

紫杉醇 mPEG-PLGA 纳米粒的制备及其抗肿瘤作用研究

方琴¹, 王季石^{2*}, 许红玮³, 李芳琼³ (1. 贵阳医学院附属医院药剂科, 贵阳 550004; 2. 贵阳医学院附属医院血液科, 贵阳 550004; 3. 贵阳医学院药学院, 贵阳 550004)

摘要:目的 探讨负载紫杉醇的聚乙二醇单甲醚-聚乳酸-乙醇酸 (mPEG-PLGA) 亲性嵌段共聚物纳米粒及其对肝癌 H22 细胞的体内抗肿瘤作用。方法 采用界面沉积法制备紫杉醇 mPEG-PLGA 纳米粒 (Ptx-Nps); 应用透射电镜表征纳米粒的形态; 粒径分析仪测其粒径及 Zeta 电位; 研究 mPEG 在共聚物中的含量及紫杉醇投药量对纳米粒的影响; 考察纳米粒对昆明小鼠肝癌 H22 的疗效和过敏实验。结果 Ptx-Nps 成球形, 粒径为纳米级 (<120 nm), 均带负电荷 (适合于静脉注射), 与紫杉醇注射液 (Ptx) 相比, Ptx-Nps 对肝癌 H22 的抑制作用比 Ptx 好。结论 采用界面沉积法制备的纳米粒在紫杉醇投药量为 1%, mPEG 含量为 4% 时包封率最佳, 本研究为开发紫杉醇新型静脉注射制剂提供了实验依据, mPEG-PLGA 共聚物可成为抗肿瘤药物的理想新型载体。

关键词:界面沉积法; 聚乙二醇单甲醚-聚乳酸-乙醇酸; 紫杉醇; 纳米粒; 肝癌

中图分类号: R943; R944.9 文献标识码: A 文章编号: 1001-2494(2007)19-1483-04

Study on Preparation of Paclitaxel-loaded mPEG-PLGA Nanoparticles and Its Inhibition Effect on Tumor

FANG Qin¹, WANG Ji-shi^{2*}, XU Hong-wei³, LI Fang-qiong³ (1. Department of Pharmaceutics, Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China; 2. Department of Hematology, Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China; 3. School of Pharmaceutics, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the characterization of paclitaxel-loaded methoxy poly(ethylene glycol)-poly(lactic-co-glycolic acid) copolymer nanoparticles and the anti-tumoral activity of the Ptx-Nps on mice liver cancer H22. **METHODS** The paclitaxel (Ptx) poly(ethylene glycol-lactic-co-glycolic acid) (mPEG-PLGA) nanoparticles were prepared by the interfacial deposition method. The particle size and Zeta potential were evaluated by Malvern Zetasizer. The morphology of mPEG-PLGA Ptx-Nps was characterized by transmission electron microscopy. The influences of the paclitaxel-fed amount and different contents of mPEG in the copolymer on Ptx-Nps were studied. Therapeutic effect of the Nps was studied on Kunming mice liver cancer H22 and hypersusceptible test was also carried out. **RESULTS** Ptx-Nps of preparation allowed the formation of spherical nanometric (<120 nm), homogeneous and negatively charged particles which were suitable for intravenous administration. The tumor inhibiting effect of Ptx-Nps was more effective compared with paclitaxel injection. **CONCLUSION** The incorporation efficiency of paclitaxel in nanoparticles was the best when using 1% paclitaxel-fed amount and 4% mPEG in the copolymer. This study will provide an experiment basis for the development of new kind of intravenous administration of paclitaxel, mPEG-PLGA copolymer becomes a new perfect material of anti-tumoral drug.

