

氟尿嘧啶聚丙交酯乙交酯-聚乙二醇单甲基醚纳米粒的制备及体外释放的研究

纪宏宇^{1,2,3}, 谷宏伟^{1,3}, 唐景玲³, 刘红梅^{1,2,3}, 于明涛^{1,3}, 吴琳华^{1,2,3*} (1. 哈尔滨医科大学第二附属医院药学部, 哈尔滨 150086; 2. 黑龙江省高校重点实验室, 哈尔滨 150086; 3. 哈尔滨医科大学药学院, 哈尔滨 150086)

摘要:目的 制备氟尿嘧啶聚丙交酯乙交酯-聚乙二醇单甲基醚(PLGA-mPEG)纳米粒,并对其体外释放特性进行研究。方法 采用纳米沉淀法制备氟尿嘧啶 PLGA-mPEG 纳米粒,采用高效液相色谱法进行封装率的测定。在单因素实验的基础上,通过正交实验优化处方和制备工艺。采用动态膜透析法对纳米粒子的体外释药特性进行研究。结果 制备的纳米粒为较均匀的类型球形粒子,平均粒径约 124.3 nm, Zeta 电位 -20.6 mV,平均封装率为(44.72 ± 0.38) %。体外释药实验研究表明,粒子在 2 h 的突释量小于 30% 在突释后的 48 h 内药物缓慢释放。结论 纳米沉淀法操作简单,制备的氟尿嘧啶 PLGA-mPEG 纳米粒粒径小,体外药物释放具有良好的缓释效果。

关键词: 氟尿嘧啶; 纳米粒; 纳米沉淀法; 体外释放

中图分类号: R944 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2011)23-1814-05

Study on Preparation and *in Vitro* Release Characteristics of 5-Fluorouracil Loaded PLGA-mPEG Nanoparticles

Ji Hong-yu^{1,2,3}, Gu Hong-wei^{1,3}, Tang Jing-ling³, Liu Hong-mei^{1,2,3}, Yu Ming-tao^{1,3}, Wu Lin-hua^{1,2,3*} (1. Department of Pharmacy, The Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, China; 2. Key Laboratory of Medications Research, College of Heilongjiang Province, Harbin 150086, China; 3. College of Pharmacy, Harbin Medical University, Harbin 150086, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To prepare 5-fluorouracil loaded PLGA-mPEG nanoparticles (5-FPN) and study its release profile *in vitro*. **METHODS** 5-FPN was prepared by nano-precipitation method. A reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) method was used to determine the entrapment efficiency of 5-FPN. Based on the single-factor experiment, the formulation and preparation process of 5-FPN was optimized using orthogonal design. **RESULTS** 5-FPN had regular spherical appearance with a mean diameter of 124.3 nm and Zeta potential of -20.6 mV, and entrapment efficiency of (44.72 ± 0.38) %. In the release *in vitro*, the cumulative percentage of abruptly released drug from PLGA-mPEG nanoparticles was lower than 30% in 2 h. The 5-FPN showed delayed release in 48 h after the drug dumping. **CONCLUSION** The nano-precipitation method is convenient. The 5-FPN prepared by nano-precipitation method has smaller particle size and possesses good sustained release characteristics *in vitro*.

KEY WORDS: 5-fluorouracil; nanoparticles; nano-precipitation; release *in vitro*

氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-Fu)是抗代谢类的抗肿瘤药物,对增殖性细胞有较强的杀伤作用。它是一种临床应用广泛的广谱抗肿瘤药物,在临床上用于多种肿瘤的治疗,对消化道癌症以及卵巢癌、宫颈癌、膀胱癌等多种肿瘤有明显疗效^[1]。目前临床使用的大多是 5-Fu 普通注射液,由于 5-Fu 注射液对肿瘤细胞的选择性低,在体内分布较广,故其对正

常细胞的毒性较大,易产生很多不良反应如骨髓抑制、白细胞减少、血小板减少等^[2]。因此为提高 5-Fu 的靶向性、降低不良反应、延长药物作用时间,研究开发 5-Fu 新型药物传递系统已成为近些年的研究热点。

纳米粒是近年来发展起来的一种新型药物传递系统,其在抗肿瘤药物中的应用受到广泛的关注。

基金项目: 黑龙江省青年科学基金项目(QC2011C104); 黑龙江省卫生厅科研课题(No. 2009-136); 哈尔滨医科大学附属第二医院青年基金项目(QN2009-03)

