

喜树碱衍生物 CZ48 缓释纳米粒的 制备及其体外释药特性考察

李思阳^{1,2}, 孔庆新¹, 王洋^{2*}

(1. 江苏食品药品职业技术学院, 江苏 淮安 223003; 2. 东北林业大学盐碱地生物资源环境研究中心, 东北油田盐碱植被恢复与重建教育部重点实验室, 哈尔滨 150040)

[摘要] 目的: 制备喜树碱衍生物 CZ48 缓释纳米粒并考察其体外释药特性。方法: 以聚乳酸(PLA)为材料, 采用 W/O/W 型乳化溶剂挥发法制备 CZ48 缓释纳米粒, 通过透射电子显微镜观察纳米粒的微观形态, 采用粒度分析仪测定粒径并考察该制剂的体外释药特性。结果: CZ48 缓释纳米粒呈明显的球状结构, 粒度(260.6 ± 3.2) nm, 载药量(11.8 ± 1.29)%, 包封率(88.7 ± 2.55)%, 体外释放可持续 48 h, 累积释放率达 85%。结论: 制备的 CZ48 缓释纳米粒包封率和载药量高, 缓释效果明显, 为该制剂的药代动力学研究提供数据支持。

[关键词] CZ48; 缓释纳米粒; 聚乳酸; 体外释放度

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)19-0005-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014190005

Preparation and *in vitro* Release of CZ48 Sustained-release Nanoparticles

LI Si-yang^{1,2}, KONG Qing-xin¹, WANG Yang^{2*}

(1. Jiangsu Food & Pharmaceutical Science College, Huai'an 223003, China;

2. Alkali Soil Natural Environmental Science Center, Northeast Forestry University, Key Laboratory of Saline-alkali Vegetation Ecology Restoration in Oil Field, Ministry of Education, Harbin 150040, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare CZ48 sustained-release nanoparticles and investigate its *in vitro* release. **Method:** Using polylactic acid (PLA) as material, CZ48 sustained-release nanoparticles was prepared

[收稿日期] 20140218(005)

[基金项目] 国家林业局引进国际先进林业技术项目(2012-4-04); 黑龙江省留学归国基金项目(LC201004)

[第一作者] 李思阳, 硕士, 讲师, 从事新型载药系统、药剂学研究, Tel: 18751288255, E-mail: 253595136@qq.com

[通讯作者] *王洋, 教授, 博士生导师, 从事药剂学和植物次生代谢研究, Tel: 0451-82191247, E-mail: ywanga@nefu.edu.cn

- [4] 齐娜, 刘广, 廖迎, 等. 熊果酸脂质体的制备及体外释放特性考察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(2): 28.
- [5] 赵培起, 曹淑贞, 王汉杰, 等. HPLC 检测紫杉醇高分子脂质体制剂的载药量和包封率[J]. 现代仪器, 2010(3): 27.
- [6] 胡连栋, 唐星, 崔福德. 全反式维甲酸固体脂质纳米粒的制备及体内外评价[J]. 药学学报, 2005, 40(1): 71.
- [7] 彭海龙, 雷志强, 刘燕燕, 等. 槐定碱脂质体的制备及理化性质研究[J]. 中国医院药学杂志, 2009, 29(1): 32.
- [8] 张洪, 成蓓, 詹新安. 联苯双酯固体脂质纳米粒的体外释药特性评析[J]. 广东药学院学报, 2009, 25(1): 23.
- [9] Radt B, Smith T A, Caruso F. Optically addressable nanostructured capsules for controlled delivery[J]. Adv Mater, 2004, 16(23/24): 2184.
- [10] 孔德新, 张天民, 邹立家. 低分子肝素钠透皮吸收制剂的研究[J]. 中国药学杂志, 1995, 30(7): 411.
- [11] 孙学惠, 郭涛, 何进, 等. 大蒜油固体脂质纳米粒中二硫化物和三硫化物在大鼠体内的组织分布[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(23): 2772.

[责任编辑 刘德文]

through W/O/W double emulsion technique, its micromorphology was observed by transmission electron microscope, particle size was determined by particle size analyzer and *in vitro* release was investigated. **Result:** CZ48 sustained-release nanoparticles showed obvious spherical structure with particle size of (260.6 ± 3.2) nm, encapsulation efficiency of $(88.7 \pm 2.55)\%$ and drug-loading of $(11.8 \pm 1.29)\%$, *in vitro* release studies showed that 85% of CZ48 was released from sustained-release nanoparticles in the first 48 h. **Conclusion:** These prepared CZ48 sustained-release nanoparticles are successfully prepared through W/O/W double emulsion technique with satisfactory encapsulation efficiency and drug-loading and obvious sustained-release, which provides data support for further research on pharmacokinetic.