KEY WORDS: interfacial deposition method; methoxy Poly(ethylene glycol)-poly(lactic-co-glycolic acid); paclitaxel; nanoparticles (Nps); liver cancer

紫杉醇 (paclitaxel, Ptx) 主要作用于微管, 与细胞微管蛋白结合, 通过诱导与促进微管蛋白聚合, 使微管过稳定化及排列异常, 使细胞有丝分裂受到阻断而发挥抗肿瘤作用, 对卵巢癌、乳腺癌、肺癌、宫颈癌、颈部癌症以及难治愈的前列腺癌均有较好的抗癌作用^[1-2]。目前临床用的紫杉醇注射液是以聚氧乙稀蓖麻油 (cremophor EL) 无水乙醇 (50:50) 制成的。聚氧乙稀蓖麻油易引起过敏反应和低血压等不

良反应, 极大的限制了临床应用^[3]。为提高紫杉醇的治疗作用, 减少不良反应, 采用靶向给药技术和控缓释技术来改善紫杉醇的给药方式和疗效^[4]是研究的趋势。

本实验采用聚乙二醇单甲醚-聚乳酸-乙醇酸共聚物 (mPEG-PLGA) 为载体材料制备紫杉醇纳米粒具有很好的生物相容性和应用安全性, PLGA 和 mPEG 都是通过美国 FDA 认可作为体内适用的聚

基金项目: 贵州省科技攻关项目 [黔科合农社字 (2001) 1142 号]

作者简介: 方琴, 女, 主任药师 * 通讯作者: 王季石, 男, 博士, 教授

Tel: (0851) 6855119-3335

E-mail: jswang-yg@yahoo.com

合物。PLGA和mPEG两者通过共价键或非共价键的物理协同合成了mPEG-PLGA两性亲水嵌段共聚物,可有效地改善纳米粒的亲水性和降解性,延长纳米粒在体内的循环时间^[5],mPEG亲水性极强,免疫原性和抗原性极低,mPEG在共聚物中含量2%~5%时是抵抗蛋白吸附的临界值,可产生有效的立体稳定作用,使其在控制释放中被广泛应用^[6]。PLGA(50/50, M_w 14 500)的包封率最高^[7],采用界面沉积法制备了负载紫杉醇的mPEG-PLGA共聚物纳米粒^[7],考察其形态结构,粒径分布,Zeta电位,mPEG在共聚物中不同含量对纳米粒的影响,进行了纳米粒对昆明小鼠肝癌H22细胞的疗效^[8]及其过敏实验^[9],并与紫杉醇注射液进行比较。

1 材料与仪器

聚乙二醇单甲醚(mPEG M_n 2000)聚乳酸-乙醇酸(PLGA 50/50, M_w 14 500)聚合物(山东济南岱罡生物技术有限公司);紫杉醇原料和紫杉醇注射液(北京四环医药科技股份有限公司);F68(药用级,南京金陵石化公司表面活性剂研究所);丙酮、二氯甲烷、磷酸均为分析纯;甲醇、乙腈均为色谱纯。

高效液相色谱系统(美国Waters公司);粒度仪[al malmcem zetasizer Nano - 2s90 (Malvern instrument uk)];超速离心机(日本日立,Himal CP 100MX);LGI-10型冷冻干燥机(北京四环科学仪器厂);透射电镜(日立H-600);酶联检测仪(Sunrise TE-CAN Austria)。

2 实验方法

2.1 紫杉醇纳米粒(Ptx-Nps)的制备

采用界面沉积法,将一定量的紫杉醇原料药溶于1 mL丙酮中,再将聚合物材料加入该溶液中,涡旋使材料完全溶解后加入丙酮使溶液体积为10 mL,马上将10 mL溶液滴加在磁力搅拌下含有F68(0.25%)的等量双蒸水中,搅拌20 min,然后将纳米溶液减压旋转蒸发至丙酮完全挥发,取出溶液,在4℃超速离心(5×10^4 r·min⁻¹)1 h,取出离心管,弃掉上清液,用双蒸水洗3次沉淀物,洗去未包封入纳米粒的药物,将沉淀物冷冻干燥24 h,即得冻干粉。

