

# 透析法制备载羟基喜树碱-聚乳酸纳米粒及其理化性质研究

罗颖<sup>1</sup>, 李乐<sup>2</sup>, 王衍戈<sup>2</sup>, 常迪<sup>2</sup>, 侯振清<sup>2</sup>, 张其清<sup>2,3,4\*</sup>

(1. 厦门大学医学院, 2. 厦门大学材料学院, 福建省生物医学工程重点实验室, 福建 厦门 361005;

3. 中国医学科学院, 北京协和医学院, 北京 100730; 4. 天津市生物医学材料重点实验室, 天津 300192)

**摘要:** 采用直接透析法制备载羟基喜树碱-聚乳酸(HCPT-PLA)纳米粒并研究其理化性质、体外释放和细胞毒性。以 HCPT-PLA 纳米粒的载药率为评价标准, 通过正交设计考察 PLA 浓度、HCPT 与 PLA 的质量比和不同截留分子质量透析袋对其指标的影响。利用 Malvern nanosizer 粒度测定仪、XRD、DSC 和激光共聚焦显微镜(CLSM)对 HCPT-PLA 纳米粒的理化性质进行表征。薄膜透析法考察体外释药特性; MTT 试验检测细胞毒作用。在优化条件下制备的载药纳米粒为实心球形, 平均粒径为 226.8 nm, 多分散系数为 0.270, 载药率为 7.49%。HCPT 是以晶体状态均匀分布于 PLA 纳米粒中。药物体外释药符合 Higuchi 方程  $Q = 2.000 6X^{1/2} - 2.593 4$ ,  $r = 0.989 2$ 。MTT 试验显示 HCPT-PLA 纳米粒呈现明显细胞毒作用。透析法制备 HCPT-PLA 纳米粒, 粒径小且分布均匀, 具有较好的缓释特性; 细胞毒性试验表明 HCPT-PLA 纳米粒具有较强的抑瘤作用且抑瘤效果优于 HCPT。

**关键词:** 羟基喜树碱; 聚乳酸纳米粒; 体外释放; 细胞毒性试验

中图分类号: R 944.9

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2010)06-0832-06

羟基喜树碱(Hydroxycamptothecin, HCPT)是喜树碱(CPT)的衍生物, 是从中国特有的珙桐科植物喜树中分离出的一种吲哚类生物碱, 它能通过抑制拓扑异构酶 I 而抑制肿瘤细胞的增殖, 对非小细胞肺癌、腹水型肝癌、胃癌及白血病有一定疗效, 为广谱抗肿瘤药物<sup>[1-4]</sup>。与 CPT 相比, 它具有更强的抗肿瘤效果和更宽的抗癌谱。但 HCPT 在临床使用时仍存在着一些问题: 如 HCPT 在生理条件下大部分以开环羧酸盐 HCPT 形式存在, 水针剂的开环羧酸盐 HCPT 与闭环内酯 HCPT 相比虽增加了水溶性但抗肿瘤活性明显降低且不易保存, 而且开环羧酸盐 HCPT 毒副作用大。近年来国内外研究多将 HCPT 制成微粒或脂质体以提高其在体内的生物利用度及降低毒副作用<sup>[4-6]</sup>。宋金春等<sup>[5]</sup>采用旋转薄膜分散-冻融法制备了 HCPT 脂质体, 但该方法存在 HCPT 脂质体粒径较大、粒径分布不均一、大量使用有机溶剂的缺陷。Shenderova 等<sup>[7]</sup>采用乳化-溶剂挥发法制备 HCPT 微粒, 但该方法因大量使用表面活性剂可能导致纳米粒生物降解、释放、体内分布等性能的改变; Zhang 等<sup>[8]</sup>采用喷雾干燥法制

备了聚乙二醇修饰的 HCPT 纳米级脂质体, 虽然制备过程简单, 但稳定性较差。透析法操作简单, 条件温和, 有机溶剂用量小, 可以避免使用表面活性剂, 成球性好, 产率高, 有望应用于工业化生产, 具有重要的研究意义和应用前景。

