

阿霉素纳米囊的制备工艺及其毒性试验

李范珠¹, 胡晋² (1. 浙江中医药大学药学院, 杭州 310053; 2. 沈阳药科大学药剂教研室, 沈阳 110016)

摘要:目的 对阿霉素纳米囊 (adriamycin nanocapsules, ADM-NC) 的制备工艺进行研究, 优化最佳制备工艺, 并对 ADM-NC 进行了急性毒性试验。方法 以可生物降解的聚氰基丙烯酸正丁酯 (polybutylcyanoacrylate, PBCA) 为囊材, 采用乳化聚合法 (emulsion polymerization method) 制备 ADM-NC; 以 NC 粒度和包封率为评价指标, 通过正交试验设计 (orthogonal design) 优化制备工艺。以小鼠尾静脉注射方式分别测定空白纳米囊及载药纳米囊的半数致死量 LD_{50} 。结果 优化制备工艺后 ADM-NC 冻干前后的粒径分别为 110 nm 和 130 nm; Zeta 电位为 114.6 mV; 以凝胶色谱法测得 ADM-NC 中药物的包封率达 53.5%; 测得空白纳米囊的 LD_{50} 为 $(238.1 \pm 40.0) \text{ mg/kg}$, 载药纳米囊 ADM-NC 的 LD_{50} 为 $(36.6 \pm 6.2) \text{ mg/kg}$ 。结论 利用乳化聚合法可制备具有较高包封率的 ADM-NC; 与 ADM 普通制剂的 LD_{50} $(8.7 \pm 0.3) \text{ mg/kg}$ 相比, ADM-NC 的毒性明显降低。

关键词: 阿霉素; 纳米囊; 聚氰基丙烯酸正丁酯; 乳化聚合法

中图分类号: R943.4 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2006)06-0474-04

Preparation and toxicity determination of adriamycin nanocapsules

LI Fan-zhu¹, HU Jin² (1. College of Pharmaceutical Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 2. Department of Pharmaceutics, Shenyang University of Pharmacy, Shenyang 110016, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To find the best preparation method of adriamycin nanocapsules, and to investigate the toxicity of adriamycin nanocapsules. **METHODS** Adriamycin nanocapsules (ADM-NC) were prepared by emulsion polymerization method with polybutylcyanoacrylate (PBCA) as carrier material. The preparation procedure was optimized using orthogonal design according to the parameters of ADM-NC size and encapsulation efficiency. LD_{50} in mice of free nanocapsules and ADM-NC were also determined. **RESULTS** Under this optimum condition, the mean diameters of the ADM-NC prior to or posterior to be dry-frozen were 110 nm and 130 nm, respectively. The encapsulation efficiency and Zeta potential of ADM-NC were 53.5% and 114.6 mV, respectively. LD_{50} of free nanocapsules and ADM-NC in mice were $238.1 \pm 40.0 \text{ mg/kg}$ and $36.6 \pm 6.2 \text{ mg/kg}$, respectively. **CONCLUSION** ADM-NC with high encapsulation efficiency can be obtained through optimized emulsion polymerization method. Compared to the LD_{50} of ADM common formulation $(8.7 \pm 0.3 \text{ mg/kg})$, we drew the conclusion that the toxicity of ADM can be decreased significantly through NC preparation.

KEY WORDS: adriamycin; nanocapsule; polybutylcyanoacrylate; emulsion polymerization method

阿霉素 (adriamycin or doxorubicin, ADM) 是一种广谱抗肿瘤抗生素。抗肿瘤谱广、活性强, 被广泛用于治疗肝癌、胃癌等。但由于阿霉素存在心脏毒性、骨髓抑制等严重的不良反应^[1], 且其分子结构不稳定, 易受水分、光、热等的影响而发生水解、光解等变化, 降低了疗效, 限制了阿霉素的临床使用。纳米囊 (nanocapsules, NC) 是由天然或合成的高分子薄层聚合物膜包裹的, 油性或水性核心所组成的一类亚显微胶状药物载体系统 (10 ~ 1 000 nm), 具有一定的生物组织靶向性^[2]。为了减少 ADM 的不良反应而又达到明显的治疗效果, 我们选用低毒、具有生物降解性和生物相容性良好的聚氰基丙烯酸正丁酯 (polybutylcyanoacrylate, PBCA)^[3] 作为囊材, 采用乳化聚合法制备了 ADM-NC。并将 ADM-NC 进行冻

干, 以达到提高 ADM 生物活性, 降低不良反应, 便于临床应用的目的。

1 材料与仪器

ADM 原料药 (深圳万乐公司); α -PBCA (广州医用胶公司); 葡聚糖凝胶 Sephadex - G15 (华美公司); Poloxamer 108 (Pluronic F68, BASF, USA) 其他试剂均为国产分析纯。

