以叶酸修饰的乳酸-羟基乙酸共聚物为载体的紫杉醇靶向纳米粒的构建与评价

吴燕,田姗,孔健,徐荣
(空军总医院药学部,北京 100142)

摘要:目的 以叶酸修饰的生物可降解材料乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA-PEG-FOL)为载体,构建紫杉醇靶向纳米粒并进行评价。**方法** 采用乳化-分散法,以溶液稳定性、粒径和包封率为评价指标,通过考察乳化剂的用量、有机相种类、水相与有机相比例、聚合物分子量、药载比、剪切速度等因素对纳米粒制备的影响,确定最优处方和制备工艺,并对纳米粒的形态、粒径、Zeta电位、包封率及载药量进行评价。**结果** 合成了载体 PLGA-PEG-FOL;制备的紫杉醇靶向纳米粒为均匀球形粒子,粒径为(88.2±6.7)nm,Zeta 电位为(56.5±4.2)mV,包封率为(92.9±3.2)%,载药量为(4.8±1.3)%。**结论** 纳米粒制备方法简便易行,重现性好。制备的纳米粒大小均匀,粒度分布较窄,包封率和载药量较高。

关键词:紫杉醇;乳酸-羟基乙酸共聚物;纳米粒;乳化-分散法
doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2016.10.010

Establishment and evaluation of targeted paclitaxel nanoparticles with PLGA-PEG-FOL as the carrier

WU Yan, TIAN Shan, KONG Jian, et al
(*Department of Pharmacy, The Air Force General Hospital, Beijing* 100142, *China*)

Abstract: Objective To prepare and evaluate the targeted paclitaxel nanoparticles with biodegradable materials of lactic acid-glycolic acid copolymer modified by folic acid (PLGA-PEG-FOL) as the carrier. **Methods** The emulsification-dispersion method was used to prepare nanoparticles. The optimum prescription and preparation technology were determined by investigating the influence of the dosage of emulsifiers, the species of organic phase, the proportion of water phase and organic phase, molecular weight of polymer, the proportion of drug particle size and the entrapment efficiency. The nanoparticles were evaluated in terms of the morphology of nanoparticles, particle size, Zeta potential, entrapment efficiency and drug-loading rate. **Results** PLGA-PEG-FOL was successfully synthesized. The targeted nanoparticle was uniform spherical particle. The particle size was (88.2±6.7) nm, Zeta potential was (56.5±4.2) mV, the entrapment efficiency was (92.9±3.2)%, and the drug-loading rate was (4.8±1.3)%. **Conclusions** The preparation method of nanoparticles was simple and reproducible. The particle size of nanoparticles was uniform with a narrow size distribution. The entrapment efficiency and drug loadings were high.

Key words: Paclitaxel; PLGA-PEG-FOL; Nanoparticles; Emulsification-dispersion method

肿瘤多药耐药(Multi-drug resistance, MDR)和化学药物对肿瘤组织的低选择性是临床上化疗失败的主要原因[1]。紫杉醇(paclitaxel, PTX)是被美国食品药品监督管理局(FDA)及欧洲药品管理局(EMA)批准的用于治疗乳腺癌和卵巢癌的一线化学药物。其难溶于水(<6 mg·L^{-1}),口服生物利用度差[2]。临床以聚氧乙烯蓖麻油和乙醇溶解后给药,给药后存在严重过敏反应、肾毒性、神经毒性、心脏毒性等不良反应,使其临床应用受到限制[3-4]。为了解决紫杉醇溶解性和探索逆转肿瘤多药耐药性的新途径,我们以叶酸修饰的生物可降解材料乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA-PEG-FOL)为载体,以泊洛沙姆(Pluronic F68)、卵磷脂和双十二烷基二甲基溴化铵(DDAB)为乳化剂来构建紫杉醇靶向纳米粒。探索叶酸介导的载药系统在叶酸主动靶向能力、长循环纳米粒的被动靶向作用、Pluronic F68 克服耐药作用,三者协同增效后临床应用的可行性;希望在靶向缓释技术改善肿瘤治疗现状的应用基础研究方面取得一些重要的创新性成果。

