



## 聚乳酸载药纳米球的制备工艺及性能研究

纳米载药体系包括纳米粒子和纳米胶囊,它们是粒径为 $10\sim 500$  nm之间的固体胶状粒子,活性组分(药物、生物活性材料等)通过溶解、包裹作用位于粒子内部或者通过吸附、附着作用位于粒子表面,该系统可增溶疏水性药物,保护药物活性,增加药物稳定性,改变药物在体内的分布,增加药物在靶向器官中的积累,提高治疗指数,减少毒副作用等[1][2][3][4]。由载体材料和药物组成的纳米载药控释系统应满足以下标准:(1)必须保持或聚集在指定的位置;(2)必须在指定的位置以适当的速度释放药物;(3)用药的稳定和方便必须是药学上可接受的;(4)如果用于肠道外必须是无菌的;(5)组成载药系统的载体材料必须是无毒、可降解的。制备纳米微球的方法主要有两种:第一种是以不同单体通过聚合反应制备,如乳液聚合和界面聚合法;第二种是载体材料分散法,即将药物和高分子载体混合后,通过分散介质与溶剂的物理化学作用分散制得,常用的方法有超声乳化-溶剂挥发法[5][6][7]和盐析凝聚法[8]。纳米释药体系中的药物释放机制是药物通过囊壁沥滤、渗透和扩散出来;也可以是基质本身的溶蚀而使其中的药物释放出来[9]。纳米载药体系是一种非常有前途的体系,对某些疾病已显示出极好的疗效,但目前还处在研究和动物体内实验阶段[10][11]。聚乳酸作为一种可生物降解的生物医学高分子材料,在人体内降解的最终产物是 $\text{CO}_2$ 、水,具有良好的生物相容性,降解产物可通过肾脏排出体外。灰黄霉素为一种抗真菌类抗生素,口服后主要在十二指肠吸收,其次在空肠、回肠,胃内也有少量吸收,可广泛分布于全身各组织,其中在皮肤、肝脏、脂肪及骨骼肌的含量较高,主要沉积在皮肤的角质层,与角蛋白结合,防止敏感菌的侵入[12]。纳米载药可被胃肠道派依尔氏斑(PP)大量吸收,50 nm的粒子约12.9%~45.4%被吸收[10]。粒子越小,越易吸收,100 nm的粒子吸收率为 $0.5\sim 10.0$   $\mu\text{m}$ 粒子的15~20倍。PP组织比相邻非PP组织多吸收200倍的纳米粒[10]。本实验以聚乳酸作为载体材料包埋灰黄霉素,探讨制备纳米微球的最佳工艺条件,并且研究了其体外释药性能,旨在为人体临床实验研究提供可靠的依据。

### 1 实验部分

#### 1.1 仪器和试剂

UV-VIS 8500型紫外-可见分光光度计(上海TECHCOMP公司),磁力搅拌器(上海司乐仪器厂),注射器60 ml(温州市欧海健达医用器材厂),H-300型透射电镜(日本日立公司),80-2型离心机(上海手术器械厂),Avanti J-25型超速离心机(美国BECKMAN COULTER公司),PHS-3C型精密PH计(上海雷磁仪器厂),HZ24型旋转振荡槽(辽阳市恒温仪器厂),Hydro 2000MU(A)激光粒径分析仪[Malvern Instrument Ltd(Paris)]。聚乳酸( $M_v=5.9$ 万,中科院成都有机化学所提供),灰黄霉素(广东药学院提供),二氯甲烷(分析纯,广州化学试剂厂),甲醇(分析纯,广州化学试剂厂),聚醚F-68(药用级,南京金陵石化公司表面活性剂研究所),其他均为国产分析纯。

#### 1.2 实验方法

1.2.1 聚乳酸载药纳米球的制备 准确称取一定量的聚乳酸和灰黄霉素,用丙酮溶解;然后置于注射器中,以一定速率注于500 r/min磁力搅拌的150 ml聚醚F-68水溶液中,常温分散约24 h;然后升温至 $40$   $^{\circ}\text{C}$ 约