聚乳酸(Polylactide, PLA)具有性能稳定、无毒、应用安全、生物相容性和生物降解性好及成膜成球性好、价格低廉等优点<sup>[9-11]</sup>, 经 FDA 批准可用作注射用微胶囊、微粒及埋植剂等缓释制剂的辅料和内固定装置, 在生物医学领域有着广泛的应用。

本研究以 HCPT 为模型药物, PLA 为载体, 采用直接透析法成功制备了 HCPT 新缓释剂型, 即载 HCPT 的 PLA(HCPT-PLA)纳米粒, 并对其理化性质、体外释放和细胞毒性进行了研究, 为临床提供 HCPT 新制剂的制备和运用奠定了一定的基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

PLA ( $M_w$  1 ku, 所用 PLA 均为外消旋 PLA, 山东省医疗器械研究所), HCPT ( $\geq 99\%$ , 湖北李时珍医药集团), N, N-二甲基甲酰胺(DMF, 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司), 二甲亚砜(DMSO, 分析纯, 广

收稿日期: 2010-04-01

基金项目: 国家科技支撑计划(2007BAD07B05); 厦门市科技计划项目(3502Z20093009)

\* 通讯作者: zhangqiq@xmu.edu.cn

东汕头市西陇化工厂), 乙腈(色谱纯), 甲醇(色谱纯), 透析袋(截留分子量(MWCO) 3 500, 7 000, 14 000 u 北京经科宏达)。

LEO1530 型场发射 SEM, PANalytical X'pert PRO 粉末 X-射线衍射仪, JEM-2100 透射电子显微镜, Malvern nano $\sigma$ zs 粒度测定仪, Waters2695-2996 高效液相色谱仪, Netzsch DSC-204 差示扫描量热仪, FV-1000 激光共聚焦显微镜。

## 1.2 HCPT-PLA 纳米粒的制备

精确称取一定量的 PLA 和 HCPT, 用 10 mL DMF 充分溶解。将上述混合液装入透析袋并置于循环水中透析 10 h 即得 HCPT-PLA 纳米粒。

## 1.3 HCPT-PLA 纳米粒的制备工艺优化

以载药率和粒径(200 nm 左右)为考察指标, 以 PLA 质量浓度, HCPT 与 PLA 的质量比, 不同 MWCO 透析袋 3 个因素的 3 个水平进行正交设计<sup>[12-13]</sup>, 采用 L<sub>9</sub>(3<sup>3</sup>) 见表 1。

表 1 正交设计实验(L<sub>9</sub>(3<sup>3</sup>))

Tab. 1 Factor level in orthogonal design experiments of L<sub>9</sub>(3<sup>3</sup>)

水平	因素		
	A $\rho(\text{PLA})/(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$	B $m(\text{HCPT}): m(\text{PLA})$	C MWCO/u
1	1	1: 15	3500
2	2	1: 10	7000
3	3	1: 5	14000

## 1.4 标准曲线的绘制及载药率的测定

精确称取闭环内酯 HCPT 粉末 10 mg, 置于 100 mL 棕色量瓶中, 加 DMF 稀释并定容至刻度得质量浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的母液。分别从母液中取出 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9, 1.1, 1.3, 1.5 mL 于 10 mL 量瓶中, 依此补充 DMF 并定容。在 383 nm 波长处测定各个浓度的紫外吸收值, 并对质量浓度进行线性回归, 得方程  $y = 0.1274x - 0.0613$ ,  $R^2 = 0.9999$ 。线性范围: 1.0~15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

载药率 = (载药微粒中药物的质量/载药微粒的质量)  $\times 100\%$ 。

## 1.5 HCPT-PLA 纳米粒的理化性质鉴定

### 1.5.1 形态观察及粒度分析

将透析后的乳液直接滴加到专用铜网上, 室温下自然干燥, 使粒子浓缩沉积, 以透射电子显微镜进行观

察。将透析后的乳液经蒸馏水适当稀释后于 25  $^{\circ}\text{C}$  测定粒径及 Zeta 电位。

### 1.5.2 X-射线衍射分析

电流: 30 mA, 电压: 40 kV, 起始角  $5^{\circ}$ , 结束角  $60^{\circ}$ , 扫描步长: 0.016 $^{\circ}$ /步, 10 s/步, 铜靶, 石墨单色器。