作者简介: 纪宏宇,女,硕士,主管药师 研究方向: 药物新剂型与新技术 * 通讯作者: 吴琳华,女,教授,硕士生导师 研究方向: 药物新剂型与新技术 Tel: (0451) 86665559 E-mail: jihongyu1979@126.com

由于肿瘤组织血管丰富,纳米级粒子易穿透肿瘤部位的血管并滞留于其中,具有高通透性和滞留效应(enhanced permeation and retention, EPR),故纳米粒本身具有一定的肿瘤靶向性,同时纳米粒还具有提高药物稳定性、延长药物作用时间、提高药物的生物利用度等优点^[3-4]。聚丙交酯乙交酯-聚乙二醇单甲基醚(PLGA-mPEG)作为一种新型载体材料具有良好的生物相容性和生物可降解性^[5-6],有文献报道将抗肿瘤药物顺铂制备成PLGA-mPEG纳米粒,能够减少药物的毒性,增强药物的被动靶向性,延长药物在体内的循环时间,进而明显的提高顺铂的治疗效果^[7]。本实验即采用PLGA-mPEG,通过纳米沉淀法制备5-Fu纳米粒,并对其质量及释药特性进行研究,为进一步研制开发高效、低毒、长效的新型5-Fu纳米粒制剂奠定实验基础。

1 仪器与试剂

AEU-210 精密电子天平(日本岛津公司); CL-2 磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限责任公司); RE-52C 旋转蒸发器(巩义市英峪予华仪器厂); SHB-D 型微型循环水真空泵(郑州长城科工贸有限公司); TGL-16 高速台式离心机(上海医药器械六厂); 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); KQ3200E 医用超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); Zetasizer 3000HS 激光粒径分析仪(英国 Malvern 公司); Tecnai G2 透射电镜(荷兰 Philips 公司)。

PLGA-mPEG(相对分子质量 1 200,山东济南岱

罡生物科技有限公司); 5-Fu(含量 $\geq 99.5\%$)(上海森灏精细化工有限公司,批号:20081030); 泊洛沙姆 188、泊洛沙姆 407(德国巴斯夫公司); 甲醇为色谱纯; 丙酮、乙醇等其他试剂均为分析纯; 蒸馏水(哈医大二院药学部自制)。

2 方法与结果

2.1 处方和工艺筛选

2.1.1 单因素实验 通过单因素实验分别考察了有机溶剂的种类、水相温度、表面活性剂的种类和浓度、药量、聚合物的质量、有机相的加入方式及搅拌时间对包封率的影响。

2.1.2 正交实验优化工艺处方 在单因素实验的基础上,对显著影响药物包封率的 4 个因素,即有机相组成、水浴温度、药载比、表面活性剂的浓度,采用正交设计法进行处方优化。每个因素选择 3 个水平,按照 $L_9(3^4)$ 进行实验,以包封率为主要评价指标确定最佳处方。正交实验设计方案与结果见表 1,正交统计分析结果见表 2。

由表 2 可知,此实验校正模型 $P < 0.05$,具有统计学意义。由表 1、2 的结果进行综合分析,各指标因素的主次顺序为 $A > B > C > D$,其中 A、B 两因素具有统计学意义($P < 0.05$)。A 因素中 $k_{II} > k_{III} > k_I$,B 因素中 $k_{II} > k_{III} > k_I$,C 因素中 $k_{II} > k_I > k_{III}$,D 因素中 $k_{II} > k_{III} > k_I$,因此得到的最佳处方为 $A_1B_2C_2D_2$ 。

2.2 氟尿嘧啶聚丙交酯乙交酯-聚乙二醇单甲基醚纳米粒(5-FPN)的制备方法

表 1 确定最佳处方的正交实验方案和结果

Tab. 1 Program and result of orthogonal design

No.	Factor				Entrapment efficiency /%
	The ratio of organic phase (V/V) (A)	Temperature of water phase /°C (B)	The ratio of 5-Fu and PLGA-mPEG (C)	Surfactant concentration /% (D)	
1	6:0	30	1:2	0.5	32.75
2	6:0	40	1:2.5	1	44.68
3	6:0	50	1:3	1.5	34.35
4	4:2	30	1:2.5	1.5	29.37
5	4:2	40	1:3	0.5	31.99
6	4:2	50	1:2	1	27.63
7	3:3	30	1:3	1	22.60
8	3:3	40	1:2	1.5	29.11
9	3:3	50	1:2.5	0.5	25.73
k_I	37.27	28.24	29.83	30.16	
k_{II}	29.66	35.26	33.26	31.64	
k_{III}	25.81	29.24	29.65	30.94	
R	11.47	7.02	3.61	1.48	

