

碱性成纤维生长因子纳米粒的制备及体外释放研究

刘慧娜^{1*}, 王 玮²(1.郑州市骨科医院, 郑州 450052; 2.河南大学药学院, 河南 开封 475001)

中图分类号 R944 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)17-1584-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.17.18

摘要 目的:制备碱性成纤维生长因子(bFGF)纳米粒(NP),并考察其体外释放特性。方法:以生物可降解材料 α -氰基丙烯酸正丁酯(PBCA)为载体,采用乳化聚合法制备bFGF-PBCA-NP,并以粒径和包封率为指标,采用正交试验优选 α -PBCA(μ l)与bFGF(μ g)的比例、泊洛沙姆F68的质量分数和加入bFGF后溶液的pH值;采用电子透射显微镜观察纳米粒的形态,考察bFGF-PBCA-NP的粒径及其分布、包封率、载药量和72 h的体外累积释药量(Q),并进行一级动力学、Higuchi、Weibull、双指数双相动力学及多项式方程拟合。结果: α -PBCA与bFGF的比例为4.8,泊洛沙姆F68为3%,pH为2.0;所得纳米粒为圆整的类球形实体粒子,平均粒径为 (120.5 ± 1.60) nm,载药量为 (4.26 ± 0.02) %,包封率为 (89.35 ± 0.83) %;bFGF-PBCA-NP的体外释放以双指数双相动力学和多项式方程拟合较好, r 分别为0.990 5和0.994 7。结论:所制备的bFGF-PBCA-NP具有明显的缓释作用。

关键词 碱性成纤维生长因子; α -氰基丙烯酸正丁酯; 纳米粒; 制备; 正交试验; 体外释放

Study on Preparation and *in vitro* Release of bFGF-loaded Nanoparticles

LIU Hui-na¹, WANG Wei²(1.Zhengzhou Orthopaedic Hospital, Zhengzhou 450052, China; 2.Pharmacy College of Henan University, Henan Kaifeng 475001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To prepare the basic fibroblast growth factors (bFGF)-loaded nanoparticles (NP), and to study the release behavior of the nanoparticles *in vitro*. METHODS: Using biodegradable materials α -PBCA as carrier, bFGF-PBCA-NP was prepared by emulsion polymerization method. Using diameter and entrapment efficiency as index, orthogonal test was used to optimize the proportion of α -PBCA (μ l) to bFGF (μ g), mass fraction of poloxamer F68 and pH of solution after added bFGF. The morphology of the nanoparticles was observed with TEM. The particle size and distribution of bFGF-PBCA-NP, entrapment efficiency, drug-loading amount and 72 h accumulative drug release *in vitro* (Q) were investigated. First order kinetics equation, Higuchi equation, Weibull equation, double exponential biphasic kinetics equation and polynomial equation were fitted. RESULTS: The proportion of α -PBCA and bFGF was 4.8, and poloxamer F68 accounted for 3% with pH of 2.0; bFGF-PBCA-NP were sphere-like solid particle with mean size of (120.5 ± 1.60) nm. The drug-loading amount was (4.26 ± 0.02) % and the encapsulation efficiency was (89.35 ± 0.83) %. The *in vitro* release properties could be expressed by double exponential biphasic kinetics equation and polynomial equation, and correlation coefficients were 0.990 5 and 0.994 7. CONCLUSIONS: Prepared bFGF-PBCA-NP show significant sustained release.

KEY WORDS Basic fibroblast growth factors; α -PBCA; Nanoparticles; Preparation; Orthogonal test; Drug release *in vitro*

冠心病是目前导致人类死亡的主要疾病之一,在我国其发病率呈逐年增高趋势,越来越多医学工作者在不断寻求新的冠心病治疗方法。治疗性血管生成(Therapeutic angiogenesis)或称“生物搭桥”(Biologic bypass)的方法是目前冠心病治疗研究的热点。近年来,随着分子生物学的发展,人们发现血管新生过程中,有许多细胞因子的参与,而碱性成纤维生长因子(bFGF)就是其中之一^[1]。bFGF具有促进缺血心肌新生血管形成和保护心肌细胞的作用,是“药物冠脉搭桥”的重要组成部分,适用于冠心病及周围血管病的治疗,其潜在的治疗价值已得到心血管界的重视^[2]。但是bFGF在体内的半衰期为3~10 min,全身应用将被快速灭活而难以发挥其有效作用;在溶液中的稳定性较差,局部穿刺分次给药也难以产生有效作用,并且不适合长期给药。因此研究bFGF的纳米粒对长期维持局部药物的有效浓度、促进新生血管生长有着重要意义。

