

• 研究论文 •

沉淀法制备甲基莲心碱聚乳酸-羟基乙酸共聚物纳米粒

温庆果^{1,2}, 陈敬^{1,2}, 刘韶^{1,2}, 李新中^{1,2} (1. 中南大学湘雅医院药剂科, 湖南 长沙 410008; 2. 中南大学药学院, 湖南 长沙 410013)

[摘要] 目的: 制备甲基莲心碱聚乳酸-羟基乙酸共聚物纳米粒(Nef-PLGA-NPs)。方法: 以聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)为载体, 丙酮为有机溶剂, 通过正交试验设计优化沉淀法制备甲基莲心碱 PLGA 纳米粒的工艺。结果: 最佳工艺条件为: PLGA 的质量浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, Nef 的质量浓度为 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 水相与有机相的体积比为 20:1。纳米粒平均包封率为 $(85.3 \pm 0.8) \%$, 平均载药量为 $(7.75 \pm 0.07) \%$, 平均粒径为 $(82.9 \pm 1.2) \text{ nm}$ 。结论: 优化条件下采用沉淀法制备的甲基莲心碱 PLGA 纳米粒包封率高、载药量大、平均粒径小。

[关键词] 甲基莲心碱; 纳米粒; 沉淀法; 正交设计

[中图分类号] R943 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-5213(2011)15-1231-04

Preparation of neferine-loaded PLGA nanoparticles using precipitation method

WEN Qing-guo^{1,2}, CHEN Jing^{1,2}, LIU Shao^{1,2}, LI Xin-zhong^{1,2} (1. Department of Pharmacy, Xiangya Hospital, Central South University, Hunan Changsha 410008, China; 2. College of Pharmacy, Central South University, Hunan Changsha 410013, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To prepare neferine-loaded PLGA nanoparticles (Nef-PLGA-NPs). **METHODS** Nanoparticles were prepared by a precipitation method with poly (lactic-co-glycolic) acid (PLGA) as carrier material and acetone as organic solvent, then optimize the formulations by design of orthogonality. **RESULTS** The best preparation condition: the concentration of PLGA was $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, the concentration of Nef was $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, the ratio of water phase and organic phase was 20:1. The average encapsulation efficiency of resultant nanoparticles was $(85.3 \pm 0.8) \%$, the average drug loading was $(7.75 \pm 0.07) \%$, the mean particle size was $(82.9 \pm 1.2) \text{ nm}$. **CONCLUSION** Under the optimum conditions, Nef-loaded PLGA nanoparticles prepared by a precipitation method are found to be a high encapsulation efficiency and drug loading, a smaller particle size.

KEY WORDS: neferine; nanoparticles; precipitation; orthogonal design

甲基莲心碱(neferine, Nef)是从睡莲科植物莲(Nelumbo nucifera Gaertn)成熟种子的绿色胚芽中提取出的一种双苄基异喹啉生物碱,为莲子心中主要活性成分^[1]。近年来,国内外有学者发现 Nef 具有逆转肿瘤多药耐药的作用^[2]。但是, Nef 在体内吸收代谢快,生物利用度低^[3-4]。如何增加药物的吸收同时达到靶向作用是开发该药物抗癌作用新剂型的关键。

纳米粒是一种新型的药物载体,除了具有靶向性外,还具有缓释性、提高药物稳定性及生物利用度等特点^[5]。聚乳酸-羟基乙酸共聚物 [Poly(lactide-co-glycolide) acid, PLGA] 具有良好的生物降解性、生物相容性及无毒的特点,早已由 FDA 批准上市并广泛应用于聚合物纳米粒的制备。

