

染料木素 MePEG-PLGA 共聚物胶束的制备及其药动学研究

何礼¹, 韩瑞伟¹, 唐晓飞², 李明³, 刁磊⁴, 韩伟¹, 阎雪莹^{1*} (1.黑龙江中医药大学药学院, 哈尔滨 150040; 2.黑龙江省哈尔滨市香坊区疾病预防控制中心, 哈尔滨 150031; 3.四川大学生物材料工程研究中心, 成都 610064; 4.吉林农业科技学院, 长春 132101)

摘要: 目的 制备染料木素(GEN)MePEG-PLGA 共聚物胶束, 考察其理化性质、初步稳定性及静脉给药后大鼠体内的药动学行为。方法 采用改良的自乳化溶剂挥发法制备胶束, 考察其形态、包封率、载药量、粒径和 Zeta 电位; 采用动态膜透析技术考察其释药行为, 并对其释药规律进行拟合; 将胶束冻干品置于 4 °C 冰箱中保存, 分别于放置 1 d、10 d、1 个月、3 个月、6 个月 after 取样, 考察其包封率和载药量变化; 对健康大鼠尾静脉注射 GEN 胶束, 采用 HPLC 测定 GEN 在大鼠体内的血药浓度, 采用 DAS 2.0 软件处理血药浓度数据, SPSS 17.0 软件对主要药动学参数进行统计学分析。结果 制备所得胶束的包封率为(84.43±2.93)%, 载药量为(2.63±0.91)%, 粒径为(63.75±4.12)nm; GEN 胶束的释药行为最符合 Weibull 模型; GEN 胶束冻干品 6 个月渗漏率为 2.45%, 载药量下降 0.18%; 大鼠尾静脉注射 GEN 胶束和 GEN 乳剂 40 mg·kg⁻¹ 后, 主要药动学参数 AUC_{0-t} 分别为(99.46±4.77)mg·L⁻¹·h 和(57.51±1.37)mg·L⁻¹·h, t_{1/2} 分别为(7.48±1.15)h 和(4.95±1.15)h, C_{max} 分别为(16.03±1.20)mg·L⁻¹ 和(16.73±1.10)mg·L⁻¹, CL 分别为(0.36±0.02)L·h⁻¹·kg⁻¹ 和(0.67±0.02)L·h⁻¹·kg⁻¹。结论 制备所得的 GEN 胶束形态规整, 粒径分布狭窄, 包封率较高, 具有一定的缓释特征, 稳定性良好, 并且明显改变了 GEN 的药动学行为, 使其消除减慢, 同时提高了药物的生物利用度。

关键词: 染料木素; 胶束; 体外释放; 稳定性; 药动学

中图分类号: R943.4

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2012)06-0477-06

Preparation of Genistein-loaded MePEG-PLGA Nano-micelle and its Pharmacokinetics in Rats

HE Li¹, HAN Ruiwei¹, TANG Xiaofei², LI Ming³, Diao Lei⁴, HAN Wei¹, YAN Xueying^{1*} (1.College of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China; 2.Xiangfang Center for Disease Control and Prevention of Harbin, Harbin 150031, China; 3.Engineering Research Center in Biomaterials, Sichuan University, Chengdu 610064, China; 4.Jilin Agricultural Science and Technology College, Changchun 132101, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To prepare genistein-loaded MePEG-PLGA nano-micelle and study its physicochemical properties. To investigate the release characterization *in vitro* and study the pharmacokinetic characteristics of genistein nano-micelle after single dose in rats. **METHODS** Genistein nano-micelle was prepared by modified spontaneous emulsification solvent diffusion method, then its physicochemical properties including entrapment efficiency, drug loading, average diameter and Zeta potential were studied. The *in vitro* release was studied by dynamic dialysis method and the release behavior was fitted with different equations. Put freeze-dried GEN-loaded micelle at 4 °C for six months to investigate the changes of the entrapment efficiency and drug loading. The plasma concentrations of Genistein at different time were determined by a developed and validated HPLC method after i.v. administration. The pharmacokinetic parameters were acquired with DAS 2.0 software and analyzed using SPSS 17.0 statistic software. **RESULTS** The entrapment efficiency, drug loading and average diameter of the prepared nano-micelle were (84.43±2.93)%, (2.63±0.91)% and (63.75±4.12)nm, respectively. The release behavior of the lyophilized Gen nano-micelle was well-fitted to Weibull equation. The entrapment efficiency and drug loading had no significant difference after stored at 4 °C for six months. After i.v. administration of Genistein nano-micelle and Genistein emulsion 40 mg·kg⁻¹, the main pharmacokinetic parameters were as follows: AUC_{0-t} were (99.46±4.77)mg·L⁻¹·h and

