

文章编号:1671-6833(2010)03-0016-04

5-氟尿嘧啶磁性固体脂质纳米粒制备工艺优化研究

沈国鹏¹, 梁春丽¹, 葛庆平², 杜 斌³

(1. 郑州大学 化工与能源学院, 河南 郑州 450001; 2. 河南省产品质量监督检验院, 河南 郑州 450052;
3. 郑州大学 药学院, 河南 郑州 450001)

摘 要: 为提高5-氟尿嘧啶(5-FU)制剂的疗效,降低毒副作用,以单硬脂酸甘油酯为载体,氢化大豆卵磷脂、泊洛沙姆为乳化剂,磁性纳米四氧化三铁为磁体,采用复乳-溶剂挥发法制备5-氟尿嘧啶磁性固体脂质纳米粒(5-FU-MSLN)。以包封率为考察指标,通过单因素实验和正交设计对制备工艺进行优化,所制备的5-FU-MSLN包封率为58.35%。用透射电镜观察,磁性固体脂质纳米粒外观形态圆整,粒径分布均匀;在倒置的显微镜下观察,磁性固体脂质纳米粒体外磁响应性良好,实验结果表明,5-FU-MSLN是有希望的静脉给药靶向制剂。

关键词: 5-氟尿嘧啶;磁性固体脂质纳米粒;工艺优化;包封率

中图分类号: TQ469; R944

文献标识码: A

0 引言

5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)是临床常用的抗肿瘤药物之一^[1],广泛用于各种实体瘤的治疗,但其血浆半衰期短,毒副作用较大,不易为患者所接受。目前国内外研究报道的有关5-氟尿嘧啶新剂型主要有5-FU脂质体、5-FU复合微球、5-FU纳米乳剂以及5-FU固体脂质纳米粒。磁性固体脂质纳米粒(Magnetic Solid Lipid Nanoparticle, MSLN)是近年来研究的一种新型靶向制剂,该制剂使药物同时具有生物功能、磁性靶向功能和治疗功能。制备固体脂质纳米粒的方法主要有热匀质法、冷匀法、复乳法、溶剂分散法等^[2-4]。Mao等^[5]以硬脂酸为载体,用热匀质法制备的5-氟尿嘧啶固体脂质纳米粒不但粒径较大,以100 mg 5-FU为例,包封率仅为22.40%,而5-氟尿嘧啶磁性固体脂质纳米粒(5-FU-MSLN)的制备目前国内外鲜见报道。本研究结合生物靶向(固体脂质纳米粒)与物理靶向(磁靶向)二种靶向方法,采用复乳-溶剂挥发法制备5-FU-MSLN,使5-FU被包裹在磁性固体脂质纳米粒的内水相中,提高其疗效,降低毒副作用,并以包封率为考察目标,通过单因素实验与正交

设计对制备工艺进行了优化。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

7401-90电动搅拌器(天津市华兴科学仪器厂);BP211D型电子天平(德国赛多利斯公司);JY92-II超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司);UV-2102 PC紫外-可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);Nano-ZS90型激光纳米粒度分析仪(英国马尔文公司);Tecnai G² 20 S-TWIN透射电子显微镜(荷兰FEI公司);铷铁硼强磁铁(郑州大学磁性材料厂);XSP3A单目显微镜(上海万衡精密光学仪器厂)。

5-FU(常州剑湖化工有限公司,批号:061108,纯度≥99%);单硬脂酸甘油酯(成都科龙化工试剂厂);氢化大豆卵磷脂(上海爱康精细化工有限公司);泊洛沙姆-188(上海协泰化工有限公司);磁性纳米四氧化三铁(自制,粒径范围为10~20 nm);葡聚糖凝胶(生化试剂,台州市路桥四甲生化塑料厂)。

1.2 5-FU-MSLN的制备方法

精密称取处方量单硬脂酸甘油酯、氢化大豆卵磷脂加入20 mL无水乙醇和氯仿混合溶液

收稿日期:2009-12-05;修订日期:2010-01-18

基金项目:郑州市科技攻关计划资助项目(083SGYS33261-1)

作者简介:沈国鹏(1963-),男,河南郑州人,郑州大学副教授,主要从事有机合成、药物制剂研究,

E-mail: guopen@zzu.edu.cn.

