

细胞松弛素 B 毫微粒和微粒的制备与评价

朱振峰 杨 菁 孙洪范 冷希岗 宋存先 王彭延(天津 300192 中国医学科学院,中国协和医科大学,生物工程研究所)

摘要 以可生物降解的聚乳酸——聚乙醇酸共聚物(PLGA)和聚 L-乳酸(PLLA)为载体,采用乳化——溶剂挥发法制备含细胞松弛素 B(cyto B)的毫微粒和微粒,其粒度分别为 150nm,500nm,1 μ m,5 μ m,10 μ m 和 20 μ m。体外释放实验证明,可通过选择适当的基质材料和粒子大小达到所期望的药物释放过程。

关键词 细胞松弛素 B;毫微粒;微粒

Preparation and evaluation of cytochalasin B nano/microparticles

Zhu Zhenfeng(Zhu ZF), Yang Jing(Yang J), Sun Hongfan(Sun HF), *et al* Institute of Biomedical Engineering, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300192)

ABSTRACT By an emulsification/solvent evaporation technique, biodegradable poly(lactic - coglycolic acid) (PLGA) and poly(L - lactic acid(PLLA) were used as carrier to form nanoparticles and microspheres loading cytochalasin B. The particles were characterized by particle size, morphology and in vitro drug release. Their graded diameters were 150nm, 500nm, 1 μ m, 5 μ m, 10 μ m and 20 μ m, respectively. The results of in vitro release demonstrated that the desired release profile could be achieved by properly selecting the matrix material and particle size.

KEY WORDS cytochalasin B, nanoparticle, microsphere

微粒(microparticles)作为一种药物控释系统的载体,可用于某些特定部位的局部给药,达到较高的局部药物浓度,而全身药物浓度较低,从而起到增效减毒的作用,目前受到极大重视。可生物降解的聚合物微粒包括:微球、微囊、毫微粒及脂质体。它们能在水中悬浮,以流体形式应用,这就为利用导管介入血管内灌注药物局部治疗血管再狭窄提供了可能性^[1]。细胞松弛素 B(cytochalasin B, cytoB)为一抗平滑肌细胞增生药物,在动物模型中能有效地预防再狭窄。本文的目的是以 cytoB 为模型药物,研究可生物降解的毫微粒和微

粒中药物释放的影响因素,为血管内部治疗再狭窄提供理论基础。

1 材料和仪器

聚乳酸-聚乙醇酸共聚物(PLGA)50:50 和聚 L-乳酸(PLLA)(美国 Birmingham Polymers 公司);聚乙烯醇(PVA Mr:30000~70000)和 cytoB(美国 Sigma 公司);所用的有机溶剂均为色谱纯或分析纯。

激光粒度测定仪(美国 Nicomp 公司,型号 370);扫描电镜(日本 Hitachi 公司,型号 S570);HPLC 仪(美国 Waters 公司)。

2 实验方法

2.1 粒子的制备

采用乳化-溶剂挥发法^[2]制备含载 cytoB 的微粒。聚合物和 cytoB 分别溶在二氯甲烷和丙酮中,这两种有机溶液按 8:2 的容积比混合后,加入到 PVA 的水溶液中,通过超声或匀浆化过程即形成水包油型的乳液,在常压下搅拌挥发有机溶剂,固化的微粒可通过离心收集,用蒸馏水洗 3 遍除掉粒子表面 PVA 和没有包封进的药物,最后冷冻干燥。

2.2 粒子的表征

2.2.1 粒子大小的分布:直径小于 1000nm 的毫微粒在水中悬浮后,用激光粒度仪测定;微粒的大小用光学显微镜依据 40 计数板测定。

2.2.2 表面形态:冻干的粒子铺在铝箔的粘性表面,粒子的表面涂金后,即可在扫描电镜下观察粒子形态。

2.2.3 粒子中的药物含量:取每批制备的粒子 4~5mg 作为样品,溶在 1ml 氯仿中,然后加入 9ml 乙醇沉淀聚合物,用 HPLC 仪测定上清中 cytoB 的含量。HPLC 仪测定 cytoB 的条件如下:色谱柱:3.9×300nm, Bondapak