本文以 PLGA 作为载药材料,采用沉淀法制备 Nef 纳米粒,并通过正交实验设计对制备工艺进行优化,为研究逆转肿瘤多药耐药的 Nef 新剂型开发提供参考。

1 材料

Agilent 1100 型液相色谱仪(美国安捷伦公司); Zetasizer 1000HSA 纳米粒度分析仪(Malvern 公司); R 系列旋转蒸发器(无锡星海王生化设备有限公司); Nef 对照品(湘雅医院药剂科刘韶老师馈赠,纯度 >99%,批号 0909161); Nef 原料药(自制,面积归一化法纯度 >98%,批号 0910122); 聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA 75/25, MW15000, 济南岱罡生物科技有限公司); 聚乙烯醇(Polyvinyl Alcohol, 湖南湘中精细化学品厂); 泊洛沙姆 188(德国巴斯

[基金项目] 国家高新技术研究发展计划(863 计划)(编号:2007AA021802) **[作者简介]** 温庆果,男,硕士,电话:15116331873, E-mail: wen-qingguo2006@163.com **[通讯作者]** 李新中,男,博士生导师,教授,电话:0731-84327454, E-mail: xylixin@medmail.com.cn

夫(奥海贸易发展有限公司);丙酮、甲醇等其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 Nef-PLGA-NPs 的制备方法 采用沉淀法制备 Nef 纳米粒^[6]。精密称取处方量的 Nef 和 PLGA,加适量丙酮使之溶解,得有机相。400 r·min⁻¹ 搅拌,将有机相用 5 号针头液下缓慢注入含表面活性剂的水溶液中;继续搅拌 30 min 后 40 °C 水浴减压旋转蒸发 90 min 除去有机溶剂,0.45 μm 微孔滤膜过滤即得透明、带蓝色乳光的 nef 纳米粒胶体溶液。

2.2 Nef-PLGA-NPs 包封率及载药量的测定方法

2.2.1 色谱条件 色谱柱: Hypersil BDS C₁₈ 柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm, 大连依利特);流动相: 甲醇-水-三乙胺 (70:30:0.1);流速: 1.0 mL·min⁻¹;柱温: 30 °C;检测波长: 282 nm。

2.2.2 标准曲线的建立 精密称取干燥至恒重的 Nef 对照品 5.5 mg,置于 50 mL 量瓶中,加甲醇配制成质量浓度为 110.0 μg·mL⁻¹ 的储备液。分别精密吸取 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 mL 储备液于 10 mL 棕色量瓶中,用甲醇稀释定容,得质量浓度分别为 5.5, 11.0, 22.0, 44.0, 66.0, 88.0, 110.0 μg·mL⁻¹ 的系列 Nef 对照品溶液,0.45 μm 滤膜滤过, HPLC 测定,以峰面积 (Y) 对对照品溶液浓度 (X) 回归得标准曲线,回归方程为: $Y = 7.989X - 19.911$, $r = 0.9993$ ($n = 7$)。结果表明 Nef 在 5.5 ~ 110.0 μg·mL⁻¹ 范围内线性关系良好,辅料对其测定无干扰 (见图 1)。

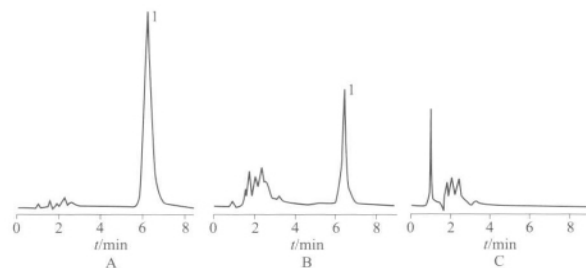


图 1 Nef 的高效液相色谱图

A. Nef 对照品; B. Nef-PLGA-NPs; C. 空白 PLGA 纳米粒; 1-Nef 峰

Fig 1 HPLC spectra of Nef

A. Nef control; B. Nef-PLGA-NPs; C. blank PLGA nanoparticles; 1-Nef peak

2.2.3 包封率及载药量的测定 吸取一定量的 Nef-PLGA-NPs 胶体溶液,低温超速离心 (4 °C, 15 000 r·min⁻¹, 60 min) 2 次,取上清液进样, HPLC 测定 Nef 含量并按以下公式计算包封率和载药量。

$$\text{包封率 (ER)} = [(W_1 - W_2) / W_1] \times 100\%$$

$$\text{载药量 (DL)} = [(W_1 - W_2) / W_{\text{PLGA+Nef}}] \times 100\%$$

其中 W_1 为投药量; W_2 为上清液含药量;

