

雷公藤甲素聚乳酸纳米粒载药体系的研究

刘明星,董 静,杨亚江*,杨祥良,徐辉碧

(华中科技大学药物研究所,武汉 430074)

【摘要】 目的:研究聚乳酸包裹雷公藤甲素纳米粒的制备,并探讨其载药性质。方法:采用改良的自乳化溶剂蒸发法制备雷公藤甲素(TP)聚乳酸(PLA)纳米粒,考察各工艺因素对纳米粒粒径、包封率及载药量的影响,并通过透射电子显微镜(TEM)、动态激光粒度分析仪、傅立叶红外光谱(FT-IR)及X-射线粉末衍射(X-ray)初步研究了其载药性质。结果:优选出适合处方的包合工艺为:水相与有机相的比例为40:15(w/v),表面活性剂的浓度为1%,药物的浓度为0.3%,TP与PLA的比例为1:15(w/w),包封率为74.27%,载药量的百分率为1.36%,所得纳米粒形态光滑规整,其粒径分布均匀,FT-IR及X-ray表明TP被有效地包裹在纳米粒中。结论:此方法适合制备脂溶性药物聚合物纳米粒,适合大生产。

【关键词】 自乳化溶剂蒸发法;雷公藤甲素;聚乳酸;纳米粒;制备

【中图分类号】 R967; TQ317 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-5048(2004)02-0117-05

雷公藤甲素(Triptolide, TP)是卫矛科植物雷公藤的主要成分之一,经药理和临床试验表明它具有免疫抑制、抗炎、抗生育及抗肿瘤等生物活性^[1]。

聚合物纳米粒作为药物载体释放体系在药物和基因输送方面具有许多优越性:可缓释药物、靶向输送、减轻和避免毒副作用等^[2]。近年来具有可生物降解和生物相容性的聚乳酸作为载体材料的纳米控释系统的研究异常活跃^[3]。有关聚合物纳米粒的制备方法较多,如溶剂蒸发法^[4]、沉淀法^[5]、超临界流体技术^[6]等。对于脂溶性药物,应用较多的是水包油溶剂蒸发法,但是这种方法最大的缺点是使用了毒性较大的有机溶剂如二氯甲烷等,以及需要高能量的设备如超声仪等,这些都不利于药品的开发和工业化生产,自乳化溶剂蒸发法能克服以上的不足,而且经实验表明,在这种方法的基础上,用混合溶剂如丙酮/乙醇等代替单一溶剂如丙酮等效果更好^[7],而且操作简单方便。

本文以TP为模型药物,采用改良的自乳化溶剂蒸发法制备聚乳酸纳米粒,同时讨论了各工艺因素对纳米粒的粒径、包封率和载药量的影响,并初步研究了其载药性质。

1 材料及仪器

雷公藤甲素(福建中医药研究所);聚乳酸(D,

L-PLA, Mw = 10197, 山东医疗器械研究所), Poloxamer 188(沈阳药大集琦药业有限责任公司), 甲醇为色谱纯,其它试剂均为分析纯。

GL 20型全自动高速冷冻离心机(湘西仪器仪表总厂机械仪器厂), LGJ 0.5冷冻干燥机(北京四环科学仪器厂), Agilent HP 1100型高效液相色谱系统(Agilent Technologies, USA)。JEM-100CX II透射电子显微镜(JEOL, 加速电压100KV), ZetaPALS无机/有机多功能Zeta电位/动态激光粒度分析仪(Brook Haven Instruments corporation, USA), 1700型傅立叶红外光谱仪(Perkin-Elmer)及D/MAX-RB转靶X-射线粉末衍射仪(Rigaku)。

2 方法

2.1 纳米粒的制备

采用改良的自乳化溶剂蒸发法制备雷公藤甲素聚乳酸纳米粒^[7],将溶有适量聚乳酸和雷公藤甲素的丙酮/无水乙醇所组成的有机相,搅拌下滴加到含有一定量 Poloxamer 188 水相中,滴毕,继续搅拌2~5 min,然后减压蒸出有机溶剂和一部分水,即得纳米粒胶态混悬液。此胶态混悬液作透射电镜和粒径分析,或超速冷冻离心3 h(12 000 r/min, 10℃)后,沉淀物经重蒸馏水洗涤、离心2次,水分散

*【收稿日期】 2003-10-15 【*通讯作者】 Tel: 027-87547141 E-mail: yjyang@mail.hust.edu.cn

【基金项目】 国家863计划资助项目(No. 2001AA218051)