1 材料

bFGF试剂盒(上海麦莎生物有限公司分装);Bio-tek Model酶标分析仪(美国Bio-tek Instruments.INC公司);CL-3

* 药师, 硕士研究生。研究方向:药物新剂型与新技术。电话:0371-67771613。E-mail:liuhuina203@163.com

型恒温加热磁力搅拌器(郑州长城科工贸有限公司);YP-600型电子天平(上海第二天平仪器厂);AB135-S电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司);SHA-C型水浴恒温振荡器(江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司);JEM-100CX- II 电子透射显微镜(日本电子公司)。

α -氰基丙烯酸正丁酯(α -PBCA,广州白云医用胶股份有限公司);bFGF冻干粉末(暨南大学生物研究中心,纯度: >95 %) ;三羟甲基氨基甲烷(上海化学试剂采购供应站分装厂);其他试剂均为市售分析纯产品;所用水皆为SZ-93自动双重纯水制备系统制备。

2 bFGF-PBCA微球(NP)的制备

2.1 乳化聚合法制备^[3-4]

制备bFGF-PBCA-NP。精密量取5 ml含有一定浓度泊洛沙姆F68、pH 7.6的三羟甲基氨基甲烷(Tris)缓冲水溶液,然后加入适量bFGF的超纯水溶液,置于恒温加热磁力搅拌器上,660 r/min持续搅拌下,用0.1 mol/L HCl将pH调至2.0,以微量注射器精密量取 α -PBCA适量并加入高速搅拌的溶液中,1 h后,用0.05 mol/L HCl调节pH至中性,继续搅拌1 h即得bFGF-PBCA-NP胶体溶液。同法制备不含bFGF的空白纳米粒。

2.2 正交试验优化制备工艺

根据相关文献和预试验确定单因素,通过对制备条件温度、搅拌速度、搅拌时间、加入 bFGF 后溶液的 pH 值、bFGF 用量和泊洛沙姆 F68 浓度进行考察,并以载药纳米粒的粒径、包封率(EE)和载药量(DL)为指标,优选出影响 bFGF-PBCA-NP 制备的主要因素有 3 个: α -PBCA(μl)与 bFGF(μg)比例(A)、泊洛沙姆 F68 质量分数(B)、加入 bFGF 后溶液的 pH 值(C)。根据指标纳米粒的粒径、包封率和载药量的权重,分别给 3 个指标 0.2、0.5、0.3 的权重系数,采用综合加权评分法^[5-6],综合评分=粒径_{min}/粒径 $\times 100 \times 0.2 + EE/EE_{\text{max}} \times 100 \times 0.5 + DL/DL_{\text{max}} \times 100 \times 0.3$ 。每个因素选择 3 个水平,按正交试验表 $L_9(3^3)$ 进行试验^[3]。正交试验因素与水平见表 1,结果分析见表 2、表 3。

表 1 因素与水平

Tab 1 Factor and levels

因素	水平		
	1	2	3
A α -PBCA 与 bFGF 比例	3.2	4.8	6.4
B 泊洛沙姆 F68 质量分数, %	1	2	3
C 溶液 pH 值	2.0	3.0	5.0

表 2 正交试验结果

Tab 2 Results of orthogonal design

编号	因素			指标			综合评分
	A	B	C	粒径, nm	EE, %	DL, %	
1	1	1	1	100	54.7	3.19	72.49
2	1	2	2	231	71.1	4.15	77.09
3	1	3	3	453	45.8	2.67	48.48
4	2	1	2	110	85.2	3.38	88.59
5	2	2	3	312	83.1	3.30	75.22
6	2	3	1	116	90.5	3.59	92.05
7	3	1	3	377	87.4	2.63	76.01
8	3	2	1	99	92.3	2.77	90.02
9	3	3	2	188	89.9	2.70	78.75

