

• 药剂与工艺 •

改良溶剂挥发法制备姜黄素衍生物 mPEG₅₀₀₀-PLGA 纳米粒的研究

刘楠楠, 蒋福升, 俞婷婷, 沈 勇, 张 坤, 徐 敏, 刘翔宇, 杨汝春, 丁志山*
浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053

摘要: 目的 对改良溶剂挥发法制备姜黄素衍生物 Cur(OA)₂ 的聚乙二醇单甲醚-聚乳酸-乙醇酸共聚物[poly-lactide-co-glycolide-co-poly-(ethylene-glycol), mPEG₅₀₀₀-PLGA]纳米粒[Cur(OA)₂-NPs]的工艺进行优化, 并对 Cur(OA)₂-NPs 加以表征。方法 以包封率、形态、粒径为指标, 采用正交设计筛选优化制备工艺。以激光粒度仪和透射电子显微镜分别对 Cur(OA)₂-NPs 的粒径、Zeta 电位和形貌进行表征。结果 优化的制备方案: 药物 Cur(OA)₂ 与载体 mPEG₅₀₀₀-PLGA 的用量(质量)比为 1 : 4, 有机相与水相溶剂体积比为 1 : 2; 搅拌速率为 1 200 r/min, 泊洛沙姆 188 (F68) 的用量为 0.3%。所得 Cur(OA)₂-NPs 为球形粒子, 分布较均匀, 平均粒径 86.23 nm (粒径范围 80~100 nm), Zeta 电位为-23.8 mV。结论 改良溶剂挥发法适于载姜黄素衍生物的 mPEG₅₀₀₀-PLGA 纳米粒子的制备。

关键词: 姜黄素; 聚乙二醇单甲醚-聚乳酸-乙醇酸共聚物; 纳米粒; 溶剂挥发法; 正交设计

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)16-2223-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.16.006

Preparation of curcumin-(oleic acid)₂ loaded mPEG₅₀₀₀-PLGA nanoparticles by modified solvent evaporation method

LIU Nan-nan, JIANG Fu-sheng, YU Ting-ting, SHEN Yong, ZHANG Kun, XU Min, LIU Xiang-yu,
YANG Ru-chun, DING Zhi-shan
Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

Abstract: Objective To optimize the technological process for the preparation of curcumin-(oleic acid)₂ [Cur(OA)₂] loaded by mPEG₅₀₀₀-PLGA with modified solvent evaporation method and to characterize the nanoparticles [Cur(OA)₂-NPs]. **Methods** Using entrapment efficiency (EE), appearance, and particle size as indexes, orthogonal test design was used to optimize the preparation technology. Laser particle size analyzer and transmission electron microscopy (TEM) were carried out to evaluate the Cur(OA)₂-NPs size, Zeta potential, and morphological characteristics. **Results** The optimal preparation conditions for Cur(OA)₂-NPs were as follows: Cur(OA)₂-mPEG₅₀₀₀-PLGA (1 : 4); organic solvent-aqueous solvent (1 : 2); the stirring speed was 1 200 r/min; Poloxamer 188 (F68) concentration was 0.3%. The Cur(OA)₂-NPs were spherical and uniformly distributed, with average particle size 86.23 nm (range of particle size: 80—100 nm) and Zeta potential -23.8 mV. **Conclusion** The modified solvent evaporation method is suitable to prepare the curcumin derivatives loaded mPEG₅₀₀₀-PLGA NPs.

Key words: curcumin; mPEG₅₀₀₀-PLGA; nanoparticles; solvent evaporation method; orthogonal design

姜黄素 (curcumin, Cur) 是从姜科植物姜黄 *Curcuma longa* L. 中提取的一种多羟基化合物, 大量研究表明, 姜黄素具有抗氧化、抗炎、抗癌、清除自由基、抗微生物以及对心血管系统、消化系统

等多方面药理作用, 且几乎没有明显毒副作用^[1], 是一种具有良好应用前景的抗肿瘤新药。但姜黄素水溶性差, 在机体内难以吸收, 易代谢 (口服生物利用度低, 大部分以原形排出体外约 89%), 在体

收稿日期: 2013-03-12

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目 (Y2111091); 浙江省大学生科技创新资助项目 (2012R410029)

作者简介: 刘楠楠 (1989—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药新剂型。Tel: 18042320258 E-mail: liunannan19900227@163.com

*通信作者 丁志山, 教授, 博士生导师。Tel: 13184220302 E-mail: zjtcmdzs@sohu.com

网络出版时间: 2013-07-05 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20130705.1550.012.html>