2.2 载药量和包封率的测定

载药量的测定:称取一定质量的Ptx-Nps冻干粉,加入1 mL二氯甲烷,5 mL乙腈-2 mmol·L⁻¹磷酸盐缓冲液(50/50)溶解,涡旋溶解5 min,用氮气吹至溶液澄清,再用一定量的流动相稀释后,用HPLC测溶液中紫杉醇的峰面积,结合紫杉醇的标

准曲线,计算载药量。

包封率的测定:用5 mL乙腈-2 mmol·L⁻¹磷酸盐缓冲液(50/50)溶解离心分离的沉淀物,用HPLC测溶液中紫杉醇的峰面积,结合紫杉醇的标准曲线,计算包封率。

2.3 纳米形态、粒度和Zeta电位的测定

取载药前后的纳米粒胶体溶液适量分别滴加于铜丝网膜上,在透射电子显微镜下观测其形态并照相;取纳米粒胶体溶液用蒸馏水稀释后,用粒度仪测定粒度及Zeta电位,每个样品3次,算出平均值。

2.4 Ptx-Nps对小鼠肝癌H22疗效分析

以注射生理盐水为对照实验,比较紫杉醇注射液和Ptx/Nps对昆明小鼠肝癌H22的疗效,10只小鼠为1组,共7组,进行ip给药,隔2 d给药1次,共给药4次,采用统计学检验方法t检验。

2.5 急性过敏性实验

取豚鼠12只,随机分为2组,每组6只,各半。分别按照2 mg·kg⁻¹,腹腔注射2种供试药物0.5 mL,隔天注射,连续3次,观察豚鼠行为及不良反应。其中两组中取一半于7 d由腹腔注射2 mL,进行激发,观察注射后豚鼠有无用爪搔鼻、喷嚏、竖毛、抽搐、大小便失禁、休克和死亡现象。另一半于首次注射后14 d腹腔注射相同剂量,并进行观察。

3 结果与讨论

3.1 mPEG在共聚物中的含量及投药量等对纳米粒的影响

mPEG在共聚物中的含量及紫杉醇投药量对纳米粒的影响见表1。由表1可以看出,mPEG的含量为4%,投药量为1%时,纳米粒的包封率为最好[(92.76±0.23)%];紫杉醇纳米粒的粒径在70~120 nm之间,粒径分布较窄,随着紫杉醇投药量和载药量的增加,粒径并不增大;Ptx-Nps的Zeta电位为-(11.25±0.27),Zeta电位绝对值越小,对纳米粒表面电荷的屏蔽作用越强,同时,随着隐形纳米粒粒径的减少,Zeta电位也相应减少,导致纳米粒稳定性提高^[10]。

3.2 Ptx-Nps显微形态观察

取载药前后适量纳米胶体溶液分别滴在铜丝网膜上,在透射电子显微镜下观测其形态并摄影,见图1。纳米溶液形态均呈球形,载药后粒径小于载药前,粒径分布较窄,与粒度仪所测粒径非常相近。

3.3 Ptx-Nps对昆明小鼠癌细胞H22疗效分析

以注射生理盐水为对照实验,比较紫杉醇注射液(Ptx)和紫杉醇纳米粒对昆明小鼠肝癌H22的疗

表 1 mPEG在共聚物中的含量及紫杉醇投药量等对纳米粒的影响 . $n = 3, \bar{x} \pm s$

Tab 1 Influences of the different contents of mPEG in copolymer and the paclitaxel- fed amount etc on nanoparticle. $n = 3, \bar{x} \pm s$

