

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00295

## 包裹多烯紫杉醇 PLGA-PEG 纳米粒的制备及体外释放度考察

陈 婷, 鲁 莹, 林亚玲, 黄景彬, 涂 晔, 孙治国, 刘俊杰, 钟延强\*

第二军医大学药学院药剂学教研室, 上海 200433

**[摘要]** **目的** 制备包裹多烯紫杉醇 PLGA-PEG 纳米粒(DTX-NPs)并评价其体外释放行为。**方法** 合成高分子聚合物 PLGA-PEG-COOH 并表征;以其作为载体,复乳溶剂挥发法制备隐形纳米粒;动态光散射粒径仪和透射电镜测定 DTX-NPs 的粒径分布、zeta 电位及表面形态;采用 HPLC 法测定 DTX-NPs 的包封率及载药量;以 pH 7.4 磷酸缓冲盐溶液(PBS)作为释放介质,考察 DTX-NPs 的体外释放行为。**结果** DTX-NPs 平均粒径为  $(138.8 \pm 1.01)$  nm, zeta 电位为  $(-13.74 \pm 3.54)$  mV, 包封率  $(99.41\% \pm 0.29\%)$ , 载药量  $(2.47 \pm 0.02)$   $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 24 h 突释量为 49%。**结论** DTX-NPs 制备工艺简便可控,结果稳定,且其体外释放行为具有缓释性,能够在血液中长期滞留,具有良好的应用前景,值得进一步研究。

**[关键词]** 多烯紫杉醇;纳米粒子;聚乳酸羟基乙酸共聚物;体外释放

**[中图分类号]** R 943.4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)03-0295-04

### Preparation and *in vitro* release of docetaxel-loaded PLGA-PEG nanoparticles

CHEN Ting, LU Ying, LIN Ya-ling, HUANG Jing-bin, TU Ye, SUN Zhi-guo, LIU Jun-jie, ZHONG Yan-qiang\*

Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

**[Abstract]** **Objective** To prepare the docetaxel(DTX)-loaded nanoparticles based on poly(D, L-lactide-co-glycolide)-block-poly(ethylene glycol) (PLGA-b-PEG-COOH) (DTX-NPs) and to evaluate their *in vitro* release property. **Methods** PLGA-PEG was successfully synthesized and double emulsion solvent evaporation technique was used to prepare DTX-NPs. The size distribution, zeta potential, and surface morphology of the prepared DTX-NPs were characterized by dynamic light scattering (DLS) and transmission electron microscopy(TEM); the entrapment efficiency and drug content were investigated by HPLC; and the *in vitro* release was examined using phosphate buffer solution as the releasing medium. **Results** The average diameter of DTX-NPs was  $(138.8 \pm 1.01)$  nm, the zeta potential was  $(-13.74 \pm 3.54)$  mV, the encapsulation efficiency was  $(99.91\% \pm 0.29\%)$ , the drug load was  $(2.47 \pm 0.02)$   $\mu\text{g}/\text{mg}$ , the 24 h drug release was 49%, and the total drug release in 120 h was 95%. **Conclusion** The present preparation method for DTX-NPs is reliable and simple, and the product is stable and possesses a sustained release character *in vitro*. It can stay in the blood for a long period and possess a bright future of application.

**[Key words]** docetaxel; nanoparticles; poly(D, L-lactide-co-glycolide); *in vitro* release

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(3):295-298]

紫杉醇是红豆杉属植物中的一种复杂的次生代谢产物,也是目前所了解的唯一一种可以促进微管聚合和稳定已聚合微管的药物,临床上广泛用于各种恶性晚期实体瘤的治疗<sup>[1-2]</sup>,如晚期乳腺癌、卵巢癌、非小细胞肺癌等。目前国内临床使用的紫杉醇制剂主要为紫杉醇普通注射液、紫杉醇脂质体、紫杉醇白蛋白纳米悬浮液(abraxane)<sup>[3]</sup>,但药物半衰期短、毒副作用严重广泛,尤其是中性粒细胞减少症及神经毒性,在很大的程度上限制了其临床应用。故

