

磁性聚乳酸-羟基乙酸氧化酚砷纳米微粒的制备及其特性

董勤¹, 蔡洪培^{1*}, 张忠兵¹, 高申²

(1. 第二军医大学长征医院消化内科, 上海 200003; 2. 药学院药剂学教研室, 上海 200433)

[摘要] **目的:** 研究磁性聚乳酸-羟基乙酸氧化酚砷纳米微粒(M-PLGA-PAO-NP)的制备工艺, 并对纳米粒子进行评价。**方法:** 运用超声乳化-溶剂挥发法制备磁性聚乳酸-羟基乙酸氧化酚砷纳米微粒, 通过透射电镜(TEM)观察微粒形态, 振动样品磁强计(VSM)确证纳米微粒磁性的存在, 并对纳米微粒的平均粒径、载药量、包封率等进行评价。**结果:** 纳米微粒外观呈规则球形, 粒径在140~500 nm 占总数的80%, 载药量为3.2%, 包封率为34.2%, 药物磁性较好。**结论:** 获得了较满意的磁性聚乳酸-羟基乙酸氧化酚砷纳米微粒制备工艺, 其过程简单, 粒子性状符合要求。

[关键词] 氧化酚砷; 聚乳酸-羟基乙酸; 磁性; 纳米粒

[中图分类号] R 943.3; R 979.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)12-1355-03

Preparation and characterization of magnetic poly *D,L*-lactide-co-glycolide phenylarsine oxide nanoparticles

DONG Qin¹, CAI Hong-pei^{1*}, ZHANG Zhong-bing¹, GAO Shen² (1. Department of Gastroenterology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433)

[ABSTRACT] **Objective:** To study the preparation technique for magnetic poly *D,L*-lactide-co-glycolide phenylarsine oxide nanoparticles (M-PLGA-PAO-NPs) and to characterize the resultant product. **Methods:** M-PLGA-PAO-NPs were prepared by using emulsion-evaporation process. The morphology of the prepared nanoparticles were observed by transmission electron microscope and the magnetism of the particles was determined by vibrating sample magnetometer. Meanwhile, we also evaluated the mean diameter, encapsulation ratio, and drug loading rate of the particles. **Results:** The nanoparticles had a regular spherical surface, with 80% of them having a diameter of 140-500 nm. We also found that the drug loading rate of the particles was 3.2% and the mean encapsulation ratio was 34.2%. The drug had satisfactory magnetic property. **Conclusion:** Our method can obtain M-PLGA-PAO-NP with satisfactory quality, it is simple-to-use and the prepared particles can meet the requirement of pharmaceutics.

[KEY WORDS] phenylarsine oxide; poly *D,L*-lactic-co-glycolic acid; magnetite; nanoparticle

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(12):1355-1357]

近年来,具有中国民族特色的三氧化二砷抗白血病治疗已被国内外广大学者所认同,使得砷剂用于人体疾病治疗逐步成为新的研究热点之一。最近国内外学者先后报道^[1,2]有机砷化合物——美拉肿醇(melarsoprol)、氧化酚砷(phenylarsine oxide, PAO)对于人体肿瘤,尤其是血液肿瘤具有明显的抑制作用,可诱导其凋亡,但是显著的全身不良反应却极大地制约了其在临床中的应用,如中枢神经毒性、局部刺激反应、胃肠道反应等。

磁性药物微球是一种新的靶向给药系统,它是把药物和铁磁性物质共同包藏于载体中所制成的稳定剂。注入体内后在足够强的外磁场作用下可逐渐集结于肿瘤部位,缓慢释放化疗药物,相应减少了全身药物水平,从而达到高效、缓释、低毒的效果。在各种载体中,聚乳酸-羟基乙酸(poly *D,L*-lactic-co-glycolic acid, PLGA)是一种无毒可生物降解的聚合物,具有可控制生物降解、原料易得、生物相容性较好等优点^[3,4], FDA 已经批准其用作医用手术

缝合线和注射用微胶囊、微球及埋植剂等制剂的材料。

本研究采用超声乳化-溶剂挥发法,以 PLGA 为载体,制备磁性聚乳酸-羟基乙酸氧化酚砷纳米微粒(M-PLGA-PAO-NP),观察纳米粒的形态、大小和粒径分布等。该纳米粒在增加病灶部位药物浓度的同时,可达到减少全身不良反应的效果,为开展探索 M-PLGA-PAO-NP 靶向抗肿瘤治疗奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 氧化酚砷(phenylarsine oxide, 美国

[基金项目] 国家自然科学基金(30370644); 上海科研计划项目(0352nm107). Supported by National Natural Science Foundation of China (30370644), and Scientific Research Program of Shanghai (0352nm107).