外也容易被氧化^[2],这是姜黄素类化合物尚未开发成新药的根本原因。国内外已有不少关于姜黄素的结构改造以及新剂型方面的报道^[3],但都未达到开发临床应用的标准。因此有必要进一步研制开发新型姜黄素制剂,以提高其溶解度、生物利用度和其靶组织浓度,增强药效。

为此,本课题组前期合成了姜黄素油酸衍生物[*curcumin-(oleic acid)*₂, *Cur(OA)*₂],小鼠体内组织分布研究表明,该衍生物能显著增加姜黄素在肝脏组织中的分布,尾 iv 给予小鼠相当于姜黄素 20 mg/kg 后,其 15 min 后肝脏组织中姜黄素达到峰值(31.47 μg/g),4 h 后仍然可检测到(15.77 μg/g),并明显表现为肝组织靶向性^[4],具有潜在开发应用价值。然而,姜黄素经油酸修饰后脂溶性极强,难以单独通过 iv 给药,必需辅以适当的剂型改进。

纳米技术已成功应用于医药行业^[5]并产生巨大效益,其中聚合物聚乙二醇单甲醚-聚乳酸-乙醇酸共聚物(mPEG₅₀₀₀-PLGA)因其较好的生物相容性和应用安全性而被广泛研究;因此,本实验利用 mPEG₅₀₀₀-PLGA 作为载体制备新型 *Cur(OA)*₂ 纳米粒,预计该共聚物疏水端 PLGA 极易与 *Cur(OA)*₂ 疏水端油酸分子相互作用形成疏水核,而在外侧的 mPEG₅₀₀₀ 部分则伸展到水溶液中形成纳米粒。

作为 iv 给药的抗肿瘤药物,合适的纳米粒粒径对于药物运输系统是非常重要的。一般来说,纳米粒的最优粒径范围是在 10~100 nm。如果粒径小于 10 nm,纳米粒将会迅速地被肾清除(阈值<6 nm),而大于 100 nm,纳米粒将会增加被内皮网状系统(RES)吞噬的机会^[6]。本课题组前期研究表明^[7],*Cur(OA)*₂ 纳米粒的粒径为 235 nm 时,尽管体外抗肿瘤活性显示其对 HepG2 细胞具有较好的抑制作用,但是所制备的纳米粒并不是最优的。因此,本实验在原有的纳米粒制备方法上,加入了泊洛沙姆 188(F68)。F68 是一种非离子型的聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物,其兼具脂溶性和水溶性,是 FDA 批准的药用辅料,在药剂学上常用作乳化剂^[8]。据报道,F68 可用于阻止含药微粒被巨噬细胞吞噬,从而增加其在血液循环内的停留时间^[9]。而循环时间延长和内皮网状系统 RES(肝)蓄积减少使得纳米粒可通过增强的渗透和滞留效应(enhanced permeability and retention effect, EPR)有效地聚集于多种肿瘤,发挥抗肿瘤作用^[10]。

因此,本实验以 mPEG₅₀₀₀-PLGA 为载体,F68

作为乳化剂,优化制备工艺,制备 mPEG₅₀₀₀-PLGA 负载 *Cur(OA)*₂ 纳米粒[*Cur(OA)*₂-NPs],并采用透射电子显微镜、激光粒度分析仪对其形态和表面性质进行表征,为构建安全有效的新型姜黄素药物传输系统奠定基础。

1 仪器与材料

UV—Vis3000 型紫外可见分光光度计(上海迪诺力泰仪器设备有限公司);磁力加热搅拌器(德国 IKA 集团);SHZ—III 循环水式真空泵(巩义市英峪予华仪器厂);R206D 型旋转蒸发仪(上海申顺生物科技有限公司);冷冻超速离心机(Thermo Electron 公司);H—7650 透射电子显微镜(日本 Hitachi 公司);Zetasizer Nano ZS90 激光粒度测定仪(英国 Marven 公司)。

油酸[顺式-9-十八(碳)烯酸,杭州双林化工试剂厂,批号 Q/YSH09-93];姜黄素(质量分数≥98%,美国 Sigma 公司);聚乙二醇单甲醚-聚乳酸-乙醇酸共聚物[mPEG₅₀₀₀-PLGA, mPEG₅₀₀₀ 的相对分子质量为 5 000, mPEG₅₀₀₀ 为 4%,其中乳酸-乙醇酸(LA-GA 55:45),济南岱罡生物科技有限公司];F68(相对分子质量为 8 350±1 000,上海源叶生物技术有限公司);硅胶 H(上海沪峰生物科技有限公司);四氢呋喃(THF)等其余试剂均为分析纯。

