

PEG-PLGA 载 5-FU 纳米缓释微球的制备及体外释药研究

王锡山^{1*}, 汤庆超¹, 汤 钧², 林 航²

(1. 哈尔滨医科大学第三临床医学院 腹外科, 黑龙江 哈尔滨 150081; 2. 吉林大学 化学学院, 吉林 长春 130023)

[摘要] 目的 将 5-FU(氟尿嘧啶)包裹于可生物降解性高分子聚合物 PLGA(聚乳酸丙酮酸聚合物)中,构成具有缓释特性的纳米球,并于其表面以能阻止 MPS 细胞吞噬的亲水基团 PEG(聚乙二醇)修饰,以达到适于体内长循环的载药体系。方法 复乳法将氟尿嘧啶水相于二氯甲烷中均匀分散,形成 W/O 的初乳液,将该初乳液在高速搅拌下缓慢注入含 5%(W/V)聚乙炔醇(PVA)的氟尿嘧啶饱和水溶液中,经乳化形成 W/O/W 乳液,旋转蒸发二氯甲烷溶剂使微球固化;冻干后在 4℃ 冰箱中保存。结果 纳米微球平均粒径 310nm,表面光滑,直径分布均匀,5-FU 载药量 15.4%,缓释 5d。结论 制备得到了缓释时间为 5d 的 5-FU 载药纳米微球。

[关键词] 5-氟尿嘧啶;聚乙丙交酯聚乙二醇;纳米粒子;体外释药

[中图分类号] R979.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-1905(2007)05-0422-03

Study on preparation and in vitro release of 5-fluorouracil loaded poly(lactide-co-glycolide-co-poly(ethylene glycol)) nanoparticles

WANG Xi-shan, TANG Qing-chao, TANG Jun, *et al*

(Department of Abdominal Surgery, The Third Clinical College, Harbin Medical University, Harbin 150081, China)

Abstract: Objective To prepare a 5-fluorouracil carried system by PLGA nano-sphere, a material with biodegradability and ER(extended release) capability, of which surface was modified by hydrophilic group PEG to prolong NPs *in vivo* circulation. **Methods** High shearing emulsification was used to make the 5-fluorouracil internal water phase dispersed uniformly in dichloromethane and the primary emulsion (W/O) was thus obtained. This was dripped into 5-FU saturated solution containing 5% (W/V) of PVA under a vigorous stirring for 5 min to obtain the double emulsion (W/O/W). Afterwards, the solvent evaporation was carried out under vacuum, using a rotating evaporator to make the particle indurescent. Eventually lyophilized NPs was stored at 4℃. The morphology of the NPs was investigated by scanning electron microscopy (SEM) and loading efficiency was determined by thermogravimetric analysis (TGA). Drew the curve of accumulative release rate on time by UV spectrophotometer. **Results** The average-diameter of 5-FU-PLGA-PEG-NP was 310nm, loading efficiency was 15.4%. *In vitro* release test showed that the release behavior of 5-FU from NPs in PBS was that after an obvious release of about 52.5% in former 24h, there were 99.2% 5-FU released within 5 days. **Conclusion** We adjust experiment factors such as polymer concentration, internal water phase volume, and emulsification time to prepare drug loaded NPs by W/O/W double emulsion. Investigation of drug loading efficiency and *in vitro* release shows that the 5-FU loaded NPs have well sphere morphology and 5-days control release properties.