### 1.5.3 差热扫描分析

取样品 5~10 mg 置于铝盘内并密封, 升温速率 10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , 于氮气(40 mL/min)保护下测定样品的热性能。

### 1.5.4 激光共聚焦显微镜(CLSM)分析

将透析后的乳液滴加在干净的载玻片上自然干燥后制成样品, HCPT 荧光由 382 nm 的氩激光激发, 样品的荧光分布由 z 轴的方向从纳米颗粒的最顶部往最底层观察, 每层之间相隔 60 nm。

## 1.6 HCPT-PLA 纳米粒的体外释放试验

HCPT 浓度的测定采用 HPLC 法<sup>[14-15]</sup>。

1) 体外释药。精确称取 HCPT-PLA 纳米粒粉末并装入透析袋内(MWCO 3 500 u), 加入少量 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)(pH 7.4), 扎紧后将其置于 100 mL PBS 中, 在(37.0  $\pm$  0.5)  $^{\circ}\text{C}$ , 100 r/min 条件下恒温振荡, 定时取样, 并立即补加相同量的释药介质。样品在 380 nm 处测定吸光度, 根据标准曲线得到 HCPT 的浓度, 计算释放量。

2) HPLC 标准曲线的绘制。精确称取闭环内酯 HCPT 粉末 10 mg, 置于 100 mL 棕色量瓶中, 加色谱纯甲醇稀释并定容至刻度得质量浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的母液, 吸取母液用适量 pH 3 的 V(0.01 mol/L 柠檬酸): V(乙腈) = 50: 50 混合液分别稀释成一系列浓度的闭环内酯 HCPT 标准液; 用适量 pH 9 的 V(0.01 mol/L 硼酸): V(乙腈) = 50: 50 混合液分别稀释成一系列浓度的开环羧酸盐 HCPT 标准液。

3) 色谱条件。预柱 30 mm  $\times$  4.6 mm, C18, 5  $\mu\text{m}$  和分析柱 Symmetry RP-C18(250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 流动相为 V(0.075 mol/L 醋酸铵): V(乙腈) = 72: 28; 流速为 0.8 mL/min, 进样量为 50  $\mu\text{L}$ , 柱温为 30  $^{\circ}\text{C}$ , 紫外检测波长为 380 nm。在该色谱条件下, 两种形式的 HCPT 完全分离, 闭环内酯 HCPT 的保留时间为 6.5 min, 开环羧酸盐 HCPT 的保留时间为 2.9 min(图 1)。

## 1.7 细胞毒性试验(MTT)

体外细胞培养实验采用人肝癌细胞 BEL-7402, 细胞培养采用 RPMI-1640 培养基(含 10% (体积分数)

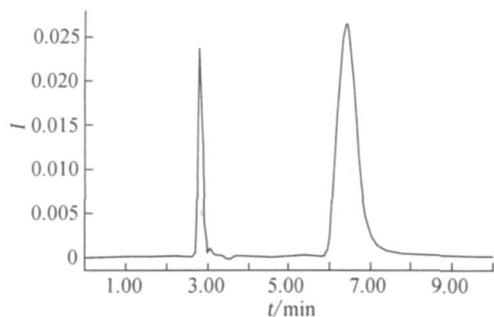


图1 开环酸盐 HCPT 和闭环内酯 HCPT 混合物的色谱图

Fig. 1 Chromatogram of mixture of carboxylate HCPT and lactone HCPT

小牛血清, 青霉素 100 U/mL, 链霉素 100 μg/mL), 在 CO<sub>2</sub> 培养箱(5% (体积分数) CO<sub>2</sub>, 37 °C 饱和湿度) 中培养<sup>[16]</sup>; 取对数生长期细胞, 胰酶消化后, 在 96 孔板中铺板, 铺板密度为  $3.5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ ; 待细胞贴壁后, 加入不同浓度(10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 μmol/L) 的 HCPT、PLA 纳米粒和 HCPT-PLA 纳米粒, 每一浓度重复 5 孔, 重复 2 板( $n=2$ ), PBS 为空白对照. 48 h 后加入 MTT 溶液(5 mg/mL) 20 μL 继续培养 4 h, 弃上清, 每孔加入 150 μL DMSO, 37 °C 孵育 15 min 后用酶联免疫检测仪测定 570 nm 处 A 值. 绘制细胞生长抑制率图表. 细胞生长抑制率计算公式如下:

