

包载荧光探针香豆素-6 的 PLGA 纳米粒的制备

李晓芳, 马艳结, 张晓, 陈钢^{*} (广东药学院药剂系, 广州 510006)

摘要: 目的 以生物可降解材料聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)为材料, 制备包载荧光探针香豆素-6 纳米粒, 并进行处方优化。方法 采用乳化-溶剂挥发法制备香豆素-6-PLGA 纳米粒, 以利用率和包封率为考察指标, 正交试验对处方进行优化。结果 制得香豆素-6 纳米粒的包封率为 51.6%, 利用率为 81.9%, 平均粒径 135 nm, 香豆素-6 体外 72 h 泄漏率低于 2%。结论 香豆素-6 PLGA 纳米粒制备工艺简便可行, 香豆素-6 可作为荧光探针, 用于纳米粒的动物体内示踪及靶向性研究。**关键词:** 香豆素-6; 聚乳酸-羟基乙酸共聚物; 纳米粒; 处方优化

中图分类号: R943.42

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2011)08-0740-05

Preparation of Fluorescent Probe Coumarin-6 Loaded PLGA Nanoparticles

LI Xiaofang, MA Yanjie, ZHANG Xiao, CHEN Gang^{*} (Department of Pharmaceutics, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To prepare fluorescent probe coumarin-6 loaded nanoparticles using the biodegradable material poly(lactic-co-glycolic acid)(PLGA) as carrier. **METHODS** Coumarin-6 loaded PLGA nanoparticles were prepared by emulsification solvent evaporation method. The formulation was optimized by orthogonal design using utilization ratio and entrapment efficiency as the indexes. **RESULTS** The mean entrapment efficiency of coumarin-6 loaded PLGA nanoparticles was 51.6% and the utilization ratio was 81.9%. The average size was 135 nm and the *in vitro* cumulative release of coumarin-6 from nanoparticles was less than 2% in 72 h. **CONCLUSION** The preparation process of coumarin-6 loaded PLGA nanoparticles is simple and feasible, and coumarin-6 can be used as fluorescence marker for *in vivo* tracing and targeting study of nanoparticles.

KEY WORDS: coumarin-6; PLGA; nanoparticles; prescription optimization

以天然或合成的高分子材料为载体的纳米给药系统, 具有小尺寸效应、表面效应和界面效应等特性, 能够穿过血脑屏障、网状内皮组织, 改变药物在体内的分布; 通过EPR效应聚集并滞留于肿瘤部位, 提高疗效, 降低药物不良反应; 能提高多肽、疫苗类药物的体内稳定性, 调节释药速率, 增加胃肠道等生物膜的通透性, 使之成为近年来最为活跃的研究方向之一, 越来越多地应用于控制药物释放和靶向给药体系的研究。尤其以聚乳酸(PLA)、聚乳酸-羟基乙酸共聚物[poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA]为代表的生物降解性聚合物, 因具有良好的生物降解性、生物相容性等特点, 被广泛应用于生物医用工程材料领域以及微粒给药系统的研究^[1-2]。

对于微粒给药系统体内评价的一个重要内容是研究其体内吸收和转运情况, 目前常用的方法

是进行荧光标记或放射性标记后示踪给药系统的体内转运行为。由于荧光标记方法无放射性污染问题, 既可通过荧光显微镜或共聚焦显微镜直观、定性观察给药系统的体内转运情况, 又可进行定量测定, 因而得到更广泛的应用。实验室采用的荧光标记方法有化学合成法^[3]、物理包载法^[4]等。香豆素-6(coumarin-6)是一种激光转化率较高、性能比较稳定的脂溶性激光染料, 文献报道包载 0.05% 香豆素-6 的纳米粒, 显微镜下即能观察到较强烈的荧光, 并且可用HPLC定量测定, 检测灵敏度很高^[5]。因此, 近年来香豆素-6常被作为荧光探针, 包载于微粒给药系统内, 进行给药系统的体内示踪、细胞摄取及转运机理研究^[6-7]。本实验采用实验室常用的PLGA纳米粒的制备方法——乳化-溶剂挥发法, 制备包载香豆素-6的PLGA纳米粒, 采用正交试验优化处方工艺, 并考察了纳米

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30801553)

作者简介: 李晓芳, 女, 硕士, 副教授 Tel: (020)39352117

E-mail: lixiaofang105@163.com

^{*}通信作者: 陈钢, 男, 博士, 副教授, 硕导

Tel: (020)39352117 E-mail: cg753@126.com

粒的形态、粒径分布以及纳米粒中香豆素-6的体外泄漏情况,探讨香豆素-6作为PLGA纳米粒荧光标记物的可行性,为进一步进行载药纳米粒的体内转运及靶向性研究打下基础。