[作者简介] 董勤, 博士生. E-mail: hongyu1221@yahoo.com.cn

* Corresponding author. E-mail: hongpeicai@sohu.com

Sigma 公司), 聚乳酸-羟基乙酸 (poly D, L-lactic-co-glycolic acid, 山东医疗器械研究所), 四氧化三铁 (纳米级, 美国 Sigma 公司), 聚乙烯醇 (PVA1788, 北京有机化工厂), 二氯甲烷等其他试剂均为分析纯, 购于上海国药集团化学试剂有限公司。

1.2 磁性纳米粒制备^[5-7] 采用超声乳化-溶剂挥发法制备 M-PLGA-PAO-NP, 将氧化酚砷和聚乳酸-羟基乙酸共聚物按一定质量比 1:10 完全溶解在 2 ml 二氯甲烷中, 再加入磁性四氧化三铁纳米颗粒, 超声分散形成油相。将油相滴入 3% PVA 水溶液 4 ml 中, 超声乳化 5 min 后呈现均匀乳状。在搅拌同时, 将上述乳液缓缓滴加到 50 ml 0.3% PVA 水溶液中, 持续搅拌 5 h, 整个搅拌过程在 37℃ 水浴中进行。搅拌结束后, 将所得混悬液置于磁铁上, 除去上清液, 再用蒸馏水洗涤, 高速离心 (12 000 r/min) 10 min, 反复 3 次。将所得沉淀物冷冻干燥、真空干燥、灭菌, 即得 M-PLGA-PAO-NP。

1.3 载药量及包封率的测定 本研究采用高效液相色谱法测定氧化酚砷的载药量及包封率。液相色谱条件^[8]为: 流动相: 乙腈: 水 = 1:4 (V/V); C-18 色谱柱: 250 mm × 4.6 mm; 流速: 1 ml/min; 进样量: 20 μl; 出峰时间: 8.76 min; 检测波长: 256 nm。

精密称取 M-PLGA-PAO-NP 冻干粉 20 mg, 加 10 ml 二甲基亚砷完全溶解、1 000 r/min 离心 2 min, 在 256 nm 波长处测峰面积 (A), 并利用标准曲线求出微粒中氧化酚砷的含量 $A = 0.26674 \times c (\text{g/ml}) + 87773$, $r = 0.9998$ 。载药量 (%) = (微粒中氧化酚砷的含量/微粒的总质量) × 100%; 包封率 (%) = (微粒中氧化酚砷的含量/投药量) × 100%。

1.4 纳米粒形态、粒径和分布的观察 采用激光粒径仪测定纳米粒的粒径大小和分布 (LS230 美国贝克曼库尔特仪器公司); 通过透射电镜 (Hitachi-6000, 日本日立公司) 观察纳米粒形态。取纳米粒混悬液适量, 滴于镀膜的电镜铜网上, 用 1.5% (W/V) 磷钨酸染色, 晾干后, 置于透射电镜下观察, 拍照。

1.5 振荡样品磁强计 (VSM) 考察纳米粒磁性 精密称取适量纳米粒, 通过 VSM 绘制纳米微粒的磁滞曲线, 验证纳米粒的磁性。

1.6 纳米粒体外释放试验 精密称取适量纳米微球 (相当于氧化酚砷 1.0 mg), 悬浮于 10 ml pH 7.4 的磷酸盐缓冲液中 [内含 0.02% Tween-20 (吸附抑制剂), 0.02% Tween-80 (湿润剂), 0.02% NaN₃ (抑菌剂)], 置于 37℃ 条件下, 于水浴恒温振荡器上振荡, 振荡频率为 100 次/min。在设定时间点取出,

12 000 r/min 离心 10 min, 除去上清液, 剩余微球用二甲基亚砷完全溶解, 1 000 r/min 离心 2 min 后, 取上清液用上述高效液相法于 256 nm 处检测微球内残余药量, 再计算释放百分率。

2 结果

2.1 纳米粒的包封率和载药量 本研究制备的纳米粒平均包封率为 34.2%, 包封率较好。取 5 批制备的纳米粒, 进行载药量测定, 测得载药量分别为 3.06%、3.15%、3.18%、3.21%、3.41%, 平均载药量为 3.20%, 批间差异较小, 说明工艺稳定性、重现性好。