表 3 正交试验结果分析

Tab 3 Analysis of the results of orthogonal design

	粒径, nm			EE, %			DL, %		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
K_1	261.33	195.67	105.00	57.20	75.77	79.17	3.34	3.07	3.18
K_2	179.33	214.00	176.33	86.27	82.17	82.07	3.42	3.41	3.41
K_3	221.33	252.33	380.67	89.87	75.40	72.10	2.70	2.99	2.87
R	82.00	56.66	275.67	32.67	6.77	9.97	0.72	0.42	0.54
P	0.19	0.26	0.02	0.05	0.59	0.44	0.32	0.59	0.49

R 值大小可以看出不同因素对试验结果影响的程度。R 值越大,说明此因素对所考察指标的影响越大。由表 3 中的结果可得, α -PBCA 与 bFGF 比例对 DL 和 EE 的影响较大,而粒径受 pH 值影响较大。

比较 K 值大小可了解该因素的不同水平对试验结果影响的程度。对 DL 和 EE 而言, K 值越大的水平越理想;而对粒径而言, K 值越小的水平越理想。采用统计软件 SPSS 13.0 对正交试验进行数据处理,结果表明, α -PBCA 与 bFGF 比例对 EE 有显著影响($P < 0.05$),而泊洛沙姆 F68 质量分数和 pH 值对 DL 和 EE 无显著影响($P > 0.05$); pH 值对 bFGF-PBCA-NP 的粒径有显著影响($P < 0.05$), α -PBCA 与 bFGF 比例和泊洛沙姆 F68 质量分数对粒径无显著影响($P > 0.05$)。

综合表 2 和表 3 的结果,确定最佳处方和工艺为: $A_2B_3C_1$,

即 α -PBCA 与 bFGF 比例为 4.8,加入酸后调节加入 bFGF 后溶液的 pH 值为 2.0,泊洛沙姆 F68 质量分数为 3%。

3 纳米粒的形态学及粒径考察

3.1 纳米粒的形态考察

透射电子显微镜照片见图 1,粒径分布见图 2。

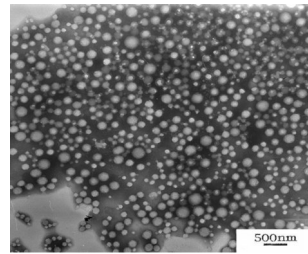


图 1 bFGF-PBCA-NP 电镜照片($\times 20\ 000$)

Fig 1 TEM micrograph of bFGF-PBCA-NP($\times 20\ 000$)

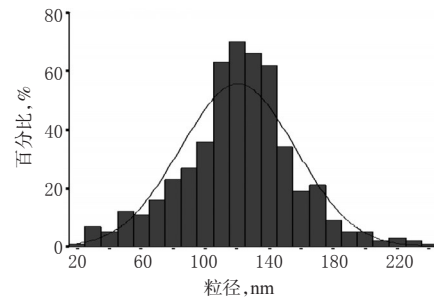


图 2 bFGF-PBCA-NP 粒径分布图

Fig 2 Particle size and distribution of bFGF-PBCA-NP

结果,制得纳米粒为圆球形或类球形,大小较均匀,不粘连,分散良好,粒径分布较窄,且基本呈正态分布,平均粒径为 (120.5 ± 1.60) nm。

由图 2 可见,制得的纳米粒为规则的圆球形,表面较光滑。 $D_{10} = 72.5$ nm, $D_{50} = 119.15$ nm, $D_{90} = 164.5$ nm。根据跨距的计算方法可得跨距为 0.77,表明其粒径分布较窄,大小较均匀。

