

· 实验研究 ·

## 载羟基喜树碱聚乳酸微球的制备与体外释药研究

谢黎崖<sup>1</sup>, 吴永良<sup>1</sup>, 朱佩娟<sup>2</sup>, 侯振清<sup>2</sup>

(1 厦门大学附属第一医院, 厦门 361003; 2 厦门大学生物医学工程研究中心, 厦门 361005)

**[摘要]** 目的: 研究载羟基喜树碱的聚乳酸微球的制备方法并考察其体外释药性质。方法: 以 PLA 为成膜材料, 采用改良乳化-溶剂挥发法, 制备载羟基喜树碱的聚乳酸微球并优化制备工艺; 对载药微球进行表征; 超声介导下进行载药微球的体外释药试验。结果: 微球粒径在 1~7 μm, 大小均一; 羟基喜树碱浓度在 10 mg·mL<sup>-1</sup> 下, 载药微球包封率为 62.2%, 载药量为 1.69%; 药物体外释药符合 Higuchi 方程。结论: 采用乳化-溶剂挥发法, 以 PLA 为成膜材料可制得具有较高包封率的羟基喜树碱微球, 有望实现降低羟基喜树碱给药量、减少不良反应, 提高靶向性的目标。

**[关键词]** 羟基喜树碱; 聚乳酸; 微球; 超声; 体外释药

**[中图分类号]** R943.4; R979.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2012)21-2557-05

## Study on preparation and *in vitro* release behavior of hydroxycamptothecin-loaded PLA microspheres

XIE Li-ya<sup>1</sup>, WU Yong-liang<sup>1</sup>, ZHU Pei-juan<sup>2</sup>, HOU Zhen-qing<sup>2</sup>

(1 First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen 361003, China;

2 Research Center of Biomedical Engineering of Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**[Abstract]** **Objective:** To prepare hydroxycamptothecin (HCPT)-loaded PLA microspheres and study the release of HCPT *in vitro*. **Methods:** To optimize the preparation process, the HCPT-loaded PLA microspheres were prepared by using an improved solvent evaporation method; drug-loaded microspheres was characterized; *in vitro* drug release experiments were carried out under ultrasound. **Results:** The sizes of drug loaded PLA microspheres were homogeneous and between 1~7 μm; the concentration of HCPT was 10 mg·mL<sup>-1</sup>, the drug encapsulation efficiency was 62.2%, and the drug-loading amounts was 1.69%; the release *in vitro* complied with Higuchi equation. **Conclusion:** The improved solvent evaporation method with PLA as the film-forming material can increase the encapsulation efficiency of HCPT-loaded microspheres, thus the reduction of dosage and improvement of toxic effects of HCPT would be expected. Targeting effect may be improved.

**[Key words]** hydroxycamptothecin; PLA; microsphere; ultrasound; drug-release *in vitro*

羟基喜树碱 (hydroxy-camptothecin, HCPT) 为 DNA 拓扑异构酶 I (TOPO-I) 抑制剂, 具有潜在的

选择性杀伤肝癌细胞的作用。但因其不溶于水、难溶于脂、内酯环结构不稳定等特殊的理化性质, 使得临床应用受到了限制<sup>[1]</sup>。

**[基金项目]** 福建省卫生厅青年科研项目 (2009-2-79)

**[作者简介]** 谢黎崖, 女, 硕士, 副主任药师, 研究方向: 药物控缓释制剂。联系电话: (0592) 8851312, E-mail: xly885@163.com。

**[通讯作者]** 侯振清, 男, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 药物控缓释制剂与生物医学工程。联系电话: (0592) 2180686, E-mail: houzhengqing@xmu.edu.cn。

超声微球为近几年发展起来的新型超声造影剂, 很适合作为高活性物质和使用剂量小的药物靶向控释载体。像 HCPT 具有很高活性的药物, 在抗肿瘤治疗中只需要几毫克就可以达到治疗作用, 通过有效的给药系统, 只需用比原来更少的药物就可