1 仪器与材料

紫外分光光度计(型号:UV-2401,日本岛津);高效液相色谱仪(美国 Agilent);傅里叶变换红外光

基金项目:全军医学科技青年培育项目(13QNP079)
作者简介:吴燕,女,副主任药师,硕士生导师,研究方向:缓控释及靶向给药系统研究,E-mail:yanjiushi1010@126.com
通信作者:徐荣,女,副主任药师,研究方向:医院药学管理,E-mail:xurong2008-12@163.com

谱仪(型号:Nicolet 5700,美国热电公司);核磁共振谱仪(BRUKER AV-III-500 ^{1}H-NMR);电子分析天平(型号:BS110S,Sartorius);10K 超滤离心管(美国 Millipore);LC-4016 型低速离心机(上海资一仪器设备有限公司);冷冻干燥机(北京四环科学仪器厂);纳米粒度仪(型号:Winner802,济南微纳);透射电子显微镜(型号:JEM-1400plus,日本 JEOL);B25 高速剪切机;紫杉醇(江苏红豆杉药业有限公司,含量 99.4%);聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA,端羧基,75:25,Mr = 1.1 万,济南岱罡生物工程有限公司);H_2N-PEG-NH_2(Mr = 2000,嘉兴博美生物技术有限公司);双十二烷基二甲基溴化铵(DDAB,美国 Sigma 公司);Pluronic F68(德国 BASF 公司);溶血卵磷脂(MSPC,上海艾伟特);N,N'-二环已基碳二亚胺(DCC)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS,Fluka 公司);叶酸(FOL,Sigma);乙腈为色谱纯。

2 方法与结果

2.1 叶酸修饰载体 PLGA-PEG-FOL 的合成[5-6]

2.1.1 PLGA-PEG-NH_2 的合成 取 5 g PLGA 溶于二氯甲烷中,加入 206 mg DCC 和 115 mg NHS,于室温在氮气中活化 24 h(PLGA/NHS/DCC 摩尔比为 1:2:2)。将合成溶液加至冰冷的二乙醚中进行过滤和沉淀,并将活化的 PLGA 于真空中完全干燥。将溶有活化的 PLGA(1 g)的 8 mL 二氯甲烷溶液,滴加至 2 mL 溶有 2.1 g H_2N-PEG-NH_2 的二氯甲烷溶液中,边加边缓慢搅拌。在氮气中反应 6 h(PLGA/H_2N-PEG-NH_2 摩尔比为 1:5),通过加入冰冷的二乙醚进行沉淀。对沉淀的胺端基二嵌段共聚物(PLGA-PEG-NH_2)进行过滤和干燥。

2.1.2 PLGA-PEG-FOL 的合成 取 500 mg PLGA-PEG-NH_2、13 mg FOL 和 13 mg DCC,溶于 5 mL 二甲基亚砜(DMSO)中,室温反应 7 h,然后加入 50 mL 蒸馏水,3 000 r · min^{-1}离心。弃去沉淀,取上清液进行透析和干燥,即得 PLGA-PEG-FOL。

2.2 叶酸修饰载体 PLGA-PEG-FOL 的表征

2.2.1 PLGA-PEG-FOL 的红外光谱检测 图 1 红外光谱图显示:PLGA-PEG-FOL 除显示了乳酸-羟基乙酸共聚物的全部吸收峰以外,还在 1 627 cm^{-1}和 1 577 cm^{-1}新出现了苯环骨架振动引起的特征吸收峰[7],说明叶酸成功连接到乳酸-羟基乙酸共聚物高分子链上[8]。

