药纳米粒, 重悬浮于蒸馏水中, 1 000 r/min离心2 min后, 用激光粒度分析仪测定其粒径大小及分布。

5-FU的标准曲线的测定: 精确称取5-FU标准品20 mg, 用蒸馏水溶解并定容至100 mL, 分别移取0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0, 2.4, 2.8 mL至20 mL容量瓶稀释并定容, 摇匀后得到浓度范围为4.0~28.0 mg/L的5-FU标准样, 以蒸馏水为空白, 用紫外分光光度计在265 nm处测定吸光度值(Y), 以5-FU浓度(X, mg/L)和吸光度值(Y)进行线性回归, 得到标准曲线方程 $Y=0.048X+0.037$, $R^2=0.999\ 3$ ($n=7$), 结果表明, 在4.0~28.0 mg/L范围内吸光度值与浓度呈良好的线性关系。同法, 得到5-FU溶解于磷酸盐缓冲液(PBS, pH7.4)的标准曲线方程 $Y=0.041\ 3X+0.032\ 6$, $R^2=0.999\ 3$ ($n=5$), 同样, 在3.2~16.0 mg/L范围内吸光度值

与浓度也呈良好的线性关系。

成球率、载药量和包封率的测定: 称取10 mg冻干的纳米粒, 完全溶解于2 mL CH_2Cl_2 中, 用5 mL蒸馏水进行萃取, 重复萃取3次, 每次萃取后离心收集上清液, 紫外分光光度计在265 nm处测定吸光度值, 实验重复3次, 计算吸光度平均值, 对照5-FU标准曲线得到5-FU的浓度, 并按下列公式分别计算出5-FU的载药量和包封率。

$$\begin{aligned}\text{成球率} &= \frac{\text{纳米粒的质量}}{\text{投入的聚合物与药物的总质量}} \times 100\% \\ \text{载药量} &= \frac{\text{纳米粒中5-FU的质量}}{\text{纳米粒的质量}} \times 100\% \\ \text{包封率} &= \frac{\text{纳米粒中5-FU的质量}}{\text{5-FU起始投药量}} \times 100\%\end{aligned}$$

体外释药特性: 称取冻干的纳米粒30 mg, 重悬浮于5 mL PBS中, 将其置入预先处理的透析袋中, 扎紧两端, 放入装有60 mL PBS的烧杯中, 密封瓶口后置于37℃恒温水浴摇床内, 以60 r/min速度振荡, 分别在不同时间间隔取透析袋外PBS 5 mL, 同时补充同温度同体积的释放介质PBS, 取出的释放液在265 nm处测定吸光度值, 并对照标准曲线, 计算不同时间点5-FU的释药量以及累积释放量, 实验重复3次, 取平均值, 绘制体外释药曲线。

主要观察指标: 纳米粒的形态观察、粒径、多分散指数、成球率、5-FU载药量、包封率以及体外释药。

统计学分析: 由第一作者用SPSS 10.0软件进行数据处理, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 PLGA载药纳米粒的形态特征 电镜结果表明, PLGA载药纳米粒呈球形, 表面光滑, 相互无粘连, 大小基本均匀一致, 见图1。