达到在靶组织高浓度聚集的目的,并减少不良反应<sup>[2-3]</sup>。所以载 HCPT 微球具有很好的发展前景。

微球的成膜材料有磷脂类化合物、白蛋白、糖类、非离子表面活性剂以及可生物降解的高分子多聚物等。聚乳酸(PLA)是一种具有优良生物相容性和生物降解性的聚合物,其在体内代谢最终产物是 CO<sub>2</sub> 和 H<sub>2</sub>O,中间产物是乳酸,也是体内正常代谢的产物,其降解产物能参与人体的新陈代谢且性能可在大范围内通过与其他单体共聚得到调节,不会在重要器官聚集。且 PLA 制备成微球造影剂后在超声的空化效应作用下能增加药物释放速度<sup>[4-5]</sup>,一定程度上弥补 PLA 在体内降解引起药物释放慢的缺点,特别利于超声部位的肿瘤治疗。

微球超声造影剂制备方法有多种,其中一种方法是由乳剂转化而来的<sup>[6]</sup>。本实验以 PLA 为成膜材料,应用改良乳化-溶剂挥发法制备粒径大小合适的包裹 HCPT 的超声微球,为毒性较大、半衰期短的药物靶向控释多聚体微球的制备提供参考。

## 仪器与试剂

BS-1105 电子分析天平(北京赛多利斯仪器有限公司);85-1 型磁力搅拌器(国华电器有限公司);J-25 高速冷冻离心机(Beckman 公司);XL-30 环境扫描电子显微镜(Philips 公司);LS-POP(Ⅲ)激光粒度分析仪(OMEC Tech. Co. Ltd.);LEO-1530 场发射扫描电子显微镜(德国里奥电镜有限公司);D/MAX-rC 型 X 射线晶体衍射仪(日本 Rigaku 公司);DSC204 差示扫描量热分析仪(德国 Netzsch 公司);2695 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);HZP-150 全温震荡培养箱(上海精宏实验设备有限公司);透析袋(美国 Greenbird 公司);JY-92II 超声波细胞粉碎仪(宁波超声仪器有限公司);KQ-250 DB 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

HCPT(浙江海正药业股份有限公司,批号:20090216);HCPT 标准品(武汉李时珍药业集团,批号:20090621,高效液相色谱法测定含量 >99.99%)。聚乳酸(PLA,DL 型,山东省医疗器械研究所);聚乙烯醇(PVA,聚合度 500,中国石化集团四川维尼纶厂);脂肪酸山梨坦 80(Span-80,国药集团化学试剂有限公司);二甲基亚砜(DMSO,国药集团化学试剂有限公司);二氯甲烷(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>,汕头市达濠精细化学品公司)。

## 方 法

### 1 空白 PLA 微球制备

将 PLA 用 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 溶解作为油相。超声波细胞粉碎仪探头至液面下一定位置,将 0.5 mL 纯化水匀速注入含 Span-80 的油相中,超声作用下形成 W/O 初乳。匀速将初乳注入 PVA 外水相中,强力搅拌,形成 W/O/W 复乳。之后低速磁力搅拌过夜,使 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 挥发完全,PLA 固化成膜,离心后,纯净水洗涤三次,冷冻干燥,得到白色粉末,置于 4℃ 冰箱中储存。光电显微镜下观测微球直径及均匀度。以微球形貌、粒径为参考指标,分别考察 PLA 分子量、PLA 浓度、初乳超声功率、初乳乳化剂 Span-80 浓度、复乳搅拌时间、外水相 PVA 浓度、内水相/油相/外水相体积比等因素的影响,确定优化条件。

### 2 载 HCPT 的 PLA 微球制备

按上述方法,DMSO 溶解 HCPT,CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 溶解 PLA,两相混合作为油相;纯化水作为内水相;PVA 溶液作为外水相,采用前述优化的最佳方案制备载 HCPT 的聚乳酸微球。