$$\text{抑制率} = (1 - A_{\text{实验组}} / A_{\text{对照组}}) \times 100\%$$

## 2 结果与分析

### 2.1 HCPT-PLA 纳米粒的制备工艺优化

本文选择 DMF 作为溶剂并以载药率为考察指标, 三因素正交设计实验, 结果见表 1~3. 直观分析表明, 因素中 HCPT 与 PLA 的质量比对纳米粒的载药率的影响高度显著, PLA 质量浓度也较显著地影响纳米粒的载药率. 经分析, 优化后的最佳条件为 A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>1</sub>, 即 PLA 质量浓度为 2 mg/mL, HCPT 与 PLA 的质量比为 1:5, MWCO 为 3 500 u 的透析袋. HCPT 与 PLA 的质量比对纳米粒的载药率有显著影响, 在一定范围内, 随着 HCPT 的量的增加, 纳米粒的载药率呈增长趋势. 其原因可能是 HCPT 在水中溶解已饱和, 增加了未溶于透析外液的药物与 PLA 分子间的碰撞. 然而当 HCPT 浓度过高导致透析时 HCPT 易于结晶而析出.

PLA 质量浓度对纳米粒的载药率也有较大影响. 当 PLA 质量浓度过低, 如小于 1 mg/mL 时, 纳米粒的

表 2 不同实验条件对载药率的影响

Tab. 2 The drug loading efficiency in different experimental conditions

序号	水平			载药率/ %
	A	B	C	
1	1	1	1	0.41
2	1	2	2	1.52
3	1	3	3	1.29
4	2	1	2	0.39
5	2	2	3	2.22
6	2	3	1	7.49
7	3	1	3	0.61
8	3	2	1	1.70
9	3	3	2	6.60

表 3 正交设计结果

Tab. 3 Result of orthogonal design experiments L9(3<sup>3</sup>)

项目	载药率/ %		
	A	B	C
K1	3.22	1.41	9.60
K2	10.1	5.44	8.51
K3	8.91	15.38	4.12
R	6.88	13.97	5.48

载药率很低(< 0.5%), 可能是 PLA 与 HCPT 分子发生碰撞的机会变少, 在纳米粒形成时包入的药物变少. 然而当 PLA 质量浓度过高时(20 mg/mL), 纳米粒的载药率变低且粒径不均一, 也不符合实验要求的粒子(> 1 μm), 因此选择合适的浓度是很有必要的.

### 2.2 HCPT-PLA 纳米粒的形态及粒径

HCPT-PLA 纳米粒的透射电镜(TEM) 照片见图 2, 结果可见, HCPT-PLA 纳米粒呈实心球形, 大小均一, 分散均匀. 经 Malvern nanozs 粒度测定仪测定, HCPT-PLA 平均粒径为 226.8 nm, 多分散系数为 0.270, Zeta 电位为 -45.7 mV, 与空白 PLA 纳米粒(-30 mV) 相比显著减小, 推测可能是 HCPT 增加了纳米粒的稳定性.

### 2.3 HCPT-PLA 纳米粒的理化性质鉴定

HCPT-PLA 的 X-射线衍射图显示, HCPT-PLA 纳米粒为晶体特征, HCPT 的部分晶体峰消失, 与 HCPT 和 PLA 的物理混合物(1:1, 摩尔比) 衍射图