表 1 乳化-溶剂挥发法制备不同粒径的 PLGA 微粒

样品号	PLGA(% ,w/v)	PVA(% ,w/v)	乳化过程的能源	期望粒径	实测粒径($\bar{x} \pm s$)	cytoB 含量(%)	包封效率(%)
NP-1	3.0	2.5	超声仪/55w	150nm	177±45nm	13.6	77.7
NP-2	3.0	1.0	超声仪/55w	500nm	585±298nm	13.9	79.4
MS-1	3.0	2.5	匀浆器/	1 μ m	1.5±0.5 μ m	10.0	78.6
			3000r/min		5.4±2.5 μ m	16.6	
MS-2	6.0	2.5	匀浆器/	10 μ m	10.3±2.8 μ m	18.2	104
			3000r/min				
MS-3	3.0	2.5	震荡器/最大	20 μ m	18.7±4.4 μ m	15.3	87.4

注:批号为 MS-1 的样品通过梯度离心进一步分成不同粒径的两部分,第一部分(1.5±0.5 μ m)在 1000~5000r/min 的转速下收集,第二部分(5.4±2.5 μ m)在 400~1000r/min 的转速下收集

采用超声乳化可得到粒度 150~500nm 的毫微粒,而一般的匀浆乳化制备的粒子粒度较大。55w 的高能量超声乳化可产生平均粒度 150nm 的毫微粒,用匀浆器以 3000r/min 进行乳化时,粒子的粒度为 1~5 μ m,震荡乳化时,粒子粒度为 20 μ m。制备 150nm、5 μ m 和 20 μ m 的粒子时,除乳化过程所用的能源不同外,其它条件都完全一样。提示制备微粒时,通过选择乳化过程的能源可调节粒子的大小分布。PLGA 溶液的浓度对粒子大小也有显著影响。例如,在用同样的能源进行搅拌乳化时,PLGA 浓度从 3%增至 6%,所制备粒子的平均粒度从 5 μ m 增至 10 μ m。本实验中,PVA 溶液对粒子大小似乎没有显著影响。但用低浓度(1%)的 PVA 时,所制备的粒子粒度分布范围较宽,因此,本文

125A 10,m C-18,流动相:乙腈-水-四氢呋喃(50:50:0.05),流速:1.0ml/min,紫外检测波长:215nm,保留时间:6.70min。

2.3 体外药物释放

粒子中 cytoB 的体外释放研究在 37℃ 的模拟生理条件下进行。取 5mg 样品,用 5ml 磷酸缓冲液(0.5mol/L,pH 7.4)悬浮,然后转入双腔透析池的一侧,用 0.1 μ m Millipore(Type VV, Bedford, MA)膜与接收池隔开,定时用新鲜缓冲液更换接收池的缓冲液,从接收池收集到的样品可直接用 HPLC 测定其中的 cytoB 水平。

3 结果与讨论

3.1 毫微粒和微粒的制备

制备毫微粒和微粒的方法有多种,可依据所需产品的特点而选用不同的方法。本文采用乳化-溶剂挥发法制备含载 cytoB 的毫微粒(NPs)和微粒(MSs),得到了 5 种粒度的 PLGA 微粒产品。在制备过程中,通过选择 PLGA 在有机相中的浓度、水相中 PVA 的浓度、乳化过程中所采用的能源(见表 1)等,可获得所期望粒度的粒子。