Key words: 5-fluorouracil; poly(lactide-co-glycolide-co-poly(ethylene glycol)); nanoparticles; *in vitro* release

5-氟尿嘧啶是一种经典的抗代谢类广谱抗癌药

物,广泛应用于大肠癌、胃癌等消化道恶性肿瘤的治疗。但因其生物半衰期短,仅为 5~10min,有效血药浓度维持时间短,临床以多次反复持续滴注方式解决,而反复多次的给药方式又加重了副反应的发生。聚乙丙交酯 PLGA 是临床常用的一种医用敷料,以其良好的组织相容性和可生物降解性而被广泛应用

[收稿日期] 2007-01-11

[基金项目] 吴阶平基金项目(04102303);哈尔滨市科技创新人才研究专项基金项目(2006RFPXS075)

[作者简介] 王锡山(1966-),男,黑龙江哈尔滨人,教授,博士研究生导师。*通讯作者

于医药载体^[1-2]。本研究利用纳米技术建立 PLGA 包载 5-氟尿嘧啶的可控释药体系。针对微球缓释粒子在体内的循环特点,制备易于通透肿瘤部位血管壁的纳米级微球。同时,将其平均粒径限定于 310nm 及对球表面以能阻止巨噬细胞吞噬系统(mononuclear phagocyte system,MPS)吞噬的亲水基团长链 PEG 修饰,以利于更有效逃避体内 MPS 的清除作用^[3-5],并对制备的 5-FU-PLGA-PEGNP(下文均简称为 NP)进行表征检测及体外释药特性的初步研究。

1 材料与方法

1.1 试剂

PEG-PLGA(聚乙二醇-聚丙交酯)(PEG, $M_n = 2000$;PLGA, $M_n = 3.5$ 万,50/50)(山东济南岱罡生物科技有限公司),PVA(聚乙烯醇)($M_n = 13\ 000 \sim 23\ 000$,醇解度 87%~89%)(Aldrich),二氯甲烷等其它药品及试剂均分析纯(北京化工厂)。

1.2 仪器

Fa-25 高剪切分散乳化剂(Fluko),XZ-5 旋转蒸发仪,Eppendorf 5810R 台式离心机(Sigma),真空冻干机,LS-13320 粒度分析仪(BeckmanCoulter),SIS510 型扫描电子显微镜,STA409 型综合热分析仪(德国),UV-2501PC 紫外可见分光光度仪。

1.3 5-FU-PEG-PLGA-NP 的制备

在经典乳化-溶剂挥发法基础上加以适当改进制备 5-FU-PEG-PLGA 纳米微球。将 1.6gPEG-PLGA 溶于 80mL 二氯甲烷中,缓慢注入 4mL 10%(W/V)的 5-FU 氢氧化钠溶液,高剪切 26 000r/min 乳化 50s 3 次,形成 W/O 初乳液。将此溶液经分液漏斗缓慢加入 160mL 含有 5%(W/V)PVA 的 5-FU 饱和溶液中,高剪切 26 000r/min 乳化 5min,旋转蒸发蒸去二氯甲烷,将 NP 悬浮液离心并收集,用二次蒸馏水洗涤数次后冻干,将所得 NP 于 4℃ 冰箱保存^[6]。