$W_{\text{PLGA+Nef}}$ 为 PLGA 用量与投药量之和。

2.3 纳米粒粒径及其分布的测量 取一定量的纳米粒胶体溶液,纯化水稀释 5 ~ 10 倍,用 Zetasizer 1000HSA 激光纳米粒度分析仪测量纳米粒的平均粒径及其分布。

2.4 单因素考察法初选 Nef-PLGA-NPs 的制备工艺条件

2.4.1 PLGA 浓度对纳米粒制备的影响 固定 Nef 质量浓度为 1.0 mg·mL⁻¹,聚乙烯醇 (PVA) 浓度为 1%,水相与有机相体积比为 10:1,PLGA 质量浓度分别为 5, 10, 15, 25 mg·mL⁻¹,按“2.1 ~ 2.3”项下方法制备 Nef-PLGA-NPs,测定包封率和纳米粒平均粒径。结果见表 1。

表 1 PLGA 浓度对 Nef-PLGA-NPs 包封率和平均粒径的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Tab 1 Effect of the concentration of PLGA on the ER and mean diameter ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

PLGA 质量浓度 /mg·mL ⁻¹	包封率 /%	平均粒径 /nm
5	37.3 ± 0.9	80.3 ± 2.4
10	71.9 ± 0.2	88.1 ± 3.1
15	73.2 ± 1.2	103.2 ± 2.8
25	73.7 ± 0.5	173.0 ± 5.2

2.4.2 水相与有机相体积比对纳米粒制备的影响 固定 PLGA 质量浓度为 10 mg·mL⁻¹,其余工艺不变,水相与有机相体积比分别为 1:1, 5:1, 10:1, 20:1,按“2.1 ~ 2.3”项下方法制备 Nef-PLGA-NPs,测定包封率和纳米粒平均粒径。结果见表 2。

表 2 水相与有机相体积比对 Nef-PLGA-NPs 包封率和平均粒径的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Tab 2 Effect of the volume ratio of water to acetone on the ER and mean diameter of Nef-PLGA-NPs ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

V _水 :V _油	包封率 /%	平均粒径 /nm
1:1	40.1 ± 2.4	256.2 ± 6.6
5:1	80.5 ± 1.6	198.7 ± 5.7
10:1	75.3 ± 0.9	105.9 ± 2.3
20:1	73.6 ± 1.9	92.4 ± 3.6

2.4.3 Nef 浓度对纳米粒制备的影响 固定其他制备条件,Nef 质量浓度分别为 0.5, 1.0, 2.0 mg·mL⁻¹,按“2.1 ~ 2.3”项下方法制备 Nef-PLGA-NPs,测定包封率和纳米粒平均粒径。结果见表 3。

表 3 Nef 浓度对 Nef-PLGA-NPs 包封率和平均粒径的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Tab 3 Effect of the concentration of Nef on the Nef-PLGA-NPs ER and mean diameter ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Nef 质量浓度 /mg·mL ⁻¹	包封率 /%	平均粒径 /nm
0.5	73.3 ± 3.3	68.8 ± 1.6
1.0	81.7 ± 1.8	94.5 ± 1.2
2.0	90.6 ± 2.0	120.1 ± 5.6

2.5 正交试验设计优选 Nef-PLGA-NPs 的制备工艺

2.5.1 因素水平的确定 参考文献 [7-8] 及单因素试验结果, 选择影响制备 Nef-PLGA 纳米粒的主要因素即 PLGA 的质量浓度 (A)、Nef 的质量浓度 (B) 及水相和有机相的体积比 (C) 为考察对象, 每个因素各取 3 个水平 (见表 4)。选用 $L_9(3^4)$ 正交试验表, 安排试验 (见表 5)。