[**Key words**] CZ48; sustained-release nanoparticles; polylactic acid; *in vitro* release

喜树碱 (camptothecin, CPT) 是从喜树中分离得到的一种吲哚类生物碱, 具有显著的广谱抗肿瘤活性^[1]。CZ48 (camptothecin-C20-propionate) 作为一种喜树碱类似物, 可保护 CPT 内酯环的完整性并降低其毒性, 是一类极具发展前景的喜树碱类药物^[2]。但 CZ48 水溶性差、生物利用度低。缓释纳米粒作为抗肿瘤药物的载体, 具有毒性低、能增加药物溶解度、延长药物在肿瘤部位的停留时间、提高药物的生物利用度等优点, 缓释效果明显^[3]。聚乳酸 (polylactic acid, PLA) 作为载药材料具有适用药物范围广、载药量高、表面易修饰、辅助识别功能等优点^[4]。故本实验以 PLA 为材料, 采用 W/O/W 型乳化溶剂挥发法制备载 CZ48 缓释纳米粒, 以保证其在体内释放的稳定性, 达到长期平稳缓释的效果, 为该制剂的药代动力学研究提供基础数据。

1 材料

Hitachi H-765 型透射电子显微镜 (日本日立公司), Cary Eclipse 型荧光光谱仪 (美国 Varian 公司), FD5505 型真空离心浓缩系统 (美国 SIM 公司), BI-90Plus 型电位粒度分析仪 (美国 Brookhaven 公司)。CZ48 (批号 081020, 纯度 99%, 哈尔滨峰源高科技开发有限公司), 聚乳酸 (PLA, 山东省医疗器械研究所), 聚乙烯醇 (PVA, 美国 Alfa Aesar 公司), 二甲基亚砜 (DMSO, 美国 Sigma 公司), 水为超纯水或去离子水, 其他试剂均为市售分析纯。

2 方法与结果

2.1 CZ48 纳米粒的制备^[5] 称取 PLA 300 mg 和 CZ48 40 mg 置于 10 mL 二氯甲烷中, 磁力搅拌约 30 min 至完全混匀。取出转子, 于 110 W 探头超声持续 30 s, 将得到的初级微乳逐滴滴加至预冷的 2% PVA 溶液 (25 mL) 中, 利用高速分散均质机匀化, 转速 $9\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 持续 5 min, 形成纳米粒。将

纳米粒倾倒入 1% 异丙醇溶液 (50 mL) 中, 磁力搅拌约 4 h, 使纳米粒表面固化, 二氯甲烷尽量完全去除。将得到的乳液以 $5\,000 \times g$ 离心 5 min, 除去上清液。沉淀加正己烷洗涤 3 次, 每次 30 mL, 所得沉淀空气干燥, 除去残留的正己烷。向沉淀中加入水 3 mL, 涡旋使其充分分散后液氮预冻, 于 $-53\text{ }^{\circ}\text{C}$ 真空冷冻干燥 48 h, 样品称定质量后密封保存。

2.2 透射电子显微镜观察 取冻干粉 2 mg 置于离心管中, 加入少量水使其充分分散, 取少量溶液滴置于铜网上, 用 0.1% 磷钨酸溶液染色, 室温晾干, 在透射电子显微镜下观察纳米粒的微观形态, 拍照记录, 见图 1。结果显示 CZ48 纳米粒呈明显的球状结构, 粒径小 (200 ~ 300 nm) 且分布均匀, 符合药物载体给药机制。

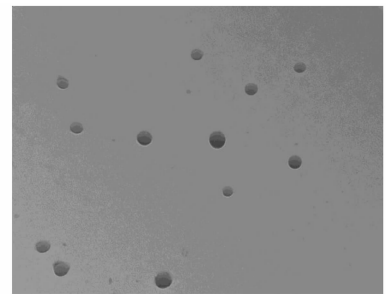


图 1 CZ48 纳米粒 TEM ($\times 40\,000$)

2.3 粒径分布 取冻干粉 2 mg, 加水充分分散均匀, 取混匀液 20 μL 置塑料比色皿中, 加水补至 3 mL, 采用粒度分析仪测定, 结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$) 粒径 (260.6 ± 3.2) nm, 多分散指数 (polydispersity index, PDI) 达 (0.166 ± 0.022) nm。表明 CZ48 纳米粒的粒度分布均匀, 在临床使用的安全范围内, 与 TEM 观察结果相吻合。

2.4 包封率和载药量测定 精密称取 CZ48 粉末 5.0 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加 DMSO 定容, 得 $0.1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 储备液。将该储备液分别稀释至 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 通过荧光分光光度计^[5]