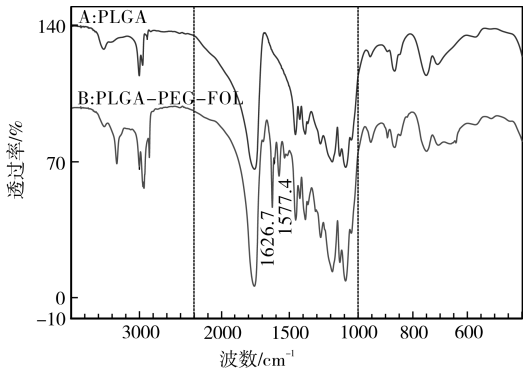

图 1 叶酸修饰 PLGA-PEG-FOL 的红外光谱

2.2.2 PLGA-PEG-FOL 的 ^{1}H 核磁共振检测 从图 2 及氢质子峰归属显示,叶酸修饰乳酸-羟基乙酸共聚物的制备成功[9]。

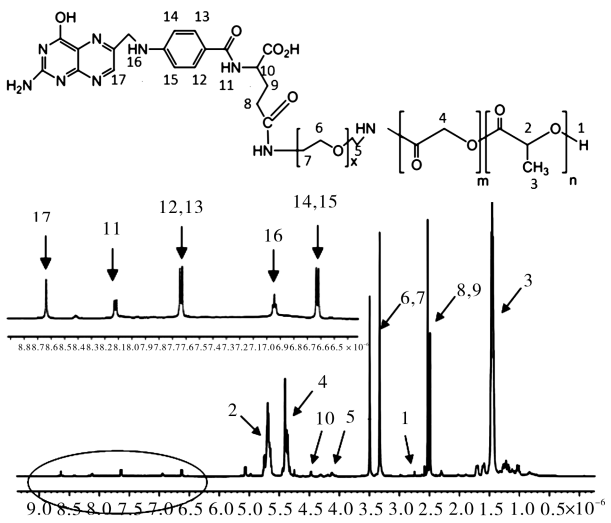

图 2 叶酸修饰乳酸-羟基乙酸共聚物的 ^{1}H 核磁共振谱图

2.3 紫杉醇纳米粒的制备

2.3.1 乳化剂用量的影响 固定有机相为二氯甲烷,水相与有机相的比例为 2:1(v/v),药载比为 1:10(w/w),考察加入乳化剂的用量对制剂稳定性的影响。结果表明,乳化剂用量分别为 MSPC 0.01%(w/v)、Pluronic F68 0.1%(w/v)、DDAB 0.4%(w/v)时,乳化剂用料较少且所制备的纳米粒包封率较高、粒径较小。具体见表 1。

2.3.2 有机相种类的影响 固定水相与有机相的比例为 2:1(v/v),药载比为 1:10(w/w),乳化剂用量分别为 MSPC 0.01%(w/v)、Pluronic F68 0.1%(w/v)、DDAB 0.4%(w/v),考察不同有机相种类(二氯甲烷、丙酮、乙酸乙酯)对纳米粒包封率和粒径的影响。结果表明,相同条件下二氯甲烷制备的制剂包封率较高且粒径较小,故选择二氯甲烷作为有机相溶剂。具体见表 2。

表 1 乳化剂用量对纳米粒包封率和粒径的影响

MSPC (w/v) /%	Pluronic F68 (w/v) /%	DDAB (w/v)/%	包封率/ (%, $\bar{x} \pm s$)	粒径/ (nm, $\bar{x} \pm s$)
0.005	0.10	0.4	80.3 ±1.7	166.2 ±12.4
0.010	0.10	0.4	92.5 ±2.9	89.1 ±6.2
0.020	0.10	0.4	91.8 ±3.3	82.1 ±5.4
0.010	0.05	0.4	87.7 ±2.3	139.0 ±9.3
0.010	0.10	0.4	92.5 ±2.9	89.1 ±6.2
0.010	0.20	0.4	92.6 ±3.6	107.2 ±7.0
0.010	0.10	0.2	82.3 ±2.5	180.2 ±14.1
0.010	0.10	0.4	92.5 ±2.9	89.1 ±6.2
0.010	0.10	0.6	93.0 ±3.8	86.2 ±5.3