本实验以 PLGA-mPEG 为载体材料,采用纳米沉淀法制备纳米粒。室温下称取 20 mg 5-Fu 与 50 mg PLGA-mPEG 溶于 6 mL 有机溶剂丙酮中作为有机相,将有机相以恒定速率滴入到 40 mL 温度为 40 °C 搅拌的 1% 的泊洛沙姆 188 溶液中,得到有淡蓝色乳光的纳米粒溶液,在 1 400 r · min⁻¹ 的搅拌速度下搅拌 20 min,在 35 °C 减压条件下除去有机溶剂,所得溶液用 0.8 μm 的微孔滤膜过滤,将滤液离心 40 min(20 000 r · min⁻¹, 4 °C) 后收集纳米粒子即得 5-Fu 纳米粒。

2.3 5-FPN 包封率的测定

2.3.1 色谱条件 色谱柱: DiamonsilTM C₁₈ (4.6 mm × 250 mm 5 μm); 流动相: 甲醇-水(1:9); 流速: 1.0 mL · min⁻¹; 柱温: 30 °C; 检测波长: 265 nm; 进样量: 10 μL。在该条件下 5-Fu 的保留时间约为 4.8 min。5-Fu 与纳米粒辅料分离良好,辅料不干扰 5-Fu 的测定。

2.3.2 标准曲线的测定 精密称取 5-Fu 约 10 mg 置于 100 mL 量瓶中,用流动相溶解后稀释至刻度,混匀,制得 100 μg · mL⁻¹ 的贮备液。分别精密吸取贮备液 1.0、3.0、4.0、5.0、6.0 和 8.0 mL,置于 10 mL 量瓶中,用流动相稀释至刻度,得一定浓度的系列标准液。以峰面积(A)为纵坐标,以质量浓度 ρ(μg · mL⁻¹)为横坐标进行线性回归,得回归方程: $A = 3.5570 \times 10^4 \rho + 1.9415 \times 10^4$ (r = 0.9995)。5-Fu 在 10 ~ 100 μg · mL⁻¹ 线性关系良好。

2.3.3 精密度实验 分别取 40、50、60 μg · mL⁻¹ 的低、中、高 3 种质量浓度的对照品溶液,于 1 d 内测定 5 次,计算日内精密度;每 1 d 进样 1 次,连续测定 5 d,计算日间精密度。日内精密度和日间精密度(RSD)均小于 2%,符合要求。

2.3.4 回收率实验 分别称取一定质量的空白纳米粒制剂 9 份,加至 40、50、60 μg · mL⁻¹ 的低、中、高 3 个质量浓度的对照品溶液中,每个浓度各制备 3 份,将其完全分散后,离心取上清液进样测定,计算回

收率。平均回收率为 100.09%,RSD 为 0.94%。

2.3.5 包封率的测定 采用高速离心法分离游离药物与纳米粒粒子,高效液相色谱法测定游离药物的含量。载药纳米粒溶液离心 40 min(20 000 r · min⁻¹, 4 °C) 后,收集上清液,进样 10 μL,记录峰面积,计算包封率。

测定了 3 批最佳处方工艺的 5-FPN 的包封率,结果平均包封率为(44.72 ± 0.38)%。

2.4 纳米粒的质量评价

2.4.1 纳米粒粒径、电位的测定 取载药纳米粒,用蒸馏水稀释到适当的浓度,经激光粒度分析仪测定,纳米粒的平均粒径为 124.3 nm,Zeta 电位为 -20.6 mV。粒度分布和 Zeta 电位分布分别见图 1、2。

2.4.2 形态观察 将样品用蒸馏水适量稀释,采用磷钨酸复染法,通过透射电镜,观察纳米粒的粒子形态,透射电镜照片见图 3。从图 3 中可以看出,纳米粒为较均匀的一类球形粒子。

