

文章编号:1001-6880(2016)5-0724-05

载 10-甲氧基喜树碱缓释纳米粒的制备、表征与体外释药研究

李思阳¹,孔庆新¹,张 瑞²,王 洋^{2*}¹江苏食品药品职业技术学院,淮安 223003; ²东北林业大学盐碱地生物资源环境研究中心

东北油田盐碱植被恢复与重建教育部重点实验室,哈尔滨 150040

摘要:以高分子多聚物聚乳酸(PLA)为材料,10-甲氧基喜树碱(MeOCPT)为模型药物,采用乳化溶剂挥发法制备载10-甲氧基喜树碱缓释纳米粒,表征并考察其体外释药特性。透射电子显微镜观察缓释纳米粒具有明显的球状结构,确定了最佳投料比为0.02:1,平均粒径在100~250 nm之间,包封率和载药量分别为83.57±3.45%和3.10±1.19%,体外持续缓慢释放达48 h以上,累计释放率超过70%,缓释效果明显。以乳化溶剂挥发法成功制备的载10-甲氧基喜树碱缓释纳米粒,为聚乳酸作为药物缓控释载体的进一步研究提供依据,为难溶性小分子药物研究提供方向。

关键词:10-甲氧基喜树碱;纳米粒;制备;表征;体外释放

中图分类号:R283.6

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.5.015

Preparation, Characterization and *in vitro* Release Behavior of 10-Methoxycamptothecin-loaded Sustained Release Nanoparticles

LI Si-yang¹, KONG Qing-xin¹, ZHANG Rui¹, WANG Yang^{2*}¹ Jiangsu Food & Pharmaceutical Science College, Huai'an 223003, China; ² Alkali Soil

Natural Environmental Science Center, Northeast Forestry University, Key Laboratory of Saline-alkali Vegetation Ecology Restoration in Oil Field, Ministry of Education, Harbin 150040, China

Abstract: The polylactic acid(PLA) was used as the material with 10-methoxycamptothecin(MeOCPT) as model drugs, the sustained-release nanoparticles for MeOCPT was successfully prepared and characterized by emulsion solvent evaporation method. The sustained-release nanoparticles was obvious spherical structure by transmission electron microscopy (TEM) observations. The optimal ratio of MeOCPT to PLA was 0.02:1. The particle size distribution was 100-250 nm. The satisfactory encapsulation efficiency and drug-loading content were up to 83.57±3.45 and 3.10±1.19%, respectively. The *in vitro* release studies showed that 70% of MeOCPT was released from the sustained-release nanoparticles in the first 48 h which had obvious slow release effect. In conclusion, the sustained-release nanoparticles for MeOCPT were successfully prepared by emulsion solvent evaporation method which providing basis for further research of PLA as drug controlled release carrier and direction for the research of small molecular drugs.

Key words: 10-methoxycamptothecin; nanoparticles; preparation; characterization; *in vitro* release

喜树碱(camptothecin,CPT)是1966年由Wall等^[1]从我国植物喜树中分离纯化等到的一种天然生物碱,具有显著的抗癌活性^[2-4]。10-甲氧基喜树碱(MeOCPT)是一种喜树碱的天然衍生物,是CPT中A环中10位的-H被-OCH₃所取代,故命名为10-甲氧基喜树碱,其结构见图1。研究表明,MeOCPT对部分肿瘤细胞具有明显的抑制作用^[5,6],但由于其毒副作用大、结构不稳定、水溶性差以及生物利用

低等因素限制了其临床应用^[7]。因此,对药物进行结构修饰、改变药物剂型^[2]、研究新型药物载体系统以及给药方式成为关注的热点^[8]。

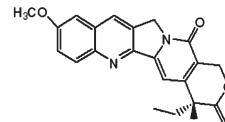


图1 MeOCPT的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of MeOCPT

近年来,作为抗肿瘤药物载体和传递系统的缓释纳米粒子^[9],由于其毒副作用小、能有效增加药

物的溶解度、增强药物疗效、具有明显的缓释效果和一定的靶向性等一系列优点,而备受国内外科研工作者的关注^[10]。PLA 是一种具有良好的生物可降解性的高分子材料,在美国被 FDA 批准应用于作心血管支架以及注射用微球、埋植剂等制剂的辅料^[11],其作为载体材料具有表面易修饰、载药量高以及易辅助识别等优点^[12-14]。