(1:1),一定温度下水浴溶解,得到脂质溶液.称取 100 mg 5-FU 置 5 mL 超纯水中超声水浴溶解制成内水相,同时称取表面活性剂泊洛沙姆适量,溶于 pH=7.2 的 PBS 缓冲溶液中作外水相;缓慢将内水相滴入脂质溶液中,同时加入适量磁性纳米四氧化三铁,形成 W/O 型初乳,滴加完毕后,用 400 W 探头超声分散 30 s,将其滴加入到含表面活性剂的同温度外水相中,搅拌乳化,减压蒸馏缓慢除去有机溶剂,200 W 探头超声分散 1 min,形成 W/O/W 型 5-FU-MSLN 混悬液^[6-9],按 1.3 方法测包封率,平行实验 3 次,取其平均值.

1.3 包封率的测定

参照文献[10],采用葡聚糖凝胶柱色谱法测定包封率.色谱柱为 Sephadex G-50(φ1.0×20 cm),洗脱液为超纯水.取 5-FU-MSLN 0.2 mL 上样于填装好的葡聚糖凝胶柱上,用超纯水以 0.5 mL/min 流速洗脱,每 2 mL 收集一次,分离被包封药物与游离药物.以超纯水为空白,紫外-可见分光光度计在 265 nm 波长处测定游离药物的含量.包封率计算如下

包封率 = $(W_{总} - W_{游}) / (W_{总}) \times 100\%$

式中:W_总 为药物总质量,μg;W_游 为游离药物质量,μg.

1.4 产品的表征

1.4.1 5-FU-MSLN 的形态观察

取 5-FU-MSLN 加适量超纯水稀释,取适量滴加在覆盖碳膜的铜网上,室温干燥形成薄膜后,用透射电子显微镜观察其形态.

1.4.2 体外磁性响应性

取 5-FU-MSLN 混悬液适量,均匀涂布在载玻片上,载玻片一侧放置一块钕铁硼强磁铁,在倒置显微镜下观察磁性固体脂质纳米粒在强磁场作用下的定向移动效果.

2 结果与讨论

2.1 制备工艺的单因素实验

影响 5-FU-MSLN 包封率的因素较多,本研究在预实验的基础上,初步确定单硬脂酸甘油酯质量分数为 4.0%,药脂比(5-FU 与单硬脂酸甘油酯的质量比)为 1/10,磁性纳米四氧化三铁质量分数为 0.1%,乳化温度为 55~60℃,乳化时间为 1 h,初乳 400 W 超声分散 30 s,终乳 200 W 超声分散 1 min,用单因素法确定对包封率影响较大的类脂比(氢化大豆卵磷脂与单硬脂酸甘油酯的质量比)、泊洛沙姆质量分数,其结果见表 1.

表 1 单因素实验结果

Tab.1 Test results of single factor

因素	水平	包封率/%
类脂比(g/g) (泊洛沙姆质量分数为 1.0%)	1/20	35.33
	1/10	52.21
	3/20	33.33
	1/5	—
泊洛沙姆质量分数/% (类脂比为 1/10)	0.5	57.10
	1.0	55.21
	1.5	50.55
	2.0	44.21

从表 1 结果可见,类脂比对包封率的影响较大.类脂比过小,乳化效果不好,W/O 型初乳不稳定,包封率不高;类脂比过大,固体脂质纳米粒容易聚集、粘连而使脂质沉淀,药物泄露到分散介质中,包封率下降.包封率随着外水相泊洛沙姆浓度增大而减小,泊洛沙姆质量分数为 0.5% 时,包封率最高,而且经测定固体脂质纳米粒的 Zeta 电位也较稳定,分散性良好.

2.2 制备工艺的正交实验优化

2.2.1 正交实验设计

在单因素实验的基础上,采用 L₉(3⁴) 正交实验,考察药脂比、类脂比、泊洛沙姆质量分数、乳化温度的交互作用对 5-FU-MSLN 包封率的影响,见表 2.

