

文章编号: 1005-8982(2012)26-0001-04

·论著·

载替莫唑胺纳米粒制备方法比较研究*

林晓宁¹, 田新华¹, 魏峰¹, 任磊²

(1.厦门大学附属中山医院 神经外科, 福建 厦门 361004;

2.厦门大学生物医学工程研究中心, 福建 厦门 361005)

摘要:目的 比较载替莫唑胺聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒(TMZ-PBCA-NP)的不同制备方法, 确定最佳制备工艺。方法 以 α -氰基丙烯酸正丁酯(BCA)为载体, 分别采用乳化聚合法和界面聚合法制备 TMZ-PBCA-NP, 加以吐温-80(T-80)进行表面修饰, 并通过 zeta 电位仪检测纳米粒粒径和电位, 透射电镜观察纳米粒形态, 紫外分光光度计测定各自的包封率和载药量。结果 乳化聚合法制备的 TMZ-PBCA-NP 平均粒径(135.8 ± 11.3)nm, 表面电位(-24.8 ± 2.2)mV, 包封率(44.23 ± 2.04)%, 载药量(2.80 ± 0.05)%; 界面聚合法制得的载药纳米粒平均粒径(175.4 ± 10.2)nm, 表面电位(-18.3 ± 3.6)mV, 包封率(44.35 ± 2.58)%, 载药量(2.31 ± 0.47)%。透射电镜下观察两种方法所制备的纳米粒大小均较为均匀, 粒子间无明显聚集。结论 采用乳化聚合法制备 TMZ-PBCA-NP 效果较优于界面聚合法。

关键词: 替莫唑胺; 聚氰基丙烯酸正丁酯; 纳米粒; 乳化聚合法; 界面聚合法

中图分类号: R979.1; R965

文献标识码: A

Comparison of the preparation methods of Temozolomide-loaded nanoparticles*

LIN Xiao-ning¹, TIAN Xin-hua¹, WEI Feng¹, REN Lei²

(1.Department of Neurosurgery, Zhongshan Hospital of Xiamen University, Xiamen,

Fujian 361004, P.R. China; 2.Research Center of Biomedical Engineering,

Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, P.R. China)

Abstract: **[Objective]** To compare Temozolomide polybutylcyanoacrylate nanoparticles (TMZ-PBCA-NP) prepared by two different methods so as to determine the optimal process. **[Methods]** TMZ-PBCA-NP was prepared by emulsion polymerization and interfacial polymerization methods separately and the surfaces of the two kinds of nanoparticles were both modified with tween-80 (T-80). Zeta potential instrument was used to detect the particle size and charge and transmission electron microscopy was employed to study the particle shape. The entrapment efficiency and drug loading were determined with ultraviolet spectrophotometry. **[Results]** The mean particle size, surface charge, entrapment efficiency and drug loading of the NP prepared by emulsion polymerization and interfacial polymerization methods was (135.8 ± 11.3) nm and (175.4 ± 10.2) nm, (-24.8 ± 2.2) mV and (-18.3 ± 3.6) mV, (44.23 ± 2.04) % and (44.35 ± 2.58) %, (2.80 ± 0.05) % and (2.31 ± 0.47) %, respectively. Both nanoparticles had uniform size distribution and no apparent aggregation according to transmission electron microscopy. **[Conclusion]** The emulsion polymerization method is better than interfacial polymerization method in preparing TMZ-PBCA-NP.

Key words: Temozolomide; polybutylcyanoacrylate; nanoparticles; emulsion polymerization; interfacial polymerization

收稿日期 2011-11-15

* 基金项目 国家自然科学基金(No 81172394)

[通信作者] 田新华 E-mail: txhmd@yahoo.com.cn

· 1 ·

替莫唑胺(Temozolomide, TMZ)是一种新型的四嗪类的 DNA 烷化剂,可迅速通过血脑屏障,是目前用于治疗恶性脑胶质瘤效果较好的化疗药物,但其半衰期仅 1.8 h,口服剂量大,体内分布呈非特异性,容易出现恶心、呕吐、疲倦、头痛及骨髓抑制等一些不良反应,因此临床应用受到一定的限制^[1]。纳米粒(nanoparticles, NP)是一类以天然或合成高分子材料为载体的固态胶体微粒,粒径约 10~1 000 nm,可作为胶体给药系统,并具有一定的缓释功能^[2-3]。因此,将替莫唑胺制备成缓释纳米粒,通过适当的表面活性修饰提高脑内药物浓度,可降低不良反应。