本研究以 PLA 为载体材料,以乳化溶剂挥发法制备载 MeOCPT 缓释纳米粒,并对其进行表征和体外释药特性研究,为该药物的体内研究提供数据支持,为其他难溶性小分子药物 PLA 缓释纳米粒的研究提供借鉴。

1 材料与仪器

1.1 试药

MeOCPT(由东北林业大学细胞生物学学科实验室合成,纯度 99%);聚乳酸(PLA,美国 Sigma 公司);聚乙烯醇(PVA,美国 Sigma 公司);乙腈、甲醇、二甲基亚砜为色谱纯(美国 Sigma 公司);水为超纯水;其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

H-7650 型透射电子显微镜(日本 Hitachi 公司);高效液相色谱系统(美国 Waters 公司);Brookhaven^PALS/90P Zeta PALS 型电位粒度分析仪(美国 Brookhaven 公司);FD5505 真空离心浓缩系统(美国 SIM 公司);Thermo C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm × 5 μm 美国赛默飞公司)。

2 方法与结果

2.1 载 MeOCPT 缓释纳米粒的制备

通过查阅有关参考文献^[15],影响以 PLA 为载体的纳米粒在制备的过程中主要受投料比和表面活性剂的浓度等因素影响。本研究通过预试验优化了制备载 MeOCPT 缓释纳米粒的条件,具体制备步骤如下:称取 6 mg MeOCPT、300 mg PLA 于 20 mL 三氯甲烷中(投料比为 0.02:1),磁力搅拌 45 min 至完全混匀后 110 W 持续超声 1 min,得到初级微乳。将该溶液倾倒于预冷的 25 mL 2% PVA/1% 六磷酸钠的混合溶液中,72 W 探头超声持续 1 min。将上述溶液倾倒于 50 mL 的异丙醇溶液中,磁力搅拌 5 h,尽可能使三氯甲烷完全挥发。将得到的乳液于 12000 rpm 离心 5 min,去上清,加入 30 mL 超纯水洗涤沉淀 3 次,用于去除沉淀表面残留的异丙醇溶

液,待沉淀完全干燥后,加入 3 mL 超纯水,涡旋使其分散均匀,液氮预冻后于-53 °C 下真空冻干 48 h,样品称重后-20 °C 密封保存。

2.2 粒度测定

粒度的大小及分布是纳米粒子表征的一项重要指标^[16],使用 PALS/90P Zeta PALS 型电位粒度分析仪分别测定空白纳米粒和载 MeOCPT 纳米粒的粒径大小及分布情况。分别取空白纳米粒冻干粉和载 MeOCPT 纳米粒冻干粉各 2 mg,置于 1.5 mL 离心管中,加入少量超纯水,涡旋使其分散均匀后,取 20 μL 混悬液于比色皿中,加超纯水至刻度线,对样品进行测定,每个样品重复测定 3 次,测定结果为:空白纳米粒和载 MeOCPT 纳米粒的粒径大小分别为 172.4 ± 47.5 nm 和 195.3 ± 46.7 nm,其粒径分布图见图 2。结果表明,与空白纳米粒相比,载 MeOCPT 纳米粒的粒径变化大小不明显,两者的粒度分布均在 100 ~ 250 nm 之间,符合临床安全用药范围。

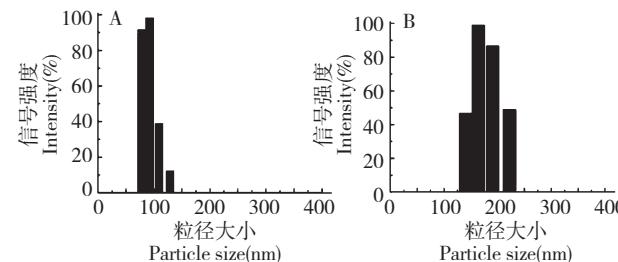


图 2 空白纳米粒(A)和载 MeOCPT 纳米粒(B)粒度分布图

Fig. 2 The size distribution of blank nanoparticles(A) and MeOCPT-loaded nanoparticles(B)