表 2 因素与水平数

Tab.2 Factors and levels of orthogonal test

水平	A	B	C	D
	药脂比 (g/g)	类脂比 (g/g)	泊洛沙姆质量 浓度/%	乳化温度 /℃
1	1/5	1/20	0.5	45
2	1/8	1/10	1.0	50
3	1/10	3/20	1.5	55

表 3 样品包封率测定结果

Tab.3 The encapsulation efficiency results of samples

实验号	A	B	C	D	包封率/%
1	1	1	1	1	29.25
2	1	2	2	2	42.69
3	1	3	3	3	24.00
4	2	1	2	3	32.50
5	2	2	3	1	51.74
6	2	3	1	2	32.58
7	3	1	3	2	36.80
8	3	2	1	3	58.63
9	3	3	2	1	32.39
R1/%	31.98	32.85	40.15	37.89	
R2/%	38.94	51.02	35.96	37.36	
R3/%	42.71	29.76	37.51	38.38	
R/%	10.73	21.26	4.19	1.02	

表 4 方差分析表

Tab.4 The results of variance analysis

方差来源	偏差平方和	自由度	方差	F 值	P
A	177.69	2	88.85	113.76	<0.05
B	791.85	2	395.93	506.94	<0.05
C	26.97	2	13.49	17.26	
D	1.56	2	0.786	1.000	
误差	1.56	2	0.786		

2.2.2 正交实验结果

由表 3、4 的极差分析和方差分析结果可知,在 4 个因素中,对 5-FU-MSLN 包封率的影响重要性依次为 $B>A>C>D$ 。综合各个因素,选择 $A_3B_2C_1D_3$ 组合,即药脂比为 1/10,类脂比为 1/10,泊洛沙姆质量分数为 0.5%,乳化温度为 55℃的工艺来制备 5-FU-MSLN。

2.3 工艺验证实验

按照最佳处方重复 3 次,制备 5-FU-MSLN,测定其包封率,结果见表 5。

表 5 验证实验结果

Tab.5 The verification test results %			
实验号	包封率	平均包封率	相对平均偏差
1	57.43	—	—
2	58.97	58.35	0.794
3	58.55	—	—

从表 5 的结果看出,按照优化后的工艺,经过 3 次实验制备的 5-FU-MSLN 平均包封率为 58.35%,相对平均偏差为 0.794%,说明制备工艺可靠,重现性良好。

2.4 5-FU-MSLN 的微观形态观察

图 1 透射电子显微镜照片显示的是按照最佳方案制备的 5-FU-MSLN,5-FU-MSLN 大都呈规则、完整的球形,粒子分散状态良好,无粘连,粒径分布范围为 50~100 nm,分布比较均匀。

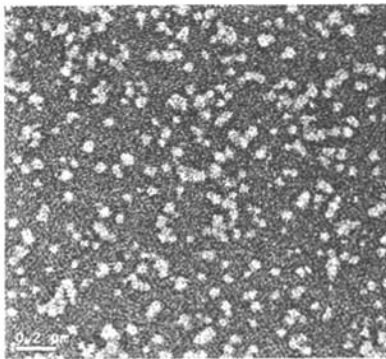


图 1 5-FU-MSLN 的透射电镜照片
Fig.1 Microphotograph of 5-FU-MSLN by transmission electron microscope

2.5 体外磁响应性

从图 2 可以观察到,随着时间的推移,5-FU-MSLN 在人工强磁场中发生定向移动,逐渐聚集在靠近钕铁硼强磁铁载玻片的一侧,这些现象说明,5-FU-MSLN 对人工强磁场有良好的反应能力,能较短时间内从低磁场强度方位向高磁场强度方位发生自动的定向移动。

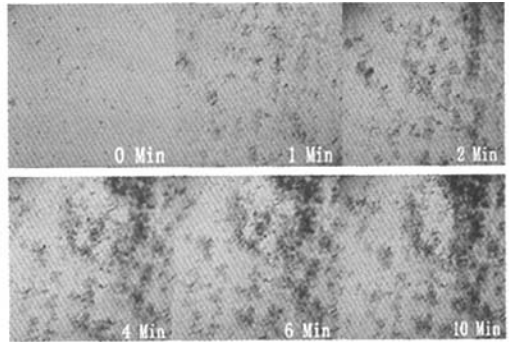


图 2 5-FU-MSLN 在磁场中不同时间点分布

Fig.2 The distribution of 5-FU-MSLN at different time points in the magnetic field

