

含水核载牛血清白蛋白聚氰基丙烯酸丁酯 微囊的制备及体外释放*

李 赛 钱志勇 刘晓蕾 刘孝波**

(中国科学院成都有机化学研究所 成都 610041)

摘 要 利用界面乳液聚合方法制备了新型含水核载牛血清白蛋白(BSA)的聚氰基丙烯酸丁酯(PBCA)纳米微囊.分别研究了纳米微囊的粒径及其分布,表面 Zeta 电势的变化.并以牛血清白蛋白为模型药物考察了药物包裹率和载药量的变化以及载药纳米微囊在磷酸缓冲溶液中的体外释放行为.结果表明,所制备的纳米微囊平均粒径为 200 nm,多分散度为 0.226;表面 Zeta 电势的变化证明了 BSA 是包裹于纳米微囊的内部而不是吸附在其表面;包裹率和载药量取决于水相中 BSA 的初始浓度,当 BSA 的浓度为 0.8 mg/mL 时,包裹率和载药量分别为 35% 和 0.485×10^{-9} mol/mg;药物的释放速率取决于纳米微囊的壁厚,通过调节壁厚可以达到控释的目的.

关键词 纳米微囊,控制释放,聚氰基丙烯酸丁酯(PBCA)

近年来,随着生物技术与基因工程的发展,出现了许多用于预防和治疗疾病的蛋白质多肽药物.然而由于大多数蛋白质多肽药物生物半衰期短,口服过程中会被胃肠道中的各种蛋白酶分解破坏,易于失活.故需多次频繁注射用药,增加病人的生理痛苦和经济负担,从而大大限制了这类药物在临床上的应用.研究开发合适的口服药物载体成为药剂科学工作者面临的迫切任务.纳米粒子以其优异的药物保护作用和控制释放特性而倍受关注^[1-3].

其中聚氰基丙烯酸烷基酯(PACA)胶体纳米粒子由于具有良好的生物降解性和生物相容性被广泛应用于药物控制释放系统^[4,5].根据制备工艺的不同,可形成纳米微球(Nanospheres)和纳米微囊(Nanocapsules).前者为致密的聚合物基体,药物通过静电作用吸附在其表面;后者由一层聚合物膜包裹一个液体核(通常为油相)构成,药物封装在内部或溶解于其中,所包裹的药物以亲脂性药物为主.与前者比较,PACA 纳米微囊包裹药物可以避免各种蛋白酶对药物的分解作用而提高生物利用度^[6].因此高分子纳米微囊是目前蛋白质/多肽药物控释体系的研究中的热门课题.

目前 PACA 纳米微囊的制备方法包括界面聚合法^[7]、O/W 乳液聚合法^[8]、W/O 乳液聚合法^[9].

前两种方法制备的纳米微囊悬浮在水相中,以油相为囊心.后一种方法制备的纳米微囊悬浮在油相中,以水相为囊心.但是大多数蛋白质多肽药物并不能溶解于以油相为囊心的纳米微囊内.同时含水核的纳米微囊悬浮在油相中也不适合于静脉注射.本文采用界面乳液聚合方法制备了悬浮在水相中并含水核载牛血清白蛋白聚氰基丙烯酸丁酯(PBCA)纳米微囊.并考察了载药量、包裹率和 Zeta 电势的变化,以及载药纳米微囊在磷酸缓冲溶液中的体外释放行为.

1 实验部分

1.1 原料与试剂

2-氰基丙烯酸丁酯,北京瞬康医用胶有限公司;牛血清白蛋白,生物试剂,上海伯奥生物科技有限公司;Span-85,分析纯,上海化学试剂公司;三油酸甘油酯,分析纯,上海试剂二厂;其它试剂均为分析纯试剂.

1.2 PBCA 纳米微囊的制备及体外释放

1.2.1 载牛血清白蛋白(BSA)PBCA 纳米微囊的制备 取含有不同浓度的 BSA 的 1.6 mL 去离子水和 0.2 mL 乙醇相混合,并用 0.1 mol/L NaOH 溶液将其 pH 值调整为 7.40.将制得的水相在搅拌下滴加入由 16 g 三油酸甘油酯和 3 g Span-85 组

成的油相中,并在室温下超声乳化 30 min.然后在搅拌下向上述乳液中滴加 0.1 mL 氰基丙烯酸丁酯单体.经 2 h 聚合后 PBCA 就形成含 BSA 水核的壳,高速离心(L8-80M,美国 Beckman 公司)去除油相,重新加入 0.5 mL 去离子水高速离心,洗去残余油相后,重新加入适量去离子水.制得悬浮于水相中包裹 BSA 于水核内的 PBCA 纳米微囊.