多采用 2.5% 的 PVA 溶液作为水包油型乳液的水相。用激光粒度仪测定 150nm 毫微粒的粒度分布情况如图 1 所示,粒度在 150~200nm 范围内的毫微粒占 80%以上,平均粒度为 177±45nm。用扫描电镜观察毫微粒的形态,结果如图 2 所示,毫微粒呈典型的球型,大小均匀,表面光滑。各种微粒 cytoB 的含量及包封效率见表 1。根据制备时的配方和粒子大小不同,含药量可在 10%~18% 范围内有所变动。各种粒子的包封效率都较高,粒子越小,包封效率越低。

3.2 PLGA 粒子的体外药物释放

本文中各种尺寸的 PLGA 粒子在体外的药物释放过程如图 3 所示,均呈现出早期的突释相,第一天 cytoB 的释放量可达 10%~50%,具体情况是,24h 内 150nm

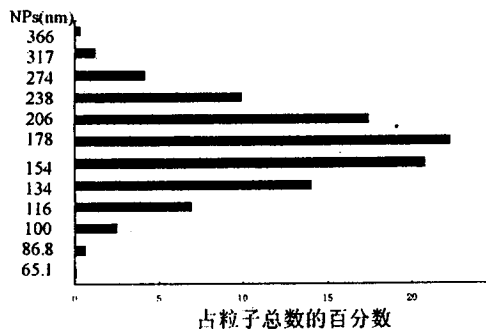


图1 150nm PLGA 毫微粒的大小分布

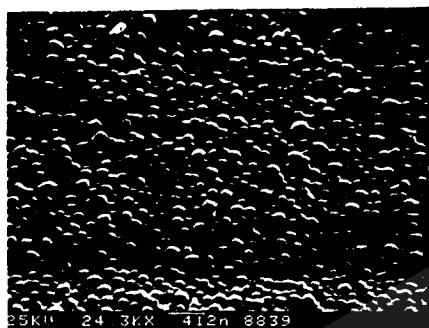


图2 扫描电镜下 PLGA 毫微粒的形态

毫微粒的体外药物释放量约在 50% 以上,而 20 μ m 微粒的释放量只有 10%。各种尺寸的粒子都能维持一定时间的缓释效应,直径为 150nm 的毫微粒,在 2 周内的药物释放量高达 85%,而 20 μ m 的微粒,在 40d 内,只有 60% 的药物释放出来。尺寸在这两者之间的粒子,随着粒度的增加,释药速率逐渐降低。各种粒子早期突释及随后的释药速率的不同,可能与粒子的表面积有关。结果提示,可通过选择粒子的大小来控制药物释放的快慢。但是,对于一些特殊的用途,如血管内局部给药,粒子大小对于动脉吸收载药粒子是非常重要的。有作者报道^[3,4],与粒度较大的微粒相比,超微小的毫微粒(100~150nm)能更有效地进入动脉壁内。也有作者的研究证明^[2],只有小于 200nm 的毫微粒,在动脉壁内才能达到足够高的水平。所以,改善药物的释放过程,即减少早期的突释效应和维持长期的释放过程,是胶体药物输送系统领域面临的巨大挑战。

3.3 用 PLLA 作为基质材料的毫微粒

由可生物降解的聚丙交酯和聚内酯所制备的毫微粒和微粒的药物释放机理主要是表面扩散和聚合物的侵蚀^[5]。粒子的大小和聚合物的物理和化学特性,如可生物降解性、晶体性、亲水性、分子量等是控制粒子中药物释放的主要因素。为改善 cytoB 从毫微粒中的释放过程,本文做了以 PLLA 为基质材料的研究。PLLA NPs 的制备方法与 PLGA NPs 的制备方法相同,得到的结果也相类似,粒度在 150nm 左右, cytoB 的含