3.2 DL、EE 的测定

采用离心法^[3],取制得纳米粒的胶体溶液适量,置于专用塑料离心管中,配对后放入高速冷冻离心机中离心。运行参数为:转速 15 000 r/min,温度设定为 4 $^{\circ}\text{C}$ 。离心 2 h 后,取离心后的上清液适量,采用酶联免疫法^[7]分别测定 m_1 和 m_2 ,按照公式计算 DL 和 EE。

$$DL = \frac{m_1 - m_2}{m_0} \times 100\%$$

$$EE = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100\%$$

式中, m_1 为加入的药物总质量(mg); m_2 为上清液中药物质量(mg); m_0 为制得的纳米粒的质量(mg)。

结果,批号为 071002、071004、071005 的 3 批 bFGF-PBCA-NP 的 DL 与 EE 分别为 4.26%、90.3%, 4.24%、89.9%, 4.28%、90.7%,平均值分别为 $(4.26 \pm 0.02)\%$ 、 $(89.35 \pm 0.83)\%$ 。

4 bFGF-PBCA-NP 的体外释药

4.1 释放介质的选择

在研究微粒制剂体外释放时,为模拟体内条件,常选择生理盐水或磷酸盐缓冲液作为释放介质。在本研究中,选择磷

酸盐缓冲液(pH 7.4)作为释放介质。

4.2 药物测定方法

bFGF的测定方法采用酶联免疫法,依照次序分别精密吸取不同质量浓度的bFGF标准品溶液各100 μl,标准品质量浓度分别为0、50、100、250、500、1 000 pg/ml,记录光密度(OD)结果。以结合率B/B₀(%) (B=标准品OD值, B₀=标准品0点OD值)对bFGF质量浓度(c)进行直线回归,并绘制标准曲线,得回归方程为B/B₀(%) = -0.082c + 93.316 (r=0.992 9),线性范围为0~1 000 pg/ml。

4.3 bFGF在释放介质中的稳定性考察

将配成一定质量浓度的bFGF水溶液置于三角瓶中,放入恒温振荡箱中,保持37℃,分别于不同时间取出0.4 ml,并补加等体积释放介质。将样品按照酶联免疫试剂盒操作方法将样品进行处理后,在酶标分析仪上测定样品在0、1、4、8、12、24、36、48、72 h的OD值,并计算质量浓度c(pg/ml)。结果c仅下降8.84%,表明样品在72 h内稳定,RSD<2.0%。

4.4 样品体外释放^[8-11]

将所制得的纳米胶体溶液补加释放介质至40 ml,置于磨口三角锥形瓶中,其中bFGF的理论质量浓度约为120 ng/ml。将锥形瓶浸入37℃恒温振荡器中,维持37℃恒温振荡,于不同时间取样0.4 ml,然后补加相同体积的释放介质。在酶标分析仪上测定样品中bFGF的OD值,并计算累积释放量(Q),绘制累积释放曲线。结果,0、1、2、4、8、12、24、36、72 h的Q分别为(0.43 ± 0.50)%、(7.15 ± 0.68)%、(15.65 ± 0.73)%、(21.09 ± 0.71)%、(26.99 ± 0.82)%、(36.71 ± 1.04)%、(4.64 ± 0.94)%、(66.86 ± 1.08)%、(73.92 ± 0.89)% ,累积释放曲线见图3。

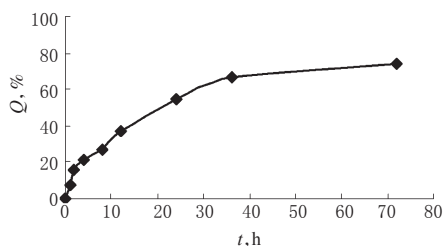


图3 72 h内bFGF-PBCA-NP累积释放曲线

Fig 3 The accumulative release curves of bFGF-PBCA-NP within 72 h

4.5 体外释药曲线拟合

以Q对时间(t)分别采用一级动力学(I)、Higuchi(II)、Weibull(III)、双指数双相动力学(IV)及多项式方程(V)对释药数据进行拟合,结果见表4[AIC = n ln Re + 2P, n为试验数据的个数, P为所设模型参数的个数, Re = Σ W_i(Q_{拟合} - Q)², W_i为权重]。

表4 不同拟合方程bFGF-PBCA-NP的拟合结果

Tab 4 Comparison of *in vitro* accumulative release data of bFGF-PBCA-NP fitted by different equations