基金项目: 黑龙江省教育厅研究生创新科研项目(YJSCX2011-459HLJ)

作者简介: 何礼, 男, 硕士生 Tel: (0451)82195748 E-mail: heli_stu@126.com

*通信作者: 阎雪莹, 女, 博士, 教授 Tel: (0451)82195748

E-mail: yanxueying@yahoo.com.cn

(57.51 ± 1.37) $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}$, $t_{1/2}$ were (7.48 ± 1.15)h and (4.95 ± 1.15)h, C_{\max} were (16.03 ± 1.20) $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and (16.73 ± 1.10) $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, CL were (0.36 ± 0.02) $\text{L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ and (0.67 ± 0.02) $\text{L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$. **CONCLUSION** The genistein nano-micelle was spherical with narrow size distribution and high entrapment efficiency, the genistein nano-micelle possess the properties of sustained release with good stability. Compared with reference injection, the nano-micelle can significantly improve the pharmacokinetic behavior of genistein.

KEY WORDS: genistein; nano-micelle; release *in vitro*; stability; pharmacokinetics

聚合物胶束是一种由两亲嵌段共聚物在适当条件下自发形成的核-壳纳米载体^[1]。由于其抗血液稀释能力突出、具备长循环特性、能极大程度增加难溶性药物溶解度且对药物具有缓控释作用、对肿瘤部位渗透能力强等独特优势在近十年来受到了广泛的关注。

染料木素(genistein, GEN)是从豆科植物槐角 *Sophora japonica* L.中提取得到的一种异黄酮类化合物。大量研究证实 GEN 具有雌激素作用、抗氧化作用以及抑制拓扑异构酶活性、抑制蛋白酪氨酸激酶活性、诱发细胞程序性死亡、抑制血管生成等作用^[2], 目前 1 类新药“染料木素胶囊”已进入 II 期临床研究, 是一种很有潜力的癌症化学预防剂和化疗剂。然而 GEN 在水中几乎不溶, 直接口服生物利用度低, 限制了其临床应用。本实验以具有很好生物相容性和应用安全性的 MePEG-PLGA 为载体制备 GEN 共聚物胶束, 以提高药物生物利用度, 并增加其靶向性, 提高疗效。同时考察其体外释放、初步稳定性和静脉注射后在大鼠体内的药动学行为, 为临床用药和新剂型研发提供理论依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

TECNAIG2 透射电子显微镜(荷兰 Philips 公司); Mastersizer 2000 激光粒度分析仪(英国 Malvern 公司); LC-2010AHT 高效液相色谱仪(日本 Shimadzu 公司); BT25S 电子天平(德国 Sartorius 公司); Scientz-IIID 超声波细胞破碎仪(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

1.2 材料

GEN 对照品(中国药品生物制品检定所, 含量 $\geq 98\%$, 批号: 111704-200501); GEN(西安小草植物科技有限责任公司, 含量: 98.19%, 批号: XC100310); MePEG-PLGA[济南岱罡生物科技股份有限公司, $M_r(\text{MePEG})=4\ 000$, $M_r(\text{MePEG}) : M_r(\text{PLGA})=1 : 3$, $M_r(\text{LA}) : M_r(\text{GA})=75 : 25$]; 透析袋(美国 Sigma 公司, MW: 8 000~14 400);

Poloxamer188(德国 BASF 公司); 染料木素静脉注射乳剂(自制, 批号: 20110712); 甲醇为色谱纯, 水为去离子水, 其余试剂均为分析纯。