2.2 微球形态、粒径和分布的观察 结果表明 M-PLGA-PAO-NP 呈圆形, 表面光滑, 分布均匀, 不粘连, 磁性微球中可见非均匀分散的黑色不透光区, 为四氧化三铁微粒 (图 1)。激光粒度分析仪测定粒径分布范围窄, 粒度集中分布在 140~500 nm, 平均粒径为 290 nm (图 2)。

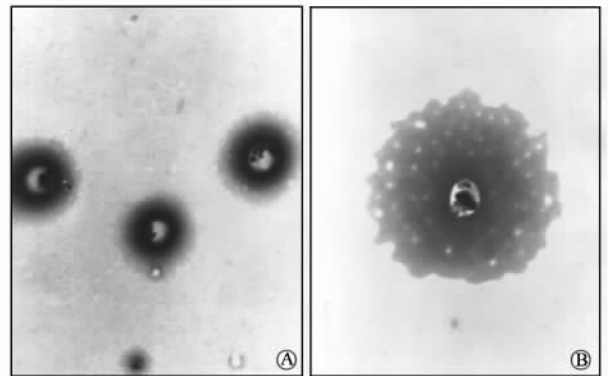


图 1 M-PLGA-PAO-NP 透射电镜照片
Fig 1 TEM photographs of M-PLGA-PAO-NP
A: ×40 000; B: ×100 000

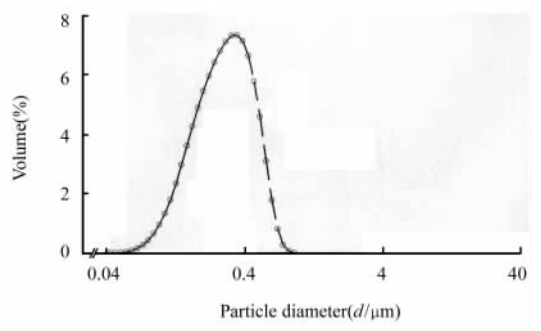


图 2 激光粒度分析 M-PLGA-PAO-NP 粒径分布
Fig 2 Diameter distribution of M-PLGA-PAO-NP by LS230

2.3 纳米粒磁性考察 通过 VSM 检测可知, 由于纳米微粒包裹四氧化三铁, 故具有铁磁性物质所具有的磁滞现象, 在改变磁场的大小与方向的情况下,

形成一条封闭的磁滞曲线(图 3),充分表明氧化酚砷聚乳酸纳米微粒具有一定的磁响应性。

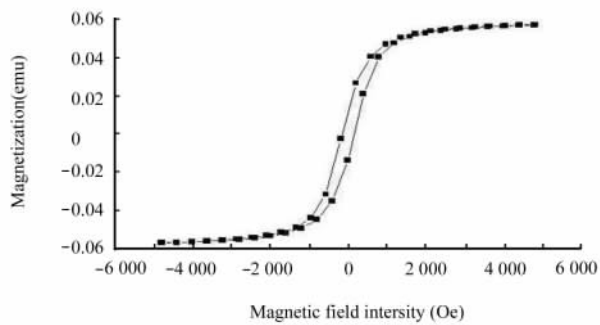


图 3 磁性聚乳酸-羟基乙酸氧化酚砷纳米微粒磁滞曲线

Fig 3 Hysteresis loop of M-PLGA-PAO-NP

2.4 纳米粒体外释放试验 纳米粒的体外释放曲线见图 4。可看出,经过最初的快速释放后,进入缓慢控释阶段,于第 8 天时达到最终基本稳定的平台期。

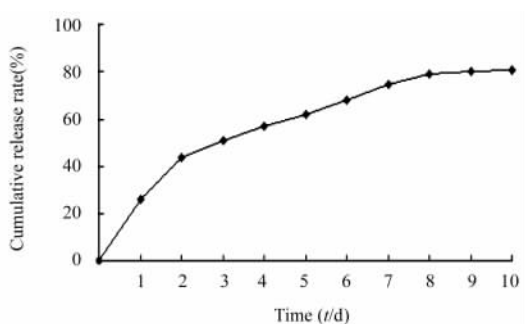


图 4 磁性聚乳酸-羟基乙酸氧化酚砷纳米粒体外释放结果

Fig 4 Cumulative result of *in vitro* release of M-PLGA-PAO-NP

3 讨论

采用生物相容性好、可降解的高分子材料纳米化作为载体,将药物与磁性物质包裹制备磁性纳米微粒,在外加磁场的情况下可达到较好磁靶向性的作用,减少药物的全身不良反应,为靶向治疗提供了一种较好的研究思路。本实验使用的 PLGA 具有组织相容性好、无免疫原性、可生物降解等优点,经美国 FDA 批准,已应用于体内组织材料的制备。

