

摘要

本文研究了生物降解聚合物纳米粒载药系统。论文对纳米粒的制备、表征，载药纳米粒的体外药物释放行为、体外抑瘤活性和药代动力学等进行了研究。具体内容摘要如下：

1. 载阿霉素壳聚糖纳米粒

(1) 通过对一系列影响壳聚糖纳米粒粒径因素的研究，确定了以离子交联法制备粒径较小壳聚糖纳米粒的最佳条件。在最佳条件下制得的纳米粒粒径最小，体积平均粒径为 183nm，粒径分布较集中，可满足纳米粒载药体系的要求。经 TEM 观察，粒子成球性好。红外光谱研究显示，壳聚糖分子的氨基与 TPP 的磷酸基之间有较强的静电结合作用。

(2) 采用先使阿霉素与 TPP 形成复合物，再将其包封于壳聚糖纳米粒中的方法可使阿霉素包封率大幅度提高。确定了制备高包封率载阿霉素壳聚糖纳米粒的最佳条件。在优化条件下制备的壳聚糖载阿霉素纳米粒，阿霉素包封率为 82.73%，载药量 17.2%，纳米粒体积平均粒径为 193nm，粒子成球性好，粒径分布均匀。纳米粒表面电位值为 +52.1mV，粒度稳定性好，长时间放置粒径无变化。

(3) 载阿霉素壳聚糖纳米粒的体外释放研究表明：阿霉素的体外释放呈三段模式，先是初期的快速释放，接着是一近匀速释放，最后是缓慢和持续的长时间释放。按 Higuchi 方程能较好地描述壳聚糖纳米粒的体外释放曲线，纳米粒具有良好的缓释作用。阿霉素用量、壳聚糖脱乙酰度及分子量对纳米粒阿霉素释放速度有影响。

(4) 用四唑盐 (MTT) 比色法研究了载阿霉素壳聚糖纳米粒的体外抑瘤活性，与阿霉素注射剂相比，载阿霉素壳聚糖纳米粒可提高阿霉素的生物利用度。

2. 载紫杉醇聚乳酸 (PLA) 和聚乙交酯丙交酯 (PLGA) 纳米粒

(1) 研究了制备 PLA 和 PLGA 纳米粒的二元溶剂分散法。研究中用浊点滴定法阐明了乙醇加入丙酮溶液中对纳米粒粒径和产率的影响。研究表明纳米粒产率随丙酮溶液中乙醇量的增加而提高，并当乙醇量接近 PLA、PLGA 浊点时达最大，而纳米粒粒径却随丙酮溶液中乙醇量的增加而减小，并当乙醇量接近 PLA、PLGA 浊点时达最小。

确定了制备 PLA 和 PLGA 聚合物纳米粒的最佳条件，在优化条件下，不同聚合物制备的纳米粒产率均大于 90%，平均粒径在

130~180nm 之间，并有较窄的粒度分布。

PLA、PLGA 聚合物纳米粒达临界絮凝点 (CFPT) 时，电解质 Na_2SO_4 浓度都大于 0.7mol/L，远高于血液中电解质的浓度，说明它们都能在血液电解质浓度下稳定存在。对纳米粒脂肪酶降解的研究表明：随着聚合物分子中羟基乙酸比例的增大，聚合物纳米粒降解速度加快；酶浓度增加，纳米粒降解速度也加快；纳米粒的酶降解是在纳米粒表面和内部同时发生的，纳米粒的降解为均相降解。

(2) 研究确定了制备载紫杉醇聚合物纳米粒的最佳条件。在优化制备条件下，用不同分子量、共聚比的聚合物制备的载紫杉醇纳米粒的紫杉醇包封率均可达 90%，并具有较高载药量。

不同聚合物制备的载紫杉醇纳米粒粒径与空白纳米粒粒径相近，其平均粒径均在 130~180nm 之间，并有较窄的粒度分布。DSC 分析说明紫杉醇在纳米粒中是以分子分散的无定形状态存在。载紫杉醇纳米粒稳定性研究表明，纳米粒能长期稳定分散存在，长期放置后其粒径及其分布均无明显改变。

由于 PLA、PLGA 聚合物分子中羧基的存在，载紫杉醇纳米粒和空白纳米粒的表面电位均为负值。经 DSPE-PEG 修饰后，由于 PEG 长链对纳米粒负电性的掩蔽作用，纳米粒表面电位减小，纳米粒的粒径略有增大的趋势。

(3) 载紫杉醇纳米粒的体外释放研究表明纳米粒具有较好的缓释作用，按 Higuchi 方程更能较好地描述载紫杉醇纳米粒的体外释放曲线。用不同聚合物或不同表面活性剂用量制备的载紫杉醇纳米粒均可连续地以不同的速度释放紫杉醇。

(4) 用四唑盐比色法研究了载紫杉醇纳米粒的体外抑瘤活性，与紫杉醇注射剂相比，载紫杉醇纳米粒可提高紫杉醇的生物利用度，紫杉醇包封于纳米粒后其活性没有降低，而且可以从纳米粒中逐渐释放出来而在更长的时间内作用于癌细胞。另外采用载紫杉醇纳米粒的形式给药，无需使用对人体有不良副作用的聚羟乙基蓖麻油 (Cremophor EL)，更加有益于紫杉醇的临床应用。

(5) 以市售的紫杉醇注射剂为对照品，测定计算了载紫杉醇纳米粒于小鼠体内的药代动力学参数。结果表明：在同样的紫杉醇剂量条件下，载紫杉醇长循环纳米粒具有较高的消除半衰期，其消除半衰期为 6.38h，而载紫杉醇普通纳米粒和紫杉醇注射剂分别为 2.11h 和 0.71h。由于 DSPE-PEG 对纳米粒表面的修饰，载紫杉醇长循环纳米

粒可延长紫杉醇体内循环时间。

关键词：纳米粒，壳聚糖，阿霉素，聚乳酸，聚乙交酯丙交酯，紫杉醇

Abstract

Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery systems have been investigated in this dissertation. The preparation and character of nanoparticles, the in vitro drug release, cytostatic activity and in vivo pharmacokinetics of drug-loaded nanoparticles were studied. The research was mainly concerned with the following aspects.

1. Doxorubicin-loaded chitosan nanoparticles

(1) The chitosan nanoparticles were prepared by the ion cross-linked method. The optimum conditions for preparing smaller nanoparticles were determined. At the optimum conditions, the nanoparticles obtained had the smallest size. The mean diameter of nanoparticles was 183nm with a narrow distribution. From the observation of transmission electron microscopy(TEM), the nanoparticles exhibited a spherical shape. IR spectra of nanoparticles showed that there was linkage between phosphoric group of TPP and ammonium ion of chitosan, which was the reason of the formation of nanoparticles.

(2) The encapsulation efficiency of doxorubicin was enhanced greatly by the formation of doxorubicin-TPP complex firstly. In the preparation of doxorubicin-loaded nanoparticles, doxorubicin was formed doxorubicin-TPP complex firstly, and then loaded into nanoparticles. The optimum conditions to prepare doxorubicin-loaded nanoparticles with high encapsulation efficiency were determined. The encapsulation efficiency of doxorubicin was 82.75%, and drug loading was 17.2%. The nanoparticles were round in shape with mean diameter of 193nm. The zeta potential of nanoparticles was +52.1mv. The nanoparticles were stable and had no change in size during a long period.

(3) The in vitro release of doxorubicin-loaded chitosan nanoparticles demonstrated that the release behavior of doxorubicin exhibited a triphasic pattern characterized by a fast initial release, followed by a constant release and then a slower and continuous release. The nanoparticles had rather good doxorubicin sustained release. The Higuchi equation could well described the in vitro release curve of nanoparticles. The release speed of doxorubicin from nanoparticles was influenced by the

amount of doxorubicin, the deacetylation degree and molecular weight of chitosan.

(4) The cytostatic activity of doxorubicin-loaded chitosan nanoparticles was analyzed by the MTT method. Compared with the control doxorubicin injection, the doxorubicin-loaded chitosan nanoparticles could not only maintain the bioactivity of doxorubicin but also enhance its bioavailability.

2. Paclitaxel-loaded polylactide(PLA) and poly(DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles

(1) A binary solvent dispersion method has been investigated in the preparation of nanoparticles of PLA and PLGA. The effects of ethanol on the nanoparticle size and yield have been examined by using of cloud point titration method. It was found that the yield of nanoparticles increased with increase of ethanol in mixture with acetone and attained a maximum value near the cloud point, whereas the size of nanoparticles decreased with increase of ethanol in the solution with acetone and attained a minimum value near the cloud point.

The optimum conditions for preparing polymeric nanoparticles were determined. The yield of nanoparticles was above 90% with the average size being ranged in 130~180nm for both PLA and PLGA.

At the critical flocculation point(CFPT) of PLA and PLGA nanoparticles, the concentration of electrolyte Na_2SO_4 was above 0.7mol/L, which was much higher than the concentration of electrolyte in blood. It proved that nanoparticles could be stable at the concentration of electrolyte in blood. The results of enzyme degradation of the polymeric nanoparticles showed that the speed of degradation increased with the increase of glycolide part in polymer and the increase of enzyme concentration. The enzyme degradation happened both on the surface of nanoparticles and inner them, which was a process of homogenous degradation.

(2) The optimum conditions for preparing paclitaxel-loaded nanoparticles were also determined. At the optimum conditions, the encapsulation efficiency of paclitaxel-loaded nanoparticles with higher drug loading was up to 90%.

The size of paclitaxel-loaded nanoparticles was similar to that of

drug-free nanoparticles, whose mean size ranged from 130nm to 180nm. The differential scanning calorimetry(DSC) analysis of paclitaxel-loaded nanoparticles showed that paclitaxel was in an amorphous phase of a molecular dispersion in the nanoparticles. The nanoparticles were stable and had no change in size and distribution during a long period.

Since the existence of carboxylic groups, the zeta potential of both drug-loaded nanoparticles and drug-free nanoparticles were negative. After modified by DSPE-PEG, the surface charge of nanoparticles decreased since the long chain of PEG masked the negative charge present in the nanoparticles. In addition, the size of nanoparticles had a trend of increase.

(3) The *in vitro* release of paclitaxel-loaded nanoparticles demonstrated that nanoparticles had rather good sustained release. The Higuchi equation could well described the *in vitro* release curve of nanoparticles. Paclitaxel-loaded nanoparticles prepared with different polymer or different concentration of surfactant could continuously release paclitaxel at different speed.

(4) The cytostatic activity of paclitaxel-loaded nanoparticles was analyzed by the MTT method. Compared with the control paclitaxel injection, the paclitaxel-loaded nanoparticles could not only maintain the bioactivity of paclitaxel but also enhance its bioavailability. In addition, it is helpful to the use of paclitaxel in clinic by its incorporation into nanoparticles, which avoids the use of Cremophor EL with side effect.

(5) Pharmacokinetics was evaluated in mice after *in vivo* injection of paclitaxel, which was formulated in Cremophor EL or in drug-loaded nanoparticles. At the same content of paclitaxel, long-circulating nanoparticles could stay in the blood circulation for a longer time, with $T_{1/2\beta}$ 6.38h, against $T_{1/2\beta}$ 2.11h of conventional nanoparticles and $T_{1/2\beta}$ 0.71h of paclitaxel injection. Since the modification of DSPE-PEG, long-circulating nanoparticles could greatly increase the circulation time of paclitaxel in blood stream.

KEY WORDS: nanoparticles, chitosan, doxorubicin, paclitaxel, PLA, PLGA

原创性声明

本人声明,所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知,除了论文中特别加以标注和致谢的地方外,论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果,也不包含为获得中南大学或其他单位的学位或证书而使用过的材料。与我共同工作的同志对本研究所作的贡献均已在在论文中作了明确的说明。

作者签名: 蒋新宇 日期: 2005年5月20日

关于学位论文使用授权说明

本人了解中南大学有关保留、使用学位论文的规定,即:学校有权保留学位论文,允许学位论文被查阅和借阅;学校可以公布学位论文的全部或部分内容,可以采用复印、缩印或其它手段保存学位论文;学校可根据国家或湖南省有关部门规定送交学位论文。

作者签名: 蒋新宇 导师签名: 田志山 日期: 2005年5月25日

第一章 绪 论

不同药物对疾病有不同的治疗机制和治疗效果，所以药物的选用十分重要。然而即使是好药，如果没有合适的剂型，或不能通过有效途径到达体内需要的患部，也不可能有效地发挥其功能和达到良好的治疗效果。因此必须选择合适的药物载体、药物剂型及给药途径，使机体能有效地吸收药物。以口服药物为例，我们知道，人体服用一种药物后，只有当体内的血药浓度（血液中的药物浓度）达到一定值后，这种药物才能起到治疗的作用。这一特定的药物浓度被称为最小血药浓度。而当血药浓度增加到一定值后，药物就有可能对人体正常的组织和器官产生毒副作用。此时的血药浓度被称为最大血药浓度。最大血药浓度和最小血药浓度之间的浓度范围被称为有效治疗血药浓度（也即为治疗窗）。血药浓度应在治疗窗内维持一段时间，才能起到治疗的作用。理想的药物释放行为是在给药后，体内的血药浓度能够长期稳定的维持在治疗窗内，才能起到有效的治疗作用。但传统的药物制剂采用一般的药物载体，在服药后的开始阶段，血药浓度会随机体对药物的吸收而慢慢增高，最高时可能超过中毒极限浓度，然后随着药剂中药物的释放，血药浓度逐渐下降，降到最低有效浓度之下就失去治疗作用^[1]。因此，为了维持体内必需的血药浓度，只能采用一日数次定时服药或注射，如图 1.1 所示。

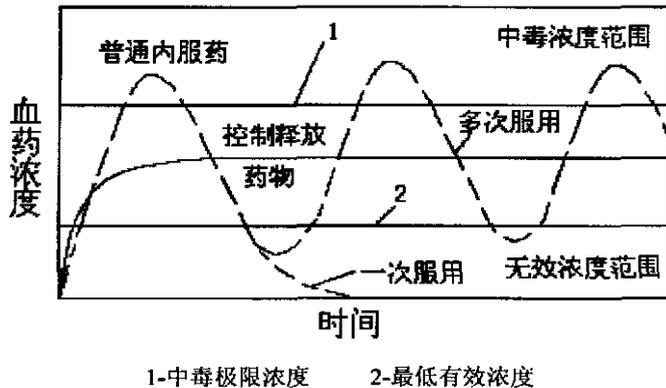


图 1.1 服用传统药物制剂后的血药浓度变化

每天几次定时服药是十分不方便的，对长期服药者更是一种精神负担。另外在传统的给药方式中，药物进入人体后，在作用于病变部分的同时，也不可避免地对其它组织和器官的正常细胞造成侵害，如用于癌症治疗的细胞毒性药物在杀伤癌细胞的同时，它会产生全身严重的毒副作用，使化疗药物的临床应用受到很大的限制。因此研究新型药物释放体系，使药物能充分发挥药效，用药时能保证血药浓度维持恒定，最大程度地减少药物对身体的毒副作用一直是人们研究的热

门课题，其中的一个重要方向就是药物纳米粒载体释放系统^[2,3]。

1.1 药物纳米粒载体释放系统的定义和优点

药物纳米粒载体释放系统是将纳米技术和纳米材料应用于药学领域产生的，它是以纳米粒（Nanoparticles, NP）作为药物载体的一种药物输送形式。国际上一般公认 0.1~100nm 为纳米尺度空间，100~1000nm 为亚微米体系，而在药物传输系统领域一般将纳米粒的尺寸界定在 1~1000nm^[4]，显然，该范围包括了大小在 100nm 以上的亚微米粒子，因此也可称为毫微米。所以，纳米粒是粒度在纳米级的（1~1000nm）固态胶体微相，它是纳米球（Nanospheres, NS）、纳米囊（Nanocapsules, NC）、纳米胶束（Nanomicelle, NM）、纳米脂质体（Nano-liposomes, NL）和纳米乳剂（Nano-emulsion, NE）的统称。在药物纳米粒载体系统中，药物以粉末或溶液的形式或分散包埋于纳米粒中，或吸附结合于纳米粒表面。

药学领域纳米粒的研究早于“纳米技术”概念的出现，1976 年，Birrenback 等^[5]首先提出了纳米粒和纳米囊的概念；1979 年 Couvrenr 等^[6]用纳米粒进行抗癌药物载体的研究，到 20 世纪 90 年代纳米粒载体的研究已成为药学领域的研究热点之一。

20 多年来的大量研究表明，纳米粒作为药物载体具有以下显著优点^[7]。

（1）增加药物的吸收

由于纳米粒高度分散，表面积大，并具有特殊的表面性能（如生物粘附性、电性、亲和性等），有利于增加药物在吸收部位的接触时间和接触面积，加之纳米粒对药物具有明显的保护作用，故可提高药物的吸收和生物利用度^[8,9]。

（2）控制药物的释放

由于载体材料的种类与性能（如分子量和比例）的不同，制备纳米粒的工艺不同以及纳米粒的结构不同等，可以使药物具有不同的释药速度。

（3）改变药物的体内分布特征

纳米粒进入体内后由于网状内皮系统的吞噬作用，可靶向于吞噬细胞丰富的肝脏、脾脏、肺和淋巴组织等，特别小纳米粒还可进入骨髓组织。纳米粒经抗体介导、配体介导或磁场介导等，可主动靶向靶组织，是抗肿瘤药物的良好载体^[10-12]。

（4）提高药物的稳定性

纳米粒载体可以提高药物的稳定性，避免药物在到达病灶前被降解，这一点对于基因药物和具有生物活性的药物特别重要^[13-15]。

（5）改变药物的膜转运机制

纳米粒可以增加药物对生物膜的透过性，如增加药物对血脑屏障和细胞膜的

通透性等，有利于药物对一些特殊部位的治疗^[16]。

(6) 用于抗肿瘤药物的载体

纳米粒作为抗肿瘤药物的治疗，主要是为了通过纳米粒的作用，改变药物在体内的分布和药物动力学特性，提高药物对肿瘤部位的靶向性，从而提高疗效，并降低毒副作用。另一方面，肿瘤部位的细胞通透性处于亢进状态，抗癌药物在血液循环中存在的时间越长，越有利于肿瘤的治疗^[17,18]。

鉴于有以上的优点，药物纳米粒载体释放系统是一种非常有前途的给药体系，已经引起人们广泛的研究兴趣。其中，在纳米粒作为抗肿瘤药物的载体方面已经做了不少的研究工作，所涉及的抗肿瘤药物包括：5-氟尿嘧啶，阿霉素，甲氨喋呤、米托蒽醌，放线菌素 D，阿克拉霉素，长春胺，顺铂和碳铂等^[19]。从各种抗肿瘤药物进行的动物实验结果来看，药物与纳米粒结合后，大多数都可以改变药物的体内过程，使药物在体内的滞留时间延长，提高了对肿瘤的抑制率，与游离药物相比，有的可以提高疗效 50%以上^[20-22]。

1.2 药物纳米粒载体高分子材料

为使药物纳米粒载体系统具有以上所述功能，作为药物载体的材料起着关键作用。与传统药物制剂中起保持药物制剂成形作用的赋形剂（如明胶和乳糖）不同，在药物纳米粒释放体系中的药物载体材料需起到对药物缓释、导向、延长寿命及用药简便的作用，因此对材料的要求更高。药物纳米粒载体系统所用的载体材料有天然的有机材料和无机材料及合成的有机材料和无机材料，高分子材料和非高分子材料，生物降解材料和非生物降解性材料。传统药物载体大多是无机物质，但在药物纳米粒载体系统中，由于高分子材料具有的优良性能，使它在药物载体中显示了越来越重要的地位。

过去曾普遍认为生物惰性材料是用于人体内的最理想材料，但随着生物降解高分子的发展，发现生物降解高分子具有更理想的生物相容性。由于生物降解高分子材料在体内可以降解，降解产物能被机体吸收或代谢，不存在体内累积的危险，因此生物降解材料比生物惰性材料更安全、可靠，从而逐渐取代了生物惰性材料，成为在体内使用的首选材料。

实际上，对于作为药物释放体系载体的高分子材料有一定的要求，它们的性能应该满足以下条件：

(1) 具有生物相容性和生物降解性，即载体高分子材料能在体内降解为小分子化合物而被机体代谢、吸收或排泄^[23]。如果不能降解，则需要在药物释放后通过手术取出^[24]。

(2) 高分子材料的降解产物须无毒和不产生炎症反应^[25]。

(3) 高分子材料的降解必须发生在一个合理的期间^[26], 而药物的释放速度也可通过控制载体材料的降解速度予以控制。

此外, 高分子材料的可加工性、可消毒性、力学性能以及来源保证、价格高低也是影响材料最终能否实际应用的重要因素。

最初, 天然的生物降解高分子明胶, 壳聚糖, 白蛋白等被广泛地用作药物载体。近年来随着合成生物降解高分子材料的迅猛发展, 与天然生物降解高分子相比, 它们降解速度可控、可调, 具有更好的机械性能, 因此有逐渐取代天然的生物降解高分子材料之势。

常用的药物载体材料见表 1.1^[27-29]。

表 1.1 常用的药物载体高分子材料

生物降解性高分子	非生物降解性高分子
明胶	聚乙烯醇
甲壳素或壳聚糖	聚醋酸乙烯酯
白蛋白	聚苯乙烯
胶原	聚硅氧烷橡胶
脂肪族聚酯	聚丙烯酸酯
聚氧基丙烯酸烷基酯	聚乙烯
聚酸酐	聚甲基丙烯酸酯
聚酰胺	聚氨基甲酸酯
其它聚酯类	聚四氟乙烯

除了上述这些高分子材料外, 还有许多正处于实验研究阶段的材料也被用于载药纳米粒的研究, 相信随着研究工作的深入和发展, 会有越来越多的高分子材料可供选择。

1.2.1 壳聚糖载体材料

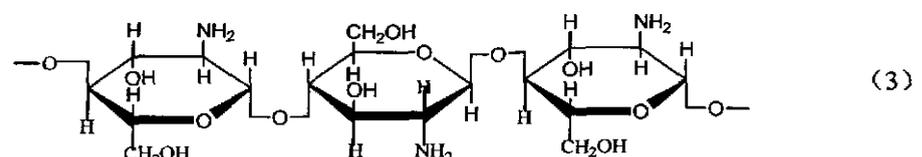
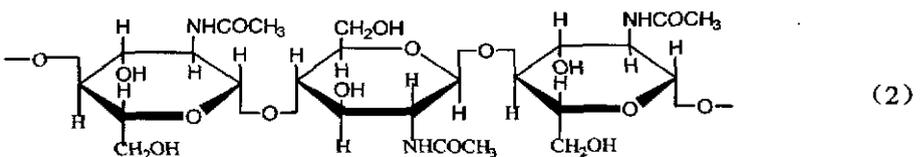
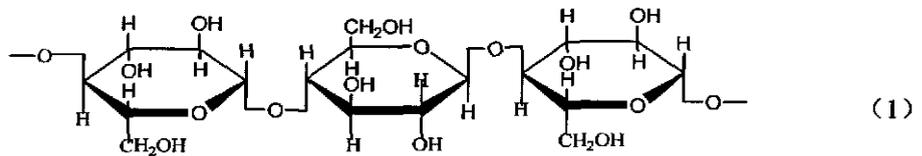
早在 1811 年, 法国人 H.braconnot 从菌类中提取了一种类似纤维素的物质。由于它大量存在于低等动物, 特别是节肢动物的甲壳中, 故称甲壳素 (Chitin), 又名壳蛋白、几丁质。甲壳素脱除乙酰基后, 称为可溶性甲壳质 (Chitosan), 又名可溶性甲壳素、脱乙酰几丁质或壳聚糖^[30]。

1.2.1.1 壳聚糖的结构和性质

壳聚糖是一种天然生物高分子聚合物, 其化学名称为聚-(1, 4)-2-氨基-2-脱氧- β -D-葡萄糖^[31,32]。在化学结构上与纤维素十分相似, 差别仅在于纤维素分子链中 C-2 上的羟基被胺基所取代, 如图 1.2 所示。由图可见, 由于壳聚糖中游离氨基的存在, 其反应活性要比原来的甲壳素强得多, 这正是壳聚糖受到广泛应用的主要原因。

作为天然多糖中唯一的碱性多糖，在酸性条件下，壳聚糖是一种线性高分子电解质，其溶液具有一定的粘度。壳聚糖的分子量越大，溶液的浓度越高，粘度就越大。壳聚糖因含有游离氨基，其氮原子上还有一对未结合的电子，使氨基呈弱碱性，能结合一个氢离子，从而使壳聚糖成为带正电荷的电解质。壳聚糖的氨基属于一级氨基，氨基上的氢较活泼，在中性介质中壳聚糖能与芳香醛或脂肪醛形成西佛碱 (Schiff's base)。因此，壳聚糖可用具有双官能团的醛或酸酐等交联，其交联产物不易溶解，溶胀也小，性质较稳定^[33]。

另外，壳聚糖还具有许多独特的生物功能。有抗菌消炎，促进伤口愈合，抗酸，抗溃疡，降血脂和降胆固醇等多种作用，同时还具有很强的凝血作用，经硫酸化后，能转变成肝素类似物而起到抗凝血作用^[34,35]。随脱乙酰基程度的提高，壳聚糖血液相容性也有所改善，当脱乙酰度达 90%时，表现出较好的血液相容性。



(1) 纤维素; (2) 甲壳素; (3) 壳聚糖

图 1.2 分子结构图

1.2.1.2 壳聚糖作为药物载体的优点

壳聚糖作为一种天然高分子材料已用于药物载体的研究，这是因其具有以下优点：

(1) 壳聚糖是取之不尽的天然高分子聚合物。其前体甲壳素在自然界的资源非常丰富，每年地球上的自然生成量可达 10^{14} 吨，是地球上仅次于纤维素的最丰富的天然聚合物。

(2) 壳聚糖具有良好的生物降解性和生物相容性。它可以被壳聚糖酶、溶菌酶、蜗牛酶等水解,水解的最终产物氨基葡萄糖是生物体内大量存在的一种成分,因此无毒。由于壳聚糖在体内可以被降解,不会有蓄积作用,降解产物也不与体液反应,对组织无排异性,因而具有良好的生物相容性。

(3) 壳聚糖在酸性环境下的正电性对肿瘤的治疗很有意义,因为肿瘤细胞具有比正常细胞表面更多的负电荷,因此载药壳聚糖在酸性环境中对肿瘤细胞表面具有选择性吸附和电中和作用^[36]。

(4) 壳聚糖还具有直接抑制肿瘤细胞的作用,通过活化免疫系统显示抗癌活性,与现有的抗癌药物合用可增强后者的抗癌效果。

1.2.1.3 壳聚糖作为药物载体的应用

由于壳聚糖作为药物载体的诸多优越性,其在药物载体上的应用已引起各国学者的重视,壳聚糖纳米粒在以下方面的应用正日益展开。

(1) 药物缓释和控释作用

药物包封于壳聚糖纳米粒后,其释放主要决定于壳聚糖的生物降解和溶蚀,因此药物的释放明显延长。Janes 等^[37]制备了多柔比星壳聚糖纳米粒,体外药物释放实验表明,在前 2h 内药物释放达 17%,随后 2d 药物释放仅增加 4.5%。Calvo 等^[38]用聚环氧乙烷-聚环氧丙烷共聚物等交联的壳聚糖纳米粒,用于破伤风类毒素的口服给药载体,抗原释放缓慢,18d 后有 20%的破伤风类毒素被释放。梁桂媛等^[39]采用乳化交联法及先制备白蛋白微球再在其表面固定壳聚糖的方法制备了两种 5-氟尿嘧啶壳聚糖微球,体内释放实验表明,在 pH7.4 磷酸盐缓冲溶液中,微球具有显著的缓释作用。

(2) 增加药物的吸收作用

壳聚糖纳米粒已被证实能有效地增强药物通过鼻腔和肠道粘膜上皮的吸收。Fernandez 等^[40]对糖尿病兔进行鼻腔给药,结果表明在同样的给药剂量下,胰岛素壳聚糖纳米粒组比对照组的降血糖作用更加强烈和持久。Mooren 等^[41]研究了泼尼松龙壳聚糖纳米粒通过小肠上皮粘膜的情况,结果表明,壳聚糖纳米粒能提高药物通过上皮细胞的通过率。这是因为壳聚糖本身是一种安全有效的吸收促进剂,且能够粘附于粘膜上皮,增加药物与上皮组织的接触时间,减少药物清除,从而提高药物的生物利用度。

(3) 增加药物靶向性和降低药物的毒副作用

研究表明,肿瘤细胞具有比正常细胞表面更多的负电荷,因此壳聚糖所带的正电荷对肿瘤细胞表面具有选择性吸附和电中和作用。此外,壳聚糖还具有直接抑制肿瘤细胞的作用,并通过活化免疫系统促进人体抗肿瘤作用,从而与抗肿瘤药发挥协同作用。对多柔比星壳聚糖纳米粒的研究表明,肿瘤细胞对纳米粒具有

选择性吞噬作用,从而增加疗效,降低药物外周毒副作用^[37]。Mitra 等^[42]对右旋糖酐-多柔比星壳聚糖纳米粒用于肿瘤靶向释放研究,结果右旋糖酐-多柔比星壳聚糖纳米粒不但减少外周毒副作用,还能大大提高对实体瘤的治疗效果。

(4) 提高药物稳定性

随着重组 DNA 技术的发展,基因工程蛋白质和多肽类药物的大规模生产已成为现实,与传统的化学合成药物相比,肽类药物具有毒副作用小的特点,但此类药物在胃肠道中极易被蛋白水解酶水解,仅限于注射给药,再者肽类药物在循环系统中生物半衰期较短,需多次注射,另外多数肽类药物通过生物屏障的能力较差。而用壳聚糖纳米粒作为这类药物的载体后,由于药物外面包覆壳聚糖而不容易被破坏,因此可用于鼻腔、眼部及胃肠道给药,显著提高药物的稳定性^[38,43]。

(5) 基因运载工具

利用壳聚糖可浓缩 DNA,且形成小的分散颗粒(最大粒径为 100nm)的特点,将壳聚糖 DNA 纳米粒复合物用于基因运载,经验证纳米粒复合物能有效转染 HeLa 细胞^[44]。Roy 等^[45]的研究结果表明,壳聚糖 DNA 纳米粒能够转染 HEK293, IB3 及 THE 细胞。Mao 等^[46]将氯喹包封于壳聚糖 DNA 纳米粒中,进一步提高了 DNA 的转染效率。

因此,作为一种具有广阔前景的新型药物载体,壳聚糖纳米粒可携带多种药物,可用于器官靶向,胞内靶向等药物传递系统或口服,眼用和透皮制剂中。另外,它还可用作固定化酶载体,还可与合成高分子制成敏感性水凝胶膜而用作药物释放载体^[47]。

但在国内,对于壳聚糖载体材料的研究的重点还是在壳聚糖载药微球的研究,而且国内外仍非常缺乏对影响纳米粒粒径的因素的研究和报道^[48]。

1.2.2 聚乳酸、聚乙交酯-丙交酯共聚物载体材料

1.2.2.1 聚乳酸、聚乙交酯-丙交酯共聚物的结构和性质

聚乳酸 (polylactic acid, PLA) 及乳酸/羧基乙酸共聚物聚乙交酯-丙交酯 (polylactic-co-glycolic acid, PLGA) 是典型的合成可降解聚合物,也是结构最简单的线性聚羟基脂肪酸酯。它们的分子结构通式为 $\{OCH(R)CO\}_n$ 。式中 R 为 $-CH_3$ 时是聚乳酸, R 为 $-CH_3$ 和 H 时是聚乙交酯-丙交酯^[1]。

PLA 由丙交酯开环聚合制备,降解后生成乳酸,常用的聚合方法是本体熔融聚合,即用有机金属化合物如辛酸亚锡、氯化锌等为催化剂,在 $140^{\circ}\text{C}\sim 170^{\circ}\text{C}$ 下聚合。PLA 分子中有一个不对称的碳原子,因此有两种光学异构体,可形成四种不同构型的聚合物:两种立体规整性构型,右旋聚乳酸和左旋聚乳酸(D 构型和 L 构型),可表示为 D-PLA 和 L-PLA;一种外消旋构型的聚乳酸表示为 DL-PLA;第四种是内消旋构型,在实际中很少使用。其中 DL-PLA 分子中的不对称碳链为非规整结构,是无定形聚合物, T_g 约 65°C ,降解和吸收速度较快,

一般为 3~6 个月。这种聚乳酸有利于药物均匀分布在基质中，因此非常适用于作为药物载体材料。

以 PLA 为主结构与其他聚合物共聚可大大改善聚合物材料的物理性能，最成功的共聚物是乳酸与羟基乙酸形成的无规共聚物 PLGA。PLGA 的性能变化与组成不是简单的线性关系，因为两种单体无规共聚后破坏了原均聚物的分子规整性，结晶度大大降低乃至完全失去结晶性。组成各为 50% 的共聚物分子，达到最大限度的无规结构，完全变成无定形态，因此各种性能变化出现转折，如降解速度最快，比两个均聚物降解速度快得多^[7]。

脂肪族聚酯高分子的降解机制主要是水解反应，故聚合物的降解速度与材料的吸水率或水膨胀程度密切相关。而高分子材料的吸水程度又与材料的亲疏水性和材料的形态关，因此不同的聚酯降解速度不同，同种聚酯亦会由于构型的不同而具有不同的降解速度。例如 L-PLA 具有结晶性，降解速度要慢于无定形的 DL-PLA；相反，结晶性的聚羟基乙酸（PGA）却具有相当快的降解速度。因此通过改变共聚物的组成，控制其结晶性、溶解性可有效地调节材料的降解速度，得到性能优异的 PLGA 共聚物^[49-51]。

1.2.2.2 PLA 和 PLGA 作为药物载体的优点：

PLA 和 PLGA 作为药物载体主要有以下优点：

(1) PLA 和 PLGA 在体内的代谢是通过聚酯水解，首先被降解为乳酸和羟基乙酸，然后通过体内三羧酸循环变为二氧化碳和水，其吸收和代谢机理已经明确并具有可靠的生物安全性，因而 PLA 和 PLGA 已被美国 FDA 批准用于临床。

(2) PLA 和 PLGA 具有可调节的物理和力学性能，即通过两种单体的无规共聚、嵌段共聚以及通过选择不同的立体异构和不同配比，可得到一系列性能随结构变化的材料。

1.2.2.3 PLA 和 PLGA 作为药物载体的应用

由于 PLA 和 PLGA 具有良好的生物相容性，生物可降解性以及性能的可调控性，它们作为药物载体的报道已有不少。

(1) 解决易分解药物的口服给药问题

肽类、蛋白类、酶类、疫苗等药物，易被胃肠道酸碱物质和各种消化酶分解，临床应用只能采取肠道外给药途径。制成 PLA 和 PLGA 纳米粒可保护被包裹药物不被破坏，加之适当的包衣，更可有效控制纳米粒的在体内的降解^[52-54]。

(2) 作为蛋白质类药物鼻腔给药的载体

将蛋白质抗体模型药物破伤风毒素包裹于含聚乙二醇的 PLA 纳米粒中^[55]，放射标记后大鼠鼻腔给药，血液中的放射活性可在至少 48h 内维持高放射性。

(3) 延长药物体内半衰期

Allemann^[56]制备 ^{14}C -沙伏噻平 PLA 纳米球,大鼠肌内注射后 5.4 天,体内放射性物质的量可达最初浓度的 50%,血浆放射活性保持稳态水平可达 7 天以上。静脉注射后,药物持续缓慢释放。而注射游离药物溶液后不足 1 天,即有 50% 药量被消除。Allemann 把抗肿瘤药 InPcF_{16} 包裹到 PLA 纳米粒子和聚乙二醇 (PEG) 修饰的 PLA 纳米粒子中,给小鼠静脉注射后,发现前者的血药浓度较低。

(4) 改变药物体内转运,加速药物体内降解

Fawaz^[57]给兔分别静脉灌注相当于 $10\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的吲哚美辛游离水溶液或 PLA 纳米囊,肝脏巨噬细胞对纳米囊的捕获增加,促进了吲哚美辛的肠肝循环,导致胆汁药物浓度增加及药物的胆汁排泄增加,促进了药物的总体消除。

(5) 改变药物体内分布

Nadaka^[58]以 PLA 为 A 块,聚氧化乙二醇为 B 块组成了 ABA3 块式复合聚合物纳米粒,将黄体酮作为模型药物研究其体内药动力学及体内分布。研究表明,纳米粒具有体内长循环特性,肝脏、肾脏对纳米粒的摄取减少,肝脏、肾脏中药物分布降低。

(6) 提高药物生物利用度

Fawaz^[59]发现,家兔直肠给予单剂量 $10\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的吲哚美辛纳米囊混悬液与水溶液相比,药物吸收更完全,生物利用度更高。Leroux^[60]的研究与此相似,将 HIV-1 蛋白酶抑制剂 CGP-57813 制成 PLA 和 PLGA 纳米粒小鼠静脉注射,与对照溶液相比,血药浓度-时间曲线下的面积增大 2 倍。Kim 等^[61]制备了载有硝苯地平的 PLGA (50:50) 共聚物纳米粒子,粒子直径在 120~210 nm 范围内,与硝苯地平的对照溶液相比,纳米粒剂型药物的高峰浓度下降,相对生物利用度明显增加。潘妍等^[62]制备了载有胰岛素的 PLGA 纳米粒,粒子平均粒径 149.6nm,胰岛素包封率 42.8%,药物相对生物利用度较高。类似的研究还有许多,共同的结果都表明用 PAL 和 PLGA 为载体材料可制备粒径适宜的纳米粒,而且载药纳米粒的生物利用度均有所提高。但在 PLA 和 PLGA 纳米粒的制备产率,有关如何提高药物包封率,PLA 和 PLGA 载药纳米粒药物释放性能方面的研究还很少甚至尚未见报道。

(7) 降低药物不良反应

非甾体类抗炎药胃肠道刺激明显,将双氯芬酸钠和吲哚美辛制成 PLA 纳米囊^[63],大鼠静脉给药后,药物胆汁排泄增加,但未发现药物肠肝循环对粘膜的损伤。胃部给药后,可见对胃部粘膜的明显保护作用。将家兔给予吲哚美辛溶液或纳米囊混悬液进行对比,纳米囊对直肠刺激有良好的保护作用。伯氨喹毒性大,安全性差,将伯氨喹 PLA 纳米粒分别给健康小鼠和感染小鼠静脉注射,两组小

鼠均耐受良好^[64]。

1.3 药物纳米粒载体系统的类型及制备方法

药物纳米粒载体系统由药物和纳米粒共同组成，纳米粒是药物的载体，药物通过溶解、包裹作用位于纳米粒子内部，或者通过吸附、附着或键合作用位于纳米粒子表面。因此，药物纳米粒载体系统可分为贮存式、基体式和附着式三种形式^[65]（见图 1.3）。



图 1.3 药物纳米粒载体系统的三种形式

贮存式结构的药物集中在纳米粒内部，其外部是纳米粒载体材料膜；基体式结构的药物均匀地分散于纳米粒内，其药物可以是单分散，也可以一定的聚集态结构分散于纳米粒基体中；附着式结构药物则是吸附或键合于纳米粒表面。

常用的两种将药物负载到纳米粒中的方法是：（1）在制备纳米粒的同时，将药物负载到纳米粒上；（2）将纳米粒制备好以后，再将它们浸泡在药物的溶液中，使药物吸附在纳米粒的表面。相对于吸附的方法，包裹方法的载药能力更好些。具体来说，药物和聚合物之间的相互作用，纳米粒的制备过程，以及药物和聚合物材料的相容性等因素决定了纳米粒的载药能力。

1.3.1 纳米粒的类型

作为药物载体的纳米粒因所用材料、制备方法的不同，可有多种类型：

（1）纳米脂质体

粒径控制在 100nm 左右并用亲水性材料如聚乙二醇进行表面修饰的纳米脂质体在静脉注射后兼具“长循环（long circulation）”和“隐形（stealthy）”或“立体稳定（stereo-stable）”的特点，对减少肝脏巨噬细胞对药物的吞噬、提高药物靶向性、阻碍血液蛋白质成分与磷脂等的结合、延长体内循环时间等具有重要作用。纳米脂质体也作为改善生物大分子药物的口服吸收以及其他给药途径吸收的载体，如透皮纳米柔性脂质体和胰岛素纳米脂质体等^[65-67]。

（2）固体脂质纳米粒

与磷脂为主要成分的脂质体双分子层结构不同，固体脂质纳米粒（solid lipid nanoparticle, SLN）是由多种类脂材料如脂肪酸、脂肪醇及磷脂等形成的固体颗粒，其性质稳定、制备较简便，具有一定的缓释作用，主要适合于难溶性药物的包裹，被用作静脉注射或局部给药达到靶向定位和控释作用的载体^[68-70]。

鼠均耐受良好^[64]。

1.3 药物纳米粒载体系统的类型及制备方法

药物纳米粒载体系统由药物和纳米粒共同组成，纳米粒是药物的载体，药物通过溶解、包裹作用位于纳米粒子内部，或者通过吸附、附着或键合作用位于纳米粒子表面。因此，药物纳米粒载体系统可分为贮存式、基体式和附着式三种形式^[65]（见图 1.3）。



图 1.3 药物纳米粒载体系统的三种形式

贮存式结构的药物集中在纳米粒内部，其外部是纳米粒载体材料膜；基体式结构的药物均匀地分散于纳米粒内，其药物可以是单分散，也可以一定的聚集态结构分散于纳米粒基体中；附着式结构药物则是吸附或键合于纳米粒表面。

常用的两种将药物负载到纳米粒中的方法是：（1）在制备纳米粒的同时，将药物负载到纳米粒上；（2）将纳米粒制备好以后，再将它们浸泡在药物的溶液中，使药物吸附在纳米粒的表面。相对于吸附的方法，包裹方法的载药能力更好些。具体来说，药物和聚合物之间的相互作用，纳米粒的制备过程，以及药物和聚合物材料的相容性等因素决定了纳米粒的载药能力。

1.3.1 纳米粒的类型

作为药物载体的纳米粒因所用材料、制备方法的不同，可有多种类型：

（1）纳米脂质体

粒径控制在 100nm 左右并用亲水性材料如聚乙二醇进行表面修饰的纳米脂质体在静脉注射后兼具“长循环（long circulation）”和“隐形（stealthy）”或“立体稳定（stereo-stable）”的特点，对减少肝脏巨噬细胞对药物的吞噬、提高药物靶向性、阻碍血液蛋白质成分与磷脂等的结合、延长体内循环时间等具有重要作用。纳米脂质体也作为改善生物大分子药物的口服吸收以及其他给药途径吸收的载体，如透皮纳米柔性脂质体和胰岛素纳米脂质体等^[65-67]。

（2）固体脂质纳米粒

与磷脂为主要成分的脂质体双分子层结构不同，固体脂质纳米粒（solid lipid nanoparticle, SLN）是由多种类脂材料如脂肪酸、脂肪醇及磷脂等形成的固体颗粒，其性质稳定、制备较简便，具有一定的缓释作用，主要适合于难溶性药物的包裹，被用作静脉注射或局部给药达到靶向定位和控释作用的载体^[68-70]。包裹，被用作静脉注射或局部给药达到靶向定位和控释作用的载体^[68-70]。