聚氰基丙烯酸正丁酯(polybutylcyanoacrylate, PBCA)为生物可降解高分子材料,具有良好的生物相容性和缓释性等特点,已有大量国内外学者研究发现其通过吐温-80(Tween-80, T-80)修饰后可透过血脑屏障(blood brain barrier, BBB),并显著提高脑内药物浓度^[4-6]。因此,本研究拟采用乳化聚合法和界面聚合法制备替莫唑胺聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒(TMZ-PBCA-NP),通过比较两种方法所制备的载药纳米粒粒径、电位、包封率和载药量等性质的不同,优选出制备工艺,为该载药纳米粒的进一步研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器 pH 计(日本 EYELA 公司)、BS200S-WE 型电子天平(北京塞多利斯天平有限公司)、恒温磁力搅拌器(国华电器有限公司)、旋转蒸发仪(日本 EYELA 公司)、AvantiTM J-E 型高速离心机(美国 Beckman 公司)、SHA-C 型恒温超声振荡器(常州国华电器有限公司)、UV 800 紫外分光光度计(美国 Beckman 公司)、Zeta 电位仪(英国 Malvern Instruments 公司)、Free Zone 型冷冻干燥机(美国 LAB-CONCO 公司)及 2100HC 型透射电子显微镜(日本 JEM 公司)。

1.1.2 试剂 替莫唑胺原料(江苏天士力公司赠送,纯度 99.9%)、 α -氰基丙烯酸正丁酯(广州白云医用胶总公司)、吐温-80(Sigma 公司)及 PluronicF-68(BBI 高纯),其余试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 乳化聚合法制备 TMZ-PBCA-NP 移液管移取 0.1 mol/L 盐酸溶液加入装有蒸馏水锥形瓶中,调节 pH 至 2.5 称取一定量 TMZ 及 PluronicF-68 搅

拌溶解后,定容至 10 mL,于室温、磁力搅拌下缓慢滴加适量 α -BCA 单体于上述溶液,边滴加边搅拌,滴加完毕,封闭瓶口,500 r/min 持续搅拌 4 h。调节溶液 pH 至 5.0 后,经 G3 漏斗过滤,高速低温离心,沉淀加超纯水充分超声分散后,得乳白色均匀胶体溶液。在制备好的 TMZ-PBCA-NP 胶体溶液中加入适量 T-80,充分搅拌后置 37°C 恒温箱孵化 30 min,得修饰产品,最后冻干,共制备 3 份样品。

1.2.2 界面聚合法制备 TMZ-PBCA-NP 将 α -BCA 单体溶于乙酸乙酯,加入到含 TMZ 的丙酮溶液中,使该体系混合均匀形成油相。水相由 PluronicF-68 和蒸馏水组成,于室温、磁力搅拌下将油相溶液缓慢滴加入水相中,总反应体积 30 mL,滴加完毕,封闭瓶口,1 000 r/min 持续搅拌 3 h,得乳白色胶体溶液,然后应用旋转蒸发仪将溶液体积减压蒸馏至 1/3,经 G3 漏斗过滤,其后离心、修饰等步骤同乳化聚合法,最后得冻干产品,共制备 3 份。

1.2.3 纳米粒粒径大小及电位检测 室温条件下取少量胶体溶液,加蒸馏水稀释,置 zeta 电位仪中检测粒径大小、多分散系数及电位负荷。

1.2.4 纳米粒形态观察 取 1~2 滴 TMZ-PBCA-NP 胶体溶液置于铜网上,2%磷钨酸溶液负染后,室温晾干,于透射电镜下观察纳米粒形态和大小。

1.2.5 TMZ 标准曲线的建立 用 0.1 mol/L 盐酸配制 20 μ g/L 的 TMZ 溶液,紫外分光光度法于 200~400 nm 波长范围内扫描,测得其 λ_{\max} 为 329 nm。称 TMZ 原料药 10 mg 置于 100 mL 容量瓶中,定容得到 100 μ g/mL 的储备液,用移液管分别取不同单位储备液,并用 0.1 mol/L 的盐酸配制成 2、4、6、8、10、12、14 和 16 μ g/mL 的 TMZ 标准溶液,在紫外分光光度 329 nm 波长处分别测定其吸光度 A,以吸光度 A 与质量浓度 C 进行线性回归处理。

