

· 论 著 ·

携载两性霉素 B 的聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒的制备及特性评价

徐楠¹, 邹豪², 温海¹, 陈江汉^{1*}

(1. 第二军医大学长征医院皮肤科, 上海 200003; 2. 第二军医大学药学院药剂学教研室, 上海 200433)

[摘要] 目的:制备携载两性霉素 B (AmB) 的聚氰基丙烯酸正丁酯 (PBCA) 纳米粒, 测定表征, 并筛选制备工艺。方法:将抗真菌药物 AmB 以孵化法吸附在 PBCA 空白纳米粒上, 制备两性霉素 B-聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒 (AmB-PBCA-NP), 并以聚山梨酯-80 进行表面修饰。检测所制备 AmB-PBCA-NP 溶液的 D_{405} 值, 利用 AmB 的标准方程计算 AmB 药物浓度并评价药物溶液的稳定性; Nano-S 粒径测定仪测定粒径分布; 将 AmB-PBCA-NP 胶体溶液离心后, 取上清液测定浓度, 按公式计算纳米粒的包封率及载药量等指标; 进行体外释放实验; 以不同处方条件下纳米粒的粒径、载药量和包封率为评价指标筛选优化的处方工艺。结果:制备的 AmB-PBCA-NP 外观呈圆或类圆形, 平均粒径 (69.01 ± 28.56) nm, 分散均匀; AmB 标准品在 $1.12 \sim 5.60$ $\mu\text{g/ml}$ 范围内的线性回归方程为: $D_{405} = 0.1634c + 0.0066$, $r = 0.9993$, AmB-PBCA-NP 的平均回收率为 99.93%, 其溶液在 12 h 内稳定性较好; 体外释放实验表明 24 h 体外释放具有一定的缓释性; 实验发现最优化的处方为稳定剂采用 Dextran T-70, 且不加助溶剂脱氧胆酸钠, 其包封率及载药量均比较高, 分别为 56.10%、82%。结论:该方法工艺简单易行, 载药纳米粒性状符合药剂学要求。

[关键词] 两性霉素 B; 聚氰基丙烯酸正丁酯; 纳米技术

[中图分类号] R 944 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)10-1127-04

Preparation and characterization of amphotericin B polybutylcyanoacrylate nanoparticles

XU Nan¹, ZOU Hao², WEN Hai¹, CHEN Jiang-han^{1*} (1. Department of Dermatology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433)

[ABSTRACT] **Objective:** To prepare amphotericin B (AmB)-polybutylcyanoacrylate (PBCA) nanoparticle and evaluate its characteristics, so as to screen for the optimal preparation technique. **Methods:** AmB was loaded to blank PBCA nanoparticles by incubation to prepare AmB-PBCA nanoparticles. The surface of the nanoparticles was modified with polysorbate 80. The AmB concentration of AmB-PBCA-NP solution was calculated with the standard curve of AmB at D_{405} , and the stability of solution was assessed. The diameter distribution of the particles was determined with Coulter Laser granulometer. The colloid solution of AmB-PBCA-NP was centrifuged and the supernatant was harvested to determine the concentration of AmB. The encapsulation rate, drug loading rate, and *in vitro* drug release were measured. The optimized preparation recipe was screened using diameter, drug loading rate, and encapsulation rate of the particles as indices. **Results:** The prepared AmB-PBCA nanoparticle had a regular spherical or elliptic surface, with a mean diameter of (69.01 ± 28.56) nm. The curve of standard AmB was linear within the range of $1.12 \sim 5.60$ $\mu\text{g/ml}$: $D_{405} = 0.1634c + 0.0066$ ($r = 0.9993$). The average recovery of AmB-PBCA-NP was 99.93%, showing the solution of AmB-PBCA-NP was stable within 12 h. The nanoparticles showed a sustained drug release *in vitro* within 24 h. The optimized recipe was: Dextran T-70 stabilizer without sodium deoxycholate, with a mean encapsulation rate of 56.10% and a drug loading rate of 82%. **Conclusion:** The current method for preparing AmB-PBCA nanoparticles is simple and can meet the requirements of pharmaceutics.