2 方法和结果

2.1 姜黄素油酸衍生物 *Cur(OA)*₂ 的合成

按 Jiang 等^[4]方法合成姜黄素衍生物 *Cur(OA)*₂,并对其结构进行确证。

2.2 *Cur(OA)*₂-NPs 的制备

采用改良的有机溶剂注入法制备载 *Cur(OA)*₂ 的 mPEG₅₀₀₀-PLGA 纳米粒。将一定量的 *Cur(OA)*₂ 与适量的 mPEG₅₀₀₀-PLGA 载体材料用 THF 溶解,形成有机相。将此溶液装于 10 mL 针筒接 10 μL 枪头的简易装置中,再在磁力搅拌(1 200 r/min)下以一定的速度(20 滴/min)注入溶有适量 F68 的双蒸水中(室温 25 ℃)。于 30 ℃水浴中,以 100 r/min 减压蒸发,除去 THF,而后将纳米粒溶液置入低温离心机,以 3 000 r/min 低速离心去除大颗粒聚集物,得到纳米粒的混悬液。将表征后的纳米粒混悬液再以 20 000 r/min,4 ℃冷冻离心 30 min 沉淀纳米粒,弃去上清液,去除残留的 mPEG₅₀₀₀-PLGA,双蒸水重新悬起纳米粒子,重复洗涤 3 次,真空冷冻干燥 24 h,保存纳米粒。

2.3 包封率和载药量的测定

2.3.1 吸收波长的确定 分别取 mPEG₅₀₀₀-PLGA、Cur(OA)₂ 和 F68 适量, 用 THF 溶解后, 以空白溶剂为参比, 在波长 200~600 nm 进行扫描, 结果见

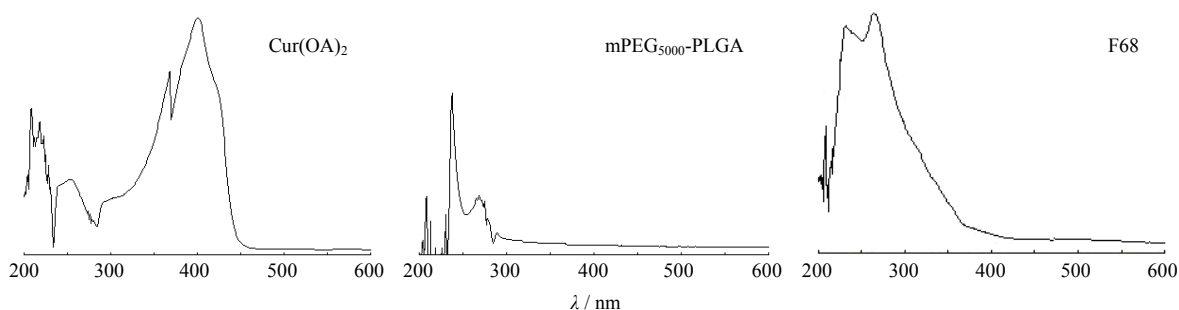


图1 Cur(OA)₂、mPEG₅₀₀₀-PLGA 和 F68 紫外扫描图谱

Fig. 1 UV scanning spectra of Cur(OA)₂, mPEG₅₀₀₀-PLGA, and F68

(实验室自制, 质量分数>98%,) 45 mg, 用 THF 溶解, 置于 100 mL 量瓶中, 并定容, 得到质量浓度为 0.45 mg/mL 的储备液。分别精密吸取储备液 200、300、400、500、600、700 μL 置于 10 mL 量瓶中, 用 THF 稀释至刻度, 充分摇匀, 即得质量浓度分别为 9.0、13.5、18.0、22.5、27.0、31.5 μg/mL 的 Cur(OA)₂ 对照品溶液。以 THF 为参比溶液, 在 400 nm 处测定吸光度 (*A*) 值。根据测定数据, 以质量浓度为横坐标 (*X*), *A* 值为纵坐标 (*Y*) 进行线性回归, 得回归方程为 $Y=21.18X+0.1270$, $r=0.9990$, 表明 Cur(OA)₂ 在 9.0~31.5 μg/mL 与 *A* 值呈良好的线性关系。

2.3.3 精密度试验 取质量浓度为 18.0 μg/mL 对照品溶液, 测定 *A* 值, 连续测量 5 次, 结果其 RSD 为 0.36%, 表明精密度良好。

