

• 实验研究 •

5—氟尿嘧啶磁性微球的制备及其性能的探讨

浙江医科大学(杭州, 310006) 彭道兴 吴阿富 吴光华 陈国璋 金学军*

提要 将5—氟尿嘧啶、牛血清白蛋白和磁性液体混合乳化, 在不同温度下固化, 然后制成粒径 $1\sim 2\mu\text{m}$ 的注射用磁性白蛋白微球(FMAM)。在体外 37°C 的吐温80的生理盐水中, 用各种不同固化温度的磁性微球进行释放试验, 结果表明: 微球制备的固化温度越高, 微球药物释放越缓慢。对磁性液体配比不同的微球药释试验结果表明, 磁性液体配比越高其释药越缓慢。另外, 还对磁性微球在不同磁感应强度下的磁应答性以及在小鼠体内皮下组织的分布情况作了初步研究。

关键词 磁性白蛋白微球; 磁性液体; 5—氟尿嘧啶。

目前肿瘤临床治疗的诸方法中, 如药物化疗, 由于药物进入体内后, 大多全身分布, 难以在肿瘤区保持药物的高浓度, 同时对机体毒性较大; 微波热疗法目前还存在着穿透力低, 集束性差等问题, 推广应用受到一定限制。本研究针对上述方法之不足, 提出磁导向微波—介质热疗和磁性微球化疗联合方法(简称联合方法), 即运用磁性药物微球, 以控制药物的靶向性, 并与微波、介质热疗联合作用, 具体地是通过牛血清白蛋白作为载体, 包埋高浓度抗肿瘤药物和磁性液体, 制成磁性白蛋白微球(FMAM), 在外磁场作用下, 把磁性微球导向肿瘤病灶, 缓释出药物, 再借助微波辐射作用于微球中的共振介质, 产生共振升温至 $42.5\sim 45.0^\circ\text{C}$, 使有效地杀死肿瘤细胞, 从而提高疗效。

Widder 等人用血清白蛋白、阿霉素、磁性液体制备磁性微球^[1-3], 陈琪等采用明胶、5-Fu、铁粉制成粒径在 $0.20\sim 1.0\text{mm}$ 的磁性微球^[4], 但未见有5-Fu牛血清白蛋白磁性微球的报道。5-Fu对肿瘤实体的透入性比阿霉素, 甲氨喋呤好^[5], 且白蛋白微球无毒, 生物降解性和生物相容性好以及抗原性小, 明显优于脂质体^[6,7], 本文以5-Fu、

牛血清白蛋白、磁性液体为原料, 用超声波乳化, 采用热固化方法制成粒径在 $1\sim 2\mu\text{m}$ 的磁性微球, 可供动脉注射之用, 并对其药物释放, 磁应答等有关性能进行探讨, 为联合方法提供依据。