表 2 有机相种类对纳米粒包封率和粒径的影响/$\bar{x} \pm s$

有机相种类	包封率/%	粒径/nm
二氯甲烷	92.5 ±2.9	89.1 ±6.2
丙酮	85.3 ±4.4	178.9 ±5.2
乙酸乙酯	90.4 ±3.8	130.1 ±3.1

2.3.3 水相与有机相比例的影响 固定有机相为二氯甲烷,药载比为 1∶10(w/w),乳化剂用量分别为 MSPC 0.01%(w/v)、Pluronic F68 0.1%(w/v)、DDAB 0.4%(w/v),考察不同水相与有机相比例(W/O 分别为 1∶1、2∶1、3∶1,v/v)对纳米粒包封率和粒径的影响。结果表明,随着 W/O 的减小,纳米粒包封率增加,但同时粒径明显增大。综合考虑,选择 W/O(2∶1,v/v)来制备纳米粒。具体见表 3。

表 3 水相与有机相比例对纳米粒包封率和粒径的影响/$\bar{x} \pm s$

水相与有机相比例(W/O,v/v)	包封率/%	粒径/nm
1∶1	94.1 ±1.5	202.0 ±7.3
2∶1	92.5 ±2.9	89.1 ±6.2
3∶1	85.5 ±2.9	63.1 ±4.8

2.3.4 聚合物分子量的影响 固定有机相为二氯甲烷,水相与有机相的比例为 2∶1(v/v),药载比为 1∶10(w/w),乳化剂用量分别为 MSPC 0.01%(w/v)、Pluronic F68 0.1%(w/v)、DDAB 0.4%(w/v),考察不同分子量(Mr 分别为 1.1、2.5、4.5 万)聚合物对纳米粒包封率和粒径的影响。结果表明,随着 PLGA 分子量的增加,包封率无明显变化,粒径明显增大。故选择 Mr = 1.1 万的 PLGA 作为载体材料。具体见表 4。

表 4 聚合物分子量比例对纳米粒包封率和粒径的影响/$\bar{x} \pm s$

聚合物分子量/万	包封率/%	粒径/nm
1.1	92.5 ±2.9	89.1 ±6.2
2.5	91.8 ±3.5	169.7 ±9.0
4.5	92.2 ±3.9	220.1 ±7.4

2.3.5 药载比的影响 固定有机相为二氯甲烷,水相与有机相的比例为 2∶1(v/v),乳化剂用量分别为 MSPC 0.01%(w/v)、Pluronic F68 0.1%(w/v)、DDAB 0.4%(w/v),考察不同药载比(1∶8、1∶10、1∶12,w/w)对纳米粒径和包封率的影响。结果表明,随着药载比的减小,包封率逐渐增加,但同时粒径也逐渐增大。综合考虑,选择药载比(1∶10,w/w)来制备纳米粒。具体见表 5。

表 5 药载比对纳米粒包封率和粒径的影响/$\bar{x} \pm s$

药载比(w/w)	包封率/%	粒径/nm
1∶8	93.6 ±2.1	152.6 ±5.5
1∶10	92.5 ±2.9	89.1 ±6.2
1∶12	87.7 ±4.5	71.4 ±4.2

2.3.6 剪切速度的影响 固定水相与有机相的比例为 2∶1(v/v),药载比为 1∶10(w/w),乳化剂用量分别为 MSPC 0.01%(w/v)、Pluronic F68 0.1%(w/v)、DDAB 0.4%(w/v),考察不同剪切速度(10 000、13 000、16 000 $r \cdot min^{-1}$)对纳米粒径和包封率的影响。结果表明,随着剪切速度的增大,粒径逐渐减小,但包封率先增大后减小,故选择 13 000 $r \cdot min^{-1}$ 的剪切速度来制备纳米粒。具体见表 6。

表 6 剪切速度对纳米粒包封率和粒径的影响/$\bar{x} \pm s$

剪切速度/ $r \cdot min^{-1}$	包封率/%	粒径/nm
10 000	84.2 ±4.0	144.5 ±6.2
13 000	92.5 ±2.9	89.1 ±6.2
16 000	87.3 ±4.5	63.1 ±4.8