后经冻干得白色纳米粒粉末。

2.2 纳米粒的形态观察

取 1~2 滴纳米粒胶态混悬液置于铜网上,用 2% 磷钨酸溶液染色,室温晾干,于透射电子显微镜下观察纳米粒的形态并拍照。

2.3 纳米粒的粒径大小及其分布

室温条件下,取纳米粒胶态混悬液,以重蒸馏水稀释后,置于动态激光粒度分析仪的样品管中,在波长 635.0 nm 处测定粒径大小分布及平均粒径。

2.4 包封率及载药量的测定

2.4.1 反相高效液相色谱法 (RP-HPLC) 色谱条件: 色谱柱为 Lichrospher C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 甲醇-水 (48 : 52) 为流动相; 检测波长 218 nm; 柱温 30 °C; 流速 1.0 ml/min; 进样量为 20 μl, 外标法。

2.4.2 包封率及载药量的测定 精密称取载药纳米粒冻干粉适量于 5 ml 的容量瓶中,以重蒸馏水水合后定容至刻度,恢复冻干前的浓度,精吸该溶液 1 ml 至小烧杯中,搅拌下微热蒸发溶剂至干,加入 2 ml 二氯甲烷使固体完全溶解,母液微热蒸发溶剂至干,流动相溶解,膜过滤 (0.45 μm) 后转入到 10 ml 容量瓶中并用流动相定容至刻度,摇匀即得样品溶液,进样 20 μl 进行色谱分析,代入标准曲线方程计算包裹雷公藤甲素的量,经换算后按下式计算包封率 (EE%) 和载药量的百分率 (DL%):

$$\text{包封率 (EE\%)} = W_{\text{包}} / W_{\text{药}} \times 100\%$$

$$\text{载药量 (DL\%)} = W_{\text{包}} / W_{\text{总}} \times 100\%$$

式中 $W_{\text{包}}$: 纳米粒中包裹药物量 (mg), $W_{\text{药}}$: 投入的总药量 (mg), $W_{\text{总}}$: 纳米粒的总重量 (mg)。

2.5 傅立叶红外光谱 (FT-IR) 分析

对空白纳米粒 (PLA-NP)、载药纳米粒 (TP-PLA-NP)、药物 (TP) 及空白纳米粒与药物的机械混合 (TP + PLA-NP) 进行 FT-IR 分析, KBr 压片。

2.6 X-射线粉末衍射 (X-ray) 分析

对以上 4 种物质 PLA-NP、TP-PLA-NP、TP、PLA-NP + TP 进行 X-ray 分析。测试条件为 Cu-K_α 辐射, 电压 40 kV, 管流 50 mA, 2θ 范围在 5° ~ 70°, 角速度为 15° (2θ)/min。

3 结果

3.1 各工艺因素对纳米粒性质的影响

3.1.1 水相 (外相) 与有机相 (内相) 体积比的影响

固定表面活性剂的浓度为 1% (w/w), TP 在有机溶剂的浓度为 0.3% (w/w), 取聚乳酸为 100 mg, 改变外相的体积, 测定各条件下纳米粒的粒径、包封率、载药量 (见表 1)。由表 1 可知, 随着外相体积的增大, 纳米粒粒径明显减小, 包封率和载药量相应减小。

Tab 1. Effect of the ratio of the aqueous and organic phases on the properties of nanoparticles

Volume ratio (v/v) ^a	Mean size (nm)	EE (%)	DL (%)
1.6 : 1	289.2	77.13	1.76
2 : 1	145.6	74.6	1.3
2.6 : 1	149.7	74.27	1.36
4 : 1	133.5	55.3	1.11
8 : 1	133.7	53.2	0.9

^a the volume ratio of aqueous and organic phases

EE: encapsulation efficiency; DL: drug loading

3.1.2 表面活性剂浓度的影响 根据表 1 的数据, 其它条件不变, 取水相 (外相) 与有机相 (内相) 的体积比为 40 : 15 (ml/ml), 改变表面活性剂的重量, 在不同浓度下测定纳米粒径、包封率和载药量 (见表 2)。结果表明, 随着表面活性剂的浓度的增大, 其粒径明显减小, 包封率和载药量趋向减小, 但浓度大于 1% 时, 其结果相反。

Tab 2 Effect of the surfactant concentration on the properties of nanoparticles

$c_{\text{surfactant}}$ (% w/w)	Mean size (nm)	EE (%)	DL (%)
0.1	238.6	76.4	1.44
0.25	189.5	75.1	1.37
1.0	149.7	74.27	1.36
2.0	169.1	74.9	1.4
4.0	219.6	79.1	1.5