试剂、仪器与材料

牛血清白蛋白(BSA) 中科院上海生物化学研究所产

棉籽油 杭州油脂公司提供

5—氟尿嘧啶 杭州华东制药厂提供

磁性液体 黑龙江化工研究所提供, 主要成份为 Fe_3O_4 , 17.5mg/ml

超声波发生器 功率250W 本溪市无线电一厂

牛角形磁铁 最大磁感应强度为1650 MT, 本校微波研究室提供

吐温—80 分析纯 浙江龙游化学试剂厂

紫外分光光度计 岛津UV-2000型

方法和结果

一、FMAM 的制备

按 Widder 等^[1-3,8]方法并加以改进(图

*系1990届浙江医科大学生物临床工程系毕业生曾参与部份药物释放工作

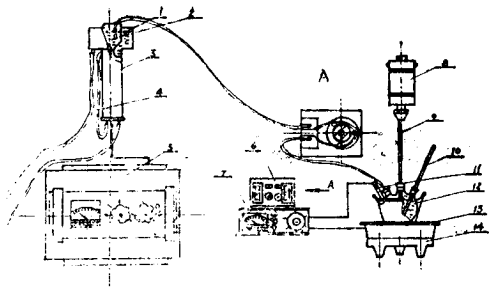


图1 磁性微球制备装置简图

- | | |
|-----------------|----------------|
| 1. 超声杯 | 8. 电机 |
| 2. 试样 | 9. 搅拌 |
| 3. 超声波发生器(250W) | 10. 温度计 |
| 附件 | |
| 4. 水管 | 11. 温度检测器(热电偶) |
| 5. 超声波发生器(250W) | 12. 三口烧瓶及试样 |
| 6. 蠕动泵 | 13. 石棉网 |
| 7. 温度指示控制器 | 14. 2000W电炉 |

1), 将5-Fu、 H_2O 、BSA和磁性液体用超声波混匀, 加棉籽油, 再用超声波匀化2分钟, 用蠕动泵恒速转入烧瓶中固化(内盛棉籽油, $145 \pm 2^\circ C$, 搅拌速度3000转/分), 10 min内加毕, 继续保持温度和转速10 min, 自然冷却至室温, 加乙醚, 摇匀, 转入塑杯里, 在强磁场中使FMAM沉积在杯底部, 弃去乙醚棉籽油液, 用乙醚洗除FMAM表面残留棉籽油, 最后将FMAM转移到试管里, 加乙醚, 摇匀, 于 $4^\circ C$ 左右保存。通过光镜和扫描电镜观察, FMAM呈球形, 大小匀称, 粒径在 $0.6 \sim 1.6 \mu m$ 之间, 符合注射要求(图2, 图3)。

分别改变固化温度, 在 $125 \pm 2^\circ C$, $165 \pm 2^\circ C$, 以同样的配比和方法制取FMAM待用。

另外, 改变上述配比中的磁性液体的用量, $75 \mu l$, $25 \mu l$, $10 \mu l$, 固化温度 $145 \pm 2^\circ C$, 以同样方法制取FMAM供释放用。

二、FMAM包药量测定

1. NaOH消解法^[4]

准确称取FMAM约0.04 g, 加9 ml含吐温80的生理盐水, 超声波混合均匀, 转入100 ml容量瓶里, 加0.1 mol/l NaOH 40 ml,

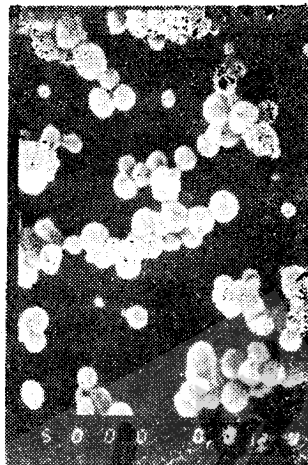


图2 FMAM在扫描电镜下的形态 $\times 5000$

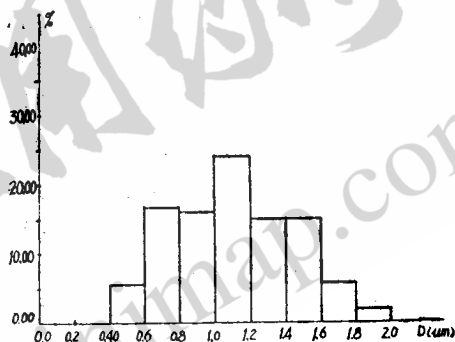


图3 5-Fu磁性微球粒径大小分布情况

(微球制备条件, $t = 145^\circ C$, 磁性液体 $50 \mu l$)

$$\bar{x} = 1.10 \mu m \quad S_x = 0.34 \mu m$$

$$n = 106$$

$$t = 1.984 (\text{选用 } f = 100)$$

$$P < 0.025 (\text{单侧})$$

$$D = 1.10 \pm 6.55 \times 10^{-2} (\mu m)$$

用不含5-Fu的磁性微球作对照, 一起置放在恒温振荡器上, 频率200/min, 温度 $42.0^\circ C$, 时间30 min。取出, 加0.1 mol/l NaOH至刻度, 摇匀, 取10 ml在强磁场中分离, 吸取上层清液4 ml于25 ml容量瓶里, 用0.1 mol/l HCl稀释至刻度, 静置, 用紫外分光光度计测定5-Fu含量, 于265 nm处测其光密度, 得包药量为投入药量的 $58.69 \pm 0.98\%$

