

卡铂碳包铁纳米壳聚糖微球的制备和特征

鲍世韵^{1,2}, 李富荣², 郭跃华^{1,2}, 韩涛³, 周汉新² (1. 华中科技大学同济医学院附属协和医院肝胆外科, 武汉 430022; 2. 暨南大学第二临床医学院深圳市人民医院临床医学研究中心, 广东 深圳 518020; 3. 暨南大学化学学院, 广州 510632)

摘要:目的 制备卡铂碳包铁纳米壳聚糖微球,检测其性能,并与卡铂纯铁纳米壳聚糖微球进行比较。方法 以吸附药物的碳包铁纳米磁粉为磁性内核,壳聚糖为基质,卡铂为负载药物,采用反相微乳法制备卡铂碳包铁纳米壳聚糖微球。卡铂纯铁纳米壳聚糖微球的制备方法相似,不同的是以无吸附药物能力的纯铁纳米磁粉为磁性内核。检测和比较两种纳米药物微球的形态、粒径、磁响应性、载药量、包封率和体外释药。结果 两种药物微球的球形圆整,平均粒径(210 ± 26) nm,粒径分布 150 ~ 300 nm,磁响应性强。碳包铁纳米微球的载药量(11.15 ± 1.03)%,纯铁纳米微球载药量(9.21 ± 1.10)%。碳包铁纳米微球 1, 2, 3, 4 d 的体外释药量分别为 60%、74%、84%、92%;纯铁纳米微球 1, 2 d 的释药量分别为 81%、91%。结论 通过活性炭吸附和物理基质包裹双重物理机制载药载药的卡铂碳包铁纳米壳聚糖微球不但载药量高,而且释药速度平稳。多重机制的有机结合是优化纳米微球性能的有效方法。

关键词: 双重机制; 物理包裹; 活性炭吸附; 磁性; 纳米微球; 壳聚糖; 卡铂

中图分类号: R943.41 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2006)06-0467-03

Preparation and characteristics of carboplatin-Fe@C-loaded chitosan nanoparticles with dual physically loading-drug mechanisms

BAO Shi-yun^{1,2}, LI Fu-rong², GUO Yue-hua^{1,2}, HAN Tao³, ZHOU Han-xin² (1. Department of Hepatobiliary Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China; 2. Clinical Medical Research Center, Jinan University 2nd Clinical Medicine College (Shenzhen People's Hospital), Shenzhen 518020, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE The aim of the present work was to set up the optimal carboplatin-Fe@C-loaded chitosan nanoparticles method, compare and assess the carboplatin-Fe@C-loaded with the carboplatin-Fe-loaded chitosan nanoparticles. **METHODS** The carboplatin-Fe@C-loaded chitosan nanoparticles was prepared by reverse microemulsion method. The prepared nanoparticles consisted of Fe@C nanopowder absorbed with drug as magnetic core, chitosan as matrix and carboplatin as model drug. The preparation of the carboplatin-Fe-loaded chitosan nanoparticles was similar. It was the difference that pure iron nanopowder which is unable to adsorb drug replaced of Fe@C nanopowder as the core. The shape, size, magnetic responsivity, drug content, encapsulation efficiency and drug release in vitro of the two kinds of nanoparticles were determined and compared. **RESULTS** The two kinds of nanoparticles exhibited fairly smooth and spherical in shape with average size of $210 \text{ nm} \pm 26 \text{ nm}$ (size range of 150 nm-300 nm) and good magnetic responsivity. The drug content of carboplatin-Fe@C-loaded chitosan nanoparticles reached (11.15 ± 1.03)%, that of carboplatin-Fe-loaded chitosan nanoparticles (9.21 ± 1.10)%. The cumulative release percent of the carboplatin-Fe@C-loaded chitosan nanoparticles in vitro in 1 d, 2 d, 3 d, 4 d were 60%, 74%, 84%, 92%, respectively. On the contrast, those of carboplatin-Fe-loaded chitosan nanoparticles in 1 d, 2 d were 81%, 91%. **CONCLUSION** The carboplatin-Fe@C-loaded chitosan nanoparticles with dual physical drug-loaded mechanisms (physical encapsulation and adsorption of active carbon) possessed higher drug content and more sustained drug releasing. Thus, the cooperation of multi-mechanisms was a promising orientation to improve the properties of nanoparticles.