1 仪器与材料

RF-5301 荧光分光光度计(日本 SHIMADZU); LC-10AT 高效液相色谱仪(RF-10AXL 荧光检测器,日本 SHIMADZU); SZCL-2 型数显智能控温磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限责任公司); SCIENTZ-II D 超声波细胞粉碎仪(宁波新芝生物科技股份有限公司); JEM-100CX II 透射电子显微镜(日本电子株式会社); Mastersizer 2000 激光粒度分析仪(英国马尔文)。

香豆素-6(美国 Sigma-Aldrich, 含量 $\geq 98.0\%$); PLGA(LA:GA=75:25, M_r 10 000, 山东省医疗器械研究所); Sephadex G-50 葡聚糖凝胶(瑞典 Pharmacia); 聚乙烯醇(PVA 4-88, M_r 31 000, 德国 Sigma-Aldrich); 甲醇(色谱纯, 德国 Merck); 甲醇、乙腈、二氯甲烷、乙酸乙酯(分析纯, 天津市富宇精细化工有限公司)。

2 方法与结果

2.1 香豆素-6 PLGA 纳米粒的制备

采用乳化-溶剂挥发法制备 PLGA 纳米粒,取适量 PLGA 和香豆素-6 溶解于一定量的二氯甲烷和乙酸乙酯(7:3)中作为有机相,加入适量 PVA 水溶液中,在冰水浴条件下,运用超声波细胞粉碎仪间断超声数分钟后,转移至 0.5%的 PVA 水溶液中,于磁力搅拌器上搅拌 3~4 h 挥去有机溶剂,得到香豆素-6-PLGA 纳米粒。同法制备不含香豆素-6 的空白纳米粒。

2.2 香豆素-6 HPLC 分析方法的建立

2.2.1 色谱条件^[8] 色谱柱: Diamonsil C_{18} (4.6 mm $\times$ 150 mm, 5 μ m); 检测器: RF-10AXL 荧光检测器; 流动相: 甲醇-水(95:5); 流速: 1.0 mL $\cdot$ min⁻¹; 进样量: 20 μ L; 检测波长: 激发波长 E_x =466 nm, 发射波长 E_m =504 nm。

2.2.2 专属性试验 精密称取 5.09 mg 香豆素-6 置于 50 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度作为香豆素-6 储备液。精密吸取香豆素-6 储备液适量,加甲醇定容作为对照品溶液;精密吸取载香豆素-6 的纳米粒适量,加乙腈溶解材料,最后加适量甲醇稀释,作为供试品溶液;另取适量空白纳米粒,同法制备阴性对照溶液。依次进样 20 μ L

测定,记录色谱图。结果表明,香豆素-6 的保留时间约 5.6 min,峰形良好。供试品中香豆素-6 与相邻杂质峰分离度大于 1.5,理论板数按照对照品峰计算 $>3\ 000$,阴性对照溶液不干扰测定,表明该分析方法具有良好的专属性。色谱图见图 1。

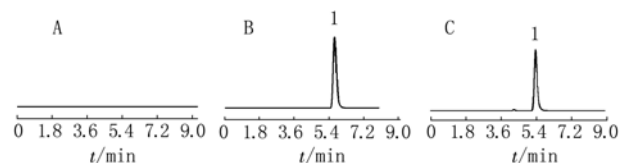


图 1 香豆素-6 高效液相色谱图

A-阴性对照溶液; B-香豆素-6 对照品溶液; C-供试品溶液; 1-香豆素-6

Fig 1 HPLC chromatogram of coumarin-6

A-negative control solution; B-control solution of coumarin-6; C-sample solution; 1-coumarin-6

2.2.3 标准曲线的制备 精密吸取香豆素-6 储备液适量,用甲醇稀释成浓度 0.509, 1.018, 2.036, 5.09, 10.18, 20.36 ng $\cdot$ mL⁻¹ 的系列溶液。按“2.2.1”项下色谱条件分别进样 20 μ L。以香豆素-6 浓度对峰面积进行线性回归,得到回归方程为: $A=165\ 575.51C+69\ 321.84$ ($r=0.999\ 8$)。结果表明,香豆素-6 在浓度为 0.509~20.36 ng $\cdot$ mL⁻¹ 内与峰面积具有良好的线性关系。