1.2.6 纳米粒包封率和载药量的测定 取适量 TMZ-PBCA-NP 胶体混悬液适量,在 4°C、20 000 r/min 条件下离心 30 min,收集上清液,用紫外分光光度计测定上清液中 TMZ 的含量,并按以下公式计算包封率(ER)和载药量(DL):包封率 $ER = (W_a - W_s) / W_a \times 100\%$,载药量 $DL = (W_a - W_s) / W_{\text{纳米球}} \times 100\%$,其中 W_a : TMZ 投药量, W_s : 上清液中 TMZ 量, $W_{\text{纳米球}}$: 制得的纳米粒的量。

2 结果

2.1 纳米粒粒径及电位大小检测结果

两种方法按各自最佳工艺条件制备载药纳米粒, 分散性均良好, 其粒径及电位结果详见表 1, 粒径分布情况见图 1、2。

表 1 TMZ-PBCA-NP 粒径和电位检测结果

制备方法	粒径/(nm $\bar{x} \pm s$)	电位/(mV $\bar{x} \pm s$)	PDI
乳化聚合法	135.8 \pm 11.3	-24.8 \pm 2.2	0.19
界面聚合法	175.4 \pm 10.2	-18.3 \pm 3.6	0.21

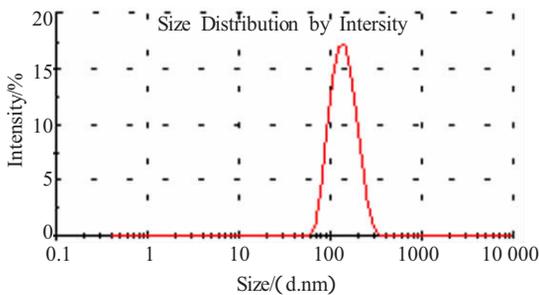


图 1 乳化聚合法制备的 TMZ-PBCA-NP 粒径分布

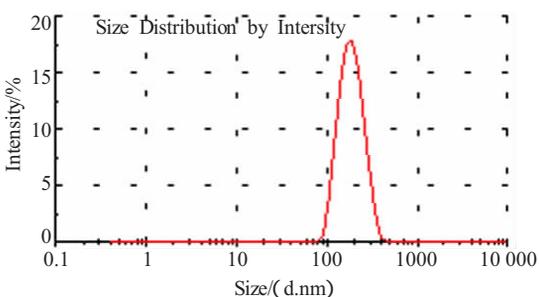


图 2 界面聚合法制备的 TMZ-PBCA-NP 粒径分布

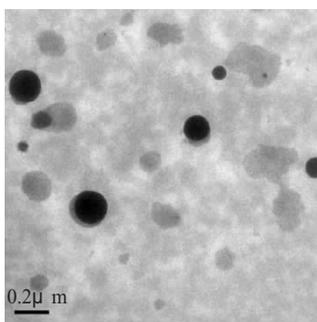


图 3 界面聚合法制备的 TMZ-PBCA-NP 透射电镜照片 (放大倍数 $\times 10000$)

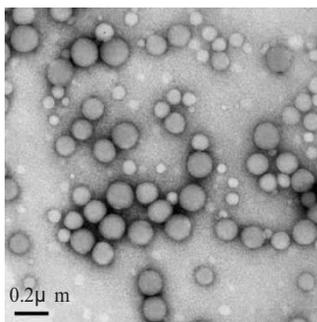


图 4 乳化聚合法制备的 TMZ-PBCA-NP 透射电镜照片 (放大倍数 $\times 10000$)