(3) 纳米囊和纳米球

主要由聚乳酸、聚丙交酯乙交酯、壳聚糖、明胶等生物降解高分子材料制备。可用于包裹亲水性药物也可包裹疏水性药物^[71,72]。根据材料的性能,适合于不同给药途径,如静脉注射的靶向作用、肌肉或皮下注射的缓控释作用,口服给药的纳米囊和纳米球也可用非降解性材料,如乙基纤维素、丙烯酸树脂等。

(4) 聚合物胶束

这是近几年正在发展的一类新型的纳米粒载体。它是有目标地合成水溶性嵌段共聚物或接枝共聚物,使之同时具有亲水性基团和疏水性基团,在水中溶解后自发形成高分子胶束 (polymeric micelles),完成对药物的增溶和包裹。因为其具有亲水性外壳及疏水性内核,适合于携带不同性质的药物,亲水性的外壳还具备“隐形”的特点^[73]。目前研究较多的是聚乳酸与聚乙二醇的嵌段共聚物,而壳聚糖及其衍生物因其优良的生物降解特性正在受到密切关注^[74]。

1.3.2 纳米粒的制备方法

纳米粒的制备根据所用载体材料的不同、药物的不同及载药形式的不同等可采用不同的方法。主要可以归纳为两大类:一类是由单体通过聚合反应直接制备的化学方法,如乳液聚合;另一类由高分子材料通过分散的方法获得,如溶解(或熔融)分散法、机械粉碎法等物理方法。其中一些方法已在非纳米级微粒载体的制备中得到广泛应用,

1.3.2.1 单体聚合法制备聚合物纳米粒

通常,可以通过三种聚合方法制备聚合物微粒,即:乳液聚合法、分散聚合法和悬浮聚合法。因为乳液聚合法所得的微粒粒径比较小,可小于 1000nm,而其它两种制备方法所得的粒子的粒径比较大,乳液聚合法是使用的最多的制备聚合物纳米粒的一种方法。

乳液聚合法是一种经典的、常用的高分子合成方法,系将 2 种互不相溶的溶剂在表面活性剂的作用下形成微乳液,在微乳滴中单体经成核、聚结、团聚后得到纳米粒子,它是制备纳米粒的重要方法。乳液聚合法既适用于连续的水相,也适用于连续的有机相。在连续的水相中乳液聚合的典型制备方法如下:首先将单体溶于水相以进入乳化剂胶束,形成由乳化剂分子稳定的单体液滴,然后通过引发剂或高能辐射在水相中引发聚合。聚甲基丙烯酸甲酯、聚烷基异氰酸酯、聚丙烯酸类共聚物纳米粒均可通过此方法制备。以有机相作为连续相的乳液聚合法制备纳米粒也已有报道,但由于需用大量的有机溶剂和有毒的表面活性剂,因而应用受到限制。乳液聚合法中影响粒子大小的因素包括 pH、乳化剂和稳定剂种类及用量、单体浓度等^[75]。

1.3.2.2 分散法制备纳米粒

因为聚合反应不可能百分之百的反应完全,因而单体聚合法制得纳米粒不可

避免带有未反应的单体或其它聚合反应物。此外聚合反应中所使用的引发剂,表面活性剂等也会混杂在所得的纳米粒中。而这些物质的存在必然会对生物体带来一定危害,所以必须通过复杂的纯化过程将它们除去。因此,近年来如何通过分散法将天然的聚合物或合成的聚合物制备纳米粒,引起了人们的极大兴趣。因为,采用这种方法制备的聚合物纳米粒可以有效的避免单体聚合法制备纳米粒的缺点。分散法制备纳米粒主要有以下几种方法:

(1) 凝聚分散法

一些大分子如明胶、阿拉伯胶、壳聚糖、海藻酸钠或两亲性的聚合物等采用单凝聚法或复凝聚法制备纳米粒。例如,将含有壳聚糖-PEG 嵌段共聚物的水溶液与聚阴离子化合物的水溶液混合,由于相反电荷的结合凝聚成纳米粒^[76]。两亲性的壳聚糖-PEG 嵌段共聚物和聚乳酸-聚乙二醇嵌段共聚物,即可以在水中直接形成纳米胶束。

(2) 高压均质法

第一代纳米均质技术是利用球磨设备对药物-表面活性剂溶液进行充分研磨,通常需要数小时甚至数天。第二代技术系利用高压均质设备,在高压下($1.5 \times 10^5 \text{kPa}$ 以上)将微粉化药物-表面活性剂溶液挤出通过直径约 $25 \mu\text{m}$ 的孔隙,由于被挤流体在孔隙中的动压瞬间极大地增加,而在挤出孔隙时则其静压迅速减小,在室温条件下发生水的剧烈沸腾,产生气穴现象和爆裂,这种爆裂力足以使药物微粉进一步崩碎,经过 10~20 次循环,可得到粒子大小在 100~1000nm, 固体含量 10%~20%的纳米混悬剂^[77]。

(3) 熔融分散法

主要用于固体脂质纳米粒的制备。将药物溶解在熔融类脂材料中,在表面活性剂的水溶液中分散和乳化。将得到的粗乳高压匀化成 O/W 型乳剂,冷却至室温,脂质固化即得。也可将药物溶解在熔融脂质中,待脂质-药物混合物固化后,置于液氮或干冰中研磨。在低于脂质熔点 $5 \sim 10^\circ\text{C}$ 的温度下将得到的粉末分散于表面活性剂水溶液中,高压匀化后冷冻干燥或喷雾干燥即得^[78]。

(4) 溶剂蒸发法

该法采用聚合物和药物的有机溶液与水在乳化剂存在下形成稳定乳液,经高压匀乳或超声后,在连续搅拌及一定温度和压力条件下蒸去溶剂即得纳米粒混悬液。

此法制备纳米粒的报道最早始于 60 年代。制造过程实际上是分两步进行的,先形成液滴,再除去溶剂。常用的方法是:根据包囊高分子材料的性质制成油包水(W/O)或水包油(O/W)的乳液体系,再通过稳定剂在液滴表面形成一层保护层,以减少乳液液滴间的相互凝集。常用的乳化稳定剂有聚乙烯醇、明胶、司

班、吐温等。由于乳液液滴的大小直接决定最终纳米粒的尺寸，因此乳化剂的选择和用量相当重要。有时可选用两种以上的乳化剂，使之产生协同作用而提高稳定效果。

溶剂的除去有抽提及蒸发两种方式，两者都是溶剂从液滴向周围介质扩散的过程，所以抽提速度和蒸发速度对最终形成的纳米粒的表面形态有一定影响，而纳米粒的大小及表面形态对药物释放性能将有很大的影响。用抽提的方法，因溶剂扩散速度快，纳米粒表面会呈现多孔性；用蒸发的方法，溶剂扩散速度慢，可形成相当光滑的表面。影响粒子大小的因素有乳化剂、相比、搅拌速度、蒸发速度等^[76,79]。搅拌速度对乳液液滴的形成有重要影响，通常是在均质器内高速搅拌或在强的超声波下形成微乳液，而后再除去溶剂形成粒径为纳米级的纳米粒。

一般来说，水包油乳液体系对水溶性药物的包裹不甚理想，油包水乳液体系对亲脂性药物也不理想。近来发展了一种双乳液技术，是通过形成水包油包水（W/O/W）或油包水包油（O/W/O）乳液体系提高药物的包封率。通过选择合适的制备参数，溶剂蒸发法可以在很宽的粒径范围内制备纳米粒，现已成为应用最普遍的纳米粒制备技术。

（6）乳化/溶剂扩散法

该法是溶剂蒸发法的改进方法。以丙酮或甲醇为“水相”，以水不溶有机溶剂如二氯甲烷或氯仿为“油相”，在乳化剂存在下，由于大量“水相”的迅速扩散将“油相”分散成微细液滴，在蒸发溶剂后形成固体纳米粒。该方法不需要均乳或超声，故称为“低能乳化”^[76]。

这是一种制备纳米粒的新方法。典型例子有：将聚乳酸（PLA）溶于丙酮，将药物溶于油相，然后将所形成的丙酮-油体系注入含有表面活性的水中。由于丙酮迅速穿透界面，大大降低了界面张力，自发形成纳米液滴，使在水中不能溶解的聚乳酸逐渐向界面迁移、沉积，最终形成纳米粒。这种方法有重复性好、药物包裹量大、粒径均匀的优点。

（7）超临界技术

将聚合物或药物溶解在超临界液体中，当该液体通过微小孔径的喷嘴减压雾化时，随着超临界液体的迅速汽化，即析出固体纳米粒^[80]。该法曾用于相对分子量在 10,000 以下的聚乳酸纳米粒的制备，但不适合于更大的聚乳酸。因为大多数药物和载体材料在超临界液体中不溶解，有时可以应用所谓“超临界反溶剂（anti-solvent）”技术，即将聚合物或药物溶解在可与超临界液体相混溶的“反溶剂”中，同时雾化，在高压下超临界流体可以完全吸收“反溶剂”，而析出纳米粒子。超临界技术比较复杂，工艺控制难度大。

1.4 药物纳米粒载体系统的释药机制

制备载药纳米粒的目的之一就是希望药物能以可预测的方式从纳米粒中释放出来。尽管对载药纳米粒的物理化学性能及其药物释放行为已经进行了深入的研究,但是载药纳米粒药物释放的机制还是不是很明确,目前比较容易被接受的有扩散控制模型、化学反应控制模型、溶胀控制模型等三种模型^[81-83]。

1.4.1 扩散控制模型

扩散控制模型主要用于非生物降解聚合物纳米粒包埋药物的情况,在这种体系中,药物通过聚合物的扩散速率是速率控制步骤。将这一体系简化后,可以得到这种体系的药物释放机理的模型。药物释放过程一般都遵循菲克扩散定律(Fick's law of diffusion),其表达式如下:

$$J = -D \frac{dc}{dx} \quad (1)$$

其中, J 为药物通用量, D 为扩散系数, dc/dx 为药物浓度梯度。药物释放的推动力是制剂与其周围环境的药物浓度差,药物在这种推动力作用下从含有高浓度药物的聚合物中扩散到周围环境,从而达到释药的目的,通过调节扩散系数 D 可实现药物控制释放。

如果扩散系数和聚合物的壁厚是定值,而且药物的浓度梯度是线性变化的,方程(1)可以简化为以下形式:

$$J = D \frac{\Delta C_m}{L} \quad (2)$$

L 是纳米粒聚合物壁的厚度。因此药物是线性释放的,即药物释放是一个零级释放的过程。

但是由于药物在纳米微粒中的分散情况和扩散途径不一样,药物的释放机制又有所不同,也有许多的简化模型:

- (1) 药物溶解在聚合物基质中并以溶液扩散机制释出。
- (2) 药物分散在聚合物基质中并通过溶液扩散机制释出。
- (3) 药物溶解在聚合物基质中通过制剂中充水的微孔道扩散释出。
- (4) 药物分散在聚合物基质中但通过制剂中充水的微孔道扩散释出。

对于不同的情况,可应用不同的扩散机理加以解释。通过改变高分子材料的种类、药物浓度、制剂孔隙率,孔道形状等可得到不同的释药速率,起到控制释放的作用。

1.4.2 化学反应控制模型

化学反应控制模型主要应用于可降解载药高分子纳米粒。在这种体系中,药物也是均匀地分散在聚合物纳米粒中,但它和扩散控制模型不一样的地方是:即认为可降解的纳米粒在药物释放的过程中,它的体积会变小,而扩散控制模型的

则不会改变。在化学反应控制模型中生物降解型纳米粒在酶的攻击下发生表面侵蚀或团块崩解，药物逐渐或迅速释放出来。如脂质体在溶酶体中被酯酶降解，从而释放出药物。图 1.4 是可降解高分子载药纳米粒药物释放的示意图。

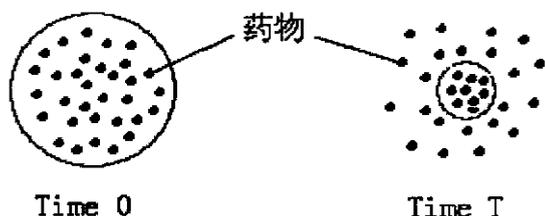


图 1.4 生物降解纳米粒药物释放模型

Hopfenberg 等^[84]建立了一个理想的表面腐蚀的药物释放模型。在这种模型中有一个腐蚀常数 k 。药物的释放速率和腐蚀常数及纳米粒的表面积有关。如果纳米粒的表面积的腐蚀是时间的线性函数，那么我们就可以得到零级释放的载药纳米粒。

具体的来说，对于可降解的载药纳米粒，药物的释放速率和以下几个因素有关：

- (1) 药物和聚合物之间的相互作用力；
- (2) 药物从聚合物中扩散的能力和速率；
- (3) 纳米粒载体材料的降解速率。

因此，可降解纳米粒药物释放过程实际上主要是由扩散和降解这两种过程共同控制的。如果药物的扩散速率远大于聚合物基体的降解速率，药物的释放是遵循扩散的机制的。否则的话，是遵循降解的机制的。

从化学的观点来看，这种载药体系又可分为三种不同的类型：

(1) 水溶性高分子通过可降解的交联键形成水不溶的高分子基质，包埋药物后遇水或酶，交联键断裂使之重新可溶，从而释药^[85]。这种类型的聚合物体系往往会溶胀，然后迅速释放出水溶性的药物，但水不溶性的药物或大分子药物的分子将可能与高分子体系的大分子相互缠结，难于扩散释出，其释药速率将大大降低。

(2) 水不溶性高分子基质包埋药物后，遇水时因侧基的水解、离子化等原因而变成水溶性高分子，溶解后释放出所包埋的药物。这种类型的释药体系中的高分子降解溶蚀只发生在侧基上，其分子量变化不大。

(3) 水不溶性高分子基质包埋药物后遇水时高分子主链断裂降解成水可溶性的小分子物质从而释药。对这一体系的基本要求是其降解产物应是无毒的，如聚丙烯交酯即属于这一类。

1.4.3 溶胀控制模型

在这一体系中，药物是溶解或者分散在聚合物的基体中，当外部环境中的溶剂渗透到纳米粒中的时候，纳米粒发生膨胀，药物便从中释放出来。因此溶剂的渗透能力决定了药物的释放速率。

实际上，上述三种模型并不能涵盖所有的药物纳米粒释放体系，而且在实际过程中，往往是几种方式共存。表 1.2、1.3 列出了药物从纳米粒中释放的释放方式以及影响因素，从中不难看出药物的释放是一个比较复杂的过程，需要针对具体的药物、给药系统（或纳米粒材料）以及给药途径具体地分析^[86]。

表 1.2 药物从纳米粒载体系统中的释放方式

编号	释 放 方 式
1	膜渗透性控制：pH、热、微波、磁性
2	扩散
3	离子交换：离子扩散和浸滤
4	表面浸蚀
5	整体崩裂：酶攻击

表 1.3 影响药物从纳米粒载体中释放的因素

影响因素	影 响 内 容
药物	在纳米粒中位置；分子量；理化性质；浓度；药物/载体作用
纳米粒	材料类型和量；粒子大小和密度；交联或聚合的程度和性质；辅料的存在
环境	pH；离子强度；极性；酶的存在；温度

对药物纳米粒载体系统的释药机制的研究，目前还主要集中在载药纳米粒体外药物释放行为的研究，有以下几种研究方法：（1）生物膜隔离的扩散池法；（2）透析袋透析法；（3）反相透析法；（4）超速离心法；（5）超滤法；（6）离心-超滤联用的方法。由于简单方便，透析袋透析法是目前应用的最多的方法。

1.5 阿霉素药物系统

1.5.1 阿霉素的结构和药理作用

阿霉素 (Doxorubicin, DOX)，又名多柔比星、亚德里亚霉素 (Adriamycin)，系由链霉菌 (*Streptomyces peucetius* var. *caesius*) 发酵培养所得的蒽环类 (Anthracyclines) 抗肿瘤抗生素^[87,88]，其结构见图 1.5。

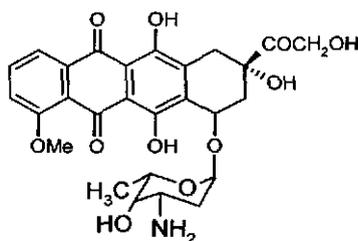


图 1.5 阿霉素的化学结构

阿霉素为红橙色结晶，熔点 205℃，产品多以盐酸盐形式存在，盐酸阿霉素易溶于水、甲醇，微溶于极性小的有机溶媒中。

阿霉素具有广泛的抗肿瘤作用。临床证明，对急、慢性粒细胞白血病和急、慢性淋巴细胞白血病，多发性骨髓瘤，恶性淋巴瘤，MH-134 肝癌，睾丸癌，乳腺癌，甲状腺癌，尤文氏瘤及肾母细胞瘤的疗效最好，对膀胱癌，神经母细胞瘤，软组织肉瘤，头颈部肿瘤，支气管肺癌，胃肠癌及食道癌等亦有一定疗效。

阿霉素的抗肿瘤作用机理是抑制核酸，特别是 DNA 的合成。阿霉素分子通过主动转运机制易于通透细胞膜进入细胞内，然后很快与细胞核结合。阿霉素分子可插入 DNA 分子中，与 DNA 形成一稳定的复合物，导致 DNA、RNA 及蛋白质合成之抑制及 DNA 双螺旋体不能卷曲，从而对肿瘤细胞造成破坏。

1.5.2 阿霉素常规用药的局限性

一直以来，阿霉素在癌症化疗中主要都是以其盐酸盐形式静脉注射给药，但是因为对癌细胞和人体健康细胞的非特异性，使它在杀伤癌细胞的同时，也产生了全身严重的毒副作用。而且存在明显的疗效-剂量依赖关系，即加大药物剂量能明显提高疗效，但增加剂量，势必增加全身的毒性反应，使其临床应用受到很大的限制。

阿霉素的主要毒性、副作用有以下几点^[89]：

- (1) 对免疫功能具有抑制作用；
- (2) 骨髓毒性；
- (3) 心脏毒性；
- (4) 阿霉素还可引起恶心、呕吐、脱发、口炎、皮疹、发热等。

1.5.3 载阿霉素纳米粒系统

鉴于阿霉素常规用药方式的局限性，要增强其在癌症化疗中的作用并降低全身毒副作用，必须研究开发新的给药途径。近二、三十年来，纳米粒在药物控释体系中的应用越来越多，已显示出极大的优势和良好的前景，因此有许多科技工作者将载阿霉素纳米粒体系作为阿霉素新的用药方式的突破口，并且已经取得了初步成效。

将阿霉素包载于纳米粒上, 相对于游离阿霉素在癌症化疗方面有了显著改善。主要表现在以下几个方面^[90]:

(1) 阿霉素纳米粒可使癌细胞的耐药性显著降低, 药效比水针剂增加了 10 倍^[91]。在阿霉素聚丙烯酸甲酯纳米粒与游离阿霉素对单核癌细胞系 V-937 的抗肿瘤活性比较研究中, 以细胞生长抑制核 DNA 合成抑制为指标, 阿霉素纳米粒细胞毒性提高了 3 倍, 90% 细胞生长抑制需游离阿霉素与阿霉素纳米粒分别是 0.051, 0.018 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 相同药物浓度, 纳米粒在细胞中量愈多, 则药物活性愈高, 细胞对阿霉素纳米粒的摄取量远较游离阿霉素量大。

(2) 阿霉素纳米粒可改变阿霉素的消除动力学, 游离阿霉素消除半衰期是 23.7 \pm 7.7h, 消除曲线下面积为 8.6 \pm 2.8 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{h}$, 阿霉素纳米粒消除半衰期则延长为 85.9 \pm 19.2h, 消除曲线下面积为 29.6 \pm 6.6 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{h}$ ^[92]。

(3) 阿霉素纳米粒在降低阿霉素心脏毒性时, 对肝脏转移瘤的疗效也得以提高^[93,94]。将网状细胞肉瘤 M5076 接种到 CSTBL/6 小鼠体内, 考察游离阿霉素与阿霉素纳米粒对肝脏转移瘤的活性, 给药后, 阿霉素纳米粒较阿霉素大大降低了转移数目, 使小鼠成活率显著提高。药动学数据表明, 肝脏对阿霉素纳米粒有强大摄取能力, 这些靶向分布作用使肝脏成为有效的药物贮库, 增加了对肝脏肿瘤细胞的作用强度与作用时间。

(4) 通过将阿霉素包载于具有靶向性的纳米载体上, 可将药物直接送达需要目标部位, 使目标部位的药量大大增加, 从而减少需药量, 减少阿霉素毒副作用。天津大学的常津^[95]制备出了阿霉素免疫磁性纳米粒 (AIMN), 还设计出在给药部位近端和远端进行 ^{99m}Tc⁴⁺ 标记的 AIMN 的体内磁靶向定位试验, 结果表明, AIMN 具有超顺磁性特性, 在给药部位近端和远端磁区均能产生放射性富集, 富集强度为给药量的 60%~65%, 同时其在脏器的分布显著减少, 从而证实了 AIMN 具有较强的磁靶向定位功能。

目前, 载阿霉素纳米粒体系正在加强其实用性的研究。Kattan 等人^[96]在法国进行了阿霉素-聚氰基丙烯酸异己酯纳米粒的临床研究, 发现该纳米粒体系可以通过改变药物的体内分布, 增加阿霉素的细胞毒性, 而使心脏毒性降低。该研究同时还进行了人体药物动力学研究。

1.6 紫杉醇药物系统

1.6.1 紫杉醇的结构和药理作用

紫杉醇 (Paclitaxel, 商品名为 Taxol) 是 Wani 等最早从短叶红豆杉树皮中提取得到的一个具有紫杉烷环的二萜类化合物, 分子式为 C₄₇H₅₁NO₁₄, 分子量 853.9。紫杉醇具有复杂而独特的结构 (见图 1.6), 人工合成十分困难, 现在主

要从生长缓慢的紫杉树的树皮中提取^[97,98]。

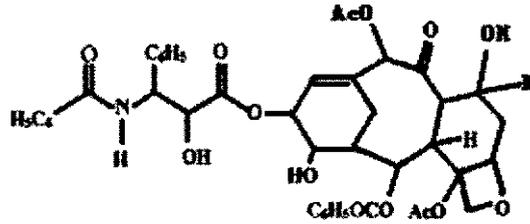


图 1.6 紫杉醇的化学结构

紫杉醇为白色或灰白色结晶性粉末，熔点 216~217℃，水溶性很差，亲脂性较强，可溶于甲醇、乙醇和丙酮等有机溶剂中。

紫杉醇的抗肿瘤作用机制是通过诱导和促使微管蛋白聚合成微管，同时抑制所形成微管的解聚，产生稳定的微管束。使微管束的正常动态再生受阻，细胞在有丝分裂时不能形成正常的有丝分裂纺锤体，从而抑制了细胞分裂和增殖。紫杉醇主要用作治疗卵巢癌、乳腺癌及非小细胞肺癌。

1.6.2 紫杉醇常规用药的局限性

由于紫杉醇的水溶性非常差，口服制剂的吸收性差，临床上主要通过静脉滴注给药^[99]。一直以来其市售制剂为紫杉醇的聚羟乙基蓖麻油（Cremophor EL）与无水乙醇的 1:1（体积比）溶液，临床应用前用生理盐水稀释 5~20 倍。这种用药方式存在许多问题^[100]。

(1) 起增溶作用的 Cremophor EL 有许多毒副作用；

(2) 市售制剂稀释后临床使用浓度为 0.3~1.2mg/mL，此浓度下紫杉醇会逐渐缓慢从溶液中沉淀，因此稳定性差，必须稀释后立即使用；

(3) 乙醇和 Cremophor EL 可以溶出聚氯乙烯输液袋和输液管中的增塑剂。

1.6.3 载紫杉醇纳米粒系统

鉴于紫杉醇现行用药方式中存在的问题，研究不含 Cremophor EL 并能提高紫杉醇生物利用度的其它给药途径具有重要的意义，其中载紫杉醇纳米粒的研究主要有下述不同载体材料。

(1) 紫杉醇白蛋白纳米粒

白蛋白具有良好的生物相容性与生物降解性，紫杉醇白蛋白纳米粒不像传统紫杉醇注射剂那样含大量表面活性剂，也无人体抗原性，不会在临床上引起十分严重的过敏问题；同时由于可改变药物的体内分布特征，增加了药物对肿瘤的治疗效果^[7]。

(2) 紫杉醇固态脂质纳米粒

Sharma^[101]用磷脂为载体材料制备载紫杉醇纳米粒，发现纳米粒低温下长时

间放置不变, 体外抗肿瘤活性有所提高。陈大兵^[102]以硬脂酸为载体材料制备紫杉醇脂质纳米粒, 用两种不同表面活性剂所制备的载药纳米粒粒径分别为 104nm 和 220nm, 紫杉醇包封率分别为 47%和 75%, 它们的体内紫杉醇消除半衰期均高于市售紫杉醇注射剂。

(3) 紫杉醇 PLGA 纳米粒

Mu^[103]用维生素 E TPGS 为表面分散剂制备了载紫杉醇 PLGA 纳米粒, 纳米粒粒径范围为 300 至 800nm, 纳米粒体外紫杉醇释放实验说明紫杉醇释放速度与所选用表面分散剂有关, 但未对载紫杉醇纳米粒的体外药敏性能进行研究。Wang^[104]用 PLGA 与一低分子量物质聚合的共聚物制备了载紫杉醇微粒, 微粒释药速度快, 以扩散控制为主。

(4) 紫杉醇聚己内酯 (polycaprolactone, PCL) 纳米粒

Kim^[105]用 PCL 制备了载紫杉醇纳米粒, 纳米粒粒径小于 100nm, 载药率大于 20%, 研究表明该纳米粒在水中具有良好的悬浮稳定性和高的载药率, 可用作紫杉醇的给药途径。

虽然载紫杉醇纳米粒体系的研究已有一些, 但从报道的研究工作来看还存在紫杉醇包封率低, 药物渗漏, 纳米粒稳定性等问题有待进一步研究解决。

1.7 本课题的研究意义和主要研究内容

癌症是现代人类健康的第二大杀手, 据世界卫生组织报道, 目前全世界每年新增癌症患者 900 万人, 死于癌症的人数 500 万人。到 2020 年, 全世界新增癌症人数将达到 2000 万人, 死于癌症的患者将超过 1200 万人, 人类面临着严峻挑战。我国由癌症引起的死亡率在所有病因中居第 2 位, 占 17.9%, 且人口众多, 近几年来癌症发病率呈上升趋势, 是癌症威胁比较大的国家^[106]。

目前临床对癌症的治疗主要采用手术和化疗的方法, 其效果一直不尽人意。特别是在化疗过程中, 大量采用具有全身毒副作用的细胞毒性药物, 在杀伤癌细胞的同时也对正常细胞构成伤害, 不仅使疗效无法全部发挥, 也给病人带来巨大痛苦。因此, 改变投药的途径、变换药物的剂型及新的药物的研制等各种各样的尝试从未有过间断, 其中癌症化疗药物的替代给药方式的研究已越来越得到各国科技工作者的重视。

近几十年来, 人们将药物纳米粒释放体系概念引入抗癌药研制中, 通过将药物与一定的药物载体结合制得具有控制释放性能和一定靶向性的新的给药体系, 给癌症的治疗带来了一场新的革命。虽然这一工作大部分尚处于实验室研究阶段, 但也有一些已有望取得临床实验的成功。

我国鉴于癌症对人民健康的严峻威胁, 也投入了大量的人力物力进行控释抗

癌药物的研制。本课题正是在国家 863 高技术项目“纳米药物载体治疗技术——人体恶性肿瘤”(2001AA218011)资助下进行的抗癌药物纳米粒载体的研究。

尽管以生物降解高分子材料为主体的载药纳米粒自九十年代以来一直是研究的热点,各国的科学家在这个领域取得了非常有意义的结果。但是到目前为止,仍然存在着许多问题没有得到解决,限制了药物纳米粒释放体系的进一步发展。这些问题主要体现在以下几个方面。

(1) 纳米粒的制备方法

纳米粒的制备方法主要通过乳液聚合和沉淀法来制备,在制备过程中聚合反应中所使用的引发剂,一些表面活性剂等也会混杂在所得的纳米粒中。而这些物质的存在必然会影响到载药纳米粒的使用安全性,并给生物体带来一定危害。在目前纳米粒的制备方法中都忽视了纳米粒的产率问题,而对于那些成本较高的合成高分子载体材料,低的纳米粒产率将决定到该材料的实际应用。

(2) 生物药物的包埋

目前制备纳米粒的材料主要是合成的聚酯类聚合物。此类聚合物是亲脂性的,具有良好的生物相容性和生物可降解性。但此类材料亲水性比较差,因此在负载基因、蛋白等具有生物活性的亲水性药物时,容易破坏它们的结构,从而使它们失去生物活性。

(3) 药物的包封率和稳定性

当前纳米粒的药物包封率还不能完全满足应用的要求,载药量不高。同时纳米粒的储存稳定性不好,特别是载药脂质体,其负载的药物会从脂质体内渗透出来。因此发展一种有效的方法来提高纳米粒的载药量和储存稳定性是当前载药纳米粒的一个研究课题。

(4) 纳米粒的表面性质和靶向行为

纳米粒的表面性质对纳米粒在体内的循环时间和靶向行为有着重要的影响。但目前纳米粒的靶向作用机理仍不清楚,纳米粒的表面性质对纳米粒与人体免疫系统的相互作用的影响也还不清楚。

(5) 载药纳米粒的体内药物缓释行为和药物的传输机制

由于人体内存在着多种酶和蛋白,而这些物质对载药纳米粒的药物释放速度,对纳米粒基体的降解都有着很大的影响,但这方面的研究还有待进一步深入。同时载药纳米粒能否通过血脑屏障也是一个非常重要的研究课题。

为此我们希望通过我们的研究工作能够部分解决前述的一些问题,或者提供解决问题的新思路和方法,为今后进一步的研究和开发工作奠定基础。因此,我们分别选择了两类代表性的载药材料,一种是具有许多独特的物理化学特性和生物功能的壳聚糖,一种是已被美国 FDA 批准用于临床的脂肪族聚酯 PLA 和

PLGA；选择了一种水溶性药物阿霉素，一种脂溶性药物紫杉醇，分别开展载阿霉素壳聚糖纳米粒和载紫杉醇 PLA、PLGA 纳米粒的研究。研究工作主要包括以下内容：

（1）空白（不载药）壳聚糖纳米粒和载阿霉素壳聚糖纳米粒的制备

以壳聚糖、三聚磷酸钠为基本原料，采用离子交联法制备空白壳聚糖纳米粒，以减小粒径为目的，探讨多种因素对纳米粒平均粒径的影响，并从红外光谱角度对反应机理进行初步研究；在空白壳聚糖纳米粒制备的基础上，进行包载抗癌药物阿霉素的研究，以获得高包率的载阿霉素壳聚糖纳米粒为目标，研究载药纳米粒制备方法，深入研究多种因素对载阿霉素壳聚糖纳米粒包封率的影响。

（2）载阿霉素壳聚糖纳米粒的性能研究

对最佳条件下制备的载阿霉素纳米粒进行体外释放实验研究，分析其药物释放过程，并考察阿霉素初始用量、壳聚糖脱乙酰度、分子量等因素对控释效果的影响，从而为进一步设计具有不同释放要求的纳米粒载体提供参考；研究载阿霉素壳聚糖纳米粒的体外抑瘤活性。

（3）空白（不载药）PLA、PLGA 纳米粒和载紫杉醇纳米粒的制备

研究制备空白（不载紫杉醇）PLA、PLGA 纳米粒的新方法，以解决纳米粒制备过程中材料损失大，纳米粒产率低的问题，研究纳米粒的生物降解性能；对载紫杉醇纳米粒进行表面修饰，通过物理吸附方法使一定的亲水性表面活性剂接到载紫杉醇纳米粒的表面，以延长其在体内的循环时间。

（5）载紫杉醇 PLA、PLGA 纳米粒的性能研究

研究载紫杉醇 PLA、PLGA 纳米粒的体外释放性能，分析其药物释放过程，并考察不同共聚比，不同分子量和不同表面活性剂用量对载紫杉醇纳米粒释放紫杉醇速度的影响，为进一步设计具有不同释放要求的纳米粒载体提供参考；研究载紫杉醇 PLA、PLGA 纳米粒的体外抑瘤活性和药物代谢动力学。

第二章 壳聚糖纳米粒的制备与表征

壳聚糖具有无毒、良好的生物相容性（包括血液相容性、组织相容性和免疫性）及可生物降解吸收等特点，被广泛应用于固定化酶、药物释放载体、人工透析膜、吸收缝合线、伤口涂敷料、人造皮肤等生物医药领域^[107]。近年来，壳聚糖微球、纳米粒载药系统也得到了一定的研究。由于壳聚糖纳米粒粒径小，且有较好的亲水性，适合作为亲水性药物的载体，也有望成为一些蛋白、多肽和基因类药物的载体，人们对它的研究更为重视。

在制备载药壳聚糖纳米粒之前，本章先进行了空白（不载药）纳米粒的研究。基于离子交联法的基本原理，考虑到在酸性条件下壳聚糖是表面带有正电荷的聚合物大分子，三聚磷酸钠（sodium tripolyphosphate, TPP）在水溶液中带有负电荷，由于静电作用二者易交联凝聚成纳米级微粒，通过控制一定条件可以得到合乎要求的壳聚糖纳米粒。实验中以减小粒径为目的，考察了壳聚糖和 TPP 浓度、壳聚糖脱乙酰度、搅拌速度、pH 值、温度、保温时间、电解质、表面活性剂等多种因素对壳聚糖纳米粒平均粒径的影响，以得到最佳制备条件。并对纳米粒的形成机理，纳米粒的形态作了研究。

2.1 实验部分

2.1.1 试剂、材料及仪器

不同分子量、不同脱乙酰度壳聚糖（医药级，浙江玉环海洋生物有限公司）；聚醚 Pluronic F-68（医药级，ICN Biomedicals Inc. Aurora, Ohio）；吐温-80（化学纯，汕头市光华化学厂）；三聚磷酸钠（分析纯，上海医药试剂公司）；其它试剂均为分析纯，水为二次蒸馏水。

78-1 型磁力加热搅拌器（江苏省金坛市正基仪器有限公司）；SHZ-C 型循环水式多用真空泵（河南省巩义市英峪予华仪器厂）；PHS-3C 型精密 pH 计（上海雷磁仪器厂）；电子天平（瑞士生产）；MASTERSIZER2000 激光散射粒度分析仪（英国马尔文仪器有限公司）；AVATAR 360 红外光谱仪（美国 Nicolet 公司）；H-800 透射电镜（日本日立公司）。

2.1.2 实验内容

2.1.2.1 壳聚糖醋酸溶液的配制

称取一定量的壳聚糖样品（如无特殊说明，所用壳聚糖的脱乙酰度为 95%）于大烧杯中，根据选定的浓度加入定量的蒸馏水，再加入冰醋酸，使醋酸浓度为 1%（v/v）。加热上述溶液，并不断搅拌促进壳聚糖溶解。最后趁热抽滤，得到所需的壳聚糖醋酸溶液，保存于容量瓶中，以备后用。

2.1.2.2 壳聚糖纳米粒的制备

采用离子交联法制备壳聚糖纳米粒,即配制一定浓度的 TPP 水溶液,磁力搅拌下,逐滴滴加 4mL TPP 溶液于 20mL 一定浓度的壳聚糖醋酸溶液中,反应 10min,即得到壳聚糖纳米粒混悬液。

2.1.2.3 纳米粒平均粒径的测定

纳米粒平均粒径在马尔文仪器公司 MASTERSIZER 2000 激光散射粒度分析仪上测定。取纳米粒混悬液适量,加去离子水稀释到合适的浓度后用激光散射粒度分析仪测定平均粒径和分散度。

2.1.2.4 纳米粒表面形态研究

将壳聚糖纳米粒的混悬液滴到电镜制样铜网上,干燥后,用 1%的磷钨酸钠溶液染色 15 分钟,再干燥后,使用透射电镜 (TEM) 对其表面形态进行观察并拍摄照片。

2.1.2.5 纳米粒红外光谱

将纳米粒混悬液均匀涂于玻璃板上,干燥后制成膜,与壳聚糖样品分别进行红外光谱分析。

2.2 结果与讨论

2.2.1 壳聚糖纳米粒制备方法选择

近年来,壳聚糖纳米粒作为许多种抗癌药物和生物大分子(如蛋白质、DNA)的控释载体,其制备方法的研究也受到重视,现已有以下几种制备方法。

(1) 共价交联法^[108]

将药物溶解或分散于壳聚糖醋酸溶液中,混合均匀后,将此溶液加入到含有表面活性剂(如 HLB 值较小的司盘类)的有机溶剂中,经搅拌或超声处理,形成 W/O 型乳液,再用戊二醛,甲醛等进行化学交联,通过离心,纯化即可制得壳聚糖纳米粒。该法是常用的制备方法,对于疏水性药物可将其首先溶于有机溶液中,然后再分散于壳聚糖醋酸溶液中,形成 O/W 乳液,再将 O/W 乳液滴加到有机相中制成 O/W/O 型复乳后再交联的方法制备。

(2) 沉淀法或凝聚法^[109]

在壳聚糖醋酸溶液中,加入吐温-80 等表面活性剂作为分散剂,将硫酸钠溶液滴入搅拌的壳聚糖溶液中,超声处理,通过溶液的浊度来判定微粒的形成,所得微粒粒径介于微球与纳米粒之间。壳聚糖纳米粒也可以通过羧甲基纤维素钠(CMC)与壳聚糖起复凝聚作用而制备。

(3) 喷雾干燥法^[110]

将药物、壳聚糖溶于冰醋酸-水-丙酮中得到不同浓度的壳聚糖溶液,在惰性

的热气流中进行喷雾干燥，在干燥过程中冰醋酸-水-丙酮迅速蒸发，从而形成壳聚糖微球。

(4) 模板聚合

南京大学的胡勇等^[111]用一种新的方法制备了壳聚糖-聚丙烯酸(PAA)纳米粒。将壳聚糖溶解于丙烯酸(AA)溶液中，在 N₂ 保护，70℃下用 K₂S₂O₈ 引发丙烯酸以壳聚糖为模板产生聚合，所得聚合物 PAA 的羧基与壳聚糖的氨基交联，导致壳聚糖高分子链卷曲而成纳米粒。该方法反应条件温和，纳米粒粒度小，分布均匀，并且具有一定的 pH 敏感性。

(5) 乳滴聚结法^[112]

将壳聚糖溶液加入药物溶液中，加入乳化剂，经高速搅拌得乳剂 A；同样将 NaOH 溶液加入乳化剂，经高速搅拌得乳剂 B。然后将 A 和 B 两种乳剂混合，经搅拌而发生乳滴聚结，离心从而得到壳聚糖纳米粒。

上述制备方法虽然各有特点，但是也存在一些问题。如共价交联法，使用大量的有机溶剂和表面活性剂，而且戊二醛，甲醛等化学交联剂具有细胞毒性以及对大分子的灭活作用；沉淀法和喷雾干燥法得到的产物粒径偏大，分布不均匀，结果重现性差；模板聚合法条件苛刻，过程复杂。因此，近年来有人将离子交联法^[113,114]引入壳聚糖纳米粒制备过程，产生了良好的效果。

离子交联的原理是壳聚糖分子中存在大量的氨基，在酸性条件下其表面带有正电荷，一些聚阴离子（如三聚磷酸盐(TPP)阴离子、硫酸葡聚糖、海藻酸钠等）在水溶液中带有负电荷。控制一定的条件下使二者相互混合，利用壳聚糖的游离氨基与阴离子发生分子间或分子内交联反应而制得壳聚糖纳米级微粒（反应示意过程如图 2.1）。该方法过程简单，作用时间短，条件温和，不使用有机溶剂，得到的纳米粒粒径小，分布均匀，且结果重现性较好。同时，由于静电相互作用是一种弱作用力，不涉及热交联过程中的高温及化学交联过程中的共价键形成，因而对所包载药物，尤其是生物制品的性质无较大影响。

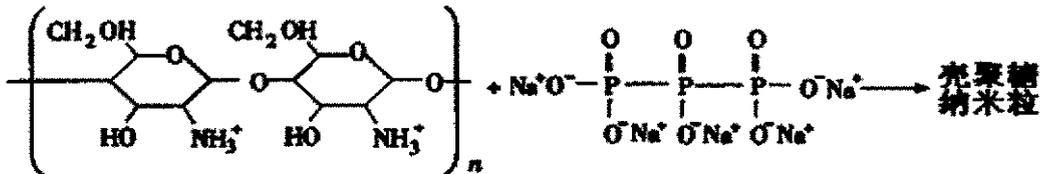


图 2.1 壳聚糖纳米粒制备过程

离子交联法制备壳聚糖纳米粒中虽已有报道，但大多集中在纳米粒的应用上，对纳米粒制备过程中影响纳米粒形成的因素研究的较少，有的因素甚至还没

有研究。基于此,本文利用酸性条件下壳聚糖高分子链上带正电的氨基与 TPP 分子中带负电的磷酸基的静电相互作用来制备壳聚糖纳米粒,深入详细地研究各反应因素对壳聚糖纳米粒粒径的影响,以期得到较为理想的结果,

2.2.2 影响壳聚糖纳米粒粒径的因素

2.2.2.1 壳聚糖、TPP 浓度对纳米粒粒径的影响

壳聚糖与 TPP 的反应主要是带正电的氨基与带负电的磷酸基的静电相互作用,因此二者的浓度不同,也即反应中二基团的不同比例会对形成的纳米粒的粒径有较大影响。同时,作为高分子溶液,壳聚糖浓度对溶液粘度和高分子链的状态有影响,也就会造成纳米粒粒径的不同。所以研究中首先考察了不同浓度下壳聚糖与 TPP 反应生成纳米粒的平均粒径差异,据此得出较佳的浓度条件。

实验中,先配制了不同浓度的壳聚糖溶液和 TPP 溶液,发现在不同的浓度范围内壳聚糖与 TPP 混合后分别可得到清亮溶液、纳米粒或大颗粒聚集物。即当两者浓度都低时,几乎没有凝聚物出现,溶液清亮;当两者浓度都高时,则生成大粒径凝聚物;只有当两者浓度在一定范围时才能生成纳米粒。以此为基础,配制了浓度为 2.5, 3, 4, 5, 7, 10mg/mL 的壳聚糖醋酸溶液和浓度分别为 1, 1.5, 2.5, 4, 5mg/mL 的 TPP 溶液,室温下反应 10min 得到纳米粒混悬液,分别对其进行粒度分析,所得到的平均粒径值见表 2.1。

表 2.1 壳聚糖、TPP 浓度对纳米粒粒径的影响

TPP 浓度 (mg/mL)	平均粒径(μm)					
	壳聚糖浓度 (mg/mL)					
	2.5	3	4	5	7	10
1	0.252	0.469	0.547	0.424	0.626	0.754
1.5	0.742	0.398	0.527	0.573	1.488	1.533
2.5	0.260	0.305	0.289	0.265	0.457	0.706
4	1.179	1.169	0.894	1.060	1.328	3.425
5	0.791	0.643	0.822	0.750	0.772	5.236