2.2.4 仪器精密度试验 分别取 5.09, 10.18, 15.27 ng $\cdot$ mL⁻¹ 3 个浓度的香豆素-6 甲醇溶液 20 μ L, 分别进样 6 次测定,计算各浓度峰面积的 RSD 均 $<0.5\%$,表明仪器精密度良好。

2.2.5 回收率试验 取 0.1 mL 空白纳米粒胶体溶液 9 份,分别精密加入香豆素-6 储备液适量,用适量乙腈溶解材料,加甲醇稀释,制备成低、中、高 3 种浓度的溶液,分别进样 20 μ L 测定,记录峰面积,代入线性方程,计算回收率。结果不同浓度香豆素-6 的回收率在 98%~104%之间, RSD 值为 1.88%,表明该方法回收率良好,符合体外样品测定的要求。

2.3 香豆素-6 纳米粒包封率的测定

采用葡聚糖凝胶柱将载香豆素-6 的纳米粒和游离香豆素-6 分离。取溶胀 24 h 以上的 Sephadex G-50 装柱(1.5 cm $\times$ 10 cm),精密量取 1 mL 纳米粒胶体液上样,用去离子水洗脱,收集分离所得的香豆素-6 纳米粒。分别精密吸取香豆素-6 纳米粒液 0.1 mL 和过柱分离的香豆素-6 纳米粒液 0.5 mL,加适量乙腈溶解材料,再用适量甲醇稀释,微孔

滤膜过滤, 进样 20 μL 测定, 得到纳米粒体系中香豆素-6 的总量 W_T 和包裹于纳米粒中香豆素-6 的量 W_{NP} 。另设 W_0 为香豆素-6 总投入量, 按以下公式计算香豆素-6 的包封率与利用率:

$$\text{利用率} = \frac{W_T}{W_0} \times 100\%; \quad \text{包封率} = \frac{W_{NP}}{W_T} \times 100\%$$

2.4 正交试验优化处方

在预试验的基础上, 选取 PLGA 的浓度、内外相体积比、PVA 浓度和药物与载体材料的用量比作为考察因素, 按正交设计 $L_9(3^4)$ 表安排试验, 以包封率、利用率为优化指标, 根据方差分析确定主要影响因素及优化处方。各因素水平表见表 2, 试验结果见表 3、表 4 和表 5。

正交试验直观分析结果表明, 以香豆素的包封率为优化指标, 各种因素影响的重要性顺序为内外相体积比>PLGA 浓度>PVA 浓度>香豆素与 PLGA 的用量比; 而以香豆素的利用率为优化指标, 则为香豆素与 PLGA 的用量比>PLGA 浓度>PVA 浓度>内外相体积比。表明内外相体积比对包封率影响较大, 而投料量比则对香豆素-6 利用率影响较大。包封率是纳米粒质量评价的重要指

标, 包封率高表明包裹于纳米粒中的香豆素-6 比例高; 而利用率为纳米粒体系中香豆素-6 的总量与投入量的比值, 利用率越高表明进入纳米粒体系中的香豆素-6 的量越多, 制备过程中的损失程度越小, 同样也是评价纳米粒处方工艺的不可忽视的考察指标。故综合考虑两方面因素, 以综合指标(包封率 $\times 0.7$ +利用率 $\times 0.3$)对结果进行分析。方差分析结果表明, 香豆素与 PLGA 用量之比、内外相体积比及 PLGA 浓度对纳米粒的制备均有显著影响。最终所得优化处方为 $D_3B_2A_3C_3$, 即 PLGA 30 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 油水体积比为 1 : 5, PVA 浓度 3%, 香豆素与 PLGA 重量比为 1 : 500。

表 2 $L_9(3^4)$ 因素水平表

Tab 2 Factors and levels of $L_9(3^4)$ orthogonal experiment

水平	因素			
	A PLGA 浓度/ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	B 有机相 : 水相	C PVA 浓度/%	D 香豆素 : PLGA
1	10	1 : 3	1	1 : 100
2	20	1 : 5	2	1 : 200
3	30	1 : 10	3	1 : 500

表 3 正交试验结果

Tab 3 Result of orthogonal experiment

序号	A	B	C	D	利用率/%	包封率/%	综合指标 (包封率 $\times 0.7$ +利用率 $\times 0.3$)
1	10	1 : 3	1	1 : 100	30.19	58.13	49.74
2	10	1 : 5	2	1 : 200	35.62	59.88	52.61
3	10	1 : 10	3	1 : 500	64.66	52.88	56.42
4	20	1 : 3	2	1 : 500	75.18	50.84	58.14
5	20	1 : 5	3	1 : 100	30.43	63.49	53.57
6	20	1 : 10	1	1 : 200	31.41	52.80	46.38
7	30	1 : 3	3	1 : 200	63.48	45.29	50.75
8	30	1 : 5	1	1 : 500	75.44	59.17	64.05
9	30	1 : 10	2	1 : 100	72.61	38.73	48.89