3.1.3 药物浓度的影响 其它条件不变, 改变 TP 的重量, 在不同浓度下测定纳米粒径、包封率和载药量 (见表 3)。由实验数据可知, 随着药物在有机溶剂中浓度的增大, 纳米粒的粒径、包封率和载药量都有增大趋势 (由于处方要求, 所用药物量不大)。

Tab 3. Effect of the drug concentration in organic phase on the properties of nanoparticles

$c_{TP}(\%, w/w)$	Mean size(nm)	EE(%)	DL(%)
0.05	135.5	66.2	1.2
0.1	146.6	73.2	1.33
0.3	149.7	74.27	1.36
5	176.3	75.0	1.4

3.2 纳米粒的粒径测定和形态观察

透射电子显微镜下观察到在相同优化条件下制备的空白和载药纳米粒呈圆形, 形态规整, 它们的平均粒径没有很大变化, 分别为 138.6 nm 及 149.7 nm, 多分散指数分别为 0.088 和 0.11, 且粒径呈正态分布(见图 1)。

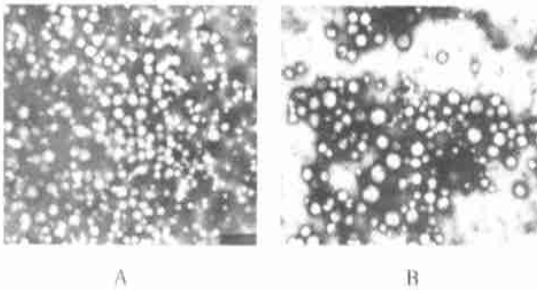


Fig 1. A and B are the transmission electron microscopy (TEM) of PLA-NP and TP-PLA-NP ($\times 29\ 000$) respectively

3.3 包封率和载药量的测定

实验结果表明, 浓度在 1.84 ~ 46 $\mu\text{g/ml}$ 范围内, 雷公藤甲素的浓度 (c) 与其相应值峰面积 (A) 之间有良好的线性关系, 标准曲线方程为 $A = 31.602c + 10.099$ (相关系数 $r = 1, n = 6$)。3 种浓度雷公藤甲素的回收率 (%) 分别为 98.85, 99.67, 100.48, 5 次测定的日内、日间 RSD (%) 分别为 0.09 ~ 1.01 及 0.5 ~ 2.12。在相同条件下测得的包封率和载药量见以上各表。

3.4 傅立叶红外光谱分析

图 2 显示了 TP、TP+PLA-NP、PLA-NP、TP-PLA-NP 4 种不同物质的 FT-IR 图。

3.5 X-射线粉末衍射分析

图 3 显示了 TP、TP+PLA-NP、PLA-NP、TP-PLA-NP 4 种不同物质的 X-ray 图。

4 讨论

本文采用改良的自乳化溶剂蒸发法制备了载药聚乳酸纳米粒。在制备过程中, 选择合适的内、外相体积比是制备纳米粒的关键所在。据自乳化

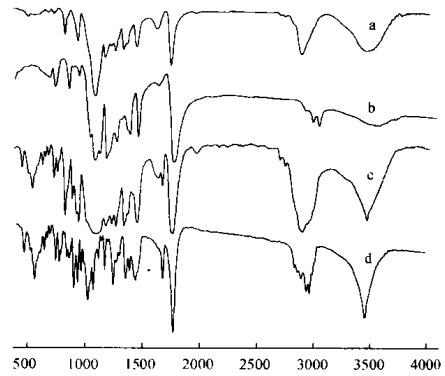


Fig 2 FT-IR analysis of samples (a) PLA-NP; (b) TP-PLA-NP; (c) physical mixture of TP and PLA-NP; (d) TP

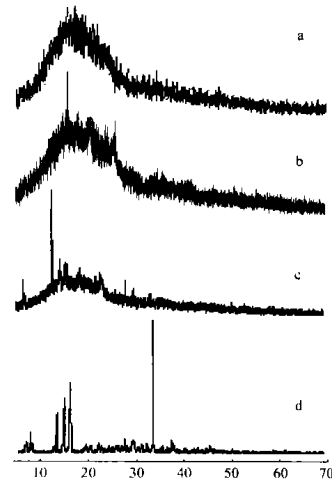


Fig 3 X-ray analysis of samples (a) PLA-NP; (b) TP-PLA-NP; (c) physical mixture of TP and PLA-NP; (d) TP