1.2.2 空白 PBCA 纳米微囊的制备 制备方法同上,只是在去离子水和乙醇中不加 BSA.并将所得空白 PBCA 纳米微囊置于不同浓度的牛血清白蛋白溶液中,高速离心后待测.

1.2.3 包裹 BSA 的 PBCA 纳米微囊的体外释放

取制得的载 BSA 的 PBCA 纳米微囊乳液置于 20 mL pH = 7.4 的磷酸缓冲溶液(含 0.1% EDTA, 37℃ 恒温)中,每隔一定时间取出 0.5 mL 缓冲溶液(并补充相同体积的 PBS 溶液),用去离子水稀释至 2 mL,高速离心后取水相,并利用紫外可见分光光度计(TU-1800)测定紫外光谱,检测 BSA 的含量.

1.3 测试方法

1.3.1 PBCA 纳米微囊粒径的测定 取所制备的 PBCA 纳米微囊乳液适量,用水稀释后在激光粒度分析仪(Matersizer)上进行粒径分析,记录并打印测定结果.

1.3.2 Zeta 电势的测定 Zeta 电势通过电泳法在 WSO-II 稳压稳流电泳仪上测定.并按下式计算:

$$\zeta = \eta u / E \epsilon \epsilon_0$$

上式中 ζ 为电动电势(mV); η 是分散介质的粘度(Pa·s); u 是界面移动速度(m/s); E 是电场强度(V/m); ϵ 是介电常数; ϵ_0 是真空介电常数, 8.85×10^{-12} F/m.

1.3.3 载药量和包裹率的计算 取所制备的包裹牛血清白蛋白的 PBCA 纳米微囊乳液高速离心,取离心产物用 1 mL 四氢呋喃溶解,再高速离心(18000 r/min)去除上层溶剂,用 4 mL 去离子水溶解离心产物,用分光光度法在 278 nm 处测定蛋白质的含量,计算载药量和包裹率.

$$\text{包裹率}(\%) = \frac{\text{纳米微囊含 BSA 的量}}{\text{BSA 的初始量}} \times 100\%$$

$$\text{载药量} = \frac{\text{纳米微囊含 BSA 的量}(\text{mol})}{\text{聚合物的重量}(\text{mg})}$$

1.3.4 透射电镜观察 将 PBCA 纳米微囊乳液涂布于 300 目铜网上,磷钨酸染色后,用 JEM-

100CX 透射电子显微镜观察(TEM)测定纳米微囊壁厚.

2 结果与讨论

2.1 载牛血清白蛋白 PBCA 纳米微囊的制备

在纳米微囊制备过程中,在 OH^- 离子的引发下,氰基丙烯酸丁酯单体在油/水界面上发生阴离子聚合反应,并形成一层聚合物膜将蛋白质水核包裹.图 1 为激光粒度分析仪分析纳米微囊的粒径大小和分布.所制备的载牛血清白蛋白 PBCA 纳米微囊的平均粒径为 200 nm,多分散度为 0.226.从样品的透射电子显微镜可以看出,牛血清白蛋白溶于水相中并被 PBCA 包裹于囊心(见图 2).PBCA 纳米微囊的壁厚大约为 30 nm 左右.

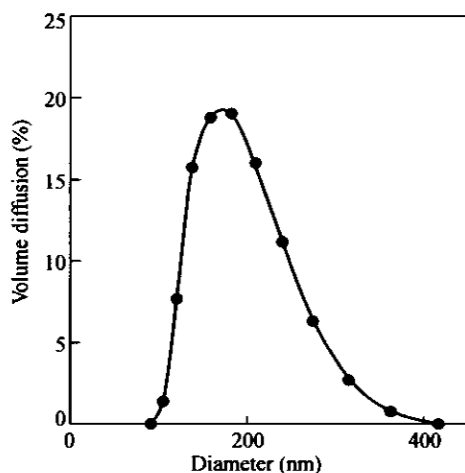


Fig. 1 Sizes distribution of BSA-loading PBCA nanocapsules

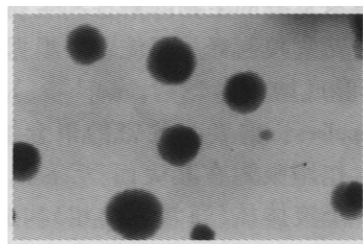


Fig. 2 TEM image of BSA-loading PBCA nanocapsules ($\times 50000$)

2.2 Zeta 电势的变化

从图 3 可以看出,未包裹牛血清白蛋白的空白 PBCA 纳米微囊的表面电势为 -36.7 mV;当包裹 BSA 的浓度为 0.50 mg/mL 时,PBCA 纳米微囊的表面电势变化很小,只降低了 0.7 mV;而当空白 PBCA 纳米微囊吸附相同浓度为的 BSA 溶液

时,其表面电势却增大为 -10 mV . 这表明 BSA 主要包裹在 PBCA 纳米微囊的内部,而不是简单吸附在微囊的表面.随着所吸附蛋白质浓度的增大,纳米微囊表面电势逐渐增加.当 BSA 浓度为 2.5 mg/mL 时,PBCA 纳米微囊表面电势逐渐增加为 $+15\text{ mV}$.这是因为 BSA 通过静电吸附在 PBCA 纳米微囊表面导致其表面电势增加为正电势.