8 h; 将所得乳液用高速离心机在25 000 r/min 4 °C下离心约1 h后真空干燥, 即得聚乳酸 载药纳米球。

1.2.2 均匀设计实验 影响聚乳酸载灰黄霉素纳米球载药量和包封率的主要因素有F68%、灰黄霉素、聚乳酸及丙酮。为减少误差及线性回归上的要求, 水平数至少为二倍因素的要求, 用拟水平法, 将各因素所取4个水平重复使用, 用 $U_8(8^4)$ 安排试验见表1。

表 1 试验安排表

Tab.1 The experimental arrangement table

No.	F68(%)	Griseofulvin (g)	PLA (g)	Acetone (ml)
1	0.3	0.040	0.40	40
2	0.3	0.042	0.45	50
3	0.4	0.044	0.50	60
4	0.4	0.046	0.55	70
5	0.5	0.040	0.25	40
6	0.5	0.042	0.30	50
7	0.6	0.044	0.35	60
8	0.6	0.046	0.40	70

PLA: Polylactic acid

1.2.3 透射电镜观察 取聚乳酸载药纳米球乳液滴于铜网上, 然后用1.5%(质量分数)邻钨酸进行负染, 自然干燥后用透射电镜观察其大小和形态。

1.2.4 纳米球粒径大小测定 应用粒径分析仪测定乳液中载药聚乳酸纳米球的粒径和粒径分布。

1.2.5 灰黄霉素标准溶液的配制与测定 准确称取33.8 mg灰黄霉素, 溶解于甲醇中, 定容配成676 mg/L溶液作为储备液, 然后分别移取1、2、3、4、5、6 ml, 并分别定容至25 ml, 作为标准溶液。用紫外分光光度计在310 nm处测 $D_\lambda$ , 并将浓度与吸光度进行线性拟合, 得到灰黄霉素在甲醇溶液中C-A关系的工作曲线方程,  $C=66.1204A-5.32859$ , 其中 $n=6$ ,  $R=0.99854$ , C的单位为mg/L。

1.2.6 聚乳酸载药纳米球载药量和包封率测定 准确称取10 mg 聚乳酸载药纳米球, 移取1 ml二氯甲烷将其溶解, 然后再移入约9 ml的甲醇, 使聚乳酸沉淀析出。4 000 r/min离心1 h后, 过滤并用甲醇定容至25 ml, 测 $D_\lambda$ 。根据工作曲线方程计算出浓度, 依据下式计算出载药量和包封率:

$$\text{载药量} = \frac{\text{实测的药物量}}{\text{样品量}} \times 100\%$$

$$\text{包封率} = \frac{\text{药物含量}}{\text{投药分率}} \times 100\%$$

1.2.7 聚乳酸载药纳米球体外释放性能测试 准确称取聚乳酸载药纳米球0.1 g, 置于用透析袋制成的释药袋中, 紧密封口。置于37 °C 500 ml的磷酸缓冲溶液(pH=7.4)中, 以100 r/min恒温振荡, 定时取5 ml释放介质, 同时补充等量的“新鲜”溶媒。测定 $D_\lambda$ 。根据工作曲线方程换算成浓度, 并依下式计算出累积释药百分率:

$$\text{累积释药百分率} = \frac{\text{总释放量}}{\text{含药量}} \times 100\%$$

## 2 结果与讨论

### 2.1 聚乳酸载药纳米球透射电镜与粒径分布分析

图1为聚乳酸载灰黄霉素纳米球的透射电镜图，球形较好且较为分散。粒径分布较为均一，比表面径在114 nm左右。

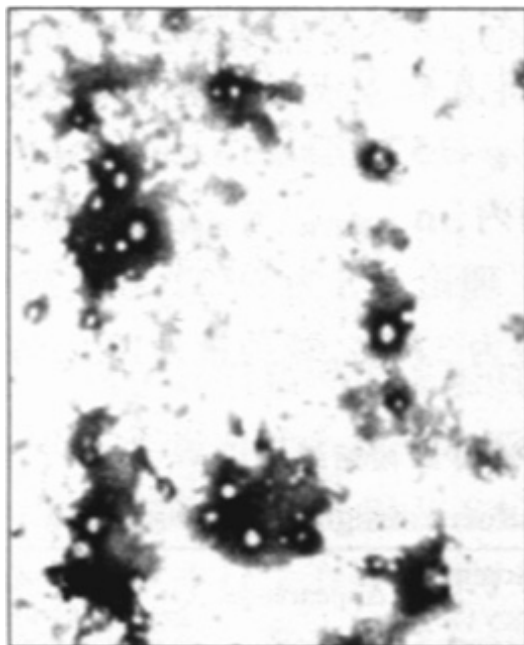


图1 载药聚乳酸纳米球透射电镜照片( $\times 30\ 000$ )  
Fig.1 TEM photo of drug-loaded PLA nanosphere( $\times 30\ 000$ )