溶剂蒸发法纳米粒形成的机理, 水溶性的有机溶剂只有充分自发扩散到水相中, 自乳化成较小的乳滴, 才能形成大小均匀、规整光滑的纳米粒。随着外相体积的增大, 纳米粒粒径明显减小, 包封率和载药量相应减小; 但外、内相的体积比高于 2.6 : 1 时, 粒径、包封率和载药量都没有很大差别。这主要是由于有机溶剂在水中的扩散速率到一定值时, 增加水的体积对它们影响不大^[7]。

表面活性剂的浓度对纳米粒粒径、包封率和载药量的影响同样重要。表面活性剂浓度的增加, 其表面张力减小, 提高了有机相在水相中的分散度, 而且在纳米粒表面形成一层亲水性膜, 它阻止了粒子间的团聚, 使纳米粒粒径减小, 增强了体系的稳定性, 其包封率和载药量相应减小。但是, 随着表面活性剂浓度的继续增大 (大于 1%, w/w), 常会造成外相过于粘稠, 此时表面活性剂并不完全具有其所有的特性如表面张力等^[8], 纳米粒反而趋向于

聚集, 结果使纳米粒粒径增大, 包封率和载药量也相应增大。

药物和载体材料在有机相中的浓度对纳米粒包封率的影响可用粘度变化来解释。随着浓度的增大, 溶液的粘度相对增加, 较高的粘度阻止了扩散过程的快速进行, 而不能产生均一较小的乳滴, 可使聚合物聚集, 形成大的胶团微粒, 从而使纳米粒的粒径增大, 包封率和载药量增加。

本文采用冷冻离心及反相高效色谱法测定纳米粒包封率和载药量, 但冷冻离心的温度和转速直接影响测定的结果, 由于纳米粒粒径较小, 所以在现有离心条件下 (12 000 r/min, 10 °C), 以上各表中的包封率和载药量都偏低。

优选出适合处方的包含工艺为: 水相-有机相为 40:15 (v/v), 表面活性剂的浓度为 1%, 药物的浓度为 0.3%, TP-PLA 为 1:15 (w/w), 包封率为 74.27%, 载药量为 1.36%, 而且在相同优化条件下制备的空白和载药纳米粒平均粒径没有很大变化, 这可能是在同一体系中所用的聚乳酸及药物量较少。

图 2d 中 1768.92 cm^{-1} 是 TP 的特征内酯羰基峰, 3453.5 cm^{-1} 为较强的羟基峰; c 是 TP 和 PLA-NP 的机械混合的红外光谱, 出现的羰基峰 1766.94 cm^{-1} 有微小降低、变宽, 可能是重叠了聚乳酸的羰基峰, 而且羟基峰也变宽; a 中 1756.21 cm^{-1} 是 PLA-NP 纳米粒表面聚乳酸的羰基峰; 它与 b 中 TP-PLA-NP 出现的羰基吸收峰 1754.06 cm^{-1} 几乎没有变化, 其羟基峰明显变弱, 且羰基峰与 TP 和 TP+PLA-NP 的羰基吸收峰有一定的偏移, 这些可定性地说明药物被包裹在聚乳酸里, 同时也说明药物和聚乳酸之间有微弱的相互作用^[9]。

从 X-ray 图中可以看出, d 图显示 TP 为晶形结构, 且其主要特征结晶峰出现在 $2\theta = 0^\circ \sim 40^\circ$ 范围

内, 这些峰在 TP 与 PLA-NP 的机械混合物 c 图中明显可见, 但相对较弱, 而 b 图载药纳米粒这些峰基本消失, 它还保持了 a 图空白纳米粒的无定形结构, 因此可说明被纳米粒包裹的药物为无定形或半晶形结构^[10]。