2. 超声波法

准确称取FMAM约0.03 g, 加10 ml含吐温80的生理盐水, 用强超声波处理80 min,

经磁场分离后吸取清液，用紫外分光光度计测定其 5-Fu 含量，在 265 nm 处测定其光密度，计算包药量为 $58.23 \pm 0.29\%$ ，继续用超声波处理 140 min，测定 5-Fu 含量值恒定。

三、FMAM 的体外药物释放

取样品（含药量已知），加 10 ml 0.1% 吐温 80 生理盐水混合均匀，转到 25 ml 梨形烧瓶里，在强磁场中分离，吸取上层清液，保存待测即为微球表面吸着量，再加 15 ml 0.1% 吐温 80 生理盐水，置烧瓶于 37℃ 恒温水浴器中，搅拌的转速为 500 转/分，定时取出，置磁场中分离，每次吸取上层清液 5 ml 后，

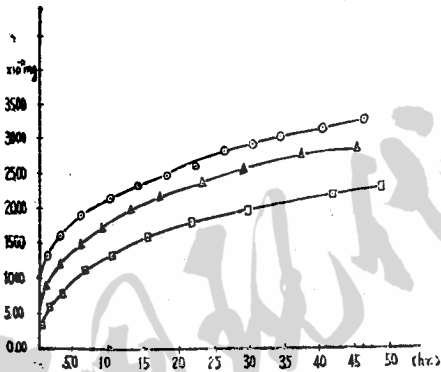


图 4 不同固化温度的磁性微球的 5-Fu 释放情况

○、△、□ 分别为 125℃，145℃，165℃。

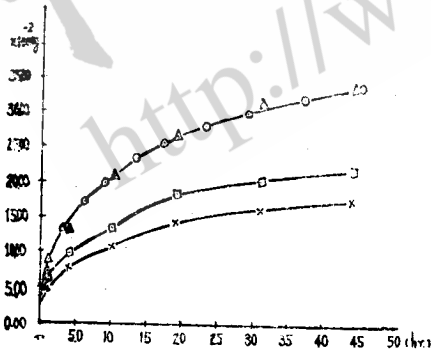


图 5 磁性液体含量不同的磁性微球的 5-Fu 释放情况

○、△、□、X 分别表示含 10 µl，25 µl，50 µl 和 75 µl 的磁性液体的 FMAM。

重新补充 5 ml 吐温 80 生理盐水，重复操作，用不含 5-Fu 的 FMAM 样品作对照。吸取的释放药液用紫外分光光度计测定其含量，于 265 nm 处测定光密度，在测定条件下 ($\text{pH} = 6.7$) $\text{C}_4\text{H}_3\text{O}_2\text{NF}$ 的百分吸收系数为 522，从而计算出 5-Fu 的累积释药量。结果见图 4、图 5。