2.3.4 回收率试验 精密量取 9 份“2.3.7”项下制备的上清液 0.5 mL 置 9 个 1 mL 量瓶中, 再分别精密移取 0.1、0.2、0.4 mL 质量浓度为 18.0 μg/mL 的 Cur(OA)₂ 对照品溶液加入量瓶中, 用 THF 稀释至刻度, 摇匀, 得到 3 种质量浓度的样品溶液各 3 组, 于 400 nm 波长处分别测定 *A* 值, 各质量浓度平行测定 3 次, 计算 Cur(OA)₂ 的平均回收率为 99.85%, RSD 为 0.68%, 表明载体及辅料等对测定无干扰。

2.3.5 稳定性试验 取“2.3.7”项下制备的上清液, 于 1 d 内 0、1、2、4、6、8、24 h 时分别测定 400 nm 处的 *A* 值, 计算其 RSD 为 1.51%, 表明上清液在 24 h 内基本稳定。

2.3.6 重复性试验 取同批次制备的上清液 5 份, 连续测定 *A* 值, 计算其质量浓度的 RSD 为 1.06%,

图 1。可见 Cur(OA)₂ 在 400 nm 处有最大吸收, 而 mPEG₅₀₀₀-PLGA 和 F68 在此波长对 Cur(OA)₂ 的紫外吸收几乎没有干扰, 故选定 400 nm 为检测波长。

2.3.2 标准曲线的制备 精密称 Cur(OA)₂ 对照品

表明该方法的重复性良好。

2.3.7 包封率和载药量的测定 取适量的纳米粒混悬液, 用 THF 溶解并测定, 得药物总量 (W_t); 另取纳米粒混悬液溶解后经过 20 000 r/min 超速冷冻离心 40 min 后的上清液进行测定, 得游离药物量 (W_f); 另设制备时加入的药物和载体总量为 (W_s); 则包封率= $(W_t-W_f)/W_t$, 载药量= $(W_t-W_f)/W_s$, 收率= W_t/W_s 。

2.4 单因素试验法初选 Cur(OA)₂-NPs 的制备条件

纳米粒是由高分子物质组成, 粒径在 10~1 000 nm, 药物可以溶解包裹于其中或吸附在其表面上。作为抗癌药的载体是纳米粒最有价值的用途之一, 因肿瘤的血管壁间隙约为 100 nm, 对粒径小于 100 nm 的粒子具有生物通透性, 从而载药纳米粒可以从肿瘤有隙漏的内皮组织血管中逸出而进入肿瘤组织内发挥疗效^[11]。在纳米给药系统中, 药物突释现象又是影响其应用的关键问题之一。适量的突释可以使血药浓度快速达到有效治疗浓度, 对治疗有利, 但过量的突释会导致血药浓度接近或超过中毒水平, 从而产生不良反应。在众多影响微球突释的因素中, 粒径又是最主要的因素。所以, 本实验以粒径作为评价标准之一^[12]。

在预试验的基础上, 以“2.2”项所述 Cur(OA)₂-NPs 制备方法为基础, 采用单因素试验法对药物 Cur(OA)₂ 与载体 mPEG₅₀₀₀-PLGA 的用量(质量)比、反应温度、搅拌速率、旋蒸挥干温度、超声时间、有机相与水相体积比以及 F68 用量等对纳米粒的形成影响较大的因素进行考察, 以筛选制备纳米粒的最佳工艺。各因素水平安排见表 1。

表1 因素水平

Table 1 Factors and levels

水平	药物与载体 质量比	反应温度 / ℃	搅拌速率 / (r·min ⁻¹)	旋蒸温度 / ℃	超声时间 / min	有机相与水相 体积比	F68 用量 / %
1	1 : 1	25	200	25	0	2 : 10	0.00
2	1 : 1.5	30	400	30	5	5 : 10	0.05
3	1 : 2	40	600	35	10	10 : 10	0.10
4	1 : 3	60	800	40	15	20 : 10	0.20
5	1 : 5	80	1 000	45	20	30 : 10	0.30
6			1 200				0.35

分别以粒径和包封率作为主要指标进行单因素考察,其中药物载体质量比 1 : 2,反应温度 25 ℃,搅拌速率是 1 000 r/min,旋蒸温度 30 ℃,超声时间 5 min,有机相与水相体积比 5 : 10, F68 的用量为 0.10%。结果发现,药物与载体质量比、搅拌速率、有机相和水相体积比以及 F68 用量是影响制备工艺的主要因素。