新剂型的研发十分迫切,而纳米给药系统因其靶向性强、用药间隔长、毒副作用小等优点,成为目前国内内外抗肿瘤药物新剂型研究的一大热点。

近年来人们对聚乙二醇[poly(ethylene glycol), PEG]修饰的隐形纳米粒<sup>[4-5]</sup>(stealth nanoparticles, S-NP)进行了大量的研究。PEG 化修饰可以减少纳米粒与血浆中调理素的结合,增加其血液稳定性,增大载体寻靶机会,从而借助肿瘤组织特异性 EPR 效应(enhanced permeability and retention effect,

**[收稿日期]** 2010-12-17 **[接受日期]** 2011-01-24

**[基金项目]** 国家自然科学基金青年项目(30800259). Supported by National Natural Science Foundation for Distinguished Young Scholars (30800259).

**[作者简介]** 陈 婷, 硕士生. E-mail: carina0831@163.com

\* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81871285, E-mail: yqzhong@smmu.edu.cn

EPR)使循环系统中载药粒子集中富集在肿瘤部位,从而增强药物在患处的靶向性和疗效。载多烯紫杉醇的叶酸靶向 PLGA-PEG 纳米粒现已有报道<sup>[6]</sup>,其平均粒径大于 200 nm,且载药量有待提高。

本课题以自制聚乳酸羟基乙酸共聚物嵌合聚乙二醇片段(PLGA-PEG-COOH)为载体材料,以改进的复乳溶剂挥发法制备 PEG 化的隐形多烯紫杉醇纳米粒,通过单因素试验,以粒径为主要指标对处方工艺进行筛选,测定其粒径、zeta 电位、包封率、载药量等,并对其体外释放行为进行了考察。

## 1 材料和方法

1.1 材料和仪器 超声乳化仪(美国 Branson 公司);V55C 型冷冻干燥机(美国 Virtis 公司);RZR 2021 电子恒速搅拌机(德国 Heidolph 公司);5605 型高速离心机(德国 Hettich 公司);5418 型高速离心机(德国 Eppendorf 公司);VTX-3000L 型 UZUSIO 涡旋混合器(日本 LMS 公司);VD53 真空干燥箱(德国 Binder 公司);Zen3600HS 激光粒度分析仪(英国 Malvern 公司);L-2000 系列高效液相色谱仪(日本 Hitachi 公司);透射电镜(JEM-2010,日本 JEOL 公司);NH<sub>2</sub>-PEG-COOH(北京键凯科技有限公司);PLGA-COOH[乳酸(LA):羟基乙酸(GA)=50:50,特性黏度为 40 L/kg,德国 Boehringer Ingelheim 公司];其他试剂均为分析纯,水为去离子水。

1.2 PLGA-PEG 的合成<sup>[7]</sup> 精密称取 PLGA-COOH 5.00 g 置于 10 ml 二氯甲烷中,涡旋至完全溶解,向此溶液中分别加入 135 mg N-羧基琥珀酰亚胺(NHS)、230 mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCl)充分反应后 PLGA-COOH 转换成 PLGA-NHS,将其在乙醚中沉淀,洗涤提纯后真空干燥。精密称取 1.00 g PLGA-NHS 溶于 4 ml 氯仿,继而加入 NH<sub>2</sub>-PEG-COOH 250 mg 和 N,N-二异丙基乙胺 28 mg,充分反应后在甲醇中沉淀,将沉淀物真空干燥,得最终产物(OCH<sub>2</sub>C(O)OCCH<sub>3</sub>C(O))<sub>m</sub>OCH<sub>2</sub>CH(OCH<sub>2</sub>CH)<sub>n</sub>C(O)OH。

1.3 包裹多烯紫杉醇 PLGA-PEG 纳米粒(DTX-NPs)的制备 根据文献<sup>[8-9]</sup>,对复乳溶剂挥发法进行改进,制备工艺如下:精密称取一定量的 PLGA-PEG-COOH 置于乙酸乙酯中充分涡旋溶解作为油相,向此溶液中加入内水相(1 mg/ml 的多烯紫杉醇溶液或者去离子水),冰浴超声乳化形成 W/O 型初乳溶液。用作为外水相,将初乳溶液加入一定浓度的 PVA 溶液,冰浴超声形成 W/O/W 复乳,将此复乳稀释后低速搅拌 4 h,5 600×g 离心 60 min 收集纳米粒,继而用去离子水重悬洗涤 3 次后冷冻干燥