2.3 Zeta 电位测定

Zeta 电位是表征胶体分散系稳定性的重要指标,一般来说,分子或分散粒子越小,Zeta 电位(正或负)越高,体系越稳定,即溶解或分散可以抵抗聚集。本研究对载 MeOCPT 纳米粒的 Zeta 电位进行测定,结果显示,其 Zeta 电位为 -37.2 ± 1.5 mV,证明了这种纳米粒的稳定性并可长期保存。

2.4 透射电镜观察

分别称取 2 mg 空白纳米粒冻干粉和载 MeOCPT 纳米粒冻干粉于 2 个小离心管中,加入少量超纯水涡旋使其分散均匀,取 30 μL 溶液滴于铜网上,用 0.1% (w/v) 的磷钨酸溶液染色,静置吸附 10 min,取出铜网,静置 1 h 将溶液晾干,在透射电镜下分别观察纳米粒的微观形态,记录图像,其图像结果见图 3。

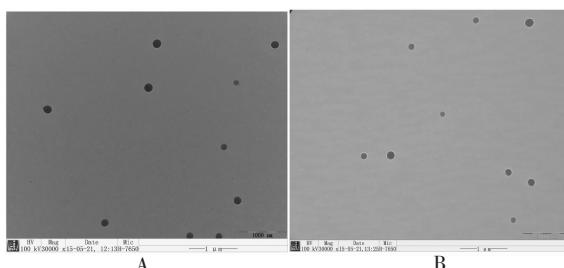


图3 空白纳米粒(A)和载 MeOCPT 纳米粒(B)透射电子显微镜图片

Fig. 3 The TEM images of blank nanoparticles (A) and MeOCPT-loaded nanoparticles (B)

由图3可以看出,以PLA为载体的MeOCPT纳米粒呈明显的球状结构,大小均匀,表面光滑,粒径在200 nm左右,与粒径分布的结果相吻合。此外,PLA载药系统能够很好的装载MeOCPT模型药物,与空白纳米粒相比仍然在结构形状大小等方面没有明显的差异,有效地证明了该载药系统的稳定性。

2.5 包封率和载药量测定

2.5.1 HPLC 色谱条件及标准曲线的确定

HPLC色谱条件的确定:选用Thermo C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);A泵流动相为水(含5%乙腈),B泵为乙腈,采用梯度洗脱方式:0~12 min, 80% A; 12~15 min, 80%~40% A; 15~19 min, 40%~10% A; 19~25 min, 10%~80% A; 25~30 min, 80% A。柱温为室温,流速1.2 mL/min,进样体积20 μL。经2475型荧光检测器检测确定其激发波长E_x=380 nm,检测波长E_m=515 nm。

标准曲线的确定:精密称取MeOCPT粉末10 mg于10 mL容量瓶中,加二甲基亚砜超声溶解,即得1 mg/mL标准溶液。将该标准溶液分别稀释至5、10、20、40、80 ng/mL系列溶液,通过确定的HPLC色谱条件对系列溶液的浓度进行测定,在该色谱条件下MeOCPT峰型良好,保留时间为10.52 min。以MeOCPT质量浓度为横坐标,荧光峰面积为纵坐标进行线性回归,得到标准曲线方程y=1160.5x+2.1783,R²=0.9996,线性范围5~80 ng/mL。

2.5.2 包封率和载药量的测定

准确称取5 mg载MeOCPT纳米粒冻干粉末三份置于10 mL容量瓶中,加入二甲基亚砜超声溶解,定容。用甲醇溶液稀释100倍,通过确定的HPLC色谱条件测定其荧光峰面积,根据“2.5.1”标准曲线y=1160.5x+2.1783计算MeOCPT的含量,并根