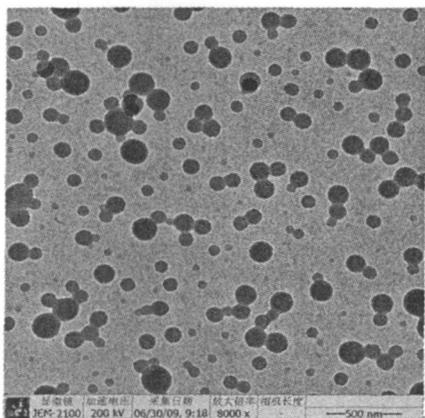


图 2 HCPT-PLA 纳米粒的透射电镜照片

Fig. 2 The TEM image of HCPT-PLA nanoparticles

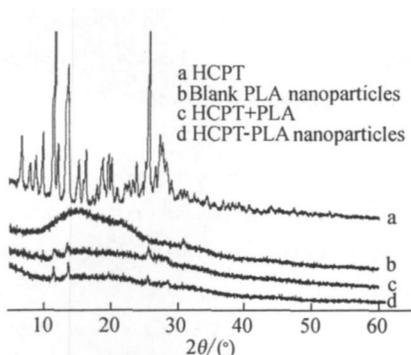


图 3 HCPT、空白 PLA 纳米粒、HCPT 和 PLA 的物理混合物及 HCPT-PLA 纳米粒的 XRD 谱图

Fig. 3 XRD spectra of HCPT, blank PLA nanoparticles, physical mixture of HCPT and PLA, and HCPT-PLA nanoparticles

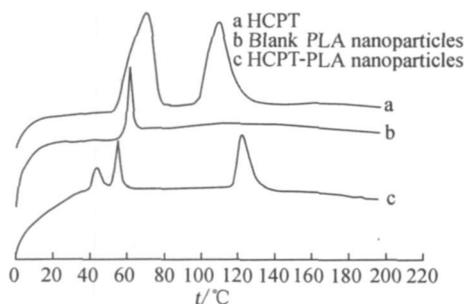


图 4 HCPT、空白 PLA 纳米粒和 HCPT-PLA 纳米粒的差热扫描图

Fig. 4 DSC analysis of HCPT, blank PLA nanoparticles and HCPT-PLA nanoparticles

类似(图 3). 说明 HCPT 是以晶体状态存在于 PLA 纳米粒中的. 差热扫描图显示, HCPT 有 2 个吸热峰(70 和 110 °C), PLA 大约在 60 °C 也有 1 个吸热峰, HCPT-PLA 纳米粒曲线中同时出现了 HCPT 和 PLA 的吸热峰(图 4). 这个结果与 XRD 结果相吻合.

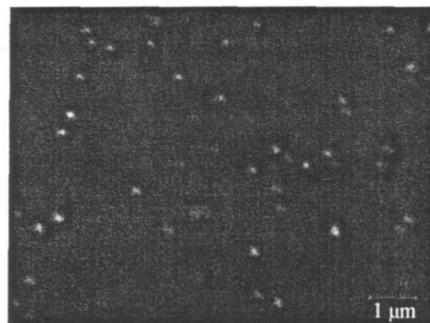


图 5 HCPT-PLA 纳米粒的 CLSM 断层扫描照片

Fig. 5 Confocal optical sections of HCPT-PLA nanoparticles captured by CLSM

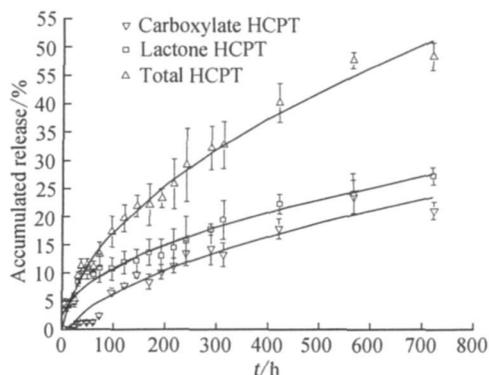


图 6 HCPT-PLA 纳米粒在 0.1 mol/L PBS (pH 7.4) 中的释放

HCPT 总量等于开环羧酸盐 HCPT 与闭环内酯 HCPT 之和

Fig. 6 Drug release behavior of HCPT-PLA nanoparticles in 0.1 mol/L PBS (pH 7.4)

CLSM 分析结果表明 HCPT 均匀分布于 PLA 纳米粒中(图 5).

### 2.4 体外释药结果

对开环羧酸盐 HCPT 及闭环内酯 HCPT 溶液进行分析, 以峰面积( $Y$ )为纵坐标, HCPT 质量浓度( $X$ ,  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )为横坐标进行线性回归, 发现 HCPT 在 50~3 000  $\text{ng}/\text{mL}$  范围内线性关系良好, 闭环内酯 HCPT 回归方程为  $Y = 294.62X - 4 721.5 (R^2 = 0.997 9)$ , 开环羧酸盐 HCPT 回归方程为  $Y = 252.85X + 9 555 (R^2 = 0.997 9)$ .