磁力加速搅拌器 (IKA, RH-KT/C, Germany); 紫外分光光度计 (岛津 UV - 2201 型, 日本); 透射电子显微镜 (JEM - 1200EX, Japan); Zeta 电位、纳米激光粒度仪 (Zetasizer 3000HSA, Malvern, England); 医用冷冻干燥机 (LGJ - IIA 型, 上海医疗器械三厂)。

昆明种小鼠, 雌雄各半, 体重 $(20 \pm 2) \text{ g}$ (浙江中医药大学

作者简介: 李范珠 (1964 -), 男, 教授, 主要研究方向: 新型药物输送系统的研究。Tel: (0571) 86613756, E-mail: lifanzhu@zjtcn.net, Fax: (0571) 86613606

实验动物中心)。

2 实验方法

2.1 ADM-NC制备工艺的研究

2.1.1 ADM-NC的制备方法 精密称取 ADM原料药,将其溶于含有适量 Poloxamer108 的 50mL蒸馏水中,混合均匀,加入一定量的 0.01 mol/L盐酸中,在磁力搅拌下加入一定的 PBCA,反应 2h后,形成 ADM-NC混悬液,然后在 50~60℃减压蒸馏至 25mL,加入一定量的冻干赋形剂溶解后,先以 G3垂容玻璃漏斗过滤,再以 0.45μm 的微孔滤膜过滤,即得浓度为 1mg/mL 的 ADM-NC溶液,分装于安瓿中,冷冻干燥即可。

2.1.2 ADM-NC制备工艺的优化 为优化 ADM-NC的制备工艺,对影响 ADM-NC包封率的主要因素: pH 值、表面活性剂 Poloxamer108用量、PBCA用量、搅拌时间设计了 4因素 3水平的正交实验,以 $L_9(3^4)$ 设计表头并安排实验,见表 1。

表 1 正交设计因素水平表

水平	因素			
	A	B(%)	C(mL)	D(h)
	(pH值)	(Poloxamer108)	(PBCA)	(搅拌时间)
1	1.5	0.10	0.15	0.5
2	2.0	0.15	0.20	1.0
3	2.5	0.20	0.25	2.0

2.2 ADM-NC的粒度、Zeta电位测定及其冻干品的研究

将制得的 ADM-NC经过 24h的冷冻干燥后,获得界面整齐、丰满的冻干品。采用负染色法对 ADM-NC混悬液和冻干品进行处理,用 JEM-1200EX透射电子显微镜观察其形态并在 Zeta电位、纳米激光粒度仪上测定 ADM-NC的粒度及其 Zeta电位。

2.3 ADM-NC包封率的测定

2.3.1 葡聚糖凝胶 (Sephadex-G15)柱分离能力的考察 将 Sephadex-G15用蒸馏水浸泡、溶胀、煮沸,装于 2.5cm×30cm 的玻璃柱中,以恒流蠕动泵输送蒸馏水,平衡后,分别取 ADM溶液、空白 NC、ADM-NC混悬液 1.0mL加于柱的顶端,以 0.01 mol/L盐酸溶液为流动相洗脱,流出液通过 UV-2201流动检测池监测,设定波长在 ADM的最大吸收 233nm处,记录其流出曲线。由于 ADM-NC粒子较大,根据分子筛原理,较大的粒子先出柱,而 ADM小分子后出柱,二者能被完全分开。

2.3.2 标准曲线和回收率 精密配制一系列 ADM标准水溶液,浓度分别为: 2, 1, 0.5, 0.2, 0.1mg/mL。在 Sephadex-G15色谱柱上,进行层析。收集 ADM流份,稀释至 100mL。层析条件如下:进样量-1mL;流动相-蒸馏水;流速-90mL/h;紫外检测波长-233nm。层析后得到 5份 ADM标准样品。在 UV-2201上测定各样品的吸光度,进而求得标准曲线和回收率。

2.3.3 包封率测定 在 Sephadex-G15色谱柱上,把纳米囊和游离的 ADM分成两个流份。收集游离的 ADM,稀释至 100mL,在 UV-2201上测定游离 ADM的吸光度。根据标准曲线,按以下公式计算包封率:包封率 = $(C_{总} - C_{游离}) / C_{总} \times 100\%$ 。