2.4.1 药物 Cur(OA)₂ 与载体 mPEG₅₀₀₀-PLGA 的质量(质量)比的影响 由表 2 结果可知, mPEG₅₀₀₀-PLGA 载体材料对粒径影响很大,随着载体材料量的降低,纳米粒粒径随之减小。这与 Li 等^[13]研究的结果是一致的。聚合物质量浓度低时,有机相溶液黏度低,表面张力小,分散速度快,有利于有机相的快速扩散和挥发,因此生成纳米粒粒径小。而随着聚合物质量浓度增大,有机相溶液黏度增大,表面张力也变大,不利于聚合物溶液在水相中的分散,所以生成的纳米粒粒径较大。但是当药物与载体质量比分别是 1 : 1、1 : 1.5、1 : 2 时,得到的纳米粒混悬液放置一段时间后,会有沉淀聚集。同时随着载体量的加大,包载的药物增多,而投药量与载体材料的比例显著下降,表现为载药量的降低。

2.4.2 反应温度的影响 由表 3 可知,当反应温

表2 药物载体质量比对 Cur(OA)₂-NPs 粒径及包封率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)Table 2 Effect of carrier / drug ratio on particle size and EE of Cur(OA)₂-NPs ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

药物与载体质量比	粒径 / nm	包封率 / %
1 : 1	73.00 ± 4.23	89.34 ± 0.67
1 : 1.5	84.87 ± 2.54	89.23 ± 0.77
1 : 2	89.90 ± 2.67	90.87 ± 0.98
1 : 3	102.20 ± 1.23	89.61 ± 0.55
1 : 5	120.19 ± 3.45	87.23 ± 0.10

表3 反应温度对 Cur(OA)₂-NPs 粒径和包封率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)Table 3 Effect of reaction temperature on size and EE of Cur(OA)₂-NPs ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

反应温度 / ℃	粒径 / nm	包封率 / %
25	80.92 ± 1.88	90.55 ± 0.11
30	79.48 ± 2.01	89.45 ± 0.88
40	82.77 ± 1.17	89.31 ± 0.89
60	81.62 ± 1.07	90.66 ± 0.10
80	78.35 ± 2.11	88.54 ± 0.42

度为 30 ℃时,纳米粒粒径最小,然而各个水平之间并无统计学差异 ($P>0.05$),反应温度对粒径影响不大。且各反应温度下纳米粒的包封率也没有统计学差异 ($P>0.05$),因此反应温度对纳米粒粒径以及包封率影响不大,为此,本实验选择室温作为反应温度。

2.4.3 搅拌速率的影响 试验中发现(表 4),纳米粒粒径随搅拌速率增加先降低后增加,在 600 r/min 时粒径最小。当转速 ≤ 600 r/min 时,滴入水相中的有机相溶液不能及时分散,形成絮状团,影响纳米粒的形成。当转速增加到一定速率 (≥ 1 200 r/min)

表4 搅拌速率对 Cur(OA)₂-NPs 粒径及包封率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)Table 4 Effect of stirring speed on particle size and EE of Cur(OA)₂-NPs ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

搅拌速率 / (r·min ⁻¹)	粒径 / nm	包封率 / %
200	84.56 ± 2.35	90.32 ± 0.71
400	79.70 ± 1.01	88.43 ± 0.45
600	76.47 ± 0.87	90.21 ± 0.01
800	93.29 ± 4.20	89.57 ± 0.31
1 000	101.20 ± 3.78	90.43 ± 0.77
1 200	103.12 ± 1.22	91.61 ± 0.22

时,可观察到水面出现一层油膜,经搅拌形成团聚物,贴在瓶壁上,纳米粒粒径增大。而转速对包封率的影响不大。

2.4.4 旋蒸温度的影响 从表5数据可以看出,不同水浴温度条件下,纳米粒粒径集中在75~79 nm,可见,在减压状态下,不同水浴温度对纳米粒粒径影响无统计学差异($P>0.05$)。然而,实际观察发现,水浴温度超过40℃时,圆底烧瓶中会形成絮状物,溶液表面形成薄膜,且有大量药物贴壁,不利于纳米粒的形成。因此,适合制备纳米粒的旋蒸温度为25~35℃,并且此温度范围内,对药物的包封率影响不大,没有统计学差异($P>0.05$)。

表5 旋蒸温度对Cur(OA)₂-NPs粒径和包封率的影响
($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effect of evaporation temperature on size and EE of Cur(OA)₂-NPs ($\bar{x} \pm s, n=3$)