清洁级 Wistar 大鼠 12 只, 雌雄各半, 体质量 (200 ± 20)g, 黑龙江中医药大学 GLP 实验室提供, 实验动物许可证号: SCXK(黑)2008-0004。

2 方法

2.1 GEN 胶束的制备

采用改良的自乳化溶剂扩散法(modified-SESD)^[3]制备胶束, 分别称取 21 mg GEN, 110 mg MePEG-PLGA 置于锥形瓶中, 加入丙酮:乙醇=3:2 混合有机溶剂 10 mL, 水浴 50 °C 使其完全溶解。在 $500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的机械搅拌条件下, 将所得混合溶液以 $3 \text{ 滴} \cdot \text{s}^{-1}$ 的速度滴入预先配好的 20 mL 含 1% Poloxamer 188 的水溶液。滴定结束后继续搅拌 10 min, 将所得产物在 40 °C 下减压除去有机溶剂, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 加 3%海藻糖混匀, 冻干后保存。

2.2 GEN 胶束的形态观察

取 GEN 胶束冻干品适量, 加水轻微振摇分散后滴加在铜网上, 2%磷钨酸钠溶液负染, 在透射电镜下观察粒子形态, 见图 1。由图可见, 胶束制成冻干针剂后, 仍为球形实体, 形态较圆整, 分布较均匀。

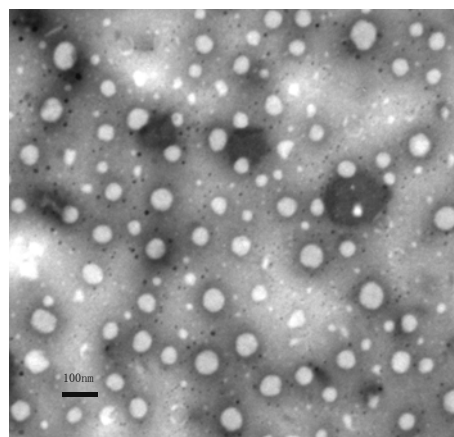


图 1 GEN 胶束的透射电镜照片($\times 43\ 000$)

Fig 1 Transmission electronic micrograph of GEN micelle ($\times 43\ 000$)

2.3 GEN 胶束的粒径及 ZETA 电位

GEN 胶束的粒径和 ZETA 电位测定结果见图 2。由图可知，GEN 胶束的粒径大多分布在 50~

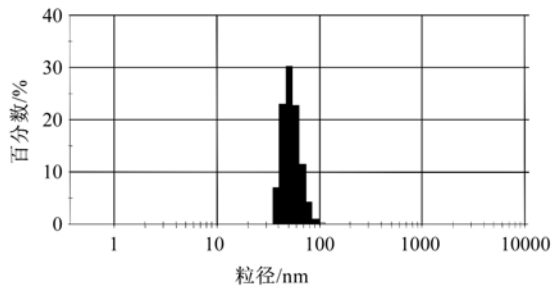


图 2 GEN 胶束冻干针剂的粒度分布及 Zeta 电位图

Fig 2 Particle diameter and Zeta potential of GEN micelle

2.4 GEN 胶束的包封率和载药量测定

采用反相 HPLC 测定 GEN 含量。色谱条件：Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)，甲醇-水(60 : 40)，流速为 1 mL·min⁻¹，检测波长为 260 nm，进样量 10 μL。在此色谱条件下，以 GEN 峰面积(Y)对其浓度(X)进行线性回归，所得标准曲线方程为：Y=124 316X-38 008(r=0.999 9)，日内、日间精密度 RSD<3%，回收率>98%，表明该法满足分析要求。