24 h,即得固态纳米粒。

1.4 处方工艺考察 复乳法制备 PLGA-PEG 纳米粒的影响因素较多,根据预实验结果,本文通过单因素实验考察 PLGA-PEG 浓度、内水相体积、超声乳化强度、外水相浓度等 4 个因素的影响,用动态光散射法测定每批纳米粒的平均粒径,初步确定纳米粒的基本处方工艺如下:精密称取 40 mg PLGA-PEG-COOH 置于 1 ml 乙酸乙酯中充分涡旋溶解作为油相,向此溶液中加入浓度为 1 mg/ml 多烯紫杉醇溶液 100 μl,冰浴超声(150 W,60 s)乳化形成 W/O 型初乳溶液。用 3% PVA 溶液 3 ml 作为外水相,加至将初乳溶液中,冰浴超声(150 W,90 s)形成 W/O/W 复乳,将此复乳低速搅拌 4 h。5 600×g 离心 60 min 收集纳米粒,以去离子水重悬洗涤 3 次后冷冻干燥 24 h。

1.4.1 PLGA-PEG 浓度对粒径的影响 固定其他因素不变,仅改变 PLGA-PEG 浓度制备纳米粒,将有机相中 PLGA-PEG 浓度考察水平定为 30、40、50 mg/ml,每个水平重复 3 批次,测定其粒径。

1.4.2 内水相体积对粒径的影响 固定其他因素不变,仅改变内水相体积制备纳米粒,将内水相考察水平定为 50、100、150 μl,每个水平重复 3 批次,测定其粒径。

1.4.3 超声乳化强度对粒径的影响 固定其他因素不变,仅改变超声乳化强度制备纳米粒,将乳化超声功率考察水平定为 100、150、200 W,每个水平重复 3 批次,测定其粒径。

1.4.4 外水相浓度对粒径的影响 固定其他因素不变,仅改变外水相 PVA 浓度制备纳米粒,将外水相 PVA 浓度的考察水平定为 3%、4%、5%,每个水平重复 3 批次,测定粒径。

1.5 优化处方制备纳米粒 通过预实验及单因素考察,确定优选处方为:精密称取 40 mg PLGA-PEG-COOH 置于 1 ml 乙酸乙酯中充分涡旋溶解作为油相,向此溶液中加入浓度为 1 mg/ml 多烯紫杉醇溶液 100 μl,冰浴超声(150 W,60 s)乳化形成 W/O 型初乳溶液。用 4% PVA 溶液 2 ml 作为外水相,加至将初乳溶液中,冰浴超声(150 W,90 s)形成 W/O/W 复乳,将此复乳低速搅拌 4 h。5 600×g 的条件下离心 60 min 收集纳米粒,以去离子水重悬洗涤 3 次后冷冻干燥 24 h。

1.6 DTX-NPs 的形态学研究 将适量 DTX-NPs 悬液滴到已载有碳膜的铜网上,用 1.0% 磷钨酸染色,待其干燥后即得透射电镜样品。

1.7 DTX-NPs 包封率和载药量的测定 按照文献<sup>[10-11]</sup>以及预实验结果,确定色谱条件。仪器:L-2000 系列高效液相色谱仪;色谱柱:Diamondsil(钻

石)  $C_{18}$  4.6 mm×150 mm, 5  $\mu$ m; 流动相: 甲醇: 水: 乙腈=45: 30: 25; 检测波长: 230 nm; 柱温: 25 $^{\circ}$ C; 流速: 1.0 ml/min; 进样量: 20  $\mu$ l。精密称取多烯紫杉醇纳米粒 10 mg 3 份, 分别加入 1 ml 甲醇超声 5 min 破球, 在转速为 9 300 $\times$ g 的条件下离心 5 min, 取上清液依上述色谱条件进样<sup>[12]</sup>。按照标准曲线计算上清液中药物含量, 包封率(%) = 纳米粒多烯紫杉醇测得量/投药量( $\mu$ g/mg)  $\times$  100%。载药量( $\mu$ g/mg) = 纳米粒多烯紫杉醇含量/载药纳米粒总量。