### 3 载 HCPT 的 PLA 微球质量评价

#### 3.1 载药微球的形貌和粒径分布

取少量冻干后的载药微球用纯化水分散,超声 10 min,待微球分散完全,滴加至硅片,室温下干燥,喷金 25 s,电镜下观察微球形貌。

取少量冻干后的微球用纯化水分散,超声 10 min,待微球分散完全,滴加至石英皿,Zeta 粒径仪测定微球粒径分布。

#### 3.2 载药微球中药物的存在形式

**3.2.1 X 射线晶体衍射仪观测** 取适量样品,用红外压片机压片,再把样品转移到特制载玻片上,进行 X 射线观测。仪器参数:扫描范围 2θ = 5° ~ 60°,扫描速度 4°·min<sup>-1</sup>,考察样品的存在形式。

**3.2.2 扫描量热分析仪观测** 取少量样品 20 mg,进行观测。升温速率 10℃·min<sup>-1</sup>,空气封尾,测定样品的热性能,考察样品的存在形式。

#### 3.3 HCPT 含量的测定

**3.3.1 分析方法的确定** 采用高效液相色谱分析法(HPLC)测定 HCPT 浓度,色谱条件如下:色谱柱为 symmetry C<sub>18</sub> 柱(150 mm × 3.9 mm 5 μm);流动相为 70 mmol·L<sup>-1</sup> 醋酸铵(pH 6.4)缓冲液-乙腈(70:30);流速为 0.8 mL·min<sup>-1</sup>;紫外检测器检测,检测波长为 383 nm;进样量为 10 μL;柱温为 30℃。在该色谱条

件下,HCPT的两种存在形式(羧酸盐和酯环构型)能完全分离,保留时间分别为1.669和2.552 min。

**3.3.2 标准曲线的建立** 精密称取HCPT标准品,用DMSO溶解成 $2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液,作为储备液。用磷酸盐缓冲液(pH 2.5):DMSO=50:50,稀释成一系列浓度的HCPT标准液(浓度分别为100,300,600,800和1000  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ )。在此条件下,HCPT主要以内酯环构型存在,对其进行HPLC分析,以峰面积(A)为纵坐标,HCPT内酯环构型含量(C)为横坐标,进行线性回归。得回归方程: $A = 8.09 \times 10^6 C - 4.76 \times 10^4$  ( $r = 0.9918$ ),在 $2.5 \sim 1000\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内成线性相关。

**3.3.3 回收率试验** 精密称取处方量约80%,100%,120%的HCPT标准品,加入辅料配制成溶液,分别进样20  $\mu\text{L}$ ,测峰面积,连续3次,代入标准曲线换算成实际测定浓度,计算回收率,其平均值为98.7%,RSD为2.34%。

**3.3.4 精密度试验** 分别配制3个不同浓度的HCPT溶液,浓度分别为20,200和2000  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,5 d内用已建立的HPLC法测定HCPT含量,1 d内连续测5次,进行日内与日间精密度测定。计算日内RSD及日间RSD,取平均值。日内RSD为1.52%,日间RSD为2.54%。

### 3.4 包封率和载药率的测定

精确称取不同HCPT含量的载药微球粉末10 mg,溶于1 mL  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 中,DMSO定容至25 mL量瓶中,HPLC法测定HCPT浓度,并且计算载药微球的载药率(DLC%)和包封率(EE%)。从而可选择制备工艺中HCPT的最佳浓度。载药量和包封率按以下公式计算: $\text{DLC}/\% = \text{HCPT的含量}/\text{微球的质量} \times 100$ ;  $\text{EE}/\% = \text{实际载药率}/\text{理论载药率} \times 100$ 。

### 4 超声介导下载药微球的体外药物释放

精确称取50 mg载药微球,分散于30 mL PBS(pH 7.4)中,装入已经溶胀的透析袋中,再放入含有400 mL PBS的水池中,固定透析袋位置,水池恒温 $37\text{ }^\circ\text{C}$ , $100\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 搅拌。为观测超声条件对载药微球释放药物的影响,将其分为两组,超声组采用超声波细胞粉碎仪的超声探头,80 W,超声30 s处理;非超声组按常规条件进行释放。取透析液按HPLC法测定HCPT的浓度,计算出体外超声释药累积量。

## 结 果

### 1 优化条件

最终确定优化条件如下:PLA分子量10000,

PLA浓度 $25\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,初乳超声功率 $200\text{ W}\cdot 80\text{ s}$ ,复乳 $2500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 搅拌3 h,初乳乳化剂Span-80浓度2%,PVA浓度1%,内水相/油相/外水相体积比为1:10:100。

优化后制备的微球呈球形,形态圆整规则,粒径分布均匀,平均粒径在(1~7  $\mu\text{m}$ )范围内,其中2.8%的微球粒径为3091 nm,11.5%的微球粒径为3580 nm,22.4%微球粒径为4145 nm,30.6%微球粒径为4801 nm,32.7%微球粒径为5560 nm。