Contents of mPEG/%	Paclitaxel-fed amount/mg	Size/nm	Zeta potential/mV	Entrapment efficiency/%	Drug-baded amount/%
2	0.45 \pm 0.005	109.81 \pm 0.65	- (11.1 \pm 0.72)	80.41 \pm 0.30	0.36 \pm 0.012
	0.99 \pm 0.018	111.03 \pm 0.40	- (14.7 \pm 0.49)	86.18 \pm 0.62	0.86 \pm 0.018
4	0.42 \pm 0.006	79.76 \pm 0.49	- (7.8 \pm 0.20)	90.38 \pm 0.34	0.41 \pm 0.002
	1.02 \pm 0.029	81.69 \pm 0.22	- (11.25 \pm 0.27)	92.76 \pm 0.23	0.91 \pm 0.008
5	0.45 \pm 0.009	73.80 \pm 0.51	- (9.9 \pm 0.51)	84.18 \pm 0.23	0.38 \pm 0.006
	1.00 \pm 0.013	94.40 \pm 0.59	- (9.5 \pm 0.25)	79.66 \pm 0.53	0.82 \pm 0.002

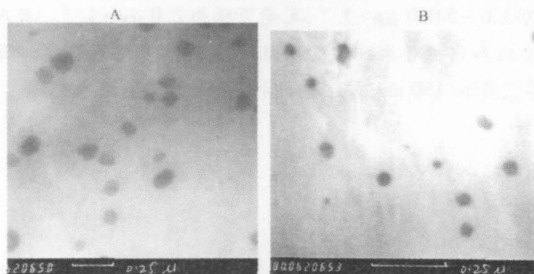


图 1 纳米粒载药前 ($\times 40\ 000$)后 ($\times 80\ 000$)的透射电镜照片

A - 载药前; B - 载药后, 1%载药量

Fig 1 Transmission electronic microphotographs of before ($\times 40\ 000$) and after ($\times 80\ 000$) loading drug Nps

A - before bading drug; B - after loading drug with the drug amoun 1%

表 2 紫杉醇纳米粒和紫杉醇注射液对昆明小鼠癌细胞 H22疗效分析. $n = 4, \bar{x} \pm s$

Tab 2 Therapeutic effect of Paclitaxel nanoparticles and injection on Kummig mice liver cancer H22 $n = 4, \bar{x} \pm s$

Group	Dosage/mg \cdot kg ⁻¹	Animal amount Begin/end	A voidupois/g Begin/end	Weight of tumour/g	Restraining efficiency/%
Control	-	10/10	18.62/27.04	3.67 \pm 0.54	-
Ptx	2.5	10/10	18.75/28.07	2.73 \pm 0.48	25.61 ¹⁾
	5.0	10/10	18.75/28.07	2.28 \pm 0.42	37.79 ¹⁾
	7.5	10/10	18.82/30.14	1.50 \pm 0.43	59.26 ¹⁾
Ptx/Nps	2.5	10/10	18.46/27.09	2.69 \pm 0.38	26.59 ¹⁾
	5.0	10/10	18.81/29.93	2.09 \pm 0.31	42.97 ¹⁾
	7.5	10/10	18.84/33.76	1.19 \pm 0.16	67.68 ²⁾

注: ¹⁾ $P < 0.001$, 与对照组相比, ²⁾ $P < 0.05$, 与紫杉醇注射液相比

Note: ¹⁾ $P < 0.001$, vs Control, ²⁾ $P < 0.05$, vs Ptx

嚏; 三级: 多次连续喷嚏、伴有呼吸困难或痉挛、抽搐; 四级: 痉挛、抽搐、大小便失禁、休克死亡。

3.4.2 过敏反应症状 紫杉醇注射液具有明显的过敏反应, 在第一次给药后即出现抓鼻及颤抖, 并在激发过后出现呼吸困难及抽搐。紫杉醇纳米粒在致敏过程中均未发生抓鼻、喷嚏、竖毛等过敏反应, 但在激发过后个别出现抓鼻及轻微颤抖, 过敏反应的程度明显低于紫杉醇注射液; 两组动物无一死亡。