由表 2.1 数据可见,壳聚糖、TPP 溶液浓度对形成的纳米粒的平均粒径有较大影响,不同浓度得到的结果差异很大,且规律性不是很强。壳聚糖纳米粒粒径并不是随着壳聚糖和 TPP 浓度的增大就一定增大,而是呈现出不太规则的变化,这说明壳聚糖纳米粒粒径除与壳聚糖和 TPP 的浓度有关外,还与反应体系中氨基、磷酸基比例、壳聚糖溶液粘度、壳聚糖高分子链的状态等多种因素有关。综合考虑减小粒径和有适当浓度的壳聚糖、TPP 以形成较大数量纳米粒以利于对药物的包封,取壳聚糖浓度 5mg/mL, TPP 浓度 2.5mg/mL,二者在该浓度条件下反应

得到的纳米粒平均粒径为 265nm，比较小。

2.2.2.2 壳聚糖、TPP 溶液体积比对纳米粒粒径的影响

从壳聚糖、TPP 浓度对纳米粒粒径的影响实验知道，壳聚糖纳米粒粒径不仅与两者的浓度有关，而且与两者在混合溶液中的相对含量有关，因此有必要进一步研究壳聚糖与 TPP 相对用量对壳聚糖纳米粒粒径的影响。实验中固定壳聚糖溶液体积为 20 mL，改变 TPP 溶液的体积，所得实验结果见图 2.2。

当 TPP 溶液体积小于 1mL 时生成的粒子量少，溶液近清亮，粒径难以检测出，所以图中未标示出。而当 TPP 体积大于 1mL 时，由图可见，壳聚糖纳米粒粒径先略为增大，然后再随 TPP 体积的增加先减小再增大，在 TPP 溶液体积为 4mL 时，壳聚糖纳米粒粒径接近最小值。这进一步说明，只有当壳聚糖和 TPP 的用量比在一定范围时，壳聚糖纳米粒粒径才能获得最小值。从图中可看出，当 TPP 用量在 3~5mL 时，也就是壳聚糖和 TPP 的配比控制在 3:1~8:1 时，可以得到粒径较小和稳定性好的纳米粒。

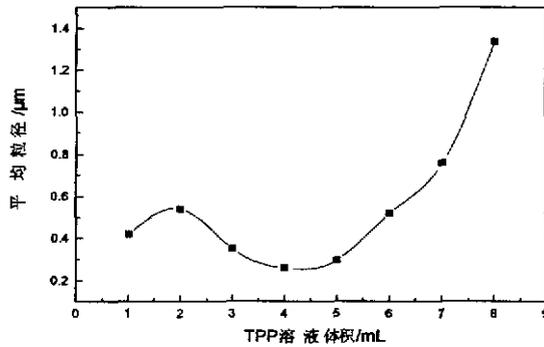


图 2.2 TPP 用量对纳米粒粒径的影响

2.2.2.3 壳聚糖脱乙酰度对纳米粒粒径的影响

壳聚糖是甲壳素脱乙酰基的产物，脱乙酰度越大，分子链上-NH₂含量越高，相应的壳聚糖酸性溶液中-NH₃⁺越多，即与 TPP 发生离子键联的位点越多，更易凝聚成粒径较小的纳米粒。同时，若壳聚糖脱乙酰度小，分子中-NHCOCH₃基多，空间位阻较大，也不易形成粒径较小的纳米粒。

实验中，选择四种同一分子量，脱乙酰度分别为 83%、86%、91%、95%的壳聚糖样品以选定的浓度（5mg/mL）配成醋酸溶液，分别与 2.5mg/mL TPP 溶液在室温下反应 10min 得到壳聚糖纳米粒混悬液，分别对其进行粒度分析，结果见图 2.3。

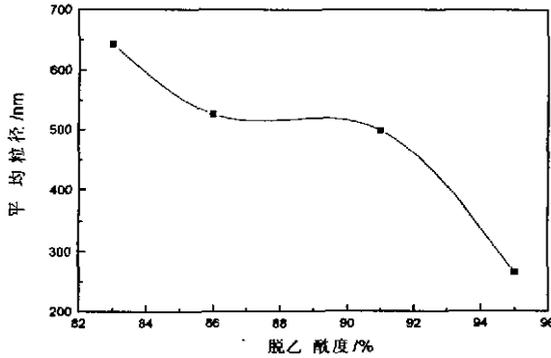


图 2.3 壳聚糖脱乙酰度对纳米粒粒径的影响

由图 2.3 可见,随着壳聚糖脱乙酰度增大,得到的纳米粒平均粒径呈减小趋势,证明了上述分析的合理性。为此,为制备较小粒径的纳米料,应选用 95% 脱乙酰度的壳聚糖。

2.2.2.4 壳聚糖分子量对纳米粒粒径的影响

壳聚糖是一种天然大分子聚合物,其分子量变化范围大,不同分子量壳聚糖制备的纳米粒粒径可能会有所不同。实验中用同一脱乙酰度但不同分子量的壳聚糖制备了纳米粒,由图 2.4 可见,随着壳聚糖分子量的增加,壳聚糖纳米粒粒径略有增大。

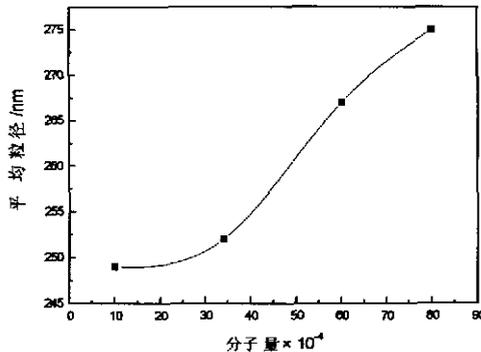


图 2.4 壳聚糖分子量对纳米粒粒径的影响

壳聚糖分子量增加,其分子链增长,与 TPP 结合形成纳米粒时分子链的弯曲缠绕较难进行,所以生成的纳米粒粒径会增大。而另一方面,壳聚糖分子量大,其分子链上的 $-\text{NH}_3^+$ 数目多,与 TPP 结合的位点多,两者之间能较紧密结合形成粒径较小的纳米粒。所以,在两方面因素的综合作用下纳米粒粒径随壳聚糖分子量的增加略有增大,但变化不是太大。

2.2.2.5 搅拌速度对纳米粒粒径的影响

壳聚糖纳米粒制备是一个离子交联凝聚过程,因此搅拌速度对形成的纳米粒

的平均粒径及其粒径分布存在影响。增大搅拌速度，有利于纳米粒的均匀分散，防止纳米粒的聚集。另外，壳聚糖高分子溶液的粘度较大，增大搅拌速度也有利于纳米粒的形成。

实验中，用壳聚糖醋酸溶液与 TPP 溶液在选定的浓度于常温下反应 10min，控制不同的搅拌速度，考察其对纳米粒平均粒径的影响，结果见表 2.2。

表 2.2 搅拌速度对纳米粒粒径的影响

搅拌速度 (r/min)	平均粒径 (μm)
200~300	2.127
500~600	0.699
700~800	0.265
900~1000	0.260

研究发现，低速下粒子聚集严重，在进行粒度分析时，超声分散后纳米粒粒径仍为 2.127 μm ，其平均粒径远大于高速搅拌下的情况。由表 2.2 数据可以看出，随搅拌速度增大，平均粒径呈减小趋势。考虑到若搅拌速度过快，能量增高，粒子间碰撞加剧，有可能破坏已形成的纳米粒，所以选定所有纳米粒制备过程中搅拌速度为 700~800r/min。

2.2.2.6 搅拌时间对纳米粒粒径的影响

纳米粒分散于介质中形成分散溶胶，该溶胶的高分散性和不均匀性使得分散物系具有特殊的光学性质即丁达尔效应。丁达尔效应与分散粒子的大小及投射光线波长有关。当分散粒子的直径大于投射光波波长时，光投射到粒子上就被反射。分散粒子的直径小于投射光波波长时，光波可以绕过粒子而向各个方向传播，发生散射，散射出来的光即所谓乳光 (opalescence)。由于纳米粒直径比可见光的波长要小得多，纳米粒分散体系就以光散射为主。

散射光强度与投射光波长的 4 次方成正比，即波长越短的光越易被散射（散射得越多）。因此，当用白光照射时，由于蓝光波长 ($\lambda \sim 450\text{nm}$) 较短，较易被散射，故纳米粒分散物系常呈浅蓝色^[115]。

实验中得到的壳聚糖纳米粒混悬液可以观察到丁达尔效应。随着 TPP 加入壳聚糖溶液中，两、三分钟即可见到乳光产生，溶液泛蓝，说明该反应能够较快地进行，实验数据 (图 2.5) 也表明反应很快就能达到完成，纳米粒粒径随搅拌时间的延长基本不变。为使反应较为充分，将反应时间定为 10min，同时乳光的产生也能大致说明产物的粒径处于纳米级。

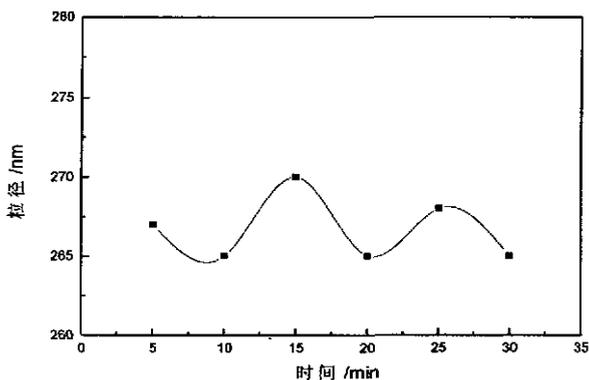


图 2.5 搅拌时间对纳米粒粒径的影响

2.2.2.7 TPP 滴加速度对纳米粒粒径的影响

壳聚糖与 TPP 的离子交联反应虽是一个比较快速的过程，但 TPP 滴加速度太快对纳米粒粒径必有影响。

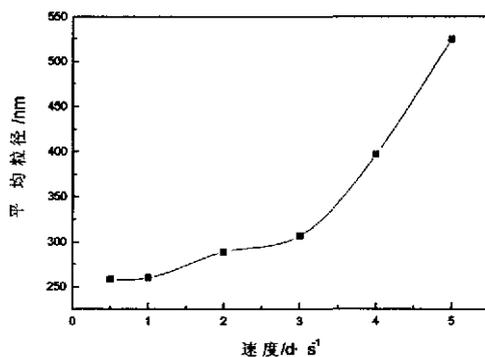


图 2.6 TPP 滴加速度对纳米粒粒径的影响

由图 2.6 可见，TPP 滴加速度越快，壳聚糖纳米粒粒径越大。当滴加速度小于 1 滴/秒时，滴加入壳聚糖溶液中的 TPP 溶液在搅拌下能快速分散开，因此可生成粒径小的纳米粒。随 TPP 滴加速度的增大，滴加入壳聚糖溶液中的 TPP 溶液不能及时分散开，局部 TPP 浓度大而与壳聚糖形成大粒径的纳米粒。当 TPP 滴加速度大于 5 滴/秒时，溶液中甚至可观察到大粒径的颗粒物。

2.2.2.8 pH 值对纳米粒粒径的影响

在壳聚糖纳米粒制备过程中，主要是壳聚糖分子中的带正电氨基与 TPP 分子中带负电磷酸基的静电相互作用，作为高分子电解质，溶液 pH 值对壳聚糖分子的带电性质势必存在影响。据文献报道，壳聚糖分子的 pKa 值为 6.3^[16]，欲使其带正电，溶液的 pH 值必须小于 6.3。随着 pH 值降低，溶液酸度增加，壳聚糖以正电性的存在的机会增加，同时溶液粘度减小，有可能使形成的纳米粒的粒径

减小。另外,经测定 2.5mg/mL 的 TPP 溶液的 pH 值为 9.15,呈碱性,若壳聚糖溶液的 pH 值过低,随着 TPP 加入其中,溶液体系的 pH 值发生变化,也有可能影响纳米粒的形成。

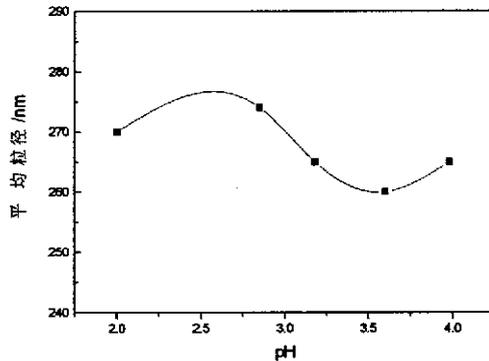


图 2.7 壳聚糖溶液 pH 值对纳米粒粒径的影响

实验中,用精密 pH 计测定所配制壳聚糖 1%醋酸溶液的 pH 为 3.98,加醋酸调节 pH 值使其降低,发现随着醋酸加入量的增多,pH 值变化缓慢。即使当溶液 pH 调为 2.0 时,其平均粒径为 270nm,与 pH3.98 时的平均粒径 265nm 相差不大,说明壳聚糖溶液 pH 值对纳米粒粒径影响不大。

产生上述结果的原因为,壳聚糖醋酸溶液具有 pH 缓冲性质,醋酸的加入量在一定范围内对 pH 值的改变不大;pH 值为 3.98 时,壳聚糖中的氨基基本以 -NH_3^+ 的形式存在,随着 pH 值降低,溶液酸度增加,壳聚糖链上 -NH_3^+ 的数目却很少增加,因此纳米粒的粒径基本不变,所以壳聚糖配成 1%醋酸溶液使用即可。

2.2.2.9 温度对纳米粒粒径的影响

壳聚糖与水水合后,其分子链由于布朗运动可形成球形胶束,溶液粘度较大,流动呈非牛顿型。随温度升高,布朗运动加快,分子链间的氢键减弱,使流动呈牛顿型,有利于较小纳米粒的形成。同时温度升高,可为壳聚糖分子与 TPP 的结合提供更多的能量,二者能较紧密地结合,使壳聚糖高分子链卷曲成更小粒径的纳米粒。因此,可以预计随温度的升高纳米粒粒径会减小。

实验中,在不同的温度条件下制备出壳聚糖纳米粒,对其进行粒度分析,结果见图 2.8。

由图 2.8 可见,随着温度的升高,纳米粒粒径呈减小趋势。在 60℃时平均粒径值达到最小(183nm),这主要是由于壳聚糖从有序态(螺旋结构)变到无序态(无规线团)的转变温度(T_m)为 62℃^[117]。温度接近 T_m 时,壳聚糖中的无序分子即活化分子显著增多,这种活化分子更易与 TPP 反应,紧密结合生成较小粒径的纳米粒。若温度继续升高至 70℃时,得到的纳米粒混悬液存在微量肉眼可见的絮状物,说明有少量纳米粒发生了聚集,这可能由于温度过高,粒子间

碰撞加剧，为部分纳米粒凝聚提供了机会。所以，从减小纳米粒粒径角度考虑，选用 60°C 为最佳反应温度。

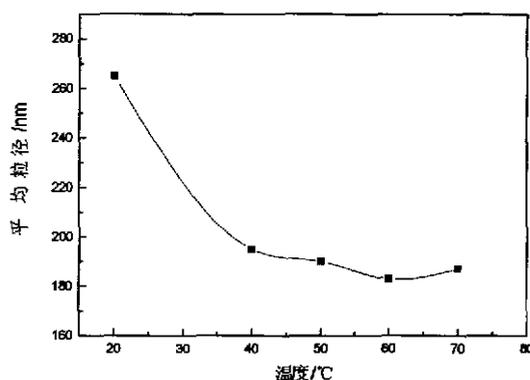


图 2.8 温度对纳米粒粒径的影响

2.2.2.10 保温时间对纳米粒粒径的影响

考虑到壳聚糖从有序态变到无序态的转变温度为 62°C ，若在 60°C 下对壳聚糖溶液保温一段时间，对其高分子链的溶解状态会有一些影响，从而对纳米粒粒径造成影响。

研究中，先让壳聚糖溶液在 60°C 下保温一定时间，再滴加 TPP 溶液形成纳米粒，对不同保温时间得到的纳米粒进行粒度分析，结果见图 2.9。

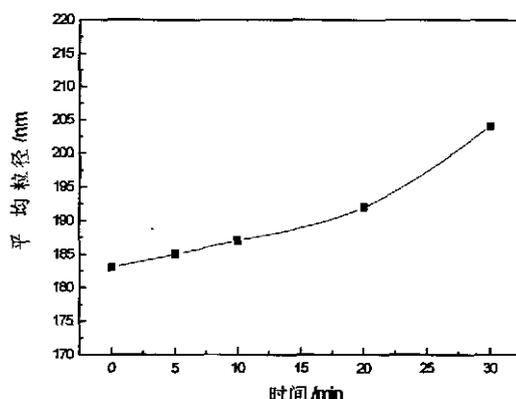


图 2.9 保温时间对纳米粒粒径的影响

由图 2.9 可知，随着保温时间延长，纳米粒平均粒径呈增大趋势。这可能是因为在 60°C 下壳聚糖从有序态到无序态的转变较快，而随着时间的延长，壳聚糖分子有足够的时间碰撞，分子间氢键作用增强，相互结合机会变大，使形成的纳米粒粒径稍有增大。除此保温过程中少量水分挥发，使壳聚糖溶液粘度增大也会

造成生成较大粒径的纳米粒。因此，实验中不将壳聚糖溶液先置于水浴中保温，而是在选定的温度下直接滴加 TPP 进行反应。

2.2.2.11 电解质对纳米粒粒径的影响

实验中壳聚糖纳米粒是用离子交联法制备，其关键在于正负电性基团的静电相互作用，因此，反应介质（水）中电解质的存在有可能会影响到纳米粒的形成、大小及其粒度分布。为此，将不同量的 NaCl 溶解于壳聚糖醋酸溶液中，60℃ 下滴加 TPP 制备壳聚糖纳米粒，对得到的纳米粒进行粒度分析，结果见图 2.10。

由图 2.10 可知，加入 NaCl，纳米粒的平均粒径呈增大趋势，当 NaCl 浓度大于 0.5mol/L 时平均粒径值基本不变。同时实验发现，滴加完 TPP 继续搅拌 10min 过程中，溶液依然清澈，无色，无泡沫，反应完放置 10min 左右，溶液才开始泛蓝并变浑浊（出现乳光），最后浑浊程度较不加 NaCl 制得的纳米粒混悬液更大。相比较不加 NaCl 的制备过程（滴加 TPP 片刻即出现乳光）可知，加入 NaCl 延迟了壳聚糖与 TPP 的反应。

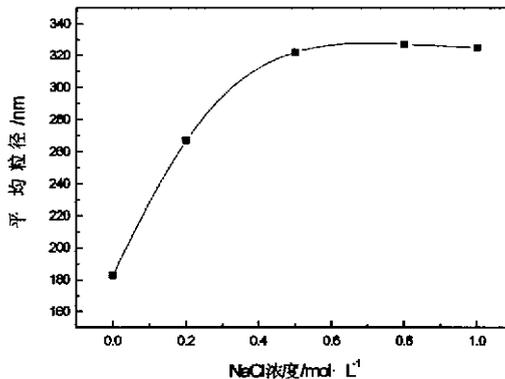


图 2.10 电解质对纳米粒粒径的影响

出现上述现象的原因在于，加入一定量的盐离子后，搅拌过程中盐的正负离子 (Na^+ , Cl^-) 会将带有相反电荷的氨基正离子与磷酸基负离子包覆起来阻碍了壳聚糖与 TPP 静电结合，所以搅拌 10min 内体系依然未出现乳光。待停止搅拌后，壳聚糖与 TPP 才慢慢开始相互作用，但此时体系没有达到搅拌时的均匀状态，因而形成的纳米粒粒径分布不均，有较大粒子出现，使平均粒径值偏高。同时由于实验中所用壳聚糖相对较少，当 NaCl 浓度大于 0.5mol/L 时，NaCl 的这一效应与其量的多少没有太大关系，所以在该浓度范围内得到的纳米粒平均粒径值相差不大。

2.2.2.12 表面活性剂对纳米粒粒径的影响

实验制备的纳米粒大多数粒径在 100~200nm 之间，具有较高的比表面积，与周围介质有着物理界面，在热力学上存在不稳定性。表面活性剂可以改变体系

界面状态，对形成的纳米粒起到分散和稳定作用。

表面活性剂的分散、稳定作用机理主要有以下几点^[118]：

(1) 形成双电层 分散剂多为离子化电解质，其离子部分可被吸附在粒子质点的表面，这样在粒子-液体界面形成带电层。在液相中，此电层又吸引周围介质带相反电荷的离子，从而形成双电层，使粒子颗粒相互排斥，所以增强了纳米粒体系的稳定性。

(2) 物理屏蔽作用 表面活性剂能将纳米粒表面包围起来，形成吸附层，使纳米粒颗粒之间产生物理障碍，造成空间位阻，从而阻止颗粒相互接触，不产生聚集现象。

(3) 氢键作用 表面活性剂分子本身具有带正电和带负电的部分，通过氢键的作用力，使周围的水分子产生定向排列。依靠氢键的作用，在纳米粒子附近建立起附加的缓冲层，使体系粘度上升，利于纳米粒分散的稳定性。

(4) 偶极作用 在电场的作用下，非离子型表面活性剂分子内部的正负电中心发生偏移，成为偶极分子。偶极分子的一端沿着纳米粒子表面定向排列，另一端朝向液相，从而阻止粒子间的接触，起到保护粒子的稳定作用。

鉴于纳米粒的形成过程是正负电荷的相互作用，为避免电荷干扰，故选用非离子型表面活性剂，它可以通过吸附在纳米粒表面产生物理屏蔽或是产生偶极作用对纳米粒起到分散和稳定作用。

实验选用吐温-80、聚醚 F-68 两种非离子型表面活性剂来考察其对粒径的影响。吐温-80，即聚氧乙烯(20)失水山梨醇单油酸酯，HLB 值为 15。聚醚 F-68 是美国 Wyandott 公司开发的 Pluronic 型表面活性剂，HLB 值为 29，二者的亲水基团均为聚氧乙烯链，都有较好的亲水性^[119]。聚醚 F-68 是 FDA 批准可以静脉注射的表面活性剂之一，具有很高的生物耐受性，也是药剂学中常用的表面活性剂。

实验中分别在室温(20℃)与 40℃下对不同浓度吐温-80、聚醚 F-68 的影响进行探讨，结果见表 2.3 和表 2.4。

表 2.3 室温(20℃)下表面活性剂对纳米粒粒径的影响

表面活性剂	浓度	平均粒径 (nm)
吐温-80	0.1% (v/v)	436
吐温-80	0.4% (v/v)	384
吐温-80	0.6% (v/v)	375
F-68	0.1% (w/v)	372
F-68	0.4% (w/v)	351
F-68	0.6% (w/v)	342

由表 2.3 可见, 同一温度条件下使用吐温-80 制得的纳米粒粒径大于 F-68 制得的纳米粒的粒径, 同一种表面活性剂浓度小时制得的纳米粒粒径较大。与吐温-80 相比, F-68 为一更加优良分散剂, 它吸附在粒子表面, 其高度水化的聚氧乙烯链以螺旋卷曲状伸向水相中, 形成很好的立体能垒, 从而防止了聚集, 对纳米粒的分散性较吐温-80 稍好。因此, 浓度低时, 表面活性剂量少, 不同表面活性剂的性能差异得以体现, 用两种不同表面活性剂所制纳米粒粒径相差比较大; 而浓度高时, 表面活性剂量多, 可充分包围住纳米粒子防止粒子间聚集, 所以用两种不同表面活性剂所制纳米粒粒径相差不大。

表 2.4 40℃下表面活性剂对纳米粒粒径的影响

表面活性剂	浓度	平均粒径 (nm)
吐温-80	0.1% (v/v)	250
吐温-80	0.4% (v/v)	206
吐温-80	0.6% (v/v)	205
F-68	0.1% (w/v)	204
F-68	0.4% (w/v)	205
F-68	0.6% (w/v)	204

由表 2.4 可见, 升高温度, 纳米粒粒径显著减小, 两种不同表面活性剂所制纳米粒粒径趋于相近。这主要是因为温度升高时, 如前所述温度使纳米粒粒径减小的原因成为主要因素, 与之相比不同表面活性剂分散能力的差异影响不大, 从而使两种不同表面活性剂所制纳米粒粒径结果较为相近。

但是, 综合两表数据可见, 无论是室温还是在加热情况下, 表面活性剂的加入都使纳米粒粒径略有增大, 说明在单纯的离子交联过程中已可得到分散的粒径较小的纳米粒, 粒子间聚集并不严重, 而吸附有表面活性剂后粒径反而会增大。这是因为经测定壳聚糖纳米粒表面电位为+47.30mv, 其表面带有一定量的正电荷, 粒子间存在静电排斥力而使纳米粒能稳定分散存在。

2.2.3 纳米粒表面形态及粒径分布分析

制得的纳米粒样品经磷钨酸钠染色后用透射电镜 (TEM) 观察表面形态 (放大 8 万倍), 电镜照片见图 2.11。

由图可见, 纳米粒形状规则, 具有一个比较清晰的球形结构, 大小分布均匀。未染色纳米粒的 TEM 照片上粒子为白色, 染色后粒子中间为白色, 周围为黑色, 是因为染色物质未能进入粒子内部。部分粒子有聚集现象, 是因为粒径处于纳米级, 具有较高的比表面积 (经测定为 $54.1704\text{m}^2/\text{g}$), 存在热力学不稳定因素。

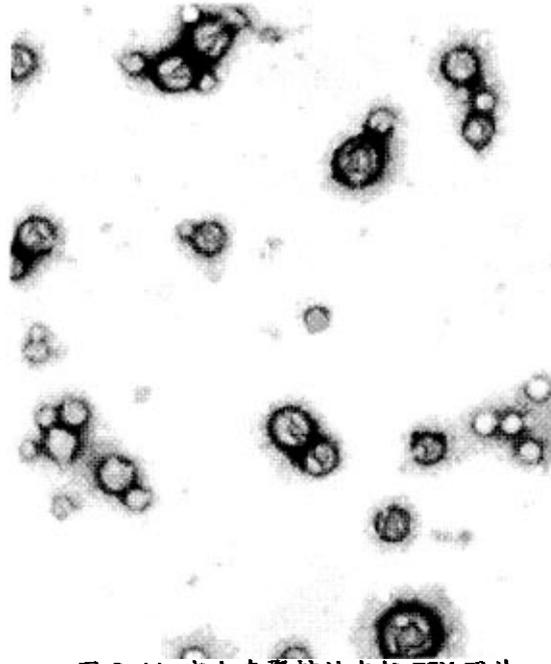


图 2.11 空白壳聚糖纳米粒 TEM 照片

纳米粒粒径分布见图 2.12，其体积平均粒径为 183nm，粒径分布较集中，多在 100~200 nm 之间，能够满足纳米粒载药体系的要求。

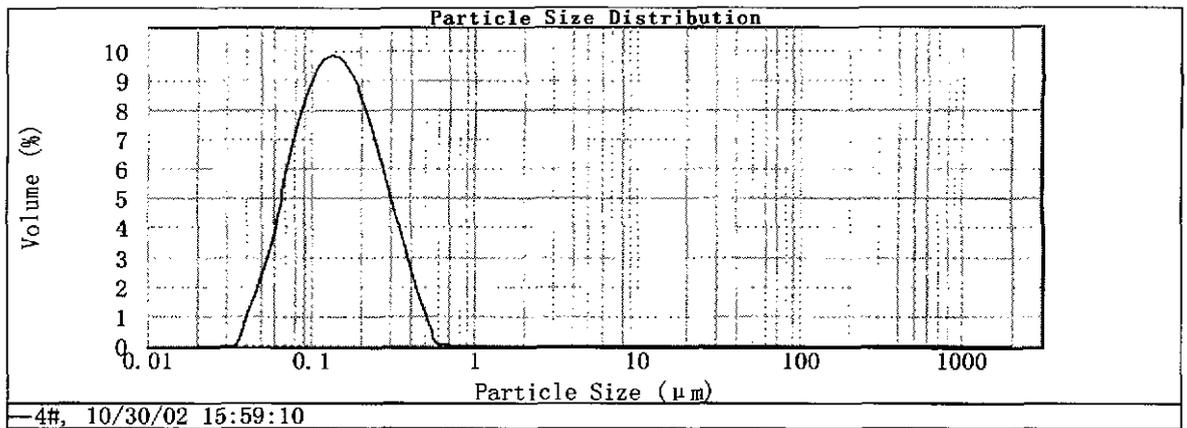


图 2.12 纳米粒粒度分布图

2.2.4 纳米粒红外光谱分析

壳聚糖纳米粒与壳聚糖样品的红外光谱见图 2.13。

壳聚糖 IR 图上， 3434cm^{-1} 处为 -NH_2 与 -OH 伸缩振动产生的重叠的吸收峰，而在壳聚糖纳米粒的 IR 图上，该峰由 3434 cm^{-1} 移至 3399 cm^{-1} ，并且变宽，说明氢键加强了。另外，制成纳米粒后，壳聚糖 IR 图上 1644 cm^{-1} 处的肩峰消失，在 1630 cm^{-1} 处出现了一个新的突峰，并且 -NH_2 的变形振动峰由 1602 cm^{-1} 移至

了 1534 cm^{-1} 。Knaul^[120]在进行壳聚糖与 NaH_2PO_4 结合的 IR 研究中也得到了与上述情况相似的结果,被认为是由于磷酸基与氨基的结合而产生的光谱变化。根据实验事实和参照 Knaul 的结论,可以认为纳米粒形成过程中,TPP 的磷酸基与壳聚糖的氨基结合,从而使分子间的作用加强而凝聚成纳米粒。

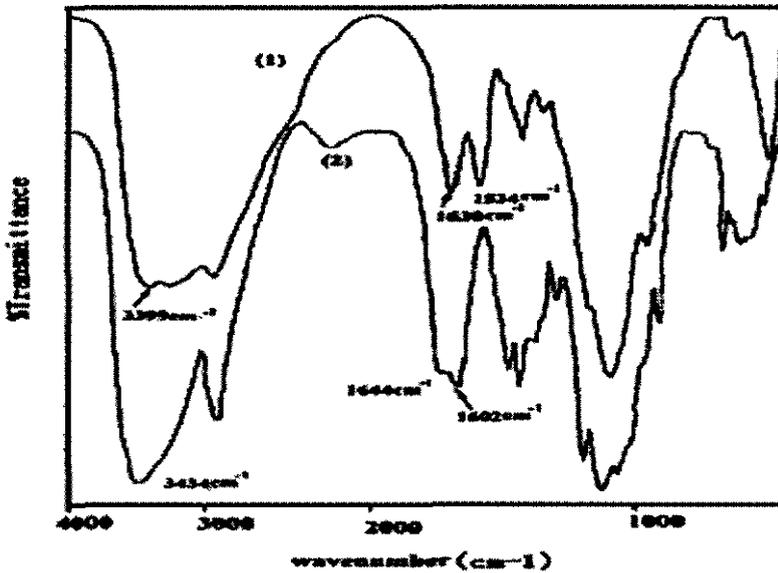


图 2.13 壳聚糖纳米粒 (1) 与壳聚糖 (2) 的红外光谱

2.3 小结

(1)通过对一系列影响壳聚糖纳米粒粒径因素的研究,表明了壳聚糖和 TPP 的浓度及用量、壳聚糖脱乙酰度、滴加 TPP 溶液时壳聚糖溶液温度、滴加 TPP 溶液速度、搅拌速度等因素对壳聚糖纳米粒粒径影响较大;壳聚糖溶液 pH、壳聚糖溶液在 60°C 下的保温时间、壳聚糖分子量对壳聚糖纳米粒粒径影响不大;而表面活性剂、电解质的加入会使壳聚糖纳米粒粒径增大。

(2)确定了以离子交联法制备粒径较小壳聚糖纳米粒的最佳条件:壳聚糖脱乙酰度 95%,浓度 5 mg/mL (1%醋酸溶液),用量 20 mL ; TPP 浓度 2.5 mg/mL ,用量 4 mL ; TPP 溶液以 1 滴/秒的速度滴加入 60°C 壳聚糖溶液中,在 $700\sim 800\text{ r/min}$ 搅拌速度下反应 10min。方法过程简单,不使用有机溶剂和表面活性剂。

在最佳条件下制得的纳米粒粒径最小,体积平均粒径为 183 nm ,粒径分布也较集中,能够满足纳米粒载药体系的要求。

(3)经 TEM 观察,粒子成球性好,大小分布均匀,说明粒子间的凝集以及小粒子的布朗运动与碰撞导致粒子粒径分布范围变宽不是很严重。

(4)红外光谱研究显示,壳聚糖分子的氨基与 TPP 的磷酸基之间有较强的

静电结合作用，这正是两者能凝聚成纳米粒的原因。

第三章 载阿霉素壳聚糖纳米粒的制备及体外释药研究

作为药物载体的纳米粒除了要求其粒径较小且呈球形外,纳米粒对药物的包封率和载药率也是衡量纳米粒载药系统是否可行的重要指标。虽然对纳米粒载药系统的药物包封率和载药率没有统一的规定,但在纳米粒载药系统的研究中人们总是期望在纳米粒粒径尽可能小的前提下,为了减少药物的损失,药物的包封率尽可能高,同时有一定的载药量。但通常的情况是纳米粒粒径减小其对药物的包封率就会下降,即两者是相矛盾的。当然即使如此,多数情况下首先要考虑的还是纳米粒粒径,为了不被体内免疫系统识别吞噬,延长其体内循环作用时间,纳米粒粒径最好应小于 200nm,其分布也以越集中越好,因此纳米粒粒径的大小是决定其可否作为药物载体的首要的决定性条件。

正是基于此,在前一章中详细研究了空白壳聚糖纳米粒的制备条件,获得了粒径小于 200nm 的壳聚糖的纳米粒。在此基础上,本章首先将研究如何将阿霉素包载于纳米粒上,并在保证纳米粒粒径无大的变化的前提下尽可能提高其对阿霉素的包封率。

载药纳米粒作为药物传递和释放的载体,其中的药物能否释放出来,是快还是慢,以何种形式释放,是否具有缓释或控释作用,也是纳米粒载药系统可否应用的关键因素之一。为此,本章还对壳聚糖纳米粒对所包载阿霉素的体外释放性能进行了研究,并探讨了不同因素对纳米粒体外释放性能的影响。

3.1 实验部分

3.1.1 试剂、材料及仪器

注射用盐酸阿霉素(10mg/瓶,深圳万乐医药有限公司);阿霉素标准品(湖南省药检所);壳聚糖(医药级,浙江玉环海洋生物有限公司);透析袋(DM-16,截留分子量 3500,北京华美生物材料有限公司);三聚磷酸钠(分析纯,上海医药试剂公司);其它试剂均为分析纯,水为二次蒸馏水。

磷酸盐缓冲溶液(Phosphate Buffer Solution, PBS, pH7.4, 0.1mol/L):称取磷酸二氢钾(KH_2PO_4) 1.36g,加入 0.1mol/L 的氢氧化钠溶液 79mL,蒸馏水稀释到 200mL,得到 pH7.4 的 0.1mol/L 的缓冲溶液。

78-1 型磁力加热搅拌器(江苏省金坛市正基仪器有限公司);GSY-II 型电热恒温水浴锅(北京市医疗设备厂);TGL-16G 型冷冻离心机(上海玉成干燥设备有限公司);756MC 型紫外可见分光光度计(上海分析仪器厂);PHS-3C 型精密 pH 计(上海雷磁仪器厂);MASTERSIZER2000 激光散射粒度分析仪(英国马尔

文仪器有限公司); DELSA 440SX 表面电位与粒度分析仪(美国 COULTER 仪器公司); H-800 透射电镜(日本日立公司)。

3.1.2 实验内容

3.1.2.1 阿霉素的测定^[121]

称取 10mg 阿霉素标准品溶于 50mL 蒸馏水中,待完全溶解后定容至 100mL,配制成 100 μ g/mL 的阿霉素溶液。再从配好的溶液中分别取 0.5 mL, 1.0 mL, 2.0mL, 3.0mL, 4.0mL, 5.0mL, 6.0mL 溶液于 100mL 容量瓶中,加蒸馏水稀释至刻度,则所配制的阿霉素标准溶液的浓度分别为 0.5 μ g/mL, 1 μ g/mL, 2 μ g/mL, 3 μ g/mL, 4 μ g/mL, 5 μ g/mL, 6 μ g/mL。用紫外可见分光光度计于阿霉素的吸收波长 485nm(紫外可见扫描结果见图 3.1)处分别测定一系列标准溶液的吸光度值,做标准曲线,并进行线性回归分析。得线性回归方程为: $Y=0.008+0.0173C$ ($r=0.9993$), 线性范围为 0.5~6 μ g/mL。

实验中计算包封率值所用到的阿霉素浓度均由线性回归方程得出。

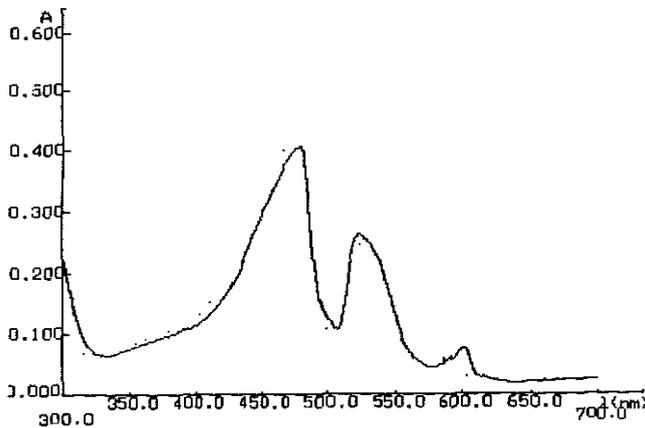


图 3.1 阿霉素紫外可见扫描结果图

3.1.2.2 阿霉素-TPP 复合物的形成

取 1mg 阿霉素溶于盛有 4mL 2.5mg/mL TPP 溶液的 10mL 棕色容量瓶中,混合,置于恒温水浴中于 50 $^{\circ}$ C 下保温 5min,阿霉素即可与 TPP 形成复合物。

3.1.2.3 壳聚糖载阿霉素纳米粒的制备

磁力搅拌下,将上述制得的阿霉素-TPP 复合物溶液用滴管以 1 滴/秒的速度逐滴滴加到 20mL 5mg/mL 的壳聚糖 1% 醋酸溶液中,40 $^{\circ}$ C 下反应 10min,即得到壳聚糖载阿霉素纳米粒混悬液。因为阿霉素易发生光降解反应,以上操作须避光进行。

3.1.2.4 纳米粒阿霉素包封率、载药量的测定

将载阿霉素壳聚糖纳米粒混悬液于冷冻离心机(4 $^{\circ}$ C) 13000rpm 离心

30min。纳米粒经洗涤冷冻干燥后称重。上清液用蒸馏水稀释至一定体积，其中阿霉素含量以标准曲线法用紫外-可见分光光度计于阿霉素的 λ_{\max} 485nm 处测定（在此波长下除阿霉素外其它物质基本无吸收）。所有吸光度值以相同条件下制备的空白壳聚糖纳米粒离心后的上清液为参比。

纳米粒阿霉素包封率（EE）与纳米粒阿霉素载药量（DL）按下式计算：

$$EE(\%) = \frac{W_0 - W_c}{W_0} \times 100\% \quad (3-1)$$

$$DL(\%) = \frac{W_0 - W_c}{W_m} \times 100\% \quad (3-2)$$

式中， W_0 表示加入阿霉素的总量， W_c 表示上清液中阿霉素量， W_m 表示所得纳米粒质量。

3.1.2.5 载阿霉素纳米粒平均粒径和表面形态分析

纳米粒平均粒径在马尔文仪器公司 MASTERSIZER 2000 激光散射粒度分析仪上测定。取载阿霉素纳米粒混悬液适量，加去离子水稀释后用激光散射粒度分析仪测定平均粒径和多分散度。

将载阿霉素壳聚糖纳米粒的混悬液滴到电镜制样铜网上，干燥后，用 1% 的磷钨酸钠溶液染色 15 分钟，再干燥后，使用透射电镜（TEM）对其表面形态进行观察并拍摄照片。

3.1.2.6 载阿霉素纳米粒表面电位分析

取纳米粒混悬液适量，加去离子水稀释后用 COULTER 公司的 DELSA 440SX 表面电位与粒度分析仪测定表面电位。

3.1.2.7 载阿霉素纳米粒粒度稳定性分析

对制备的载阿霉素纳米粒放置 5、15、30、45 天，分别进行粒度分析，比较平均粒径值的变化。

3.1.2.8 载阿霉素纳米粒的体外释放实验

取一定量载阿霉素纳米粒于透析袋中，加入 2mLPBS 缓冲溶液后封严，放入盛有 18mLPBS 缓冲溶液的释放池中。恒温（37℃）持续搅拌下定时取样，同时补充等量生理盐水。用紫外可见分光光度计于 485nm 处测定样品中的阿霉素含量，进而计算出阿霉素的累积释放率。所有吸光度值均以未载药纳米粒同样条件下的 PBS 缓冲溶液为参比。

3.2 结果与讨论

3.2.1 壳聚糖纳米粒包药机理

酸性条件下壳聚糖是表面带有正电荷的聚合物大分子，TPP 在水溶液中带有

负电荷, 由于静电作用二者易交联成纳米级微粒, 因此制备壳聚糖载阿霉素纳米粒的关键问题是如何将阿霉素包载于纳米粒上。

常用的载药方法有包裹药物、在溶液中吸附药物和通过化学反应将药物与载体材料键合等方法。Mitra^[122]先将阿霉素通过碳氮双键与经氧化的葡聚糖结合, 再将它们的复合物包载于壳聚糖纳米粒中, 阿霉素包封率可达 60~65%。化学键合药物虽有可能获得较高的药物包封率, 但由于存在化学反应对药物活性的影响, 反应中所用化学试剂对人体的毒害, 并且有时以化学键与载体相连的药物难以游离药物释放出来等原因, 使这种载药方式的实际应用受到限制。但仅仅将药物包裹或分散于纳米粒中就要得到高的包封率有时是相当困难的, 因此如何提高药物包封率是纳米粒载药系统研究中又一关键问题。

实验中先采用了一些不同的方法制备载阿霉素壳聚糖纳米粒, 测定了它们各自的阿霉素包封率。

方法 1: 1mg 阿霉素先溶于壳聚糖醋酸溶液中, 然后按制备纳米粒的条件滴加 TPP 溶液入其中, 经检测纳米粒阿霉素包封率为 18.03%。

方法 2: 1mg 阿霉素先与一定量硫酸葡聚糖溶液混合几分钟, 再加入壳聚糖醋酸溶液中, 然后再按制备纳米粒的条件滴加 TPP 溶液入其中, 经检测纳米粒阿霉素包封率为 25.05%。

方法 3: 1mg 阿霉素先与多聚磷酸溶液混合几分钟, 再加入壳聚糖溶液中, 然后再按制备纳米粒的条件滴加 TPP 溶液入其中, 经检测纳米粒阿霉素包封率为 22.65%。