[KEY WORDS] amphotericin B; polybutylcyanoacrylate; nanotechnology

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(10): 1127-1130]

两性霉素 B (AmB) 属大环多烯类抗生素, 一直是治疗深部真菌感染的首选药物, 但随着隐球菌感染发病率的升高, 耐药菌株也逐渐增多, 敏感性呈下降趋势, 更重要的是该药物很难通过血脑屏障 (BBB), 即使脑膜有炎症时, 脑脊液 (CSF) 中仍不能检测出 AmB, 更无法达到有效治疗水平^[1], 静脉合并鞘内直接给药疗效虽然较好, 但由于不良反应很严重, 患者难以接受。因此, 临床迫切需要研发新型

药物和采用新的治疗技术来解决这一问题。

近年来, 为了使药物能够通过 BBB, 学者们尝试

[基金项目] 上海市科委纳米专项基金 (0452nm016)。Supported by Fund for Nano-research of Shanghai Science and Technology Committee (0452nm016)。

[作者简介] 徐楠, 博士生。E-mail: chaochen@cityyouth.cn

* Corresponding author. E-mail: chenjianghan@126.com

了许多方法,其中国内外报道最多的是通过纳米材料作为载体达到通过 BBB 的目的。已投入临床应用的 AmB 脂质体实际上也是一种载体药物,但由于费用较高,不能用于鞘内给药,极大地限制了其在临床的广泛推广。国内外学者研究发现聚氰基丙烯酸正丁酯(PBCA)经过聚山梨酯-80 修饰后能够透过 BBB^[2,3],有望成为提高脑内药物浓度的良好载体。

本研究采用 PBCA 作为载体材料,与经典抗真菌药 AmB 相结合,通过适当的表面修饰,制备出能够携载 AmB 的纳米复合体,并对其进行特性评价及工艺优化,为将其用于治疗隐球菌性脑膜炎奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料和仪器 AmB (25 mg/支,上海新先锋药业,批号:050701);-氰基丙烯酸正丁酯(BCA,北京瞬康医用胶有限公司,批号:20050508);右旋糖苷 Dextran T-70、Polxamer 188 (Pharmacia 公司,北京世纪华林生物科技有限公司,批号:17-0280-01),聚山梨酯-80 (T-80,上海化学试剂公司,批号:F20040213)。

Sartorius 电子天平(BS-124S,北京电子仪器厂);Zetasizer 纳米粒径分析仪(Malvern 公司);HJ-3 恒温磁力搅拌器(上海和欣仪器厂);PHS-25 型 pH 计(上海雷磁仪器厂);CQ-250 型超声波清洗器(上海超声波仪器厂);GL20 型全自动超速冷冻离心机(日本日立公司);TGL-18G 型高速离心机(上海医用分析仪器厂);JEM-100CX 透射电子显微镜(JEOL,加速电压 100 kV);UV-256 型可见紫外分光光度计(日本岛津)。

1.2 AmB-PBCA-NP 的制备及 T-80 的孵化 称取 300 mg 的 Dextran T-70 加蒸馏水搅拌溶解,以 0.01 mol/L 的盐酸调节溶液的 pH 值至 3.0,定容。室温及电磁搅拌下缓缓加入 BCA,4 h 后,调节 pH 至 8.5,再加入 20 mg 的 AmB 粉针剂,在 pH 值 7.0 条件下搅拌 4 h,得 AmB-PBCA-NP 胶体溶液。取 10 ml 制备好的 AmB-PBCA-NP 胶体溶液,加入 0.1 ml 的 T-80,充分搅拌后,置 37 恒温箱中孵化 2 h。

1.3 纳米粒粒径大小的测定及其分布 室温条件下取胶体溶液适量,加注射用水分散,置 Nano-S 粒径测定仪中测定粒径大小及分布。

1.4 纳米粒的形态观察 取 1~2 滴纳米粒胶态混悬液置于铜网上,2%磷钨酸溶液负染色,室温晾干,于透射电镜下观察纳米粒的形态并拍照。

1.5 紫外检测 AmB 药物浓度

1.5.1 标准曲线的绘制 精密称取 AmB 标准品适量,用乙醇配制成 112 μg/ml 的储备液,精密吸取 1、2、3、4、5 ml 溶液置 100 ml 容量瓶中,用乙醇稀释至刻度,配制成浓度为 1.12、2.24、3.36、4.48 和 5.60 μg/ml 的溶液,在 405 nm 波长处测定其光密度(D_{405}),以 D_{405} 对浓度(c)进行线性回归。