4 结论

采用界面沉积法制备的紫杉醇 mPEG-PLGA 纳米粒 (Ptx-Nps), 粒径小于 120 nm, 粒径分布较窄, 随着紫杉醇投药量和载药量的增加, 粒径并不增大; 实验结果表明, 在筛选 mPEG-PLGA 材料中, PLGA 为 50/50, M_w 14 500, mPEG ($M_n = 2\ 000$) 的含量为 4% 时, 包封率最高, 与文献报道稳合^[7]; 紫杉醇投药量为 1%, mPEG 含量为 4% 时, Ptx-Nps 的包封率达 (92.76

效, 结果见表 2。结果说明, 生理盐水对肿瘤无抑制作用, 紫杉醇注射液和紫杉醇纳米粒对肿瘤均有抑制作用, 但在 2.5, 5 mg \cdot kg⁻¹ 剂量条件下, Ptx-Nps 对肿瘤的抑制率大于 Ptx 注射液, 肿瘤重量明显减小; 剂量为 7.5 mg \cdot kg⁻¹ 时, Ptx-Nps 与 Ptx 比较有显著性差异 ($P < 0.05$), 与对照组比较 ($P < 0.001$), 有非常显著性差异, 说明 Ptx-Nps 对昆明鼠肝癌 H22 的抑制生长比 Ptx 效果好。

3.4 过敏实验

3.4.1 判断指标 根据两组大鼠反应的过敏症状不同, 分为 1~4 级。0 级: 无明显反应; 一级: 有轻微抓鼻、竖毛; 二级: 有明显的抓鼻、竖毛、颤抖或喷

± 0.23), 载药量为 (0.91 \pm 0.008)%, Zeta 电位为 - (11.25 \pm 0.27); Ptx-Nps 抑制昆明鼠肝癌 H22 细胞的生长比紫杉醇注射液好, 随剂量增大抑制率增大; 急性过敏试验结果表明, 所制纳米粒的过敏反应的程度小于紫杉醇注射液, 与文献报道一致^[9]。

紫杉醇是近来治疗癌症的最有前途的药物之一。目前临床使用的只有紫杉醇注射液, 怎样解决形成一种合适的给药体系是最重要的。我们使用的聚乙二醇单甲醚-聚乳酸-乙醇酸共聚物 (mPEG-PLGA) 可成为抗肿瘤药物的理想新型载体, 为临床提高治愈率并降低不良反应提供了实验依据。

REFERENCES

- [1] ZHANG GL. Progress and clinical application of paclitaxel[J]. *Chin New Drugs J* (中国新药杂志), 1995, 4(2): 3-5.
- [2] CROSASSO P, CERUTIM, BRUSA P, et al. Preparation, characterization and properties of sterically stabilized paclitaxel-containing liposomes[J]. *J Controlled Release*, 2000, 63(1): 19-30.

液相色谱-串联质谱法测定人血浆中厄贝沙坦

关心²,陈笑艳¹,宋波¹,张逸凡¹,钟大放^{1*} (1. 中国科学院上海药物研究所 药物代谢研究中心,上海 201203; 2. 沈阳药科大学药物代谢与药理学实验室,沈阳 110016)

摘要:目的 建立快速、灵敏的液相色谱-串联质谱法测定人血浆中厄贝沙坦的浓度。方法 50 μL 血浆样品经乙腈沉淀蛋白处理后,以乙腈-水-甲酸(90:10:0.25)为流动相,Zorbax SB C₁₈柱分离,通过电喷雾离子源四极杆串联质谱,以选择反应监测(SRM)方式进行检测。结果 测定血浆中厄贝沙坦方法的线性范围为 2.0~5 000 μg·L⁻¹,定量下限为 2.0 μg·L⁻¹。日内、日间精密度(RSD)均小于 8.3%,准确度(RE)在 ±4.1%以内。厄贝沙坦和内标替米沙坦的回收率分别为 90.9%和 90.4%;每个样品测试时间仅为 3.6 min。应用此法研究了 18 名健康受试者单剂量 po 150 mg 厄贝沙坦片后的药动学特点。结论 该法选择性强,灵敏度高,适用于厄贝沙坦的临床药动学研究。