将 4 mL GEN 胶束溶液装入已处理后的透析袋中，将袋口扎紧，混悬在盛有 86 mL 释放介质的小杯中，将杯放到恒温水浴振荡器 37 °C 水浴中恒速(100 r·min⁻¹)振摇，在 360 min 时，精密吸取透析外液 2 mL，处理后按上述色谱条件测定胶束中游离的 GEN 量。同时精密吸取相同体积的 GEN 胶束溶液，精密加入 8 mL 乙腈，涡旋 1 min，0.45 μm 微孔滤膜过滤后进行 HPLC，测定胶束中所含 GEN 总量(W_总)，按下式计算载药量和包封率：
 $ER\% = (W_{总} - W_{游离}) / W_{总} \times 100\%$ ；
 $DL\% = (W_{总} - W_{游离}) / W_{胶束} \times 100\%$ (式中 W_总 为 GEN 胶束所含 GEN 总量，W_{游离} 为透析外液中游离的 GEN 量，W_{胶束} 为胶束中所载的 GEN 和辅料量总和)，结果见表 1。

表 1 GEN 胶束的包封率和载药量

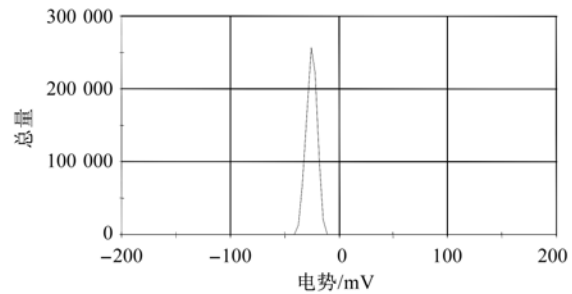
Tab 1 Entrapment efficiency and drug loading of GEN micelle

组别	No.1	No.2	No.3	$\bar{x} \pm s$
包封率/%	82.27	84.14	83.53	83.31±0.95
载药量/%	2.59	2.33	2.61	2.51±0.16

2.5 GEN 胶束的体外释放研究

取 GEN 胶束冻干品一瓶(相当于 GEN 2.0 mg)，

100 nm，平均粒径为 63.7 nm，多分散指数 PDI 为 0.129，表明胶束粒径分布较窄；Zeta 电位为 -25.1 mV，表明胶束比较稳定。



精密加入 4 mL 注射用水分散后，转入已处理后的透析袋中，将袋口扎紧，混悬在盛有 86 mL 释放递质的小杯中，将杯放到恒温水浴振荡器 37 °C 水浴中恒速以 100 r·min⁻¹ 振摇。在释放开始后，分别于 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36, 48 h 量取 1 mL 释药介质(同时补加等量同温空白介质)，经 0.45 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液进样测定，计算药物的累积释放率 Q(%)。精密吸取一定量 GEN 溶液(GEN 以释放介质为溶剂，含量与 GEN 胶束冻干品相当)，置透析袋内，同法试验。取样时间为 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120 min，计算累积释放率 Q(%)，绘制体外释放曲线，结果见图 3。

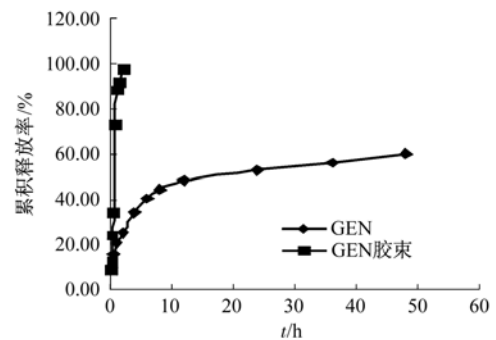


图 3 GEN 和 GEN 胶束的体外释放曲线

Fig 3 The release curve of GEN and GEN nano-micelle

由结果可知，GEN 原料药释放较快，2 h 基本释放完全，而 GEN 胶束前期释药较快，后期释放较慢，相比 GEN 原料药具有明显的缓释效应。分别采用一级动力学方程、Higuchi 方程、Niebergull 平方根定律、Hixcon-crowell 立方根定律、Ritger-peppas 方程、Weibull 方程对 GEN 胶束各时间点的累积释药百分率进行拟合，求出其回归方程，

拟优合度以 R^2 , AIC 值进行综合判断, 结果 Weibull 模型的拟合效果最好, 方程为 $\text{Ln}[\text{Ln}(1/1-Q)] = 1.266\text{Ln}(t) - 4.768$, $R^2 = 0.954$, $\text{AIC} = -28.99$ 。证实了其具有一定的缓释特性, 为进一步的体内研究提供了深层次的理论依据。