可以看出, 不论以上那种方法阿霉素的包封率都不高。从蒽环类药物阿霉素的化学结构式(图 1.2)可知阿霉素分子中含有碱性基团-NH₂, 在酸性条件下分子带有正电荷的-NH₃⁺, 与同样带正电荷的壳聚糖分子之间存在电荷排斥力, 因此要想将阿霉素包载于壳聚糖纳米粒上是非常困难的。为了解决这一问题, Kevin 等^[123]提出了两种途径, 一种是在纳米粒产生之前先形成壳聚糖-阿霉素复合物, 但可以想象壳聚糖与阿霉素的复合效率会很低, 实际实验中阿霉素的复合率只有 1.4% (w/w), 所以即使与壳聚糖复合的阿霉素最后进入了纳米粒中, 绝大部分的阿霉素还是在复合过程中损失掉了。另一种途径与我们的实验一样, 即先用聚阴离子掩蔽阿霉素的正电性, 然后加入壳聚糖溶液中, 再滴加 TPP 形成载药纳米粒。但从实验结果来看, 用硫酸葡聚糖(见图 3.2)或多聚磷酸两种聚阴离子先与阿霉素混合后, 纳米粒的阿霉素包封率虽有所提高, 但也仅能分别达到 25.05%和 22.65%, 仍有大量阿霉素损失掉了, 效果仍不理想。

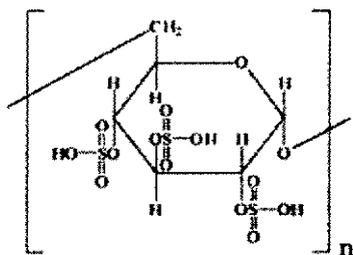


图 3.2 硫酸葡聚糖化学结构图

经过理论上的分析与试验，发现先让阿霉素与 TPP 溶液在一定条件下反应一段时间形成复合物，再将阿霉素-TPP 复合物溶液滴加到壳聚糖溶液中，所得纳米粒包封率可大幅度提高到 80%以上。这是由于阿霉素与 TPP 在一定条件下能较紧密地结合在一起，充分掩蔽阿霉素的正电性，这种结合了阿霉素的 TPP 再通过静电作用与壳聚糖生成纳米粒过程中很少有阿霉素的泄漏，其效果要比以硫酸葡聚糖或多聚磷酸两种聚阴离子为桥将阿霉素带入纳米粒方法好得多，因此最终可获得高包封率的纳米粒。

3.2.2 阿霉素-TPP 复合物形成过程中阿霉素包封率影响因素

3.2.2.1 pH 值对纳米粒阿霉素包封率的影响

经测定 0.25%TPP 溶液的 pH 为 9.15，实验中用稀醋酸调节其酸度，在不同 pH 值下进行阿霉素与其的结合反应，发现 TPP 溶液 pH 值对纳米粒包封率有较大影响。结果见图 3.3。

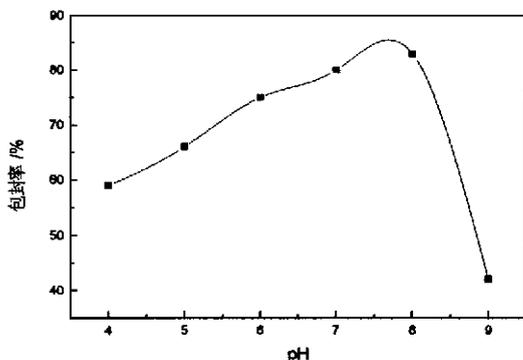


图 3.3 pH 值对阿霉素包封率的影响

由图 3.3 可知，当 TPP 溶液 pH 为 8.0 时，纳米粒包封率最大，大于 80%；pH 大于 8.0 时随着 TPP 溶液 pH 的增大，纳米粒包封率迅速下降；pH 小于 8.0 时随着 TPP 溶液 pH 的减小，纳米粒包封率也下降，但下降的较为缓慢。从阿霉素的 pKa 为 8.2 我们可知，只有当 TPP 溶液 pH 小于 8.2 时，阿霉素的氨基在溶液中才能主要以带正电性的-NH₃⁺形式存在，这样才能与 TPP 上的带负电荷的磷酸根基团较好的结合而使纳米粒有最高的包封率。当 pH 大于 8.2 后，阿霉素分

子中所带 $-NH_3^+$ 迅速下降,与 TPP 的结合极大的减少,这直接导致纳米粒包封率的大大下降。而当 pH 小于 8.0 时,随着 TPP 溶液 pH 的减小,溶液酸度增加,溶液中 H^+ 浓度增大,其与 TPP 磷酸根阴离子的结合与阿霉素和 TPP 磷酸根阴离子的结合发生竞争,从而使阿霉素与 TPP 结合的机率下降,最终使阿霉素的包封率有所降低。另外在较低 pH 下,TPP 磷酸根阴离子的减少,也可能造成其与壳聚糖结合生成纳米粒量的减少,也促使纳米粒包封率下降。

3.2.2.2 温度对纳米粒阿霉素包封率的影响

阿霉素与 TPP 的结合是一个静电相互作用的过程,不同恒温温度对这种结合程度必然有影响,从而造成纳米粒包封率的不同。一般而言,阿霉素与 TPP 结合越紧密,继而与壳聚糖形成纳米粒后包载的药物就会越多,损失就越小,从而使包封率也就越高。

实验中先将 1mg 阿霉素溶于 TPP 溶液在不同温度下恒温反应 3 min,再在常温下与壳聚糖溶液反应生成壳聚糖纳米粒,考察恒温温度对纳米粒包封率的影响。实验结果见图 3.4。

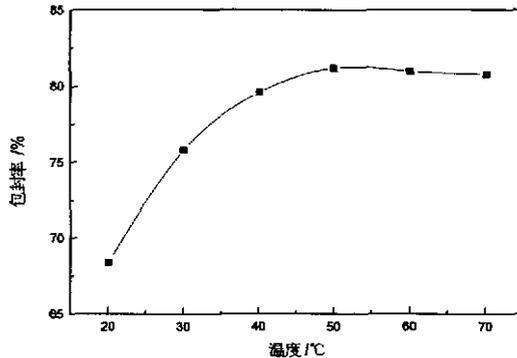


图 3.4 温度对阿霉素包封率的影响

由图 3.4 可见,相对于 TPP 溶液的 pH 来说,温度对阿霉素包封率的影响要小得多。温度小于 50°C 时,阿霉素包封率随温度的升高增加不大。当温度高于 50°C 后,随温度的继续升高阿霉素的包封率不再变化。这是因为在一定温度范围内,温度的增加,可为阿霉素与 TPP 结合提供更多的能量,使两者能较紧密地结合从而提高纳米粒的包封率。阿霉素虽对热稳定,但考虑到高温长时间对阿霉素的稳定性可能会有一定影响,确定 50°C 为较佳恒温温度。

3.2.2.3 时间对纳米粒阿霉素包封率的影响

在 50°C 下将阿霉素与 TPP 溶液反应不同时间,比较时间对纳米粒包封率的影响,所得实验结果如图 3.5。

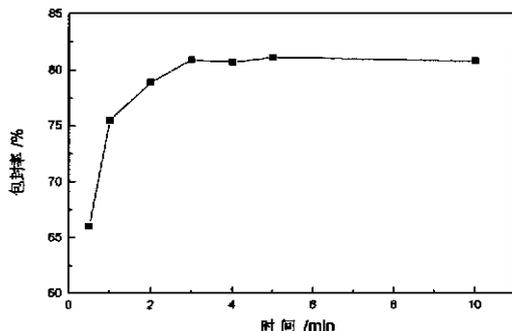


图 3.5 阿霉素-TPP 复合物形成过程中时间对阿霉素包封率的影响

从图 3.5 可看出, 随着时间的延长, 纳米粒包封率很快由 0.5min 时的 66% 增加到 3min 时的 80% 以上。此后, 反应时间再增加, 纳米粒包封率变化不大, 在图中为一近似水平的直线。这说明阿霉素与 TPP 的结合较快, 反应 3min 后基本已到最大值, 因此阿霉素与 TPP 溶液反应的时间可确定为 3min。

3.2.3 载阿霉素纳米粒形成过程中阿霉素包封率影响因素

3.2.3.1 温度对纳米粒阿霉素包封率的影响

上一章已讨论过温度对空白纳米粒粒径有一定影响, 本章对当 TPP 结合了一定量阿霉素后, 再与壳聚糖溶液发生反应时, 过程中不同温度下得到的纳米粒的包封率进行了研究。

实验中, 先将 1mg 阿霉素溶于 TPP 溶液在 50℃ 下恒温 3min 后再与壳聚糖在不同的温度下反应, 得到纳米粒混悬液, 其包封率值随温度的变化趋势见图 3.6。

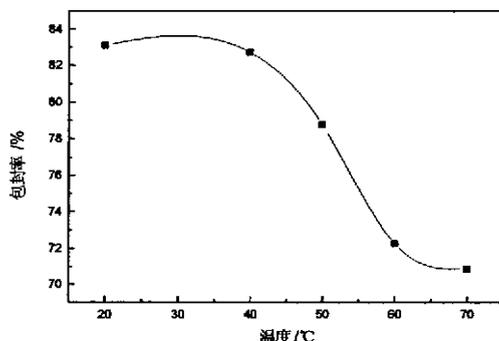


图 3.6 载阿霉素纳米粒形成过程中温度阿霉素包封率的影响

由图 3.6 可见, 随着温度的升高, 纳米粒阿霉素包封率呈下降趋势。这是由于虽然与 TPP 的结合掩蔽了阿霉素的部分正电荷, 但其正电性依然存在, 加入到壳聚糖溶液中依然会有一定的静电排斥力, 这一作用在常温下 (20℃) 不明显, 以致包封率较高 (83.12%)。当温度为 40℃ 时, 包封率已略有下降 (82.73%),

说明排斥力已有所增强。温度继续升高,排斥作用越来越明显,使部分阿霉素不能包裹于壳聚糖纳米粒中,包封率下降较多。

从上一章的实验结果知在 60℃时,纳米粒的平均粒径达到最小(183nm),而此时包封率只有 72%左右。因此,综合考虑温度对纳米粒粒径和阿霉素包封率的影响,可选择 40℃为制备载阿霉素纳米粒的最佳温度,在此温度下所形成的纳米粒不仅粒径小于 200nm,且有较高的阿霉素包封率。

3.2.3.2 阿霉素用量对纳米粒阿霉素包封率的影响

实验中取不同量的阿霉素与 TPP 形成复合物后,40℃下与壳聚糖溶液反应生成载阿霉素纳米粒,对其包封率值进行分析,考察阿霉素用量对包封率的影响,结果见图 3.7。

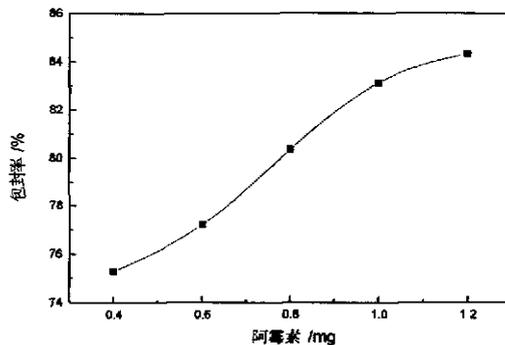


图 3.7 阿霉素用量对阿霉素包封率的影响

由图 3.7 可见,随着阿霉素用量的增加,包封率呈增加趋势。这一现象与目前随着药物用量的增加,包封率降低的已有文献报道相反。可能的原因是相对于阿霉素而言,TPP 的量是大量的,在一定范围内增加的阿霉素可与 TPP 结合而带入纳米粒中,因此纳米粒包封率增加。但是,实验发现当阿霉素量达到 1.2mg 时,阿霉素与 TPP 混合一段时间会有片状黑色沉淀物产生,且随阿霉素量的继续增加沉淀物也增多,这说明阿霉素与 TPP 的结合具有饱和性。

因此从图中看阿霉素用量在 1.2mg 时虽然包封率最高,但此时已有少量沉淀物产生,会影响纳米粒的生成与粒径分布,故确定 1.0mg 为较佳阿霉素用量。

3.2.3.3 阿霉素用量对纳米粒载药率的影响

在纳米粒载药系统的研究中,为了减少药物的损失人们总是期望药物的包封率尽可能高,同时有一定的载药量以保证其疗效,减少载药纳米粒的用量,因此载药率也是衡量药物载体系统的一个指标。

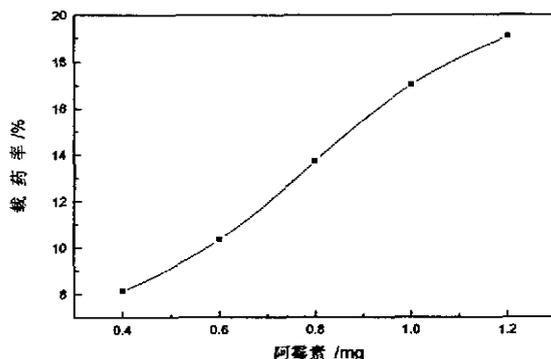


图 3.8 阿霉素用量对载药率的影响

由图 3.8 可看出,随着阿霉素用量的增加,载药率也增加。当阿霉素用量为 1.0mg 时,纳米粒载药率为 17.02%。因为当 TPP、壳聚糖浓度一定时,两者结合形成的纳米粒载体的量是基本不变的,而随阿霉素用量的增多,结合进入纳米粒的阿霉素量增大,所以纳米粒的载药率提高。相对来说纳米粒阿霉素包封率值较高,而载药量较低,主要是由于纳米粒的主要部分是包封材料壳聚糖和 TPP,而药物阿霉素所占比例偏小。另外,纳米粒粒径小,表面积大,药物的渗漏也会影响其载药率。

3.2.3.4 壳聚糖脱乙酰度对纳米粒阿霉素包封率的影响

实验中配制相同分子量不同脱乙酰度的壳聚糖溶液,常温下分别与阿霉素-TPP 复合物反应制得载药纳米粒,得到的包封率随脱乙酰度的变化见图 3.9。

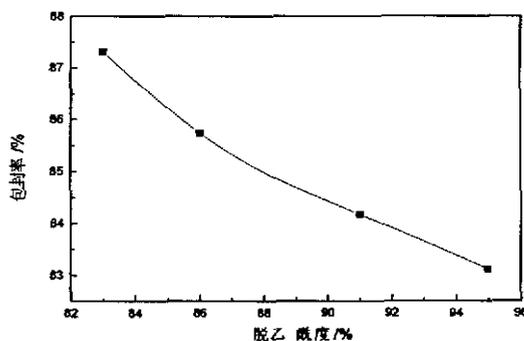


图 3.9 壳聚糖脱乙酰度对阿霉素包封率的影响

由图 3.9 可见,随壳聚糖脱乙酰度增大,纳米粒包封率略为减小。这是因为壳聚糖脱乙酰度增大,分子链上 $-\text{NH}_3^+$ 含量高,即正电性提高,虽有利于其与 TPP 的结合形成纳米粒,但对加入的阿霉素的排斥力也增强,致使部分阿霉素不能包裹于纳米粒中,造成纳米粒包封率下降。

上一章已讨论过壳聚糖脱乙酰度对空白纳米粒粒径的影响,知道脱乙酰度越

高纳米粒粒径越小,本章的研究表明壳聚糖脱乙酰度高其纳米粒包封率却有所下降,二者存在矛盾。综合两方面的因素可以发现,壳聚糖脱乙酰度对粒径的影响较大,而对包封率的影响则相对较小,83%和95%脱乙酰度壳聚糖纳米粒的包封率分别为86.32%,83.12%,相差不大。因此,除特别申明外,研究中仍选用95%脱乙酰度的壳聚糖进行实验。

3.2.3.5 壳聚糖分子量对纳米粒阿霉素包封率的影响

由空白壳聚糖纳米粒的制备实验可知,壳聚糖分子量对纳米粒粒径影响不大。95%脱乙酰度下,不同分子量的壳聚糖制备的纳米粒包封率见图3.10。

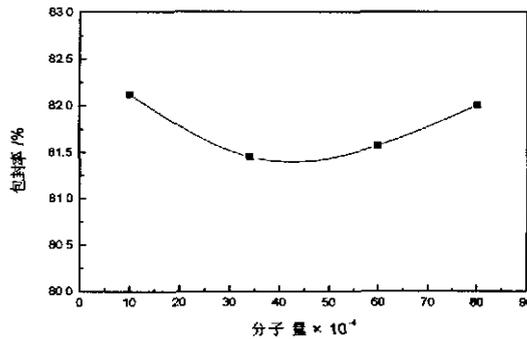


图 3.10 壳聚糖分子量对纳米粒包封率的影响

由图可知,纳米粒包封率随壳聚糖分子量的变化也基本不变。这是因为在相同浓度下,具有同一脱乙酰度的壳聚糖,其-NH₃⁺的数目大体一致,因此它们与TPP的交联作用力也基本相当,对所加入的阿霉素的排斥力也相近,所以纳米粒的包封率差不多。

3.2.3.6 壳聚糖溶液 pH 值对纳米粒阿霉素包封率的影响

实验中用稀醋酸调壳聚糖溶液至不同的 pH 值,然后再滴加 TPP 和阿霉素的混合液,所得纳米粒的包封率值见图3.11。

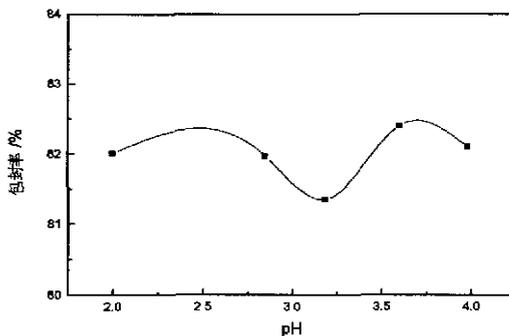


图 3.11 壳聚糖溶液 pH 值对纳米粒包封率的影响

由图可见,壳聚糖溶液 pH 值发生变化,但纳米粒阿霉素包封率基本维持不变。这再次说明了在 pH4.0 的情况下,壳聚糖中的-NH₂ 基本与-H⁺结合以-NH₃⁺的形式存在,随 pH 的降低-NH₃⁺量不再增加。因此,壳聚糖对阿霉素的静电排斥力不再增加,纳米粒的阿霉素包封率也就保持不变。

3.2.3.7 搅拌时间对纳米粒阿霉素包封率的影响

壳聚糖纳米粒形成的速度非常快,在几分钟内就可生成,而且其粒径在一定时间内没有变化。搅拌时间对纳米粒阿霉素包封率的影响则见图 3.12,从图中可看出,随搅拌时间的延长,纳米粒阿霉素包封率略有降低。这是因为壳聚和 TPP 的结合能与阿霉素与 TPP 的结合竞争,壳聚糖分子链长,其与 TPP 结合的位点多,结合力强。所以,随着时间的延长,壳聚糖分子可将与 TPP 结合的阿霉素替换下来,而使纳米粒的阿霉素包封率下降。

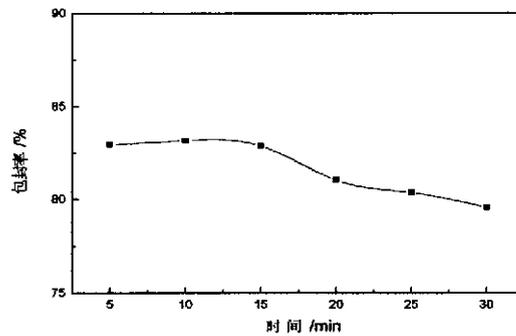


图 3.12 搅拌时间对纳米粒阿霉素包封率的影响

3.2.3.8 搅拌速度对纳米粒阿霉素包封率的影响

搅拌速度加快,壳聚糖纳米粒阿霉素包封率呈下降趋势。因为,壳聚糖与 TPP 的离子交联作用要强于阿霉素与 TPP 之间的作用,在高速搅拌情况下可拆散阿霉素与 TPP 的结合,取而代之的是壳聚糖与 TPP 的结合,这就使纳米粒的阿霉素包封率减小。由于搅拌速度低时,纳米粒的粒径过大,所以在制备载阿霉素纳米粒时仍选择适中的搅拌速度,即 700~800 r/min,这样既可以获得粒径小于 200nm 的载阿霉素纳米粒,又能保证纳米粒具有较高的阿霉素包封率。

表 3.1 搅拌速度对纳米粒阿霉素包封率的影响

搅拌速度 (r/min)	包封率 (%)
200~300	82.45
500~600	82.32
700~800	82.03
900~1000	80.57
1100~1200	78.43

3.2.4 载阿霉素壳聚糖纳米粒粒径和形态分析

上一章已研究过空白纳米粒制备的最佳条件,对影响平均粒径的因素有了较多的考虑。本章在载阿霉素壳聚糖纳米粒的制备中,除了先使阿霉素与 TPP 溶液反应几分钟外,唯一改变的条件是纳米粒制备时的温度为 40℃,对该条件下制得的载阿霉素壳聚糖纳米粒进行粒度分析,其体积平均粒径 193nm,粒度分布图见图 3.13。

同样在此条件下制备的空白纳米粒体积平均粒径为 195nm,与载阿霉素壳聚糖纳米粒粒径几乎一致。这说明制备载阿霉素壳聚糖纳米粒的过程不会改变纳米粒的粒径,纳米粒载阿霉素后粒径也不会增大。因为相对于高分子壳聚糖(样品分子量 60 万)来说,阿霉素分子(分子量 579.99)很小,对形成纳米粒的粒径无影响。

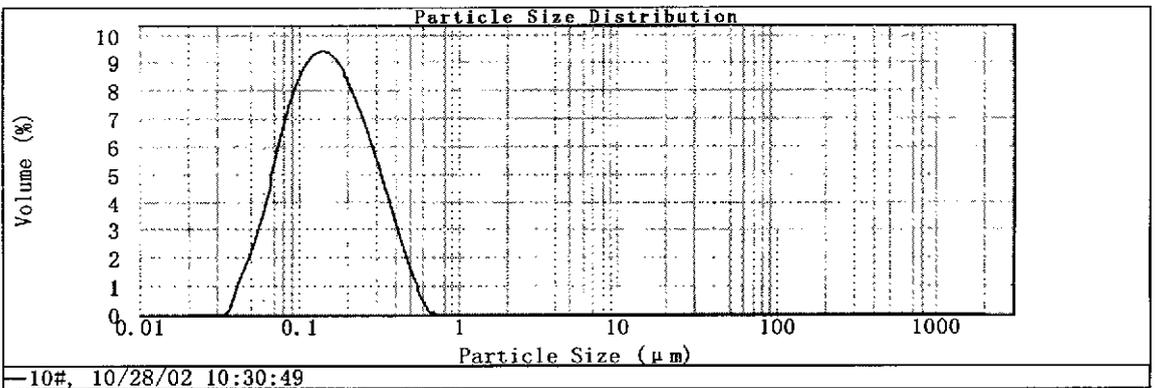


图 3.13 载阿霉素壳聚糖纳米粒粒度分布图

同样对 40℃下制得的载阿霉素壳聚糖纳米粒进行 TEM 观察(放大倍数 8 万倍),电镜照片见图 3.14。

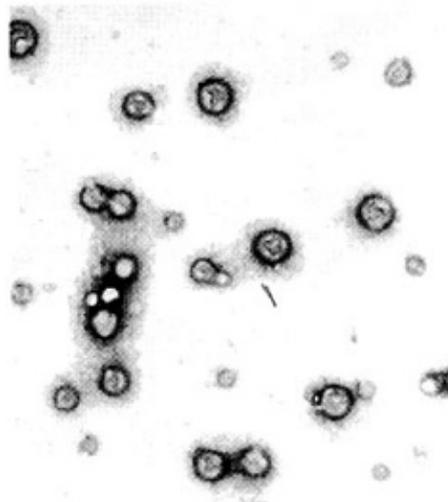


图 3.14 载阿霉素壳聚糖纳米粒 TEM 照片

由图可见, 包载阿霉素后, 除纳米粒颜色稍深外, 其它与空白纳米粒一致, 成球性好, 粒径分布较均匀。

3.2.5 载阿霉素壳聚糖纳米粒表面电位分析

测定纳米粒的表面电位有助于我们预测纳米粒胶体体系的贮存稳定性。一般来说, 当纳米粒的表面电位的绝对值大于 25mV 时, 由于静电力的排斥作用, 纳米粒就可以以一种稳定的形态存在, 不会发生聚集。纳米粒的表面电位不仅会影响纳米粒的稳定性, 还会影响其与体内物质的静电作用力。由于体内的因素较为复杂, 经典胶体科学中的扩散双电层理论很难描述纳米粒与体内物质的吸引与排斥。较为一致的看法是, 负电荷表面往往使纳米粒相对于正电荷或中性表面在体内更易被清除。表面带正电的粒子易与细胞膜上的负电荷相互吸引, 所以细胞容易粘合并有可能摄取这种粒子, 这一点对实体瘤的治疗很有意义。通过对静脉注射给药的分析可以看出, 正电性的粒子相对负电性粒子而言, 能与许多种血液成分相互作用, 这使得静脉注射给药后, 药物分布和在器官中积累模式发生了改变。同时, 能与细胞或膜发生反应的正电性纳米粒体系有望发展一些新的给药方式, 如粘膜给药。

本实验选用壳聚糖纳米粒作为载阿霉素体系, 壳聚糖在酸性条件下表面即带有大量正电荷, 制得的载药壳聚糖纳米粒样品经表面电位与粒度分析仪测定, 其表面电位为+52.1mV (见图 3.15)。这说明由于 $-NH_3^+$ 的存在, 纳米粒表面带有正电荷, 表面电位较大, 有利于纳米粒混悬液的稳定。同时, 带正电荷的纳米粒对给药后纳米粒在体内的分布也有利。

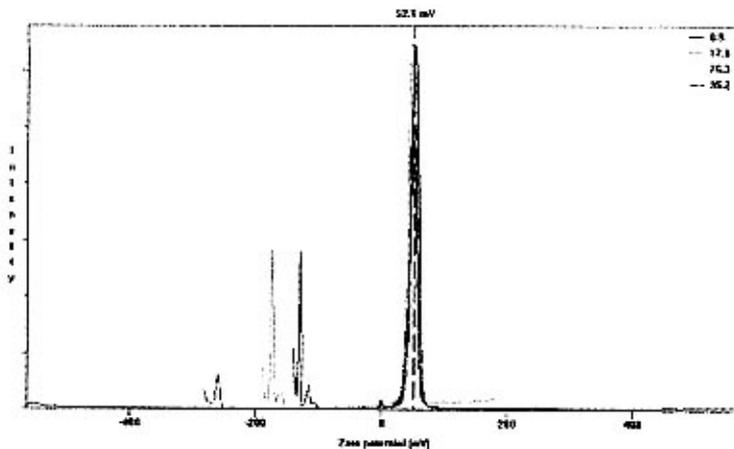


图 3.15 载阿霉素壳聚糖纳米粒表面电位图

3.2.6 载阿霉素壳聚糖纳米粒粒度稳定性分析

稳定性实指某种性质(如分散相浓度、颗粒大小、体系粘度和密度等)有一定程度的不变性。在此主要以聚集稳定性表征, 系指体系的分散度是否随时间变化而言。例如体系中含一定数目的细小微粒, 由于某种原因, 团聚在一起形成一个大粒子并不再被拆散开, 这时体系的分散度降低, 这称为体系的聚集稳定性变

差,反之,若体系中的细小粒子长时间不团聚,则体系的聚集稳定性好^[115]。

对 40℃下制备的载阿霉素壳聚糖纳米粒进行粒度稳定性分析,考虑其平均粒径随放置时间的变化,结果见表 3.2。

由表 3.2 数据可见,随放置时间的延长,纳米粒的平均粒径没有太大变化,说明粒度稳定性较好,放置过程中粒子间无聚集现象。这主要是因为粒子带正电,表面电位值较高(+52.1mV),有利于纳米粒混悬液的稳定。

表 3.2 纳米粒粒度稳定性数据

时间 (d)	平均粒径 (nm)
0	193
5	192
15	195
30	194
45	190

3.2.7 载阿霉素壳聚糖纳米粒靶向性分析

由于大小不同的药物(制剂)具有不同的穿透能力,可以在体内到达不同的部位,因此通过控制药物(制剂)颗粒的大小,可以达到一定的药物靶向目的。微粒或纳米粒系统主要被网状上皮细胞丰富的肝、脾、肺、骨髓等吸收,作为外来异物被巨噬细胞吞噬。颗粒的粒径直接影响其体内分布,比如粒径 $<5\mu\text{m}$ 的微粒可以通过肺,粒径 $<300\text{nm}$ 的纳米粒可以进入血液循环,粒径 $<100\text{nm}$ 的纳米粒能进入骨髓。要使纳米粒不被肝脏和脾脏的窦状小管截留,其粒径最好要小于 200nm 。但并不是纳米粒粒径越小越好,在粒径小于 70nm 时,纳米粒在肝脏的聚集现象已较为明显^[125]。

实验中,40℃下制备的纳米粒的粒度数据为 $D[4,3]=193\text{nm}$, $d(0.1)=65\text{nm}$, $d(0.5)=128\text{nm}$, $d(0.9)=0.292\text{nm}$,可见体积平均粒径 193nm ,50%的纳米粒的粒径小于 128nm ,绝大部分纳米粒的粒径在 300nm 以下。说明纳米粒基本上均可进入血液循环,大部分纳米粒不会被肝脏和脾脏的窦状小管截留,可延长其在体内的循环时间,其包载的药物进入除免疫系统之外的肿瘤病变部位的机会增加。

当然,尽管纳米粒系统有一定的靶向性,但这种靶向性只是被动的,为了提高其主动靶向性,可以通过制成单克隆抗体导向纳米粒或对纳米粒表面改性等手段实现。

3.2.8 载阿霉素壳聚糖纳米粒的体外释药研究

纳米粒中药物的释放机制一般认为有三种:(1)扩散,即药物由进入纳米粒的介质溶解后,经纳米粒中的孔道而扩散到介质中,这一过程基本上是物理过程,而纳米粒表面药物的溶解及扩散则是造成药物突释的原因;(2)纳米粒载体材料

的溶蚀，溶蚀的速率取决于材料的性质、介质的组成、pH 值、体积和温度等，是物理化学过程；(3) 纳米粒载体材料的降解，在此过程中纳米粒载体材料发生水解或在酶的作用下酶解（化学反应及生化反应），使药物释放出来。

对可生物降解壳聚糖纳米粒来说在体内药物的释放是一个比较复杂的过程，往往是几种释放方式共存，既有药物的扩散，又有纳米粒在酶的攻击下发生表面浸蚀或团块崩解，药物逐渐或迅速释放出来，需要针对具体的药物及给药途径具体分析。由于体内药物释放研究的复杂性，本文只进行了载阿霉素壳聚糖纳米粒的体外释放研究，以期为纳米粒在体内的释放行为提供一定的预见，同时比较不同载药纳米粒的释药差异和对药物释放机理作一定的探讨。

3.2.8.1 载阿霉素壳聚糖纳米粒体外释放过程分析

对前述最佳条件下制备的载阿霉素纳米粒在 PBS 缓冲液中进行体外释放研究，结果见图 3.16。

由图 3.16 可以看出，阿霉素的释放在最初几小时内有一快速释放，12 小时其累积释放率超过 10%，24 小时至 72 小时内阿霉素接近匀速释放，72 小时后阿霉素的释放变得非常缓慢，其最大累积释放量为 25.36%。初期阿霉素的快速释放，归因于吸附在纳米粒表面阿霉素的快速溶解和扩散，这对药物的快速起效是有利的。初期累积释放量不大，说明结合在纳米粒表面的药物比较少，绝大部分药物位于纳米粒内部，因此纳米粒可具有良好的缓释作用。中期阿霉素的近匀速释放是包裹在纳米粒内部的阿霉素通过纳米粒中孔隙的扩散所致。最后仍有相当量的阿霉素留在纳米粒中释放不出来，这说明阿霉素被壳聚糖分子与 TPP 紧密包封于纳米粒中，要使这部分阿霉素释放出来需要壳聚糖纳米粒的溶蚀或壳聚糖分子的降解。但由壳聚糖纳米粒稳定性实验中可知，壳聚糖纳米粒的粒径在几十天内未发生变化，这说明在没有酶存在下壳聚糖纳米粒的溶蚀或壳聚糖分子的降解是极其缓慢的，因此药物的释放主要靠药物的缓慢溶渗作用而使阿霉素释放率变化很慢。

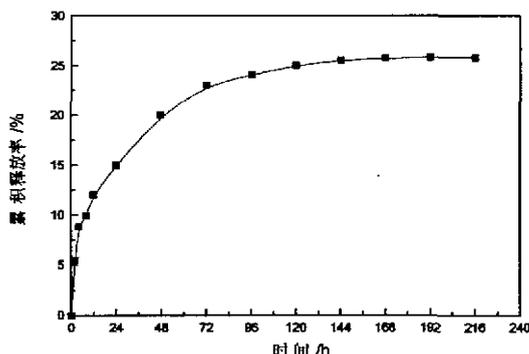


图 3.16 载阿霉素纳米粒体外阿霉素外释放曲线

为了探讨壳聚糖纳米粒的体外释放机制，分别按零级释放模型、一级释放模型以及 Higuchi 方程拟合其体外释放曲线，即将阿霉素的累积释放百分率 Q 对时间 t ， $\ln[1-Q]$ 对 t ，以及 Q 对 $t^{1/2}$ 进行进行回归分析，其结果分别为：

零级动力学方程：

$$Q = 9.7432 + 0.0991t (r = 0.8539)$$

一级动力学方程：

$$\ln[1 - Q] = -0.0914 - 0.0016t (r = -0.9001)$$

Higuchi 方程：

$$Q = 4.0562 + 1.9242t^{1/2} (r = 0.9698)$$

由体外释放机制研究可看出：4 小时内阿霉素的平均累积释放百分率 Q 与时间成一定线性关系 ($r = 0.9897$)，表明阿霉素在 4 小时内的体外释放基本符合零级动力学过程，即恒速释药，说明壳聚糖纳米粒具有一定的控释效果。此外，按 Higuchi 方程更能较好地描述壳聚糖纳米粒的体外释放曲线，即阿霉素的释放量与时间的平方根成直线关系，这符合水不溶性骨架的释药性能。

3.2.8.2 阿霉素用量对纳米粒体外释放的影响

前面已经讨论过阿霉素用量对包封率的影响，随着阿霉素用量增加，包封率增大。被包进纳米粒的阿霉素的量增多，必然会对纳米粒释放性能造成影响。

实验中对不同阿霉素用量 (0.4mg, 0.6 mg, 0.8 mg, 1.0 mg) 制备的纳米粒进行了体外释放研究，考察累积释放率随时间的变化，结果见图 3.17。

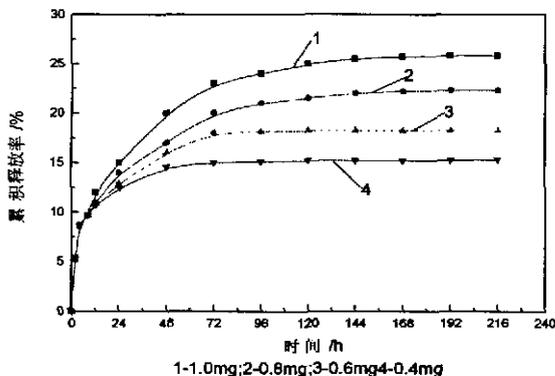


图 3.17 阿霉素初始用量对体外释放的影响

由图 3.17 可见，在开始的约 12h 内，四种纳米粒的释放情况较为一致，都有一个较快速释放阿霉素的过程，这是源于吸附在纳米粒表面阿霉素的快速扩散。在随后的时间内，开始产生明显差别，阿霉素用量越大，亦即纳米粒中包裹的药物越多，释放越快。到 72h 后，释放都变得缓慢，最终阿霉素用量越大的累

积释放越多。

产生这一现象的主要原因在于近匀速释放阶段药物浓度梯度的差别。如前所述，中期阿霉素的近匀速释放是包裹在纳米粒内部的阿霉素的扩散所致，阿霉素用量大的纳米粒内外阿霉素浓度差别大，扩散的驱动力也就大，使阿霉素得以快速释放。阿霉素用量越多的纳米粒，随着药物的释放其遗留在基体中的孔道越多，又会提高剩余药物的释放速度。因此，阿霉素用量越大，释放越快。同时，由于没有降解酶存在，后期阿霉素很难释放出来，使其累积释放率达到一较大值后基本维持不变。

3.2.8.3 壳聚糖脱乙酰度对体外释放的影响

前面研究了壳聚糖脱乙酰度对纳米粒粒径、包封率的影响，在此对分子量为60万具有不同脱乙酰度（deacetylation degree, DD）壳聚糖制备的载药纳米粒的体外释放进行研究，结果见图 3.16。

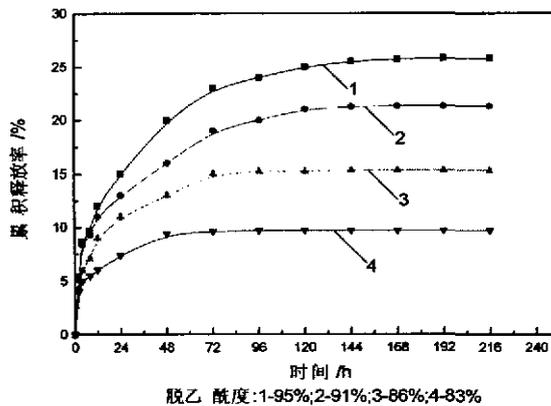


图 3.18 壳聚糖脱乙酰度对体外释放的影响

由图 3.18 可见，脱乙酰度不同，壳聚糖纳米粒药物的释放速度也不同。12 小时时，脱乙酰度 95%的壳聚糖纳米粒阿霉素释放率为 12%，而脱乙酰度 83%的壳聚糖纳米粒阿霉素释放率只有 6%。此后随着时间的延长，脱乙酰度的大的壳聚糖纳米粒药物释放速度相对增加较快，使不同脱乙酰度壳聚糖纳米粒药物累积释放量差距增大。

产生上述现象的原因在于，相同分子量的壳聚糖分子其脱乙酰度越大，分子链上-NH₃⁺的含量越高，即正电性越高，因此对同样带正电的阿霉素的排斥作用会更强，使阿霉素与纳米粒的结合相对较弱，阿霉素的释放速度也因此较快。这就使我们用不同脱乙酰度的壳聚糖制备释药速度不同的纳米粒成为可能。

3.2.8.4 壳聚糖分子量对体外释放的影响

壳聚糖是一种大分子天然聚合物，其分子量变化范围大，不同分子量壳聚糖

制备的载阿霉素纳米粒可能会有不同的药物释放性能。由图 3.19 可见,随着壳聚糖分子量的增加,壳聚糖载阿霉素纳米粒药物释放速度下降。在开始的 12 小时内,三种纳米粒的释药速度相近,这是因为三种纳米粒的粒径相差不大,比表面积相似,位于纳米粒表面或表层的药物的量和扩散速度相近。此后,随着释药时间的延长,三种纳米粒累积药物释放率的差异增大。到 144 小时时,由分子量分别为 80 万、60 万和 34 万的壳聚糖制备的载药纳米粒其累积释放率分别是 20.6%、25.5%和 34.7%,壳聚糖分子量越小,其纳米粒累积阿霉素释放率越大。由于相同脱乙酰度壳聚糖中 $-NH_3^+$ 的量是一样的,因此影响它们释药速度不同的原因应是分子量大小的不同,也即分子链长短的不同。分子量大的壳聚糖,其分子链长,与 TPP 交联缠绕更加紧密,其自身分子链内基团的相互作用也大,因此形成的纳米粒渗透性差,纳米粒对药物的包封更加紧密,所以药物的释放速度相对较慢。

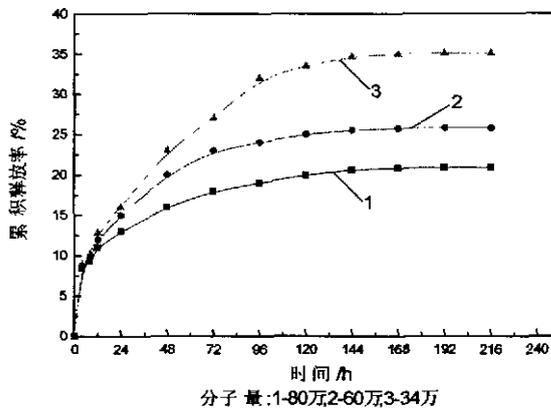


图 3.19 壳聚糖分子量对体外释放的影响

3.3 小结

(1) 通过实验研究发现先使阿霉素与 TPP 形成复合物,再将其包封于壳聚糖纳米粒中可使阿霉素包封率大幅度提高,确定了制备高包封率载阿霉素壳聚糖纳米粒的最佳条件:

形成阿霉素-TPP 复合物过程:温度 50°C ,保温时间 3min,体系 pH 值 8.0,阿霉素用量 1.0mg;载阿霉素纳米粒形成过程:除温度为 40°C 外其它条件与制备空白壳聚糖纳米粒相同。

(2) 在最佳条件下制备的壳聚糖载阿霉素纳米粒,阿霉素包封率为 82.73%,载药量 17.2%,纳米粒体积平均粒径为 193nm,粒子成球性好,粒径分布均匀,且具有一定的靶向性。纳米粒表面电位值为 $+52.1\text{mV}$,粒度稳定性好,长时间放

置粒径无变化。

(3) 通过对载阿霉素壳聚糖纳米粒的体外释放研究, 表明阿霉素的体外释放呈三段模式。在最初几小时内阿霉素有一快速释放, 12 小时其累积释放率可达 10%, 24 小时至 72 小时内阿霉素接近匀速释放, 72 小时后阿霉素的释放变得非常缓慢。初期阿霉素的快速释放对药物的快速起效是有利的, 初期累积释放量不大, 说明结合在纳米粒表面的药物比较少, 绝大部分药物位于纳米粒内部, 因此纳米粒具有良好的缓释作用。中期阿霉素的近匀速释放说明将药物包裹于纳米粒中起到了一定的控释效果。最后仍有相当量的阿霉素留在纳米粒中释放不出来, 说明阿霉素与纳米粒载体的结合比较紧密, 也体现了较好的包载效果。按 Higuchi 方程能较好地描述壳聚糖纳米粒的体外释放曲线, 即阿霉素的释放量与时间的平方根成直线关系, 符合水不溶性骨架的释药性能。

考察了阿霉素用量、壳聚糖脱乙酰度及分子量对药物释放的影响, 结果显示, 不同条件下制备的纳米粒的阿霉素释放速度有较大差别, 表明可根据实际需要制备具有不同释放阿霉素速度的壳聚糖纳米粒。

第四章 二元溶剂分散法制备 PLA、PLGA 纳米粒的研究

由于聚乳酸 (polylactic acid, PLA) 及聚乙交酯-丙交酯 (polylactic-co-glycolic acid, PLGA) 具有良好的生物相容性, 生物可降解性、性能的可调控性, 且其吸收和代谢机理已经明确并具有可靠的生物安全性, PLA 和 PLGA 已被美国 FDA 批准用于药物输送系统, 因而它们作为药物载体的报道已有不少。