表 4 因素与水平

Tab 4 Factors and levels

水平	因素			
	A/mg·mL ⁻¹	B/mg·mL ⁻¹	空白	C
1	10	0.5	-	5
2	15	1.0	-	10
3	20	2.0	-	20

表 5 $L_9(3^4)$ 正交试验结果

Tab 5 Results of $L_9(3^4)$ orthogonal test

实验号	A	B	空白	C	包封率/%	载药量/%	平均粒径/nm	综合指标
1	1	1	1	1	84.8	4.24	75.9	0.505 1
2	1	2	2	2	67.8	4.52	75.1	0.458 2
3	1	3	3	3	71.3	7.13	85.6	0.583 7
4	2	1	2	3	32.7	2.19	103.7	0
5	2	2	3	1	91.1	4.56	328.5	0
6	2	3	1	2	67.2	13.45	369.3	0
7	3	1	3	2	82.2	2.05	107.6	0.126 0
8	3	2	1	3	72.3	7.23	107.8	0.551 7
9	3	3	2	1	82.9	11.06	181.9	0.418 9
K_1	0.516	0.210	0.352	0.308				
K_2	0.000	0.337	0.292	0.195				
K_3	0.366	0.334	0.237	0.378				
极差 R	0.516	0.127	0.115	0.183				

2.5.2 评价指标的设定 以包封率、载药量和平均粒径为考察指标, 对各项考察指标进行标准化后, 计算综合指标 (overall desirability, OD), 用综合指标作为评价指标^[9]。

对于欲达到最大值的指标, 如包封率、载药量, 其标准化计算方程为:

$$Y_i = (X_i - X_{\min}) / (X_{\max} - X_{\min})$$

其中 X_{\max} 和 X_{\min} 分别为考察指标可被接受的最大值和最小值。当指标值等于或超过 X_{\max} 时, 将 Y_i 设为 1。相反, 当指标值等于或低于 X_{\min} 时, Y_i 为 0。

对于要进行最小化的指标, 如平均粒径等, 其标准化计算方程为:

$$Y_i = (X_{\max} - X_i) / (X_{\max} - X_{\min})$$

此时, 当考察指标值等于或超过设定的最大值时, $Y_i = 0$ 。当指标值等于或低于 Y_{\min} 时, Y_i 为 1。

各考察指标设定的最大值与最小值见表 6。

综合指标 = $(Y_1 * Y_2 * Y_3 * \dots * Y_n)^{1/n}$ (Y_n 为各项考察指标的标准化值 $n = 1, 2, 3, \dots$)。

2.5.3 正交试验结果 包封率、载药量、平均粒径和综合指标试验结果见表 5。对正交试验综合指标结果进行方差分析, 结果见表 7。

表 6 各考察指标设定的最大值与最小值

Tab 6 Maximum value and minimum value to the defined indexes

指标	包封率/%	载药量/%	平均粒径/nm
最小值	35	2.00	50
最大值	90	15.00	200

表 7 方差分析

Tab 7 Analysis of variance

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	P 值
A	0.422	2	21.100	19.000	<0.05
B	0.031	2	1.550	19.000	
C	0.052	2	2.600	19.000	
误差	0.02	2			

结果表明, A 因素即 PLGA 的浓度对制备工艺具有显著性影响, 各因素对包封率的影响依次为 $A > C > B$, 正交设计所得最佳工艺处方为 $A_1 B_2 C_3$, 即 PLGA 的质量浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, Nef 的质量浓度为 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 水相与有机相的体积比为 20:1。

2.5.4 验证试验 按正交试验筛选的最佳工艺条件, 平行制备 3 批 Nef 纳米粒, 并对其包封率、载药量和平均粒径进行测定, 用综合指标评价。结果表明, 采用优选的工艺条件制备 Nef-PLGA-NPs, 3 次试验的综合评价指标均优于正交试验中各次试验的结果, 平均粒径为 82.6 nm , 多分散指数 (PDI) 为 0.197, Zeta 电位为 -10.35 mV 。结果见表 8。

表 8 验证试验结果 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 8 Results of verification Test ($\bar{x} \pm s$)

