

• 药剂与工艺 •

载蟾毒灵聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒的制备及其评价

陈 美, 余江南, 徐希明, 许 颖*

江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013

摘要: **目的** 以聚氰基丙烯酸正丁酯(PBCA)纳米粒为载体, 制备包载中药单体蟾毒灵的纳米粒制剂。**方法** 采用醇中聚合法制备了包载蟾毒灵的PBCA纳米粒, 通过单因素试验及正交试验设计对制备工艺进行考察, 并测定了纳米粒的粒径分布、形态、包封率、载药量及溶血性等理化性质。**结果** 醇中聚合法制备的蟾毒灵PBCA纳米粒形态均匀, 平均粒径为 (151.2 ± 6.1) nm, 多分散系数为 0.133 ± 0.024 , Zeta电位为 (-7.09 ± 0.58) mV, 包封率为 $(70.812 \pm 6.139)\%$, 载药量为 $(1.990 \pm 0.291)\%$; 与蟾毒灵原料药相比, 该制剂的溶血性更低, 安全性有所提高。**结论** 蟾毒灵PBCA纳米粒的制备方法, 可有效缩短中药单体与酸性介质的接触时间, 制得的纳米粒各项理化性质良好, 可为易水解中药单体纳米粒载体的制备提供新思路。**关键词:** 蟾毒灵; 聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒; 醇中聚合法; 正交试验设计; 溶血性

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)09-1296-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.09.008

Preparation and evaluation of bufalin coated PBCA nanoparticles

CHEN Mei, YU Jiang-nan, XU Xi-ming, XU Ying

College of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China

Abstract: **Objective** To prepare poly-*n*-butylcyanoacrylate (PBCA) nanoparticles entrapped a Chinese medicine monomer of bufalin. **Methods** Alcohol polymerization method was adopted to prepare bufalin PBCA nanoparticles and the preparation process was optimized by single factor experiment and orthogonal test design, while size distribution, morphology, encapsulation efficiency (EE), drug loading and hemolytic of the prepared nanoparticles were systemly analyzed. **Results** The obtained nanoparticles were regular in shape with average particle size of (151.2 ± 6.1) nm, as well as a poly-dispersity index of 0.133 ± 0.024 . The Zeta potential and EE of bufalin PBCA nanoparticles were (-7.09 ± 0.58) mV and $(70.812 \pm 6.139)\%$, respectively. Drug loading of PBCA nanoparticles is $(1.990 \pm 0.291)\%$. Moreover, less hemolysis and improved safety were appeared in the formulation group, comparing with the bulk drug group. **Conclusion** Alcohol polymerization method, a method to prepare PBCA nanoparticles which exhibits good physical and chemical properties, can effectively reduce the exposure time of the Chinese medicine monomer in the acidic media. It may provide a new idea for the preparation of nanocarrier of easily hydrolyzed monomer.

Key words: bufalin; poly-*n*-butylcyanoacrylate nanoparticles; alcohol polymerization method; orthogonal design; hemolysis

蟾毒灵(bufalin)是蟾酥中抗肿瘤作用最强的蟾酥二烯酸内酯之一, 可从蟾蜍的耳后腺和皮肤分泌物中提取和分离得到^[1-2]。研究发现, 蟾毒灵主要通过诱导肿瘤细胞的凋亡及分化来抑制肿瘤血管生成, 阻滞肿瘤细胞增殖而发挥抗肿瘤作用, 在适宜的剂量内具有显著的抗癌活性和较高的治疗指数^[3]。蟾毒灵是一种疏水性药物, 因其毒性较大、口服半

衰期短以及治疗窗窄等特点而限制了其在临床的广泛应用^[4]。

α -氰基丙烯酸正丁酯(α -butylcyanoacrylate, α -BCA)单体中的双键被高负电性的氰基和烷氧基极化, 一些常见的阴离子如 Br^- 、 CH_2COO^- 、 OH^- 以及水、醇及氨基酸等物质中的亲质子基团均可引发其聚合, 使其形成聚氰基丙烯酸正丁酯(poly-*n*-

收稿日期: 2015-02-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81202930); 江苏省高校自然科学研究面上项目(12KJB350002); 江苏大学高级人才科研启动基金(11JDG122)

作者简介: 陈 美(1989—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药制剂。Tel: 15050857651 E-mail: 15050857651@163.com