KEY WORDS: dual mechanisms; physically encapsulation; adsorption of active carbon; magnetic; nanoparticles; chitosan; carboplatin

磁靶向纳米药物微球能使化疗药物获得靶向性和控释性,正成为肿瘤化疗的研究热点。磁性内核是微球的关键组

分。碳包铁(简称为 Fe@C)纳米磁粉由中心的纯铁和外层的多孔活性炭构成。本研究以碳包铁纳米磁粉为磁性内核,

基金项目:广东省自然科学基金(NO.04006966);广东省名医工程研究项目;深圳市科技计划项目(NO.2002-K3-121)

作者简介:鲍世韵(1962-),男,在读博士,主任医师,从事纳米靶向药物和肝癌治疗研究,E-mail: baom94@yahoo.com.cn,联系地址:深圳市人民医院 临床医学研究中心(邮编:518020)。

* 通讯作者:周汉新,男,教授,从事纳米医药研究,E-mail: hxzhou55@yahoo.com.cn,联系地址:深圳市人民医院临床医学研究中心(邮编:518020)。

壳聚糖为基质,采用反相微乳法,通过基质包裹和活性碳吸附双重物理机制负载卡铂,制备卡铂 Fe@C 纳米壳聚糖微球,检测微球的各项性能,并与卡铂纯铁纳米壳聚糖微球进行比较。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

Fe@C 纳米磁粉(平均粒径 25 nm,粒径范围 0~50 nm,铁含量 89.6%,比表面积:40~60 m²/g,深圳市尊业纳米材料有限公司),纯铁纳米磁粉(平均粒径 25 nm,粒径范围 0~50 nm,铁含量 99.9%,比表面积:40~60 m²/g,深圳市尊业纳米材料有限公司),卡铂(纯度>99%,齐鲁制药厂),壳聚糖(脱乙酰度 95%,济南海得贝海洋生物工程有限公司),表面活性剂气溶胶 OT(AOT,浙江嘉善巨枫化工厂),透析袋(M.W. cutoff 8000-12000),其他试剂均为市售分析纯。

1.2 仪器与设备

荷兰 PHILIPS 公司 TECNAI-10 型透射电子显微镜,德国 Brook Haven Instruments 公司 BT-2002 型激光粒度仪,德国 Bruker 公司 EQUINOX-55 型红外吸收光谱仪 FT-IR,福建新大陆生物技术有限公司 722s 型分光光度计,德国 SARTORIUS 公司 BP211D 型电子分析天平。

1.3 Fe@C 纳米磁粉对卡铂的吸附和脱附作用

1.3.1 卡铂标准曲线的绘制 采用络合分光光度法测定卡铂浓度^[1]。在 0~100 μg/mL 间精密配制 10 个浓度梯度的卡铂对照品溶液,取 1 mL 卡铂溶液,加入 1.5 mL 含 SnCl₄ (1.0 mol/L) 的 1.0 mol/L 盐酸溶液,室温下避光反应 50 min,测定 398 nm 处吸光度,以其为纵坐标,卡铂浓度为横坐标作图,拟合回归方程。Y=0.008X+0.0104, R²=0.9993。

1.3.2 吸附和脱附作用

取 Fe@C 纳米磁粉 50 mg,浸入 10 mL 浓度为 20 mg/mL (C₀) 的卡铂饱和水溶液中,超声分散,室温下吸附 24 h,磁分离后取上清液测卡铂水溶液浓度 (C₁),吸附量=(C₀-C₁)×10 mL/50 mg。测定 Fe@C 纳米磁粉、卡铂和吸附卡铂的 Fe@C 纳米磁粉的红外吸收光谱。

将吸附有卡铂的 Fe@C 纳米磁粉 50 mg 浸入 10 mL 蒸馏水中,室温下置于水平摇床上,100 r/min,于定时间点磁分离后取上清液测卡铂浓度,计算释放量,并且更换蒸馏水。

1.4 卡铂 Fe@C 纳米壳聚糖微球的制备

将 50 mg Fe@C 纳米磁粉在卡铂饱和水溶液中浸泡 24 h,磁分离后加入到 5 mL 溶解壳聚糖 (50 mg) 和卡铂 (150 mg) 的 3% 醋酸水溶液,混匀,超声分散后,加入 500 μL 预交联剂 10% 戊二醛溶液,构成水相,50 mL 溶解 20 g AOT 的甲苯为油相。在超声和搅拌 (2000 r/min) 下,将水相逐滴加入油相,形成微乳液,0.5 h 后向微乳液中加入 5 mL 交联剂 50% 戊二醛溶液,维持搅拌,交联固化 5 h,用无水乙醇和蒸馏水反复清洗 5 遍,冷冻干燥得卡铂 Fe@C 纳米壳聚糖微球。

卡铂纯铁纳米壳聚糖微球的制备方法基本相同,只是用纯铁纳米磁粉代替 Fe@C 纳米磁粉,不需浸泡吸附,直接加入到溶解壳聚糖和卡铂的乙酸溶液。

1.5 纳米药物微球的形状和粒径

用透射电子显微镜观察 Fe@C 纳米磁粉和纳米药物微球的形状,激光粒径分析仪测其粒径分布。

1.6 纳米药物微球的载药量和包封率

1.6.1 载药量的测定 取纳米药物微球 10 mg,浸入 10 mL 1 mol/L 盐酸溶液,超声分散,静置 8 h,离心和磁分离,取上清液,并经 0.22 μm 滤膜过滤,以同法处理的空白纳米微球为对照,测定卡铂浓度,根据公式计算载药量。