2.4 最优处方工艺验证 根据上述试验结果,确定最优处方和制备工艺为:采用乳化-分散法,精密称取 100 mg PLGA-PEG-FOL、10 mg 紫杉醇和 25 mg Pluronic F68,加入 25 mL 二氯甲烷,超声溶解后作为油相;精密称取 5 mg MSPC、25 mg Pluronic F68 和 2% DDAB 水溶液 10 mL,加入 40 mL 蒸馏水,水浴加热(65 ℃)溶解后作为水相。在高速剪切机搅拌下将油相缓慢加至水相中形成 O/W 乳液,滴加完

毕后继续高速剪切 3 ~ 5 min。将该乳剂在磁力搅拌下加入适量的水,继续搅拌过夜使二氯甲烷完全挥发。将所得纳米粒混悬液先低速离心(1 000 r·min^{-1},20 min)除去大颗粒聚集物,再置超滤管中离心(3 500 r·min^{-1},30 min),收集沉淀,冷冻干燥即得。

2.5 冷冻干燥工艺考察 为了得到分散性和流动性较好的粉末,分别考察了不加冻干保护剂、加入甘露醇、蔗糖两种不同冻干保护剂,以及加入不同浓度冻干保护剂(3%、5%、7%,w/v)对冻干产物外观和流动性的影响。结果表明,加入 5% 蔗糖时,得到的冻干产物为流动性较好的淡黄色粉末。

2.6 纳米粒形态观察 取冻干的纳米粒适量,加蒸馏水稀释至适宜浓度,取 1 ~ 2 滴纳米粒胶态混悬液置于铜网上,用 1.5% 磷钨酸溶液染色,室温晾干,于透射电子显微镜下观察纳米粒的形态并拍照。从图 3 中可以看出,制备的纳米粒为球形粒子,大小均匀。

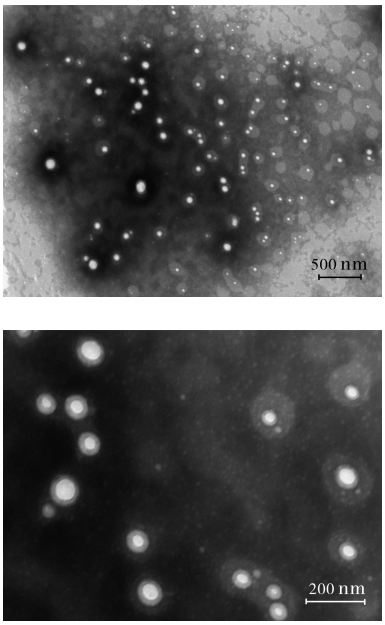

图 3 载药纳米粒透射电镜图(1.5% 磷钨酸溶液染色)

2.7 纳米粒粒径和 Zeta 电位测定 称取适量冻干纳米粒,加一定量的蒸馏水稀释,取 1 mL 溶液加入纳米粒度仪的样品池中,测定粒径及粒度分布。结果表明,纳米粒的平均粒径为(88.2 ± 6.7) nm,粒度分布较窄。见图 4,Zeta 电位(56.5 ± 4.2) mV。

2.8 纳米粒载药量和包封率的测定

2.8.1 *色谱条件* 色谱柱:C_{18}柱(Venusil XBP 150 mm × 4.6mm,5μm);流动相:乙腈∶水 = 50∶50;检

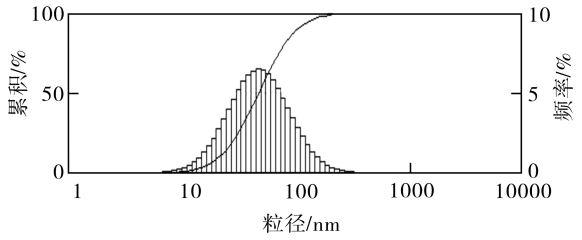

图 4 纳米粒的粒径及粒度分布图

测波长:227 nm;柱温:25 ℃;流速:1.0 mL·min^{-1};进样量:10 μL。

2.8.2 *系统适用性试验* 取本品适量,以流动相配制成 100 mg·L^{-1}的溶液,平行配制 6 份,作为供试品溶液进行测定。主峰峰面积的 RSD = 0.652%,主峰保留时间的 RSD = 0.069%,主峰的拖尾因子 < 2.0,主峰的理论塔板数 > 3 000,结果表明,该方法系统适用性良好。