2.4.3 体外释药特性研究 采用动态膜透析法进行纳米粒体外释药实验。分别精密量取 3 份处方量的冻干纳米粒约 2 mg,置于经处理过的透析袋内,加入 1 mL 磷酸盐缓冲液(pH 7.4)混匀,将袋口扎紧。以 100 mL 磷酸缓冲液(pH 7.4)为释放介质,转速为 100 r · min⁻¹,温度为(37 ± 0.5) °C,在 0.25、0.5、1、2、4、6、8、10、12、24、36、48 h 分别取样 1 mL,经 0.8 μm 微孔滤膜过滤后,取 10 μL 进样。取样同时向体系中补充 1 mL 释放介质。通过下式计算纳米粒的累积释放百分率(Q)。结果见图 4。

$$Q\% = \frac{v_0 \times \rho_t + v \times \sum_{n=1}^{t-1} \rho_n}{W} \times 100\%$$

ρ_t - t 时间点测得释放介质中的药物质量浓度(μg · mL⁻¹); v - 每次取样体积(mL); v₀ - 释放介质的总体积(mL); W - 纳米粒的载药量(μg); ρ_n - 各取样时间点的质量浓度(μg · mL⁻¹)。

表 2 正交实验结果方差分析表

Tab. 2 The statistic analysis of orthogonal design

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	P
Corrected Model	312.820 ¹⁾	6	52.137	42.477	0.023
	8 503.299	1	8 503.299	6 927.833	0.000
A	204.801	2	102.400	83.428	0.012
B	82.799	2	41.399	33.729	0.029
C	25.220	2	12.610	10.274	0.089
Error	2.455	2	1.227		
Total	8 818.574	9			
Corrected total	315.275	8			

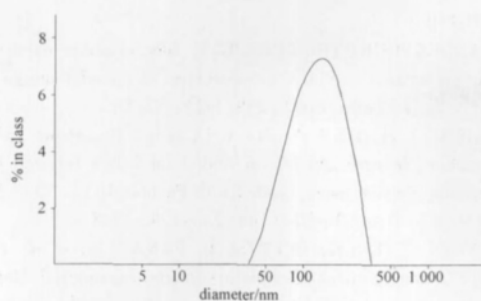


图1 5-FPN 粒径分布图

Fig.1 The size distribution of 5-FPN

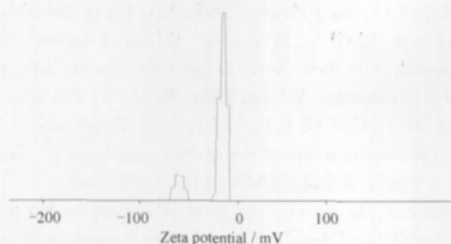


图2 5-FPN Zeta 电位分布图

Fig.2 Zeta potential of 5-FPN

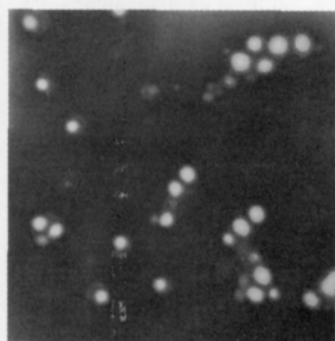


图3 5-Fu 纳米粒透射电镜照片(×60 000)

Fig.3 The TEM image of 5-FNP(×60 000)

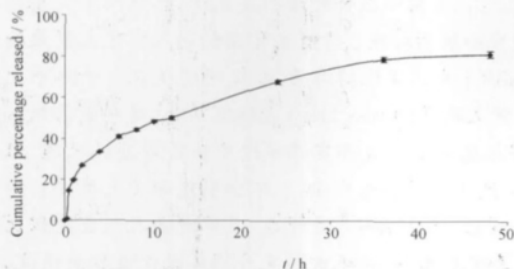


图4 5-Fu 纳米粒的累积释放曲线. $n=3, \bar{x} \pm s$

Fig.4 The cumulative release profile of 5-Fu from PLGA-mPEG nanoparticles *in vitro*. $n=3, \bar{x} \pm s$