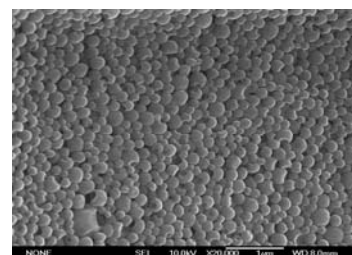
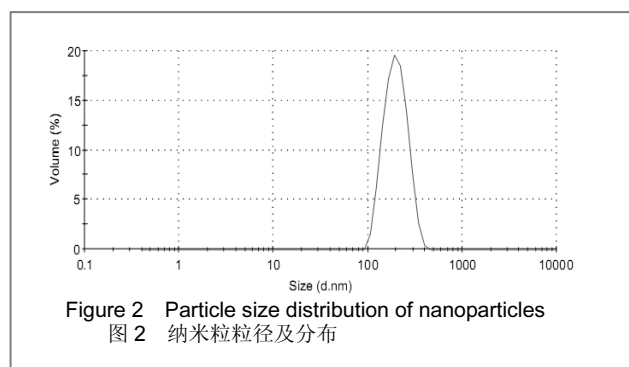
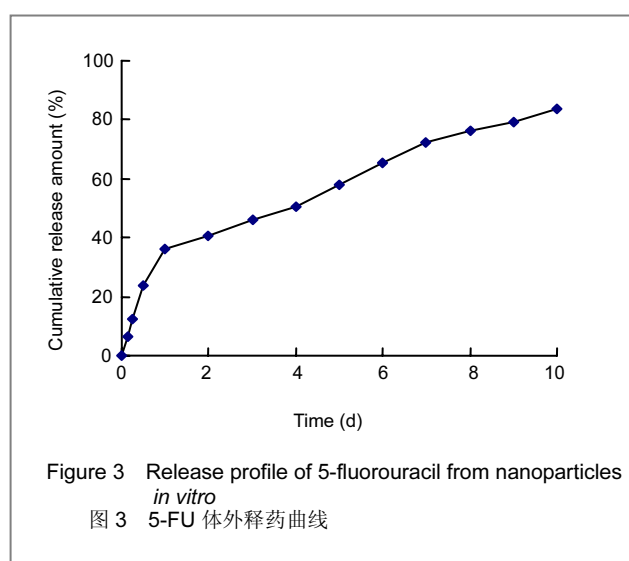


Figure 1 Field emission scanning electron micrograph of nanoparticles ($\times 20\ 000$)
图1 纳米粒电镜观察($\times 20\ 000$)

2.2 PLGA载药纳米粒的粒径及分布 最优化制备条件, 利用激光粒度分析仪测定制得的载药纳米粒粒径, 结果显示其粒径分布较窄, 且呈正态分布, 平均粒径为 (186 ± 14) nm, 多分散指数(PDI)为0.069, 见图2。



2.3 成球率、5-FU的载药量、包封率和体外释药 根据标准曲线方程以及公式计算, 载药纳米粒的成球率为70.8%, 5-FU的载药量为6.6%, 包封率为28.1%。体外释药曲线表明, 纳米粒在10 d内持续释放5-FU, 并可分突释与缓释两个阶段。在突释阶段, 24 h内5-FU累积释药量达36.2%; 在缓释阶段, 5-FU释药持续时间较长, 至第10 d时, 5-FU累积释药量达83.6%, 见图3。



3 讨论

载药纳米粒是直径为10~500 nm的固体胶体粒子, 药物或药物活性成分通过溶解、包裹进入粒子内, 或者通过吸附、偶合作用于粒子表面。这种微粒因直径较小, 能改善其透过细胞膜的能力, 使药物在体内选择性分布, 从而提高药物生物利用度, 降低毒副作用^[13-15]。制备纳米粒的材料通常是高分子化合物, 以合成的高分子聚合物和天然大分子为主。实验选用的药物载体PLGA是一种合成的高分子聚合物, 具有良好的生物相容性和

生物降解性, 并且其最后降解产物经体内正常途径代谢, 对细胞无毒害作用, 已被美国FDA批准作为体内适用的高分子聚合物^[5,16-19]。

影响纳米粒粒径、载药量和包封率的因素很多, 为获得最佳制备条件, 本研究考察了PVA质量浓度、超声分散的频率、内水相、外水相的体积等4个因素, 从而优化了纳米粒的制备条件。结果显示纳米粒大小较均匀, 表面光滑, 相互无粘连, 平均粒径为 (186 ± 14) nm, 载药量为6.6%, 包封率为28.1%。较其他研究相比^[20-23], 本实验5-FU的载药量及包封率仍较低, 推断这可能与制备的载体不同、投入5-FU初始剂量低、纳米粒径较小、制备复乳时部分5-FU进入外水相PVA溶液等因素有关。

5-FU体外释药曲线分为突释、缓释两个阶段。在突释阶段, 5-FU释放几乎呈线性, 24 h累积释放量达36.2%。这部分5-FU释放较快, 可能是因为药物吸附在纳米粒表面, 或者以较弱的作用力结合在纳米粒表层, 从而较易脱落。