2.6 GEN 胶束的初步稳定性考察

将制备的 3 批 GEN 胶束冻干品置于 4 °C 冰箱中保存, 分别于放置 1, 10, 30, 90, 180 d 后取样, 水化后测定其包封率和载药量, 考察其稳定性, 结果见表 2。结果表明, GEN 胶束冻干品 6 个月渗漏率为 2.45%, 载药量下降 0.18%, 初步稳定性考察显示其稳定性良好, 达到了预期目的。

2.7 大鼠体内药动学实验

2.7.1 血浆样品的处理 精密吸取 100 μL 血浆样品置 1.5 mL 离心管中, 加入 200 μL 甲醇沉淀血浆蛋白, 涡旋混合 1 min, 10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,

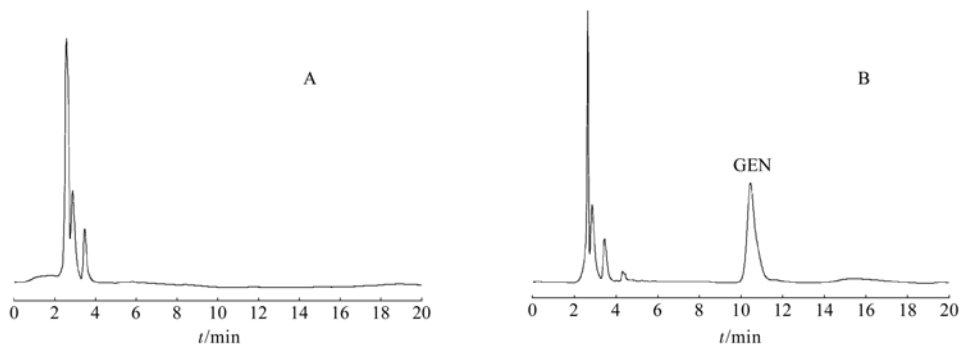


图 4 GEN 大鼠血浆样品色谱图

A-空白血浆; B-血浆样品

Fig 4 The HPLC chromatogram of Genistein in rat plasma

A-blank plasma; B-plasma sample

2.7.3 标准曲线及线性范围 精密吸取大鼠空白血浆 200 μL , 分别加入不同浓度的 GEN 标准系列溶液 20 μL , 配制成相当于 GEN 血药浓度为 0.1, 0.4, 2, 8, 24, 32, 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的血浆样品, 按“2.7.1”项下方法处理, 按“2.4”项下色谱条件进样测定。以血浆中 GEN 的浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 进行线性回归, 得线性回归方程: $Y = 90\,749X + 1\,779$, $r = 0.999\,9$ 。结果表明, GEN 在 0.1~40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性良好。以 $S/N = 3$ 计, 最低检测限为 0.02 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.7.4 方法学验证 取低、中、高(0.1, 8, 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)3 个浓度的质控样本, 每份样品连续进样 5 次, 计算日内精密性; 连续 5 d 相同条件进样, 计算日间精密性。结果表明, 方法的日间、日内

表 2 180 d 内胶束包封率与载药量测定结果($n=3$)

Tab 2 Result of entrapment efficiency and drug loading in 180 days($n=3$)

日期/d	包封率/%	载药量/%
1	84.59±0.44	2.57±0.04
10	84.42±1.01	2.54±0.01
30	83.75±0.46	2.49±0.05
90	83.08±0.87	2.45±0.02
180	82.14±0.69	2.39±0.06

吸取全部上清液过微孔滤膜(0.22 μm), 按“2.4”项下色谱条件进样测定。

2.7.2 专属性考察 空白血浆及静脉注射 GEN 胶束 1 h 后收集的的血浆样品色谱图见图 4。从结果可知, GEN 的保留时间为 11 min, 基线噪音较小, 血浆中代谢物峰及其他内源性物质均不干扰 GEN 的测定, 说明本方法具有较高的专属性。