载药量=微球中卡铂含量/微球总质量×100%。

1.6.2 包封率的测定 取纳米药物微球 10 mg,超声分散于 10 mL 蒸馏水后,即刻离心和磁分离,测定蒸馏水中卡铂浓度,乘以体积得未包封的药量。

包封率=(1-未包封的药量/微球的总药量)×100%

1.7 纳米药物微球的磁响应性

采用沉降法检测纳米药物微球对磁场的响应性。取 10 mg 纳米药物微球超声分散在 20 mL 蒸馏水中,在强度为 1 T 的磁场中或无磁场自然重力沉降状态中,2.5 cm 沉降距离内,于即定时间点,取上层液在波长 500 nm 处测定透光率。

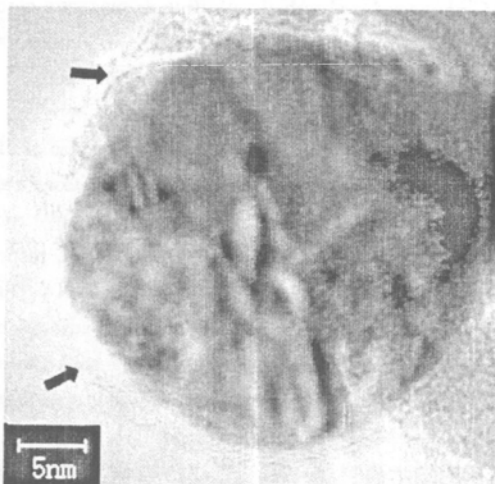
1.8 纳米药物微球的体外释药

取纳米药物微球 50 mg (或相当质量的卡铂标准品为对照),超声分散于 5 mL 蒸馏水中,装入透析袋,将透析袋放入装有 95 mL 蒸馏水的锥形瓶中,置于恒温 (37℃) 水平摇床上,转速 100 r/min,于定时间点取 1 mL 溶液,测卡铂浓度,计算累积释放量,并补充 1 mL 蒸馏水。

2 结果

2.1 Fe@C 纳米磁粉对卡铂的吸附和脱附作用

Fe@C 纳米磁粉的核心为纯铁,铁纯度为 99.9%,外层包裹活性碳。Fe@C 纳米磁粉对卡铂的吸附量为 5.3%,24 h 脱附量为 86%。见图 1。



Fe@C 纳米磁粉 TEM 照片

Fig 1 TEM of Fe@C nanopowder

2.2 纳米药物微球的形状和粒径

卡铂 Fe@C 纳米壳聚糖微球球形圆整,平均粒径 (210±26) nm,粒径分布 150 nm-300 nm。卡铂纯铁纳米壳聚糖微球的形貌和粒径与其相当。见图 2。



图 2 卡铂 Fe@C 纳米壳聚糖微球 TEM 照片

Fig 2 TEM of carboplatin - Fe@C - loaded chitosan nanoparticles

2.3 纳米药物微球的载药量和包封率

卡铂 Fe@C 纳米壳聚糖微球的载药量为 $(11.15 \pm 1.03)\%$, 包封率为 $(95.40 \pm 2.47)\%$; 卡铂纯铁纳米壳聚糖微球的载药量为 $(9.21 \pm 1.10)\%$, 包封率 $(91.28 \pm 2.16)\%$ 。

2.4 纳米药物微球的磁响应性

两种纳米药物微球均表现出良好的磁响应性, 见图 3, 4 min 内纳米药物微球能够完全沉降, 使溶液的透光率接近 100%。没有磁场的情况下, 微球能较持久分散于溶剂中, 溶液的透光率变化很小, 说明微球分散性良好。

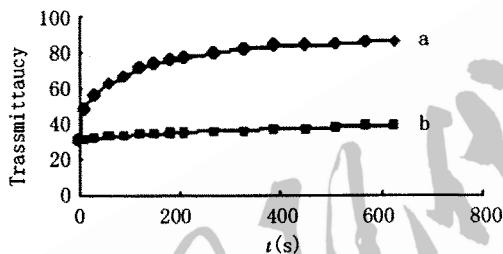


图 3 卡铂 Fe@C 纳米壳聚糖微球磁响应性曲线

Fig 3 Curve of magnetic responsivity of carboplatin - Fe@C - loaded chitosan nanoparticles