1.5.2 回收率测定 精密吸取 AmB 储备液 1.0、3.0、5.0 ml 溶液置于 100 ml 容量瓶中,按处方比加入空白 PBCA-NP 胶体、Dextran T-70、Polxamer 188 等,再加入乙醇,稀释至刻度,混匀,测定 D_{405} ,计算平均回收率。

1.5.3 药物溶液的稳定性 精密吸取 AmB 储备液 3.0 溶液置于 100 ml 容量瓶中,测定 0、2、4、8、12 h 的 D_{405} 。

1.6 包封率和载药量的测定 取 AmB-PBCA-NP 胶体溶液适量,于 4、35 000 r/min 离心 90 min,取上清液测定浓度,计为 c_0 (mg/ml),按投药量计算 AmB 的初始浓度,计为 c (mg/ml),PBCA-NP 的初始浓度计为 M (mg/ml),空白 PBCA-NP 胶体溶液冷冻干燥后准确称质量,与胶体溶液体积的比值即为 M 值。计算公式如下:

$$\text{包封率: } E = (c - c_0) / c \times 100\%$$

$$\text{载药量: } Y = (c - c_0) / M \times 100\%$$

1.7 AmB-PBCA-NP 的体外释放实验 选择 PVP (聚乙烯吡咯烷酮) K30 的水溶液为保护胶体,加入适量置 AmB-PBCA-NP 液中,制成含 2% PVP 的 AmB-PBCA-NP 液,超声振荡 5 min,室温振摇 12 h。取 1 ml 转入透析袋中,置 10 ml 37 蒸馏水中振摇 12 h,分别在 0、5、10、24 h 取样 0.5 ml 测定 D_{405} ,同时补充同体积蒸馏水,计算释放率(%)。

1.8 纳米粒处方工艺的筛选 分别以 Dextran T-70、Polxamer 188 等作为稳定剂以及脱氧胆酸钠作为助溶剂,以 NP 的粒径及载药量和包封率为评价指标,筛选优化制备工艺。

实验 1:称取 300 mg Dextran T-70,加蒸馏水搅拌溶解,调节 pH 值至 3.0,定容。电磁搅拌下缓缓加入适量 BCA (使浓度为 1%),搅拌 4 h 后,调节 pH 至 8.5,得空白 PBCA-NP 胶体溶液。取 10 ml 胶体溶液加入 20 mg 的 AmB 粉针剂,继续搅拌 4 h,即得 AmB-PBCA-NP 胶体溶液。按 1.6 项所述方法测定粒径及载药量、包封率。

实验 2:按实验 1 步骤首先得空白 PBCA-NP 胶

体溶液,量取胶体溶液 10 ml,加入 20 mg 的 AmB 粉针剂,测定 pH 值约为 7.0,再加入助溶剂脱氧胆酸钠 20 mg,继续搅拌 4 h,即得。按 1.6 项所述方法测定粒径及载药量、包封率。

实验 3:称取 Dextran T-70 和 Poloxamer 188 各 300 mg,加蒸馏水搅拌溶解,调节 pH 值至 3.0 并定容。电磁搅拌下缓缓加入适量 BCA (使浓度为 1%),搅拌 4 h 后,调节 pH 至 8.5,得空白 PBCA-NP 胶体溶液。量取 10 ml 加入 20 mg 的 AmB 粉针剂,继续搅拌 4 h,即得。按 1.6 项所述方法测定粒径及载药量、包封率。

实验 4:按实验 3 步骤制得空白 PBCA-NP 胶体溶液。量取 10 ml 加入 20 mg 的 AmB 粉针剂,再加入助溶剂脱氧胆酸钠 20 mg,继续搅拌 4 h,即得。按 1.6 项所述方法测定粒径及载药量、包封率。