2 结果

2.1 SEM 表征分析

扫描电子显微镜(SEM)观察已制备 NP 的表观形态特征,如图 1 显示,5-FU-NP 成球规整,呈圆形或椭圆形,分布均匀,彼此不粘连。

2.2 纳米微球的粒度分析

粒度测定显示 5-FU-NP 粒度分布均匀,平均粒径为 310nm,结果见图 2。

2.3 载药量的测定

称取 4mg NP,在 N₂ 气保护下,以 10℃/min 的升温速度对其进行热重分析(TGA),得到 NP 载药量为

15.4%。

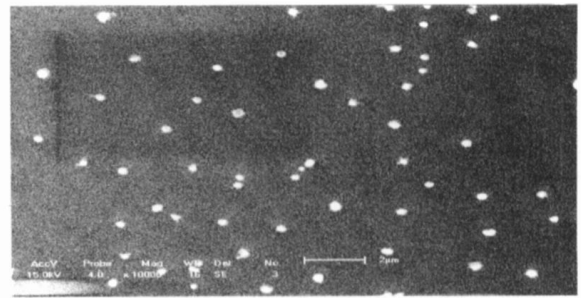


图 1 5-FU 纳米粒子的 SEM 照片

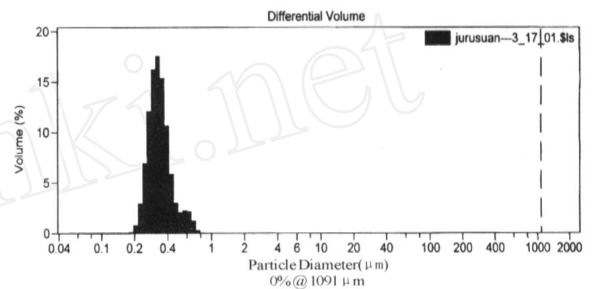


图 2 5-FU-NP 的粒径分布

体积比统计数据 PEG-PLGA-5-FU-NP;测量范围 0.040~2 000μm;容积:100%;平均粒径:0.310μm;中位粒径:0.300μm

2.4 NP 的体外释药

精确称取 50mg 5-FU,溶于 10mL PBS 缓冲溶液中,分别稀释到 0.05%、0.01%、 5×10^{-3} 、 1×10^{-3} 、 5×10^{-4} 、 1×10^{-4} 、 5×10^{-5} ,于 265nm 测吸光度 A。据 A 值绘制 5-FU 对 PBS 液的标准曲线,所得标准曲线方程为 $A = 0.29674 + 44.85016C [c / (mg \cdot mL)]$ ($R = 0.99338$)。精确称取 50mg 载药 NP 于透析袋中,加入 10mL PBS 缓冲液(pH = 7.4),将密闭好的透析袋放入 90mL PBS 缓冲液中,该体系置于 37℃,70r/min 摇床中恒温振荡,于 0h、1h、2h、3h、4h、5h、6h、7h、8h、9h、12h、24h、30h、48h、72h、96h、120h 分别取样 4mL,每次取样后向原缓冲液中及时补加 4mL PBS。样品分别在 265nm 下测定 A,代入标准曲线方程,计算出相应浓度,分别计算不同时间点 NP 的累积释药百分率(%),绘制释药时间曲线(图 3)。

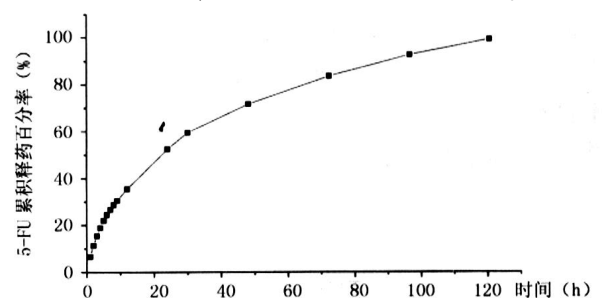


图 3 5-FU-NP 体外释药曲线

3 讨论

由于进展期肿瘤组织周围毛细血管增生显著,而肿瘤部位毛细血管对 400 ~ 600nm 以下的粒子的通透性和摄取作用很强^[7],因此,近年来纳米药物以其很好的通透性和靶向性而在抗癌药物研究中备受关注。5-氟尿嘧啶作为经典抗肿瘤药物,其疗效常常被其过快的体内代谢过程产生的诸多毒副作用限制,因而纳米技术和可生物降解物质的可塑性成为一种可行的解决方案^[8-10]。与传统超声乳化法相比,该方案可以在简化制备过程的同时,有效地将载药粒子的粒径降低到纳米范围。

本实验使用了 PLGA (50/50) 替代 PLA,因为 PLGA 与 PLA 相比固化较慢,因此在较长的溶剂蒸发过程中,表面张力致使 PLGA 微球的粒径进一步缩小。其次,PLGA 连接亲水 PEG 链段后,使 NP 内部为疏水的载药部位,而表面 PEG 的亲水性更加有利于抵制和逃逸 MPS 的吞噬。同时降低内水相的用量和改用高剪切乳化仪提供更强大的乳化功效,使初乳液粒径大大降低,更易得到纳米级复乳粒子^[11]。最后制备获得的 5-FU-NP 冻干粉剂分散度良好不粘连,NP 表面光滑,形态规整(图 1),这是使该体系均匀释药的重要因素之一。