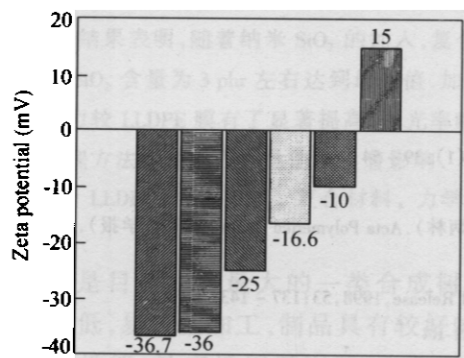


Fig. 3 Zeta potential of PBCA nanocapsules

From left to right: non-loading PBCA nanocapsules, BSA-loading PBCA nanocapsules (BSA concentration: 0.5 mg/mL), BSA-absorbed PBCA nanocapsules (BSA concentration: $0.10, 0.20, 0.50, 2.50\text{ mg/mL}$)

2.3 PBCA 纳米微囊的载药量和包裹率

从图 4 可以看出 BSA 可以有效的被包裹于 PBCA 纳米微囊中,并且包裹率和载药量取决于水相中 BSA 的初始浓度. BSA 浓度较低时,包裹率可以达到 90% 以上,随着蛋白质浓度增加,包裹率逐渐降低.当 BSA 浓度为 0.8 mg/mL 时,包裹率降低为 35%,并达到平衡.但同时实际载药量是随着蛋白质浓度的增大而增加.当水相中 BSA 的浓度 0.8 mg/mL 时,其载药量达到 $0.485 \times 10^{-9}\text{ mol/mg}$,并趋于平衡.这可能是当蛋白质浓度过高时,一部分 BSA 积聚于油水界面,这会对氰基丙烯酸丁酯单体起到阻聚作用,从而导致包裹率的下降和载药量无法进一步提高.

2.4 载 BSA 的 PBCA 纳米微囊的体外释放

分别采取 PBCA 纳米微囊包裹和表面吸附两种方式来运载 BSA.并在温度为 37°C 时, pH 为 7.4 的磷酸缓冲溶液中进行体外释放(图 5).结果表明采用表面吸附方式时,BSA 直接解吸进入缓冲液中,经过一个突释过程,并在 100 min 左右很快达到释放平衡.而当采用包裹形式时,由于 BSA 表面包裹了一层 PBCA 聚合物,在释放过程中首先发生 PBCA 聚合物链上的逆 Knovenagel 反应降