旋蒸温度 / °C	粒径 / nm	包封率 / %
25	79.22±1.20	90.47±0.03
30	75.65±1.19	88.89±0.55
35	76.85±2.17	90.43±0.42
40	76.66±1.66	87.32±0.82
45	78.20±2.02	89.42±0.17

2.4.5 超声时间的影响 从表6可见,超声时间在0~10 min 粒径变化不大,无统计学差异($P>0.05$)。随着超声时间延长,粒径变大,超声15 min 以上粒径变化不大。然而,随着超声时间的增加,包封率有下降的趋势,可能原因是超声对纳米粒子结构造成破坏使药物游离出来所致,但影响不明显,且没有统计学差异($P>0.05$),因此,为了节约时间,省去超声过程。

2.4.6 有机相与水相体积比的影响 在表7的试验结果中可以看到,随着有机相体积的增加,粒径先

表6 超声时间对Cur(OA)₂-NPs粒径和包封率的影响
($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 6 Effect of ultrasound time on size and EE of Cur(OA)₂-NPs ($\bar{x} \pm s, n=3$)

超声时间 / min	粒径 / nm	包封率 / %
0	96.05±1.07	90.51±0.11
5	94.45±2.11	90.21±0.31
10	96.46±1.82	89.89±0.01
15	99.23±2.01	89.37±0.88
20	99.51±2.15	88.11±0.21

表7 有机相与水相体积比对Cur(OA)₂-NPs粒径及包封率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 7 Effect of organic / water ratio on particle size and EE of Cur(OA)₂-NPs ($\bar{x} \pm s, n=3$)

有机相与水相体积比	粒径 / nm	包封率 / %
2 : 10	147.50±1.23	88.85±0.81
5 : 10	104.40±2.01	89.77±0.52
10 : 10	85.56±1.46	88.81±0.01
20 : 10	158.80±1.58	90.42±0.73
30 : 10	324.70±1.21	89.19±0.51

减小后增大。在有机相中聚合物浓度相同的情况下,改变水相与有机相的比例,当有机相体积增加,比值接近1,聚合物能有效地分散在水相中,纳米粒粒径减小。当有机相继续增加,有机相和水相的体积比减小,造成水相不能及时分散聚合物,聚合物增多,使Cur(OA)₂纳米粒粒径变大。有机相与水相体积比的变化,严重影响纳米粒粒径的大小,而对包封率的影响不大。

2.4.7 F68 用量的影响 表8结果显示,纳米粒的粒径随着F68用量的增加而变小,F68的加入大大地改善了纳米粒制备过程中聚集成团、贴壁的问题。当F68的用量大于0.3%时,粒径变大,且旋蒸过程中起泡现象严重,不利于纳米粒的形成。

表8 F68用量对Cur(OA)₂-NPs粒径及包封率的影响
($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 8 Effect of usage of F68 on particle size and EE of Cur(OA)₂-NPs ($\bar{x} \pm s, n=3$)

F68 用量 / %	粒径 / nm	包封率 / %
0	181.5±0.36	90.33±0.91
0.05	154.4±1.09	89.35±0.41
0.10	123.1±1.11	90.23±0.03
0.20	129.4±1.01	89.17±0.99
0.30	112.6±0.89	90.36±0.55
0.35	145.7±0.97	88.41±0.31

2.5 正交设计优化Cur(OA)₂-NPs的制备工艺

2.5.1 因素与水平 选择影响Cur(OA)₂-NPs制备的4个重要因素,即药物Cur(OA)₂与载体mPEG₅₀₀₀-PLGA的用量比(质量比,A)、有机相与水相的体积比(B);搅拌速率(C)、F68用量(D),每个因素分3个水平,以粒径、包封率为筛选指标,按正交设计L₉(3⁴)表进行试验。

2.5.2 正交试验 采用多指标试验综合加权评分法

处理数据。根据2个指标的重要性,确定粒径和包封率的权重分别为0.8和0.2,以综合评分(综合评分=粒径 $\times$ 0.8+包封率 $\times$ 0.2)为指标进行考察^[14]。试验设计及结果见表9,方差分析见表10。