### 2.2 灰黄霉素在甲醇溶液中的紫外光谱分析

从灰黄霉素在甲醇溶液中的紫外光谱图(图2)可以发现，在320、280、240和220 nm处分别有4个吸收峰，200 nm处的峰可能与溶剂甲醇有干扰，两个峰分开得不明显，故选择280和310 nm的吸收波长来进行定量。测定实验中取310 nm的吸收峰位置来定量，因在此位置所配的各浓度溶液吸光度较低，均不超过2.5，误差较小；而在280 nm处吸光度较大，可产生较大的实验误差。

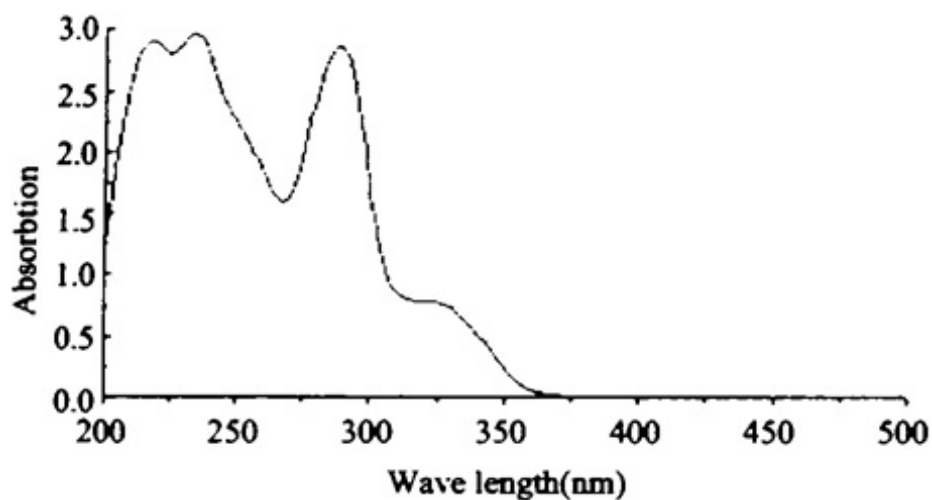


图2 在甲醇溶液中的灰黄霉素紫外光谱图  
Fig.2 The UV spectrum of griseofulvin in the methol solution

### 2.3 含药量测定方法回收率测试

由回收率(表2)可以计算出平均回收率为99.61%。每次测试的数据都存在一定的误差,这与配制溶液的操作方法存在关系,所以测得药含量和包封率都应乘以平均回收率。

表 2 回收率测定实验

Tab.2 Recovery rate determining experiment

	1	2	3	4	5
Added amount of griseofulvin(mg)	1.400	1.200	1.690	1.920	3.800
Determined amount of griseofulvin(mg)	1.369	1.219	1.684	1.932	3.7401
Recovery rate(%)	97.77	101.58	99.65	100.63	98.42

### 2.4 均匀设计实验结果分析

将所得载药量(DL)、包封率(R)和外观(A,总分为10分)结果进行综合评分(S),得 $S=5DL+R/10+2A$ 。均匀设计试验结果见表3。用S对 $F_{68}$ (%)、 $m_{\text{灰黄霉素}}$ 、 $m_{\text{聚乳酸}}$ 、 $V_{\text{丙酮}}$ 线性回归得方程 $S=91.89609-9.075 F_{68}(\%) +363.772 3 m_{\text{灰黄霉素}}-157.983 333 m_{\text{聚乳酸}}+0.469 14 V_{\text{丙酮}}$ 。在此范围内, $m_{\text{灰黄霉素}}$ 、 $V_{\text{丙酮}}$ 越大越好, $F_{68}$ (%)、 $m_{\text{聚乳酸}}$ 越小越好。理论上S为99.22,经3次重复试验得S为95.59,误差为3.66%,载药量为13.55%。