2.2 纳米粒形态观察

两种方法所制备的 TMZ-PBCA-NP 胶体溶液外观均呈乳白半透明, 电镜下呈圆形或类圆形, 大小较为均匀, 粒子间无明显聚集。见图 3、4。

2.3 标准曲线的建立

测定结果表明所有辅料在 329 nm 波长处对测定结果无干扰, 标本溶液在 2~16 μ g/mL 范围内线性关系良好, 得回归方程 $A=0.051C+0.003$ ($r=0.9999$)。线性关系图见图 5。

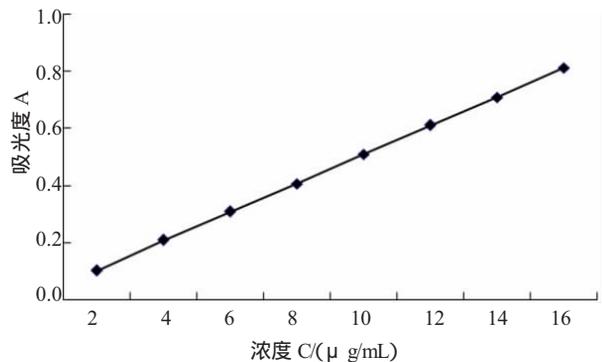


图 5 TMZ 药物浓度与吸光度线性关系图

2.4 纳米粒包封率和载药量的测定结果

按上述公式分别计算两方法制备的 TMZ-PBCA-NP 的包封率和载药量, 其结果见表 2。

表 2 TMZ-PBCA-NP 包封率和载药量测定结果 (% $\bar{x} \pm s$)

制备方法	包封率	载药量
乳化聚合法	44.23 \pm 2.04	2.80 \pm 0.05
界面聚合法	44.35 \pm 2.58	2.31 \pm 0.47

3 讨论

恶性脑肿瘤的治疗一直是医学发展进程中的巨大挑战之一, 其预后差并非简单的相关治疗药物疗效差, 很大一部分原因是由于 BBB 的存在, 使药物无法进入脑组织发挥作用。近年来, 可靶向入脑的纳米载药系统受到广泛关注, 其中最为吸引人的则是如何通过表面改性以达到载药纳米粒更好的脑靶向性和更强的透血脑屏障能力, PBCA 作为脑靶向载体自 1995 年开始研究以来, 已有大量证明通过表面活性剂吐温-80 修饰具有可靶向入脑并显著提高脑内药物浓度的能力^[7-10]。因 PBCA 带有羧基, 吸电性强, 相邻的碳原子呈强正电性, 在水中遇阴离子如 OH^- 易自动聚合成球, 因此在制备过程中加入稳定剂 PluronicF-68 可以避免纳米粒团聚粘连, 同时可使聚合反应速率减慢, 保持纳米粒较小粒径^[11]。

BCA 聚合方法目前主要有两种,即乳化聚合法和界面聚合法。乳化聚合法主要适合在酸性溶液中溶解度较大且稳定的药物,操作条件相对简单易控;而界面聚合法则主要适合在有机溶剂如丙酮、乙醇等溶解度大的药物^[12-13]。替莫唑胺相比与其他脑肿瘤化疗药物,虽然其脂溶性更好透血脑屏障能力更强,但其在酸性介质中亦有较大的溶解度^[14-15],因此本研究分别采用乳化聚合法和界面缩聚法制备 TMZ- PBCA- NP 进行比较。研究结果显示两种方法均适于制备 TMZ- PBCA- NP,其包封率和载药量未见明显区别,其原因可能与上述替莫唑胺特性有关,但乳化聚合法制备的纳米粒粒径小、电位低,对载药纳米粒透血脑屏障入脑具有相当重要的作用,同时考虑乳化聚合法制备工艺相对简单,因此总体而言,乳化聚合法较优于界面缩聚法。

目前市面上的替莫唑胺药物基本是传统的口服给药方式,半衰期短,由于缺乏组织特异性,药物用量大,不良反应仍较多,对非靶器官甚至会带来很大的毒副作用。因此,发展靶向性药物载体,特异性将替莫唑胺靶向导入脑部病变部位,是很有必要的。本实验已初步优选出 TMZ- PBCA- NP 的制备方法,但其是否能使替莫唑胺大部分输送入脑从而使脑内药物浓度增加,将进一步通过实验进行验证。