*通信作者 许 颖, 女, 博士, 讲师, 主要从事中药单体新剂型的研究。Tel: (0511)85038451 E-mail: xyding@mail.ujs.edu.cn

butylcyanoacrylate, PBCA) 长链^[5], 进而自发组装形成纳米粒或纳米囊^[6-7], 是一种具有良好生物相容性的生物可降解材料。常见的 PBCA 纳米粒的制备方法为乳液聚合^[7]和界面缩聚法^[8], 乳液聚合法适合在酸性介质中溶解度大且较稳定的药物, 是将 α -BCA 加入到含有表面活性剂的酸性水溶液中, α -BCA 在乳化剂所形成的乳滴或胶束内部发生聚合, 按照药物的加入顺序分为一步法和两步法^[9]; 而界面缩聚法适于脂溶性药物, 是将 α -BCA 单体及药物溶于有机溶剂中得到的油相缓慢滴加到含有表面活性剂的大量水相中, 使 α -BCA 单体在两相扩散界面上聚合而得^[10-11]。这 2 种方法中, 为防止水中 OH^- 过多引发单体的快速聚合, 一般均需调节水相至酸性, 为保证单体充分聚合, 反应时间一般不少于 4 h, 这就容易造成对酸不稳定的药物的降解。

本实验设计了一种新型的醇中聚合法来制备蟾毒灵 PBCA 纳米粒, 该方法中 α -BCA 单体的聚合基本在醇中进行, 能避免药物在酸性介质中的降解, 可有效地包载中药单体蟾毒灵, 为易水解的中药单体纳米粒的制备提供了一种新思路。

1 仪器与材料

高效液相色谱仪, LC-10ADVP 泵, SPD-20A 紫外检测器, 日本岛津公司; H66025 超声清洗机, 无锡市超声电子设备有限公司; RE-2000A 旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; pH 计, 上海天达仪器有限公司; 79-1 恒温磁力搅拌器, 金坛市医疗仪器厂; JY 92-II 超声波细胞粉碎机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; 透射电子显微镜 (Tecnai 12, Philips company, Holland); Zetasizer Nano ZS90 激光粒度分析仪, 英国马尔文仪器有限公司。

蟾毒灵对照品, 质量分数 98%, 批号 20130120, 规格 1 g/支, 购自南京森贝伽生物科技有限公司; α -BCA 购自北京康派特医药科技开发有限公司; 普朗尼克 F68 购自德国 BASF 化学试剂公司; 其余试剂均购自国药集团化学试剂有限公司, 其中甲醇与

乙腈为色谱纯, 其他试剂为分析纯。

溶血实验所使用的新西兰家兔 (雄性, 体质量 2 kg) 由江苏大学动物实验中心提供, 动物使用许可证号 SCXK (苏) 2013-0011。

2 方法与结果

2.1 分析方法的建立

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Thermo Scientific C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水 (67:33); 体积流量 1 mL/min; 检测波长 296 nm; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 20 μL 。

2.1.2 溶液配制 精密称取蟾毒灵对照品 10 mg 于 100 mL 量瓶中, 甲醇溶解并稀释至刻度, 得到蟾毒灵储备液 (质量浓度 100 $\mu\text{g/mL}$)。

精密吸取 10 μL α -BCA 单体, 滴加入 5 mL 2% F68 水溶液中, 600 r/min 磁力搅拌 2 h 后, 加入乙腈溶液, 超声破乳, 于 15 000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下离心 10 min, 移取上清液备用。将备用上清液以流动相进行稀释, 即得空白辅料。取适量蟾毒灵储备液, 经流动相稀释配制成蟾毒灵样品 (5 $\mu\text{g/mL}$)。将备用上清液与储备液经流动相稀释混合, 即得蟾毒灵样品与辅料的混合物。

2.1.3 专属性试验 精密吸取流动相、空白辅料、蟾毒灵样品、蟾毒灵样品和辅料的混合物各 20 μL , 按照“2.1.1”项下色谱条件测定。由 HPLC 图谱 (图 1) 可知蟾毒灵样品溶液的出峰时间为 9.8 min, 而流动相与空白辅料在药物出峰位置均无干扰, 由图 1-D 可见药物的色谱峰可以达到基线分离, 该实验所选用的色谱条件专属性良好。

2.1.4 对照品溶液的制备和线性考察 精密吸取“2.1.2”项蟾毒灵储备液, 以流动相为溶剂, 分别稀释配制质量浓度为 0.5、1、3、5、10、15、20 $\mu\text{g/mL}$ 的系列标准溶液。按“2.1.1”项下的色谱条件测定, 记录峰面积, 以峰面积 (A) 对药物质量浓度 (C) 进行线性回归, 即得蟾毒灵的标准曲线, 回归方程为 $A = 10\,758 C - 128.16$ ($R^2 = 0.999\,9$)。结果表明,

