

白蛋白纳米球药物载体的制备及表征

王 恺, 马光辉

(中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室, 北京 100080)

摘 要:以超声乳化-化学交联方法制备了粒径为 60~100 nm 的负载丝裂霉素的白蛋白纳米球。含有丝裂霉素和白蛋白的水相经超声乳化, 在油相中形成纳米乳滴, 然后加入戊二醛, 使纳米乳滴发生交联形成纳米球。通过比较形成乳液的稳定性选择了最适的乳化剂, 系统考察了交联剂戊二醛的用量对所制纳米球性质的影响。结果表明, 戊二醛用量增加, 则纳米球产率、载药量和药物包封率均增加, 而粒径和溶胀度下降, 体外释药速度亦下降。戊二醛用量使醛基与白蛋白氨基摩尔比为 16:1 时最佳。纳米球的体外释药为双相释药, 两个释药相均符合 Higuchi 方程。

关键词:白蛋白纳米球; 制备; 体外释药; 丝裂霉素

中图分类号: R944.2

文献标识码: A

文章编号: 1009-606X(2004)02-0155-05

1 前言

在肿瘤治疗中, 由于抗癌药物对正常细胞也有强烈的杀伤作用, 所以人们期望能采用靶向制剂将其引导到特定的患部发挥药效, 因此抗癌药物靶向制剂成为药剂学研究的热点, 而利用微球实现靶向给药则是其中的重要内容。根据靶向原理的不同, 靶向微球可分为普通注射微球、栓塞性微球和磁性微球^[1]。对普通注射微球, 粒径是决定其体内分布的重要因素。要使微球能长时间在体内循环从而实现其靶向性, 微球应该避免被肝脏和脾脏的窦状小管截留, 其粒径必须小于 200 nm^[2]。白蛋白微球是人或动物白蛋白与药物一起制成的一种微球制剂, 与其它胶体载体系统如脂质体相比, 白蛋白微球具有更好的储存稳定性和更高的亲水性药物的负载能力, 并且释药性能的可控性更好, 所以是一种理想的药物载体^[3]。然而, 尺寸均一的白蛋白纳米球(albumin nanosphere)的制备一直是一个难点。通过搅拌乳化和膜乳化方法得到的白蛋白微球粒径都在 5 μm 以上, 只有超声乳化法^[1,3]和去溶剂法^[4-7]才可制得粒径小于 1 μm 的白蛋白纳米球, 然而粒径小于 200 nm 的白蛋白纳米球却少有报道。Müller 等^[3-5]制备了粒径小于 200 nm 的白蛋白纳米球, 但未包埋抗癌药物, 也未对交联剂用量的影响进行系统考察。本工作以常用的抗癌药丝裂霉素为模型药物, 以超声乳化-化学交联方法制备了粒径为 60~100 nm 的白蛋白纳米球, 并系统考察了交联剂用量对所得纳米球性质的影响。

2 实验

2.1 药品与仪器

牛血清白蛋白(BSA)(美国 Amresco 公司, 生物技术级), 胰蛋白酶(美国 Amresco 公司, 1:250, 来自牛胰), 25%戊二醛水溶液(美国 Sigma 公司), 注射用丝裂霉素(上海新亚药业有限公司, 10 mg 装), 乳化剂 Arlcel 83(失水山梨醇倍半油酸酯, 美国 Sigma 公司), HCO-40(聚氧乙烯 40 氢化蓖麻油, 日本 Nikkol 公司), 卵磷脂(美国 Sigma 公司, TypeII-S 来自大豆), Span 85(失水山梨醇三油酸

收稿日期: 2003-05-28, 修回日期: 2003-07-18

基金项目: 国家杰出青年科学基金资助项目(编号: 20125616)

作者简介: 王恺(1979-), 男, 江西省南昌市人, 硕士, 生物化工专业; 马光辉, 通讯联系人, Tel: 010-82627072.

酯)和 Span 80(失水山梨醇单油酸酯)均为国产分析纯. 其他试剂均为国产分析纯.