精密性 RSD 均 < 5%, GEN 在线性范围内的提取回收率为 90.69%~94.23%, 方法回收率为 97.53%~105.13%, 符合测定要求。

2.7.5 药动学实验

2.7.5.1 GEN 静脉注射乳剂的制备^[4] 精密称取大豆卵磷脂 0.60 g、注射用大豆油 5 g 于烧杯中, 60 °C 左右恒温搅拌约 10 min, 加入 GEN 500 mg, 加热搅拌使温度达到 70 °C 并保持恒定。精密称取医用甘油 1.25 g 和 Poloxamer 1 881.00 g 于烧杯中, 加入 45 mL 注射用水, 加热搅拌使之澄清, 继续加热搅拌使温度达到 70 °C 并保持恒定。在 70 °C 恒定温度下, 将油相缓慢加入到水相中并不断搅拌, 继续搅拌 10 min, 制得初乳。初乳用超声波细胞粉碎机冰水浴探头超声 15 min(超声 2 s, 间歇

2 s), 功率 750 W, 制得 GEN 静脉注射乳剂。上述方法制得的 GEN 静脉注射乳剂呈乳白色, 外观均一, 未出现挂壁现象, 没有粒子及沉淀析出, 4 °C 冰箱冷藏保存, 半个月未见有分层和絮凝现象, 状态良好。通过透射电镜(TEM)观察为圆形球状, 粒径均一, 用激光散射粒径分布及 Zeta 电位测定仪测定其平均粒径为 232 nm, Zeta 电位为 -21.1 mV, 载药量为 1 mg·mL⁻¹, 离心加速试验(4 000 r·min⁻¹)表明稳定性良好。

2.7.5.2 实验设计 将大鼠随机分为 2 组, 每组 6 只, ♀ ♂ 各半。实验前禁食 12 h, 自由饮水。根据文献[5-6]及预试验, 确定给药剂量分别为 GEN 乳剂组(40 mg·kg⁻¹)、GEN 胶束组(40 mg·kg⁻¹, 取 GEN 胶束冻干品两瓶, 相当于 GEN 4.0 mg, 临用前用 1 mL 注射用水分散), 各组称重后, 尾静脉注射给药, 于给药后 0, 0.083, 0.17, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h 从眼眶后静脉丛取血约 0.4 mL。将所取血样置 1.5 mL 肝素化离心管中, 10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液 100 μL, 按“2.7.1”项下方法处理, 测定 GEN 含量。

GEN 乳剂组和胶束组的平均药-时曲线见图 5。由结果可知, 与 GEN 乳剂组相比, GEN 胶束组的血药浓度-时间曲线更平稳, 除初始血药浓度值显著降低外, GEN 胶束组在各时间点的血药浓度值均明显高于乳剂组, 并且在 24 h 时仍有较高的浓度分布。由于肿瘤部位的细胞供血充足, 其通透性处于亢进状态, 药物在血液中的浓度越高, 维持时间越长, 药物和肿瘤组织接触的机会就越多, 越有利于药物被输送至肿瘤组织, 因此 GEN 胶束有助于提高 GEN 的抗癌疗效。

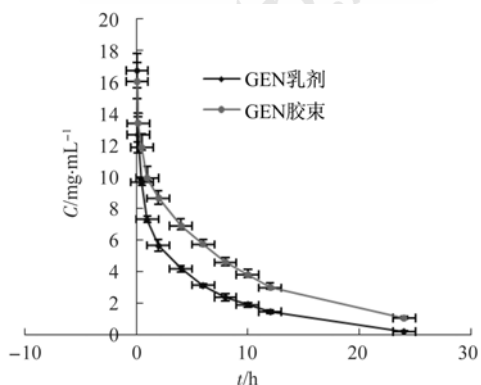


图 5 GEN 乳剂组和胶束组的平均血药浓度-时间曲线(n=6)
Fig 5 The concentration-time curve of GEN in rat plasma after single iv GEN emulsion and GEN micelle(n=6)