如图4 释放曲线所示,纳米粒子在2 h 时发生突释现象,释放量小于30%。在12 h 时,载体纳米粒的药物累积释放百分率达到50%左右。

在48 h 时,载体纳米粒的累积药物释放百分率达到80%以上,药物释放较完全。体外释药实验结果表明,以PLGA-mPEG 为载体的纳米粒具有明显的缓释特性。

3 讨论

3.1 目前常用于纳米粒的生物可降解载体材料有聚氰基丙烯酸酯、聚酯、聚酰胺、聚酸酐等^[8],其中应用最广泛的是聚乳酸(PLA)、聚羟基乙酸及乳酸/羟基乙酸共聚物(PLGA)。有报道称用PLA、PLGA 作为载药微球、纳米粒的载体,可以起到保护药物、增溶、提高生物利用度及靶向释药等作用^[9]。但是这两种材料具有严重的疏水性,限制了其在药物载体领域中的应用。本实验采用PLGA-mPEG 为载体材料,PLGA 连接亲水段mPEG 后,增加了材料的亲水性,使材料具有两亲性。同时由于亲水性PEG 链的引入,能够抵制和逃逸网状内皮系统的吞噬,延缓粒子在体内循环系统的滞留时间,更有利于药物向有血管缺陷的肿瘤组织的渗透,进一步提高纳米粒的靶向性。此外,本实验制备的纳米粒具有一定缓释特性,有效地降低了纳米粒中药物在浓集于肿瘤组织之前的大量释放,从而避免由此产生的全身毒副作用及药效降低的现象。

3.2 纳米粒的制备方法有乳化溶剂挥发法^[10]、纳米沉淀法^[11]、高压均质法^[12]等。本实验采用简单易行、操作安全的纳米沉淀法制备5-Fu 纳米粒。此方法中使用的有机溶剂毒性较低、易除去,避免了二氯甲烷等毒性大的有机溶剂的使用。此方法制备的粒子粒径较小,分散性和重现性较好。

3.3 本实验曾做过粒径为50 nm 左右的纳米粒,但是其释放曲线的突释现象严重。在3 h 左右药物累积释放量就达到了80%。而由粒径为120 nm 左右的纳米粒的释放曲线可知,粒径为120 nm 左右的纳米粒子在48 h 时累积药量达到80%以上,具有很好的缓释特性。由此可知,粒径的大小影响纳米粒的药物释放。粒径较大的纳米粒的药物释放时间长,能够达到很好的缓释效果。

3.4 测定药物包封率时,需要将游离药物与包封药物分离。常见的方法有透析法、凝胶柱层析法、超滤法等。透析法耗时长、凝胶柱层析法设备复杂、超滤法材料昂贵,而低温超速离心的方法设备操作简单且分离效率高,因此本实验采用低温超速离心的方法分离游离药物与纳米粒粒子,回收率实验结果表明,该方法可靠。

3.5 对方工艺影响因素的考察可知,有机相组成、温度、水相浓度、药量与聚合物量的比例、有机相加入方法等因素对5-FPN的包封率有影响,前4个因素影响较显著。在本实验中,通过验证实验结果表明最优处方的重现性好。5-Fu微溶于水,这可能是包封率不高的原因。通过实验可知,粒子形成的搅拌时间和旋转蒸发时间过长都会使粒子的包封率下降,因此本实验拟进一步采用冷冻干燥技术,将纳米粒子制备成冻干粉末,以提高粒子的稳定性。