另外, 溶液内外的浓度差起始较大, 也可能促使5-FU的加快释放。随后2-10 d, 5-FU体外释药进入缓释阶段, 第5 d, 5-FU累积释放量达58.0%, 至第10 d时5-FU累积释放量达83.6%。5-FU的释放速度明显减缓, 这可能由于随着时间的延长, PLGA出现了生物降解, 而在降解过程中纳米粒表面也不断形成孔隙, 从而使包裹内部的5-FU以扩散方式逐渐释放, 从而起到了缓释的效果。

本实验以PLGA为载体, 制备了负载5-FU的载药纳米粒, 可为5-FU的临床抗肿瘤治疗提供一个新的途径。

4 参考文献

- [1] Manchanda R, Fernandez-Fernandez A, Nagesetti A, et al. Preparation and characterization of a polymeric (PLGA) nanoparticulate drug delivery system with simultaneous incorporation of chemotherapeutic and thermo-optical agents. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2010 ;75(1):260-267.
- [2] Wang X, Yang L, Chen ZG, et al. Application of nanotechnology in cancer therapy and imaging. *CA Cancer J Clin*. 2008;58(2): 97-110.
- [3] Alexis F, Rhee JW, Richie JP, et al. New frontiers in nanotechnology for cancer treatment. *Urol Oncol*. 2008;26(1): 74-85.
- [4] Lee JS, Chae GS, Kim MS, et al. Degradation behaviour *in vitro* for poly(D,L-lactide-co-glycolide) as drug carrier. *Biomed Mater Eng*. 2004;14(2):185-192.
- [5] Jain RA. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials*. 2000;21(23):2475-2490.
- [6] Ma BH, Wang SH, Wang H, et al. Zhongguo Yaoye. 2009;18(17): 1-3.
马宝花, 王少华, 王宏, 等. 5-氟尿嘧啶纳米级给药系统研究进展[J]. 中国药业. 2009, 18(17):1-3.
- [7] Arias JL. Novel strategies to improve the anticancer action of 5-fluorouracil by using drug delivery systems. *Molecules*. 2008; 13(10):2340-2369.
- [8] Li S, Wang A, Jiang W, et al. Pharmacokinetic characteristics and anticancer effects of 5-fluorouracil loaded nanoparticles. *BMC Cancer*. 2008;8:103.
- [9] Liu B, Dong Q, Wang M, et al. Preparation, characterization, and pharmacodynamics of exenatide-loaded poly(DL-lactic-co-glycolic acid) microspheres. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2010;58(11): 1474-1479.

- [10] Mao S, Xu J, Cai C, et al. Effect of WOW process parameters on morphology and burst release of FITC-dextran loaded PLGA microspheres. *Int J Pharm.* 2007;334(1-2):137-148.
- [11] Bilati U, Allemann E, Doelker E. Strategic approaches for overcoming peptide and protein instability within biodegradable nano- and microparticles. *Eur J Pharm Biopharm.* 2005;59(3):375-388.
- [12] Cui F, Cun D, Tao A, et al. Preparation and characterization of melittin-loaded poly (DL-lactic acid) or poly (DL-lactic-co-glycolic acid) microspheres made by the double emulsion method. *J Control Release.* 2005;107(2):310-319.
- [13] Mei XG. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology Press.2009:3-8.
梅兴国. 微载体药物递送系统[M]. 武汉:华中科技大学出版社,2009:3-8.
- [14] Wu ZQ, Zhang GZ. Beijing: Beijing: Science Press. 2001:1-19.
吴自勤,张国桢. 纳米材料和纳米结构[M]. 北京:科学出版社,2001:1-19.
- [15] Kan SX, Wang XW, Tang JT, et al. Jiefangjun Yaoxue Xuebao. 2009;25(2):169-171.
阚思行,王晓文,唐劲天,等. 纳米药物控释系统研究进展[J]. 解放军药学报,2009,25(2):169-171.
- [16] Joshi SA, Chavhan SS, Sawant KK. Rivastigmine-loaded PLGA and PBCA nanoparticles: preparation, optimization, characterization, in vitro and pharmacodynamic studies. *Eur J Pharm Biopharm.* 2010;76(2):189-199.
- [17] Jin C, Bai L, Wu H, et al. Cytotoxicity of paclitaxel incorporated in PLGA nanoparticles on hypoxic human tumor cells. *Pharm Res.* 2009;26(7): 1776-1784.
- [18] Kou G, Gao J, Wang H, et al. Preparation and characterization of paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles coated with cationic SM5-1 single-chain antibody. *J Biochem Mol Biol.* 2007;40(5):731-739.
- [19] Farokhzad OC, Cheng J, Teply BA, et al. Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(16): 6315-6320.
- [20] Zhu L, Ma J, Jia N, et al. Chitosan-coated magnetic nanoparticles as carriers of 5-fluorouracil: preparation, characterization and cytotoxicity studies. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2009;68(1):1-6.
- [21] Zheng Y, Yang W, Wang C, et al. Nanoparticles based on the complex of chitosan and polyaspartic acid sodium salt: preparation, characterization and the use for 5-fluorouracil delivery. *Eur J Pharm Biopharm.* 2007;67(3):621-631.
- [22] Sairam M, Babu VR, Vijaya B, et al. Encapsulation efficiency and controlled release characteristics of crosslinked polyacrylamide particles. *Int J Pharm.* 2006;320(1-2):131-136. PMID: 16766148
- [23] Yu BT, Zhang ZR, Zeng RJ. Yaoxue Xuebao. 2000;35(9):700-705.
于波涛,张志荣,曾仁杰. 肝靶向氟尿嘧啶类脂纳米粒的研究[J]. 药学报,2000,35(9):700-705.