据公式(1)和(2)计算包封率和载药量。

$$\text{包封率}(\%) = \frac{\text{MeOCPT 检测量}}{\text{MeOCPT 投药量}} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{载药量}(\%) = \frac{\text{MeOCPT 检测量}}{\text{纳米粒冻干粉称重质量}} \times 100\% \quad (2)$$

经计算,求得载MeOCPT纳米粒的包封率和载药量分别为83.57±3.45%和3.10±1.19%。结果证实了这种载MeOCPT纳米粒的包封率和载药量较高,能够实现药物的有效运载。

2.6 体外释药研究

2.6.1 MeOCPT-PBS 标准曲线绘制

精密称取10 mg MeOCPT粉末,用二甲基亚砜超声溶解定容至10 mL容量瓶中,即得到1 mg/mL MeOCPT标准溶液。将该标准溶液用PBS缓冲液分别稀释至20、40、80、160、320 ng/mL的标准溶液。采用“2.5.1”项下HPLC色谱条件检测上述不同浓度条件下的荧光检测峰面积。在该条件下,色谱峰型良好,保留时间为2.83 min。以MeOCPT质量浓度为横坐标,荧光检测峰面积为纵坐标进行线性回归,得标准曲线方程Y=7863.5X-79526, R²=0.9979,线性范围20~320 ng/mL。

2.6.2 体外释放

称取2 mg载MeOCPT纳米粒冻干粉,置于10 mL离心管中,加入5 mL超纯水涡旋使其分散均匀后,取1 mL混悬液于处理好的透析袋内,密封。将透析袋置于装有25 mL PBS释放介质(pH=7.4)的棕色小瓶内置于37 °C恒温培养箱中,磁力搅拌。分别在0.08、0.16、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、5、6、8、10、12、18、24、36、48 h等不同时间点取3 mL释放液备用并补充等体积新鲜的PBS缓冲液。采用采用“2.5.1”项下HPLC色谱条件,检测上述不同时间点采集的释放液体的荧光峰面积,根据“2.6.1”标准曲线Y=7863.5X-79526计算MeOCPT的含量,计

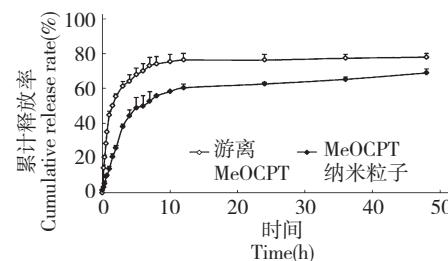


图4 游离 MeOCPT 和载 MeOCPT 纳米粒的体外释放曲线

Fig. 4 *In vitro* release of free MeOCPT and MeOCPT-loaded nanoparticles

算出累计释放率,见图 4。

从图 4 中可以看出,游离 MeOCPT 释放速度较快,约 6 h 累计释放就超过了 70%,而载 MeOCPT 纳米粒则缓慢持续释放,经过 48 h 后,累计释放率超过 70% 且仍有缓慢增加趋势。结果表明,该 MeOCPT 纳米粒具有明显的缓释效果和持续的释放特性,为其体内的药代动力学研究提供数据支撑。

2.7 长期稳定性试验

取置于-20 ℃冰箱中密封保存 6 个月的冻干粉样品,按照“2.2”、“2.3”、“2.5”项下内容,分别测定载 MeOCPT 纳米粒的粒度大小、Zeta 电位以及包封率和载药量等结果,并与原样品进行比较,重新进行 3 次,其四项数据结果分别为,原样品:195.3 ± 46.7 nm,-37.2 ± 1.5 mV、83.57 ± 3.45%、3.10 ± 1.19%;保存 6 个月的冻干粉样品:198.6 ± 52.4 nm,-37.8 ± 1.2 mV、82.48 ± 4.20%、3.22 ± 1.86%。该结果表明,在低温长期保存中,该纳米粒主要表征指标没有发生明显变化,证明了该纳米粒具有一定的长期稳定性。