2 结果

2.1 粒径分布 经激光粒度分析仪测定,平均粒径为 (69.01 ± 28.56) nm。见图 1。

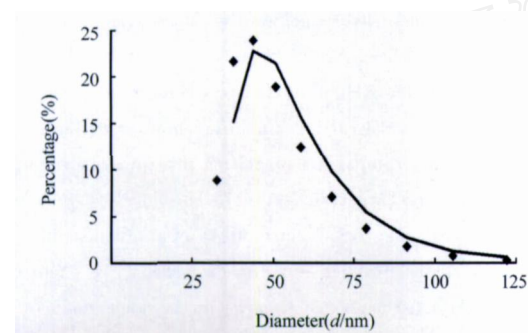


图 1 AmB-PBCA-NP 胶体溶液粒径分布

Fig 1 Diameter distribution of AmB-PBCA-NP

2.2 形态学观察 实验得 AmB-PBCA-NP 胶体溶液外观呈淡黄色不透明乳状液体。电镜下呈圆或类圆形,大小较为均匀,无明显聚集。见图 2。

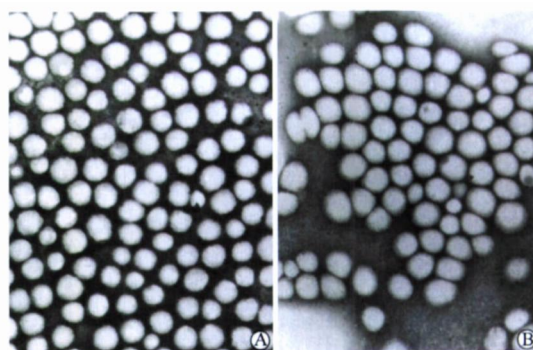


图 2 AmB-PBCA-NP 胶体溶液透射电镜照片

Fig 2 TEM image of AmB-PBCA-NP ($\times 50\,000$)

A: AmB-PBCA-NP; B: AmB-PBCA-NP modified with T-80

2.3 AmB 紫外测定 线性回归方程: $D_{405} = 0.1634c + 0.0066$, $r = 0.9993$ 。结果显示,溶液浓度在 $1.12 \sim 5.60 \mu\text{g/ml}$ 范围内,光密度与浓度呈良好的线性关系。平均回收率为 $(99.93 \pm 0.41)\%$,RSD 为 $(0.36 \pm 0.06)\%$ 。12 h 内 AmB 的 D_{405} 值的 RSD = $(0.563 \pm 0.002)\%$,表明药物溶液在此时间段内稳定。

2.4 载药量及包封率 经预试验,离心速度对包封率、载药量无明显影响。由表 1 可知,实验 1 处方中的稳定剂采用 Dextran T-70,且不加助溶剂脱氧胆酸钠,载药量及包封率均比较高,同时,粒径较小。

2.5 体外释药性质考察 结果显示,加 2% 的 PVP 后纳米药物呈时间依赖性释放,并具有一定缓释性(图 3)。

表 1 不同处方工艺对 AmB-PBCA-NP 性征的影响

Tab 1 Effect of different formulas on characteristics of AmB-PBCA-NP

No.	Formula	Drug loading (%)	Entrapment efficiency (%)	Diameter (d/nm)
1	Dextran T-70	82	56.10	89.9
2	Dextran T-70 + sodium deoxycholate	25	23.10	90.7
3	Dextran T-70/ F68	92	38.40	93.4
4	Dextran T-70/ F68 + sodium deoxycholate	45	34.80	88.6