2.8.3 *专属性* 在选定的色谱条件下,处方中的辅料不干扰主药的测定。

2.8.4 *方法的精密度* 为了验证方法的精密度进行了进样精密度、重复性和中间精密度试验。(1)进样精密度:取本品适量,以流动相配制成 100 mg·L^{-1}的溶液,作为供试品溶液,连续进样 6 针。其 RSD = 0.064%,结果表明,该方法进样精密度良好。(2)重复性:取本品适量,以流动相配制成 100 mg·L^{-1}的溶液,平行配制 6 份,作为供试品溶液。分别进行 HPLC 测定,其 RSD = 0.994%,结果表明,该方法重复性良好。(3)中间精密度:取重复性试验中所制备的 6 份同一浓度的供试品溶液作为供试品;分别取 6 份供试品溶液和 1 份对照品溶液,在不同时间,由不同的实验人员连续进行测定,结果表明本方法具有良好的中间精密度(RSD = 0.791%)。

2.8.5 *线性范围* 取本品约 10 mg,精密称定,置 50 mL 量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,配成 200 mg·L^{-1}的母液,精密量取母液 1、2、3、4、5、6、7 mL,分别置 10 mL 量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,制成相当于检测浓度的 20%、40%、60%、80%、100%、120%、140% 溶液,依法测定,记录峰面积,以峰面积对浓度绘制回归曲线。结果表明,浓度在20 ~ 140 mg·L^{-1}范围内线性关系良好,其回归方程为:$Y = 20.177\ 4X - 4.5143$,$R^2 = 0.999\ 9$。

2.8.6 *溶液稳定性* 取本品约 10 mg,精密称定,置 100 mL 量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,配制成 100 mg·L^{-1}的供试品溶液,测定了连续 8 h 的溶液稳定性。结果表明,溶液在 8 h 之内可保

持稳定(RSD =0.199%)。

2.8.7 回收率 准确称取空白纳米粒 9 份,每份 100 mg,依次加入 PTX 标准溶液配制成浓度为 80%、100%、120%的供试品溶液各 3 份,分别测定其含量,将实测值与理论值比较,计算回收率。结果表明,三个浓度的平均回收率分别为 100.4%、101.1%、100.7%,9 个回收率数据的 RSD 为 0.431%,回收率良好。具体见表 7。

表 7 回收率试验结果

序号	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%
1	4.0	4.01	100.2	
2	4.0	4.03	100.8	100.4
3	4.0	4.01	100.2	
4	5.0	5.03	100.6	
5	5.0	5.07	101.4	101.1
6	5.0	5.06	101.2	
7	6.0	6.06	101.0	
8	6.0	6.04	100.7	100.7
9	6.0	6.02	100.3	

2.8.8 检测限和定量限 采用信噪比法对方法的检测限和定量限进行了测评:检测限为 0.2 mg · L^{-1}(信噪比 3:1);定量限为 0.4 mg · L^{-1}(信噪比 10:1)。

2.8.9 载药量和包封率的测定[10] 称取冻干样品适量分散于蒸馏水中,加入适量乙腈超声使纳米粒完全溶解,测定 PTX 含量($W_{包}$),按下式计算纳米粒的载药量(DL%)与包封率(EE%):

载药量(DL%) = $W_{包}/W_{总} \times 100\%$

包封率(EE%) = $W_{包}/W_{药} \times 100\%$

式中 $W_{包}$:纳米粒中包裹药物量(mg);$W_{总}$:纳米粒的总重量(mg);$W_{药}$:投入的总药量(mg)。

取 3 批冻干样品依法测定,包封率为(92.9 ± 3.2)%,载药量为(4.8 ± 1.3)%。

3 讨论

3.1 制备纳米粒的方法选择 预实验采用乳化-溶剂挥发法,用超声波细胞粉碎机进行探头超声制备纳米粒。此方法每次制备体积很小(2 mL),操作繁琐,且由于超声探头在溶液中的位置无法精密控制,导致重现性差。而乳化-分散法制备体积较大(50 ~ 100 mL),简便易行,重现性好,故选择此法制备纳米粒。