表 3 均匀设计试验结果

Tab.3 The result of uniform designed experiment

No.	Drug content (%)	Enveloping efficiency (%)	Appearance	Comprehensive score
1	8.93	95.28	3	60.17
2	7.27	85.11	4	52.86
3	7.96	98.35	6	61.64
4	5.23	67.69	5	42.92
5	11.47	83.15	7	79.67
6	11.09	90.30	8	80.48
7	7.95	71.30	9	64.88
8	10.40	100.88	9	80.09

### 2.5 载药纳米球与载药微米球的释药性能比较

图3为载药纳米球与微米球的释药曲线,两者存在很大不同。由于纳米球的粒径远小于微米球,在释药过程中药物透过球体路径较之少得多,所以可见到652.5 h时纳米球大约释药了74.1%,而微球只释药不到10%,而药物本身为油溶性,所以载药微米球的释药速率较慢,而纳米球在性能上有一个“突跃”,能起到“增溶”药物的作用。

(责任编辑:黄开颜)

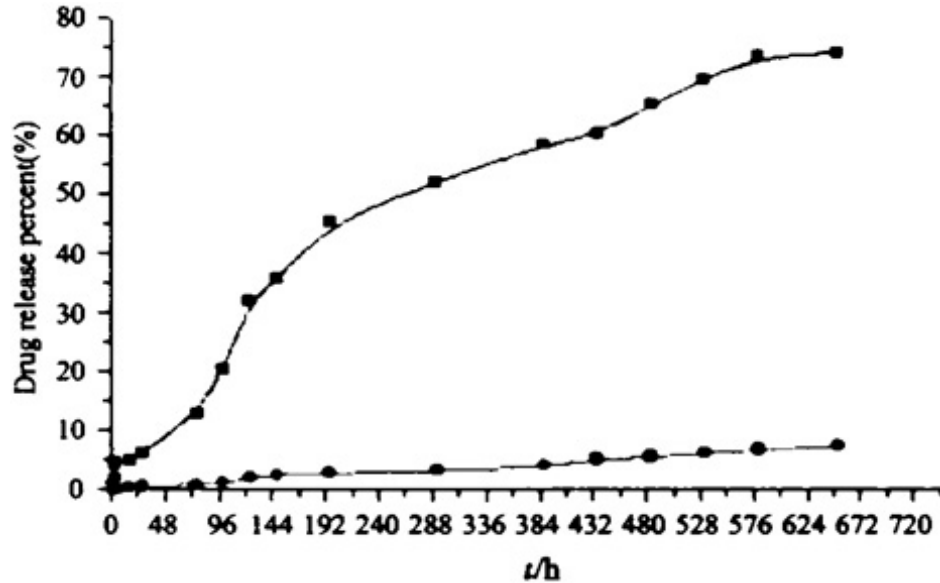


图3 载药纳米球和微米球的释药曲线

Fig.3 The release curve of drug-loaded nanosphere and drug-loaded microsphere  
a: For the nanosphere, the amount of the drug loading is 3.80 percent and the particle size is 114 nm.  
b: For the microsphere, the amount of the drug loading is 3.53 percent and the particle size is 45.3  $\mu\text{m}$ .