采用 DAS2.1 软件进行非房室模型拟合并计算药动学参数, 达峰浓度(C_{max})和达峰时间(T_{max})采用实测值, 采用梯形法计算药时曲线下面积(AUC_{0-t}), 采用 SPSS 17.0 软件对 GEN 乳剂组和胶束组的主要药动学参数(AUC_{0-t} 、 $AUC_{0-\infty}$ 、 $t_{1/2}$ 、 CL 、 MRT_{0-t})进行 t 检验, 结果见表 3。结果表明, 在相同给药剂量下, GEN 乳剂组和胶束组的 AUC_{0-t} 、 $AUC_{0-\infty}$ 、 $t_{1/2}$ 、 CL 均存在显著差异($P<0.01$)。胶束组具有更大的药时曲线下面积(AUC_{0-t}), 为乳剂组的 1.73 倍; 胶束组的消除半衰期($t_{1/2}$)为乳剂组的 1.71 倍; 胶束组有较低的血浆清除率(CL), 仅为乳剂组的 0.54 倍, 同时胶束组的平均驻留时间(MRT_{0-t})延长($P<0.05$)。

表 3 大鼠尾静脉注射 GEN 乳剂和胶束的药动学参数比较(n=6)

Tab 3 Comparison of pharmacokinetic parameters in rats between GEN emulsion and GEN micelle after iv administration(n=6)

参数	GEN 乳剂	GEN 胶束
$AUC_{0-t}/mg \cdot L^{-1} \cdot h$	57.508±1.367	99.461±4.774 ¹⁾
$AUC_{0-\infty}/mg \cdot L^{-1} \cdot h$	59.505±2.184	110.817±5.697 ¹⁾
MRT_{0-t}/h	5.673±0.139	7.172±0.19 ²⁾
$MRT_{0-\infty}/h$	6.531±0.566	10.025±1.114
$t_{1/2}/h$	4.949±0.793	8.484±1.15 ¹⁾
T_{max}/h	0.083±0	0.083±0
$CL/L \cdot h^{-1} \cdot kg^{-1}$	0.673±0.024	0.362±0.019 ¹⁾
$VL \cdot kg^{-1}$	4.787±0.626	3.896±0.54
$C_{max}/mg \cdot L^{-1}$	16.725±1.102	16.039±1.204

注: 与 GEN 乳剂组比较, ¹⁾ $P<0.01$, ²⁾ $P<0.05$

Note: Compared with GEN emulsion, ¹⁾ $P<0.01$, ²⁾ $P<0.05$

3 讨论

GEN 在水中几乎不溶, 从而使其应用和研究都受到限制, 因此首先要设法改善药物的溶解性, 提高其生物利用度。药剂学中增溶的经典方法主要是使用混合溶剂或增溶剂等, 但这些或是增溶效果不理想, 或是具有较大毒性。如增溶环孢素 A 和紫杉醇的聚氧乙烯蓖麻油 EL 可引起过敏、高血压症以及神经毒性等副反应^[7], 常用的表面活性剂 Tween-80 可引起过敏、溶血等不良反应^[8], 胆酸盐对粘膜具有刺激性, 注射时引起疼痛和溶血。聚合物胶束作为一种极具开发潜力的药物载体, 基本上克服了以上缺点, 紫杉醇胶束制剂 Genexol-PM

的Ⅱ期临床研究结果显示, 69 例中仅有 4 例出现了过敏反应^[9]。

改良的自乳化溶剂扩散法(modified-SESD)由 Murakami 等第一次报道用于纳米粒子的制备中, 有机相采用丙酮与乙醇的混合溶液, 取代了 SESD 方法中常用的二氯甲烷、丙酮混合溶液, 其中有机相中丙酮与乙醇的比例对乳滴大小影响显著, 这种方法克服了制备过程中使用有毒有机溶剂(如二氯甲烷、氯仿等)的缺点, 并且不需高能设备(如均质器、超声等), 为大规模生产提供了可能。然而, 由于原方法所使用的聚乙烯醇(PVA)可能存在一定致癌性, 且较难从纳米粒子表面去除, 为此本课题对这一方法进行了进一步改进, 以安全性高的 Poloxamer 188 代替 PVA, 所制备的胶束表面光滑, 形态圆整, 且具有较高的包封率和较小的粒径。