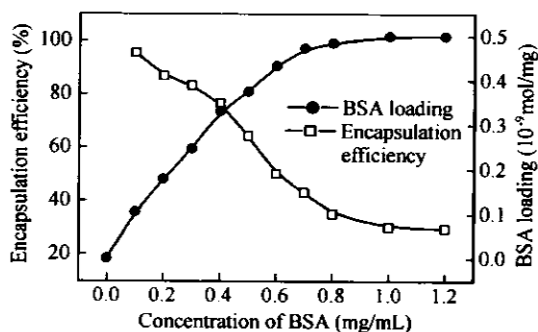


Fig. 4 Encapsulation efficiency and drug loading of BSA in PBCA nanocapsules

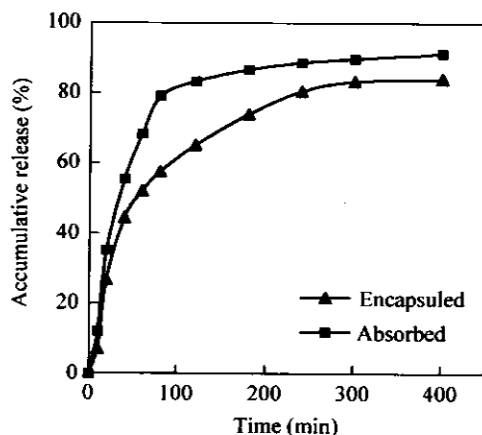


Fig. 5 Release of BSA from PBCA nanocapsules with different loading method

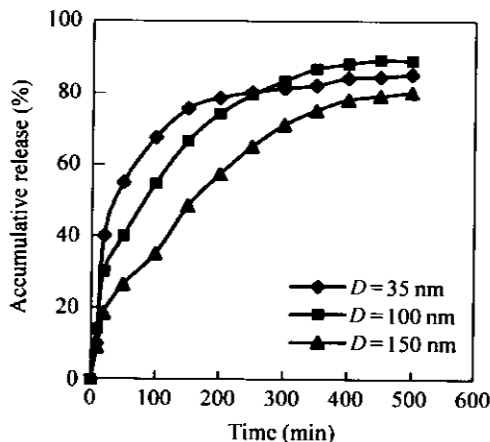


Fig. 6 Release of BSA from PBCA nanocapsules with different wall thickness

解^[10],然后将蛋白质释放出来,这样减缓了 BSA 的释放过程,将释放平衡时间延长到 350 min.同时包裹方式和表面吸附两者的累积释放率比较,前者要小一些,这可能是在制备过程中后者只是

简单的静电吸附,蛋白质损失不大的缘故。

通过只改变氰基丙烯酸丁酯的单体量而不改变其它条件制备了不同壁厚而囊心水核的大小不变的 PBCA 纳米微囊。不同壁厚的 PBCA 纳米微囊在 PBS 中的释放曲线图 6 所示。纳米微囊壁厚为 35 nm 时,壁厚很容易降解完毕,BSA 的释放会有一个突释 (Burst release) 现象。随着壁厚的增加,

PBCA 聚合物的降解时间增加,BSA 可以从囊壁降解而成的空隙中逐渐扩散释放,这样其释放的时间也逐渐延长,同时突释现象减缓。当壁厚为 150 nm 时,药物释放时间可以延长到 500 min。由此可见通过控制纳米微囊的壁厚,可以调节控制蛋白质的释放速率。

REFERENCES

- 1 Langer R. *Nature*, 1998, 392: 5 ~ 10
- 2 Hideki M, Masao K, Hirofumi T, Yoshiaki K. *Int J Pharm*, 1999, 187: 143 ~ 152
- 3 Takeuchi H, Yamamoto H, Kawashima Y. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001, 47(1): 39 ~ 54
- 4 Fresta M, Cavallaro G, Wehrli E, Puglisi G. *Biomater*, 1996, 17: 751 ~ 758
- 5 Feng Peng (冯鹏), Ma Jianbiao (马建标), Wang Yinong (王亦农), He Binglin (何炳林). *Acta Polymerica Sinica (高分子学报)*, 2000, (5): 620 ~ 625
- 6 Fattal E, Vauthier C, Aynie I, Nakada Y, Lambert G, Malvy C, Patrick C. *J Controlled Release*, 1998, 53: 137 ~ 143
- 7 Fessi H, Puisieux F, Devissaguet J P, Ammoury N, Benita S. *Int J Pharm*, 1989, 55: R1-R4
- 8 Quintaner-Guerrero D, Allemann E, Doelker E, Fessi H. *Pharm Res*, 1998, 15: 1056 ~ 1062
- 9 Vranckx H, Demoustier M, Deleers M. *Eur J Pharm Biopharm*, 1996, 42: 345 ~ 347
- 10 Lenaerts V, Couvreur P, Christiaens E, Joiris E, Roland M. *Biomater*, 1984, 5: 65 ~ 68

PREPARATION AND *IN VITRO* RELEASE OF POLY(BUTYL CYANOACRYLATE) NANOCAPSULES WITH AN AQUEOUS CORE CONTAINING BOVINE SERUM ALBUMIN

LI Sai, QIAN Zhiyong, LIU Xiaolei, LIU Xiaobo

(Chinese Academy of Sciences, Chengdu Institute of Organic Chemistry, Chengdu 610041)

Abstract Poly(butyl cyanoacrylate) (PBCA) nanocapsules with an aqueous core containing bovine serum albumin (BSA) were prepared by interfacial polymerization in a W/O emulsion. The nanocapsule sizes and their distribution were measured by laser scattering technique and transmission electron micrography. The change of Zeta potential, encapsulation efficiency, drug loading and *in vitro* release of nanocapsules were investigated using BSA as a model drug. The experimental results showed that nanocapsules were approximately 200 nm in diameters, 0.226 in polydispersity. Encapsulation efficiency and drug loading were depended on the initial BSA concentration in aqueous phase. When the concentration was 0.8 mg/mL, encapsulation efficiency and drug loading were 35% and 0.485×10^{-9} mol/mg of polymer. With the increase in the wall thickness of nanocapsules, the release time of BSA in PBS solution increased. The release rate could be controlled through adjusting the wall thickness of nanocapsules.

Key words Nanocapsules, Controlled release, Poly(butyl cyanoacrylate)