四、FMAM 的体外磁应答实验

按图 6 装置，将 FMAM 悬浮于吐温 80

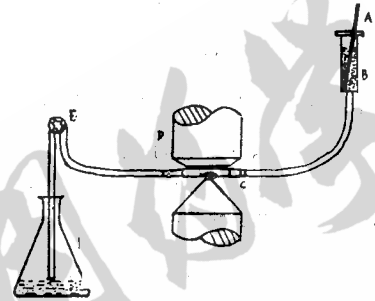


图 6 5-Fu 磁性微球磁应答试验示意图

A: 玻棒 D: 磁场
B: FMAM 溶液 E: 蠕动泵
C: 玻管 F: 收集器

生理盐水中，吸取 25 ml 加入 B 容器里，启动蠕动泵 E，调节所需档速，使 FMAM 溶液随导管缓缓通过磁场 D 处的玻管 C（水平装置，中心点的内径 $\phi = 0.386 \text{ cm}$ ，外径 = 0.608 cm ，玻管长 7.0 cm ），未被磁场截留的 FMAM 随溶液被收集在 F 里。分别改变蠕动泵速度档速和磁场 D 的磁感应强度，用 721 型分光光度计，选用 500—700 nm 波长范围内任一值**，测定每一档速收集液的光密度值，按 $(1 - \frac{A_x}{A_0}) \times 100\%$ 式计算， A_0 、 A_x 分

别为未通过磁场和通过磁场后的光密度值，求得 FMAM 悬浊液被磁场截留的百分率（图 7）。当流速为 0.02 cm/sec ，磁感应强度从 400 MT 增到 850 MT 时，FMAM 的截留量从 33% 增到 47.62%；若流速为 0.4 cm/sec ，磁感应强度从 400 MT 增到 850 MT 时，FMAM 的截留量从 6.02% 增到 22.62%

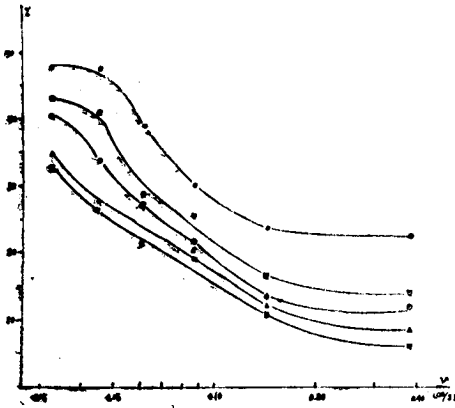


图7 磁性微球的截留量与磁感应强度、流速的关系

●, □, ○, ▲, ■分别表示磁感应强度为
850 MT, 700 MT, 600 MT, 500 MT, 400 MT

五、FMAM在小鼠皮下结缔组织中分布情况

在FMAM中加入吐温80生理盐水10 ml,用超声波混匀后,吸取1 ml悬浊液,立即注入小白鼠尾部皮下组织里,0.5 h后处死,经切片处理,在光镜下观察结果见图8。

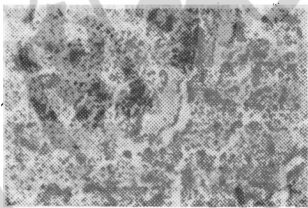


图8 FMAM在小白鼠皮下组织分布情况×1000(油镜)

黑点为淋巴细胞,灰黑色为FMAM,
大黑点可能是吞噬细胞

讨 论

1. 将FMAM配制成吐温80生理盐水悬浊液,注射到小鼠尾静脉,在心、肺、脾、肝和肾等器官中,都能检测到FMAM,没有发现滞留和栓塞现象。实验发现,当超声波功率恒定时,超声匀化的时间对FMAM粒

径大小和匀称性的影响与搅拌速度对粒径大小的影响是一致的^[2,7]。

2. FMAM含药量测定我们选用两种方法,一种是根据文献^[4]加以改进,另一种是利用强超声波破坏FMAM的结构,游离出5-Fu。经测定,两种方法其结果基本一致。包药量前者为 $58.69\% \pm 0.9$,后者为 $58.23\% \pm 0.29$ 。平均值为 $58.41\% \pm 0.9$ 。该值是指经过2 min超声波预处理后,包埋在微球内部的药量和表面吸着量的总和(见表1)。