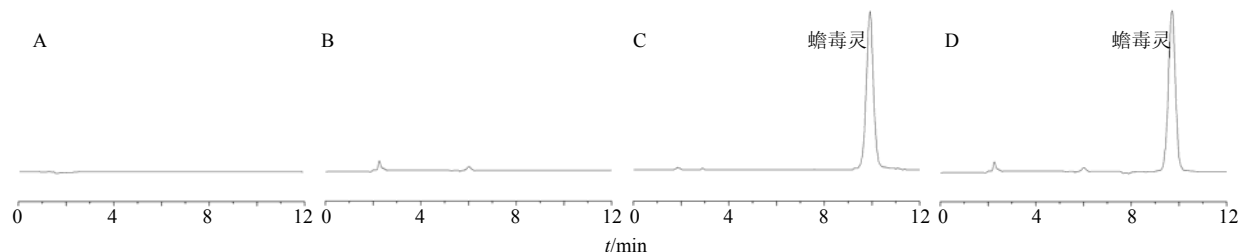


图 1 流动相 (A)、空白辅料 (B)、蟾毒灵样品 (C)、蟾毒灵样品和辅料的混合物 (D) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of mobile phase (A), blank accessories (B), bufalin sample (C), and mixture of bufalin and accessories (D)

蟾毒灵在 0.5~20 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

2.1.5 精密度试验 取“2.1.2”项蟾毒灵储备液配制成高、中、低(1、10、20 $\mu\text{g/mL}$) 3个质量浓度样品,按“2.1.1”项下的色谱条件,经 HPLC 各连续进样 5 次,测定 A ,计算日内精密度;1、10、20 $\mu\text{g/mL}$ 3个质量浓度的样品连续测 3 d,每天测定 1 次,得日间精密度。结果显示,高、中、低质量浓度的蟾毒灵样品日内及日间精密度分别为 0.418% 和 0.256%、1.655%和 1.286%、1.704%和 1.846%,表明本研究所选用的测定方法精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 取质量浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 的蟾毒灵溶液,分别于 0、4、8、12、24、48、72 h 经 HPLC 测定峰面积,计算 RSD。各时间点药物的 RSD 均小于 2.0%,表明蟾毒灵甲醇溶液在 72 h 内稳定性良好。

2.1.7 加样回收率试验 取“2.1.2”项下蟾毒灵储备液,分别配制成高、中、低(1、10、15 $\mu\text{g/mL}$) 3个质量浓度样品,各加入适量的辅料,按“2.1.1”项下色谱条件测定,记录峰面积,计算回收率。低、中、高 3个质量浓度的样品所得平均回收率分别为 $(100.728 \pm 0.345)\%$ 、 $(100.767 \pm 1.119)\%$ 和 $(95.642 \pm 0.283)\%$ 。

2.2 醇中聚合法制备蟾毒灵纳米粒

精密称量 3 mg 蟾毒灵,溶解在含有适量 F68 的乙醇体系中,精密吸取适量 α -BCA 单体,缓慢逐滴加入乙醇体系中,边滴加边搅拌(约 600 r/min),搅拌 5 h 后,将此乙醇体系逐滴加入到含 10% F68 的水相中,30 $^{\circ}\text{C}$ 、100 W 水浴超声使体系分散均匀;继续搅拌 0.5 h 后,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 真空旋转蒸发除去乙醇;200 W 探针超声 2 s $\times$ 200 次,过 0.8 μm 滤膜即可。

2.3 包封率与含药量检测

本研究采用超滤离心法^[5]测定纳米粒的包封率。吸取适量体积纳米粒混悬液,置于 0.5 mL 超滤离心管内(截留相对分子质量为 100 000),在 9 000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下离心 6 min,按“2.1.1”项色谱条件测定超滤膜下层溶液中蟾毒灵药物的量,此为未包载进纳米粒的游离蟾毒灵的量。精密吸取 0.4 mL 纳米粒混悬液,用甲醇定容至 5 mL,超声 10 min,于 15 000 r/min,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 25 min,取上清液进液相检测总游离药物。蟾毒灵 PBCA 纳米粒的包封率与载药量分别根据下列公式进行计算。

$$\text{包封率} = (W_z - W_y) / W_z$$

$$\text{载药量} = (W_z - W_y) / W_n$$

W_z 为纳米粒破乳后总游离药物(μg), W_y 为未包载进纳米粒的游离药物(μg), W_n 为纳米粒的质量(μg)