尽管制备 PLA、PLGA 微粒的技术已较成熟, 但其纳米粒制备技术仍处于研究之中。目前, 虽然制备 PLA、PLGA 纳米粒的方法已有几种, 如乳化溶剂挥发法, 透析法, 相转移-界面沉淀法等, 但所有这些方法对制备过程中影响纳米粒粒径的因素都未做详细和深入的研究, 且都忽视了一点, 即由于纳米粒子的极大表面积易引起粒子聚集而使纳米粒的产率不高。本章研究了一种在水相中制备 PLA、PLGA 纳米粒的新方法——二元溶剂分散 (BSD) 法, 对影响纳米粒粒径和产率的因素进行了研究, 该方法的 PLA 和 PLGA 两种聚合物的纳米粒产率均大于 90%, 纳米粒平均粒径在 130~180nm 之间。

4.1 实验部分

4.1.1 试剂、材料及仪器

不同分子量和共聚比的 PLA 和 PLGA (成都航利生物材料研究所); 90%水解度和 500 聚合度的 PVA-124 为日本进口分装; 聚醚 Pluronic F-68 (医药级, ICN Biomedicals Inc. Aurora, Ohio); 脂肪酶 (北京华美生物工程公司); 其它试剂均为分析纯, 水为二次蒸馏水。

78-1 型磁力加热搅拌器 (江苏省金坛市正基仪器有限公司); 756MC 型紫外可见分光光度计 (上海分析仪器厂); SHZ-C 型循环水式多用真空泵 (河南省巩义市英峪予华仪器厂); ALV-5000/E 光散射测定仪; TGL-16G 型冷冻离心机 (上海玉成干燥设备有限公司); PHS-3C 型精密 pH 计 (上海雷磁仪器厂); MASTERSIZER 2000 激光散射粒度分析仪 (英国马尔文仪器有限公司); H-800 透射电镜 (日本日立公司)。

4.1.2 实验内容

4.1.2.1 PLA 和 PLGA 纳米粒的制备

将 0.2g PLA 或 PLGA 溶于由不同量丙酮和乙醇组成的 8mL 二元溶剂中, 搅拌下将所得聚合物溶液以每秒一滴的速度滴加入 40mL 1% F-68 水溶液中, 控制搅拌速度为 300r/min。滴加完后, 减压除去丙酮和乙醇, 得纳米粒混悬液。将所得纳米粒混悬液先于 1000r/min 低速离心除去大颗粒聚集物, 再在 16000r/min 速度下冷冻离心 25min, 沉淀用 25mL 蒸馏水洗涤。将沉淀物超声分散于 50mL 蒸

馏水中，真空下冷冻干燥得纳米粒。纳米粒产率由下式计算：

$$\text{纳米粒产率} = \frac{\text{纳米粒质量}}{\text{PLA或PLGA质量}} \times 100\%$$

4.1.2.2 粒径和粒径分布

MASTERSIZER 2000 激光散射粒度分析仪测定纳米粒平均粒径和粒径分布。冻干纳米粒粒径经超声分散于蒸馏水后测定。

4.1.2.3 PLA 和 PLGA 浊点的测定

用滴定法测定乙醇滴加入 PLA、PLGA 丙酮溶液中出现混浊时的浊点，具体步骤如下：2mL 不同浓度的 PLA 或 PLGA 丙酮液置于 20mL 试管中。摇动下连续滴加乙醇至丙酮溶液刚出现混浊，即 PLA 或 PLGA 刚刚开始沉淀时为终点。由此获得相应条件下 PLA 或 PLGA 达浊点时，乙醇占 PLA 或 PLGA 丙酮-乙醇混合溶液的体积分数 $\varphi(\text{eth})'$ 。

4.1.2.4 纳米粒的稳定性评价

纳米粒在电解质中的稳定性通过加入等量、但不同浓度的 Na_2SO_4 溶液进行评价。将 0.5mL 的纳米粒混悬液加入到 2.5mL（浓度从 0~0.9mol/L）的 Na_2SO_4 溶液中，摇匀，15 分钟后，用紫外可见分光光度计在 400nm 处测试溶液的浑浊度。临界絮凝点（CFPT）为浑浊度突然增加时的电解质浓度。

4.1.2.5 纳米粒的酶降解

用蒸馏水配制浓度为 0.01% 和 0.02% 的脂肪酶水溶液。

取纳米粒混悬液 2 mL，加入 15 μL 脂肪酶水溶液，用 ALV-5000/E 光散射测定仪，观察散射光强随浓度的变化情况，每隔一定时间记录一次光强。同时观察粒子尺寸变化情况。测试条件：角度 30 度，温度 25 $^{\circ}\text{C}$ 。

4.2 结果与讨论

4.2.1 PLA、PLGA 纳米粒制备方法选择

目前，有关 PLA、PLGA 微球的制备方法已有较多的研究和报道，而有关 PLA、PLGA 纳米粒的制备方法却不多，方法的分类也不太明确和科学。综合国内外文献，我们认为除通过调整微球制备工艺参数以期制备粒径符合要求的纳米粒外，目前 PLA、PLGA 纳米粒的制备方法主要有以下三种：

(1) 乳化溶剂挥发法^[125,126]

对于脂溶性药物，直接将其溶于 PLA、PLGA 的二氯甲烷溶液中，再将此有机相加入含有乳化剂的水相，经高速搅拌或超声乳化方式制成 O/W 乳状液，最后挥发除去有机溶剂二氯甲烷，PLA、PLGA 固化成纳米粒；对于水溶性药物，则将药物的水溶液或缓冲溶液加至 PLA、PLGA 的二氯甲烷溶液中，搅拌成 W/O 乳状液。再将此初乳液加到含有乳化剂的水溶液中，经高速搅拌乳化得到 W/O/W

型复乳。最后经挥发除去有机溶剂二氯甲烷、离心、洗涤和干燥可得到所需纳米粒。

(2) 透析法^[127]

将药物和 PLA、PLGA 溶于有机溶剂（二甲基甲酰胺、二甲基乙酰胺、二甲基亚砷等）中，转移入透析管，将透析管置于蒸馏水中透析一定时间，即可获得载药纳米粒。

(3) 相转移-界面沉淀法^[128]

将药物和 PLA、PLGA 溶于丙酮等有机溶剂中构成有机相，搅拌下将其加入含有表面活性剂的水相中，挥发除去有机溶剂即得纳米粒。

目前，在 PLA、PLGA 纳米粒制备中，应用的最多的是乳化溶剂挥发法。该方法的优点是对于水溶性和脂溶性药物都适用，通过控制水相和有机相两相体积比、聚合物浓度、表面活性剂种类等因素有时能获得良好的药物包封率，但缺点是需用较多的有机溶剂及高速匀化设备或高功率超声分散仪，所得纳米粒粒径较大且粒径分布宽。透析法可制备粒径较小、分布窄的纳米粒，但需用到一些特殊的有机溶剂，且耗时长。相转移-界面沉淀法不需要使用高速匀化设备或高功率超声分散仪，可获得粒径较小且分布范围窄的纳米粒。

因此，通过分析比较，实验先选用相转移-界面沉淀法作为 PLA、PLGA 纳米粒的制备方法，并通过研究工作对它进行了改进，提出了二元溶剂分散法，详细研究了多种因素对纳米粒粒径和产率的影响。

4.2.2 乙醇的加入对纳米粒粒径和产率的影响

实验中先采用文献报道^[128]的方法制备 PLA、PLGA 纳米粒，发现不论是聚合物材料为何种，在滴加聚合物丙酮溶液于水相中，生成纳米粒的同时总会有不少量的 PLA、PLGA 聚集成团，也就是说有不少量的 PLA、PLGA 没有生成纳米粒而损失浪费掉了。由于 PLA 和 PLGA 是合成所得，成本较高，所以如需实际应用必须尽可能减少它们的损失。

经过实验研究发现，如果在 PLA、PLGA 丙酮溶液中加入一定量的乙醇、甲醇，再将其滴入水中制备纳米粒时可明显减少颗粒团状物的量，即乙醇、甲醇的加入能提高纳米粒的产率，降低聚合物材料的损失。考虑到甲醇的毒性可能会影响纳米粒在载药系统上的应用，选择了乙醇进行深入详细的研究。

表 4.1 一般制备方法 PLA、PLGA 纳米粒的产率

聚合物	共聚比	分子量	产率/%
PLA	-	7500	58.28
PLA	-	15000	52.46
PLA	-	25000	35.53
PLGA	75/25	10000	72.59
PLGA	75/25	15000	69.54
PLGA	75/25	25000	60.18
PLGA	50/50	7500	77.31
PLGA	50/50	15000	73.62
PLGA	50/50	25000	66.58

共聚比 (LA/GA): 聚合物中乳酸与与羟基乙酸的比例

4.2.2.1 乙醇的加入对纳米粒产率的影响

为阐明乙醇加入丙酮中对纳米粒产率的影响, 用 PLA 和 PLGA 进行了以下研究。实验中, 先将 PLA、PLGA 溶于由乙醇和丙酮组成的二元溶剂, 再将聚合物溶液滴加分散于水相。用不同乙醇体积分数 ($\varphi(\text{eth})$) 的乙醇和丙酮混和溶液, 制备了三种不同共聚比的 PLA、PLGA 纳米粒。图 4.1 是纳米粒产率与丙酮中加入的乙醇量 $\varphi(\text{eth})$ 值的关系图。由图可见, 不同的聚合物条件下纳米粒产率均随乙醇体积分数的增大而提高, 并当 PLA, PLGA (75/25) 和 PLGA (50/50) 的 $\varphi(\text{eth})$ 分别为 45%, 40% 和 20% 时产率达最大值。

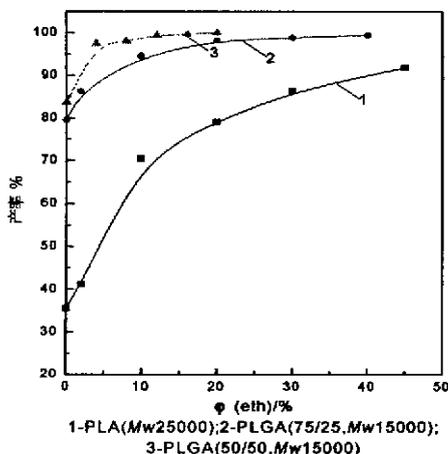


图 4.1 $\varphi(\text{eth})$ 对纳米粒产率的影响

由于乙醇较丙酮的极性大, 其在水中的分散速度大于丙酮, 二元溶剂中乙醇浓度的增加可加快 PLA 或 PLGA 液滴的扩散速度。那么是否 $\varphi(\text{eth})$ 可持续增加呢, 实际上是不可能的, 由于 PLA、PLGA 在乙醇中的溶解度较小, 因此当 $\varphi(\text{eth})$

增加到一定程度时, PLA 或 PLGA 会从乙醇和丙酮的混和溶液中沉淀出来, 不可能再滴加于水相中制备纳米粒。因此需先滴定测定乙醇滴入 PLA 或 PLGA 丙酮溶液中, 出现 PLA、PLGA 沉淀时的乙醇体积分数, 即 $\varphi(\text{eth})'$ 值。实验测定了几种聚合物在它们各自不同浓度下的 $\varphi(\text{eth})'$, 结果见图 4.2。由图 4.2 可见, 对于同一种聚合物 $\varphi(\text{eth})'$ 值随 PLA 和 PLGA 浓度的增大较缓慢的下降, 但同一种浓度下不同聚合物的 $\varphi(\text{eth})'$ 有较大差异。聚合物 PLA 体系中的 $\varphi(\text{eth})'$ 值高于 PLGA (75/25) 和 PLGA (50/50) 体系中的 $\varphi(\text{eth})'$ 。这差异正是纳米粒产率达最大值时 PLA ($M_w 25000$) 体系中乙醇体积分数 (45%), 大于 PLGA (75/25) 体系中乙醇体积分数 (40%) 和 PLGA (50/50) 体系中乙醇体积分数 (20%) 的原因。

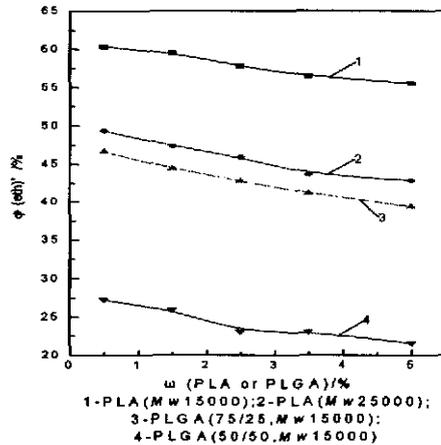


图 4.2 PLA 或 PLGA 浓度和 $\varphi(\text{eth})'$ 的关系

当 PLA 或 PLGA 溶液滴加分散于水溶液时, 由于乙醇和丙酮迅速地穿越两相界面, 显著地降低了界面张力, 自发形成纳米级 PLA 或 PLGA 液滴。在这过程中, 由于乙醇与 PLA 和 PLGA 的相溶作用力低于丙酮, 乙醇优先由液滴中向水中扩散。然后丙酮开始扩散, 迅速地穿越两相界面, 而处于液滴中的 PLA 或 PLGA 则由于乙醇和丙酮的扩散而去溶剂化, 使疏水的聚合物分子暴露于水环境下开始沉积, 最后是 PLA 或 PLGA 完全固化形成纳米粒。随 $\varphi(\text{eth})$ 值增加, 聚合物溶液中乙醇含量增大, PLA 和 PLGA 溶液的分散更易于进行, PLA 或 PLGA 微液滴中溶剂的扩散速度加快, 可产生更多纳米级的液滴并快速形成 PLA 和 PLGA 纳米粒而使纳米粒产率增大。

因此, 总是期望用较高 $\varphi(\text{eth})$ 值的二元溶剂制备 PLA 和 PLGA 纳米粒。但 $\varphi(\text{eth})$ 有一上限值, 也就是前面所述的当乙醇量不断增加至 PLA 或 PLGA 开始沉淀时的 $\varphi(\text{eth})'$ 。所以, 实验中 $\varphi(\text{eth})$ 与 $\varphi(\text{eth})'$ 的比值 x ($x = \varphi(\text{eth}) / \varphi(\text{eth})'$)

') 与纳米粒产率有关。经测定，在丙酮和乙醇二元溶液中 PLA (M_w 25000)、PLGA (75/25, M_w 15000) 和 PLGA (50/50, M_w 15000) 的 $\varphi(\text{eth})'$ 值分别为 45.95%，42.86%，23.08%。

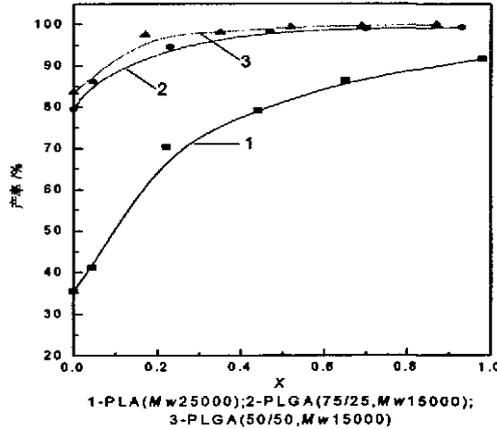


图 4.3 X 值和纳米粒产率的关系

图 4.3 是由纳米粒产率对 x 值作图而得。从中可见纳米粒产率随 x 值增加而提高，并当 x 接近 1.0 时达最大值。x=1 时意味着二元溶剂组成与达到 PLA 或 PLGA 浊点时组成一样的极限条件。这表明制备不同聚合物纳米粒，纳米粒产率最高时二元溶剂的组成为其浊点时的组成。

4.2.2.2 乙醇的加入对纳米粒粒径的影响

研究中还发现，乙醇的加入不仅可提高纳米粒产率而且对纳米粒也有较大影响。为此用不同乙醇体积分数 ($\varphi(\text{eth})$) 的乙醇和丙酮混和溶液，制备了分子量均为 15000 的三种不同共聚比的 PLA 和 PLGA 纳米粒。图 4.4 是纳米粒平均粒径与二元溶剂的 $\varphi(\text{eth})$ 值的关系图，在所有实验中聚合物浓度 $\omega(\text{PLA})$ 或 $\omega(\text{PLGA})$ 均固定为 2.5%。从图中可看出纳米粒粒径均随 $\varphi(\text{eth})$ 的增加而减小，并于 PLA、PLGA (75/25) 和 PLGA (50/50) 的 $\varphi(\text{eth})$ 分别为 55%，40% 和 20% 时粒径达最小值。 $\varphi(\text{eth})$ 值从 0 增加到 20%，PLGA (50/50) 纳米粒平均粒径由 191nm 降到 162nm，随着 $\varphi(\text{eth})$ 值从 0 增加到最大值，PLGA (75/25) 和 PLA 纳米粒的平均粒径分别由 271nm 减小到 170nm，231nm 减小到 131nm。这同样是由于乙醇的亲水性较丙酮大，随二元溶剂中乙醇浓度的增大可加速分散过程中 PLA 或 PLGA 乳滴的分散，有利于纳米粒的快速形成并避免因小粒子的聚集而导致较大粒径纳米粒的产生。

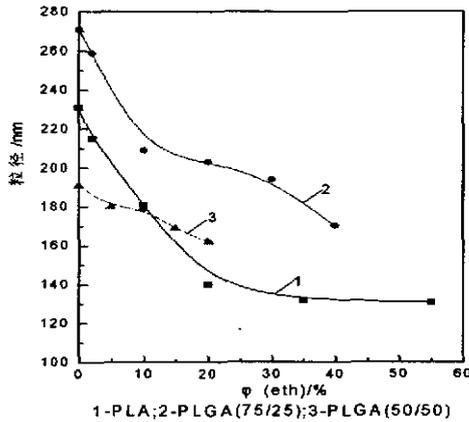


图 4.4 $\varphi(\text{eth})$ 和纳米粒粒径的关系

4.2.3 不同种类 PLA、PLGA 纳米粒的二元溶剂分散法制备

对于不同聚合物 PLA、PLGA，其二元溶剂体系有不同的 $\varphi(\text{eth})'$ 值，因此用它们制备纳米粒时分别具有不同的极大 $\varphi(\text{eth})$ 值。实验中在不同聚合物各自最大的 $\varphi(\text{eth})$ 条件下，制备了聚合物纳米粒，结果见表 4.2，图 4.5。从表 4.2，图 4.5 可看出，所有聚合物纳米粒的平均粒径均小于 180nm 并具有较窄的粒径分布，这可说明采用二元溶剂分散法制备纳米粒基本不受共聚比和聚合物种类等因素的影响。聚合物分子量和共聚比的差异对纳米粒粒径无显著影响，只是随聚合物分子量的增加聚合物纳米粒粒径略有增大。

表 4.2 二元溶剂分散法制备的 PLA 和 PLGA 纳米粒的性质

聚合物	共聚比	分子量	$\varphi(\text{eth})/\%$	粒径/nm
PLA	-	7500	50	155
PLA	-	15000	20	140
PLA	-	25000	45	157
PLA	-	40000	40	160
PLGA	75/25	10000	50	169
PLGA	75/25	15000	40	170
PLGA	75/25	25000	30	175
PLGA	50/50	7500	25	148
PLGA	50/50	15000	20	162
PLGA	50/50	25000	15	167

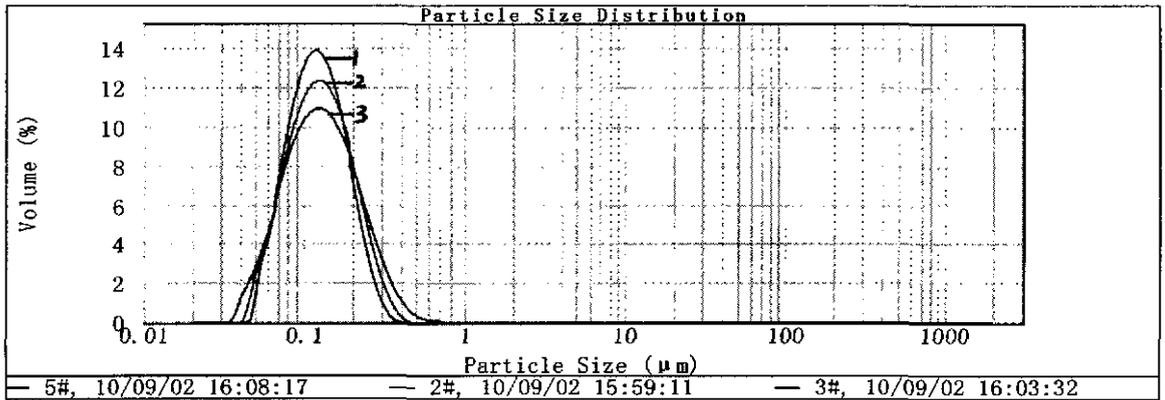


图 4.5 二元溶剂分散法制备的 PLA、PLGA 纳米粒粒径分布图

纳米粒产率和 PLA 或 PLGA 分子量的关系见图 4.6。从图中可见，PLGA 纳米粒产率随分子量增加缓慢降低，而 PLA 的分子量对其纳米粒产率有较大影响。当 PLA 的分子量大于 15000 后，其亲水性较差，则其有机相溶液在水中的分散性差，在分散过程中由于纳米粒的聚集导致其产率急剧下降。聚合物中较亲水部分随羟基乙酸链段的增加而增大，因此减少了纳米粒聚集的可能性从而使纳米粒产率提高，这是相同分子量但不同共聚比聚合物纳米粒产率差异的原因。在同一共聚比下，纳米粒产率随分子量的增加而降低，这是由于在分散过程中，大分子量聚合物液滴的分散速度较慢，使粒子凝聚的可能性增加。即使这样，二元溶剂分散法不论聚合物为何种，当其分子量小于 15000 时均仍能得到高产率（95%）的 PLA 和 PLGA 纳米粒。

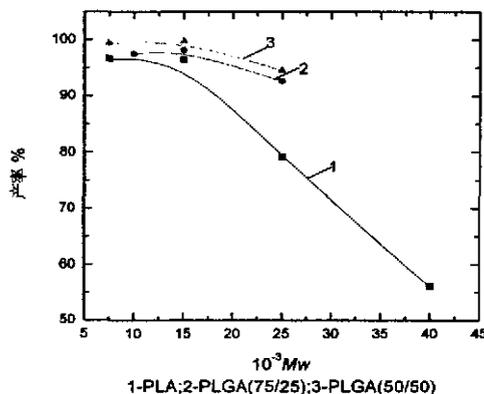


图 4.6 纳米粒产率和 PLA 或 PLGA 分子量的关系

4.2.4 表面活性剂对纳米粒制备的影响

因在溶剂扩散挥发过程中，溶液体积逐渐减小而引起分散液滴的粘度增加。这可能使液滴在溶剂挥发的早期阶段发生凝聚和团聚而影响纳米粒粒径和产率。

通过加一种分散稳定剂于水相,在液滴表面形成一薄薄的保护层可减小它们的凝聚。实验中选取了 F-68 和 PVA 两种表面分散剂,固定水相体积,研究分别改变分散稳定剂 F-68 和 PVA 浓度的影响,实验结果分别见表 4.3 和表 4.4。由表 4.3 可知 PLA、PLGA 纳米粒粒径随 F-68 浓度增加变化不大,但纳米粒产率却随 F-68 浓度的增加而上升。这是因为在低 F-68 浓度时一些乳化液滴聚集成大粒子而非纳米粒,但随 F-68 浓度的增加,覆盖在液滴表面的 F-68 分子增多,从而能有效的防止液滴的凝聚而生成大粒径的粒子。

表 4.3 F-68 质量分数对纳米粒制备的影响*

ω (F-68) /%	PLGA(50/50)		PLGA(75/25)		PLA	
	平均粒径/nm	产率/%	平均粒径/nm	产率/%	平均粒径/nm	产率/%
0.0	142	90.3	151	93.0	135	94.7
0.5	138	96.7	160	97.1	122	98.2
1.0	139	99.2	158	99.3	130	100
2.0	159	99.8	169	99.6	141	100

* PLGA(50/50), PLGA(75/25)和 PLA 分子量均是 15000

从表 4.4 可看出,对于 PVA 所得聚合物纳米粒与 F-68 有相似的结果,这进一步说明了纳米粒形成是非常快速的,不同分散稳定剂对其粒径和产率的影响基本相同。

表 4.4 PVA 质量分数对纳米粒制备的影响*

ω (PVA) /%	PLGA(50/50)		PLGA(75/25)		PLA	
	平均粒径/nm	产率/%	平均粒径/nm	产率/%	平均粒径/nm	产率/%
0.0	138	90.1	154	92.6	137	94.5
0.5	140	97.0	162	97.3	128	98.0
1.0	139	99.5	158	99.2	135	100
2.0	162	100	170	99.4	140	100

* PLGA(50/50), PLGA(75/25)和 PLA 分子量均是 15000

4.2.5 搅拌速度对纳米粒粒径的影响

研究中选取了几种不同聚合物,在它们各自最佳的 φ (eth)条件下,研究了不同搅拌速度对纳米粒粒径和产率的影响。

表 4.5 搅拌速度对纳米粒粒径的影响*

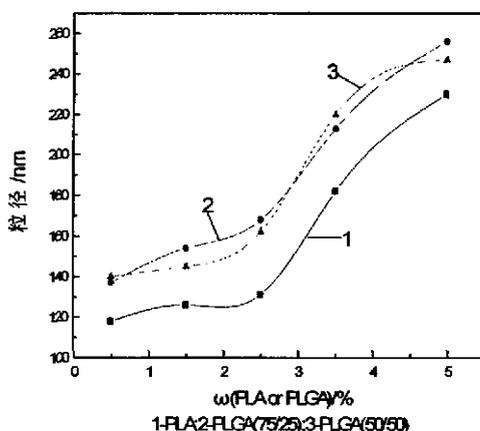
搅拌速度 r/min	PLGA(50/50)		PLGA(75/25)		PLA	
	平均粒径/nm	产率/%	平均粒径/nm	产率/%	平均粒径/nm	产率/%
100	180	88.1	197	86.4	183	87.5
200	169	95.0	179	94.6	162	94.0
300	137	99.7	161	99.5	130	99.6
400	140	99.5	160	99.4	137	99.8
500	135	99.4	164	99.4	135	99.5

* PLGA(50/50), PLGA(75/25)和 PLA 分子量均是 15000

在较低搅拌速度下, 所得不同聚合物纳米粒粒径较大, 纳米粒产率也较低。当搅拌速度增加到 300 r/min 后, 随搅拌速度的继续增大, 纳米粒粒径和产率基本不再变化。这是因为, 在低速搅拌时, 滴入水中的聚合物溶液完全分散于整个水相的时间较长, 同时搅拌速度低也使形成的聚合物液滴较大, 因此生成的纳米粒粒径较大并伴随有大颗粒物的生成致使纳米粒产率低。当搅拌速度达到一定值后, 滴入水中的聚合物溶液能快速均匀分散于整个水相, 而只要液滴分散开了其生成纳米粒速度是很快的, 所以能得到粒径小且产率高的纳米粒, 并且不再随搅拌速度的增加而变化。

4.2.6 聚合物浓度对纳米粒粒径的影响

在分子量均为 15000 的不同聚合物的各自最佳纳米粒制备条件下进行实验, 研究了不同聚合物浓度对纳米粒粒径的影响



4.7 聚合物浓度对纳米粒粒径的影响

聚合物浓度低时, 丙酮乙醇溶液粘度低, 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。随聚合物浓度增大, 丙酮乙醇溶液粘度增大, 表面张力也变大, 不利于聚合物溶液在水相中的分散, 故而生成的纳米粒粒径较大。当聚合物的浓度大到一定值后, 就有可能形成大的聚集体而不是纳米微粒。在实验中, 浓度大于 3% 的聚合物溶液滴加到水相中, 形成的纳米粒粒径大于 200nm, 同时有非纳米的絮状沉淀出现。因此必须控制聚合物丙酮乙醇溶液的浓度, 才能得到理想的纳米微粒。

所以, 为了制备获得较小粒径的纳米粒, 需选择较小的聚合物浓度。

4.2.7 聚合物溶液滴加速度对纳米粒形成的影响

在制备纳米粒的过程, 随着聚合物溶液逐渐滴加到水相中, 体系的颜色由无色变为淡蓝色, 随着滴加量的增加, 颜色也逐渐加深, 说明在滴加的过程中形成

了纳米粒。聚合物溶液滴入水相中即立刻快速分散，其中的 PLA、PLGA 则固化形成纳米粒，这是一个十分快速的过程，但聚合物溶液滴加速度太快对纳米粒的形成必有影响。

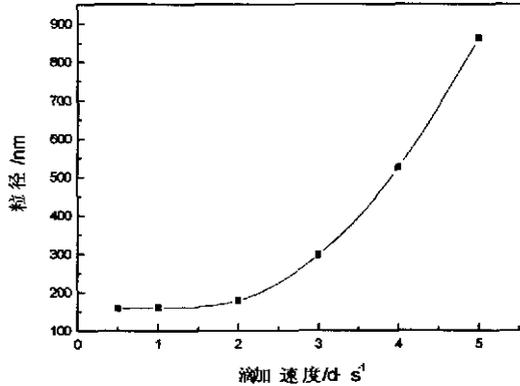


图 4.8 聚合物溶液滴加速度对纳米粒粒径的影响

实验中选取 PLA ($M_w 15000$) 进行研究，由图 4.8 可见，聚合物溶液滴加速度越快，纳米粒粒径越大。当滴加速度小于 2 滴/秒时，滴加入水相中的聚合物溶液在搅拌下能快速分散开，因此可生成粒径小的纳米粒。随聚合物溶液滴加速度的增大，滴加入水相中的聚合物溶液不能及时分散开，局部聚合物浓度大而形成大粒径的纳米粒。当聚合物溶液滴加速度大于 4 滴/秒时，可观察到水面上出现一薄层聚合物膜，经搅拌而形成团状物。所以，聚合物溶液滴加速度太大不仅生成的纳米粒粒径大，而且其产率也会下降。

4.2.8 温度对纳米粒粒径的影响

在室温左右时，纳米粒粒径受温度变化的影响不大，这是因为聚合物液滴分散和纳米粒形成的速度很快。而温度稍高时，升高水相的温度，可以有效的降低水的表面张力，使乙醇和丙酮的扩散速度增加，同时，升高温度也降低了聚合物溶液的粘度，有利于其分散成更小的液滴，从而形成粒径较小的纳米粒。这一解释和实验结果是一致的。实际上从表 4.6 中数据也可看出，室温下制备的纳米粒粒径与稍加热时制备的纳米粒粒径小不了多少，也可获得小于 200nm 的纳米粒。

温度再升高，接近丙酮沸点时，由于丙酮的快速挥发，聚合物液滴甚至来不及扩散就有聚合物析出，因此生成的纳米粒不仅粒径大而且产率低（有明显大颗粒团状物出现）。

表 4.6 温度对纳米粒粒径的影响

温度/℃	聚 合 物		
	PLGA(50/50)	PLGA(75/25)	PLA
20	140	169	142
30	138	165	136
40	124	150	128
50	127	142	130
60	216	229	195

4.2.9 有机相挥发方式对纳米粒粒径的影响

聚合物溶液滴加于水相中，由于丙酮和乙醇与水能互溶，为使聚合物能完全析出生成纳米粒需除去大部分丙酮。丙酮的挥发除去可在搅拌下自然挥发除去，也可通过旋转发器减压挥发除去。实验中研究了两种方式对纳米粒粒径的影响。

表 4.7 有机相挥发方式对纳米粒粒径的影响

聚合物	粒径/nm	
	自然挥发	减压挥发
PLA	137	135
PLGA (75/25)	170	175
PLGA (50/50)	163	159

由表可见，丙酮挥发方式对纳米粒粒径没什么影响，无论用那种方式都可获得相同大小的纳米粒。这是因为 PLA、PLGA 在水中不溶解，聚合物溶液滴加入水相后，经短时间的搅拌有机溶剂扩散开后，PLA、PLGA 纳米粒就基本完全形成。挥发方式的不同只对丙酮的除去速率产生较大差异，而对聚合物纳米粒的形成却没有影响。

4.2.10 相对对纳米粒粒径的影响

在有机相中聚合物浓度固定的情况下，改变水相与有机相的相比（水相/有机相），研究其对纳米粒粒径的影响。

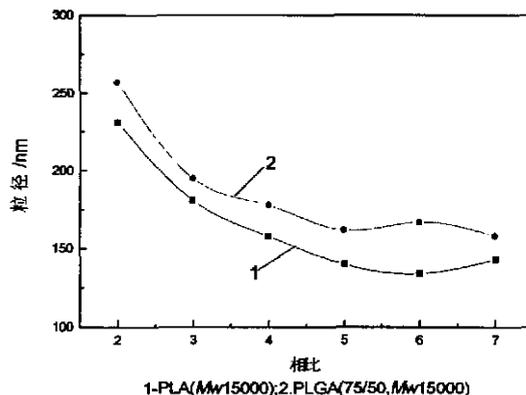


图 4.9 相对对纳米粒粒径的影响

由图 4.9 可知，随相比的减小，聚合物纳米粒粒径变大。在有机相聚合物浓度不变的情况下，相比减小，也就是起分散作用的连续水相体积减少，相对来说聚合物的量有所增加，因此难免造成对聚合物液滴分散的不利，同时单位体积内聚合物液滴增多聚集的可能性加大，这就使生成的纳米粒粒径变大。

4.2.11 PLA、PLGA 纳米粒稳定性的表征

由于在体内循环的纳米粒环境介质不是单一的水，成分较复杂，血液中有大量的电解质，因此有必要考察纳米粒在电解质中的行为，特别是稳定性能。

PLA、PLGA 纳米粒在不同电解质浓度下的稳定性，可以通过在纳米粒水溶液中加入电解质 Na_2SO_4 来表征。从图 4.10 可看出，纳米粒的稳定性和临界絮凝点 (CFPT) 随着聚合物中羟基乙酸链段的增加稍有所降低，但它们 CFPT 点时的电解质 Na_2SO_4 浓度都大于 0.7mol/L 。

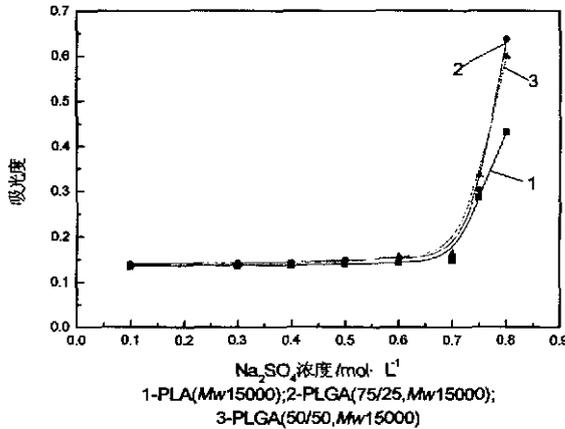


图 4.10 不同聚合物纳米粒在电解质中的稳定性

对于聚合物纳米粒，粒子表面有表面活性剂存在是纳米粒在水溶液中稳定，不易凝聚的原因。由于 F-68 是水溶性表面活性剂，在有电解质存在时，其在水中的溶解性会降低。这是因为加入电解质后，F-68 中较亲水性的聚氧乙烯链段溶剂化程度降低，水分子会被挤走，从而使链段间产生吸引而引起凝聚最终使纳米粒沉淀析出。三种聚合物纳米粒 CFPT 点时的电解质 Na_2SO_4 浓度都大于 0.7mol/L ，远高于血液中电解质的浓度，说明它们都能在血液电解质浓度下稳定存在。

4.2.12 纳米粒的脂肪酶降解研究

PLA、PLGA 等脂肪族聚酯由于可方便地通过控制组成、分子量、结晶度等参数来调节降解速度，因而降解速度可控，产品性能多样，是目前应用最广泛的生物降解高分子。

生物降解高分子通常是因为其分子主链中含有不稳定的化学键，从而可因外

界环境的影响,由于主链上键的断裂,而逐步分解成小分子物质,以至被机体吸收。生物降解高分子的降解主要是包括水解,以及由于酶的存在而促进的水解,即酶解两种方式。对于脂肪族聚酯的水解降解已有很多报导,其中包括在酸性环境下的酸催化机理、在碱性环境下的碱催化机理以及自催化机理等^[129-131]。但关于聚酯的酶解报道并不多,酶与聚酯的具体作用机制还不十分清楚,但通常认为酶分子只有在与聚酯分子发生充分接触时,才能有效地发挥作用,因此材料的表面大小对于酶降解有非常重要的影响。

研究中以 PLA、PLGA 等脂肪族生物降解高分子为材料制备纳米粒,研究纳米粒在脂肪酶作用下的降解行为,并且对不同脂肪族聚酯高分子在酶作用下的降解行为进行了比较。

4.2.12.1 不同聚合物纳米粒酶降解的比较

散射光强与单位体积的纳米粒子的数目成正比,所以散射光强的减小表明纳米粒的数目在减少。由于在测试过程中,纳米粒的大小没有变化,表明没有聚集现象发生。图 4.11 为 PLA 均聚物和 PLGA 共聚物纳米粒在加入脂肪酶(0.01%)后,散射光强随时间的变化曲线。由于散射光强随时间而减小,可以说明,聚合物纳米粒在酶的作用下发生了降解。从图 4.11 中还可看出,PLA 均聚物纳米粒降解速度最慢,PLGA(75/50)纳米粒降解速度居中,PLGA(50/50)纳米粒降解速度最快。即随着聚合物分子中羟基乙酸比例的增大,聚合物纳米粒降解速度加快。

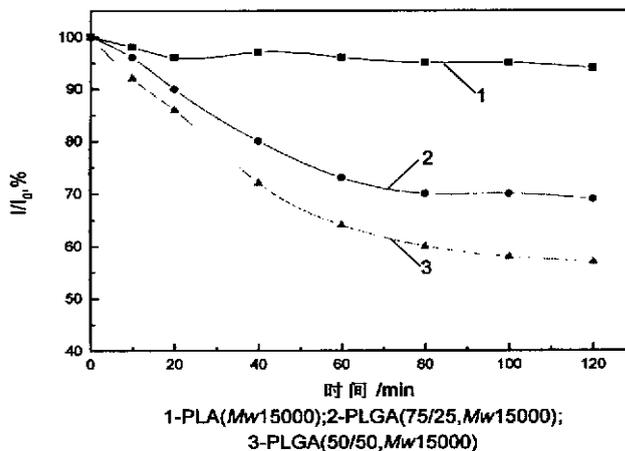


图 4.11 不同聚合物纳米粒酶降解速度比较

一般情况下在酶降解时需要酶分子必须与降解材料充分接触,对于脂肪族聚酯,酶的作用部位是酯键。虽然酶降解的具体作用机制到目前为止还不完全清楚,但从 PLA 和 PLGA 的结构看,主要差别在于 PLA 的主链上含有甲基侧基,而随

分子中羟基乙酸比例的增加甲基侧基的数目减少。因此对于 PLA 分子，大分子酶在与酯键作用时受到的空间位阻大，有效接触较少，因此其纳米粒降解速度慢；随聚合物分子中羟基乙酸比例的增加，聚合物亲水性增大，大分子酶在与酯键作用时受到的空间位阻减小，有效接触面积增大，因此其纳米粒降解速度加快，所以 PLGA (50/50) 纳米粒降解的最快。另外从 PLGA 材料的性能来看，PLGA 是乳酸与羟基乙酸两种单体无规共聚后的产物，破坏了原均聚物的分子规整性，结晶度大大降低乃至完全失去结晶性。PLGA 组成中乳酸与羟基乙酸各为 50% 的共聚物分子，达到最大限度的无规结构，完全变成无定形态，其各种性能变化出现转折，也使其降解速度比 PLA 要快得多。

4.2.12.2 不同酶浓度对 PLGA 纳米粒降解行为的比较。

图 4.12 为不同酶浓度对 PLGA (75/25, M_w 15000) 纳米粒的酶降解行为比较。由于在酶降解过程中，酶被逐渐的消耗，因此只有在酶加入量增加的情况下，才可以补充酶的消耗而使降解更为彻底。从图 4.12 中可看出，在不加入脂肪酶的情况下，纳米粒在实验时间范围内基本没有降解。当酶浓度为 0.01% 时，纳米粒降解程度大约为 30%，而当酶的浓度增加到 0.02% 时，纳米粒子降解可以达到近 40%。同时随着酶浓度的增加，纳米粒子的降解速度也明显加快，表明聚合物纳米粒表现出对于酶浓度的依赖性。这是因为酶浓度增加，其与聚合物分子中酯键接触的机会加大，所以纳米粒降解速度加快。

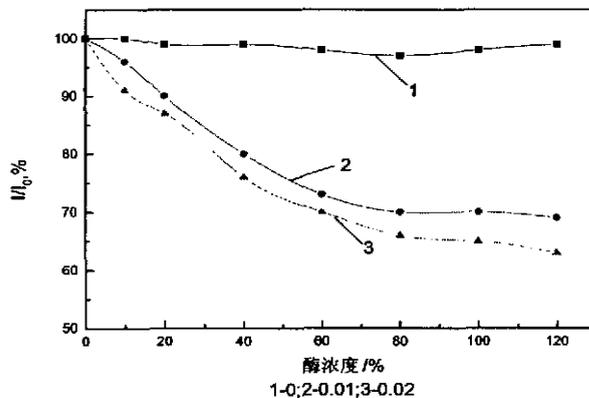


图 4.12 不同酶浓度聚合物纳米粒酶降解速度比较

4.2.12.3 纳米粒结构与酶降解机制的探讨

从纳米粒的成形过程看，纳米粒是由于高分子聚合物溶液中的有机溶剂向水中扩散而成的，因此可以认为所得到的纳米粒子只是一种高分子聚集体，其虽然具有一定的密度，但其密度并不很大，实际上是介于溶液线团与固体之间的物质。因此从总体上看，其结构比较疏松。由于在酶降解实验中，没有明显观察到纳米

粒在酶降解过程中粒径的变化。而如果酶的降解发生在纳米粒的表面,则纳米粒的粒径应该逐渐减小。因此可以认为纳米粒的酶降解是在纳米粒表面和内部同时发生的,即纳米粒的降解为均相降解,这与文献的报道^[132]是一致的,即当水的渗透速率快于高分子链的水解时,发生均相降解。由于纳米粒的结构有一定疏松性,酶分子可以进入其内部,作用于聚合物分子链上的酯键,从而使得聚合物材料降解,纳米粒也就随之消失。

4.3 小结

本章研究用二元溶剂分散法制备不同分子量、共聚比的 PLA、PLGA 聚合物纳米粒,考察了该制备方法对纳米粒产率、粒径的影响,并对纳米粒的稳定性和在酶作用下的降解进行了研究。

(1)用浊点滴定法阐明了乙醇加入丙酮溶液中对纳米粒粒径和产率的影响。研究表明纳米粒产率随丙酮溶液中乙醇量的增加而提高,并当乙醇量接近 PLA、PLGA 浊点时达最大,而纳米粒粒径却随丙酮溶液中乙醇量的增加而减小,并当乙醇量接近 PLA、PLGA 浊点时达最小。因此,可通过滴定测定 PLA、PLGA 浊点,从而确定制备具有较高产率和较小粒径的聚合物纳米粒的最优二元溶剂组成。