关键词:液相色谱-串联质谱法;厄贝沙坦;药动学;血浆药物浓度

中图分类号:R971 文献标识码:A 文章编号:1001-2494(2007)19-1486-04

Determination of Irbesartan in Human Plasma by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

GUAN Xin², CHEN Xiao-yan¹, SONG Bo¹, ZHANG Yi-fan¹, ZHONG Da-fang^{1*} (1. Center for Drug Metabolism and Pharmacokinetics Research, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China; 2. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

ABSTRACT:OBJECTIVE To develop a LC-MS/MS method for direct quantification of irbesartan in human plasma. **METHODS**

An aliquot of 50 μL plasma was treated by a simple protein precipitation using acetonitrile, then separated on a Zorbax SB C₁₈ column. The mobile phase consisted of acetonitrile-water-formic acid (90:10:0.25). A triple quadrupole tandem mass spectrometer equipped with an electrospray ionization (ESI) source was used as detector and was operated in the positive ion mode. Selected reaction monitoring (SRM) mode using the precursor to product ion of *m/z* 429 to *m/z* 207 and *m/z* 515 to *m/z* 276 was performed to quantify irbesartan and the internal standard telmisartan, respectively. **RESULTS** The linear calibration curves were obtained in the concentration range of 2.0~5 000 μg·L⁻¹. The lower limit of quantification was 2.0 μg·L⁻¹. The inter- and intra- day precision (RSD) was below 8.3%, and the accuracy (RE) was within ±4.1% calculated from QC samples. The method gave the mean recovery 90.9% and 90.4% to irbesartan and internal standard telmisartan, respectively. The total chromatographic run time was only 3.6 min. The method was employed in a pharmacokinetic study of irbesartan after an oral administration to 18 healthy volunteers. **CONCLUSION** The method was proved to be selective, sensitive, and suitable for clinical investigation of irbesartan pharmacokinetics.

KEY WORDS: liquid chromatography-tandem mass spectrometry; irbesartan; pharmacokinetics; plasma concentration

- [3] ZHANG X N, ZHANG Q. Study on new dosage forms of paclitaxel drug and its clinical application progress[J]. *Foreign Med Sci (Sec Pharm)* (国外医学·药学分册), 2002, 29(6): 321-325.
- [4] DENG L D, SUN D X, DONG A J. Advances in the research of injections of anticancer agent paclitaxel[J]. *Prog Pharm Sci* (药学进展), 2002, 26(3): 152-155.
- [5] DENG L D, SUN D I, ZHANG Y T, et al. Studies on paclitaxel-loaded methoxy poly(ethylene glycol)/poly(L-lactic acid) diblock copolymer nanoparticles[J]. *J Biomed Eng* (生物医学工程学报), 2005, 22(4): 715-718.
- [6] FANG C, PEI Y Y. Carry the research progress of anti-tumor medicine invisible nanoparticle[J]. *Chin Pharm J* (中国药学报), 2004, 39(2): 89-92.
- [7] CRISTIN F, SERGD S, ROGER D G. Paclitaxel-based plga nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and *in vitro* anti-tumoral activity[J]. *J Controlled Release*, 2002, 83: 273-286.
- [8] DENG L D, SUN D X, ZHANG Y T, et al. Studies on paclitaxel-loaded nanoparticles of amphiphilic block copolymer[J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2004, 39(2): 149-152.
- [9] ZHANG X N, TANGL H, YAN X Y, et al. Preparation of paclitaxel for injection and its hypersensitivity test[J]. *Chin J Hosp Pharm* (中国医院药学杂志), 2005, 25(1): 32-34.
- [10] FANG C, SHIB, PEI Y Y. Preparation and stability of recombinant human tumor necrosis factor- α -loaded stealth nanoparticles[J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2004, 39(11): 939-943.

(收稿日期:2006-08-11)

作者简介:关心,女,硕士研究生 *通讯作者:钟大放,男,教授,博士生导师 Tel / Fax: (021)50800738 E-mail: zhongdf@china.com