## 2 载HCPT的PLA微球质量评价

### 2.1 形貌和粒径分布测定

电镜表征见图1,制得的载药微球呈球形,表面光滑圆整,分散良好,大多数与空白微球在表面形貌上没有明显差异,但空白微球粒径分布更均一。

微球粒径的强度分布:1718 nm(0.7%);1990 nm(2.8%);2305 nm(6.3%);2669 nm(10.3%);3091 nm(14%);3580 nm(16.6%);4145 nm(17.7%);4801 nm(17%);5560 nm(14.7%)。制得的载HCPT聚乳酸微球粒径符合1~7  $\mu\text{m}$ 的要求范围。但与优化的空白微球相比,粒径范围跨度增大。

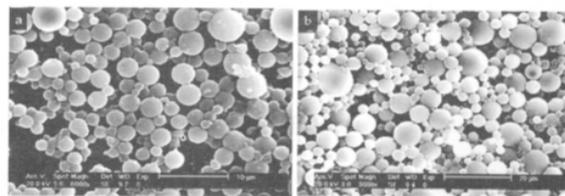


图1 PLA空白微球(a)和PLA载药微球(b)的扫描电镜图

### 2.2 XRD和DSC分析

XRD图和DSC图见图2。由图2a看出HCPT的结晶区主要在 $10^\circ \sim 30^\circ$ 之间,HCPT在 $5^\circ < 2\theta < 30^\circ$ 范围内呈现许多强结晶衍射峰,表明HCPT主要以结晶形式存在;空白微球衍射图上仅为一无定形特征;载药微球中未显示HCPT的晶型峰,说明HCPT以无定形态存在于载药微球中。由图2b看出在 $20 \sim 200\text{ }^\circ\text{C}$ 的升温范围内,HCPT的谱图在 $70\text{ }^\circ\text{C}$ 和 $130\text{ }^\circ\text{C}$ 有吸热峰,是HCPT的熔融温度;空白微球中,仅有PLA的吸热峰;而在载药微球中没有出现HCPT的吸热峰,仅有PLA的吸热峰,说明HCPT是以无定形态分布在载药微球中,而非晶体状态。通过XRD图和DSC图均能证明HCPT在载药微球中是以无定形态分布的。

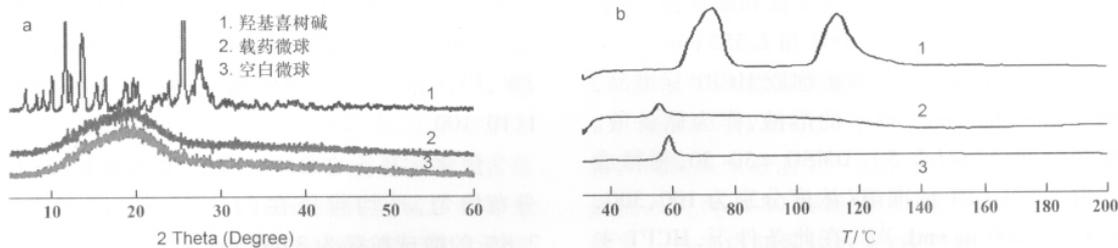


图2 HCPT、空白 PLA 微球及载药 PLA 微球的 XRD 图(a) 和 DSC 图(b)

### 2.3 包封率和载药量

载药微球中包封率和载药率随 HCPT 浓度变化曲线见图 3。载药微球的载药量和包封率均受 HCPT 浓度的影响,当 HCPT 的浓度从  $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  增加到  $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  载药量和包封率都随着 HCPT 的

浓度增加而增加,但当 HCPT 浓度为  $12 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  时,微球的载药量增大,包封率却略有降低。因此 HCPT 的浓度选择为  $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  此浓度下,载药微球包封率为 62.2%,载药量为 1.69%。