2.4 ADM-NC的急性毒性研究

2.4.1 空白 NC的 LD₅₀测定 取体重 (20±2)g的健康昆明种小鼠 70只,雌雄各半,将动物均衡随机分为 7组,每组 10只。将空白 NC粉针,用无菌注射用水稀释,按下列剂量注射于小鼠尾静脉: 125, 156, 195, 244, 305, 381, 476mg/kg(按 PBCA的比重 0.986计算其含量。剂量间隔系数 k=0.8),连续观察 48h,记录各组死亡数目,求出死亡率。

2.4.2 ADM-NC的 LD₅₀测定 取体重 (20±2)g的健康昆明种小鼠 40只,雌雄各半,随机分为四组,每组 10只,按下列剂量注射于小鼠尾静脉: 50, 40, 32, 25.6mg/kg(按 ADM的药量计,剂量间隔系数 k=0.8),连续观察 48h,记录各组死亡数目。

3 结果

3.1 ADM-NC的制备工艺研究

工艺优化的正交试验结果见表 2,方差分析见表 3。从表 2中的极差可知,因素 A、B、C、D的影响大小依次为 C>B>D>A。

表 2 $L_9(3^4)$ 正交试验安排和实验结果

试验号	因素				包封率 (%)	粒径 (nm)
	A	B	C	D		
1	1	1	1	1	36.4	117.0
2	1	2	2	2	42.3	121.5
3	1	3	3	3	64.5	104.7
4	2	1	2	3	56.7	87.5
5	2	2	3	1	62.4	112.4
6	2	3	1	2	45.7	99.31
7	3	1	3	2	47.3	114.2
8	3	2	1	3	50.7	125.7
9	3	3	2	1	61.5	130.4
K1	47.73	46.80	44.27	53.43		
K2	54.93	51.80	53.50	45.10		
K3	53.17	57.23	58.07	57.30		
极差	7.20	10.43	13.80	12.20		

表 3 方差分析

Tab 3 Analysis of variance				
方差来源	离差平方和	自由度	F值	显著性
A	84.48	2	1.24	P>0.05
B	163.4	2	5.36	P<0.05
C	296.5	2	8.12	P<0.05
D	233.2	2	4.25	P<0.05

以影响最小因素 A 作为误差进行方差分析, B、C、D 均有显著性差异。结合纳米囊的粒径进行直观分析后, 确定 A₂B₂C₃D₃ 为最佳制备工艺, 即 pH 值为 2.0 Poloxamer-108 用量为 15%, PBCA 用量为 25%, 搅拌时间为 2.0h。

3.2 ADM-NC 冻干品的研究及 ADM-NC 的粒度及 Zeta 电位测定

本实验中制备的 ADM-NC 基本呈较圆整的球形, 且大小均匀, Zeta 电位为 114.6mV。冻干前后 ADM-NC 的平均粒径分别为 110nm 和 130nm。

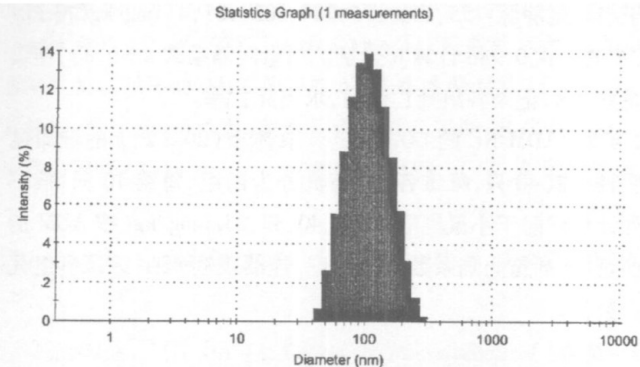


图 1 ADM-NC 的粒度分布

Fig 1 Mean diameter of ADM-NC by Laser doppler Anemometry (LDA)

3.3 包封率测定

标准曲线: 测定标准液的吸光度, 以浓度-吸光度回归, 得标准曲线方程 $A = 0.0173C + 0.012$ ($r = 0.9999$), 1~20mg/mL 范围内具有良好线性关系。由表 4 可知, 平均回收率为 102.03% ± 4.98%。由表 5 可知, ADM-NC 的包封率为 53.5%。

表 4 阿霉素的回收率

Tab 4 Recovery of ADM

ADM 浓度 (g/mL)	标准样品 吸光度 (A)	层析样品 吸光度 (A)	回收率 (%)	$\bar{x} \pm s$ (%)
20.0	0.347	0.340	97.98	102.03 ± 4.98
10.0	0.176	0.182	103.41	
5.0	0.086	0.084	97.67	
2.0	0.037	0.037	100.00	
1.0	0.018	0.020	111.11	