3 结论

(1)本研究采用复乳-溶剂挥发法制备 5-FU-MSLN,通过单因素实验和正交实验对制备工艺进行了优化,得到最佳制备条件为:单硬脂酸甘油酯质量分数为 4.0%,药脂比为 1/10,类脂比为 1/10,磁性纳米四氧化三铁用量为 0.1%,泊洛沙姆质量分数为 0.5%,乳化温度为 55℃,乳化时间为 1 h,初乳 400 W 超声分散 30 s,终乳 200 W 超声分散 1 min。

(2)按此工艺制备的 5-FU-MSLN 包封率为 58.35%;粒子外观圆整、粒径分布为 50~100 nm,体外磁响应性良好。

(3)此制备工艺简单、重现性好,为 5-FU-MSLN 的工业化生产提供了依据。

参考文献:

[1] 5-氟尿嘧啶联合替尼泊苷对胃癌 BGC-823 细胞增殖和凋亡的影响[J]. 郑州大学学报:医学版,2009,44(5):945-947.
[2] JAIN S K, CHAURASIYA A, GUPTA Y, et al. Development and characterization of 5-FU bearing ferritin appended solid lipid nanoparticles for tumour targeting [J]. J Microencapsul, 2008, 25 (5):289-297.
[3] 李航,袁华,仲谦,等.5-氟尿嘧啶载药微球的制备及性能研究[J]. 功能材料,2007,38(2):298-301.

- [4] JOSE L A, VISITACION C, M D R, et al. Magnetite poly - (alkylcyanoacrylate) (core/shell) nanoparticles as 5 - Fluorouracil delivery systems for activetargeting[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2008(69): 54 - 63.
- [5] MAO S R, WANG P, BI D Z. Investigations on 5 - fluorouracil solid lipid nanoparticles (SLN) prepared by hot homogenization[J]. Pharmazie, 2005, 60(4): 273 - 277.
- [6] 毛世瑞,王燕芝,纪宏宇,等.微乳化技术制备固体脂质纳米粒[J].药学报,2003,38(8):624 - 626.
- [7] NIHANT N, SCHUGENS C, GRANDFILS C, et al. Polylactide microparticles prepared by double emulsion/evaporation technique. I. effect of primary emulsion stability[J]. Pharm. Res., 1994, 11(10): 1479 - 1484.
- [8] MENG F, MA G H, QIU W, et al. W/O/W double emulsion technique using ethyl acetate as organic solvent: effects of its diffusion rate on the characteristics of microparticles [J]. J Controlled Release, 2003(97): 407 - 416.
- [8] 王馨,黄华.醋酸泼尼松龙固体脂质纳米粒的试制[J].中国医药工业杂志,2007,38(7):499 - 501.
- [10] 倪倩,吴海燕,凌飒,等.咪喹莫特固体脂质纳米粒包封率的测定[J].中国药师,2006,9(7):599 - 602.

Study on Optimization of 5 - Fluorouracil Magnetic Solid Lipid Nanoparticles

SHEN Guo - peng¹, LIANG Chun - li¹, GE Qing - ping², DU Bin³

(1. School of Chemical Engineering and Energy, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China; 2. Henan Institute of Products Quality Supervision and Inspection, Zhengzhou 450052, China; 3. School of Pharmaceutical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: To improve the therapeutic efficacy and reduce the toxicity of 5 - Fluorouracil (5 - FU), 5 - Fluorouracil magnetic solid lipid nanoparticles (5 - FU - MSLN) were prepared with a W/O/W double emulsion solvent evaporation technique, using monostearin as the carrier, hydrogenated soybean lecithin and poloxamer as emulsifier, magnetic Fe₃O₄ nanoparticles as magnets. With the index of encapsulation efficiency, the preparation process was optimized by single - factor test and orthogonal test. As a result, the encapsulation efficiency of 5 - FU - MSLN was 58.35%. TEM presented 5 - FU - MSLN as spherical particles, evenly distributed; 5 - FU - MSLN were observed under the inverted microscope, of which vitro magnetic responsiveness was good. Such magnetic solid lipid nanoparticles seem appropriate for vascular administration followed by drug targeting.

Key words: 5 - Fluorouracil; magnetic solid lipid nanoparticle; optimization; encapsulation rate