JY92-2D 超声波细胞粉碎机(宁波新芝科器研究所), H-600 透射电子显微镜(日本日立公司), Du 7500 紫外分光光度计(美国 Beckman 公司), THZ-C 恒温振荡器(江苏太仓市实验设备厂), DZF-6020 型真空干燥箱(上海精宏实验设备有限公司).

2.2 纳米球的制备

戊二醛水溶液与甲苯按 1:5 体积比振荡混合一定时间, 分层后取甲苯层, 得到戊二醛的甲苯溶液, 经紫外分光光度法测定, 其浓度为 0.234 mol/L.

1 ml 水相(20%的白蛋白生理盐水溶液, 含 0.25%丝裂霉素)和 50 ml 油相(环己烷, 含 2%乳化剂)在 600 r/min 转速下搅拌混合 1 h, 再超声乳化 10 min, 功率为 300 W. 加入一定量的戊二醛甲苯溶液后, 搅拌固化 2 h, 然后加入过量乙醇胺搅拌 1 h 抑制剩余醛基. 离心后用环己烷洗涤 2 次, 丙酮洗涤 3 次, 真空干燥 24 h, 即得白蛋白纳米球.

2.3 纳米球的表征

2.3.1 纳米球的外形及粒径

乙醇胺反应结束后, 取样用醋酸双氧铀染色后, 用透射电镜观察并拍照. 测量 $n(n>200)$ 个纳米球的直径 $d_i(\text{nm})$, 计算平均粒径 $\bar{d}(\text{nm})$, 并按以下公式计算粒径的变异系数 CV(coefficent of variation):

$$CV = \frac{1}{\bar{d}} \left[\sum_{i=1}^n \frac{(d_i - \bar{d})^2}{n} \right]^{\frac{1}{2}}$$

2.3.2 纳米球溶胀度的测定

称取 50 mg 左右的纳米球, 以纯水充分溶胀后, 以 5000 r/min 转速离心 5 min, 倒去上清液, 称出纳米球的湿重, 按下面公式计算溶胀度:

$$\text{溶胀度} = \frac{\text{纳米球湿重} - \text{干重}}{\text{干重}} \times 100\%$$

2.3.3 药物含量测定

将丝裂霉素溶于纯水得到浓度 C 为 0.2, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 mg/L 的溶液, 以纯水为参比, 用紫外分光光度计于 365 nm 波长下测定吸光值 A , 得到标准曲线:

$$A = 0.04222C + 0.00176, \quad R = 0.99977.$$

将 2 mg 纳米球与 4 mg 胰蛋白酶加入到 10 ml pH 7.4 的磷酸缓冲液中, 37°C 恒温振荡至纳米球完全降解. 加入 10 ml 三氯乙酸沉淀蛋白, 过滤后用紫外分光光度法测定丝裂霉素浓度. 经计算得到白蛋白纳米球的载药量和包封率.

2.3.4 体外药物释放测定

将 30 mg 纳米球加入到 5 ml 磷酸缓冲液中, 以透析袋封好, 放入装有 25 ml 磷酸缓冲液的烧杯中, 37°C 恒温振荡, 定时取出 2 ml 测定药物浓度, 并补充 2 ml 缓冲液.

3 结果与讨论

3.1 乳化剂的选择

Durbin 等^[9]和 Landfester 等^[10-11]的研究表明, 用超声乳化法可得到尺寸较为均一的纳米乳滴. 但由于纳米乳滴的比表面积大, 乳滴之间容易合并, 所以交联过程中容易发生乳滴之间的交联,

形成大微球甚至聚集体. 因此, 提高乳滴的稳定性是制备纳米球的保证. 为提高乳液的稳定性, 本研究首先对乳化剂进行了筛选. 对 5 种常用于 W/O 型乳液制备的乳化剂, 按下述的方法考察其形成乳液的稳定性. 将 1.5 ml 20% 的 BSA 溶液与 4 ml 环己烷和乳化剂混合后, 超声 90 s (功率为 80 W), 观察所得乳液开始出现分层的时间, 实验结果如表 1 所示. 表明以 Arlacel 83 和 HCO-40 为乳化剂制备的乳液稳定性最好. 但 HCO-40 在环己烷中的溶解性不好, 需要较长时间才能全部溶解, 故后面的实验采用 Arlacel 83 作为乳化剂, 根据文献情况, 乳化剂的量取为油相的 2%.