表 5 阿霉素纳米囊的包封率

Tab 5 Encapsulation efficiency of ADM in nanocapsules

试验编号	ADM 总量 (mg)	游离 ADM 的量 (mg)	包封率 (%)	$\bar{x} \pm s$ (%)
1	1.0	0.445	55.5	53.5
2	1.0	0.465	57.5	
3	1.0	0.485	51.6	

3.4 ADM-NC 的急性毒性研究

按文献^[4]的综合计算方法求得空白 NC 和 ADM-NC 小鼠尾静脉注射的 LD₅₀ 及其 95% 可信限分别为 (238.1 ±

40.0)mg/kg 和 (36.6 ± 6.2)mg/kg 见表 6、表 7。与 ADM 普通制剂的 LD₅₀ (8.7 ± 0.3)mg/kg 相比, 空白 NC 的毒性很低, 即 PBCA 的毒性很低, 且将 ADM 制成 NC 后可明显降低其毒性。

表 6 空白纳米囊的毒性试验

Tab 6 Toxicity test of free nanocapsules

Group No	Dose (mg/kg)	Lg (Dose)	Mortality (%)	LD ₅₀ (mg/kg)
1	125	2.096	0	238.1 ± 40.0
2	156	2.193	20	
3	195	2.290	30	
4	244	2.387	50	
5	305	2.484	70	
6	381	2.580	90	
7	476	2.678	100	

表 7 阿霉素纳米囊的毒性试验

Tab 7 Toxicity test of ADM-NC

Group No	Dose (mg/kg)	Lg (Dose)	Mortality (%)	LD ₅₀ (mg/kg)
1	50	1.699	100	36.62 ± 6.2
2	40	1.602	60	
3	32	1.505	30	
4	25.6	1.408	0	

4 讨论

纳米囊的制备方法主要有胶团聚合法^[2] (micell polymerization method)、乳化聚合法 (emulsion polymerization method)、界面聚合法 (interfacial polymerization method)。在本实验中, 我们采用乳化聚合法和界面聚合法来制备 ADM-NC, 发现乳化聚合法对 ADM 的包封率较高 (53.5%), 而界面聚合法则较低 (30.8%)。

PBCA 具有遇水自动聚合、低毒、生物降解性和生物相容性等特点, 因此我们以 PBCA 作为纳米囊的包封材料, 制备 ADM-NC。随着 PBCA 用量的增加, 包封率增加, 但粒径变化甚微。Alonso 等^[5]报道, 聚氰基丙烯酸酯正丁酯浓度对 NC 粒径的影响不大, 本实验结果与之相符。随着稳定剂 Poloxamer-108 用量的增加, 粒径有所减小。

国外对纳米囊中药物包封率的测定大多采用超速离心法和葡聚糖凝胶过滤法。由于在超速离心的过程中易引起粒子破裂, 产生误差, 因此, 我们采用了葡聚糖凝胶过滤法来测定 ADM-NC 的包封率。以 0.01mol/L 的 HCL 作为流动相, 对 NC 及游离药物分离较完全, 此方法简便, 回收率较高。

在小鼠急性毒性实验中, NC 和 ADM-NC 小鼠尾静脉注射的 LD₅₀ 分别为 (238.1 ± 40.0)mg/kg 和 (36.6 ± 6.2)mg/kg 与 ADM 普通制剂的 LD₅₀ (8.7 ± 0.3)mg/kg 相比, 表明囊材 PBCA 的毒性很低, 且将 ADM 制备成 NC 后可明显降低其毒性。

本实验初步考察了 ADM-NC 及其冻干粉剂的粒径、包封率、Zeta 电位和半数致死剂量,提示采用乳化聚合法可制备低毒的 ADM 纳米囊制剂。

参考文献

- [1] OMELYANENKO V, KOPECKOVA P, GENIRY C, *et al.* Targetable HPMA copolymer-adriamycin conjugates: recognition, internalization and subcellular fate [J]. J Controlled Release, 1998, 53 (1-3): 25-37.
- [2] COUVREUR P, BARRATT G, FATTAL E, *et al.* Nanocapsule technology: a review[J]. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 2002, 19(2): 99-134.
- [3] ZHANG Z R, LIAO G T. The development of polybutylcyanoacrylate nanospheres [J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 1994, 29 (6): 323-32.
- [4] XU S Y. Methodology of pharmacological experiments(药理实验方法学) [M]. 2nd. ed. Beijing: Public Health Press, 2001: 891-894.
- [5] ALONSO M J, SANCHEZ A, TORRES D, *et al.* Joint effects of monomer and stabilizer concentrations on physico-chemical characteristics of poly(butyl 2-cyanoacrylate) nanoparticles[J]. J Microencapsul, 1990, 7(4): 517-526.

收稿日期: 2005-10-14