#### 参考文献:

- [1] Yoo HS, Lee KH, Oh JE, et al. In vitro and in vivo anti-tumor activities of nanoparticles based on doxorubicin-PLGA conjugates[J]. J Control Rel, 2000, 68(3): 419-26.
- [2] Torres EC, Rodrigues JM, Moreira DL, et al. Improvement of in vitro and in vivo antileishmanial activities of 2', 6'-dihydroxy-4' -methoxychalcone by entrapment in poly (D, L-lactide)nanoparticles[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1999, 43(7): 1776-82.
- [3] Sershen SR, Westcott SL, Halas NJ, et al. Temperature-sensitive Polymer nanoshell composites for photothermally modulated drug delivery[J]. J Biomed Mater Res, 2000, 51(3): 293-300.
- [4] Roy K, Mao HQ, Huang SK, et al. Oral gene delivery with chitosan- DNA nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy[J]. Nat Med, 1999, 5(4): 387-95.
- [5] Schwarz C, Mehnert W. Solid liquid nanoparticles(SLN) for control- led-drug delivery II. Drug incorporouation and physicochemical chara- cterization[J]. J Microencapsul, 1999, 16(2): 205-13.
- [6] Duchene D, Ponchel G, Denis W. Cyclodextrins in targeting appli- cation to nanoparticles[J]. Adv Drug Delve Rev, 1999, 36(3): 29-40.
- [7] Song CX, Labhasetwar V, Murohy H, et al. Formulation and charac- terization of biodegradable nanoparticles for intravascular local drug delivery[J]. J Control Release, 1997, 43(5): 197-212.
- [8] Niwa T, Takeuchi H, Hino T, et al. Biodegradable subicron carries for peptide drugs: preparation of DL-PLGA nanoparticles with Naby a novel emulsion-phase separation method in an oil system[J]. Int F Pharm, 1995, 121(1): 45-53.
- [9] 常 津, 刘海峰, 姚康德. 医用纳米控释系统的研究进展[J]. 中国生物医学工程学报(Chin J Biomed Eng), 2000, 19(4): 423-31.

[10] 黎洪珊, 赵京玲, 魏树礼. 环孢菌素A聚乳酸纳米粒胶体的制备和大鼠的口服吸收[J]. 中国药理学杂志(Chin Pharm J), 1999, 34(8): 532-6.

[11] 皮洪琼, 吴俊丽, 袁直, 等. 注射用生物可降解胰岛素纳米球的制备[J]. 应用化学, 2001, 18(5): 365-9.

[12] 中华人民共和国卫生部药典委员会编. 药典注释[M]. 北京: 化学工业出版社, 1990. 209-11.

#### 参考文献:

[1] Yoo HS, Lee KH, Oh JE, et al. In vitro and in vivo anti-tumor activities of nanoparticles based on doxorubicin-PLGA conjugates[J]. J Control Rel, 2000, 68(3): 419-26.

[2] Torres EC, Rodrigues JM, Moreira DL, et al. Improvement of in vitro and in vivo antileishmanial activities of 2', 6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone by entrapment in poly(D, L-lactide)nanoparticles[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1999, 43(7): 1776-82.

[3] Sershen SR, Westcott SL, Halas NJ, et al. Temperature-sensitive Polymer nanoshell composites for photothermally modulated drug delivery[J]. J Biomed Mater Res, 2000, 51(3): 293-300.

[4] Roy K, Mao HQ, Huang SK, et al. Oral gene delivery with chitosan- DNA nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy[J]. Nat Med, 1999, 5(4): 387-95.

[5] Schwarz C, Mehnert W. Solid liquid nanoparticles(SLN) for controlled-drug delivery II. Drug incorporation and physicochemical characterization[J]. J Microencapsul, 1999, 16(2): 205-13.

[6] Duchene D, Ponchel G, Denis W. Cyclodextrins in targeting application to nanoparticles[J]. Adv Drug Delve Rev, 1999, 36(3): 29-40.

[7] Song CX, Labhasetwar V, Murohy H, et al. Formulation and characterization of biodegradable nanoparticles for intravascular local drug delivery[J]. J Control Release, 1997, 43(5): 197-212.

[8] Niwa T, Takeuchi H, Hino T, et al. Biodegradable submicron carriers for peptide drugs: preparation of DL-PLGA nanoparticles with Naby a novel emulsion-phase separation method in an oil system[J]. Int J Pharm, 1995, 121(1): 45-53.

[9] 常津, 刘海峰, 姚康德. 医用纳米控释系统的研究进展[J]. 中国生物医学工程学报(Chin J Biomed Eng), 2000, 19(4): 423-31.

[10] 黎洪珊, 赵京玲, 魏树礼. 环孢菌素A聚乳酸纳米粒胶体的制备和大鼠的口服吸收[J]. 中国药理学杂志(Chin Pharm J), 1999, 34(8): 532-6.

[11] 皮洪琼, 吴俊丽, 袁直, 等. 注射用生物可降解胰岛素纳米球的制备[J]. 应用化学, 2001, 18(5): 365-9.

[12] 中华人民共和国卫生部药典委员会编. 药典注释[M]. 北京: 化学工业出版社, 1990. 209-11.