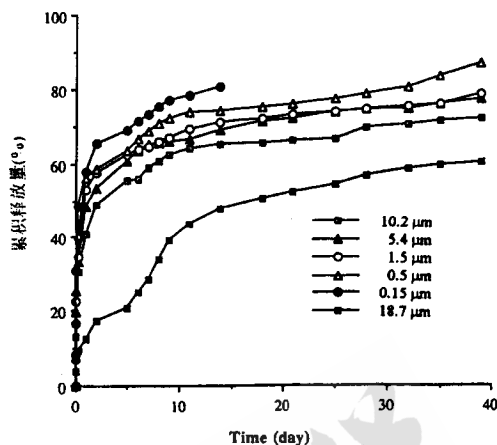


图3 PLGA 粒子中 cytoB 的体外释放

量为 14%。cytoB 从 PLLA NPs 释放的研究方法也与 PLGA NPs 的研究方法相同。体外 cytoB 从 PLLA NPs 的典型释放过程见图 4。结果证明,对于同样粒度的毫微粒,PLLA NPs 的早期突释效应比 PLGA NPs 的突释效应低得多,第一天从 PLLA NPs 的释放量只有 30% 左右,而从 PLGA NPs 的释放量达 50% 以上,PLLA NPs 的释放过程长达 110d 左右,实验最后,含载的 cytoB 几乎全部释放出来。

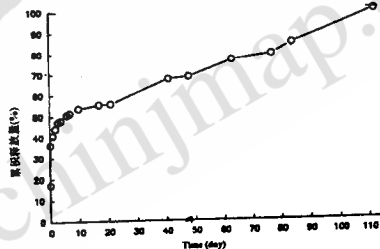


图4 PLLA 毫微粒中 cytoB 的体外释放

目前, FDA 仅批准聚 dl-乳酸(PLA)和 PLGA 为可在临床应用的可生物降解的聚合物。PLLA 是 dl-PLA 的全同立构形式,由于其不对称碳原子形成的有规则的构象, PLLA 具有高度的结晶性和低生物降解性的特点^[6],这些特点可能是造成 PLLA NPs 较低的突释效应和较长时间的缓释效应的原因。毫微粒用于血管内给药,需要较小的粒度和较长时间的缓释过程。所以, PLLA 更适于用作该系统的载体。相比之下, PLGA 具有无定型和非结晶的性质,这使得 PLGA 更适于用作制备需短期应用的毫微粒。结果证明,用不同材料制备的毫微粒具有不同的药物释放行为,通过选择适当的基质材料可达到所期望的释放过程。本文的结论是,在制备毫微粒和微粒时,可通过选择聚合物和调节粒子的粒度来控制药的释放。

致谢:该课题由国家自然科学基金和中国医学科学院资助。部分工作在美国密执安大学 Levy 教授的实

实验室完成,在此一并表示感谢。

参考文献

- 1 Labhasetwar V, Song Cx, Levy R. Nanoparticle drug delivery system for restenosis. *Adv Drug Delivery Rew*, 1997, 24: 63.
- 2 Song CX, Labhasetwar V, Murphy H, *et al*. Formulation and characterization of biodegradable nanoparticles for intravascular local drug delivery. *J Control Release*, 1997, 43: 197.
- 3 Wilensky RL, Maark KL, Hathaway DR. Direct interarterial wall injection of microparticles via a catheter: a potential drug delivery strategy following angioplasty. *Am Heart J*, 1991, 122: 1136.
- 4 Rome JJ, Shayani V, Flugelman MY, *et al*. Anatomic barrier influence the distribution of in vivo gene transfer into the arterial wall. Modeling with the microscopic tracer particles and verification with a recombinant adenoviral vector. *Arterioscler Thromb*, 1994, 14: 148.
- 5 Claes L. Requirements on resorbable implant materials. In: Heimke G, Soltesz U, Lee AJ, *et al*. *Clinical Implant Materials, Advances in Biomaterials*. Vol 9. ed 1. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1990: 161.
- 6 DeLuca PP, Mehta RC, Hausberger AG, *et al*. ACS symposium series 520. In: El - Nokaly MA, Piatt DM, Charpentier BA, ed. *Polymeric delivery systems properties and application*. Washington DC, 1993: 53.