【参考文献】

- [1] 岗艳云 (Gang YY), 张正行 (Zhang ZX). 雷公藤及其单体的药理作用研究进展 [J]. 中国药科大学学报 (*J China Pharm Univ*), 1995, **26** (4): 252-255
- [2] Kawashima Y. Nanoparticulate systems for improved drug delivery [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, **47**: 1-2
- [3] 常津 (Chang J), 刘海峰 (Liu HF), 姚康德 (Yao KD). 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 of Biomed Enginær*), 2000, **19** (4): 423-430.
- [4] Gorner T, Gref R, Michenot D, et al. Lidocaine-loaded biodegradable nanospheres. I. Optimization of the drug incorporation into the polymer matrix [J]. *J Con Rel*, 1999, **57**: 259-268.
- [5] Martine L, Laurence F, Young-H K, et al. Preparation and characterization of nanoparticles containing an antihypertensive agent [J]. *Eur J of Pharm and Biopharm*, 1998, **46**: 137-143
- [6] Benoit J P, Marchais H, Rolland H, et al. *Advances in Production Technology. Microencapsulation. Methods and Industrial Applications*. Marcel Dekker, New York, 1996. 36-72
- [7] Hideki M, Masao K, Hirofumi T, et al. Preparation of poly (DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles by modified spontaneous emulsification solvent diffusion method [J]. *Int J Pharm*, 1999, **187**: 143-152
- [8] Zambaux M F, Borneaux F, Gref R, et al. Influence of experimental parameters on the characteristics of poly (lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method [J]. *J Con Rel*, 1998, **50**: 31-40
- [9] Ajay K, Sumit M, Majumdar DK, et al. Ketorolac entrapped in polymeric micelles: preparation, characterisation and ocular anti-inflammatory studies [J]. *Int J Pharm*, 2000, **209**: 1-14.
- [10] Injon O, Kayoung L, Hye-Young K, et al. Release of adriamycin from poly (γ -benzyl-L-glutamate)/poly (ethylene oxide) nanoparticles [J]. *Int J Pharm*, 1999, **181**: 107-115.

Research on System of Triptolide-Loaded Poly (*D*, *L*-lactic acid) Nanoparticles

LIU Ming-Xing, DONG Jing, YANG Ya-Jiang, YANG Xiang-Liang, XU Hui-Bi

(Research Institute of Pharmaceutics, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

【ABSTRACT】 AIM: To study the optimum preparation and formulation of triptolide-loaded poly (*D*, *L*-lactic acid) nanoparticles (TP-PLA-NP). **METHOD:** TP-PLA-NP were prepared by the modified spontaneous emulsification solvent diffusion (modified-SESD) method. The process parameters involved were investigated with respect to the nanoparticle mean size, encapsulation efficiency and drug loading. The properties of nanoparticles were primarily studied by a transmission electron microscope (TEM), laser light scattering technique, fourier transformed infrared spectrophotometer (FT-IR) and X-ray powder diffractometry. **RESULT:** The ideal combination of preparation and formulation is the volume ratio of the aqueous and organic phases = 40 : 15; 1% of the surfactant concentration; 0.3% of the drug concentration; triptolide: poly (*D*, *L*-lactic acid) = 1 : 15 (w/w); 74.27% of encapsulation efficiency and 1.36% of drug loading. The round nanoparticles obtained were symmetrical size distribution. The entrapment of TP in nanoparticles was ensured by FT-IR and X-ray analyses. **CONCLUSION:** The method is suitable to prepare loaded water-insoluble drug polymer nanoparticles and has the advantage of convenient operation so that it can adapt to preparing nanoparticles on a large scale.

【KEY WORDS】 Modified-SESD; Triptolide; Poly (*D*, *L*-lactic acid); Nanoparticle

【Foundation Item】 This project was supported by the National 863 Foundation of China (No. 2001AA218051)

· 会 讯 ·

合理应用抗菌药物专题研讨会

随着抗生素的大量使用,使细菌耐药性与不良反应日趋严重,已成为影响人类健康的重大问题,并已引起政府有关部门与医药界广泛关注。国家食品药品监督管理局已发出了“加强抗菌药物监管,促进合理用药”的通知。为此中国药学会抗生素专业委员会、中国抗生素杂志、中国新药杂志共同商定于2004年10月在上海举办“合理应用抗菌药物专题研讨会”,会议将邀请国家主管部门的有关领导及国内从事抗菌药物基础及临床研究的著名专家作大会报告,并自即日起开始征集论文和报名。内容:抗菌药物在临床治疗与预防中的合理用药研究;细菌耐药性监测与遏制的有效措施;细菌耐药机制研究;抗菌药物的不良反应发生情况与分析;治疗耐药菌感染的新药筛选与研究开发;提高抗生素产品质量研究与监测;抗菌药物在农牧水产业中的合理应用等。

联系方式:中国医学科学院医药生物技术研究所以内中国药学会抗生素专业委员会

地 址:北京天坛西里一号(100050) 联系人:鲁杰 电话:010-63017302、63165290

传 真:010-63017302 E-mail:lujie0306@sina.com