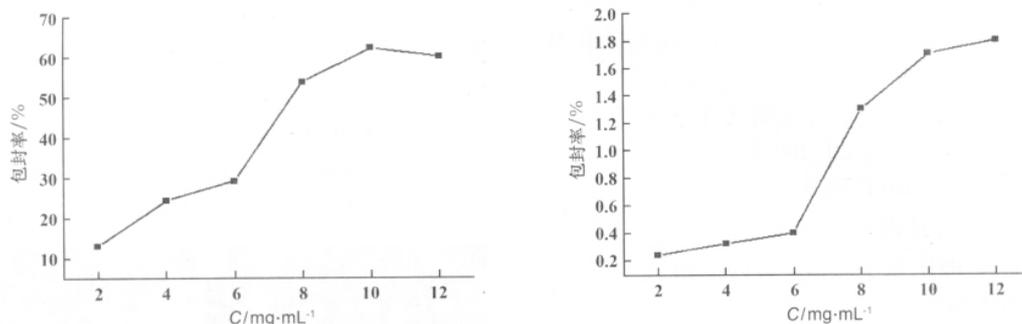


图3 载药微球中包封率和载药率随 HCPT 浓度变化曲线

### 3 超声介导下体外释药

超声介导下释药曲线见图 4。超声微球在未超声介导下,d1 释药仅 1% 左右,d2 累积释药 13%,d11 累积释药达到 78%,可见药物释放主要发生在 d2 之后。而 80 W 超声 30 s 后,载药微球在 d1 药物释放即达 20%,5 d 内累积释药接近 80%。表明超声条件下微球释药更快,不存在释药早期释放慢的现象。

释药过程中 HCPT 两种构型的含量变化见图 5。超声释药初期,HCPT 酯环和羧酸盐构型含量渐渐升高,酯环构型占优势,到 d5 时酯环构型累积释药接近 55%,而羧酸盐构型仅占 20%,但在这之后,酯环构型逐渐转化成羧酸盐构型,最终两种构型含量持平。

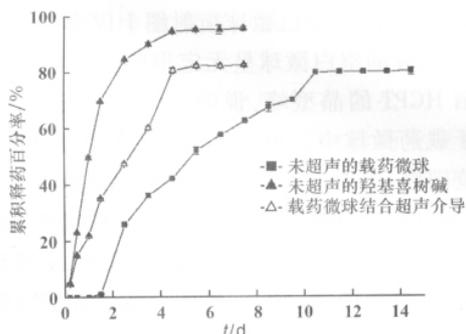


图4 超声介导下(80 W, 30 s) 载药微球的体外释药曲线

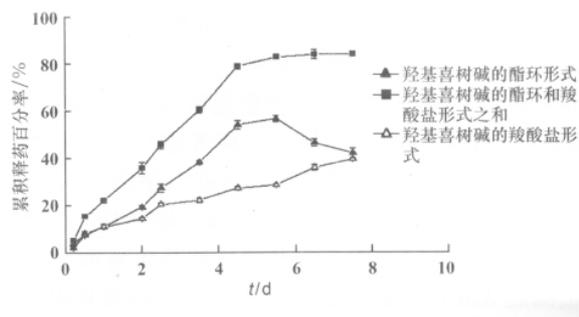


图5 载药微球体外释药过程中酯环和羧酸盐构型含量图

经过拟合,载药微球超声介导下体外释药遵循

Higuchi 方程:  $Q_{\text{总}} = 2.000 6X^{1/2} - 2.593 4$   $r = 0.989 2$ ;  
 $Q_{\text{内酯}} = 0.986 1X^{1/2} + 1.123 3$   $r = 0.957 4$ ;  $Q_{\text{羧酸盐}} =$   
 $1.014 5X^{1/2} - 3.716 7$   $r = 0.953 7$ 。

## 讨 论

由图 1 可见,载药微球与优化的空白微球相比,粒径范围跨度增大。原因可能是超声初乳化及搅拌复乳化过程中,超声功率不稳定和搅拌速率很难精确控制所致。所以,如何进一步调整参数以获得重复性好的 PLA 微球制备方法,值得深入研究。

从图 3 可以看出,当 HCPT 浓度为  $12 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  时,微球的载药量增大,包封率却降低了。原因是随着投药量增加,载药量增大了,但 HCPT 从内水相中流失也增加,因此包封率下降了。