表 1 不同乳化剂所得乳液的分层时间

Emulsifier	Emulsifier content 0.5%	Emulsifier content 5%
HCO-40	45	420
Span80	45	240
Lecithin	5	30
Span85	5	30
Arlacel 83	45	420

3.2 戊二醛用量对白蛋白纳米球性质的影响

由于戊二醛与白蛋白的反应是氨基与醛基的反应:



所以用醛基与白蛋白中氨基的摩尔比来表征戊二醛的用量. 戊二醛用量对所得白蛋白纳米球性质的影响见表 2. 当醛基与氨基比例采用 16:1 时, 所得白蛋白纳米球产率最高, 突释效应最弱, 而且载药量和包封率也较高, 因此是最佳方案.

表 2 戊二醛用量对纳米球性质的影响

Ratio of aldehyde group to amino group (mole ratio)	Diameter of nanosphere (nm)	CV (%)	Yield (%)	Drug content (%)	Drug loading efficiency (%)	Swelling degree (%)
1:1	99.34	34.68	54.06	0.79	28.45	268.78
4:1	95.27	31.25	65.12	0.80	34.53	207.23
8:1	86.25	30.06	70.53	1.15	54.24	119.73
12:1	72.85	29.64	81.24	1.66	90.15	107.86
16:1	67.63	36.37	97.61	1.29	83.67	112.10

戊二醛用量增加使更多的白蛋白发生交联而形成纳米球, 从而使纳米球收率增高. 纳米球内交联度增高, 交联速度增快, 从而抑制了药物向油相的扩散, 使药物包封率增加. 戊二醛用量增加导致纳米球粒径减小的原因有 2 个: (1) 纳米乳滴内的交联和乳滴间的合并是一个竞争过程. 交联速度的提高使乳滴较快地成球, 减少了乳滴之间的合并; (2) 交联度的提高导致纳米球更致密, 所以粒径减小, 同时洗涤中的药物损失减少, 于是载药量也增加. 而随着致密程度的提高, 纳米球的溶胀能力下降.

醛基与氨基摩尔比为 16:1 时所得纳米球的 TEM 照片如图 1 所示, 表明所得纳米球近似球形.

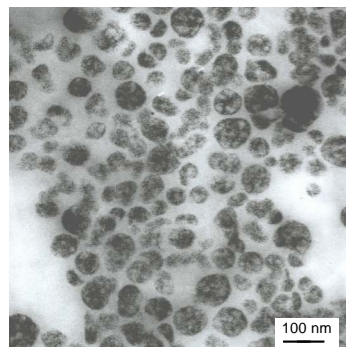


图 1 白蛋白纳米球的 TEM 照片

Fig.1 TEM photograph of albumin nanospheres (-CHO:-NH₂=16:1)

本研究制得的纳米球粒径很小,比文献^[3-5]制得的纳米球还小,这是因为制备过程中采用了较大的超声功率(300 W)和较长的超声时间(10 min),并选用了最适的乳化剂,所以能得到粒径小并稳定的乳滴,交联后就得到了小粒径的纳米球。由于纳米球的比表面积大,制备过程中药物容易损失,所以纳米球的包封率较难接近 100%,例如文献[1]中氟尿嘧啶白蛋白纳米球的包封率为 90.38%,文献[8]中阿霉素白蛋白纳米球的包封率为 75%左右,本研究则以更小的粒径达到 90.15%的包封率。