3 讨论

近年来,纳米粒载药系统尤其是表面改性的聚合物纳米粒的血脑屏障靶向性研究受到极大关注,PBCA 自 1995 年作为靶靶向载体开始研究以来已

被证明经 T-80 修饰后可以输送多种药物到达 CNS^[4-7]。

因此,本实验选择了 PBCA 作为 AmB 的载体材料,以 T-80 作为表面修饰剂,制备载药纳米粒 AmB-PBCA-NP。

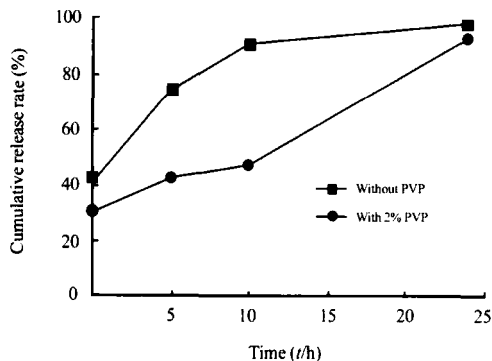


图3 AmB-PBCA-NP 体外释药
Fig 3 Cumulative drug release of AmB-PBCA-NP in vitro

影响靶向性的因素很多,其中,药物载体的粒径与之关系最密切。原因可能在于不同粒径的载体在生物体内具有不同的穿透能力。据有关报道^[8],当粒径在 100~200 nm 之间时,纳米药物主要被网状内皮系统(RES)的巨噬细胞从血液中清除,最终到达肝脏库普弗细胞的溶酶体中。经过表征测定,我们的载药纳米粒平均粒径 < 100 nm,从而为其逃避肝、脾及网状内皮系统的吞噬提供保障,增加循环药量和药物入脑概率^[9]。在制备过程中我们还发现,稳定剂采用 Dextran T-70、且不加助溶剂脱氧胆酸钠的制备工艺所得到的纳米粒其载药量及包封率均比较高,同时,粒径较小。加入 T-80 孵化后的载药纳米粒平均粒径变化为(69.01 ± 28.56) nm,电镜照片证实,纳米粒子的形态也发生了变化,形状变得略不规则,这可能和 T-80 本身的特性有关。处方中加入增溶剂脱氧胆酸钠会严重降低载药量和包封率,因此优化处方没有选用增溶剂。在 AmB-PBCA-NP 胶体溶液中加入适量的 PVP(2%),从纳米粒的释放曲线上可以看出,PVP 可以明显的延缓 AmB 的释放,呈现缓释特征。

我们成功制备出 AmB-PBCA-NP,在优化制剂学工艺后,进行了改性后 AmB 的药代动力学研究,初步预示脑靶向效果良好(另文发表)。这为将来研究脑靶向治疗隐球菌性脑膜炎奠定基础。

[参考文献]

[1] Gallis HA, Drew RH, Pickard WW. Amphotericin B: 30 years of clinical experience [J]. Rev Infect Dis,1990,12:308-329.

[2] Alyautdin RN, Petrov VE, Langer K, et al. Delivery of loperamide across the blood-brain barrier with polysorbate-80 coated polybutylacrylate nanoparticles [J]. Pharm Res, 1997,14:325-328.

[3] Ambruosi A, Yamamoto H, Kreuter J. Body distribution of polysorbate-80 and doxorubicin-loaded [¹⁴C]poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles after i. v. administration in rats[J]. J Drug Target,2005,13:535-542.

[4] Kreuter J, Alyautdin RN, Kharkevich DA, et al. Passage of peptides through the blood-brain barrier with colloidal polymer particles (nanoparticles) [J]. Brain Res, 1995, 674: 171-174.

[5] Lockman PR, Mumper RJ, Khan MA, et al. Nanoparticle technology for drug delivery across the blood-brain barrier [J]. Drug Dev Ind Pharm, 2002,28:1-13.

[6] Goppert TM, Muller RH. Polysorbate-stabilized solid lipid nanoparticles as colloidal carriers for intravenous targeting of drugs to the brain: comparison of plasma protein adsorption patterns[J]. J Drug Target,2005,13:179-187.

[7] Ambruosi A, Khalansky AS, Yamamoto H, et al. Biodistribution of polysorbate 80-coated doxorubicin-loaded [¹⁴C]-poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles after intravenous administration to glioblastoma-bearing rats[J]. J Drug Target,2006, 14:97-105.

[8] 徐辉碧. 纳米医药[M]. 北京:清华大学出版社,2004: 37-38.

[9] Shi N, Zhang Y, Zhu C, et al. Brain-specific expression of an exogenous gene after i. v. administration [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98: 12754-12759.

[收稿日期] 2006-03-13 [修回日期] 2006-07-04
[本文编辑] 尹 茶

欢迎订阅

《第二军医大学学报》 ISSN 0258-879X
CN31-1001/R
上海市翔殷路 800 号(邮编:200433) 邮发代号:4-373

JOURNAL OF MEDICAL COLLEGES OF PLA ISSN 1000-1948
CN31-1002/R
上海市翔殷路 800 号(邮编:200433) 邮发代号:4-725