确定 CZ48 的激发波长和发射波长分别为 360, 427 nm, 以质量浓度(C)为横坐标,吸光度(A)为纵坐标,得回归方程 $A = 440.32C + 16.902$ ($R^2 = 0.9993$), 线性范围 $0.125 \sim 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。准确称取冻干粉 3 份,每份 5 mg,加 DMSO 4 mL 使其完全溶解,稀释 300 倍,测定 A ,计算 CZ48 的包封率和载药量($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)分别为 $(88.7 \pm 2.55)\%$, $(11.8 \pm 1.29)\%$,表明 CZ48 纳米粒能够实现药物的有效运载。

2.5 体外释药特性考察 精密称取 CZ48 粉末 5 mg,加 DMSO 定容至 50 mL,得 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 母液。将该母液用磷酸盐缓冲液(PBS)分别稀释至 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,利用荧光分光光度计确定 CZ48 在 PBS 中的激发波长和发射波长分别为 375, 552 nm,以 C 为横坐标, A 为纵坐标,得回归方程 $A = 178.5C + 1.675$ ($R^2 = 0.9995$),线性范围 $0.1 \sim 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。称取冻干粉 2 mg 置于 10 mL 离心管中,加水 5 mL 混匀,精密量取该溶液 1 mL 置于透析袋内密封。透析袋置于 25 mL 释放介质(pH 7.4 PBS)中,模拟人体内生理环境^[6],分别在时间点 0.08, 0.16, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 36, 48 h 取释放液 3 mL,并补充相同体积的新鲜释放液。利用荧光分光光度计检测释放液中 CZ48 的 A ,计算 CZ48 累积释放率,见图 2。结果表明游离 CZ48 释放速度较迅速,3 h 累积释放率 $> 85\%$; CZ48 纳米粒持续缓慢释放,经过 48 h 后,累积释放率 $> 85\%$,且仍继续缓慢释放,充分证明 CZ48 纳米粒具有明显的缓释效果和持续释放特性。

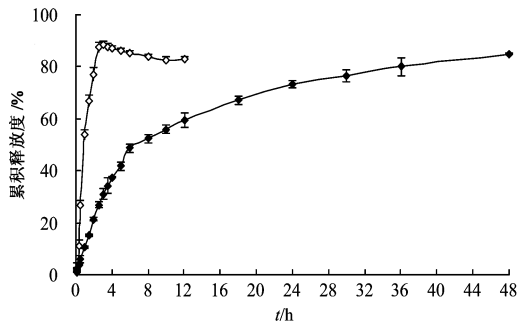


图 2 CZ48(左侧)和 CZ48 纳米粒(右侧)的体外释放曲线($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3 讨论

喜树碱类药物开发前景良好,但由于其活性内酯环容易开环,往往会导致药理活性降低。通过修饰其活性内酯环的结构或改变羟基喜树碱的剂型能在一定程度上提高药物的疗效并降低其毒副作用。此外,CZ48 在美国已进入 I 期临床研究,极具开发应用潜力,故研究 CZ48 的新型缓释制剂显得十分必要。前期研究采用的 PLA 具有良好的生物降解性,是获得美国 FDA 批准的可用于注射的药用辅料之一。以 W/O/W 型乳化溶剂挥发法制备 CZ48 纳米粒,该制剂分布均匀,符合临床的安全使用范围;载药量和包封率较高,证明该体系可作为 CZ48 的传递载体;体外释放可持续 48 h,累积释放率达 85%,具有良好的缓释效果,可为开展 CZ48 纳米粒的体内释放研究提供参考。

[参考文献]

- [1] Wall M E, Wani M C, Cook C E, et al. Plant antitumor agents. I. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata* [J]. J Am Chem Soc, 1966, 88 (16):3888.
- [2] Liehr J G, Harris N J, Mendoza J, et al. Pharmacology of camptothecin esters [J]. Ann NY Acad Sci, 2000, 922 (1):216.
- [3] 宋金林,章莉. 羟基喜树碱修饰纳米粒的制备及药理学研究[J]. 中国药理学杂志, 2009, 44(24):1888.
- [4] Murakami H, Kobayashi M, Takeuchi H, et al. Further application of a modified spontaneous emulsification solvent diffusion method to various types of PLGA and PLA polymers for preparation of nanoparticles [J]. Power Technol, 2000, 107(1/2):137.
- [5] 郭盛磊. 喜树碱衍生物 CZ48 高分子载体系统的构建及其性能研究[D]. 哈尔滨:东北林业大学, 2012.
- [6] Liu X, Wang Y, Vardeman D, et al. Development and validation of a reverse-phase HPLC with fluorescence detector method for simultaneous determination of CZ48 and its active metabolite camptothecin in mouse plasma [J]. J Chromatogr B, 2008, 867(1):84.

[责任编辑 刘德文]