表 4 正交试验直观分析结果

Tab 4 Analysis of orthogonal experiment results

指 标		A	B	C	D
包封率	K_1	56.97	51.40	56.70	53.43
	K_2	55.70	60.87	49.80	52.67
	K_3	47.73	48.13	53.90	54.30
	R	9.24	12.74	6.90	1.63
利用率	K_1	43.47	56.30	45.67	44.40
	K_2	45.67	47.13	61.13	43.50
	K_3	70.50	56.20	52.83	71.73
	R	27.03	9.17	15.46	28.23
综合指标	K_1	52.92	52.88	53.39	50.73
	K_2	52.70	56.74	53.21	49.91
	K_3	54.56	50.56	53.58	59.54
	R	1.86	6.18	0.37	9.62

表 5 方差分析表

Tab 5 Variance analysis of the orthogonal experiment

因 素	偏差平方和	F 比	P
PLGA 浓度	6.225	30.817	<0.05
有机相 : 水相	58.495	289.579	<0.01
PVA 浓度	0.202	1.000	
香豆素 : PLGA	170.780	845.446	<0.01
误差	0.202		

注: $F_{0.05(2, 2)}=19.0$; $F_{0.01(2, 2)}=99.0$

Note: $F_{0.05(2, 2)}=19.0$; $F_{0.01(2, 2)}=99.0$

2.5 优化处方验证试验

按优化处方制备 3 批香豆素-6 PLGA 纳米粒, 测得 3 批纳米粒平均利用率为 81.9%, 包封率为

51.6%，载药量为 0.08%。

2.6 纳米粒子的形态及粒径测定

取香豆素-6 PLGA纳米粒适量，用1.5%磷钨酸负染色，滴于镀膜的电镜铜网上，晾干后，置于透射电镜下观察纳米粒子的形态和粒径大小。用激光粒度分析仪测定其粒径分布。结果见图2和图3。照片可见纳米粒子呈类圆形，大小较均匀，纳米粒之间基本无黏连。粒径分布范围较窄，集中分布在100~190 nm内，平均粒径为135 nm。

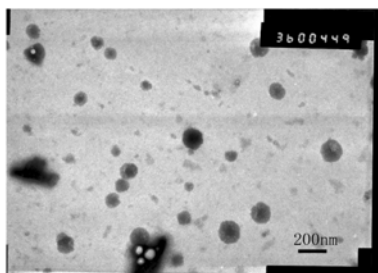


图2 香豆素-6 纳米粒透射电镜图(36 000×)

Fig 2 TEM of coumarin-6-PLGA-NP(36 000×)

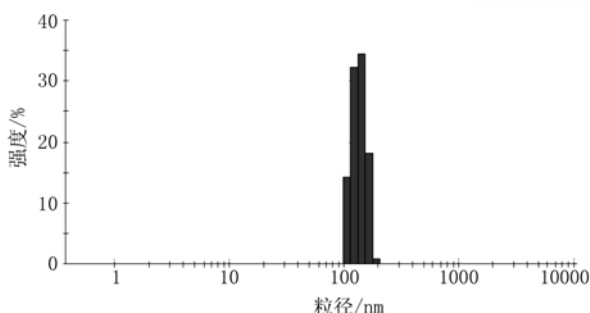


图3 香豆素-6 纳米粒粒径分布图

Fig 3 Particle size distribution of coumarin-6-PLGA-NP

2.7 香豆素-6 纳米粒体外泄漏试验^[9]

精密量取过柱后的香豆素-6 纳米粒胶液 3 mL，置于预先处理好的透析袋中，加入pH 7.4 的0.1 mol·L⁻¹磷酸盐缓冲液(PBS)2.0 mL，扎紧透析袋两端，放入装有15 mL磷酸缓冲液的具塞锥形瓶中，置于恒温振荡器中，温度37℃，振荡频率为100 r·min⁻¹，分别于0.5，1，2，4，8，24，48，72 h取释放介质1 mL，立即补充同温度的释放介质1 mL。HPLC测定香豆素-6浓度，计算累积释放百分率，绘制释放曲线，结果见图4。结果香豆素-6 在72 h累积释放百分率<2%，表明该荧光物质能够稳定的包载于纳米粒中，不易泄漏，无突释现象，可作为荧光标记物较准确地示踪纳米粒的体内转运行为。

