

# 阿苯达唑纳米微粉分散方法的研究<sup>△</sup>

马运芳\*, 陈 迹, 王建华#, 赵 军, 刘 梦, 吕顺忠(新疆医科大学第一附属医院, 乌鲁木齐 830054)

中图分类号 R965.3 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)37-3507-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.37.19

**摘 要** 目的:建立适于生物安全性研究的阿苯达唑(ABZ)纳米微粉的最佳分散方法。方法:选择超纯水、RPMI 1640 完全培养基、RPMI 1640 培养液、磷酸盐缓冲液(PBS)、0.9%氯化钠溶液5种分散介质,在扫描电镜下观察ABZ纳米微粉粒子的分散形态,并检测其粒径,与基础值比较来确定分散介质;之后以普通超声、先普通超声再细胞破碎超声两种分散方式分别分散ABZ纳米微粉,以粒径为考察指标,与基础值比较筛选最佳分散方法;并在此基础上考察普通超声时间为5~60 min时的粒径变化趋势,以确定超声时间。结果:ABZ纳米微粉在5种分散介质中均发生了不同程度的聚合,与基础值比较粒径也普遍变大,但在PBS、0.9%氯化钠溶液和超纯水中聚合程度相对轻微,粒径增大幅度也较小,结合细胞对生长环境的特殊要求选择分散介质为PBS。采用先普通超声再细胞破碎超声的分散方式,ABZ纳米微粉粒径未见显著增大。超声5~45 min,随着超声时间的延长ABZ纳米微粉的粒径不断减小;超声45~60 min,随着超声时间的延长ABZ纳米微粉的粒径反而有团聚增大的趋势,综合时间成本选择超声时间为30 min。验证试验ABZ纳米微粉的平均粒径为(387±3.6) nm,与基础值比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。结论:本分散方法可有效抑制纳米微粉悬浮液的团聚,适用于ABZ纳米微粉的生物安全性研究。

**关键词** 阿苯达唑;纳米微粉;分散方法;分散介质;粒径;生物安全性

## Study on Dispersion Method of Albendazole Nanometer Powder

MA Yun-fang, CHEN Ji, WANG Jian-hua, ZHAO Jun, LIU Meng, Lü Shun-zhong (The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish the optimal dispersion method of Albendazole (ABZ) nanometer powder for biological safety study. METHODS: Using ultrapure water, RPMI 1640 complete medium, RPMI 1640 culture medium, phosphate buffer (PBS) and 0.9% sodium chloride as medium, the morphology and particle size of ABZ nanometer powder were observed under SEM and compared with baseline to confirm the dispersion medium. ABZ nanometer powder was dispersed by conventional ultrasound or clasmotaxis ultrasound following conventional ultrasound, respectively. The particle size of ABZ nanometer powder was investigated and then compared with baseline to screen the optimal dispersion method. The change of particle size was investigated under 5-60 min of conventional ultrasound to confirm the duration of ultrasound. RESULTS: The different degree of polymerization of ABZ nanometer powder appeared in 5 kinds of dispersion mediums; the particle size of them were all higher than baseline. The polymerization of ABZ nanometer powder was slightly in PBS, 0.9% sodium chloride and ultrapure water, and the increase of particle size was also slightly. PBS was suitable medium for special growth environment of cell. By means of clasmotaxis ultrasound following conventional ultrasound, the particle size of ABZ nanometer powder was increased slightly. Within 5-45 min, the particle size of ABZ nanometer powder was decreasing with ultrasound time; within 45-60 min, the particle size of ABZ nanometer powder was growing and reuniting with ultrasound time. The ultrasound duration lasted for 30 min based on time cost. Mean particle size of ABZ nanometer powder was (387±3.6) nm; there was no significant difference between it and baseline ( $P>0.05$ ). CONCLUSIONS: The method can inhibit the polymerization of nanometer powder effectively, and it is suitable for the biological safety study of ABZ nanometer powder.

**KEY WORDS** Albendazole; Nanometer powder; Dispersion method; Dispersion medium; Particle size; Biological safety

<sup>△</sup> 基金项目:国家科技计划863重点计划资助项目(No. 2007AA021805);新疆医科大学第一附属医院药学专项基金资助项目(No.2011YX01)

\* 药师,硕士研究生。研究方向:药理学。电话:0991-4363438。E-mail:yunfang0816@163.com

# 通信作者:副教授,主任药师。研究方向:临床药理学、药物新制剂与新剂型研究。E-mail:jhw716@163.com

影响纳米药物生物安全性的关键指标是纳米药物的粒径及粒径分布<sup>[1]</sup>。此外,表面电荷、微粒形貌也与纳米药物的生物安全性密切相关<sup>[2]</sup>。但纳米微粉的高表面活性和高比表面积,导致其悬浮液的高度不稳定,易发生团聚、沉降、粒径增大、晶型转化、奥斯瓦尔德熟化效应等稳定性问题<sup>[3-4]</sup>。在进行细胞毒性等特殊生物安全性评价的过程中,纳米悬浮液的粒径、粒径分布等可能发生显著变化,导致体外细胞毒性等生物