实验号	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	综合指标
1	85.3	7.75	84.3	0.678 2
2	86.1	7.83	81.9	0.689 7
3	84.5	7.68	82.6	0.675 2
平均值	85.3 ± 0.8	7.75 ± 0.07	82.9 ± 1.2	$0.681 0 \pm 0.00 8$

2.5.5 粒子表面形态及粒径分布状况观察 取最优工艺制备的 Nef-PLGA-NPs 悬液适量, 稀释, 滴加在覆盖碳膜的铜网上, 室温 ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) 下以 2.0% 的磷钨酸钠液负染, 透射电镜下观察粒径大小和形态。结果显示, Nef-PLGA-NPs 形态圆整, 大小较均匀; 取适量 Nef-PLGA-NPs 样品, 稀释后用激光粒度分析仪进行扫描, 得到粒径分布图, 如图 2 所示。

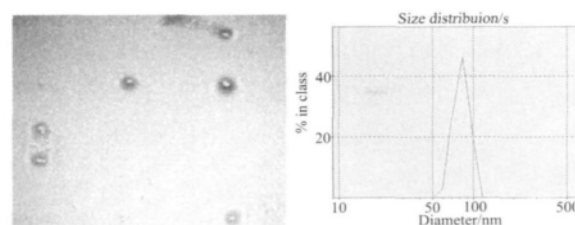


图 2 Nef-PLGA 纳米粒的透射电镜图 (放大倍数: $\times 25 000$) 及粒径分布图

Fig 2 TEM photograph and size distribution of Nef-PLGA-NPs (magnification: $\times 25 000$)

2.5.6 初步稳定性考察 将 Nef-PLGA-NPs 灌封于 10 mL 安瓿中 ,分别在室温 (25 ℃) 和冷藏 (4 ℃) 条件下放置 ,于 0 ,10 ,20 ,30 d 取样 ,测定放置前后的包封药量 ,按下式计算渗漏率 ,并观察其外观形

表 9 稳定性试验结果 ($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

Tab 9 Results of stability test ($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

贮存温度 /℃		0 d	10 d	20 d	30 d
25	粒径 /nm	82.9 ± 1.2	100.3 ± 3.5	153.6 ± 4.2	217.9 ± 5.7
	渗漏率 /%	0	2.3 ± 0.2	5.1 ± 0.3	7.6 ± 0.6
	外观形态	淡蓝色胶体溶液	淡蓝色胶体溶液	灰蓝色胶体溶液	灰白色胶体溶液
4	粒径 /nm	82.9 ± 1.2	86.4 ± 2.3	91.5 ± 2.7	100.7 ± 4.1
	渗漏率 /%	0	1.2 ± 0.3	2.5 ± 0.1	4.0 ± 0.5
	外观形态	淡蓝色胶体溶液	淡蓝色胶体溶液	淡蓝色胶体溶液	淡蓝色胶体溶液

可见 Nef-PLGA-NPs 于 4 ℃ 贮存稳定性较好 ,平均粒径及渗漏率未见显著变化。因此认为该纳米粒在冷藏条件下比较稳定。

3 讨论

纳米粒制备最常用的是纳米沉淀法和乳化-溶剂蒸发法。但乳化-溶剂蒸发法最大的缺点是使用毒性较大的有机溶剂 ,如二氯甲烷等 ,给后续的药品开发和工业化生产带来困难;沉淀法适合于难溶性药物的包裹 ,其主要优点是避免使用毒性较大的二氯甲烷等 ,且操作简单 ,方便易行。预试验中沉淀法制备的纳米粒包封率和载药量均高于乳化-溶剂蒸发法 ,粒径小且纳米粒胶体溶液稳定性 (4 ℃) 好 ,故我们选择沉淀法制备 Nef 纳米粒。

在 Nef-PLGA-NPs 的制备中 ,液下注入方式比液上滴加方式对纳米粒的粒径分布及成型更有利;试验中发现 ,针头过小易被堵塞 ,过大则使有机相加入过快而使粒径分布不均 ,因此我们选定有机相的加入方式为采用注射器 5 号针头 ,液下注入有机相 ,可制得粒径分布均匀的纳米粒。