1.8 DTX-NPs 的体外释放度研究<sup>[13]</sup> 精密称取 20 mg DTX-NPs 于 2 ml 离心管中, 共 6 份, 加入 1 ml PBS, 置于恒温水浴摇床中, 在 (37 $\pm$ 0.5) $^{\circ}$ C、振荡速度为 100 次/min、振幅 20 mm 的条件下进行体外释放度测定。分别于 1、2、4、8、24、48 h 取出, 离心 (5 600 $\times$ g, 8 min), 小心吸除上清液, 加入 1 ml 甲醇, 涡旋, 离心 (5 600 $\times$ g, 8 min), 取上清液按上述色谱条件进样测定。累计释放百分率( $F_t$ ) = ( $\sum C_t / C_0$ )  $\times$  100%。

## 2 结果

2.1 PLGA-PEG 核磁共振图谱 取上述最终合成产物 PLGA-PEG-COOH 溶于氘带氯仿, 在 300 MHz 的条件下进行核磁共振成像。从图 1 中可见, 特征峰具备且较为明显, 证明所合成材料为目标高聚物。

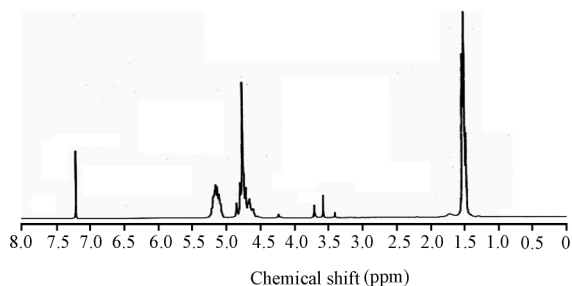


图 1 PLGA-PEG-COOH 的核磁共振图谱

Fig 1 Nuclear magnetic resonance spectrum of poly(D,L-lactide-co-glycolide)-block-poly(ethylene glycol) ( $CDCl_3$  at 300 Hz)

2.2 纳米粒形态 用透射电镜观察纳米粒的大小和表面形态, 结果见图 2, 纳米粒粒径较为均一, 表面光滑圆整, 无粘连现象。

2.3 DTX-NPs 的质量评价 精密称取以优化处方制备的冻干 DTX-NPs 适量置于塑料离心管中, 加去离子水后超声重悬, 以激光粒度仪测量其粒径与 zeta 电位。经测定得纳米粒粒径为 (138.8 $\pm$ 1.01) nm, zeta 电位为 (-13.74 $\pm$ 3.54) mV。图 3 为纳米粒的粒径图, 由图 3 可以看出, 纳米粒粒度多在 120~150 nm 之间, 分布较为均匀。

2.4 DTX-NPs 包封率和载药量 结果如表 1 所示。所制备的纳米粒平均包封率为 (99.41% $\pm$ 0.29%), 平均载药量为 (2.47 $\pm$ 0.02)  $\mu$ g/mg。

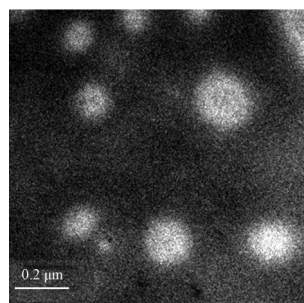


图 2 DTX-NPs 透射电镜观察

Fig 2 Morphology of docetaxel-loaded nanoparticles under transmission electron microscope

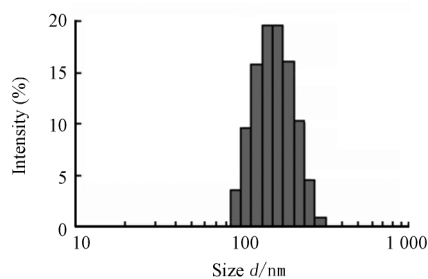


图 3 纳米粒的粒径分布图

Fig 3 Size distribution of docetaxel-loaded nanoparticles as determined by dynamic light-scattering detector