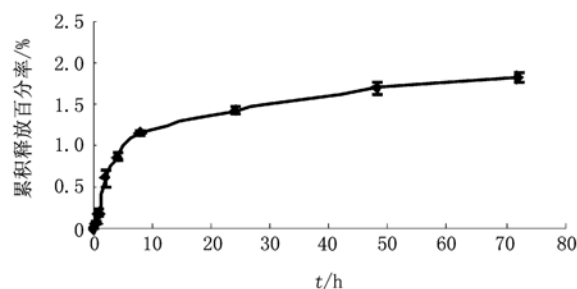


图4 香豆素-6 纳米粒体外释放曲线(n=3)

Fig 4 In vitro release of coumarin-6 loaded PLGA nanoparticles(n=3)

3 讨论

采用乳化-溶剂挥发法制备 PLGA 纳米粒，有机溶剂物理性质(如表面张力、蒸气压等)对纳米粒的形成有较显著影响^[10]。实验曾考察了有机相中二氯甲烷和乙酸乙酯比例对纳米粒制备的影响，结果采用二氯甲烷：乙酸乙酯为 7：3 的有机溶剂制备香豆素-6 纳米粒时，能够得到粒径较小的产品。正交试验表明，香豆素与载体材料用量之比、内外相体积比以及 PLGA 浓度对香豆素-6 纳米粒的制备有较显著影响。PVA 起乳化及稳定作用，浓度在 1%以上可制备较稳定的乳液，其浓度对香豆素-6 包封率影响不大。

对于采用物理包载法进行的荧光标记，用于示踪纳米粒的体内转运行为的基本要求是在体内转运过程中包载于纳米粒中的标记物保持稳定不易泄漏。体外泄漏试验是探讨香豆素-6作为荧光探针的可行性的方法。试验测得香豆素-6纳米粒在缓冲液中72 h泄漏百分率<2%，表明香豆素-6能够稳定的包载于PLGA纳米粒中，作为荧光标记物用于纳米粒的体内转运及靶向性研究是可行的。

REFERENCES

- [1] TAO A J, ZHANG L Q, SHI K, et al. Preparation and characterization of insulin loaded PLGA-HP55 nanoparticles [J]. J Shenyang Pharm Univ(沈阳药科大学学报), 2007, 24(1): 9-12.
- [2] CHITTASUPHO C, XIE S X, BAOUM A, et al. ICAM-1 targeting of doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles to lung epithelial cells [J]. Eur J Pharm Sci, 2009, 37(2): 141-150.
- [3] YAN C Y, GU J W, W X, et al. Evaluation for tumor targeting and anti-tumor activity of N-succinyl-chitosan nanoparticles [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2010, 27(10): 868-873.
- [4] GAUMET M, GURNY R, DELIE F. Fluorescent biodegradable PLGA particles with narrow size distributions: preparation by means of selective centrifugation [J]. Int J Pharm, 2007, 342(1/2): 222-230.

- [5] PANYAMA J, SAHOO S K, PRABHA S, et al. Fluorescence and electron microscopy probes for cellular and tissue uptake of poly(*d, l*-lactide-co-glycolide) nanoparticles [J]. Int J Pharm, 2003, 262(1/2):1-11.
- [6] MAKHLOF A, TOZUKA Y, TAKEUCHI H. pH-Sensitive nanospheres for colon-specific drug delivery in experimentally induced colitis rat model [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2009, 72(1): 1-8.
- [7] HU K L, LI J W, SHEN Y H, et al. Lactoferrin-conjugated PEG-PLA nanoparticles with improved brain delivery: *In vitro* and *in vivo* evaluations [J]. J Control Release, 2009, 134(1): 55-61.
- [8] GAO X L. Lectin-conjugated nanoparticles for drugs delivery into brain following intranasal administration [D]. Shanghai: Univ Fudan, 2007.
- [9] LU W, ZHANG Y, TAN Y Z, et al. Cationic albumin-conjugated pegylated nanoparticles as novel drug carrier for brain delivery [J]. J Control Release, 2005, 107(3): 428-448.
- [10] SAHANA D K, MITTAL G, BHARDWAJ V, et al. PLGA nanoparticles for oral delivery of hydrophobic drugs: influence of organic solvent on nanoparticle formation and release behavior *in vitro* and *in vivo* using estradiol as a model drug [J]. J Pharm Sci, 2008, 97(4): 1530-1542.

收稿日期: 2010-12-08