表9 $L_9(3^4)$ 正交试验设计与结果Table 9 Design and results of $L_9(3^4)$ orthogonal test

试验号	A	B	C / (r·min ⁻¹)	D / %	粒径 / nm	包封率 / %	综合评分
1	1 : 9.0 (1)	2.5 : 10 (1)	800 (1)	0.1 (1)	152.6	91.17	140.31
2	1 : 9.0 (1)	5.0 : 10 (2)	1 000 (2)	0.2 (2)	134.8	89.86	125.81
3	1 : 9.0 (1)	7.5 : 10 (3)	1 200 (3)	0.3 (3)	153.5	92.47	141.29
4	1 : 4.0 (2)	2.5 : 10 (1)	1 000 (2)	0.3 (3)	111.4	89.30	106.98
5	1 : 4.0 (2)	5.0 : 10 (2)	1 200 (3)	0.1 (1)	101.2	90.23	99.01
6	1 : 4.0 (2)	7.5 : 10 (3)	800 (1)	0.2 (2)	152.3	91.23	140.09
7	1 : 2.3 (3)	2.5 : 10 (1)	1 200 (3)	0.2 (2)	95.6	89.48	94.34
8	1 : 2.3 (3)	5.0 : 10 (2)	800 (1)	0.3 (3)	106.6	92.56	103.79
9	1 : 2.3 (3)	7.5 : 10 (3)	1 000 (2)	0.1 (1)	176.8	89.71	159.38
K_1	407.41	341.63	384.19	398.70			
K_2	346.08	328.61	392.17	360.24			
K_3	357.51	440.76	334.64	352.06			
R	61.33	112.15	57.53	46.64			

表10 方差分析

Table 10 Analysis of variance

误差来源	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
A	709.114	2	1.715	无
B	2 508.211	2	6.066	无
C	647.620	2	1.566	无
D (误差)	413.486	2		

$F_{0.05}(2, 2)=19.00$

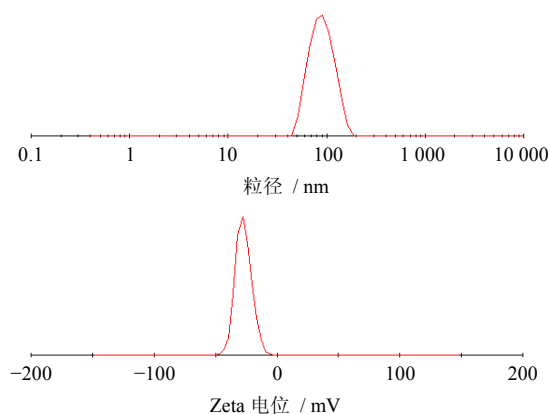
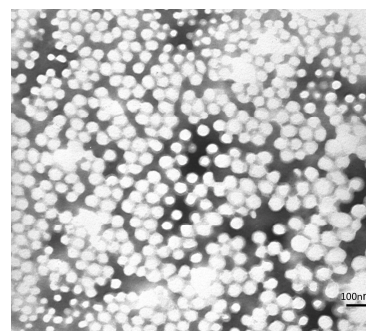
索取最佳水平,确定纳米粒的最佳处方为 $B_2A_2C_3D_3$,即药物 $Cur(OA)_2$ 与载体 $mPEG_{5000}$ -PLGA 的用量比为 1 : 4,有机相与水相的体积比为 1 : 2,搅拌速率为 1 200 r/min, F68 用量为 0.3%。

根据优化方案重复制备3批 $Cur(OA)_2$ 纳米粒子样品,激光粒度测定仪测定其平均粒径为 (86.23 ± 1.54) nm,多分散指数(PDI)为 0.057 ± 0.011 , Zeta 电位为 (-23.8 ± 2.5) mV,结果见图2;包封率为 $(91.25 \pm 0.10)\%$,载药量为 $(18.25 \pm 0.02)\%$;透射电镜(TEM)进行形态观察,结果见图3。所得粒子为球形纳米粒子,且粒径分布较均匀。

3 讨论

近年来,国内外已有不少有关聚合物纳米粒子制备方法的报道,包括纳米共沉淀法、盐析法、胶

2.5.3 试验结果分析 从综合评分的直观分析结果来看,试验结果影响的顺序为 $B>A>C>D$;从方差分析看,相对于D因素,A、B、C因素无显著性差异。考虑到本实验的具体操作和实验成本,各因

图2 $Cur(OA)_2$ -NPs 的粒径和 Zeta 电位图Fig. 2 Size and Zeta potential of $Cur(OA)_2$ -NPs图3 透射电镜下 $Cur(OA)_2$ -NPs 形态Fig. 3 Morphology of $Cur(OA)_2$ -NPs by TEM