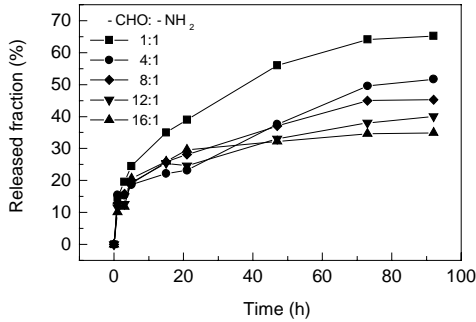


图2 不同戊二醛用量所得纳米球的体外释药曲线
Fig.2 In vitro release of mitomycin from the albumin nanospheres made with different amounts of glutaraldehyde

戊二醛用量对所得纳米球的体外释药性能的影响如图 2 所示。从图可以看出,不同戊二醛用量所得纳米球的释药趋势是相同的,表现为双相释药,5 h 内为快速释药相,其后为缓慢释药相。由于纳米球的比表面积很大,所以纳米球表面及接近表面的药物会较快释放出来,形成突释效应。致密程度高的纳米球,由于药物扩散的阻力较大,所以突释效应相对较弱,最终的药物释放率也会较低。文献[1]中氟尿嘧啶白蛋白纳米球(平均粒径 560 nm)5 h 突释 19%左右,本研究所得 5 批纳米球 5 h 后突释量为 18.6%~24.5%,比前者略高,这是因为本研究制得的纳米球更小、比表面积更大,从而更易突释。

将最后一组释药数据(即醛基与氨基摩尔比为 16:1)分别用零级动力学、一级动力学、Higuchi 方程拟合,结果如表 3 所示,其中 Q 表示 t 时刻的药物释放量。很明显,用 Higuchi 方程拟合其释药曲线最佳。

表 3 白蛋白纳米球释药曲线的拟合

Table 3 The fitting of the release curve of albumin nanospheres

Model	Fitted equation	
	0~5 h	5~92 h
Zero-order kinetics	$Q=0.0359t+0.0257, R=0.9413$	$Q=1.44 \times 10^{-3}t+0.236, R=0.8970$
First-order kinetics	$1-Q=0.975e^{-0.04041t}, R=0.9469$	$1-Q=0.764e^{-0.00202t}, R=0.9081$
Higuchi equation	$Q=0.08427t^{1/2}+0.00177, R=0.9685$	$Q=0.01857t^{1/2}+0.1859, R=0.9540$

将其他几组释药数据也以 Higuchi 方程拟合,所得结果如表 4 所示。由 R 值可知,这几组数据用 Higuchi 方程拟合也较好。可见白蛋白纳米球的体外释药规律符合 Higuchi 方程。

表 4 不同戊二醛用量所得白蛋白纳米球释药曲线的 Higuchi 方程拟合

Table 4 The Higuchi equation fitting of the released fraction of drug from albumin nanospheres prepared with different amounts of glutaraldehyde

-CHO:-NH ₂	Fitted equation	
	0~5 h	5~92 h
1:1	$Q=0.1075t^{1/2}+0.0133, R=0.9863$	$Q=0.0584t^{1/2}+0.1257, R=0.9904$
4:1	$Q=0.0789t^{1/2}+0.0258, R=0.9136$	$Q=0.0501t^{1/2}+0.0402, R=0.9830$
8:1	$Q=0.0834t^{1/2}+0.0159, R=0.9692$	$Q=0.0375t^{1/2}+0.111, R=0.9941$
12:1	$Q=0.0801t^{1/2}+0.0092, R=0.9671$	$Q=0.0285t^{1/2}+0.1313, R=0.9930$

4 结论

采用超声乳化-化学交联方法,使用较大的超声功率(300 W)和较长的超声时间(10 min),并选

用乳化效果好的乳化剂(Arlacel 83),可制得粒径为 60~100 nm 的负载丝裂霉素的白蛋白纳米球。戊二醛用量对制得的纳米球的性质有很大影响。戊二醛用量增加,则纳米球产率、载药量和药物包封率均增加,而粒径与溶胀度下降,体外释药速度亦下降。纳米球的体外释药为双相释药,两相均符合 Higuchi 方程。这种白蛋白纳米球由于粒径小,对其进行表面修饰后,期望可较长时间地在体内循环,这为以后研制静脉注射的靶向制剂奠定了基础。