安全性评价结果不能反映真实情况。同时,细胞对生长环境的特殊要求,在一定程度上也限制了悬浮液分散介质的种类<sup>[5]</sup>,从而极大地限制了对纳米药物生物学特性及作用机制(包括细胞对药物的介导、药物在细胞中的分布及其与细胞之间的相互作用等)的深入研究和认识。因此,选取适宜于生物安全性评价的纳米药物微粉的分散方法,对于纳米级药物的进一步开发研究至关重要。

试验前期,基于改善难溶性药物阿苯达唑(Albendazole, ABZ)生物利用度的目的,笔者制备了平均粒径为(370±5.7) nm的ABZ纳米微粉<sup>[6]</sup>(专利号:ZL201010527042.2);结合ABZ纳米微粉特殊的纳米效应(如小尺寸效应、表面效应)及细胞生长的特殊要求,有针对性地考察了ABZ纳米微粉在超纯水、洛斯维·帕克纪念研究所(RPMI)1640完全培养基(含胎牛血清)、RPMI 1640培养液、磷酸盐缓冲液(PBS)、0.9%氯化钠溶液5种不同分散介质中的分散情况,以选择最佳分散介质;之后考察采用普通超声(45 MHz, 30 min)、普通超声与细胞破碎超声(800 W, 5 min)结合两种分散方式对ABZ纳米微粉分散度的影响,以建立可用于细胞毒性等生物安全性评价的最佳分散方法。本研究为ABZ生物安全性评价及纳米级抗包虫药物的进一步开发研究奠定基础。

## 1 材料

ZS90激光粒度散射分析仪(英国马尔文公司);JSM-6380扫描电子显微镜(日本电子公司)。

ABZ原料药(广西桂林南药股份有限公司,批号:M-060605,纯度:99%);聚山梨酯80(南京威尔化工有限公司);聚丙烯酸钠、泊洛沙姆188(美国Sigma公司);胎牛血清、RPMI 1640培养基(美国Gibco公司);氯化钠、氯化钾、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾(天津盛奥化学试剂公司)。

## 2 方法与结果

### 2.1 统计学分析

采用SPSS 13.0软件对数据进行统计学分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本均数比较采用独立样本的*t*检验,多组样本均数比较采用方差齐性检验,组间比较采用单因素方差分析。以*P*<0.05为差异有统计学意义。

### 2.2 ABZ纳米微粉的制备

称取处方量的ABZ,配制1 390 mg/L ABZ的冰醋酸溶液4 ml,同时配制100 ml含聚丙烯酸钠(1 000 mg/L)和泊洛沙姆188(2 000 mg/L)的混合溶液。在超声或搅拌条件下,将ABZ的冰醋酸溶液与混合溶液进行快速混合,得到ABZ浆料。离心(2 710×*g*, 30 min),取其沉淀物进行冷冻干燥,获得纳米级ABZ微粉。

### 2.3 ABZ纳米微粉形貌的表征

ABZ原料药微粉与纳米微粉的扫描电镜图见图1。

由图1可见,ABZ原料药微粉为粗粉,呈不规则团块状,粒径不均一;ABZ纳米微粉为超细粉,呈不规则粒状,粒径分布均匀。对微粉粒径进行测量,结果ABZ原料药微粉和ABZ纳米微粉平均粒径分别为(1 650±7.1)、(370±5.7) nm。

### 2.4 ABZ纳米微粉在5种分散介质中的表征

称取5 mg ABZ纳米微粉,分别加入5 ml RPMI 1640完全培养基(含胎牛血清)、RPMI 1640培养液、PBS、0.9%氯化钠溶液、超纯水,使其质量浓度均为1 000 mg/L,超声30 min,采用