3 讨论

MeOCPT 是喜树碱的天然衍生物,目前针对其药理、药化和抗癌活性等方面的研究逐渐增多,广泛引起了各国学者的研究与关注。然而,由于其本身具有较强的毒副作用作用,体内不稳定等特性,往往导致其生物利用率降低。随着缓控释技术的发展,众多学者纷纷通过微胶囊、微泡、纳米颗粒以及脂质体等新型载药体系传递药物,这些给药系统能够有效携带药物分子并保持药物的稳定性,达到缓释控释的效果。此外,MeOCPT 对部分肿瘤细胞具有明显的抑制作用,具有一定的开发利用前景,为了克服其药物本身缺陷,因此开发其第四代新型缓控释制剂显得十分必要。

本研究以天然高分子 PLA 为载体材料,其广泛应用于现代缓控释制剂中,是被批准的药用辅料之一。以乳化溶剂挥发法制备的载 MeOCPT 纳米粒,该方法试验简单、条件温和,容易制备出稳定的纳米颗粒。采用 HPLC 法来测定纳米粒的包封率、载药量和体外释放特性,结果更加准确、可靠。试验结果表明,该纳米粒具有较高的包封率和载药量,较强的缓释性能。这些研究为进一步开展载 MeOCPT 纳米粒的体内药代动力学研究提供了数据支持,为聚乳酸作为药物缓控释载体的进一步研究提供依据,为

毒副作用大、不稳定的药物研究提供方向。

参考文献

- Wall ME, Wani MC, Cook CE, et al. Plant antitumor agents. I. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*. *J Am Chem Soc*, 1966, 88:3888-3890.
- Li SY(李思阳), Kong QX(孔庆新), Wang Y(王洋). Preparation, characteristics of imaging and *in vitro* release of 10-hydroxycamptothecin-loaded microbubbles. *Chin Tradit Patent Med* (中成药), 2014, 36(10):49-53.
- Fan B(范博), Zhang R(张瑞), Yu T(于涛), et al. Preparation and characterization of controlled-release formulations for methoxycamptothecin nanoparticles. *Mod Agric Sci Tech* (现代农业科技), 2015, 8:173-179.
- Liehr JG, Harris NJ, Mendoza J, et al. Pharmacology of camptothecin esters. *Ann NY Acad Sci*, 2000, 922:216-223.
- Zhang R(张瑞). Preparation and characterization of controlled-release formulations for methoxycamptothecin nanoparticles. Haerbin: Northeast Forestry University(东北林业大学), PhD. 2013.
- Lin LZ(林隆泽), Zhao ZY(赵志远), Xu RS(徐任生). Chemical constituents of the anticancer plant *Camptotheca acuminata* Decne. *Acta Chim Sin* (化学学报), 1977, 35: 227-231.
- Zheng J(郑健). Pharmacokinetic studies of 10-methoxy-camptothecin in rats. Harbin: Northeast Forestry University(东北林业大学), PhD. 2013.
- Sanchez A, Tobio M, Gonzalez L, et al. Biodegradable micro- and nanoparticles as long-term delivery vehicles for interferon-alpha. *Eur J Pharm Sci*, 2003, 18:221-229.
- Huang QY(黄秋燕), Zhang HL(张宏亮), Wang J(王捷), et al. Preparation and characterization of Chitosan-Kudingcha nanoparticles. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2015, 21(6):11-13.
- Luan SW(栾淑伟), Zhao Q(赵青), Cheng HF(程慧芳), et al. PEGylated nanostructured lipid carriers loaded with artemisinin: *in vitro* releasing characteristics and uptake by mononuclear phagocyte macrophage. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2015, 27:163-168.
- Yang XL(杨小玲), Wang S(王珊), Meng XH(孟小华). Preparation and characterization of a novel copolymer of starch grafting polylactic acid. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2009, 21:1036-1038.
- Li SY(李思阳), Kong QX(孔庆新), Wang Y(王洋). Preparation and *in vitro* release of CZ48 sustained-release nanoparticles. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2014, 19(10):5-7.

(下转第 734 页)