体外释药结果见图 6. 由图可见, HCPT-PLA 纳米粒 700 h 后累积释药 40% 左右. 可见其具有一定的缓释作用, HCPT-PLA 纳米粒能显著延长 HCPT 的释放, 长效作用更加明显. 经过拟合, 优化后制得的 HCPT-PLA 纳米粒的体外释药遵循 Higuchi 方程  $Q_{\text{总}} = 2.000 6X^{1/2} - 2.593 4, r = 0.989 2; Q_{\text{内酯}} = 0.986 2X^{1/2} +$

1.123 3,  $r = 0.957 4$ ;  $Q_{\text{羧酸}} = 1.014 5X^{1/2} - 3.716 7$ ,  $r = 0.953 7$ .

### 2.5 体外细胞毒性试验

MTT 结果显示(表 4) 空白 PLA 纳米粒对人肝癌细胞 BEL-7402 并无细胞毒作用, 对比空白 PLA 纳米粒与 PBS 空白对照组 A 值差异均无统计学意义( $p > 0.05$ ). 实验组细胞生长抑制率显示, 纯 HCPT 以及 HCPT-PLA 纳米粒均具有明显浓度依赖性细胞毒作用. HCPT-PLA 纳米粒各浓度的生长抑制率均略高于 HCPT.

表 4 空白 PLA 纳米粒, HCPT 以及 HCPT-PLA 纳米粒对人肝癌细胞 BEL-7402 的抑制率

Tab. 4 In vitro cytotoxicity assay against human liver BEL-7402 cells (48 h)

$c(\text{HCPT}) / (\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	抑制率 / %		
	空白 PLA 纳米粒 <sup>I</sup>	HCPT	HCPT-PLA 纳米粒 <sup>II</sup>
0.625	- 2.3	5.50	17.1
1.25	- 5.1	11.7	40.2
2.5	- 4.5	27.5	45.6
5	- 7.2	39.9	55.4
10	- 5.9	50.4	57.9

注: I. 空白 PLA 纳米粒的浓度和同水平的载药粒子浓度一致; II. HCPT-PLA 纳米粒的载药率为 5.16%.

## 3 结 论

- 1) 采用直接透析法成功制备了符合实验需要的 HCPT-PLA 纳米粒, 该方法简单, 条件温和, 重复可控性好;
- 2) HCPT 是以晶体状态均匀分布于 PLA 纳米粒中;
- 3) 体外释放试验表明 HCPT-PLA 纳米粒具有药物缓释优点;
- 4) 细胞毒性试验表明 HCPT-PLA 纳米粒具有较强的抑瘤作用且抑瘤效果优于 HCPT.

### 参考文献:

[1] Yan Chenghu, Yuan Xubo, Kang Chunsheng, et al. Preparation of carmustine loaded PLA ultrasmall nanoparticles by adjusting micellar behavior of surfactants [J]. Applied Polymer Science, 2008, 110(4): 2446-2452.

[2] 徐丽婷, 谢华. 羟基喜树碱的 药理作用及临床应用 [J]. 医药导报, 2002, 21(5): 302.

[3] Zhang Can, Ding Ya, Yu Liangli, et al. Polymeric micelle systems of hydroxycamptothecin based on amphiphilic N-alkyl N-trimethyl chitosan derivatives [J]. Colloids and Surfaces, 2007, 55(2): 192-199.

[4] 吴燕, 何文, 代文兵, 等. 羟基喜树碱包衣纳米脂质体的处方及制备工艺研究 [J]. 中国药学杂志, 2005(12): 922-925.

[5] 宋金春, 黄岭, 陈佳丽. 羟基喜树碱脂质体的制备及其包封率的测定 [J]. 中国医院药学杂志, 2007(10): 1381-1383.

[6] Khan S, Ahmad A, Guo W, et al. A simple and sensitive LC/MS/MS assay for 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) in mouse plasma and tissues: application to pharmacokinetic study of liposome entrapped SN-38 (LE-SN38) [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2005, 37(1): 135-142.