本课题制备所得胶束包封率达到 80%以上, 但载药量相对偏低, 其原因可能是较小的粒径限制了疏水核中包载的药量, 因此有必要对其进一步的研究以获得更高包封率和载药量的 GEN 胶束。有文献报道^[10-11], 这一问题可通过将药物与 PLGA 进行共价键结合来解决, 因此本课题将进一步尝试将药物键合至 PLGA 末端的羧基上, 然后再制备 GEN 胶束。

血液样品含有大量的蛋白质, 直接进样会使色谱柱阻塞, 柱压升高, 因此需要进行适当的前处理去除蛋白。目前常用的方法有蛋白沉淀法(protein precipitation, PPT), 液-液萃取法(LLE), 固相萃取法(solid-phase extraction, SPE)等。笔者首先尝试使用甲醇和乙睛做为沉淀试剂的 PPT 法, 发现使用甲醇作为沉淀剂可得到较好效果, 并且 PPT 法简单易行, 因此选择甲醇作沉淀剂去除蛋白质。

由于国内外现尚无 GEN 注射制剂上市, 且 GEN 在水中几乎不溶, 无法直接溶解在生理盐水中进行大鼠的尾静脉注射, 根据参比制剂选择原则, 所以实验中将 GEN 制成乳剂作为参比制剂与 GEN 胶束冻干制剂进行比较。与 GEN 乳剂相比,

胶束组的消除半衰期($t_{1/2}$)和平均滞留时间(MRT_{0-t})显著延长, 这主要是因为将亲水性的 PEG 通过酯键共价连接到 PLGA 上, 形成 PEG 包衣的纳米粒子, 可有效避免网状内皮吞噬系统(reticuloendothelial-system, RES)的识别和吞噬, 延长体内循环时间, 达到长效缓释的作用。另外, 静脉注射 GEN 胶束的 AUC 大于乳剂组的 AUC, 也是其血浆清除率减小的结果。

REFERENCES

- [1] RONG L, ZHANG Y T, HU Q H. Progress in the research of natural polymer micelle [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2010, 27(13): 1182-1187.
- [2] WU L P, LI Y S, LIU Y P. Advances in mechanisms of anti-cancer effects by genistein [J]. Int J Genetics(国际遗传学杂志), 2009, 32(1): 47-50.
- [3] MURAKAMI H, KOBAYASHI M, TAKEUCHI H, et al. Further application of a modified spontaneous emulsification solvent diffusion method to various types of PLGA and PLA polymers for preparation of nanoparticles [J]. Powder Tech, 2000, 107(1/2): 137-143.
- [4] YANG X L, WANG D K, KONG L W, et al. Preparation and characterization of cisplatin emulsions for injection [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2007, 16(17): 1376-1379.
- [5] MICHAEL MCCLAIN R, WOLZ E, DAVIDOVICH A, et al. Acute, subchronic and chronic safety studies with genistein in rats [J]. Food Chem Toxicol, 2006, 44(1): 56-80.
- [6] RUAN L P, YU B Y, ZHU D N, et al. Studies on the relationship between the intestinal absorption and in vivo activity of genistein [J]. Chin J Nat Med(中国天然药物), 2006, 4(4): 278-281.
- [7] GELDERBLOM H, VERWEIJ J, NOOTER K, et al. Gremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation [J]. Eur J Cancer, 2001, 37(31): 1590-1598.
- [8] TEN TIJE A J, VERWEIJ J, LOOS W J, et al. Pharmacological effects of formulation vehicles: implications for cancer chemotherapy [J]. Clin Pharmacokinet, 2003, 42(7): 665-685.
- [9] KIM D W, KIM S Y, KIM H K, et al. Multicenter phase II trial of Genexol-PM, a novel Cremophor-free, polymeric micelle formulation of paclitaxel, with cisplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer [J]. Ann Oncol, 2007, 18(12): 2009-2014.
- [10] LI X F, MA Y J, ZHANG X, et al. Preparation of fluorescent probe coumarin-6 loaded PLGA nanoparticles [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2011, 28(8): 740-744.
- [11] YOO H S, PARK T G. Biodegradable polymeric micelles composed of doxorubicin conjugated PLGA-PEG block copolymer [J]. J Controlled Release, 2001, 70(1-2): 63-70.

收稿日期: 2011-09-27