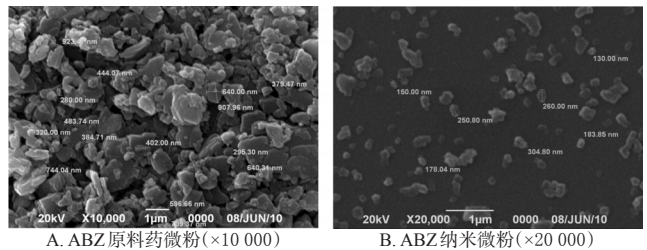


图1 ABZ纳米微粉扫描电镜图

Fig 1 The scanning electron microscopy of Albendazole nanometer powder

扫描电镜对其形貌进行观察。以粒径为考察指标,筛选可用于生物安全性研究的ABZ纳米微粉的最佳分散介质。ABZ纳米微粉在5种分散介质中的扫描电镜图见图2。

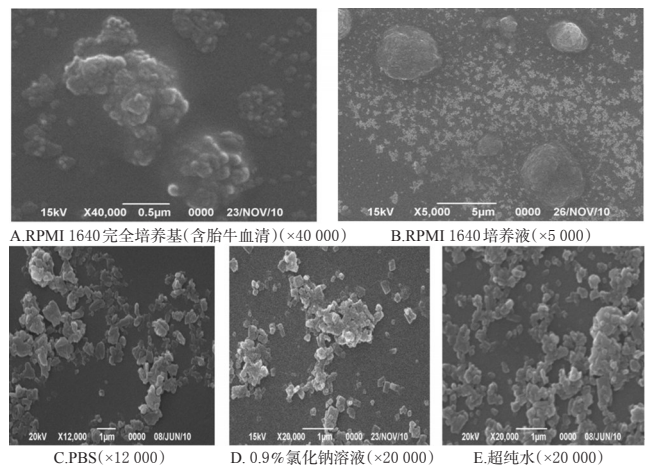


图2 ABZ纳米微粉在5种分散介质中的扫描电镜图

Fig 2 The scanning electron microscopy of Albendazole nanometer powder in 5 different mediums

由图2可见,纳米微粉在5种分散介质中均发生了不同程度的聚合。其中,微粉在RPMI 1640完全培养基及培养液中团聚最为显著(图2A、图2B),粒子大量黏合在一起,仅能观察到粒子黏合团聚后的整体外观;在PBS、0.9%氯化钠溶液和超纯水中也发生聚合黏附,但聚合程度相对轻微,图中可观察到单个粒子的外观形貌(图2C、图2D、图2E)。

ABZ纳米微粉在5种分散介质中的粒径测定结果见表1。

表1 ABZ纳米微粉在5种分散介质中的粒径测定结果( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab 1 The results of parameters of Albendazole nanometer powder in 5 different mediums( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

分散介质	平均粒径, nm
RPMI 1640完全培养基	664.5±4.81
RPMI 1640培养液	724.5±2.80
PBS	409.5±3.60
0.9%氯化钠溶液	427.5±4.50
超纯水	396.0±2.43

由表1可见,ABZ纳米微粉粒径普遍变大,其中在RPMI 1640完全培养基及培养液中粒径增大现象最为明显,分别增大至粒径基础值的1.80倍和1.96倍;在PBS、0.9%氯化钠溶液和超纯水中粒径增大幅度较小,粒径结果与扫描电镜检测结果较为一致。

综合以上结果, PBS、0.9%氯化钠溶液和超纯水均可作为用于生物安全性研究的微粉分散介质;结合细胞对生长环境的特殊要求, PBS能够更好地维持细胞生长的渗透压平衡条件和酸碱度条件, 故以PBS作为ABZ纳米微粉悬浮液的分散介质。

## 2.5 ABZ纳米微粉悬浮液的配制

取ABZ纳米微粉适量, 参照“2.4”项的考察结果, 以PBS为分散介质, 配制ABZ纳米微粉悬浮液, 备用。

## 2.6 不同超声分散方式的考察

取ABZ纳米微粉悬浮液适量, 依次采用两种分散方式处理悬浮液。方式一: 普通超声(45 MHz, 30 min); 方式二: 先普通超声(45 MHz, 30 min)后细胞破碎超声(800 W, 5 min)。以粒径为考察指标, 筛选可用于细胞染毒等生物安全性研究的ABZ微粉的最佳分散方式。结果, 采用方式一和方式二分散ABZ纳米微粉的平均粒径分别为(491.0 ± 3.30)、(382.6 ± 4.2) nm ( $n=3$ ), 多分散系数(PDI)分别为(0.440 ± 0.106)、(0.300 ± 0.124) ( $n=3$ ), 可见方式二的粒径未见显著增大。

## 2.7 不同超声时间的考察

参照“2.5”项的考察结果, 考察超声时间为5、15、30、45、60 min时纳米微粉的粒径变化。结果, 超声5~60 min时的粒径分别为926.6、540.0、472.3、460.4、550.0 nm。超声5~45 min, 随着超声时间的延长, ABZ纳米微粉的粒径不断减小; 超声45~60 min, 随着超声时间的延长, ABZ纳米微粉的粒径反而有团聚增大的趋势。超声30 min与45 min, ABZ混悬液粒径分别约为472 nm和460 nm, 经统计学分析, 二者比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。基于时间成本的考虑, 笔者选取30 min作为ABZ纳米微粉的最佳超声时间。经普通超声30 min后, 采用细胞超声破碎仪对ABZ纳米微粉悬浮液进行分散处理。