参 考 文 献:

- [1] RENI M, MASON W, ZAJA F, et al. Salvage chemotherapy with temozolomide in primary CNS lymphomas: preliminary results of a phase trial[J]. *Eur J Cancer*, 2004, 40(11): 1682-1688.
- [2] GARCIA-GARCIA E, ANDRIEUX K, GIL S, et al. Colloidal carriers and blood-brain barrier (BBB) translocation: a way to deliver drugs to the brain[J]. *Int J Pharm*, 2005, 298(2): 274-292.
- [3] TOSI G, COSTANTINO L, RUOZI B, et al. Polymeric nanoparticles for the drug delivery to the central nervous system [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2008, 5(2): 155-174.
- [4] VAUTHIER C, LABARRE D, PONCHEL G. Design aspects of poly (alkylcyanoacrylate) nanoparticles for drug delivery[J]. *J Drug Target*, 2007, 15(10): 641-663.
- [5] WOHLFART S, GELPERINA S, KREUTER J. Transport of drugs across the blood-brain barrier by nanoparticles [J]. *J Control Release*, 2011, Aug, 18: 1-10.
- [6] HUANG CY, CHEN CM, LEE YD. Synthesis of high loading and encapsulation efficient paclitaxel-loaded poly (n-butyl cyanoacrylate) nanoparticles via miniemulsion [J]. *Int J Pharm*, 2007, 338(1-2): 267-275.
- [7] KREUTER J. Influence of the surface properties on nanoparticle-mediated transport of drugs to the brain [J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2004, 4(5): 484-488.
- [8] KREUTER J, RAMGE P, PETROV V, et al. Direct evidence that polysorbate-80-coated poly (butylcyanoacrylate) nanoparticles deliver drugs to the CNS via specific mechanisms requiring prior binding of drug to the nanoparticles[J]. *Pharm Res*, 2003, 20(3): 409-416.
- [9] WILSON B, SAMANTA MK, SANTHI K, et al. Targeted delivery of tacrine into the brain with polysorbate 80-coated poly (n-butylcyanoacrylate) nanoparticles [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2008, 70(1): 75-84.
- [10] WANG CX, HUANG LS, HOU LB, et al. Antitumor effects of polysorbate 80 coated gemcitabine polybutylcyanoacrylate nanoparticles in vitro and its pharmacodynamics in vivo on C6 glioma cells of a brain tumor model[J]. *Brain Res*, 2009, 1261: 91-99.
- [11] 张阳德,丁 诚,张宗久,等.优化工艺制备表阿霉素 α -聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒[J].*中华实验外科杂志*,2006,23(10):1191-1193.
- [11] ZHANG YD, DING C, ZHANG ZI, et al. Preparation of epirubicin polybutylcyanoacrylate nanoparticles with optimized process [J]. *Chinese Journal of Experimental Surgery*, 2006, 23 (10): 1191-1193. Chinese
- [12] VAUTHIER C, BOUCHEMAL K. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles [J]. *Pharm Res*, 2009, 26(5): 1025-1058.
- [13] 王夏红.苯妥英钠聚氰基丙烯酸正丁酯纳米微粒的制备及抗癫痫的药效学研究[D].中南大学,2007:20-85.
- [13] WANG XH. Preparation of diphenylhydantoin sodium polybutylcyanoacrylate nanoparticles and its pharmacodynamics for the treatment of epilepsy [D]. Central South University, 2007: 20-85. Chinese
- [14] 王维剑,张君仁,庞 华.替莫唑胺含量测定方法的研究[J].*药物分析杂志*,2003,23(5):344-346.
- [14] WANG WJ, ZHANG JR, PANG H. Content determination method of temozolomide[J]. *Journal of Drug Analysis*, 2003, 23 (5): 344-346. Chinese
- [15] NEWLANDS ES, STEVENS MF, WEDGE SR, et al. Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials [J]. *Cancer Treat Rev*, 1997, 23(1): 35-61.