2.5 纳米药物微球的体外释药

卡铂对照品在 1 h 内即释放 90%; 纯铁纳米微球 1, 2 d 的释药量分别为 81%, 91%。; 碳包铁纳米微球 1, 2, 3, 4 d 的体外释药量分别为 60%, 74%, 84%, 92%。

3 讨论

粒径小于 400 ~ 780 nm 纳米药物载体, 能利用肿瘤组织特有的渗透和滞留效应, 穿过毛细血管内皮细胞间隙进入并滞留于肿瘤实质, 释放药物, 杀伤肿瘤细胞^[2]。亲水性表面、粒径在 200 ~ 300 nm 的纳米粒, 在体内能避免进入网状内皮系统, 具有长循环的能力^[3]。卡铂 Fe@C 纳米壳聚糖微球, 球形圆整, 平均粒径 210 nm, 外层包裹可生物降解、具生物相容性和亲水性的壳聚糖, 因此, 具有长循环和滞留于肿瘤实质的能力。

采用反相微乳法制备磁性纳米微球时, 因磁性内核不是溶解而是分散于微乳滴中, 所以该微乳滴不是稳定的胶束, 磁性内核具有脱离微乳滴, 使微乳滴散开, 不成球形的趋势。加入低浓度的戊二醛作为预交联剂, 使微乳滴产生轻度交联, 增加对磁性内核的束缚, 在外加交联剂的配合下, 将微乳滴固化成纳米球。预交联剂的量不能过高, 过高使微乳滴固

化过早, 不能继续细分, 成球后粒径过大。

药物载入纳米微球的方式可概括为三种, 一是微球表面物理吸附, 二是微球基质物理包裹, 三是药物以化学键 (如共价键或离子键) 与基质结合。相应的药物释放机制也包括三种, 一是从微球表面脱附, 二是通过基质溶胀扩散, 三是随基质溶蚀化学键断裂释放^[4]。以化学键载药的微球, 药物的释放需化学键的断裂, 只有在酸或碱条件下, 才能促进化学键的裂解, 达到治疗所需的释药速度, 而机体内环境不能满足化学键的裂解要求, 释药速率缓慢。表面吸附方式载药的微球, 载药量和包封率低, 释药过于迅速。物理包裹方式载药的微球, 虽可通过调整微球交联密度或壳聚糖浓度等, 改进释药速率, 但调节能力有限^[5]。Fe@C 纳米磁粉的活性碳层提供了新的调节机制, 一方面活性碳层能吸附一定药物^[6], 增加纳米微球总体的载药量, 其对卡铂的吸附量为 5.3%; 另一方面活性碳层对药物的释放起到缓冲作用, 使得释药速度更为平稳^[7]; 并且活性碳层吸附的药物随 Fe@C 纳米磁粉位于纳米药物微球的核心, 能被基质严密包裹, 减缓了该部分药物的释放。卡铂 Fe@C 纳米壳聚糖微球的释药情况与卡铂纯铁纳米壳聚糖微球比较, 第一天的释药量由 81% 降至 60%, 释药时间由 2 d 延长至 4 d。双重机制的综合作用, 获得了平稳的释药速度, 改善了单纯物理包裹方式药物的突释现象。

Fe@C 纳米磁粉核心为 99.9% 的纯铁, 比饱和磁强度 $1790 \text{ Am}^2/\text{kg}$, 是 Fe_3O_4 磁核的 2.6 倍, 增强了纳米药物微球的磁靶向力。磁响应性实验显示, 纳米药物微球在磁场中具有良好的磁响应性。

参考文献

- [1] 张景勤, 陆彬. 卡铂微球含量的紫外分光光度法与二阶倒数光谱法测定比较 [J]. 中国药师, 1998, 1 (4): 149-151.
- [2] MAEDA H. The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting [J]. Adv Enzyme Regul, 2001, 41: 189-207.
- [3] STOLNIK S, ILLUM L, DAVIS S, *et al*. Long circulating microparticulate drug carriers [J]. Adv Drug Deliv Rev, 1995, 16: 195-214.
- [4] SUNIL A A, NADAGOUDA N M, TEJRAJ M A. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery [J]. J Controlled Release, 2004, 100 (1): 5-28.
- [5] KO T A, PARK H T, HWANG S T, *et al*. Preparation and characterization of chitosan microparticles intended for control drug delivery [J]. Int J Pharm, 2002, 249: 165-174.
- [6] LUIZ CAO, RACHEL VRAR, JOSE D F, *et al*. Activated carbon/ iron oxide magnetic composites for the adsorption of contaminants in water [J]. Carbon, 2002, 40 (12): 2177-2183.
- [7] RUDGE S R, KURTZ T L, VESSELY C R, *et al*. Preparation, characterization, and performance of magnetic iron-carbon composite microparticles for chemotherapy [J]. Biomaterials, 2000, 21 (14): 1411-1420.

收稿日期: 2005-08-09