2.5 DTX-NPs 的体外释放行为 以  $F_t$  对时间  $t$  作图, 获得药物释放曲线见图 4, 结果表明 DTX-NPs 在 37 $^{\circ}$ C 的 PBS(pH=7.4) 120 h 内能够稳定释放。

## 3 讨论

药物通过静脉给药时, 粒径大小将直接影响到制剂分布取向: 直径为 150 nm 左右的粒子, 可以通过肝脏而进入脾脏、骨髓, 被单核-巨噬细胞系统 (mononuclear phagocyte system, MPS) 的巨噬细胞 (尤其是肝脏的 kupffer 细胞) 摄取, 形成被动靶向。故本文将纳米微粒的粒径作为重要的指标, 拟制备粒径在 150 nm 左右的载药纳米微粒, 以期达到预期的靶向隐形效果。本文在使用改良的复乳挥发法制备纳米微粒时, 以纳米粒径为指标进行了处方工艺筛选, 目标为 100~150 nm。在制备过程中, 随着 PLGA-PEG 浓度的升高, 制备的纳米粒粒径相应变大。这是由于当有机相浓度增大后, 初乳的黏度增大, 在相同剪切力下不易分散, 故形成的纳米粒粒径增大。在进行外水相筛选时, 在粒径无显著性差别的情况下我们选择较低 PVA 浓度水平, 因为 PVA 浓度增加使得粒径减小的

同时,会因为其黏度过大导致纳米粒不易收集。

超声功率与乳化时间的控制对于纳米粒的制备较为重要,功率过小,达不到需要的粒径范围,而功

率太大又会产生乳滴过度分散导致包封率的下降,本文实验得出的乳化强度和um时间能较好的兼顾二者,达到一个较为理想的状态。

表 1 优化处方制备的多烯紫杉醇纳米粒的包封率和载药量

Tab 1 Encapsulation efficiency and drug load of docetaxel-loaded nanoparticles made by optimized prescription and technique

(n=3,  $\bar{x} \pm s$ )

No.	Encapsulation efficiency (%)	Mean encapsulation efficiency (%)	Drug load ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	Mean drug load ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )
1	99.37 $\pm$ 0.18	99.41 $\pm$ 0.29	2.47 $\pm$ 0.31	2.47 $\pm$ 0.02
2	99.16 $\pm$ 0.11		2.45 $\pm$ 0.23	
3	99.70 $\pm$ 0.26		2.47 $\pm$ 0.12	

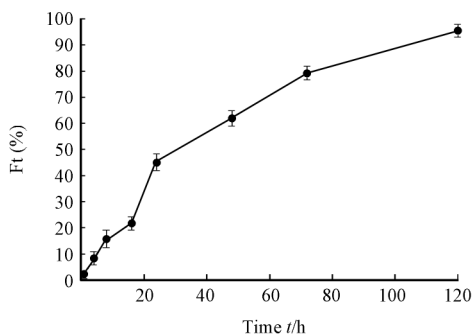


图 4 DTX-NPs 在 pH 7.4 磷酸盐缓冲液中的体外释放曲线

Fig 4 *In vitro* release curve of

docetaxel-loaded nanoparticles in pH 7.4 PBS

n=8,  $\bar{x} \pm s$

在体外释放行为考察中,本文制备的多烯紫杉醇纳米粒在 37℃ 的 PBS(pH=7.4) 中的释放规律性强,各阶段释放行为明显。第一阶段即突释阶段<sup>[14]</sup>,主要是纳米粒表层的药物在释放初期短时间内从纳米粒表面脱离导致药物释放量急剧升高到一定值,纳米粒在第 1 天释放量为 45.2%,第二阶段为稳定释放阶段<sup>[15-16]</sup>,也是纳米粒最重要的释放阶段,在这期间外部释放介质逐渐扩散至纳米粒内部,使得药物从内部向外部扩散,同时组成纳米粒的高分子材料也在逐步降解,促进释放介质的向内扩散和药物的向外扩散。在本实验中,第二阶段释放时间较长,保证了药物可在 120 h 内稳定释放,显示出明显的缓释效果,可以达到临床每周 1 次的给药目标。

[参考文献]

[1] Yin Y M, Cui F D, Mu C F, Choi M K, Kim J S, Chung S J, et al. Docetaxel microemulsion for enhanced oral bioavailability: Preparation and *in vitro* and *in vivo* evaluation[J]. J Contr Rel, 2009, 140: 86-94.  
 [2] Lortholary A, Maillard P, Delva R, Boisdrion-Celle M, Perard D, Vernillet L, et al. Docetaxel in combination with 5-fluorouracil in patients with metastatic breast cancer previously treated with anthracycline-based chemotherapy: a phase I, dose finding study[J]. Eur J Cancer, 2000, 36: 1773-1780.