单因素试验中发现 ,Nef-PLGA-NPs 胶体溶液在浓缩 (40 ℃) 过程中 ,不仅蒸发了有机溶剂丙酮 ,而且还使纳米粒子的粒径分布变得更加均匀且平均粒径下降。这可能要归因于高分子表面活性剂 PVA 在浓缩过程中形成了抵抗性的包衣膜而防止纳米粒的聚集 ,从而增加其稳定性。但浓缩时间过长 ,溶液体积减少 ,可能会导致载体材料的析出而使纳米粒粒径变大 ,试验确定浓缩时间为 90 min 可以得到包封率和粒径较优的纳米粒。同时还考察了表面活性剂 (如聚乙烯醇 PVA、泊洛沙姆 188) 对纳米粒制备的影响 ,确定以浓度为 1% 的 PVA 水溶液作为表面活性剂进行制备实验。

态及粒径的前后变化。

$$\text{渗漏率} = (W_{\text{前}} - W_{\text{后}}) / W_{\text{前}} \times 100\%$$

式中 , $W_{\text{前}}$ 、 $W_{\text{后}}$ 分别为贮存前和贮存后测得的包封药量 ,结果见表 9。

在多因素多指标的科研试验中 ,由于指标之间的非公度性及矛盾性 ,使得对方案的评价变得复杂和困难。通常是选择某种试验设计方法安排试验后 ,将多指标问题转化为综合指标进行优化分析。然而 ,人们一般采用的权重系数法、排队评分法、公式评分法等往往受主观因素干扰和缺乏通用性。本文参考 Doehlert 设计的渴求函数优化法^[10] ,以整体渴求函数值作为综合评价指标 ,较好地解决了相互矛盾指标的优化问题。

参考文献:

- [1] 谢纲 ,曾建国. 莲心心的主要成分和药理作用研究进展 [J]. 湖南中医药大学学报 2007 27: 384-386.
- [2] 秦群 ,谢兆霞 ,李新中 ,等. 中药拮抗对 K562/ A02 细胞内阿霉素积聚浓度的影响 [J]. 湖南中医学院学报 2005 25(5): 18-20.
- [3] Zhao Libo ,Wang Xiaomin ,Wu Jianhong ,et al. Improved RP-HPLC method to determine neferine in dog plasma and its application to pharmacokinetics [J]. J Chromatogra B 2007 ,857: 341-346.
- [4] 鲁定国 ,李媛 ,刘韶 ,等. 影响莲心总碱中甲基莲心碱稳定性因素的试验研究 [J]. 中国中药杂志 2008 33(20): 2418-2420.
- [5] Wang M ,Thanou M. Targeting nanoparticles to cancer [J]. Pharmacolog Res ,2010 ,62: 90-99.
- [6] Gupta H ,Pharm B ,Pharm M ,et al. Sparfloxacin-loaded PLGA nanoparticles for sustained ocular drug delivery [J]. Nanomedicine 2010 6(2): 324-333.
- [7] Holgado MA ,Arias JL ,Cózar MJ et al. Synthesis of lidocaine-loaded PLGA microparticles by flow focusing effects on drug loading and release properties [J]. Inter J Pharmaceut 2008 358: 27-35.
- [8] Song X ,Zhao Y ,Hou S et al. Dual agents loaded PLGA nanoparticles: systematic study of particle size and drug entrapment efficiency [J]. Eur J Pharm Biopharm 2008 ,69: 445-453.
- [9] 王宁 ,王建新 ,宋崎 ,等. 正交设计多指标综合评价法优化救心速释片处方 [J]. 中成药 2003 25(3): 179-182.
- [10] 汪冬庚 ,刘文英. Doehlert 设计矩阵及其在药学中的应用 [J]. 药学进展 2005 29(11): 497-501.

[收稿日期] 2010-09-19