REFERENCES

- [1] ZHU L Z, MA J W, JIA N Q, *et al.* Chitosan-coated magnetic nanoparticles as carriers of 5-fluorouracil: Preparation, characterization and cytotoxicity studies[J]. *Colloids Surf B: Biointerfaces*, 2009, 68(1): 1-6.
- [2] ASUMAN B, ONGUN M S. Formulation and investigation of 5-FU nanoparticles with factorial design-based studies [J]. *Il Farmaco*, 2005, 60(10): 840-846.
- [3] YANG Z Q, PAN P, XU J, *et al.* Study on preparation of CyA-eudragit S100-nanoparticles and its characteristics *in vivo* and *in vitro* [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2008, 43(23): 1798-1803.
- [4] HE L Q, ZHU L. Study on distribution *in vivo* and pharmacodynamics of prodrug folate-bovine serum albumin-5-fluorouracil nanoparticles [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2010, 45(2): 107-110.
- [5] VANDERVOORT J T, LUDWIG A. Biocompatible stabilizers in the preparation of PLGA nanoparticles: a factorial design study [J]. *Int J Pharm*, 2002, 238(1-2): 77-92.
- [6] ZHANG L H, HE Y N, MA G L, *et al.* Preparation, characterization, *in vitro* and *in vivo* studies on Folate-Targeted Biodegradable Polymersomes Loaded with Paclitaxel [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2010, 45(22): 1742-1748.
- [7] AVGOUSTAKIS K, BELETSI A, PANAGI Z, *et al.* PLGA-mPEG nanoparticles of cisplatin: *in vitro* nanoparticle degradation, *in vitro* drug release and *in vivo* drug residence in blood properties [J]. *J Controlled Release*, 2002, 79(1-3): 123-135.
- [8] POLLAUFE J, BERKLAND C, KIM K, *et al.* *In vitro* degradation of polyanhydride/polyester core-shell double-wall microspheres [J]. *Int J Pharm*, 2005, 301(1-2): 294-303.
- [9] ZHOU S, LIAO X, LI X, *et al.* Poly-D, L-lactide-co-poly(ethylene glycol) microspheres as potential vaccine delivery systems [J]. *J Controlled Release*, 2003, 86(2-3): 195-205.
- [10] WANG Y, CHENG H L, LI J J, *et al.* Preparation of nanoparticles by emulsion solvent evaporation technique [J]. *Lett Biotechnol* (生物技术通讯), 2008, 19(4): 562-565.
- [11] ZHU Z S, LI Y, LI X L, *et al.* Paclitaxel-loaded poly(N-vinylpyrrolidone)-b-poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles: Preparation and antitumor activity *in vivo* [J]. *J Controlled Release*, 2010, 142(3): 438-446.
- [12] CHEN G G, XU Y L, LI X M. Preparation and release study of 5-fluorouracil loaded PLGA-nanoparticles *in vitro* [J]. *West China J Pharm Sci* (华西药理学杂志), 2006, 21(5): 436-439.

(收稿日期: 2011-01-19)

实体微针透皮给药的安全性研究

李伟泽¹ 张寒¹ 韩文霞^{1*} 周建平² 霍美容² 郝保华³ (1. 西安医学院, 西安 710021; 2. 中国药科大学药学院, 南京 210009; 3. 西北大学生命科学学院, 西安 710069)

摘要:目的 探索实体微针刺入皮肤后对皮肤的影响及其安全性。方法 将实体微针刺入裸鼠皮肤, 然后进行固化、染色、切片等处理, 再置于显微镜下观察不同针尖形状的微针在皮肤上形成的孔道。用实体微针处理小鼠皮肤, 然后用金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, Sa)进行感染, 24 h后检测其血象, 以对照针处理小鼠为对照。考察实体微针刺入新生大鼠皮肤后对于皮肤纤维连接蛋白(fibronectin, FN)特殊结构域A(E III A⁺, 526 bp) mRNA表达变化的影响, 以探明皮肤在分子水平上的损伤情况, 并与对照针处理皮肤对比。最后将微针应用于志愿者皮肤, 以伊文思蓝(Evans blue)为模型药物, 观察微针刺入健康志愿者皮肤后刺入部位的变化情况。结果 实体微针刺入皮肤后能够在皮肤上形成真实的穿过皮肤角质层的孔道, 且针形不同形成的孔道也不同。微针在皮肤上形成的孔道不会促进Sa进入小鼠机体而引起感染, 也不会引起新生大鼠皮肤能够反映皮肤损伤的E III A⁺片段(526 bp)的异常表达。微针应用于志愿者皮肤后, 不会引起不良反应, 且形成的孔道在皮肤上保持时间较长。结论 实体微针刺入皮肤后能够在皮肤上形成一定大小的真实孔道, 这些孔道可充当药物透皮吸收的通道; 微针处理皮肤后不会引起机体感染和皮肤损伤。因此, 微针是一种高效、安全的促进药物透皮吸收的新技术, 可与透皮贴剂结合而将具有广泛的应用前景。

关键词: 实体微针; 透皮给药; 感染; 安全性

中图分类号: R944

文献标志码: A

文章编号: 1001-2494(2011)23-1818-05

作者简介: 李伟泽, 男, 博士, 讲师, 研究方向: 药物新型制剂; *通讯作者: 韩文霞, 女, 硕士, 助教, 研究方向: 生物技术与新药开发
Tel: (029) 86177510 E-mail: wenxiah@ yahoo. com. cn