[3] Micha J P, Goldstein B H, Birk C L, Rettenmaier M A, Brown J V III. Abraxane in the treatment of ovarian cancer: the absence of hypersensitivity reactions[J]. Gynecol Oncol, 2006, 100: 437-438.  
 [4] Zhang H J, Xia H S, Wang J, Li Y W. High intensity focused ultrasound-responsive release behavior of PLA-b-PEG copolymer micelles[J]. J Contr Rel, 2009, 139: 31-39.  
 [5] Yang A S, Yang L, Liu W, Li Z Y, Xu H B, Yang X L. Tumor necrosis factor alpha blocking peptide loaded PEG-PLGA nanoparticles: preparation and *in vitro* valuation[J]. Int J Pharmaceut, 2007, 331: 123-132.  
 [6] Liu Y T, Li K, Pan J, Liu B, Feng S S. Folic acid conjugated nanoparticles of mixed lipid monolayer shell and biodegradable polymer core for targeted delivery of docetaxel[J]. Biomaterials, 2010(31): 330-338.  
 [7] Cheng J J, Tely B A, Sherifi I, Sung J, Luther G, Gu F X, et al. Formulation of functionalized PLGA PEG nanoparticles for *in vivo* targeted drug delivery[J]. Biomaterials, 2007, 28: 869-876.  
 [8] Park J, Fong P M, Lu J, Sung J, Luther G, Gu F X, et al. PEGylated PLGA nanoparticles for the improved delivery of doxorubicin[J]. Nanomed Nanotechnol Biol Med, 2009, 5: 410-418.  
 [9] Chen H W, Gao J, Lu Y, Kou G, Zhang H, Fan L, et al. Preparation and characterization of PE38KDEL-loaded anti-HER2 nanoparticles for targeted cancer therapy [J]. J Contr Rel, 2008, 128: 209-216.  
 [10] Rao B M, Chakraborty A, Srinivasu M K, Devi M L, Kumar P R, Chandrasekhar K B, et al. A stability-indicating HPLC assay method for docetaxel[J]. J Pharmaceut Biomed Anal, 2006, 41: 676-681.  
 [11] Rouini M R, Lotfolahi A, Stewart D J, Molepo J M, Shirazi F H, Vergniol J C, et al. A rapid reversed phase high performance liquid chromatographic method for the determination of docetaxel (Taxotere) in human plasma using a column switching technique[J]. J Pharmaceut Biomed Anal, 1998, 17: 1243-1247.  
 [12] Holgado M A, Cózar-Bernal M J, Salas S, Arias J L, Álvarez-Fuentes J, Fernández-Arévalo M. Protein-loaded PLGA microparticles engineered by flow focusing: physicochemical characterization and protein detection by reversed-phase HPLC[J]. Int J Pharmaceut, 2009, 380: 147-154.  
 [13] Musumeci T, Ventura C A, Giannone I, Ruozzi B, Montenegro L, Pignatello R, et al. PLA/PLGA nanoparticles for sustained release of docetaxel[J]. Int J Pharmaceut, 2006, 325: 172-179.  
 [14] Fu K, Harrell R, Zinski, Jaklenc A, Frazier J, Lotan N, et al. A potential approach for decreasing burst effect of protein from PLGA microspheres[J]. J Pharmaceut Sci, 2003, 92: 1582-1591.  
 [15] Li Y, Ogris M, Pelisek J, Röedl W. Stability and release characteristics of poly(D, L-lactide-co-glycolide) encapsulated CaPi-DNA coprecipitation [J]. Int J Pharmaceut, 2004, 269: 61-70.  
 [16] Ho M L, Fu Y C, Wang G J, Chen H T, Chang J K, Tsai T H, et al. Controlled release carrier of BSA made by W/O/W emulsion method containing PLGA and hydroxyapatite[J]. J Contr Rel, 2008, 128: 142-148.

[本文编辑] 尹 茶