

聚乳酸载药纳米球的制备工艺及性能研究

李 良¹, 李国明², 黄伟华¹ (1 南昌市卫生防疫站, 江西 南昌 330006; 2 华南师范大学化学系, 广东 广州 510631)

摘要: 运用均匀设计实验, 以灰黄霉素为囊心物质用油包水溶剂挥发法制备灰黄霉素 / 聚乳酸纳米球, 并且分析比较了载药微米球和纳米球的释药性能。结果表明所获得的纳米球球形较好且较为分散, 粒径分布较为均一, 粒径在 114 nm 左右。经线性回归和三次重复试验得出综合评分 S 为 95.59, 误差为 3.66%, 载药量为 13.55%。载药微米球的释药速率较慢, 而纳米球在性能上有一个“飞跃”, 能起到“增溶”药物的作用。

关键词: 聚乳酸; 灰黄霉素; 纳米球

中图分类号: O636; TQ467 文献标识码: A 文章编号: 1000-2588(2004)03-0352-03

Preparation of drug-loaded polylactic acid nanospheres and drug-releasing performance evaluation

LI Liang¹, LI Guo-ming², HUANG Wei-hua¹

¹Nanchang Municipal Health and Anti-Epidemic Station, Nanchang 330006, China; ²Department of Chemistry, South China Normal University, Guangzhou 510631, China

Abstract: The polylactic acid (PLA) nanospheres containing griseofulvin were prepared by a water-in-oil solvent evaporation method adopting an uniformly designed experiment, and the drug-releasing rates were compared between the microsphere and nanosphere. The results showed that the nanospheres was good in spherical shape with narrow distribution of the particle sizes. The particle diameter was about 114 nm, and the comprehensive score of the nanosphere was 95.59, with the error of 3.66% and the drug content of 13.55% by the linearity regression averaged from the results of the three repeat experiments. The drug-releasing rate of the microsphere was relatively slow, while that of the nanosphere can have an abrupt increase, indicating its function of solubilizing the drug.

Key words: polylactic acid; griseofulvin; nanospheres

纳米载药体系包括纳米粒子和纳米胶囊, 它们是粒径为 10~500 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^[1-4]。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理学上可接受的; (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^[5-7]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 CO₂、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 0.5~10.0 μm 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

收稿日期: 2003-07-23

作者简介: 李 良(1975-), 男, 硕士, 技师, 研究方向: 生物医学高分子药物缓释材料, E-mail: liangli113@sina.com

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℃约8 h;将所得乳液用高速离心机在25 000 r/min 4℃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_λ ,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_λ 。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℃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_λ 。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。

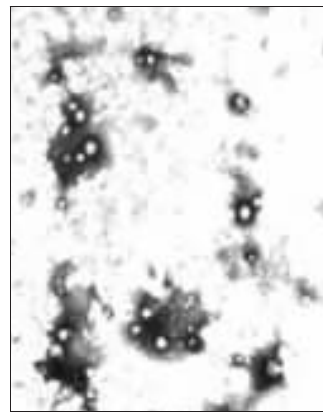


图1 载药聚乳酸纳米球透射电镜照片($\times 30\ 000$)
Fig.1 TEM photo of drug-loaded PLA nanosphere($\times 30\ 000$)

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。

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。

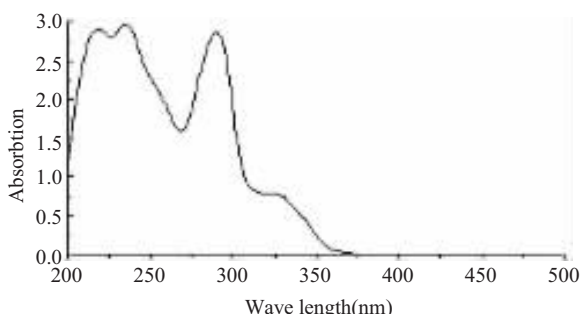


图 2 在甲醇溶液中的灰黄霉素紫外光谱图

Fig.2 The UV spectrum of griseofulvin in the methol solution

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“飞跃”,能起到“增溶”药物的作用。

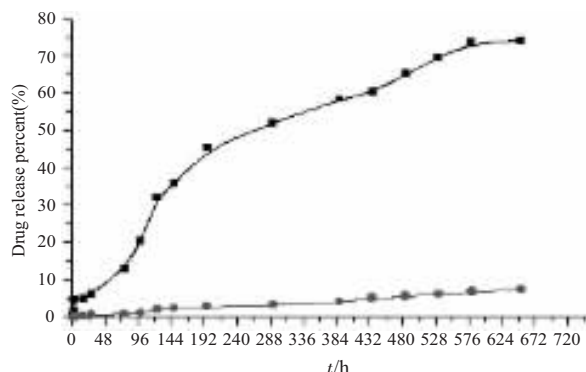


图 3 载药纳米球和微米球的释药曲线

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 μm .

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 Deliv 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 carries for peptide drugs: preparation of DL-PLGA nanoparticles with Nabya 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. (责任编辑: 黄开颜)