方程编号	拟合方程	r	AIC值
I	1-Q = -22.13e ^{0.01t}	0.809 9	-0.92
II	Q = 16.11 + 1.992 4t ^{1/2}	0.898 2	-2.74
III	Q = 1 - e ^{-50.459 4(t+2.422 2t-5)0.423 14t}	0.475 8	7.23
IV	1-Q = -77.771 4e ^{-0.000 5t} + 74.504 4e ^{-0.050 8t}	0.990 5	-7.25
V	Q = 0.000 4t ³ - 0.059 2t ² + 3.555t + 4.915 7	0.994 7	-7.42

结果可见,bFGF-PBCA-NP体外释放曲线一级动力学、Hi-

guchi和Weibull方程拟合均不佳,而双指数双相动力学和多项式方程拟合后效果较好,表明bFGF-PBCA-NP有明显的缓释作用。

5 结果与讨论

乳化聚合法,是将单体滴入含有药物及表面活性剂的酸水溶液中,在水中OH⁻的催化下,发生阴离子聚合而成,适宜的pH值在2~3之间。该方法操作简单,但由于pH值条件的限制,制约了酸不稳定药物聚氨基丙烯酸酯纳米粒的制备。经过前期稳定性考察,在所采用的制剂工艺条件下不会破坏bFGF,其中bFGF在pH 2时,2 h内保持稳定;温度在37℃时,24 h内稳定性较好。据此笔者制备了bFGF-PBCA-NP。由形态及其分布和载药性能考察的试验结果可见,bFGF-PBCA-NP平均粒径为(120.5 ± 1.60) nm,EE为(89.35 ± 0.83)%,DL为(4.26 ± 0.02)%;制得的纳米粒为规则的圆球形,表面较光滑;跨距为0.77,表明其粒径分布较窄,大小较均匀。说明该乳化聚合简单易行。

从拟合的模型来看,bFGF-PBCA-NP的体外释放则较符合多项式与双相动力学方程,具有明显的缓释特性,存在快释与慢释2个阶段:由于bFGF-PBCA-NP表面吸附的药物容易脱落并释放出来,形成快释现象,快释阶段药物在治疗部位迅速达到有效治疗浓度;被包裹于载体材料内部的药物由于载体材料形成的骨架阻碍了内部药物的溶解,释放进入慢释阶段,其作为维持剂量可避免峰谷波动及给药频率过快,因而具有较明显的缓释作用。

参考文献

- [1] 王雅梅,刘冰,孙丽翠,等.bFGF促进大鼠急性缺血心肌的毛细血管生成[J].中国生物化学与分子生物学报,2011,27(1):78.
- [2] 孙林,光雪峰,李易,等.碱性成纤维细胞生长因子基因对猪缺血心肌侧支血管生成的作用[J].中国介入心脏病学杂志,2006,14(3):188.
- [3] 田新华,林晓宁,魏峰,等.替莫唑胺聚氨基丙烯酸正丁酯纳米粒的制备[J].中国医院药学杂志,2011,31(20):1 689.
- [4] 王博,袁子民,程岚,等.β-榄香烯聚氨基丙烯酸正丁酯纳米粒的制备工艺研究[J].中草药,2011,42(3):474.
- [5] 耿丽娟,唐丽华,游本刚.α-常春藤皂苷丙烯酸树脂纳米粒的制备及其体外评价[J].中国新药杂志,2013,22(3):367.
- [6] 李群力.双黄连滴丸制备工艺的研究[J].中草药,2005,36(4):537.
- [7] 向军俭,徐晓鹏,王宏,等.碱性成纤维细胞生长因子单克隆抗体ELISA微量检测技术[J].中国免疫学杂志,2006,22(4):337.
- [8] Simovic S, Prestidge CA. Nanoparticle layers controlling drug release from emulsions[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2007,67(1):39.
- [9] 许红玮,方琴,王季石,等.紫杉醇嵌段共聚物纳米粒的制备及体外试验研究[J].中国医院药学杂志,2008,28(1):11.

(收稿日期:2012-11-06 修回日期:2012-12-20)