## 2.8 验证试验

制备ABZ纳米微粉的悬浮液, 对建立的分散方法进行验证。通过马尔文粒径仪对ABZ纳米悬浮液进行表征, 得ABZ纳米微粉悬浮液的平均粒径为(387 ± 3.6) nm。该分散方法得到的纳米悬浮液的粒径与基础值[(370 ± 5.7) nm]比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ), 在细胞毒理等生物安全性研究中较好地维持了原纳米微粉的表征。

## 3 讨论

ABZ为世界卫生组织推荐的抗包虫药物之一<sup>[7]</sup>, 其不溶于水和大多数有机溶剂, 溶解于冰醋酸, 微溶于丙酮、三氯甲烷<sup>[8-9]</sup>。对于ABZ纳米微粉的生物安全性评价(细胞毒性等), 笔者考虑将其以纳米悬浮液的形式加入细胞等微观结构, 从而考察ABZ纳米微粉适宜于生物安全性评价的分散方法。

悬浮液极易发生沉降、分层等物理稳定性问题, 纳米药物微粉的巨大表面积和高表面活性进一步加速了纳米颗粒团聚、沉降和晶体生长的速度, Stokes定律揭示了悬浮液颗粒大小和分散介质黏度的重要性<sup>[10-11]</sup>, 本试验分别对分散介质和分散方式进行了考察。

对于分散方式的考察, 笔者最初采用细胞破碎超声的方式, 但在试验中反复发现大量微粉黏附在超声探头或器具内壁的现象, 同时数据结果显示直接细胞破碎超声后的微粉粒径分布不均一, 故分析考虑引入预分散方式。将微粉和分散

介质经过普通超声进行预先混合分散后, 再进行细胞破碎超声等其他分散处理方式, 获得了较好的分散效果。与此同时, 笔者也采用了普通超声(45 MHz, 30 min)与高压均质(20 000 psi)组合的方式, 结果显示经分散处理后, ABZ纳米微粉的粒径显著降低, 并明显低于原制备的纳米微粉。分析高压均质方法可能已经改变原有微粉的某些理化性质, 微粉在强大微射流高压条件下, 进一步裂隙为具有更小粒径的微小粒子, 故考虑高压均质可作为微粉进一步纳米化的加工制备方式, 而不是分散方式。

本试验涉及的纳米微粉是ABZ原料药经纳米化后得到的中间体, 纳米微粉可进一步加工成胶囊、片剂等常规剂型<sup>[12]</sup>。试验中纳米微粉的悬浮液经分散处理后即刻加入细胞, 进行生物安全性评价, 故并未考察悬浮液中加入稳定剂(表面活性剂、高分子物质等)来提高ABZ纳米微粉的分散性, 这与成熟制剂(混悬剂)不同。因此, 是否可以在中间体中加入适宜的稳定剂以进一步提高悬浮液稳定性, 克服本分散方法不适于长期放置的缺陷, 如何保证细胞的生物安全性, 以及中间体的稳定剂加入限量还需要进一步的研究。

## 参考文献

- [1] 王雯. 纳米颗粒的细胞毒性试验研究[D]. 长春: 吉林大学, 2009: 11-12.
- [2] Liu G, Zhang D, Jiao Y, et al. In vitro and in vivo evaluation of riccardin D nanosuspensions with different particle size[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2013, 102(2): 620.
- [3] 徐清, 黄琴琴, 王永禄, 等. 纳米混悬剂物理稳定性的研究进展[J]. 中国医药工业杂志, 2012, 43(2): 148.
- [4] Sun W, Tian W, Zhang Y, et al. Effect of novel stabilizers-cationic polymers on the particle size and physical stability of poorly soluble drug nanocrystals[J]. *Nanomedicine*, 2012, 8(4): 460.
- [5] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版公司, 2004: 19-24.
- [6] 温浩, 陈迹, 王建华, 等. 纳米级阿苯达唑微粉及其制备方法: 中国, ZL201010527042.2[P]. 2012-08-08.
- [7] 王昕, 薛弘燮. 棘球蚴病的药物治疗及异丙肌苷在其中的表现[J]. 地方病通报, 2006, 21(2): 100.
- [8] 王建华, 温浩, 孙殿甲. 阿苯达唑体内过程和剂型研究进展[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2002, 15(3): 187.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 2010年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 393-394.
- [10] 陈莉, 汤恣, 陆伟根. 纳米混悬剂粒径稳定性及其控制策略[J]. 世界临床药物, 2010, 31(4): 245.
- [11] 崔福德. 药剂学[M]. 7版. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 153-157.
- [12] Liu Y, Xie P, Zhang D, et al. A mini review of nanosuspensions development[J]. *J Drug Target*, 2012, 20(3): 209.

(收稿日期: 2013-07-15 修回日期: 2013-08-07)