3.2 乳化剂的选择

3.2.1 MSPC 的选择 MSPC 是普通磷脂在磷脂酶 A2 的作用下失去一分子脂肪酸链所得的产物,具有很好的水分散性,适于制备 O/W 型乳状液[11]。MSPC 乳化油脂的能力是普通磷脂的 5 倍左右,且在高温、低温下的乳化稳定性都大于普通磷脂[12],因此本研究选择 MSPC 作为乳化剂。

3.2.2 Pluronic F68 的选择 聚氧乙烯-聚氧丙烯-聚氧乙烯三嵌段共聚物(商品名为 Pluronics),是美国 FDA 批准的药用辅料,在药物制剂领域通常作为乳化剂[13]。Pluronic 嵌段共聚物在体内外均能显著提高多药耐药肿瘤细胞对抗肿瘤药物的增敏作用,并促进药物跨过血脑屏障和肠屏障[14]。细胞研究发现,Pluronic F68 是多药耐药蛋白 P-糖蛋白的有效抑制剂[15]。因此,试验选择 Pluronic F68 作为乳化剂,同时用于逆转肿瘤的多药耐药性,以提高药物的疗效。

3.2.3 DDAB 的选择 DDAB 作为乳化剂制备的纳米粒子带有阳离子电荷,有利于纳米粒与阴离子黏多糖富集的生物组织发生电荷相互作用,从而有利于对纳米粒的滞留和摄取[16]。所以本研究选择 DDAB 作为乳化剂来制备纳米粒。

参考文献

[1] Liu D,Liu F,Liu Z,et al. Tumor specific delivery and therapy by double-targeted nanostructured lipid carriers with anti-VEGFR-2 antibody[J]. Molecular Pharmaceutics,2011,8(6):2291-2301.

[2] Koo H,Min KH,Lee SC,et al. Enhanced drug-loading and therapeutic efficacy of hydrotropic oligomer-conjugated glycol chitosan nanoparticles for tumor-targeted paclitaxel delivery[J]. Journal of Controlled Release,2013,172(3):823-831.

[3] 陈孟夏,尹登科,梁杰,等. 紫杉醇新剂型的研究进展[J]. 安徽医药,2014,18(4):602-605.

[4] 李世伟,季楚舒,何义富. 紫杉醇方案治疗晚期食管癌的临床研究进展[J]. 安徽医药,2012,16(11):1561-1563.

[5] 刘日钊,谢民强. 叶酸修饰的纳米材料在肿瘤靶向治疗中的应用研究进展[J]. 中国医药生物技术,2015,10(4):297-302.

[6] Chen J,He H,Li S,et al. An HPLC method for the pharmacokinetic study of vincristine sulfate-loaded PLGA-PEG nanoparticle formulations after injection to rats[J]. Journal of Chromatography B,2011,879(21):1967-1972.

[7] 张慧珠,高福平,杨心督,等. 壳聚糖 - 脱氧胆酸及其叶酸偶联体的表征及自组装特性研究[J]. 功能材料,2008,39(3):465-468.

[8] 肖苏尧,童春义,刘选明,等. 肿瘤靶向性药物载体叶酸 - 淀粉纳米颗粒的研制与应用[J]. 科学通报,2006,51(10):1151-1155.

[9] 凌友,黄岳山,梁常艳,等. 叶酸修饰乳酸 - 羟基乙酸共聚物纳米粒的制备及性能表征[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2008,12(36):7049-7052.

[10] 吉顺莉,戈延茹,金一. 紫杉醇 PLGA 口服纳米粒的制备及生物利用度的研究[D]. 镇江:江苏大学,2010.