(2)制备 PLA 和 PLGA 聚合物纳米粒的最佳条件是:最优二元溶剂组成,聚合物浓度 2.5%,相比(1% F-68 水溶液/聚合物有机相)5,搅拌速度 300 r/min,聚合物溶液滴加速度 1 滴/秒,室温。在此优化条件下,不同聚合物制备的纳米粒产率均大于 90%,平均粒径在 130~180nm 之间,并有较窄的粒度分布。

(3)PLA、PLGA 聚合物纳米粒 CFPT 点时的电解质 Na_2SO_4 浓度都大于 0.7mol/L,远高于血液中电解质的浓度,说明它们都能在血液电解质浓度下稳定存在。

(4)对纳米粒脂肪酶降解的研究表明:随着聚合物分子中羟基乙酸比例的增大,聚合物纳米粒降解速度加快;酶浓度增加,其与聚合物分子中酯键接触的机会加大,纳米粒降解速度加快;纳米粒的酶降解是在纳米粒表面和内部同时发生的,即纳米粒的降解为均相降解。

第五章 载紫杉醇纳米粒的制备、修饰及体外释药研究

紫杉醇是一种从紫杉树的树皮中分离的二萜类化合物，FDA 批准可用于卵巢癌和乳腺癌的治疗^[133]。由于水溶性差，临床上将紫杉醇用聚羟乙基蓖麻油（Cremophor EL）增溶于无水乙醇中制成市售制剂。临床应用前需要预先稀释，这时因溶剂的转换，紫杉醇易析出沉淀。并且 Cremophor EL 可引起体内组胺释放，造成病人出现药物性皮炎、呼吸急促，支气管痉挛和低气压等过敏反应。另外 Cremophor EL 还可以溶出聚氯乙烯塑料管和输液袋中的增塑剂，导致更严重的过敏反应发生。即便同时应用氢化可地松，过敏反应的发生率仍达到 10%—30%^[134]。

为了解决上述问题，研究不含 Cremophor EL 并能提高紫杉醇生物利用度的其它液体制剂成为当前的热点。其中包括合成紫杉醇的易溶性前体药物，采用脂质体纳米粒和微粒等。因纳米粒包封药物后，其体内分布不再决定于药物本身的物理化学性质，而更多地取决于载体系统的性质，载紫杉醇纳米粒的研究更引人注目。本章研究工作的目标就是研制不使用 Cremophor EL，而用生物降解聚合物 PLA、PLGA 纳米粒为载体，具有一定体内长循环性质和靶向作用并可提高紫杉醇抗肿瘤活性的纳米粒载体输送系统。

5.1 实验部分

5.1.1 试剂、材料与仪器

不同分子量和共聚比的 PLA 和 PLGA（成都航利生物材料研究所）；Pluronic F-68（医药级，ICN Biomedicals Inc. Aurora, Ohio）；PEG-DSPE（日本油脂株式会社）；90%水解度和 500 聚合度的 PVA-124 为日本进口分装；98%紫杉醇（湖南洪江华光生物科技有限公司）；透析袋（DM-16，截留分子量 3500，北京华美生物材料有限公司）；其它试剂均为分析纯，水为二次蒸馏水。

78-1型磁力加热搅拌器（江苏省金坛市正基仪器有限公司）；756MC型紫外可见分光光度计（上海分析仪器厂）；SHZ-C型循环水式多用真空泵（河南省巩义市英峪予华仪器厂）；TGL-16G型冷冻离心机（上海玉成干燥设备有限公司）；电子天平（瑞士生产）；MASTERSIZER 2000激光散射粒度分析仪（英国马尔文仪器有限公司）；5600LV型扫描电镜（SEM）分析仪（日本JEOL电子公司）；TAC71DX型热分析仪（美国Perkin Elmer公司）；DELSA 440SX表面电位与粒度分析仪（美国COULTER仪器公司）；BT8100高效液相色谱仪（德国Biotronic公司）；BT8200紫外可见检测器（德国Biotronic公司）。

5.1.2 实验内容

5.1.2.1 载紫杉醇纳米粒的制备

载紫杉醇纳米粒的制备与空白聚合物纳米粒的制备基本相似。20mg 紫杉醇先溶于 1mL 丙酮中，加 0.2gPLA 或 PLGA 充分搅拌使其溶解，再加丙酮和乙醇至 8mL，稍搅匀后立即滴加上述溶液于 40mL 1%F-68 水溶液中。滴加完后继续搅拌 15min，减压蒸发除去丙酮和乙醇，得载紫杉醇纳米粒混悬液。将所得纳米粒混悬液先于 1000 r/min 低速离心除去大颗粒聚集物，再在 16000 r/min 速度下离心 25min，沉淀用 25mL 蒸馏水洗涤。将沉淀物超声分散于 50mL 蒸馏水中，真空下冷冻干燥得纳米粒。

表面修饰载紫杉醇纳米粒的制备除在 1%F-68 水溶液加入 1%的 PEG-DSPE 外，其它与上相同。

5.1.2.2 纳米粒中紫杉醇含量的测定^[135]

纳米粒中紫杉醇含量由高效液相色谱法 (HPLC) 测定。准确称取一定量纳米粒溶于 1mL 二氯甲烷中，然后加入 3mL 50% (v/v) 乙腈水溶液并充分混合，室温下磁力搅拌挥发二氯甲烷至溶液透明清亮。取样用 HPLC 测定紫杉醇含量。

高效液相色谱条件：ODS—C18 柱 (250×4.6mm，粒径 5μm)，流动相乙腈：水=50：50(v/v)，流速 1.0mL/min，进样量 6μl，检测波长 227nm。在 0.03~4.8μg/mL 时，紫杉醇浓度 (C) 与 HPLC 的响应值 (紫杉醇峰面积 Y) 之间成良好的线性关系。回归方程为：Y=-1.076+6.418C (r=0.9994)，方法平均回收率为 97.92%(RSD=1.86%，n=5)。

紫杉醇纳米粒包封率 (EE) 和载药率 (DL) 计算公式如下：

$$EE\% = \frac{\text{纳米粒中紫杉醇量}}{\text{制纳米粒时所用紫杉醇量}} \times 100\% \quad (5-1)$$

$$DL\% = \frac{\text{纳米粒中紫杉醇量}}{\text{纳米粒重量}} \times 100\% \quad (5-2)$$

5.1.2.3 纳米粒粒径和粒径分布

MASTERSIZER 2000 激光散射粒径分析仪 (Malvern Instruments Ltd. Malvern, UK) 测定纳米粒平均粒径和粒径分布。冻干纳米粒粒径经超声分散于蒸馏水后测定。

5.1.2.4 纳米粒形态

用 5600LV 型扫描电镜 (SEM) 分析仪对纳米粒形态进行观察。

5.1.2.5 差示扫描量热法 (DSC) 分析

纳米粒中紫杉醇物理状态由 DSC 分析确定，用 Perkin Elmer 公司的 TAC71DX 型热分析仪测定。温度范围：20℃到 300℃，升温速度：10℃/min，

氮气保护。

5.1.2.6 表面电位分析

取纳米粒混悬液适量,加去离子水稀释后用 COULTER 公司的 DELSA 440SX 型表面电位与粒度分析仪测定表面电位

5.1.2.7 载紫杉醇纳米粒体外释放研究

将透析袋于蒸馏水中浸泡 24h 以后,置于释放池的中间,固定。取一定量载紫杉醇纳米粒于透析袋中,加 2mL 30%(v/v)乙醇水溶液。透析袋外部充满 18mL 30%(v/v)乙醇水溶液释放液。每隔一定时间取 100 μ l 释放液,然后再补充 100 μ L 释放液。用 HPLC 法测定不同时间点释放液中紫杉醇的含量。

5.2 结果与讨论

5.2.1 载紫杉醇纳米粒的载药机理

载药纳米粒的制备需考虑其粒径外,还需考虑一个很重要的因素——药物包封率。药物包封率越高,意味着在制备过程中药物的损失越小,因此在载药纳米粒的制备中,根据不同药物的成本高低,有时药物的包封率是衡量方法好坏的首选指标。PLA、PLGA 纳米粒的制备方法在前一章中已进行了详细的研究,获得了粒径合适且产率高的纳米粒,因此载药纳米粒的制备就以此为基础进行研究,以期同时得到高包封率且粒径小的纳米粒。

常用的载药方法有包裹药物、在溶液中吸附药物和通过化学反应将药物与载体材料键合等方法。从溶液中吸附药物,载药纳米粒药物包封率和载药率都不会高;通过化学反应将药物与载体材料键合要求药物和载体材料具有某些特征的官能团,而且化学对药物活性很可能会有影响,药物的释放也是个问题。由于紫杉醇是一种脂溶性药物,而使载紫杉醇纳米粒的制备可与空白纳米粒的制备相似。该过程的载药机理是当有机相滴入水相时,随着有机溶剂的不断扩散和挥发,PLA、PLGA 快速形成纳米级颗粒并被表面活性剂所稳定。由于紫杉醇在水中的溶解度很小,PLA、PLGA 纳米粒形成的同时紫杉醇也析出而使大部分紫杉醇被包封于聚合物所形成的纳米粒中,纳米粒紫杉醇包封率可达 90%。

5.2.2 同一分子量不同共聚比聚合物对紫杉醇包封率的影响

为考察同一分子量不同共聚比的聚合物是否均能用于作为紫杉醇的纳米粒载体,实验对此进行了研究。从图 5.1 中可看出,同一分子量 (M_w 15000) 下,PLA、PLGA (75/25) 和 PLGA (50/50) 三种不同共聚比的聚合物纳米粒的紫杉醇包封率相差不大,三者均大于 90%。这说明不同共聚比的聚合物纳米粒均可用于载紫杉醇。

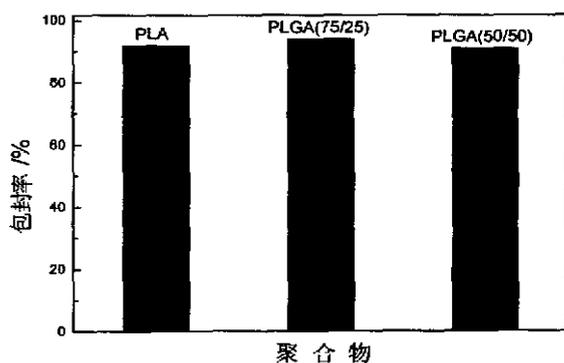


图 5.1 不同共聚比聚合物纳米粒的包封率

5.2.3 同一共聚比不同分子量聚合物对紫杉醇包封率的影响

为进一步考察聚合物种类对纳米粒紫杉醇包封率的影响,研究中用不同分子量的 PLA 和 PLGA (50/50) 聚合物制备了载紫杉醇纳米粒,实验结果见图 5.2。由图 5.2 可知,对于 PLGA (50/50),当其分子量由 7500 增加 25000 时,纳米粒紫杉醇包封率变化不大,均大于 90%;对于 PLA,当其分子量为 25000 时,纳米粒紫杉醇包封率已小于 90%,当其分子量为 40000 时,纳米粒紫杉醇包封率下降到只有 60%多。这是因为对于不同分子量聚合物,其紫杉醇包封率与纳米粒本身的产率是相关的。上一章研究结果表明,在分子量 7500 到 25000 的范围内,PLGA (50/50) 纳米粒产率相差不大,而当分子量大于 15000 后,PLA 纳米粒产率却下降较快。纳米粒产率的下降自然造成被其包封的紫杉醇量减小,部分紫杉醇进入大颗粒聚合物粒子中,而使载紫杉醇纳米粒包封率下降。

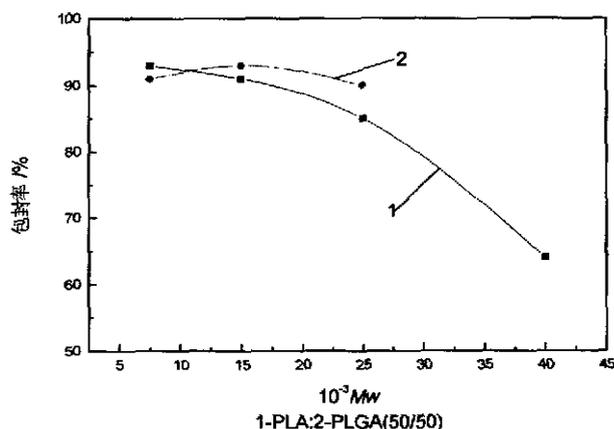


图 5.2 不同分子量聚合物纳米粒的包封率

5.2.4 有机相与水相相比对紫杉醇包封率的影响

图 5.3 显示相比 (O/W) 对紫杉醇包封率的影响, 从图中可清楚地看出, 增大水相的体积, 维持有机相体积不变时, 聚合物 (PLA) 纳米粒紫杉醇包封率逐渐下降。上一章的研究已知道, 在水相体积不变时减小有机相体积, 即减小 O/W 比可获得较小粒径的纳米粒。因此随 O/W 的减小, 纳米粒紫杉醇包封率下降, 一方面是因水相体积增大有利于形成较小的有机相分散液滴, 较小液滴具有较大的比表面积, 紫杉醇直接分散到水相中沉积的可能性增加; 另一方面是纳米粒粒径减小, 其本身对药物的包封能力也下降。

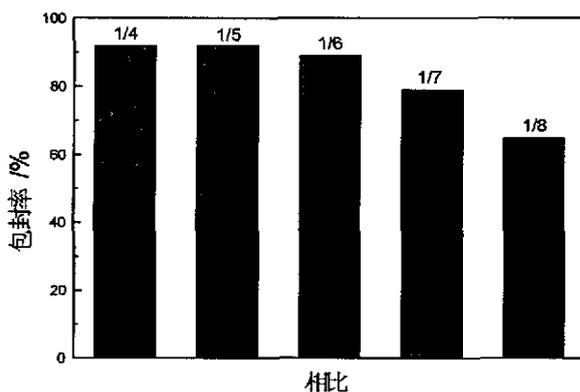


图 5.3 不同相比对纳米粒包封率的影响

5.2.5 表面活性剂用量对紫杉醇包封率的影响

表面活性剂具有亲水端和亲脂端, 对难溶于水的有机物, 具有增溶作用。在纳米粒的形成过程中, 表面活性剂上的亲脂链端与有机相结合, 其亲水端指向外水相, 将有机相液滴分散于水相中。此时原溶于有机相中的药物紫杉醇同样可与表面活性剂的亲脂端作用而较稳定地存在于有机相中, 因此可以预见表面活性剂的加入会增加紫杉醇的包封率, 实验结果 (图 5.4) 证实了这一点。

在其它条件固定不变的情况下, 随表面活性剂浓度的增加, 紫杉醇包封率逐渐加大。表面活性剂浓度到达 1% 时, 其在有机相液滴表面的分布可能已到达一极大值, 所以再继续增加其浓度, 紫杉醇包封率基本不变。此外, 上一章的研究表明随表面活性剂浓度的增大, 纳米粒产率略有升高, 这也可纳米粒包封率有所增大。

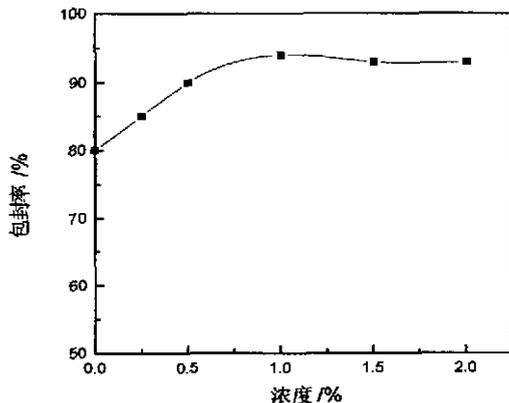


图 5.4 表面活性剂用量与纳米粒包封率的关系

5.2.6 搅拌速度对紫杉醇包封率的影响

搅拌速度对纳米粒紫杉醇包封率的影响见图 5.5，从图中可看出，纳米粒紫杉醇包封率随搅拌速度的增大，先是增加再逐渐减小。PLA、PLGA 纳米粒的制备实验结果已表明搅拌速度低时，纳米粒产率低，这是搅拌速度低时纳米粒紫杉醇包封率较小的主要原因。PLA、PLGA 纳米粒的制备实验结果也表明随搅拌速度的增加，纳米粒粒径略有下降，而纳米粒粒径的减小将导致紫杉醇包封率的下降，这是随搅拌速度增加到一定程度紫杉醇包封率下降的原因之一。另外，搅拌速度的增加到一定程度后，势必造成其对有机相液滴的搅动力和剪切力加大，破坏其均匀完整的形状，这样对紫杉醇在有机相液滴中的稳定存在以至于纳米粒的本身的稳定存在都是不利的，所以这也会使纳米粒紫杉醇包封率下降。

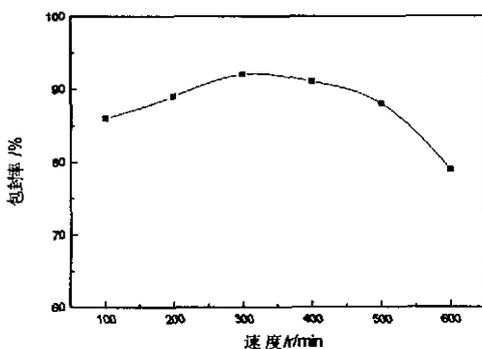


表 5.5 搅拌速度对纳米粒包封率的影响

5.2.7 温度对紫杉醇包封率的影响

温度对紫杉醇包封率的影响见图 5.6，从图中可知温度对紫杉醇包封率的影响不大，随温度的改变，纳米粒紫杉醇包封率几乎不变。这是因为一方面温度增加，加快了有机相在水相中的扩散速度和有机相自身的挥发速度，有利于形成较

小的纳米粒而使紫杉醇包封率下降；另一方面，有机相挥发速度的加快可使纳米粒的形成速度加快，这能使紫杉醇在未扩散于水相沉淀前就被形成的聚合物纳米粒包裹，所以纳米粒包封率提高。上述两方面的原因互相牵制，抵消，两者综合作用的结果使温度对纳米粒包封率的影响不大。

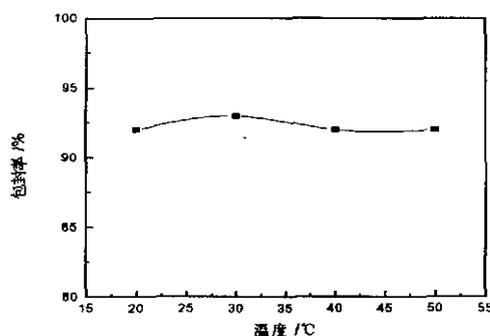


图 5.6 温度与包封率的关系

5.2.8 紫杉醇量对纳米粒包封率和载药率的影响

研究中固定聚合物量不变，改变紫杉醇的加入量，发现紫杉醇量对纳米粒包封率和载药率有较大影响。

由表 5.1 可见，对于分子量为 15000 的 PLA、PGA (75/25) 和 PLGA (50/50) 三种聚合物，纳米粒包封率和载药率的变化趋势是一致的，即随紫杉醇量的增加，纳米粒载药率增加，但其包封率都下降。因此要想得到载药率和包封率均高的纳米粒是不可能的。考虑到紫杉醇来源不易和价格高，为了减少紫杉醇的损失，应尽可能制备包封率高的纳米粒。当然载药率太低的纳米粒，在临床对癌症的治疗中要达到与载药率高的纳米粒的一样效果势必会需要较大的量，所以紫杉醇的加入量也不能太少。综合考虑，确定紫杉醇的加入量为 20mg，此时，PLA、PLGA (75/25) 和 PLGA (50/50) 的包封率分别是 92%、92%和 93%，载药率分别是 9.2%、9.2%和 9.3%。

表 5.1 载紫杉醇纳米粒的包封率与载药率

紫杉醇/mg	包封率/%			载药率%		
	PLA	PLGA(75/25)	PLGA(50/50)	PLA	PLGA(75/25)	PLGA(50/50)
10	94	95	95	4.7	4.8	4.8
15	92	93	92	6.9	7.0	7.0
20	92	92	93	9.2	9.2	9.3
25	81	80	83	10.1	10.0	10.2
30	72	73	73	10.8	10.9	10.9

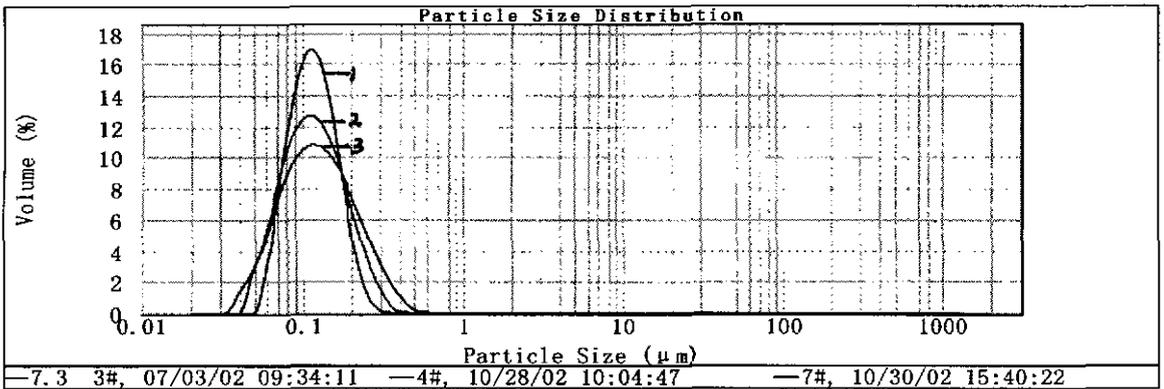
5.2.9 载紫杉醇纳米粒粒径和形态分析

不同聚合物载紫杉醇纳米粒的粒径及其粒径分布见表 5.2 和图 5.7。从中可

看出，对于不同聚合物材料，载紫杉醇纳米粒的粒径与载紫杉醇前（表 4.2）无显著差异，并具有较窄的粒径分布，这可说明紫杉醇的存在对纳米粒粒径没有影响。因为相对于构成纳米粒基体的聚合物材料来说，紫杉醇在纳米粒中的量比较少的。

表 5.2 载紫杉醇 PLA、PLGA 纳米粒的粒径

聚合物	共聚比	分子量	$\zeta(\text{eth})/\%$	粒径/nm
PLA	-	7500	50	155
PLA	-	15000	20	140
PLA	-	25000	45	157
PLA	-	40000	40	160
PLGA	75/25	10000	50	169
PLGA	75/25	15000	40	170
PLGA	75/25	25000	30	175
PLGA	50/50	7500	25	148
PLGA	50/50	15000	20	162
PLGA	50/50	25000	15	167



1-PLA; 2-PLGA (50/50); 3-PLGA (75/25)

图 5.7 载紫杉醇 PLA、PLGA 纳米粒粒径分布图

从图 5.7 也可知，绝大部分纳米粒的粒径在 300nm 以下。说明纳米粒基本上均可进入血液循环，大部分纳米粒不会被肝脏和脾脏的窦状小管截留，可延长其在体内的循环时间，其包载的药物进入除免疫系统之外的肿瘤病变部位的机会增加，具有一定的靶向性。

图 5.8 是载紫杉醇纳米粒的 SEM 图，由图可见 PLA 和 PLGA (50/50) 两种聚合物的纳米粒形状相似，所有纳米粒均呈均匀的球形，表面较平整。

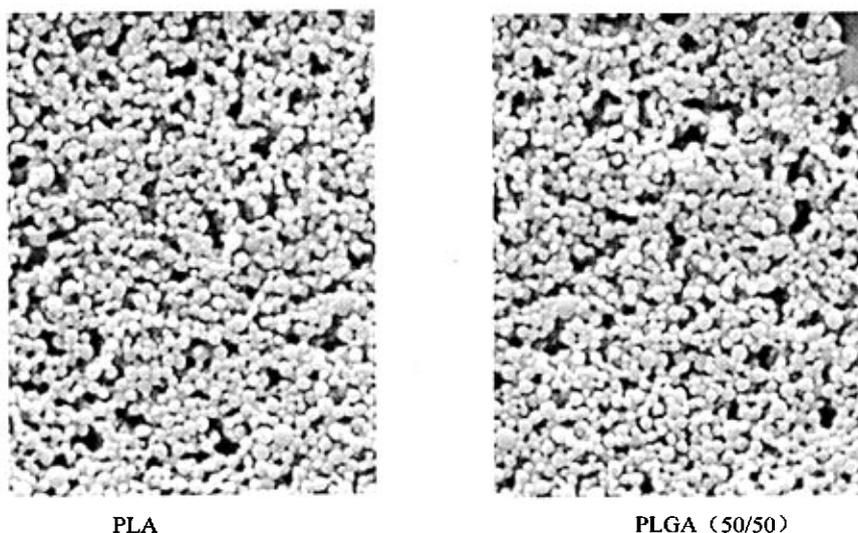
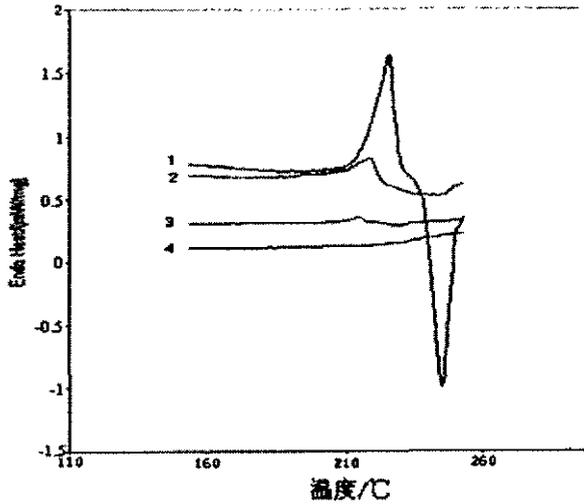


图 5.8 载紫杉醇 PLA、PLGA 纳米粒 SEM 图

5.2.10 载紫杉醇纳米粒的 DSC 分析

药物从聚合物纳米粒中释放出来的过程是相当复杂的，不但和载体的性质（降解性、分子量、结晶性以及玻璃化转变温度等）密切相关，还和药物在聚合物中的形态有关。为了对药物的释放行为有一个更为深入的了解，有必要对紫杉醇在纳米粒中的分布进行研究。

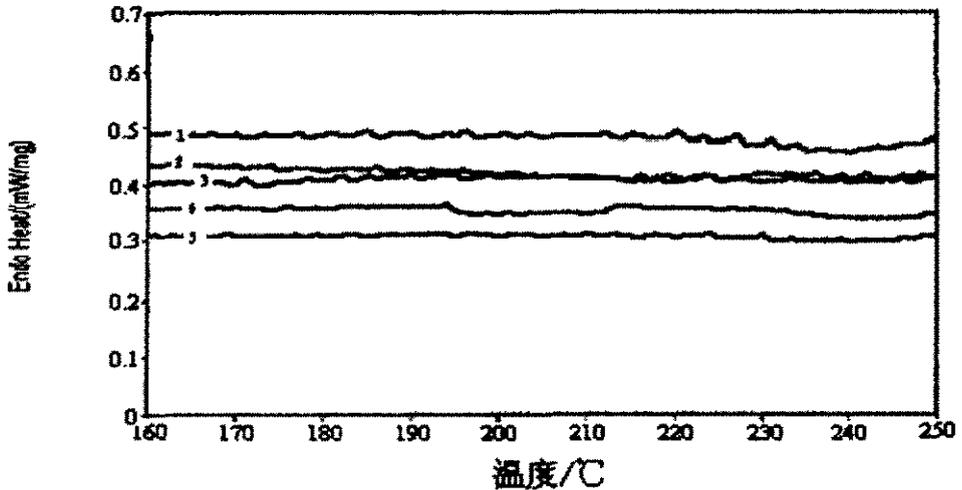
DSC 分析可提供药物在纳米粒中理化状态的定性和定量信息，主要从放热和吸热过程的变化判断这些信息。有关的热变化包括熔解，重结晶，分解，热容的变化等。DSC 分析可用于比较同一材料不同样品的相似或差异，观察添加剂对材料热性质的影响。通过药物、聚合物材料和载药纳米粒的 DSC 分析，可以了解药物在聚合物基体中的状态。药物在聚合物基体中的状态为分子分散无定形态或结晶态，药物不同的状态在体外释放过程中可表现出各自相关的特性。如果药物在聚合物纳米粒中以分子分散的无定形态存在，熔解吸热峰将检测不到。溶剂扩散法中由于纳米粒形成的速度极快，药物在纳米粒的状态应是无定形分子分散态。与结晶态相比无定形态药物具有较高的热力学活性，因而具有特殊的药学性质，如药物溶解性的增加有助于提高其生物活性。实验中，纯紫杉醇、纯聚合物材料、空白纳米料、紫杉醇和聚合物物理混合物、载紫杉醇纳米粒的 DSC 分析分别见图 5.9、5.10。由于物理混合和载 2.5%紫杉醇纳米粒的紫杉醇熔解吸热峰检测不到（因仪器灵敏度不够），制备了紫杉醇载药率 10%左右的纳米粒以供 DSC 分析。作为比较，用 10%和 5%比例的紫杉醇与聚合物的物理混合样作了实验（图 5.9）。



1-纯紫杉醇；2-10%紫杉醇和 90%PLA 混合物；
3-5%紫杉醇和 95%PLA 混合物；4-2.5%紫杉醇和 97.5%PLA 混合物；

图 5.9 纯紫杉醇及紫杉醇与 PLA 混合物的 DSC 图

从图中可看出，纯紫杉醇晶体在 223.0°C 处有一宽的熔解吸热峰，而紫杉醇晶体和 PLA 聚合物混合样的吸热峰则向低熔点处移动，其中 10%混合样的吸热峰位于 216.0°C，5%混合样的吸热峰位于 209.0°C 处。从图 5.10 可知，在 150~250 °C 之间，不同聚合物材料和空白纳米粒没有吸热峰出现。同样在此温度范围内，载紫杉醇纳米粒（载药率 9.2%）也没有出现紫杉醇的熔解吸热峰。因此，这说明紫杉醇在纳米粒中不是以晶体的形态存在，而是以分子分散的无定形状态存在。



1-PLA；2-PLGA；3-PLA 空白纳米粒；4-PLGA 空白纳米粒；5-载 9.2%紫杉醇 PLA 纳米粒；

图 5.10 空白纳米粒及载紫杉醇纳米粒的 DSC 图

5.2.11 载紫杉醇纳米粒的表面电位分析

几乎所有分散于液体中的纳米粒都带有表面电荷。表面电位是描述这一电荷的一重要参数，它能说明胶体悬浮液的稳定性。表面电位越大，粒子表面同种电荷的排斥力也越大，粒子越能稳定地分散于水中而不聚集。即表面电位的绝对值越大，纳米粒就越稳定。因此对作为药物输送载体的纳米粒，我们总是期望其能有一较大的表面电位。表 5.3 是不同聚合物（同一表面活性剂浓度下同一分子量不同共聚比）空白纳米粒和载紫杉醇纳米粒表面电位的比较，从中可看出载药与否对纳米粒表面电位的影响不大，同一聚合物空白纳米粒和载药纳米粒的表面电位相近。所有纳米粒的表面电位均为负值，这是由于纳米粒表面聚合物链段上存在的羧基离子化成羧酸根的原故。较高的纳米粒表面电位有利于其在溶液中的稳定性。

表 5.3 空白纳米粒与载紫杉醇纳米粒的表面电位

纳米粒	表面电位/mv		
	PLA	PLGA (75/25)	PLGA (50/50)
空白纳米粒	-21.2	-27.9	-30.5
载药纳米粒	-23.4	-26.6	-29.1

图 5.11 是表面活性剂 F-68 对纳米粒表面电位的影响，从表中可看出随着表面活性剂含量的增加，纳米粒表面电位绝对值减小。这是因为 F-68 表面活性剂是以疏水的聚氧丙烯端结合在纳米粒表面，亲水的聚氧乙烯端指向水中，因此掩蔽了纳米粒的负电位表面，使纳米粒表面电位上升。纳米粒电位随表面活性剂的增加而提高，当表面活性剂在纳米粒表面到达极大值后，再增加表面活性剂量，纳米粒表面电位不再增加。

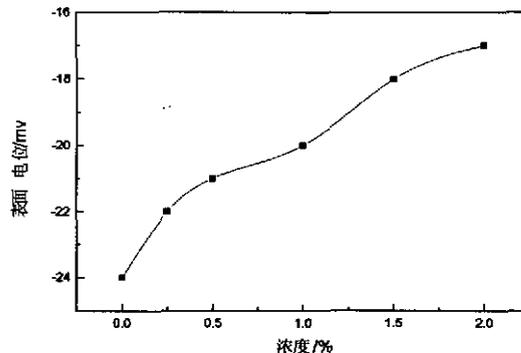


图 5.11 表面活性剂浓度对纳米粒表面电位的影响

另外从表 5.3 也可看出在同一表面活性剂浓度下用同一分子量但不同共聚比的聚合物制备的纳米粒，其表面电位的大小顺序是由 PLA、PLGA (75/25) 到 PLGA (50/50) 的顺序逐渐减小。之所以如此是因为聚合物中较疏水部分量是按

PLA、PLGA (75/25) 到 PLGA (50/50) 的顺序依次减小, 因此 PLA 与表面活性剂的结合相对较牢固, 表面活性剂对纳米粒负电位的掩蔽较强, 其表面电位也就较大。

5.2.12 载紫杉醇纳米粒稳定性分析

载紫杉醇纳米粒长时间留样观察。载紫杉醇纳米粒 0.15g 加生理盐水 25mL, 超声分散, 于有塞试管内密封保存, 定期取样进行粒径考察。定期取样 1mL, 稀释至 10mL 于 450nm 处测其吸光度。

从表 5.4 可看出放置 60 天后, 紫杉醇纳米粒粒径变化不大, 其吸光度值基本保持不变, 表明纳米粒分散体未发生絮凝, 聚集等现象, 说明纳米粒分散体能长期稳定存在, 外观、色泽、粒径及其分布均无明显改变。

表 5.4 纳米粒稳定性实验

时间/天	平均粒径/nm	吸光度
0	157	0.218
5	150	0.211
10	159	0.217
20	155	0.214
30	153	0.212
40	157	0.216
50	152	0.215
60	158	0.213

5.2.13 载紫杉醇纳米粒的表面修饰

普通的纳米粒载体系统由于网状内皮系统 (reticuloendothelial system, RES) 的摄取, 纳米粒在体内的消除速率较快且使所载药物主要用于肝脏和脾脏, 极大地限制了纳米粒的应用, 因此延长纳米粒在体内的循环时间具有重要的意义。首先, 长循环纳米粒将使所载药物在血液循环中的滞留时间延长, 这样药物能更好地发挥全身治疗作用。其次, 长循环纳米粒将增强药物在病灶部位的疗效。肿瘤等病变部位的上皮细胞处于一种渗漏状态, 由于纳米粒在体内的循环时间延长, 其装载的药物进入肿瘤等病变部位的机会增加。因此, 长循环纳米粒的作用是降低了 RES 对药物的摄取, 实际上增加了对病变部位的靶向性, 宏观的效果是明显改善疗效^[124]。

深入的研究表明: 不考虑纳米粒粒径的影响, 血液中血浆蛋白 (调理蛋白) 和纳米粒的相互作用是导致纳米粒被 RES 吞噬的根本原因。血浆蛋白会很快地吸附到纳米粒的表面, 然后人体的免疫系统很快地将它们识别出来, 并将它们作为异物排出体外^[136]。为减少这种排斥作用, 必须减少血浆蛋白和纳米粒的相互作用。而蛋白和纳米粒的相互作用主要取决于纳米粒表面的亲水亲脂性和表面电负性。

首先, 纳米粒表面的亲水性与亲脂性将影响到纳米粒与调理蛋白吸附结合力

的大小,从而影响到吞噬细胞对其吞噬的快慢。一般而言,纳米粒的表面亲脂性越大则其与调理蛋白的结合力越强,吞噬细胞对其的吞噬作用也就越强。其次,纳米粒表面电荷影响到纳米粒与体内物质如调理素的静电作用。由于体内的因素较为复杂,经典胶体科学中扩散双电层难以描述纳米粒与体内物质的吸引和排斥。但较为一致的看法是,相对于负电性或中性表面,正电性表面往往使纳米粒在体内更易被清除,而中性表面最适合用于延长纳米粒在体内的循环时间。所以说,纳米粒的表面性质决定纳米粒在体内的命运。

一般来说,PLA、PLGA 聚合物形成的纳米粒,其表面为疏水性的且都带负电荷。因此要制备能在体内长循环的载药纳米粒,必需改变粒子表面的疏水性能,降低表面负电荷。由此也可知在对纳米粒进行表面修饰时,选用非离子性的表面活性剂最佳。

粒子表面改性方法主要有:用亲水性高分子或表面活性剂对粒子表面进行修饰;合成含有亲水性高分子链段的可生物降解共聚物。研究中我们通过物理吸附的方法使一定的亲水性表面活性剂接到纳米粒的表面。

实际上在纳米粒的制备过程中,表面活性剂 F-68 在一定程度上已起到对纳米粒表面修饰的作用,但它不是一种很好的修饰材料。在所有报道的能够有效地减弱血浆蛋白和纳米粒相互作用的材料中,聚乙二醇(PEG)是效果最好的^[124,137]。不过由于 PEG 的亲水性较强,直接通过吸附作用将其吸附到疏水性的纳米粒表面,其吸附量少、吸附作用力弱,难以起到好的修饰作用。通过比较,我们选择了 DSPE-PEG 作为纳米粒的表面修饰剂。它一端的二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(DSPE)亲脂性较强,另一端的 PEG 链为亲水性的长链。在对聚合物纳米粒表面修饰时,它的 DSPE 端可以插到纳米粒里面,柔顺的 PEG 长链留在纳米粒表面。PEG 长链可以吸附大量的水分子,从而在纳米粒的表面形成一层水分子的空间位阻,减少体内巨噬细胞对纳米粒的吞噬,从而延长纳米粒于血液中的循环时间。

表 5.5 是经 DSPE-PEG 修饰后纳米粒与未修饰纳米粒的表面电位和粒径的比较。从表中可看出,DSPE-PEG 修饰前后,纳米粒的表面电位与粒径均有所变化,这表明 DSPE-PEG 确实结合到纳米粒表面上了。经 DSPE-PEG 修饰的纳米粒,由于其表面 PEG 长链的存在进一步掩蔽了纳米粒的负电性,纳米粒表面电位减小,纳米粒的粒径也略有增大的趋势。

表 5.5 DSPE-PEG 修饰前后纳米粒表面电位与粒径的比较

	表面电位/mv			粒径/nm		
	PLA	PLGA(75/25)	PLGA(50/50)	PLA	PLGA(75/25)	PLGA(50/50)
修饰前	-23.4	-27.9	-29.1	140	161	138
修饰后	-18.9	-22.8	-25.3	150	167	143

5.2.14 载紫杉醇纳米粒的体外释药研究

纳米粒的体外药物释放与其体内药物动力学参数有很大的相关性,故在做体内实验以前,必须先考察体外药物释放特性。

药物的溶出介质常用的有人工胃液,人工肠液,0.1mol/L 盐酸、pH7.4 的磷酸盐缓冲液。个别难溶性的药物可加少量十二烷基磺酸钠(SDS,0.5%以下),异丙醇,乙醇(不得超过30%)。由于紫杉醇在水中的溶解度极小,当用普通溶出介质时,溶出液中只有痕量的紫杉醇。在溶出介质中加入吐温-80,SDS 后情况仍没有什么变化。根据药典,把溶出介质换为30%乙醇水溶液后,紫杉醇可以以一定的速度缓慢地释放。紫杉醇纳米粒和释放液之间为截留分子量3500的半透膜,紫杉醇分子可以自由通过。

同一分子量不同共聚比聚合物纳米粒的体外紫杉醇释放曲线见图5.12。由图可见,早期三种聚合物纳米粒中紫杉醇均有一定程度的突然释放,在第一天内有近5%的紫杉醇释放出来。但这和传统的纳米粒载药体系的药物释放行为还是不一样的,传统的纳米粒载药体系因为在纳米粒表面吸附了大量的药物,因此有一个暴释的过程,其释放量占所载药物总量的20%~80%不等。在我们这个体系,比较弱的突释现象说明纳米粒表面吸附的药物比较少,绝大部分的药物被包裹在纳米粒的内部了。因此这些纳米粒具有较好的缓释作用。

随着时间的延长,紫杉醇释放速率慢慢降低,在一个月左右时累积释放率的增大已非常缓慢。三种聚合物中,PLGA(50/50)纳米粒的释药速度最快,1个月时紫杉醇累积释放率可达60%;PLA纳米粒的释药速度最慢,1个月时其紫杉醇累积释放率为42%。

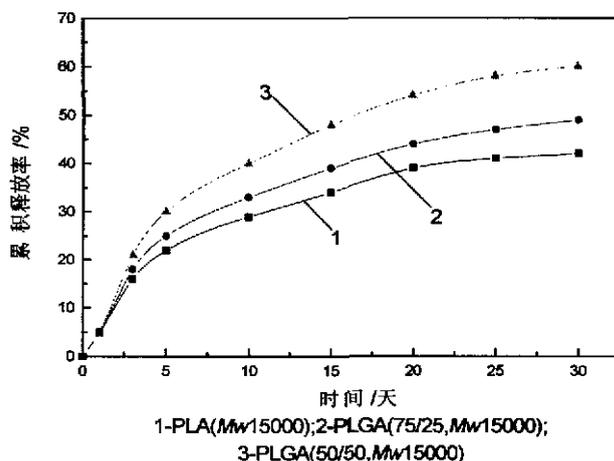


图 5.12 不同共聚比对纳米粒体外释药物影响

这些释放行为的不同,应该是和聚合物的化学组成有关。如前所述,药物从

聚合物纳米粒中的释放机理有三种：药物的扩散，纳米粒的溶蚀以及聚合物的降解。由于聚合物材料的亲水性差，降解速度慢，药物的释放主要按扩散机理进行。初期三种聚合物的较快速释放主要是因纳米粒表面和近表面紫杉醇的扩散所致，三种聚合物纳米粒的粒径相近，所以它们的释药速度也相差不大。然后，由于三种聚合物亲水性的差异，即结构中含羟基乙酸链段多的聚合物 PLGA (50/50) 亲水性最强，而不含羟基乙酸的 PLA 亲水性最弱，它们的释药速度也发生差异。PLGA (50/50) 聚合物纳米粒的亲水性最强，因此包封在纳米粒内部的紫杉醇可通过释放液渗入其中形成的孔道较快地释放出来，而 PLGA (75/25) 和 PLA 聚合物纳米粒的释药速度则依次降低。此外，聚合物中乳酸含量高，聚合物的结晶度较大，形成的纳米粒比较致密，紫杉醇从纳米粒中扩散出来和水向纳米粒内部的渗透会更困难，所以 PLA 纳米粒在三种聚合物纳米粒中释药速度最慢。当然随着纳米粒通过扩散释药的进行，聚合物也可能发生一定程度的降解，与 PLA 相比 PLGA 的降解更易进行。但在没有酸、碱或水解酶的催化作用存在下，三种聚合物的降解速度是很慢的，其降解需数月至一年的时间^[138]。所以当聚合物纳米粒释药达到一定程度后，由于聚合物在室温中性溶液中降解速度的缓慢，紫杉醇的累积释放率也增加缓慢，这一缓慢释放过程将持续很长时间。当然，聚合物在体内的降解要快得多，其释药速度也会较快。