参考文献:

- [1] 徐希明, 张钧寿. 氟尿嘧啶白蛋白微球的制备及体外性质研究 [J]. 中国药科大学学报, 1999, 30(5): 353-356.
- [2] 吴镭, 平其能. 药剂学发展与展望 [M]. 北京: 化学工业出版社, 现代生物技术与医药科技出版中心, 2002. 63.
- [3] Müller B G, Leuenberger H, Kissel T. Albumin Nanospheres as Carriers for Passive Drug Targeting: An Optimized Manufacturing Technique [J]. Pharm. Res., 1996, 13(1): 32-37.
- [4] Lin W, Garnett M C, Schacht E, et al. Preparation and in vitro Characterization of HSA-mPEG Nanoparticles [J]. Int. J. Pharm., 1999, 189: 161-170.
- [5] Lin W, Garnett M C, Davis S S, et al. Preparation and Characterization of Rose Bengal-loaded Surface-modified Albumin Nanoparticles [J]. J. Control. Rel., 2001, 71: 117-126.
- [6] Coombes A G A, Breeze V, Lin W, et al. Lactic Acid-stabilised Albumin for Microsphere Formulation and Biomedical Coatings [J]. Biomaterials, 2001, 22: 1-8.
- [7] Chen G O, Lin W, Coombes A G A, et al. Preparation of Human Serum Albumin Microspheres by a Novel Acetone-heat Denaturation Method [J]. J. Microencapsul., 1994, 11(4): 395-407.
- [8] Gupta P K, Hung C T, Lam F C. Factorial Design Based Optimization of the Formulation of Albumin Microspheres Containing Adriamycin [J]. J. Microencapsul., 1989, 6(2): 147-160.
- [9] Durbin D P, El-Aasser M S, Poehlein G W, et al. Influence of Monomer Preemulsification on Formation of Particles from Monomer Drop in Emulsion Polymerization [J]. J. Appl. Polymer. Sci., 1979, 24: 703-707.
- [10] Landfester K, Willert M, Antonietti M. Preparation of Polymer Particles in Nonaqueous Direct and Inverse Miniemulsions [J]. Macromolecules, 2000, 33: 2370-2376.
- [11] Willert M, Landfester K. Amphiphilic Copolymers from Miniemulsified Systems [J]. Macromol. Chem. Phys., 2002, 203: 825-836.
- [12] Fujimoto S, Miyazaki M, Endoh F, et al. Mitomycin Carrying Microspheres as a Novel Method of Drug Delivery [J]. Cancer Drug Deliv., 1985, 2(3): 173-181.

Preparation and Characterization of Albumin Nanospheres as Drug Carrier

WANG Kai, MA Guang-hui

(State Key Lab. Biochem. Eng., Inst. Process Eng., Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: Mitomycin-loaded albumin nanospheres sized between 60 and 100 nm were prepared by the ultrasonic emulsification-crosslinking method. After the albumin aqueous phase containing mitomycin was emulsified into the oil phase by the ultrasonifier to obtain the nanodroplets, glutaraldehyde was added to crosslink the nanodroplets. The optimal emulsifier was chosen by comparing the stability of emulsion prepared with various emulsifiers. It was found that the most stable W/O emulsion was obtained when Arlacel 83 was used as the emulsifier. The influence of the amount of glutaraldehyde on the properties of the albumin nanospheres was investigated. It was found that the yield and drug content of nanospheres and loading efficiency of the drug increased, while the diameter and swelling degree of nanospheres, and the rate of drug release in vitro decreased, with the increase of the amount of glutaraldehyde. The optimal amount of glutaraldehyde corresponds to the ratio of aldehyde group to amino group being 16:1. The drug release in vitro can be divided into two phases, both of which can be expressed with the Higuchi equation.

Key words: albumin nanospheres; preparation; in vitro drug release; mitomycin