从图 4 可以看出,未超声组药物释放主要发生在 d2 之后。造成这种现象的主要原因是药物存在于微球内,外表面分布比较少,内表面分布较多。药物以无定形状态分布于聚乳酸骨架中的,微球的释药随着聚乳酸的降解和药物的溶出而发生。释药初期,分布于微球外表面的无定形状态 HCPT 溶出快,形成微量释药;释药中期,随着聚乳酸降解,微球内部形成孔洞,药物可直接或通过孔洞迅速释放,造成突释;释药后期,随着聚乳酸进一步降解,微球渐渐破裂,微球外壳分裂成碎片状脱落,存在于微球骨架内表面的药物溶出,因此后期的药物释放速度渐渐变缓。

与未超声条件下的药物释放相比,超声条件下微球释药更快,不存在释药早期释放慢的现象。造成这种现象可能是由于超声可促成微球的膨胀,释药早期可能有一部分微球破裂,分解成微球碎片,增加药物与释放介质的表面积,促进药物的释放。这种释药模式有利于微球静脉注射进入体内后药物快

速达到有效浓度,之后的释药用于维持血药浓度。

由图 5 可知,释放前 5 d,HCPT 酯环构型占优势,表明制备的载 HCPT 聚乳酸微球中 HCPT 主要是以高活性的内酯环构型存在。之后酯环构型逐渐转化成羧酸盐构型,最终两种构型含量持平。

对于载有酯环的 HCPT 来说,其抗肿瘤活性是目前临床上使用的开环 HCPT 的几十倍<sup>[7]</sup>,本研究所制备的载 HCPT 聚乳酸微球中 HCPT 主要是以高活性的内酯环构型存在,因此只需用比原来更少的药物就可达到高效治疗的目的。

## [ 参 考 文 献 ]

- [1] 徐淑云. 中华临床药理学(下册) [M]. 北京:人民卫生出版社,2003:1470-1472.
- [2] 张力,李苏,廖海,等. 羟基喜树碱 I 期药代动力学及人体耐受性临床研究[J]. 癌症,2001,20(12):1391-1395.
- [3] ZHANG G, DING L, RENEGAR R, et al. Hydroxycamptothecin-loaded Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles induce human lung cancer cell apoptosis through caspase-8 pathway activation and disrupt tight junctions [J]. *Cancer Sci*, 2011, 102(6):1216-1222.
- [4] HUSSEINI GA, PITT WG. Micelles and nanoparticles for ultrasonic drug and gene delivery[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, 60(10):1137-1152.
- [5] TOTI US, GURU BR, HALI M, et al. Targeted delivery of antibiotics to intracellular chlamydial infections using PLGA nanoparticles [J]. *Biomaterials*, 2011, 32(27):6606-6613.
- [6] SCHLIEHE C, SCHLIEHE C, THIRY M, et al. Microencapsulation of inorganic nanocrystals into PLGA microspheres enables their intracellular localization in dendritic cells by electron and fluorescence microscopy [J]. *J Control Release*, 2011, 151(3):278-285.
- [7] PU XH, SUN J, WANG Y, et al. Development of a chemically stable 10-hydroxycamptothecin nanosuspensions [J]. *Int J Pharm*, 2009, 379(1):167-1731.

编辑:周卓/接受日期:2012-09-19

(上接第 2556 页)

- [10] 王影,宦定才,陈兵. 固体脂质纳米粒的特点及存在问题 [J]. 解放军药学学报, 2006, 22(1):51-54.
- [11] 王杰,张强. 长循环纳米粒 [J]. 国外医学·药学分册, 1999, 26(6):350-354.
- [12] 王杰,张强,索中军,等. PEG 表面修饰硬脂酸脂质纳米粒的制备与体外细胞摄取 [J]. 药科学报, 2000, 8(35):622-625.
- [13] 方超,施斌,洪鸣凰,等. 粒径和 MePEG 相对分子量对隐形纳米粒体外巨噬细胞吞噬和大鼠体内长循环的影响 [J]. 药科学报, 2006, 41(4):305-312.

- [14] WAN F, YOU J, SUN Y, et al. Studies on PEG-modified SLNs loading vinorelbine bitartrate (I): preparation and evaluation *in vitro* [J]. *Int J Pharm*, 2008, 359(1-2):104-110.
- [15] GREFF R, LUCK M, QUELLEC P, et al. 'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2000, 18(3-4):301-313.

编辑:周卓/接受日期:2012-02-20