为了探讨 PLA、PLGA 纳米粒的体外释放机制，分别按零级释放模型、一级释放模型以及 Higuchi 方程拟合其体外释放曲线，即将紫杉醇的累积释放百分率 Q 分别对时间 t ， $\ln[1-Q]$ 对 t ，以及 Q 对 $t^{1/2}$ 进行回归分析。以 r 值为评价标准，比较各拟合曲线的优劣， r 值越大，拟合程度越好，其结果分别为：

零级动力学方程：

$$\text{PLA: } Q = 9.4093 + 1.3139t (r = 0.9228)$$

$$\text{PLGA (75/25): } Q = 10.3485 + 1.5299t (r = 0.9278)$$

$$\text{PLGA (50/50): } Q = 12.0046 + 1.9079t (r = 0.9307)$$

一级动力学方程：

$$\text{PLA: } \ln[1-Q] = -0.0974 - 0.0176t (r = -0.9469)$$

$$\text{PLGA (75/25): } \ln[1-Q] = -0.1056 - 0.0217t (r = -0.9568)$$

$$\text{PLGA (50/50): } \ln[1-Q] = -0.1182 - 0.0303t (r = -0.9671)$$

Higuchi 方程：

$$\text{PLA: } Q = 0.7413 + 8.2080t^{1/2} (r = 0.9870)$$

$$\text{PLGA (75/25): } Q = 0.3732 + 9.5182t^{1/2} (r = 0.9882)$$

$$\text{PLGA (50/50): } Q = -0.3220 + 11.8317t^{1/2} (r = 0.9881)$$

由体外释放机制研究可得出: 5 天内紫杉醇的平均累积释放百分率 Q 与时间成一定线性关系, PLA、PLGA (75/25) 和 PLGA (50/50) 的相关系数 r 分别是 0.9913、0.9918 和 0.9930, 表明紫杉醇在 5 天内的体外释放基本符合零级动力学过程, 即恒速释药, 说明 PLA、PLGA 纳米粒具有一定的控释效果。此外, 按 Higuchi 方程更能较好地描述纳米粒的体外释放曲线, 即紫杉醇的释放量与时间的平方根成直线关系, 这符合水不溶性骨架的释药性能。

图 5.13、图 5.14 分别是同一共聚比, 但不同分子量的聚合物纳米粒释放曲线。它们的形状与图 5.14 中的曲线相似, 只是释药速度快慢的差异。从图中可看出, 对于共聚比相同但分子量不同的聚合物纳米粒, 药物的释放速率均随聚合物分子量的减小而增大。这是因为聚合物分子量小, 分子链的长度较短, 亲水性较强, 其聚集而成的纳米粒没有分子量大的链长的聚合物形成的纳米粒那样紧密, 因此对药物的束缚较小一些, 药物较易释放, 其释药速度较快。分子量大的聚合物, 分子链较长, 对药物的束缚较大, 由于药物的释放是由表及里的扩散机制, 即表层的药物先释放, 里层的药物需扩散至表层才能释放出来, 所以其释药速度较慢。

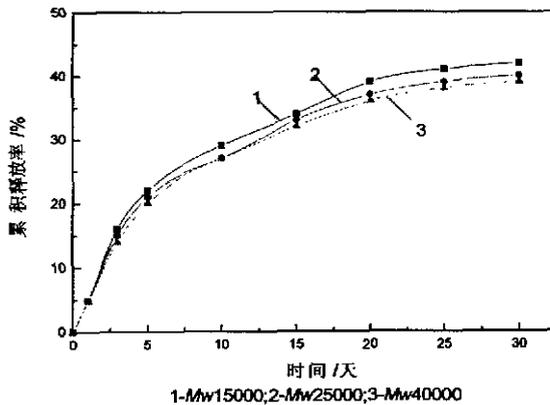


图 5.13 PLA 分子量对释放率的影响

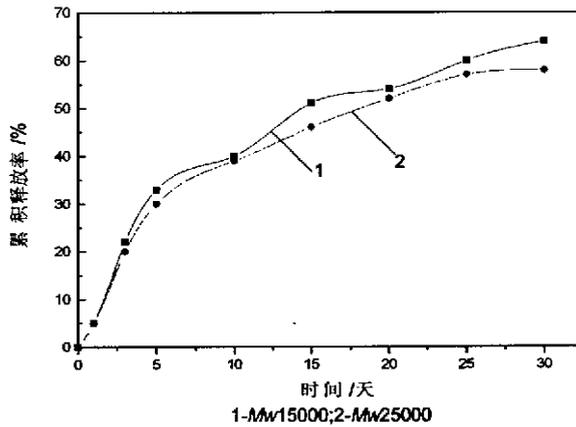


图 5.14 PLGA 分子量对释放率的影响

图 5.15 是不同表面活性剂浓度下制备的载紫杉醇纳米粒的体外释药曲线图，从中可看出表面活性剂浓度高的载紫杉醇纳米粒其紫杉醇释放速度较快。这是因为表面活性剂浓度高，载紫杉醇纳米粒表面更具亲水性，其在乙醇水溶液中更容易分散，乙醇水溶液的渗透性也加强，使紫杉醇的释放速度更快。另一方面，表面活性剂浓度高，其增溶作用也可能有益于紫杉醇在乙醇水溶液中溶解度的增加和溶解，因而有助于紫杉醇的释放。

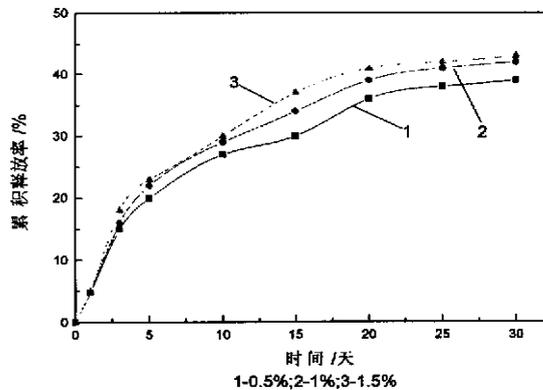


图 5.15 表面活性剂浓度对释放率的影响

药物控释体系希望药物能在一段时间内，比如几小时，几天，几个月甚至更长的时间，连续的释放药物以增加药物的疗效，以提高药物的生物利用度。从上述纳米粒的体外释放研究可知，不同共聚比，不同分子量和不同表面活性剂用量制备的纳米粒均可连续地以不同的速度释放紫杉醇，这就为纳米粒的临床应用提供了多种多样的选择。实际应用中可通过控制适当的共聚比，合适的聚合物分子

量和适量的表面活性剂量获得理想的纳米粒体内紫杉醇释放速度,达到对疾病的最佳治疗效果。

5.3 小结

本章研究了载紫杉醇纳米粒的制备,考察了多种因素对纳米粒紫杉醇包封率和载药率的影响,并对载紫杉醇纳米粒的稳定性、表面电位和表面修饰进行了研究,用 DSC 法分析了紫杉醇在纳米粒中的存在形态,研究了载紫杉醇纳米粒的体外释放。

(1) 制备载紫杉醇聚合物纳米粒的最佳条件是:最优二元溶剂组成;聚合物浓度 2.5%,相比(1% F-68 水溶液/聚合物有机相) 5,搅拌速度 300 r/min,聚合物溶液滴加速度 1 滴/秒,室温,紫杉醇用量为 PLA 或 PLGA 的十分之一。在此优化条件下,对于不同分子量、共聚比的聚合物制备的载紫杉醇纳米粒紫杉醇包封率均可达 90%,并具有较高载药率。

(2) 不同聚合物制备的载紫杉醇纳米粒粒径与空白纳米粒相近,其平均粒径均在 130~180nm 之间,并有较窄的粒度分布。DSC 分析说明紫杉醇在纳米粒中不是以晶体的形态的存在,而是以分子分散的无定形状态存在。载紫杉醇纳米粒稳定性研究表明,纳米粒能长期稳定分散存在,长期放置后其粒径及其分布均无明显改变。

(3) 由于 PLA、PLGA 聚合物分子中羧基的存在,载紫杉醇纳米粒和空白纳米粒的表面电位均为负值。经 DSPE-PEG 修饰后,由于纳米粒表面存在的 PEG 长链对纳米粒负电性的掩蔽作用,纳米粒表面电位减小,而纳米粒的粒径略有增大的趋势。

(4) 通过对载紫杉醇纳米粒的体外释放研究,表明早期三种聚合物纳米粒中紫杉醇均有一定程度的比较弱的突然释放,因此这些纳米粒具有较好的缓释作用。随着时间的延长,紫杉醇释放速率慢慢降低,由于聚合物在室温中性溶液中降解速度的缓慢,紫杉醇的累积释放率也增加缓慢。按 Higuchi 方程更能较好地描述载紫杉醇纳米粒的体外释放曲线,这符合水不溶性骨架的释药性能。

不同共聚比,不同分子量和不同表面活性剂用量下制备的载紫杉醇纳米粒均可连续地以不同的速度释放紫杉醇,可为纳米粒的临床应用提供多种多样的选择。

第六章 载药纳米粒体外抑瘤活性研究

药物纳米粒载体系统是否能用于临床,除其具有一定的载药率和药物的可释放外,还需进行一系列试验考察其抑瘤效率,是否具有生物毒性等。其中药物纳米粒载体系统的体外抑瘤效率是一非常重要的指标,其好坏直接关系到所研制的药物纳米粒载体系统能否应用于实际。因此有必要对此进行专门的实验研究。

抗癌药物敏感性试验方法繁多,大体上可分为体外与体内两大类方法,每种方法各有其优缺点和局限性,其中体外方法有以下几种:(1)美蓝法;(2)染料排斥试验法;(3)生长曲线测定法;(4)集落形成试验法;(5)四唑盐(MTT)比色法;(6)三磷酸腺苷生物发光法等。大量实验研究表明,四唑盐比色法与临床有相当好的相关性,研究中选用此法对载紫杉醇纳米粒和载阿霉素壳聚糖纳米粒的体外抑瘤活性进行了研究。

6.1 实验部分

6.1.1 试剂、材料与仪器

试剂、材料:

RPMI1640 培养基(干粉,美国 Hyclone 公司产品);胰蛋白酶(美国 Gibco 公司产品);胎牛血清(美国 Hyclone 公司产品);MTT(德国 Biomol 公司产品)二甲基亚砷(DMSO,分析纯)。

MTT 溶液:称取 250mgMTT,放入小烧杯中,加 50mlPBS(0.01mol/L, pH7.4)在电磁搅拌机上搅拌 30min,用 0.20 μ m 的微孔滤器除菌,分装,4 $^{\circ}$ C 保存。

含 10%胎牛血清 RPMI1640 培养液,0.25%胰蛋白酶。

市售紫杉醇注射剂(北京四环制药厂),盐酸阿霉素注射剂(10mg/瓶,深圳万乐医药有限公司);自制载紫杉醇纳米粒,载阿霉素壳聚糖纳米粒。

仪器:

96 孔培养板,可调移液管,吸管,离心管,计数板,CO₂ 孵箱,显微镜,振荡混合仪,酶联免疫检测仪。

6.1.2 实验内容

6.1.2.1 细胞复苏和培养

(1) 将冻存于液氮中的细胞取出,直接放入 37 $^{\circ}$ C~40 $^{\circ}$ C 水浴中,并不时摇动令其尽快融化。

(2) 在无菌操作下打开冻存管,用吸管将细胞悬液注入离心管并缓慢滴加 10 倍以上的培养液,混合后 500~1000r/min 低速离心,除去上清液,再重复用培养液洗一次。

(3) 用培养液适当稀释后, 接种培养瓶, 在 37℃ 下 CO₂ 孵箱中培养, 次日更换一次培养液。

(4) 待细胞长满培养瓶后, 加入 0.25% 胰蛋白酶, 37℃ 消化, 加培养液吹打, 1:2 传代, 长满后一瓶用于实验检测, 另一瓶继续传代培养。

6.1.2.2 载紫杉醇 PLA、PLGA 纳米粒体外抑瘤活性实验^[139]

(1) 接种细胞: 用 0.25% 胰蛋白酶消化单层人肺癌 NCI-H69 培养细胞, 再用 10% 胎牛血清的 RPMI1604 培养液配成单个细胞悬液, 以每孔 10³~10⁴ 个细胞接种于 96 孔培养板中, 每孔体积 200μL。

(2) 培养细胞: 待细胞贴壁后, 每孔分别加入不同浓度的市售紫杉醇注射剂, 空白 PLA、PLGA 纳米粒和载紫杉醇 PLA、PLGA 纳米粒试液。将培养板移入 CO₂ 孵箱中, 在 37℃, 5%CO₂ 及饱和湿度条件下, 培养一定时间。

(3) 显色: 培养完成后, 每孔加入 MTT 溶液 20μL, 37℃ 下继续孵育 4h, 终止培养, 1000r/min 离心 5min, 小心吸弃孔内培养上清液。每孔加入 150μLDMSO, 振荡 10min, 使结晶物充分溶解。

(4) 比色: 选择 490nm 波长, 在酶联免疫检测仪上测定各孔光吸收值, 记录结果。计算细胞存活率和死亡率。

$$\text{细胞存活率} = \frac{\text{试验组光吸收值}}{\text{对照组光吸收值}} \times 100\% \quad (6-1)$$

$$\text{细胞死亡率} = 1 - \frac{\text{试验组光吸收值}}{\text{对照组光吸收值}} \times 100\% \quad (6-2)$$

6.1.2.3 载阿霉素壳聚糖纳米粒体外抑瘤活性实验^[139]

(1) 接种细胞: 用 0.25% 胰蛋白酶消化单层人黑素瘤 A375 培养细胞, 再用 10% 胎牛血清的 RPMI1604 培养液配成单个细胞悬液, 以每孔 10³~10⁴ 个细胞接种于 96 孔培养板中, 每孔体积 200μL。

(2) 培养细胞: 待细胞贴壁后, 每孔分别加入不同浓度的阿霉素针剂, 空白壳聚糖纳米粒, 载阿霉素壳聚糖纳米粒试液, 将培养板移入 CO₂ 孵箱中, 在 37℃, 5%CO₂ 及饱和湿度条件下, 培养一定时间。

(3) 显色: 培养完成后, 每孔加入 MTT 溶液 20μL, 37℃ 下继续孵育 4h, 终止培养, 1000r/min 离心 5min, 小心吸弃孔内培养上清液。每孔加入 150μLDMSO, 振荡 10min, 使结晶物充分溶解。

(4) 比色: 选择 490nm 波长, 在酶联免疫检测仪上测定各孔光吸收值, 记录结果。计算细胞存活率和死亡率。

6.2 结果与讨论

6.2.1 四唑盐比色法实验原理

四唑盐比色法是一种检测细胞存活和生长的方法^[139]。显色剂四唑盐是一种能接受氢原子的染料，化学名为 3-(4,5-二甲基噁唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐，商品名是噻唑蓝，简称为 MTT。活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性的 MTT 还原为难溶性的蓝紫色结晶物 (Formazan) 并沉积在细胞中，而死细胞无此功能。二甲基亚砷 (DMSO) 能溶解细胞中的紫色结晶物，用酶联免疫检测仪在 490nm 波长处测定其光吸收值，可间接反映活细胞数量。在一定细胞数范围内，MTT 结晶物形成的量与细胞数成正比。四唑盐比色法已广泛用于一些生物活性因子的活性检测，大规模的抗肿瘤药物筛选，细胞毒性试验以及肿瘤放射敏感性测定等。四唑盐比色法的特点是灵敏度高，重复性好，操作简便，经济、快速、易自动化，无放射性污染，与其他检测细胞活力的方法 (如细胞计数法等) 有良好的相关性。

6.2.2 载紫杉醇纳米粒的体外抑瘤活性

用四唑盐比色法研究了临床应用的紫杉醇注射剂，载紫杉醇纳米粒和空白纳米粒的体外抑瘤活性。细胞培养液中紫杉醇浓度为 0.025 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，此浓度范围是紫杉醇在人体血浆中可存在的范围。

图 6.1 是紫杉醇注射剂体外抑瘤活性实验结果。由图 6.1 可见，当紫杉醇浓度为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时，NCI-H69 细胞培养 24 小时其存活率大幅下降，72 小时后细胞生长几乎完全被抑制。但有趣的是细胞在 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 紫杉醇浓度下培养 24 小时，其存活率无变化，而在 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 0.025 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 紫杉醇浓度下存活率却减少近 20%。此后，随着时间的增加，在这三种浓度下细胞的存活率均下降，到 172 小时实验结束时彼此之间相差不大，仍有 35~40% 左右的细胞未被杀死。

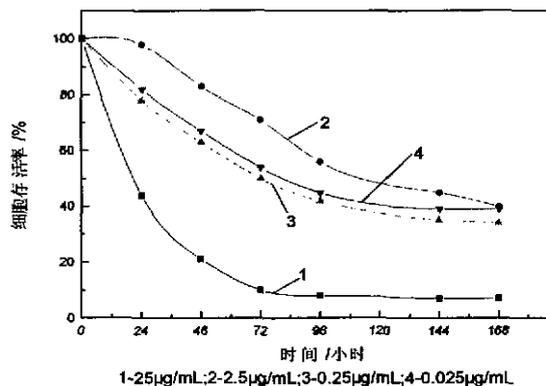


图 6.1 注射剂紫杉醇浓度与细胞存活率的关系

由于紫杉醇注射剂中的表面活性剂 Cremophor EL 具有某些生物活性，所以

实验中也考察了其对 NCI-H69 细胞的影响。从图 6.2 中可看出，当 Cremophor EL 浓度为 2.2mg/mL 时（此浓度为紫杉醇浓度为 25 μ g/mL 时溶液体系中存在的 Cremophor EI 浓度），24 小时细胞存活率下降 25%，到 72 小时细胞存活率仅有 10%，120 小时以后细胞的生成几乎完全被抑制。而当 Cremophor EL 在低浓度（0.22mg/mL 至 0.0022mg/mL 间）下，细胞长时间培养后存活率不变。结合图 6.1 和图 6.2 实验结果可知，紫杉醇浓度为 25 μ g/mL 时细胞存活率的迅速下降不仅有紫杉醇的作用，而且 Cremophor EL 也起了作用。那么为什么细胞在 2.5 μ g/mL 紫杉醇浓度下培养 24 小时其存活率无变化呢？这是因为已有报道^[140,141]表明 Cremophor EL 在一定浓度范围内又能抑制紫杉醇的细胞毒性，提高细胞的存活率，这正是 2.5 μ g/mL 紫杉醇浓度下（对应 Cremophor EL 浓度为 0.22mg/mL）细胞存活率反而要大于 0.25 μ g/mL 和 0.025 μ g/mL 紫杉醇浓度下细胞存活率的原因。

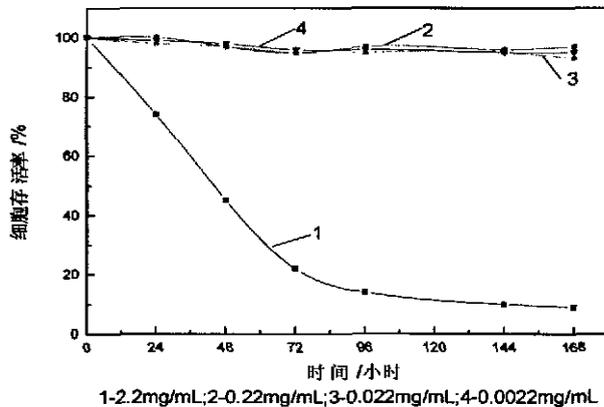


图 6.2 Cremophor EL 浓度与细胞存活率的关系

图 6.3 是 NCI-H69 细胞在载紫杉醇纳米粒中培养的存活率变化曲线图。由图可见，空白 PLGA (50/50) 聚合物纳米粒对细胞没有毒性，这可从细胞存活率一直保持近 100% 看出，这说明了聚合物材料本身没有细胞毒性。不同紫杉醇浓度下，载紫杉醇 PLGA (50/50) 纳米粒的细胞存活率变化趋势基本一致，均随时间的延长细胞存活率下降，彼此之间存活率相差不大。与图 6.1 中紫杉醇注射剂溶液中 NCI-H69 细胞存活率变化相比，可以发现细胞存活率下降速度明显减慢，如在 0.25 μ g/mL 紫杉醇浓度下，7 天（168 小时）时细胞存活率仍有 46%，但在更长培养时间条件下 PLGA (50/50) 载紫杉醇纳米粒可达到与商用紫杉醇注射剂类似的抑制细胞生长效率，11 天时细胞存活率为 37%。PLA 载紫杉醇纳米粒对 NCI-H69 细胞的抑制作用与 PLGA (50/50) 载紫杉醇纳米粒非常相似，也是随着时间的增加，细胞存活率逐渐下降。但仔细比较不同聚合物载紫杉醇纳

米粒, 可发现 PLGA (50/50) 载紫杉醇纳米粒体系中细胞存活率下降速度稍快, 这与 PLGA (50/50) 纳米粒中紫杉醇释放速度较快有关, 前面的研究已证实了这一点。

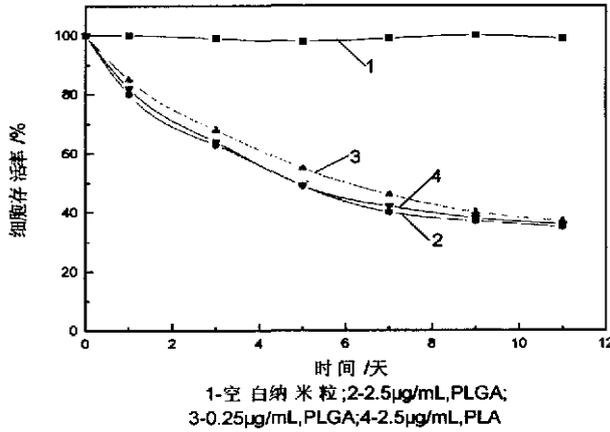


图 6.3 载紫杉醇纳米粒细胞存活率变化曲线图

从上述实验结果中可知, 培养时间和紫杉醇浓度对紫杉醇的体外细胞毒性起着重要作用, 随着培养时间的增加, 细胞毒性增大, 这与紫杉醇的作用机制是一致的。

载紫杉醇纳米粒的优点也可从实验结果中看出, 即紫杉醇包封于纳米粒后其活性没有降低, 而且可以随着紫杉醇从纳米粒中逐渐释放出来而在更长的时间内作用于癌细胞, 因此载紫杉醇纳米粒可提高紫杉醇的生物利用度。紫杉醇从纳米粒中持续不断地释放出来, 避免了游离紫杉醇的分解, 不仅可在一定时间内维持紫杉醇浓度而且可减少紫杉醇的损失。另外采用载紫杉醇纳米粒的形式给药, 无需使用对人体有不良副作用的 Cremophor EL, 也更加有益于紫杉醇的临床应用。此外, 抗肿瘤药物以包封于纳米粒中的方式给药还具有如下好处: (1) 纳米粒可吸附在细胞膜上, 使细胞表面的药物浓度增加形成药物浓度差而使药物不断进入细胞内; (2) 具有吞噬活性的肿瘤细胞可吞噬聚合物纳米粒而使药物在肿瘤细胞内部释放, 这样有益于提高药物在肿瘤细胞内的作用浓度, 减少药物的损失^[142]。

6.2.3 载阿霉素纳米粒的体外抑瘤活性

图 6.4 是人黑素瘤 A375 细胞在 0.1µg/mL 至 100µg/mL 阿霉素浓度范围培养的死亡率对比图。空白壳聚糖纳米粒条件下, 细胞死亡率近似为零, 说明制备壳聚糖纳米粒的材料对细胞无毒性, 纳米粒本身也不能杀死细胞。比较载阿霉素壳聚糖纳米粒和阿霉素注射剂培养条件下细胞的死亡率, 可知细胞死亡率均随阿霉素浓度的提高而增加, 同样浓度条件下载阿霉素壳聚糖纳米粒的死亡率低于阿霉

素注射剂培养下的死亡率,是否阿霉素包封于壳聚糖纳米粒后其生物活性降低了呢?但考虑到上述实验是在细胞培养仅 72 小时测得死亡率,而在此时间内载阿霉素壳聚糖纳米粒中仅有部分的阿霉素释放出来,因此实际上阿霉素的活性是没有降低的。

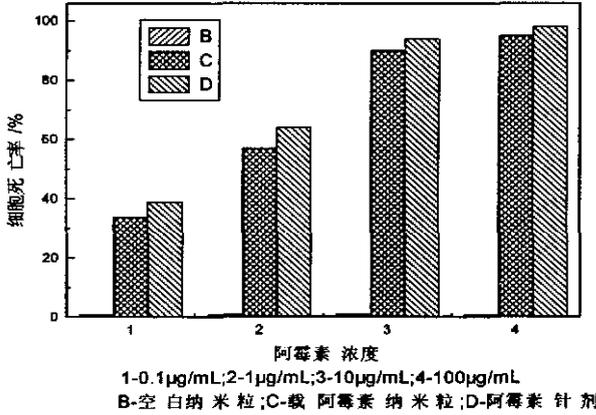


图 6.4 不同阿霉素浓度细胞死亡率比较图

图 6.5 是相同阿霉素浓度 (5μg/mL) 下,阿霉素注射剂和载阿霉素壳聚糖纳米粒细胞死亡率随培养时间的变化图。由图可见,在阿霉素注射剂体系下培养的细胞很快达到高的死亡率,而在载阿霉素壳聚糖纳米粒体系下培养的细胞初期同样时间内的死亡率虽较低,但在较长时间内死亡率却比前者更高。这说明一方面壳聚糖纳米粒中的阿霉素是缓慢释放出来的,另一方面壳聚糖纳米粒有可能被 A375 细胞吞噬,阿霉素在细胞内部逐渐释放,避免了其在细胞外面的分解,具有更高的生物利用度。

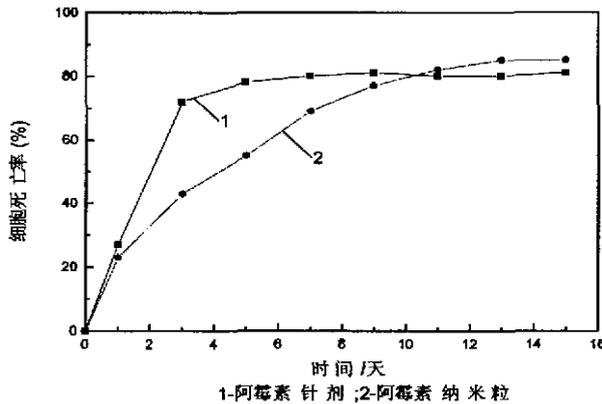


图 6.5 阿霉素针剂与阿霉素纳米粒对比实验

因此,载阿霉素壳聚糖纳米粒的优点也同样可从实验结果中看出,即阿霉素包封于纳米粒后其活性没有降低,而且可以随着阿霉素从纳米粒中逐渐释放出来而在更长的时间内作用于癌细胞。阿霉素从纳米粒中长时间连续不断地释放出来,可避免阿霉素在体内的快速代谢,不仅可保证阿霉素浓度在一定时间范围内的恒定并且可减少阿霉素的损失,所以载阿霉素壳聚糖纳米粒可提高阿霉素的生物利用度。

6.3 小结

用四唑盐比色法研究了载紫杉醇纳米粒和载阿霉素壳聚糖纳米粒的体外抑瘤活性。

研究结果表明,与紫杉醇注射剂相比,载紫杉醇纳米粒可提高紫杉醇的生物利用度,紫杉醇包封于纳米粒后其活性没有降低,而且可以从纳米粒中逐渐释放出来而在更长的时间内作用于癌细胞。另外采用载紫杉醇纳米粒的形式给药,无需使用对人体有不良副作用的 Cremophor EL,更加有益于紫杉醇的临床应用。

同样,与阿霉素注射剂相比,载阿霉素壳聚糖纳米粒也可提高阿霉素的生物利用度,阿霉素从载阿霉素壳聚糖纳米粒中逐渐释放出来,可避免阿霉素在体内的快速代谢,不仅可在一定时间范围内维持阿霉素的浓度并且可在较长的时间范围内抑制癌细胞的生长。

第七章 载紫杉醇纳米粒的药代动力学研究

目前临床使用的紫杉醇制剂为以 Cremophor EL(50%, V/V)增溶的无水乙醇溶液,临用前稀释至所需浓度后静脉滴注。为进一步研究载紫杉醇纳米粒在体内的药代动力学特征,我们采用同样静脉注射的方法,经单剂量给药后,对载紫杉醇纳米粒和紫杉醇市售注射剂在动物体内的药代动力学进行了比较,以考察载紫杉醇纳米粒特有的药代动力学特征。

研究以正常昆明小鼠为实验对象,尾静脉注射单剂量的载紫杉醇纳米粒,测定各时间点的紫杉醇血药浓度,绘制药-时曲线。以紫杉醇市售注射剂为对照,考察载紫杉醇纳米粒在小鼠体内的药代动力学特征以及表面修饰对延长紫杉醇在血液中循环时间的影响。

7.1 实验部分

7.1.1 试剂、材料与仪器

紫杉醇注射剂(北京四环制药厂);98%紫杉醇原料药(湖南洪江华光生物科技有限公司);Pluronic F-68(医药级,ICN Biomedicals Inc. Aurora,Ohio);叔丁基甲醚(美国 Sigma 公司);DSPE-PEG(日本油脂株式会社);所有其它试剂均为市售分析纯。

78-1 型磁力加热搅拌器(江苏省金坛市正基仪器有限公司);SHZ-C 型循环水式多用真空泵(河南省巩义市英峪予华仪器厂);TGL-16G 型冷冻离心机(上海玉成干燥设备有限公司);电子天平(瑞士生产);1100 系列高效液相色谱仪(美国 Agilent Technologies)。

7.1.2 实验内容

7.1.2.1 载紫杉醇纳米粒的制备

(1) 载紫杉醇长循环纳米粒的制备:20mg 紫杉醇先溶于 1mL 丙酮中,加 0.2gPLA 充分搅拌使其溶解,再加丙酮和乙醇至 8mL,稍搅匀后立即滴加上述溶液于含 1%DSPE-PEG 的 40ml 1%F-68 水溶液中。滴加完后继续搅拌 15min,减压蒸发除去丙酮和乙醇,得长循环载紫杉醇纳米粒混悬液。

(2) 载紫杉醇普通纳米粒的制备除不加 DSPE-PEG 外,其它同上。

7.1.2.2 游离紫杉醇溶液的配制

取紫杉醇注射剂(6mg/mL)用生理盐水稀释至 1mg/mL。

7.1.2.3 纳米粒小鼠体内药物动力学参数的测定

昆明小鼠(20±2g)30 只,随机分为 3 组,每组 10 只小鼠,三组小鼠以 10mg/kg 的剂量静脉分别注射紫杉醇注射剂、载紫杉醇普通纳米粒、载紫杉醇长循环纳米

粒，然后眼眶取血，3000rpm 离心，取血清于-20℃冰箱中保存。

血清药物浓度测定方法^[143,144]：于 100 μ L 血清中加入 50 μ g/mL 地西洋甲醇溶液 100 μ L，振荡 90s，混匀加入 2.0mL 叔于基甲醚振荡 2 min，离心。将上层有机相于 50℃水浴中氮气吹干，再用流动相溶解，用高效液相法测定药物浓度。色谱条件：ODS-C18 柱 (250 \times 4.6mm，粒径 5 μ m)，流动相甲醇:乙腈:水=30:40:30 (v/v)，流速 1.0mL/min，进样量 6 μ L，检测波长 227nm。

7.1.2.4 数据处理方法

血药浓度数据用中国药理学学会数学药理委员会编制的 3P87 药动学程序进行处理。

7.2 结果

7.2.1 三种给药方式体内血药浓度的测定

紫杉醇注射剂、载紫杉醇普通纳米粒和载紫杉醇长循环纳米粒体内血药浓度见表 7.1，药时曲线如图 7.1。

表 7.1 三种注给药方式的血药浓度

时间/h	浓度/ μ g \cdot mL ⁻¹		
	注射剂	普通纳米粒	长循环纳米粒
0	32.78	30.43	34.27
0.5	3.09	2.66	2.74
1	2.15	1.94	2.05
2	0.58	0.75	1.17
4	0.22	0.51	0.85
8		0.23	0.73
16			0.34

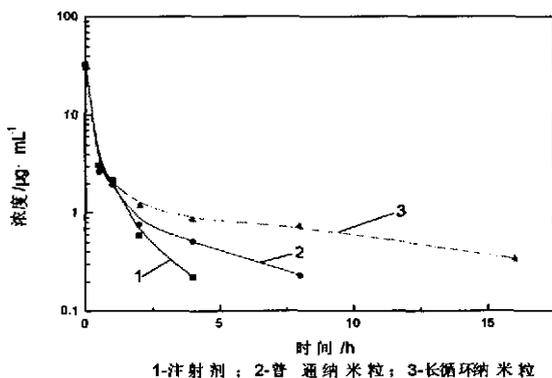


图 7.1 三种给药方式的药时曲线

7.2.2 紫杉醇注射剂药代动力学参数计算

当权重为 $1/C$ 时, 一室模型和二室模型拟合判据见表 7.2。根据二室模型拟合的药代动力学参数见表 7.3, 计算值和实测值之比较见表 7.4。

表 7.2 注射剂一室模型和二室模型拟合判据

模型	WT	R	AIC
一室	1/C	0.9982	8.1681
二室	1/C	0.9999	-2.4746

表 7.3 注射剂二室模型拟合的药代动力学参数

参数	单位	数值
A	$\mu\text{g/mL}$	27.6302
α	1/h	16.4304
B	$\mu\text{g/mL}$	5.1333
β	1/h	0.9750
$t_{1/2\alpha}$	h	0.04
$t_{1/2\beta}$	h	0.71
K_{21}	1/h	3.3965
K_{12}	1/h	9.2923
K_{10}	1/h	4.7166
AUC	$(\mu\text{g/mL})\cdot\text{h}$	6.95

表 7.4 注射剂二室模型计算值与实测值比较

时间/h	$C_{\text{obs}}/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$C_{\text{cal}}/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$D/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	D/%
0	32.78	32.76	0.02	0.05
0.5	3.09	3.16	-0.07	-2.28
1	2.15	1.94	0.21	9.95
2	0.58	0.73	-0.15	-25.91
4	0.22	0.10	0.12	52.78

C_{cal} : 计算值; C_{obs} : 实测值; D: 差值

7.2.3 载紫杉醇普通纳米粒药代动力学参数计算

当权重为 $1/C$ 时, 一室模型和二室模型拟合判据见表 7.4。根据二室模型拟合的药代动力学参数见表 7.5, 计算值和实测值之比较见表 7.6。

表 7.4 普通纳米粒一室模型和二室模型拟合判据

模型	WT	R	AIC
一室	1/C	0.9984	10.4155
二室	1/C	0.9998	-0.2258

表 7.5 普通纳米粒二室模型拟合的药代动力学参数

参数	单位	数值
A	$\mu\text{g/mL}$	28.4604
α	1/h	6.5997
B	$\mu\text{g/mL}$	1.9583
β	1/h	0.3279
$t_{1/2\alpha}$	h	0.11
$t_{1/2\beta}$	h	2.11
K_{21}	1/h	0.7317
K_{12}	1/h	3.2380
K_{10}	1/h	2.9579
AUC	$(\mu\text{g/mL})\cdot\text{h}$	10.28

表 7.6 普通纳米粒二室模型计算值与实测值比较

时间/h	$C_{\text{obs}}/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$C_{\text{cal}}/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$D/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	D/%
0	30.43	30.42	0.01	0.04
0.5	2.66	2.71	-0.05	-1.96
1	1.94	1.45	0.49	25.28
2	0.75	1.02	-0.23	-35.52
4	0.51	0.53	-0.02	-3.43
8	0.23	0.14	0.09	38.23

C_{cal} : 计算值; C_{obs} : 实测值; D: 差值

7.2.4 载紫杉醇长循环纳米粒药代动力学参数计算

当权重为 1/C 时, 一室模型和二室模型拟合判据见表 7.7。根据二室模型拟合的药代动力学参数见表 7.8, 计算值和实测值之比较见表 7.9。

表 7.7 长循环纳米粒一室模型和二室模型拟合判据

模型	WT	R	AIC
一室	1/C	0.9986	14.7706
二室	1/C	0.9998	-2.5545

表 7.8 长循环纳米粒二室模型拟合的药代动力学参数

参数	单位	数值
A	$\mu\text{g/mL}$	32.7767
α	1/h	6.5469
B	$\mu\text{g/mL}$	1.6401
β	1/h	0.1086
$t_{1/2\alpha}$	h	0.11
$t_{1/2\beta}$	h	6.38
K_{21}	1/h	0.4154
K_{12}	1/h	4.5285
K_{10}	1/h	1.7115
AUC	$(\mu\text{g/mL})\cdot\text{h}$	20.11

表 7.9 长循环纳米粒二室模型实测值与计算值比较

时间/h	$C_{obs}/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$C_{cal}/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$D/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	D/%
0	34.27	34.42	-0.15	-0.04
0.5	2.74	2.80	-0.06	-2.00
1	2.05	1.52	0.53	25.94
2	1.17	1.32	-0.15	-12.82
4	0.85	1.06	-0.21	-24.97
8	0.73	0.69	0.04	5.76
16	0.34	0.29	0.05	15.13

C_{cal} : 计算值; C_{obs} : 实测值; D: 差值

7.3 讨论

7.3.1 紫杉醇血药浓度测定方法的改进

生物样品中紫杉醇的 HPLC 检测方法, 文献报道常以 Sep-Pak 小柱固相萃取或用乙腈提取后直接进样, 用外标法或内标法测定^[145]。在实际应用中, 发现外标法稳定性差, 影响精密度。采取固相萃取法, 虽然有简便快速的优点, 但测样费用高, 不适合大量样品的测定。用乙腈提取后, 内源性杂质较多, 干扰含量测定。

在实验中通过比较几种溶剂的萃取效率, 发现二氯甲烷的萃取率小于 50%, 乙酸乙酯对紫杉醇虽有较高的萃取率, 但内源性杂质多, 干扰测定。而用叔丁基甲醚为萃取剂, 提取血清中的紫杉醇, 提取液吹干后溶解进样用内标法测定, 具有提取率高 (大于 90%), 操作步骤简单, 内源性杂质对测定无干扰的优点。在紫杉醇浓度 0.06~12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 紫杉醇浓度 (C) 与 HPLC 的响应值 (紫杉醇与内标峰面积之比 Y) 之间成良好的线性关系。回归方程为: $Y=0.0166+0.0957C$

($r=0.9997$), 方法平均回收率为 90.92%(RSD=1.69%, $n=5$)。

7.3.2 三种给药方式的药代动力学参数分析

载紫杉醇长循环纳米粒一室模型拟合的 R 值和 AIC 分别为 0.9986 和 14.7706, 二室模型拟合的 R 值和 AIC 分别为 0.9998 和 -2.5545。由以上数据可以看到, 二室模型拟合的 R 值大于一室模型拟合的 R 值, 而其 AIC 值小于一室模型的 AIC 值, 因此采用二室模型是正确的。同样, 对于紫杉醇注射剂和载紫杉醇普通纳米粒静脉注射后的血药数据用二室模型拟合的 R 值较大而 AIC 较小, 因此它们的药代动力学数据也采用二室模型拟合。

以市售的紫杉醇注射剂为对照品, 测定计算了载紫杉醇纳米粒于小鼠体内的药代动力学参数。由实验结果可知, PLA 纳米粒包裹紫杉醇后对紫杉醇的药代动力学产生了显著的影响, 特别是消除半衰期。经 DSPE-PEG 修饰的长循环纳米粒的消除半衰期 ($T_{1/2\beta}$ 6.38h) 高于普通纳米粒消除半衰期 ($T_{1/2\beta}$ 2.11h), 更高

于紫杉醇注射剂消除半衰期 ($T_{1/2\beta}$ 0.71h)。紫杉醇注射剂的 K_{10} 较普通纳米粒和长循环纳米粒的 K_{10} 大得多, 说明使用注射剂后紫杉醇从中央室消除的较快, 而普通纳米粒和长循环纳米粒则依次减慢^[146]。此外, 注射剂药时曲线的曲线下面积 AUC (6.95) 小于普通纳米粒 (10.28) 和长循环纳米粒 (20.11)。这都说明: 在同样的紫杉醇剂量条件下, 普通纳米粒和长循环纳米粒可在体内较长时间保持较高浓度, 即可在一定程度上延长体内循环时间, 提高紫杉醇的生物利用度, 其中以长循环纳米粒的效果更为显著。

载紫杉醇纳米粒由于其内紫杉醇的逐渐释放, 具有较大的消除半衰期。而长循环纳米粒较普通纳米粒效果更为显著, 有更长的体内循环时间, 是因其表面 DSPE-PEG 的存在。DSPE-PEG 是一种常用的辅助表面活性剂, 它一端的二硬脂酰磷脂酰乙醇胺 (DSPE) 为亲脂性基团, 另一端的 PEG 链为亲水性长链。在 PLA 纳米粒的表面上, DSPE 可以插入到纳米粒内部, 柔顺的 PEG 长链留在纳米粒的表面。PEG 长链的柔顺性使纳米粒的空间结构时刻发生着变化, 从而使免疫系统难以对其产生有效的识别。PEG 长链上的亲水位点还可吸附大量的水分子从而在纳米粒的表面形成一层水分子膜, 减少体内巨噬细胞对纳米粒的吞噬, 从而延长纳米粒于血液循环系统内的驻留时间, 增加癌组织对纳米粒的摄取。正常组织中血管上皮细胞的间隔为 100nm 左右, 而癌组织由于生长速度比正常组织快, 上皮细胞间的孔隙比正常组织的大, 处于渗漏状态。这样紫杉醇纳米粒较易从毛细血管中穿越上皮细胞, 到达癌组织, 从而有利于提高疗效。PEG 亲水性的长链结构对载紫杉醇纳米粒的修饰作用也使纳米粒得到隐形, 使免疫细胞难于对其产生有效的识别从而使纳米粒对非 RES 器官的靶向性增加, 实际上是增加了紫杉醇对病变部位的靶向性。

7.4 小结

以市售的紫杉醇注射剂为对照品, 测定计算了载紫杉醇纳米粒于小鼠体内的药代动力学参数。结果表明: 在同样的紫杉醇剂量条件下, 载紫杉醇长循环纳米粒具有较高的消除半衰期, 其消除半衰期为 6.38h, 而载紫杉醇普通纳米粒和紫杉醇注射剂分别为 2.11h 和 0.71h。紫杉醇注射剂的 K_{10} 较普通纳米粒和长循环纳米粒的 K_{10} 大得多, 说明使用注射剂后紫杉醇从中央室消除的较快, 而普通纳米粒和长循环纳米粒则依次减慢。由于 DSPE-PEG 对纳米粒表面的改性, 载紫杉醇长循环纳米粒可延长紫杉醇体内循环时间。