来自本文课题的更多信息—

基金资助: 国家自然科学基金项目(81000987), 课题名称: 乏氧肿瘤细胞主动靶向和高效放射增敏的纳米递药系统构建。

作者贡献: 第一作者进行实验设计, 第一、二、四作者进行实施, 第五作者进行实验评估, 资料收集为第一、三作者, 第一作者成文, 第五作者审核, 第一作者对文章负责。

致谢: 感谢解放军第四军医大学西京医院肝胆外科金成博士在优化制备纳米粒条件上的帮助。感谢西安近代化学研究所检测纳米粒粒度及分布上的帮助。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理批准: 没有与相关伦理道德冲突的内容。

本文创新性:

提供证据: 检索维普数据库, 检索时间 2010-07, 检索关键词设定乳酸羟基乙酸共聚物、纳米粒、氟尿嘧啶、体外释药; 检索 PubMed 数据库, 检索时间 2010-07, 检索关键词设定 PLGA、nanoparticle、5-fluorouracil、slow release, 目前尚较少有实验相关报道。

创新性特点: 实验对水溶性药物纳米粒的制备提供一种参考方案, 通过改进制备工艺, 最优化制备条件, 得到了理想的负载 5-氟尿嘧啶的乳酸-羟基乙酸共聚物载药纳米粒, 并获得了适宜的释药速度。通过纳米粒的缓释性及靶向性, 可改善 5-氟尿嘧啶吸收度和稳定性, 延长作用时间, 为将来应用临床治疗提供依据。

2011 年《临床超声医学》杂志征订启事

简介	栏目设置	期刊、邮发代号	联系方式
《临床超声医学杂志》是经国家科委批准, 集超声影像诊断、治疗、工程及基础研究为一体的科技刊物。国内外公开发刊, 月刊。为“中国科技论文统计源期刊”、“中国科技核心期刊”。	设有临床研究、实验研究、综述、经验交流、临床报道、病例报道、述评、专家讲座、工程技术及译文等栏目。以各级超声医学工作者、相关临床专业医师及医学院校师生为主要读者对象。	本刊刊号: ISSN 1008-6978; CN 50-1116/R; 邮发代号 78-116。 每期定价: 13 元, 全年 156 元(含邮寄费)。请到全国各地邮局订阅, 也可直接向本刊编辑部订阅。	地址及邮编: 重庆市渝中区临江路 74 号, 重庆医科大学附属第二医院内, 临床超声医学杂志编辑部, 400010 电话: 023-63811304 023-63693117 传真: 023-63811304 E-mail: lccscq@vip.163.com