本实验采用超声乳化-溶剂挥发法制备纳米微粒,该方法实用有效、简便易行,稳定性好。本研究发现磁性纳米微粒包封率与药物敷料比、PLGA 浓度密切相关,药物敷料比由 1:5 增加至 1:10 时,其包封率逐步增加,但进一步增高时,其包封率却明显改变,可能由于在一定药物敷料比时,绝大多数氧化酚砷已被 PLGA 所包裹,即使再增加 PLGA 含

量,包封率未必增加。PLGA 溶液有一定的黏稠性,随着浓度增加会加大溶液的黏度,影响纳米粒径的大小。分散介质 PVA 浓度高低对纳米微粒的成球性有较明显的影响,PVA 浓度过低会造成 PLGA 黏连,无法成球,浓度过高时则会影响微粒粒径与微粒的圆整度,与文献报道^[9,10]一致,故本研究采用了不同浓度的分散介质,进行阶段分散。

从体外释放曲线图上可看出磁性聚乳酸纳米微粒的释放过程,由最初的快速释放,即纳米粒表面吸附的药物形成的“突释”,到最终稳定的平台期(约在第 8 天),药物通过骨架材料扩散和纳米高分子聚合物缓慢溶蚀药物稳定释出,整个过程主要由 PLGA 的水解溶蚀、降解和药物的扩散来控制的。通过这种缓释作用,可减少给药的次数及用药总量,以延长药物的作用时间、减少不良反应。

[参考文献]

- [1] Sahara N, Takeshita A, Kobayashi M, et al. Phenylarsine oxide (PAO) more intensely induces apoptosis in acute promyelocytic leukemia and As₂O₃-resistant APL cell lines than As₂O₃ by activating the mitochondrial pathway[J]. *Leuk Lymphoma*, 2004, 45:987-995.
- [2] 孙岳平,贾培敏,蔡 循,等. 氧化酚砷对血液肿瘤细胞系的体外效应[J]. *癌症*, 2000, 19:27-29.
- [3] Sander EA, Alb AM, Nauman EA, et al. Solvent effects on the microstructure and properties of 75/25 poly(D, L-lactide-co-glycolide) tissue scaffolds[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2004, 70:506-513.
- [4] Massey BL, Wen X, Rohr LR, et al. Resorption rate and biocompatibility characteristics of two polyester ventilation tubes in a guinea pig model[J]. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2004, 131:921-925.
- [5] Perez C, Sanchez A, Putnam D, et al. Poly (lactic acid)-poly (ethylene glycol) nanoparticles as new carriers for the delivery of plasmid DNA[J]. *J Contr Rel*, 2001, 75 (1-2) :211-224.
- [6] Okassa LN, Marchais H, Douziech-Eyrolles L, et al. Development and characterization of sub-micron poly (D, L-lactide-co-glycolide) particles loaded with magnetite/maghemite nanoparticles[J]. *Inter J Pharmaceut*, 2005, 302:187-196.
- [7] Choi SH, Park TG. G-CSF loaded biodegradable PLGA nanoparticles prepared by a single oil-in-water emulsion method[J]. *Int J Pharm*, 2006, 311:223-228.
- [8] Haas R, Schmidt TC, Steinbach K, et al. Chromatographic determination of phenylarsenic compounds[J]. *Fresenius J Anal Chem*, 1998, 361:313-318.
- [9] Yang F, Liang R, Pan YF, et al. Preparation, characterization and *in vitro* release of ciprofloxacin poly(lactic acid) microspheres[J]. *J Chin Pharmaceut Sci*, 2005, 14:95-99.
- [10] Cui F, Cun D, Tao A, et al. Preparation and characterization of melittin-loaded poly (D, L-lactic acid) or poly (D, L-lactic-co-glycolic acid) microspheres made by the double emulsion method[J]. *J Contr Rel*, 2005, 107:310-319.

[收稿日期] 2006-04-21

[修回日期] 2006-11-20

[本文编辑] 尹 荼