第八章 结论

论文研究了生物降解聚合物纳米粒载药系统。在大量的文献整理的基础上,论文选择了天然生物降解高分子材料壳聚糖和合成生物降解高分子材料 PLA、PLGA,水溶性抗癌药物阿霉素和脂溶性抗癌药物紫杉醇,分别开展载阿霉素壳聚糖纳米粒和载紫杉醇 PLA、PLGA 纳米粒的研究。论文对纳米粒的制备、表征,载药纳米粒的体外药物释放行为、体外抑瘤活性和药代动力学进行了研究。

论文的主要研究工作和结论为:

1. 载阿霉素壳聚糖纳米粒

(1) 通过对一系列影响壳聚糖纳米粒粒径因素的研究,确定了以离子交联法制备粒径较小壳聚糖纳米粒的最佳条件:壳聚糖脱乙酰度 95%,浓度 5mg/mL (1%醋酸溶液),用量 20mL; TPP 浓度 2.5 mg/mL,用量 4mL; TPP 溶液以 1d/s 的速度滴加入 60℃壳聚糖溶液中,在 700~800r/min 搅拌速度下反应 10min。

在最佳条件下制得的纳米粒粒径最小,体积平均粒径为 183nm,粒径分布也较集中,可满足纳米粒载药体系的要求。经 TEM 观察,粒子成球性好,大小分布均匀,说明因粒子间的凝集以及小粒子的布朗运动与碰撞而导致粒子粒径分布范围的变宽不是很严重。红外光谱研究显示,壳聚糖分子的氨基与 TPP 的磷酸基之间有较强的静电结合作用,这正是两者能凝聚成纳米粒的原因。

(2) 采用先使阿霉素与 TPP 形成复合物,再将其包封于壳聚糖纳米粒中的方法可使阿霉素包封率大幅度提高,确定了制备高包封率载阿霉素壳聚糖纳米粒的最佳条件:

形成阿霉素-TPP 复合物过程:温度 50℃,保温时间 3min,体系 pH 值 8.0,阿霉素用量 1.0mg;载阿霉素纳米粒形成过程:除温度为 40℃外其它条件与制备空白壳聚糖纳米粒相同。

在优化条件下制备的壳聚糖载阿霉素纳米粒,阿霉素包封率为 82.73%,载药量 17.2%,纳米粒体积平均粒径为 193nm,粒子成球性好,粒径分布均匀,且具有一定的靶向性。纳米粒表面电位值为+52.1mV,粒度稳定性好,长时间放置粒径无变化。

(3) 载阿霉素壳聚糖纳米粒的体外释放研究表明:阿霉素的体外释放呈三段模式。在最初几小时内阿霉素有一快速释放,12 小时其累积释放率可达 10%,24 小时至 72 小时内阿霉素接近匀速释放,72 小时后阿霉素的释放变得非常缓慢。初期阿霉素的快速释放对药物的快速起效是有利的,初期累积释放量不大,说明结合在纳米粒表面的药物比较少,绝大部分药物位于纳米粒内部,因此纳米粒具

有良好的缓释作用。中期阿霉素的近匀速释放说明将药物包裹于纳米粒中起到了一定的控释效果。最后仍有相当量的阿霉素留在纳米粒中释放不出来,说明阿霉素与纳米粒载体的结合比较紧密,也体现了较好的包载效果。按 Higuchi 方程能较好地描述壳聚糖纳米粒的体外释放曲线,即阿霉素的释放量与时间的平方根成直线关系,符合水不溶性骨架的释药性能。

研究了阿霉素用量、壳聚糖脱乙酰度及分子量对药物释放的影响,结果显示,不同条件下制备的纳米粒的阿霉素释放速度有较大差别,表明可根据实际需要制备具有不同释放阿霉素速度的载阿霉素壳聚糖纳米粒。

(4) 用四唑盐 (MTT) 比色法研究了载阿霉素壳聚糖纳米粒的体外抑瘤活性。与阿霉素注射剂相比,载阿霉素壳聚糖纳米粒可提高阿霉素的生物利用度,阿霉素从载阿霉素壳聚糖纳米粒中逐渐释放出来,可避免阿霉素在体内的快速代谢,不仅可在一定时间范围内维持阿霉素的浓度并且可在较长的时间范围内抑制癌细胞的生长。

2. 载紫杉醇聚合物纳米粒

(1) 论文研究了制备不同分子量、共聚比的 PLA、PLGA 聚合物纳米粒的二元溶剂分散法,考察了该制备方法对纳米粒产率、粒径的影响,并对纳米粒的稳定性和在酶作用下的降解进行了研究。

研究中用浊点滴定法阐明了乙醇加入丙酮溶液中对纳米粒粒径和产率的影响。研究表明纳米粒产率随丙酮溶液中乙醇量的增加而提高,并当乙醇量接近 PLA、PLGA 浊点时达最大,而纳米粒粒径却随丙酮溶液中乙醇量的增加而减小,并当乙醇量接近 PLA、PLGA 浊点时达最小。因此,可通过滴定测定 PLA、PLGA 浊点,从而确定制备具有较高产率和较小粒径的聚合物纳米粒的最优二元溶剂组成。

确定了制备 PLA 和 PLGA 聚合物纳米粒的最佳条件是:最优二元溶剂组成,聚合物浓度 2.5%,相比 (1% F-68 水溶液/聚合物有机相) 5,搅拌速度 300 r/min,聚合物溶液滴加速度 1 滴/秒,室温。在此优化条件下,不同聚合物制备的纳米粒产率均大于 90%,平均粒径在 130~180nm 之间,并有较窄的粒度分布。

PLA、PLGA 聚合物纳米粒达 CFPT 点时,电解质 Na_2SO_4 浓度都大于 0.7mol/L,远高于血液中电解质的浓度,说明它们都能在血液电解质浓度下稳定存在。对纳米粒脂肪酶降解的研究表明:随着聚合物分子中羟基乙酸比例的增大,聚合物纳米粒降解速度加快;酶浓度增加,其与聚合物分子中酯键接触的机会加大,纳米粒降解速度也加快;纳米粒的酶降解是在纳米粒表面和内部同时发生的,即纳米粒的降解为均相降解。

(2) 研究了载紫杉醇纳米粒的制备,考察了多种因素对纳米粒紫杉醇包封

率和载药量的影响,并对载紫杉醇纳米粒的稳定性、表面电位和表面修饰进行了研究,用 DSC 法分析了紫杉醇在纳米粒中的存在形态。

制备载紫杉醇聚合物纳米粒的最佳条件是:最优二元溶剂组成,聚合物浓度 2.5%,相比(1% F-68 水溶液/聚合物有机相) 5,搅拌速度 300 r/min,聚合物溶液滴加速度 1 滴/秒,室温,紫杉醇用量为 PLA 或 PLGA 的十分之一。在此优化条件下,对于不同分子量、共聚比的聚合物制备的载紫杉醇纳米粒紫杉醇包封率均可达 90%,并具有较高载药量。

不同聚合物制备的载紫杉醇纳米粒粒径与空白纳米粒相近,其平均粒径均在 130~180nm 之间,并有较窄的粒度分布。DSC 分析说明紫杉醇在纳米粒中不是以晶体的形态的存在,而是以分子分散的无定形状态存在。载紫杉醇纳米粒稳定性研究表明,纳米粒能长期稳定分散存在,长期放置后其粒径及其分布均无明显改变。

由于 PLA、PLGA 聚合物分子中游离羧基的存在,载紫杉醇纳米粒和空白纳米粒的表面电位均为负值。经 DSPE-PEG 修饰后,由于 PEG 长链对纳米粒负电性的掩蔽作用,纳米粒表面电位减小,而纳米粒的粒径略有增大的趋势。

(3) 载紫杉醇纳米粒的体外释放研究表明:早期三种聚合物纳米粒中紫杉醇均有一定程度的比较弱的突然释放,因此这些纳米粒具有较好的缓释作用。随着时间的延长,紫杉醇释放速率慢慢降低,由于聚合物在室温中性溶液中降解速度的缓慢,紫杉醇的累积释放率也增加缓慢。按 Higuchi 方程更能较好地描述载紫杉醇纳米粒的体外释放曲线,这符合水不溶性骨架的释药性能。

用不同聚合物或不同表面活性剂用量制备的载紫杉醇纳米粒均可连续地以不同的速度释放紫杉醇,可为纳米粒的临床应用提供多种多样的选择。

(4) 用四唑盐比色法研究了载紫杉醇纳米粒的体外抑瘤活性。研究结果表明,与紫杉醇注射剂相比,载紫杉醇纳米粒可提高紫杉醇的生物利用度,紫杉醇包封于纳米粒后其活性没有降低,而且可以从纳米粒中逐渐释放出来而在更长的时间内作用于癌细胞。另外采用载紫杉醇纳米粒的形式给药,无需使用对人体有不良副作用的 Cremophor EL,更加有益于紫杉醇的临床应用。

(5) 以市售的紫杉醇注射剂为对照品,测定计算了载紫杉醇纳米粒于小鼠体内的药代动力学参数。结果表明:在同样的紫杉醇剂量条件下,载紫杉醇长循环纳米粒具有较高的消除半衰期,其消除半衰期为 6.38h,而载紫杉醇普通纳米粒和紫杉醇注射剂分别为 2.11h 和 0.71h。由于 DSPE-PEG 对纳米粒表面的修饰,载紫杉醇长循环纳米粒可延长紫杉醇体内循环时间。

参考文献

- [1] 俞耀庭主编. 生物医用材料[M]. 天津:天津大学出版社, 2000
- [2] Ravi Kumar MNV. Nano and microparticles as controlled drug delivery devices[J]. *J Pharm Sci*, 2000, 3: 234~258
- [3] Kawashima Yoshiaki. Nanoparticles systems for improved drug delivery[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 47: 1~2
- [4] 平其能. 纳米药物和纳米载体系统[J]. *中国新药杂志*, 2002, 11(1): 42~46
- [5] Birrenback G, Speiser P. Polymerized micelles and their use as adjuvants in immunology[J]. *J Pharm Sci*, 1976, 65(12): 1763
- [6] Couvreur P, Roland M, Guior P, et al. Polycyanoacrylate nanocapsules as potential lysosomal carriers: preparation, morphological and sorptive properties[J]. *J Pharm Pharmacol*, 1979, 31(5): 331
- [7] 朱屯, 王福明, 王习东等. 国外纳米材料技术进展与应用[M]. 北京:化学工业出版社, 2002
- [8] Lambert G, Fattal E, Couvreur P. Nanoparticles systems for the delivery of antisense oligonucleotides[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 47: 99~112
- [9] Muller RH, Jacob C, Kayser O. Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy: rationale for development and what we can expect for the future[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 47: 3~19
- [10] Kreuter J. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 47: 65~81
- [11] Lambert G, Fattal E. Polyisobutylcyanoacrylate nanocapsules containing an aqueous core as a novel colloidal carrier for the delivery of oligonucleotides [J]. *Pharm Res*, 2000, 17: 707~713
- [12] De Jacqhere F, Allemann E, Doelker E, et al. pH-dependent dissolving nano- and microparticles for improved peroral delivery of a highly lipophilic compound in dogs[J]. *J Pharm Sci*, 2001, 3: 28~31
- [13] Hirofumu Takeuchi, Hiromitsu Yamamoto. Mucoadhesive nanoparticulate systems for peptide drug delivery[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 47: 39~45
- [14] Leong KW, Mao HQ, Truong-Le VL, et al. DNA-polycation nanospheres as non-viral gene delivery vehicles[J]. *J Controlled Release*, 1998, 53: 183~193
- [15] Mao HQ, Roy K, Truong-Le VL, et al. Chitosan-DNA nanoparticles as gene

- carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency[J]. *J Controlled Release*, 2001, 70: 399~421
- [16] 蒋学华, 廖工铁, 姚倩. 毫微粒作为药物载体的应用[J]. *中国药学杂志*, 1994, 29(11): 643~646
- [17] 陈道达, 艾时斌, 马建华等. 磁液载附阿霉素靶向定位治疗消化系肿瘤[J]. *中华实验外科杂志*, 1996, 13(1): 1~2
- [18] Gupta PK, Hung CT, Morris RM, et al. Ultrastructural disposition of adriamycin associated magnetic albumin microspheres in rats[J]. *J Pharm Sci*, 1989, 4: 290~294
- [19] Irene B, Catherine D, Patrick C. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2002, 54: 631~651
- [20] Verdun C, Brasseur F, Vranckx H, et al. Tissue distribution of doxorubicin associated with polyhexylcyanoacrylate nanoparticles[J]. *Pharmacol*, 1990, 26: 13~18
- [21] Brasseur P, Couvreur P, Kante B, et al. Actinomycin D adsorbed on polymethylcyanoacrylate nanoparticles: increased efficiency against an experimental tumor[J]. *Eur J Cancer*, 1980, 10: 1441~1445
- [22] Rolland A. Clinical pharmacokinetics of doxorubicin in hepatoma patients after a single intravenous injection of free or nanoparticle-bound anthracycline[J]. *Int J Pharm*, 1989, 54: 113~121
- [23] Dunn RL, Ottenbrite RM. *Polymeric drugs and drug delivery systems*[M]. Washington D.C.: American chemical society, 1991
- [24] Bodmeier R, Paeratakul O. Drug release from laminated polymeric films prepared from aqueous latexes[J]. *J Pharm Sci*, 1990, 79: 32~36
- [25] Jeyanthi R, Panduranga RK. Controlled release of anticancer drugs from collagen-polyhema hydrogen matrices[J]. *J Controlled Release*, 1990, 13: 91~98
- [26] Kou JH, Fleisher D, Amidon GL. Modeling drug release from dynamically swelling poly(hydroxyethyl methacrylate-co-methacrylic acid)hydrogels[J]. *J Controlled Release*, 1990, 12: 241~250
- [27] 吕泽, 王身国. 高分子包囊药物释放体系[J]. *功能高分子学报*, 1997, 10(3): 429~434
- [28] 张晟, 王亚辉, 张新民等. 在药物缓释体系中应用的可生物降解材料[J]. *合成化学*, 1999, 7(4): 394~400
- [29] 王身国, 蔡晴, 吕泽等. 组织工程中药物控制释放技术的应用研究[J]. *生物工程学杂志*, 2001, 115(5): 280~284
- [30] 王爱勤, 杨立明. 天然高分子材料壳聚糖研究应用进展[J]. *化工新型材*

料, 1994,(9): 9~12

[31] Mehmet Odabasi. Chitosan Microspheres and Sponges: Preparation and Characterization[J]. Journal of Applied Polymer Science, 2000, 76(7): 1637~1643

[32] 王小红, 马建标, 何炳林. 甲壳素、壳聚糖及其衍生物的应用[J]. 功能主分子学报, 1999,12(2): 197~201

[33] 方华丰. 壳聚糖微球的研究进展[J]. 国外医药——合成药、生化药、制剂分册, 1999,20(4): 315~319

[34] 严瑞宣主编. 水溶性高分子[M]. 北京: 化学工业出版社, 1998

[35] 鲁从华, 罗传秋, 曹维孝. 壳聚糖的改性及其应用[J]. 高分子通报, 2001,(6): 46~53

[36] 方华丰, 周宜开. 壳聚糖微球的研究[J]. 中国医院药学杂志, 1999,19(12): 744~745

[37] Janes KA, Fresneau MP, Marazuela A, et al. Chitosan nanoparticles as delivery systems for doxorubicin[J]. J Controlled Release, 2001, 73: 255~267

[38] Calvo P, Remunan-Lopez C, Vila-Jato JL, et al. Novel hydrophilic chitosan/polyethylene oxide nanoparticles as proteins carriers[J]. J Appl Polym Sci, 1997, 63: 125~132

[39] 梁桂媛, 方华丰, 刘志伟. 5-氟尿嘧啶壳聚糖微球的制备[J]. 广东药学院学报, 2000,16(1): 7~10

[40] Fernandez UR, Calvo P, Remunan LC, et al. Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles[J]. Pharm Res, 1999, 16 (10) : 1576~1581

[41] Mooren FC, Berthold A, Domschke W, et al. Influence of chitosan microspheres on the transport of prednisolone sodium phosphate across HT-29 cell monolayers[J]. Pharm Res, 1998, 15 (1) : 58~65

[42] Mitra S, Caur U, Ghosh PC, et al. Tumor targeted delivery of encapsulated dextran-doxorubicin conjugate using chitosan nanoparticles as carrier[J]. J Controlled Release, 2001, 74: 317~323

[43] De Campos AM, Sanchez A, Alonso MJ. Chitosan nanoparticles: a new vehicle for the improvement of the delivery of drugs to the ocular surface[J]. Int J Pharm, 2001, 224 (1/2) : 159~168

[44] Erbacher P, Zou S, Bettingger T, et al. Chitosan based vector/DNA complexed for gene delivery: biophysical characteristics and transfection ability[J]. Pharm Res, 1998, 15 (9) : 1332~1339

[45] Roy K, Mao HQ, Huang SK, et al. Oral gene delivery with chitosan-DNA

- nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy[J]. *Nature Med*, 1999, 5 (4) : 387~391
- [46] Mao HQ, Roy K, Troung-Le VL, et al. Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characteristics and transfection efficiency[J]. *J Controlled Release*, 2001, 74: 399~421
- [47] 刘晨光, 刘成圣, 孟祥红等. 壳聚糖作为药物缓释材料的研究进展[J]. *高技术通讯*, 2003,(3): 98~102
- [48] Mehmet Odabasi. Chitosan Microspheres and Sponges: Preparation and Characterization[J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 2000, 76(7): 1637~1643
- [49] Reed AM, Giiding DK. Biodgradable polymers for use in surgery polyglycolic/poly(lactic acid) homo- and copolymers:1[J]. *Polymer*, 1979, 20: 1459~1464
- [50] Reed AM, Giiding DK. Biodgradable polymers for use in surgery polyglycolic/poly(lactic acid) homo- and copolymers:2[J]. *Polymer*, 1981, 22: 494~498
- [51] Grijpma DW, Nijenhuis NJ, Pennings AJ. Synthesis and hydrolytic degradation behavior of high-molecular-weight L-lactide and glycolide copolymers[J]. *Polymer*, 1990, 31: 2201~2206
- [52] Landry FB, Bazile DV, Spenlehauer G, et al. Influence of coating agents on the degradation of poly(D, L-lactic acid) nanoparticles in model digestive fluids[J]. *Pharm Sci*, 1996, 6(3): 195~199
- [53] Landry FB, Bazile DV, Spenlehauer G, et al. Release of the fluorescent marker prodan from poly(D, L-lactic acid) nanoparticles coated with albumin or polyvinyl alcohol in model digestive fluids[J]. *J Controlled Release*, 1997, 44: 227~232
- [54] Landry FB, Bazile DV, Spenlehauer G, et al. Peroral administration of 14c-poly(D, L-lactic acid) nanoparticles coated with human serum albumin or polyvinyl alcohol to guinea pigs[J]. *J Drug Target*, 1998, 6(4): 293~298
- [55] Tobio M, Gref R, Sanchez A, et al. Stealth PLA-PEG nanoparticles as protein carriers for nasal administration[J]. *Pharm Res*, 1998, 15: 270~275
- [56] Allemann E, Gurny R, Doelker E, et al. Distribution, kinetics and elimination of radioactivity after intravenous and intramuscular injection of 14c-savoxepine loaded poly(D, L-lactic acid) nanospheres to rats[J]. *J Controlled Release*, 1994, 29: 97~101
- [57] Fawaz F, Bonini F, Guyor M, et al. Influence of poly(D, L-lactic acid) nanospheres on the biliary clearance and enterohepatic circulation of indomethacin in

- the rabbit[J]. *Pharm Res*, 1993, 10: 750~753
- [58] Nadaka Y, Tudomi R, Sakurai K, et al. Evaluation of long-circulation nanoparticles using biodegradable ABA triblock copolymers containing poly(L-lactic acid) A-blocks attached to central poly(oxyethylene) B-blocks in vivo[J]. *Int J Pharm*, 1998, 175(26): 109~113
- [59] Fawaz F, Bonini F, Guyot M, et al. Disposition and protective effect against irritation after intervenous and rectal administration of indomethacin loaded nanocapsules to rabbits[J]. *Int J Pharm*, 1995, 133(14): 107~110
- [60] Leroux JC, Cozens R, Roesel JL, et al. Pharmacokinetics of a novel HIV-1 proteasa inhibiyor incorporated into biodegradable of enteric nanoparticles following intravernous and oral administration to mice[J]. *J Pharm Sci*, 1995, 84: 1387~1391
- [61] Kim SC, Kim DW, Shim YH, et al. In vivo evaluation of polymeric micellar paclitaxel formulation toxicity and efficacy[J]. *J Controlled Release*, 2001, 72: 191~202
- [62] 潘妍, 徐晖, 赵会英. 胰岛素乳酸/羟基乙酸共聚物纳米粒的制备及口服药效学研究[J]. *药学学报*, 2002, 37(2): 374~377
- [63] Guterres S, Fessi H, Barratt G, et al. Poly(D, L-lactic acid) nanocapsules containing nonsteroidal anti-inflammatory drugs: gastrointestinal tolerance following intravenous and oral administration[J]. *Pharm Res*, 1995, 12: 1545~1549
- [64] Rodrigues JM, Fessi H, Bories C, et al. Primaquine loaded poly(lactide) nanoparticles : physicochemical study and acute tolerance in mice[J]. *Int J Pharm*, 1995, 126(29): 253~257
- [65] Guo JX, Ping QN, Chen Y. Lecithin vesicular carriers for transdermal delivery of cyclosporin A[J]. *Int J Pharm*, 2000, 194: 201~207
- [66] Guo JX, Ping QN, Zhang L, et al. transdermal delivery of insulin in mice by using lecithin vesicles as a carrier[J]. *Drug Deliv Syst*, 2000, 7: 113~116
- [67] 张磊, 平其能, 郭健新. 口服胰岛素纳米脂质体的制备及其降血糖作用[J]. *中国药科大学学报*, 2001, 32(1): 25~29
- [68] Muller RH, Mader K, Cohia S. Solid lipid nanoparticles for controlled drug delivery: a review of the state of the art[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2000, 50: 161~177
- [69] Westesena K, Bunjess H, Kochb M. Physicochemical characterization of lipid nanoparticles and evaluation of their drug loading capacity and sustained release potential[J]. *J Controlled Release*, 1997, 48: 223~236
- [70] Jenning V, Gohis SH. Encapsulation of recinoids in solid lipid nanoparticles[J].

J Microencapsulation, 2001, 18: 149~158

[71] Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, et al. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices[J]. J Controlled Release, 2001, 70: 1~20

[72] Jung T, Kamm W, Breitenbach A, et al. Biodegradable nanoparticles for oral delivery of peptides[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2000, 50: 147~160

[73] Jones MC, Leroux JC. Polymeric micelles-a new generation of colloidal drug carriers[J]. Eur J Pharm Biopharm, 1999, 48: 101~111

[74] Liu HB, Farrell S, Uhrich K. Drug release characteristics of unimolecular polymeric micelles[J]. J Controlled Release, 2000, 68: 167~174

[75] 侯有军, 任力, 罗正汤等. 乳液法制备聚合物纳米粒子及其结构表征与应用[J]. 离子交换与吸附, 2001, 17(2): 178~186

[76] Lambert G, Fattal E, Couvreur P. Nanoparticles systems for the delivery of antisense oligonucleotides[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2001, 47: 99~112

[77] Muller RH, Jacob C, Kayser O. Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy rationale for development and what we can expect for the future[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2001, 47: 3~19

[78] Muller RH, Mehnert W, Lucks JS, et al. Solid lipid nanoparticles (SLN)-an alternative colloidal carrier system for controlled drug delivery[J]. Eur J Pharm Biopharm, 1995, 41: 62~69

[79] 刘海峰, 常津. 明胶-聚乳酸载药纳米微粒的制备及其体外释药研究[J]. 中国生物医学工程学报, 2002, 22(2): 178~182

[80] Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, et al. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices[J]. J Controlled Release, 2001, 70: 1~20

[81] 何洋, 谢玉冰, 王勇等. APA 微胶囊扩散数学模型的改进[J]. 高等学校化学学报, 2000, 21(2): 278~282

[82] 徐铜文, 何炳林. 扩散型膜控制释放技术的进展[J]. 世界科技研究与发展, 2000, 22(1): 20~25

[83] Milan P, Tatiana G, Ruxandra G, et al. Lidocaine loaded biodegradable nanospheres modeling of drug release[J]. J Controlled Release, 1999, 60: 169~177

[84] Hopfenberg HB, Paul DR, Harris HW. Controlled release from erodible slabs, cylinders and spheres in controlled release polymeric formulation[M]. Washington DC: American Chemical society, 1976

[85] 萧聪明, 朱康杰. 可控生物降解释药材料的设计与研究[J]. 高分子材料科学与工程, 2000, 16(6): 175~177

- [86] 修志龙, 齐冬建, 苏志国. 纳米技术在药物制剂中的应用[J]. 高技术通讯, 1996,(9): 56~59
- [87] 张治铤编著. 抗生素药品检验[M]. 北京:人民卫生出版社, 1987
- [88] 陈新谦, 全有豫主编. 新编药理学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1995
- [89] 王肇炎, 韩锐主编. 肿瘤药物治疗[M]. 北京:人民卫生出版社, 1987
- [90] 蒋学华, 廖工铁, 姚倩. 毫微粒作为药物载体的应用[J]. 中国药学杂志, 1994,29(11): 643~646
- [91] Kubiak C, Couvreur P, Manil L, et al. Increased cytotoxicity of nanoparticle-carrier adriamycin in vitro and potentiation by verapamil amiodarone[J]. Biomaterials, 1989, 10: 553~561
- [92] Astier A, Boat B, Ferrer MJ, et al. Enhancement of adriamycin antitumor activity by its binding with an intracellular sustained-release form polymethacrylate nanospheres in U-937 cells[J]. Cancer Res, 1988, 48(7): 1835~1842
- [93] Chiannikulchai N, Driouich Z, Benoit JP, et al. Doxorubicin-loaded nanoparticles: increased efficiency in murine hepatic metastases[J]. Sel Cancer Res, 1989, 5(1): 1~7
- [94] Chiannikulchai N, Ammoury N, Caillou B, et al. Hepatic tissue distribution of doxorubicin-loaded nanoparticles after i.v. administration in reticulosarcoma M5076 metastasis-bearing mice[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 1990, 26(2): 122~129
- [95] 常津. 具有靶向抗癌功能的纳米高分子材料——阿霉素免疫磁性毫微粒的体内磁靶向定位试验[J]. 中国生物医学工程学报, 1996,15(4): 354~359
- [96] Kattan J, Droz JP, Couvreur P, et al. Phase 1 clinical trial and pharmacokinetic evaluation of doxorubicin carried by polyisohexylcyanoacrylate nanoparticles[J]. Invest New Drugs, 1992, 10(3): 191~197
- [97] 仇文升, 李安良主编. 药物化学[M]. 北京:高等教育出版社, 1999
- [98] 唐玉海主编. 医用有机化学[M]. 北京:高等教育出版社, 2000
- [99] 阎家麒, 王惠杰, 童岩等. 紫杉醇微乳的研究[J]. 中国药学杂志, 2000,35(3): 173~175
- [100] Anil KS, Alka G, Deepika A. Paclitaxel and its formulations[J]. Int J Pharm, 2002, 235: 179~192
- [101] Sharma A, Straubinger RM. Novel Taxol formulations: preparation and characterization of Taxol-containing liposomes[J]. Pharm Res, 1994, 11: 889~895
- [102] 陈大兵, 吕万良, 杨天智等. 紫杉醇表面修饰脂质纳米粒的制备和性质[J]. 北京大学学报(医学版), 2002,34(1): 57~60

- [103] Mu L, Feng SS. Vitamin E TPGS used as emulsifier in the solvent evaporation/extraction technique for fabrication of polymeric nanospheres for controlled release of paclitaxel[J]. *J Controlled Release*, 2002, 80: 129~144
- [104] Wang YM, Sato H, Adachi I, et al. Preparation and characterization of poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres for targeted delivery of novel anticancer agent, taxol[J]. *Chem Pharm Bull*, 1996, 44: 1935~1940
- [105] Kim SY, Lee YM. Taxol-loaded block copolymer nanospheres composed of methoxy poly(ethylene glycol) and poly(caprolactone) as novel anticancer drug carriers[J]. *Biomaterials*, 2002, 22: 1697~1704
- [106] 董志伟, 乔友林, 李连弟等. 中国癌症控制策略研究报告[J]. *中国肿瘤*, 2002, 11(5): 250~260
- [107] Illum L. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient[J]. *Pharm Res*, 1998, 15(9): 1326~1331
- [108] Ohya Y, Shiratani M, Kobayashi H, et al. Release behavior of 5-fluorouracil from chitosan-gel nanospheres immobilizing 5-fluorouracil coated with polysaccharides and their cell specific cytotoxicity[J]. *Pure Appl Chem*, 1994, A31: 629~642
- [109] Berthold A, Cremer K, Kreuter J. Preparation and characterization of chitosan microspheres as drug carrier for prednisolone sodium phosphate as model for anti-inflammatory drugs[J]. *J Controlled Release*, 1996, 39: 17~25
- [110] 方华丰, 周宜开. 壳聚糖微球的研究进展[J]. *中国医院药学杂志*, 1999, 19(12): 744~745
- [110] Yong Hu, Xiqun Jiang, Yin Ding, et al. Synthesis and characterization of chitosan-poly(acrylic acid) nanoparticles[J]. *Biomaterials*, 2002, 23(15): 3193~3201
- [112] Shikata F, Tokumitsu H, Ichikawa H, et al. In vitro cellular accumulation of gadolinium incorporated into chitosan nanoparticles designed for neutron-capture therapy of cancer[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 1998, 15(1): 58~65
- [113] 梁治齐编著. 微胶囊技术及其应用[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999
- [114] Calvo P, Remunan-Lopez C, Vila-Jato JL, et al. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers[J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 1997, 63: 25~32
- [115] 沈钟, 王果庭编著. 胶体与表面化学[M]. 北京: 化学工业出版社, 1997
- [116] 严瑞宣主编. 水溶性高分子[M]. 北京: 化学工业出版社, 1998
- [117] 何东保, 石毅, 梁红波等. 壳聚糖-海藻酸钠协同相互作用及其凝胶化的研

- 究[J]. 武汉大学学报(理学版), 2002,48(2): 193~196
- [118] 刘程主编. 表面活性剂应用大全[M]. 北京:北京工业大学出版社, 1994
- [119] 刘程, 张万福, 陈长明主编. 表面活性剂应用手册[M]. 北京:化学工业出版社, 1995
- [120] Knaul JZ, Hudson SM, Creber KA. Improved mechanical properties of chitosan fibers[J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 1999, 72: 1721~1731
- [121] 刘晓波, 蔡美英, 龚艳. 阿霉素人血清白蛋白微球的制备及其性质的初步研究[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2004, 35(1): 107~109
- [122] Mitra S, Gaur U, Ghosh PC, et al. Tumor targeted delivery of encapsulated dextran-doxorubicin conjugate using chitosan nanoparticles as carrier[J]. *J Controlled Release*, 2001, 74: 317~323
- [123] Kevin AJ, Marie P F, Ana M, et al. Chitosan nanoparticles as delivery systems for doxorubicin[J]. *J Controlled Release*, 2001, 73(2): 255~267
- [124] 王杰. 长循环纳米粒[J]. *国外医学: 药学分册*, 1999,26(6): 350~354
- [125] Zambaux ME, Bonneaux F, Gref R, et al. Influence of experimental parameters on the characteristics of poly(lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method[J]. *J Controlled Release*, 1998, 50: 31~37
- [126] Niwa T, Takeuchi II, Iiino T, et al. In vitro drug release behavior of D,L-lactide/glycolide copolymer(PLGA) nanospheres with nafarelin acetate prepared by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion methods[J]. *J Pharm Sci*, 1994, 83(5): 727~732
- [127] 赵峰, 陈小平. 溶剂对无表面活性剂法制备诺氟沙星 PLGA 毫微粒及其对释药的影响[J]. *国外医学药学分册*, 2001,28(2): 126~130
- [128] Wehred P, Magenhein B, Benita S. Influence of process parameters on the PLA nanoparticle size distribution, evaluated by means of factorial design[J]. *Eur J Pharm and Biopharm*, 1995, 41(1): 19~25
- [129] Pitt GG, Chasalow FI, Hibionada YM, et al. Aliphatic polyesters: the degradation of poly(caprolactone) in vivo[J]. *J Appl Polym Sci*, 1979, 26: 3779~3787
- [130] Pitt GG, Gratzel MM, Kimmel GL, et al. Aliphatic polyesters: the degradation of poly(D,L-lactide), poly(caprolactone) and their copolymers in vivo[J]. *Biomaterials*, 1981, 2: 215~220
- [131] Woodward SC, Brewer PS, Moatamed F, et al. The intracellular degradation of poly(caprolactone)[J]. *J Biomed Mater Res*, 1989, 19: 437~444
- [132] Spenlehaur G, Vert M, Benoit JP, et al. In vitro and in vivo degradation of

- poly(DL-lactide/glycolide) type microspheres made by solvent evaporation method[J]. *Biomaterials*, 1989, 10(5): 557~563
- [133] Ramesh P. Pharmaceutical aspects of paclitaxel[J]. *Int J Pharm*, 1998, 172(5): 1~15
- [134] Fjallskog ML, Frii L, Rergh J. Is Cremophor , solvent for paclitaxel, cytotoxic?[J]. *Lancet*, 1993, 342: 876~879
- [135] 张景京, 张志荣, 罗恒. 反相高效液相色谱法测定紫杉醇及其制剂的包封率[J]. *华西药学杂志*, 2001, 16(2): 96~97
- [136] Stoem G, Belliot SO, Daeman T, et al. Surface modification of nanoparticles to oppose uptake by the mononuclear phagocyte system[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 1995, 17: 31~48
- [137] Stolnik S, Dunn SE, Garnett MC, et al. Surface modification of poly(lactide-co-glycolide) nanospheres by biodegradable poly(lactide)-poly(ethylene glycol) copolymerw[J]. *Pharm Res*, 1994, 11(12): 1800~1808
- [138] 王章阳, 廖工铁. 毫微粒载体材料的体内外降解及毒性[J]. *中国药学杂志*, 1999, 34(2): 73~75
- [139] 司徒镇强, 吴军正主编. 细胞培养[M]. 西安:世界图书出版公司, 2004
- [140] Liebmann J, Cook JA, Lipschultz C, et al. Cytotoxic studies of paclitaxel(Taxol) in human tumor cell lines[J]. *Br J Cancer*, 1993, 68(6): 1104~1109
- [141] Liebmann J, Cook JA, Mitchell JB C, et al. Cremophor EL solvent for paclitaxel and toxicity[J]. *Lancet*, 1993, 342(8884): 1428~1434
- [142] Leroux JC, Doelker E, Gurny R. The use of drug-loaded nanoparticles in cancer chemotherapy[M]. New York: Marcel Dekker, 1996
- [143] 陈大兵, 吕万良, 杨天智等. 紫杉醇表面修饰脂质纳米粒的制备和性质[J]. *北京大学学报(医学版)*, 2002, 34(1): 57~60
- [144] 叶敏, 朱珠, 傅强等. HPLC 测定人血浆中紫杉醇浓度[J]. *中国药学杂志*, 1999, 34(1): 41~43
- [145] 阎家麒, 王悦, 王九一. 紫杉醇隐形脂质体的制备及在小鼠体内的组织分布[J]. *药学学报*, 2000, 35(9): 706~709
- [146] 何蕾, 王桂玲, 张强. 紫杉醇纳米乳剂的体内外考察[J]. *药学学报*, 2003, 38(3): 227~230

致 谢

本研究凝聚多人的心血。首先感谢导师周春山的指导，论文工作从选题、实验研究到全文的审定一直得到了导师周春山教授的悉心指导。从师四年，导师渊博的专业知识，严谨的治学态度，忘我的工作作风和诲人不倦的风范都给我留下了深刻的印象，并将使我受益终生。

衷心感谢卫生部肝胆肠外科中心龚连生副教授，潘一峰博士，李斌生、郭妍硕士对我科研工作的大力技术指导和帮助。

特别感谢中南大学肿瘤研究所朱诗国、向娟娟博士，中南大学分子药理研究所文军博士给予我工作上的指导和帮助。

感谢在整个实验研究过程中为我做了大量检测工作的张玉敏老师。

感谢中南大学化学化工新技术所的各位老师以及与我一起求学的唐课文、朱华等同学。几年来，他们给了我很多热情指导和无私帮助。

最后，感谢我的父母和家人，是他们的无私奉献、支持和鼓励才使我能顺利完成学业。

2004年12月

攻读学位期间的主要研究成果

一、发表的学术论文

- [1] Jiang Xinyu, Zhou Chunshan & Tang Kewen. Preparation of PLA and PLGA nanoparticles by binary organic solvent diffusion method[J]. Journal of Central South University of Technology, 2003, 10(3): 202~206 (SCI、EI 收录)
- [2] 蒋新宇, 周春山, 张俊山. 应用三聚磷酸钠为交联剂制备载药物纳米粒的研究[J]. 中国现代医学杂志, 2003, 13(22): 69~71
- [3] 蒋新宇, 周春山, 唐课文. 二元溶剂分散法制备 PLA 和 PLGA 纳米粒[J]. 应用化学, 2003, 20(8): 732~735.
- [4] 蒋新宇, 周春山, 张俊山等. 导向药物用纳米 Fe_3O_4 磁性粒子的制备及表征[J]. 中南工业大学学报, 2003, 34(5): 516~520
- [5] 蒋新宇, 周春山, 邓 晔. 壳聚糖载药微球的研制[J]. 常德师范学院学报(自然科学版), 2003, 15(1): 36~39
- [6] 蒋新宇, 周春山. 铋基体分离及纯铋中杂质成分的 ICP-MS 测定[J]. 矿冶, 2002, 11(1): 77~79 (EI 收录)
- [7] 蒋新宇, 王微宏. 临床医学专业有机化学教学法初探[J]. 中国教育理论杂志, 2003, 35(9): 71
- [8] 蒋新宇, 周春山, 汤淑芳. N235 萃取色谱法分离萃铟余液中锆的研究[J]. 稀有金属, 2002, 26(2): 116~119
- [9] 蒋新宇, 周春山, 唐课文. 镉基体分离及纯镉中杂质成分的 ICP-MS 法测定[J]. 分析试验室, 2003, 20(2): 61~63
- [10] 蒋新宇, 周春山. 钨酸钠溶液中的钨钼分离研究[J]. 稀有金属与硬质合金, 2002, 30(3): 11~13
- [11] 蒋新宇, 周春山. 高钴硫酸锌溶液中钴的分离研究[J]. 有色矿冶, 2001, 12(6): 29~31
- [12] 董朝青, 蒋新宇, 周春山. 大孔吸附树脂对柚皮甙的吸附分离[J]. 中南工业大学学报, 2005, 36(1): 82~86
- [13] 张俊山, 陈晓青, 蒋新宇等. 纳米药物研究进展[J]. 中国现代医学杂志, 2002, 12(14): 39~42
- [14] Tang Kewen, Zhou Chunshan, Jiang Xinyu. Racemic ofloxacin separation by supported -liquid membrane extraction with two organic phases[J]. Science in China (seriesB), 2003, 46(1): 96~103 (SCI 收录)

- [15] 唐课文, 周春山, 蒋新宇. 手性溶液萃取分离氧氟沙星对映体[J]. 药学学报, 2002, 37(12): 967~970
- [16] 唐课文, 周春山, 蒋新宇. 支载膜双有机相逆流萃取分离手性对映体药物[J]. 中国科学(B 辑), 2002, 32(6): 491~496
- [17] 唐课文, 周春山, 蒋新宇. 沉淀-吸附法制备高纯酯型儿茶素[J]. 中南工业大学学报, 2002, 33(3): 247~249
- [18] 钟世安, 周春山, 蒋新宇. 芳香族亚砷缓蚀剂对碳钢的腐蚀抑制作用[J]. 中南工业大学学报, 2002, 33(1): 32~35
- [19] 陈晓青, 张俊山, 蒋新宇等. 双层表面活性剂包覆制备水基磁流体[J]. 无机化学学报, 2003, 19(5): 547~551 (SCI 收录)
- [20] 董朝青, 蒋新宇, 周春山. 柚子中柚皮甙提取工艺研究[J]. 湖南文理学院学报(自然科学版), 2004, 16(1): 34~36
- [21] 钟世安, 蒋新宇. 铜制品常温发黑研究[J]. 电镀与环保, 2002, 2: 26~27
- [22] 王艳, 周春山, 蒋新宇. 钴(III)-亚硝基 R 盐体系极谱波研究及锌电解液中钴的快速测定[J]. 理化检验(化学分册), 2002, 37 (8): 343~345
- [23] 彭密军, 周春山, 蒋新宇等. 中药栀子中高效药用活性成分京尼平甙的分离纯化. 第三届全国生物与制药技术研讨会论文集, 2003: 55~61

二、专利申请

1. 周春山, 蒋新宇, 钟世安. 高纯茶多酚绿色提取工艺. 专利号: ZL01106878.7, 授权公告日: 2004-4-28
2. 周春山, 钟世安, 蒋新宇. 表没食子儿茶素表没食子酸酯的分离制备工艺. 专利号: ZL01106877.9, 授权公告日: 2004-9-1
3. 周春山, 董朝青, 蒋新宇等. 从柚子中同时提取果胶、柚皮甙等八种产物的方法. 申请号: 03118175.9, 2003-3-12
4. 周春山, 任秀莲, 蒋新宇等. 从苦丁茶中提取总三萜酸及熊果酸、齐墩果酸的方法. 申请号: 02115387.5, 2002-12-18

三、参加的主要研究项目

1. 纳米药物载体治疗技术——人体恶性肿瘤. 国家 863 高技术项目 (2001AA218011), 2001 年 1 月
2. 特异性高分子纳米载体材料的研究开发. 湖南省科委工业攻关计划项目 (03GKY3003), 2003 年 8 月
3. 高纯酯型培儿茶素单体及其异构体衍生物. 国家中小企业创新基金项目

(02C26214300675), 2002年1月

4. 天然植物有效成分提取新技术研究开发. 湖南省科技厅重点立项项目(00NKY1010), 2001年3月

5. 农副产品中稀贵成分的分离提取研究. 国家农业成果转化基金项目, 2002年7月

四、成果鉴定

1. 周春山, 钟世安, 蒋新宇等. 天然酯型儿茶素单体的分离与提取. 评审结论: 国际先进、国内领先水平. 湖南省科委鉴定, 2001年11月

2. 周春山, 彭密军, 蒋新宇等. 高纯金尼泊甙酸的分离提取. 评审结论: 国际先进、国内领先水平. 湖南省科委鉴定, 2002年5月

五、著作

1. 医科大学化学. 北京: 化学工业出版社, 2003. (编写下册第十六章)