束形成法等^[15]。但这些方法因各种原因在实际应用中受到较大地限制,如盐析时盐溶液往往与生物活性分子不相容;制备中有毒有机溶剂的使用;胶束形成法很难用于聚合物纳米粒的大规模制备等^[16]。改良自乳化溶剂挥发方法由 Murakami 等^[17]首次报道,此法将 PLGA 溶于丙酮与乙醇的混合溶液,替代了原方法中常用的丙酮、二氯甲烷混合溶液。这种纳米粒子制备过程既避免了二氯甲烷的使用,降低了毒性;又不使用高能设备,因此聚合物纳米粒子的大规模制备成为可能。

本实验在 Murakami 等^[17]方法的基础上,用改良的溶剂挥发方法研究 $\text{Cur}(\text{OA})_2$ 纳米粒的制备工艺,获得最佳的制备方法,采用 TEM 和激光粒度电位分析仪(Zetasizer Nano ZS90)对其形态进行表征,实验表明改良的溶剂挥发法可以制得粒径较小、分布较窄的聚合物纳米粒,含药量和包封率均较高。聚合物纳米粒的特征与处方中所用的有机相与水相的体积比、材料与药物质量比、搅拌速率以及表面活性剂的用量密切相关。从各个角度考虑,改良的溶剂挥发法可操作性更强,影响因素相对较少,为进一步研究 mPEG₅₀₀₀-PLGA 纳米药物输送系统奠定了基础。

参考文献

- [1] Sharma R A, Gescher A J, Steward W P. Curcumin: The story so far [J]. *Eur J Cancer*, 2005, 41(13): 1955-1968.
- [2] 王旗,王夔.姜黄素的代谢研究[J].*中国药理学通报*, 2003, 19(10): 1097-1101.
- [3] 蔡华晶,陈纯,许建华,等.有关姜黄素剂型改造的研究进展[J].*海峡药学*, 2009, 21(4): 17-19.
- [4] Jiang F S, Yu T T, Liu X, *et al.* Biodistribution of curcumin and its derivatives new aspects for curcumin administration [A] // 2011 International Conference on Remote Sensing, Environment and Transportation Engineering (RSETE) [C]. Nanjing: Conference Publications, 2011.
- [5] Moghimi S M, Hunter A C, Murray J C. Nanomedicine: Current status and future prospect [J]. *FASEB J*, 2005, 19(3): 311-330.
- [6] Davis M E, Chen Z G, Shin D M. Nanoparticle therapeutics: An emerging treatment modality for cancer [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2008, 7(9): 771-782.
- [7] 陈小会,蒋福升,马哲龙,等.新型姜黄素纳米粒制备、表征及其体外抗肿瘤活性评价[J].*医学研究杂志*, 2012, 41(6): 42-47.
- [8] 马桂蕾,张琳华,宋存先.紫杉醇聚己内酯/泊洛沙姆 188 载药纳米粒及其抗肿瘤活性[J].*生物医学工程与临床*, 2009, 13(6): 481-485.
- [9] 史建俊,李伟伟.泊洛沙姆在药剂应用中的研究进展[J].*科技信息: 学术研究*, 2008(36): 397.
- [10] 邢磊,金义光,杜丽娜.多功能纳米载体[J].*国外医学: 药学分册*, 2007, 34(3): 226-228.
- [11] 胡泽丽,程国华.抗肿瘤药物靶向制剂的研究进展[J].*今日药学*, 2012(5): 317-320.
- [12] 薛静,王希,黄岳山,等.生物可降解材料聚乳酸-羟基乙酸(PLGA)纳米粒制备工艺的研究[A] // 中国高科技产业化研究会.全国高分子材料工程技术高级学术研讨会论文集[C].杭州:全国高分子材料工程技术高级学术研讨会, 2010.
- [13] Li J, Wang B C, Wang Y Z, *et al.* Preparation and characterization of thermosensitive nanoparticles for targeted drug delivery [J]. *J Macromol Sci*, 2008, 45(10): 833-838.
- [14] 程江雪,王荣,王晓娟,等.正交试验设计优选九节龙皂苷 I 聚乳酸微球的制备工艺[J].*中草药*, 2012, 43(10): 1923-1927.
- [15] Hu Y, Jiang X Q, Ding Y, *et al.* Preparation and drug release behaviors of nimodipine-loaded poly(caprolactone)-poly(ethylene oxide)-polylactide amphiphilic copolymer nanoparticles [J]. *Biomaterials*, 2003, 24(13): 2395-2404.
- [16] 张勇,袁超,焦举,等.改良自乳化溶剂挥发法制备 MePEG-PLGA 纳米粒的研究[J].*分析测试学报*, 2008, 27(9): 960-963.
- [17] 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]. *Powder Technol*, 2000, 107(1/2): 137-143.