微球的体外释放曲线如图 2,NP 在前 24h 内对 5-FU 的释放有明显的突释,累计释放百分比为 52.5%,然后释放较为平稳,呈零级动力学,基本上呈匀速释放,经过 5d 释放后,累计释药百分比为 99.2%,基本释放完全。将 NP 累计释药百分比(Q)与释放时间(t,h)拟合可得粒子的释药方程: $Q = 20.9037 + 0.80953t$,这说明 5-FU NP 的释放与时间有较好的线性关系,释放可持续 5d,并且从第 2d 开始,NP 释放具有零级动力学释放特性,NP 具有较好的缓释作用。该体系的释放时间适合于临床实际应用中经典的给药方案之一,即为每 3 周连续 5d 静注的给药方案,其潜在的优势为既可减少注射次数而达到相同的疗效又可减轻持续大量注入 5-FU 机体代谢过程中产生的毒副作用。

综上所述,本实验通过对复乳法制备微球的方案进行适当调整,制备得到了适合于逃避 MPS 吞噬并且易于通过毛细血管壁的纳米级载药微球,而相

对于较大粒径的载药颗粒,细胞对该粒径范围内的微球也具有较高的摄取作用^[12]。因此,基于这种纳米载药粒子的潜在优势,在本实验研究基础之上,后续的实验已经开始进行对该纳米载药粒子体内代谢和肿瘤细胞凋亡诱导作用的相关研究。

[参考文献]

- [1] Zilberman M, Eberhart RC, Schwade ND. In vitro study of drug-loaded bioresorbable films and support structures [J]. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2002, 13(11): 1221-1240.
- [2] Zilberman M, Schwade ND, Meidell RS, et al. Structured drug-loaded bioresorbable films for support structures [J]. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2001, 12(8): 875-892.
- [3] Peracchia MT, Fattal E, Desmaele D, et al. Stealth PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles for intravenous administration and splenic targeting [J]. *J Control Release*, 1999, 60(1): 121-128.
- [4] Gref R, Quellec P, Sanchez A, et al. Development and characterization of CyA-loaded poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol) PEG micro- and nanoparticles. Comparison with conventional PLA particulate carriers [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2001, 51(2): 111-118.
- [5] Bao A, Gins B, Klipper R, et al. Direct 99mTc labeling of pegylated liposomal doxorubicin (Doxil) for pharmacokinetic and non-invasive imaging studies [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2004, 308(2): 419-425.
- [6] Zambaux MF, Bonneaux F, Gref R, et al. Influence of experimental parameters on the characteristics of poly(lactic acid) nanoparticles prepared by double emulsion method [J]. *J Control Release*, 1998, 50(1-3): 31-40.
- [7] Moore A, Marecos E, Bogdanov A, et al. Tumoral distribution of long-circulating dextran-coated iron oxide nanoparticles in a rodent model [J]. *Radiology*, 2000, 214(2): 568-574.
- [8] Kataoka K, Harada A, Nagasaki Y, et al. Block copolymer micelles for drug delivery: Design, characterization and biological significance [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 47(1): 113-131.
- [9] Fontana G, Licciardi M, Mansueto S, et al. Amoxicillin-loaded polyethylcyanoacrylate nanoparticles: Influence of PEG coating on the particle size, drug release rate and phagocytic uptake [J]. *Biomaterials*, 2001, 22(21): 2857-2865.
- [10] Li C. Poly(L-glutamic acid)-anticancer drug conjugates [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2002, 54(5): 695-713.
- [11] Mainardes RM, Evangelista RC. PLGA nanoparticles containing praziquantel: effect of formulation variables on size distribution [J]. *Int J Pharm*, 2005, 290(1-2): 137-144.
- [12] Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, et al. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices [J]. *J Control Release*, 2001, 70(1-2): 1-20.