表1 FMAM包药量的测定结果*

序号	%	平均值(%)	变异系数(%)
1	57.71	58.69±0.98	1.5
2	59.68		
3	57.83	58.12±0.29	
4	58.41		

*注:该值包括经超声波处理2 min后微球表面吸附药量的测定值。

3. 据Willmott等认为,磁性微球药物释放的主要模式是药物从被包埋的白蛋白网络中快速渗透,而与白蛋白的降解无关^[6,9],本实验结果表明,FMAM的释药量与固化温度有密切关系,即固化温度高,释药量小,固化温度低,释药量大,Senyei指出,在 100°C 以上,白蛋白网络能发生交联作用^[10],我们认为,若温度继续升高,有可能使白蛋白网络结构的交联作用更趋紧密,从而使被包埋的5-Fu渗透更为缓慢,提示高温固化能延缓FMAM的药物释放。

4. 微球中磁性液体的配比对其药物释放为含量越高,释药量越小,含量越低,释药量越大。原因是磁性液体被包埋后,微球表面孔径减少,球内管道迂迴弯曲增加^[3]。

5. 磁性微球通过磁场后,其截留量与磁感应强度、流速有密切关系^[10],本实验微球流速为 0.02 cm/sec (接近人体微血管流速),磁感应强度850 MT时,FMAM的截留率为47%,可能是微球粒径太小, Fe_3O_4

含量低之故,为此,还需继续提高磁感应强度,或增大磁性液体的配比,使FMAM能极大地被定位在靶区。

6. 经光镜观察发现,FMAM在小鼠皮下结缔组织里,并不形成结缔组织包绕着的被膜,说明微球进入体内不引起很大的反应,但可见到有淋巴细胞集聚和巨噬细胞吞噬现象[图8]。

7. 实验中FMAM与溶剂分离是在牛角形永磁铁磁场中进行,比传统离心法有节省溶剂、效果好以及减少溶剂对环境污染等优点。

8. FMAM目前研究尚属起步阶段,有关体内磁应答情况,微球中的共振介质接受微波辐射能产生共振升温情况如何,还需有待深入研究。

致谢 组织学观察承本校组织胚胎教研室魏天德副教授指导

** FMAM吐温80的生理盐水在波长400—700 nm

范围内不同浓度随波长变化其吸收曲线几乎呈平行线性关系。

参 考 文 献

- [1] Widder K et al., *Flouret G, Senyei A*, *J pharm Sci* 1979, 68(1) 79~81.
- [2] Gallo J. M et al., *International J pharmacaceutics* 1984, (22) 63~74
- [3] Gupta P. K et al., *International J pharmacaceutics* 1989, 43 167~177
- [4] 陈琪等, *中国药理学报* 1983, 4(4):273~276
- [5] Willmott N et al., *Biopharmaceutics & drug Disposition*. 1986, 6:91~104
- [6] Willmott N et al., *international J pharmacaceutics* 1988, 43:161~166
- [7] Widder K J et al, *Adv pharmacol chemoth* 1979, (6)213~217
- [8] 陈国神等, *现代应用药学* 1987, (1)27
- [9] Miyazaki S et al., *J. pharm pharmacol*. 1986, 38:618~620
- [10] Senyei A et al., *Appl. phys.* 1978, 49 (6):3578~3583

Studies on Preparation of the 5-Fluorouracil Magnetic Albumin Microspheres and Its Characteristics

Peng Daoxing et al

(Zhejiang Medical University, Hangchow, 310006)

Abstract

The 5-Fluorouracil Magnetic Albumin Microspheres (FMAM) were prepared by emulsification of 5-Fluorouracil (5-Fu), Albumin and Magnetic fluid and solidification at different temperatures. The dimeters of $1\mu\text{m}\sim 2\mu\text{m}$ FMAM used for arterial injection had also been prepared at different temperatures. The release of 5-Fu from FMAM in 0.1% Tween 80-saline solution was studied at 37°C in vitro. The result showed that the higher temperature of solidification of FMAM, the slower 5-Fu releases, and the higher amount of magnetic fluid in FMAM, the slower 5-Fu releases, too.

Key words Magnetic Albumin Microsphere; Magnetic fluid; 5-Fu.