[7] Shenderova A, Burke T G, Schwendeman S P. Stabilization of 10-hydroxycamptothecin in poly (lactide or glycolide) microsphere delivery vehicles [J]. Pharmaceutical Research, 1997, 14: 1406-1414.

[8] Zhang Xinxin, Pan Weisan, Gan Li, et al. Preparation of a dispersible PEGylated nanostructured lipid carriers (NLC) loaded with 10-hydroxycamptothecin by spray drying [J]. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 2008, 56(12): 1645-1650.

[9] 白雁斌, 黄晓琴, 雷自强. 聚乳酸类医用生物降解材料的研究进展 [J]. 高分子通报, 2005(3): 46-51.

[10] 李文斌, 姜帅, 刘晓霞, 等. 聚乳酸类组织工程支架材料的设计 [J]. 化工新型材料 2005, 33(10): 70-74.

[11] Armentano I, Dottori M, Fortunati E, et al. Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: a review [J]. Polymer Degradation and Stability, 2010, 95(11): 2126-2146.

[12] 王继勇, 唐传球, 池恒, 等. 芦丁-卵磷脂复合物的制备及理化性质研究 [J]. 新乡医学院学报, 2006(1): 37-39.

[13] 宋金春, 陈佳丽, 黄岭. 2-羟丙基-β-环糊精对羟基喜树碱的增溶及稳定作用研究 [J]. 中国药房, 2008(4): 269-272.

[14] 滕南雁, 蒋及年. HPLC 测定羟基喜树碱及其注射液的含量 [J]. 中国药学杂志, 1997, 32(9): 552-553.

[15] Li Yufeng, Zhang Ruiwen. Reverse phase high performance liquid chromatography method for the simultaneous quantitation of the lactone and carboxylate forms of the novel natural product anticancer agent 10-hydroxycamptothecin in biological fluids and tissues [J]. Chromatogr

phy, 1996, 686(2): 257-265.

made of amphiphilic copolymer and normal polymer[J].

[16] Wang Jinli, Wang Rong, Li Lingbing. Preparation and properties of hydroxycamptothecin loaded nanoparticles

Colloid and Interface Science, 2009, 336(2): 808-813.

## Preparation and Characteristic of Hydroxycamptothecin-loaded PLA Nanoparticles Using Dialysis Method

LUO Ying<sup>1</sup>, LI Le<sup>2</sup>, WANG Yan-ge<sup>2</sup>, CHANG Di<sup>2</sup>,  
HOU Zhen-qing<sup>2</sup>, ZHANG Qi-qing<sup>2,3,4\*</sup>

(1. Medical College, Xiamen University, 2. The Key Laboratory of Biomedical Engineering of Fujian Province, College of Materials, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 3. Chinese Academy of Medical Science, Peking Union Medical College, Beijing 100730, China; 4. Tianjin Key Laboratory of Biomedical Materials, Tianjin 300192, China)

**Abstract:** In this paper, HCPT-loaded PLA nanoparticles of desired size range for treating liver cancer were successfully prepared by using the facile dialysis method without the additional surfactants. Effect of experimental parameters on preparation of HCPT-loaded PLA nanoparticles was evaluated. The results of orthogonal test showed that the mass ratio of HCPT to PLA was the most important determinant of drug-loaded content. The obtained HCPT-loaded PLA nanoparticles had spherical shape and smooth surface with a mean diameter of about 226.8 nm. The distribution of HCPT in PLA nanoparticles was uniform and HCPT was a crystalline state existed in PLA nanoparticles. In vitro release study indicated that HCPT in PLA nanoparticles showed a sustained release trend over a period of 30 days with no burst release at initial stage. The mean in vitro cumulative release percentage of HCPT from HCPT-loaded PLA nanoparticles vs time curve fit well with the Higuchi equation ( $Q = 2.0006X^{1/2} - 2.5934$ ,  $r = 0.9892$ ). Cytotoxicity assay against BEL-7402 show that, compared to HCPT, the HCPT-loaded PLA nanoparticles have higher cytotoxicity.

**Key words:** hydroxycamptothecin; polylactide nanoparticles; in vitro release study; cytotoxicity assay