2.4 单因素考察制备工艺

通过预试验,选出制备过程中对纳米粒的包封率影响较大的 4 个因素:乙醇的体积分数、乙醇体系中 F68 的质量分数、 α -BCA 的用量、水相 pH 值,采用单因素实验对制备工艺进行考察。

2.4.1 乙醇的体积分数对包封率的影响 分别选用体积分数 95%、96%、98%、99% 的乙醇,按“2.2”项下方法制备蟾毒灵 PBCA 纳米粒,测定包封率,结果分别为 13.391%、30.836%、59.342%、4.937%。可以看出,乙醇体积分数在 95%~98% 内,随着乙醇比例的增加,包封率近似线性增加,由 13.391% 提高到 59.342%。乙醇体积分数为 98% 时,制备得到的纳米粒的包封率最高,随着乙醇比例继续增加,包封率反而有所下降。

2.4.2 乙醇体系中 F68 的质量分数对包封率的影响 分别调节乙醇体系中 F68 的质量分数为 0、10%、20%、30% 制备蟾毒灵 PBCA 纳米粒。包封率测定结果分别为 7.554%、28.538%、72.382%、73.193%,包封率随着 F68 质量分数的增加逐渐增大,F68 质量分数为 20% 时包封率为 72.38%,与 F68 质量分数小于 20% 的处方相比,包封率有显著提高。

2.4.3 α -BCA 的用量对包封率的影响 分别使用 25、50、75 μL 的 α -BCA 单体,按“2.2”项下方法制备蟾毒灵 PBCA 纳米粒,测得包封率的结果分别为 15.124%、54.926%、42.453%。结果发现,随着 α -BCA 单体用量的增加,包封率先增加后降低, α -BCA 单体的用量为 50 μL 时,包封率最高。

2.4.4 水相 pH 值对包封率的影响 维持其他条件不变,分别调节水相的 pH 值为 2.0、4.0、7.0 制备蟾毒灵 PBCA 纳米粒,并对各样品的包封率进行检测。结果包封率分别为 19.38%、60.15%、36.21%,水相 pH 值为 4.0 时,蟾毒灵在 PBCA 纳米粒中的包封率最高,而 pH 值为 2.0 或 7.0 时,包封率均有下降的趋势。

2.5 处方优化

根据单因素试验结果,发现蟾毒灵纳米粒的包封率随着体系中 F68 量的增加而增加,当 F68 加入量超过 20% 时,包封率却未见明显增长,且由于过多的表面活性剂有可能会造成毒副作用,有研究表明^[12],纳米粒的靶向性与粒径有关,0.1~5 nm 的纳米粒在血液中会迅速被消除,5~50 nm 的纳米粒

可以通过肝脏的内皮或淋巴系统到达脾和骨髓,而50~200 nm的纳米粒可以渗透入肿瘤,因此固定乙醇体系中F68的质量分数为20%,以包封率(Y_1)及粒径(Y_2)为指标,乙醇体系的体积分数(A)、 α -BCA的用量(B)、水相pH值(C)为因素,结合 $L_9(3^4)$ 正交试验设计,对方剂进行优化。正交试验设计与结果见表1,方差分析见表2。

由表2可知,以包封率为考察指标时,因素A、B、C均对纳米粒的包封结果有显著影响,影响力大小顺序为 $B>A>C$;以粒径为考察指标时,因素A无显著影响,因素B的影响力超过因素C。由此

表1 $L_9(3^4)$ 正交试验设计与结果Table 1 Design and results of $L_9(3^4)$ orthogonal test

试验号	A/%	B/ μ L	C	D(误差)	$Y_1/\%$	Y_2/nm
1	99 (3)	75 (3)	2 (1)	(3)	21.19	180.0
2	97 (1)	50 (2)	7 (3)	(3)	65.39	164.2
3	99 (3)	25 (1)	7 (3)	(2)	33.65	161.0
4	97 (1)	75 (3)	4 (2)	(2)	52.79	239.5
5	98 (2)	75 (3)	7 (3)	(1)	63.11	245.4
6	99 (3)	50 (2)	4 (2)	(1)	69.98	149.8
7	98 (2)	50 (2)	2 (1)	(2)	71.17	114.2
8	98 (2)	25 (1)	4 (2)	(3)	68.93	157.9
9	97 (1)	25 (1)	2 (1)	(1)	29.86	138.5
K_1	148.04	132.44	122.22	162.95		
K_2	203.21	206.54	191.70	157.61		
K_3	124.82	137.09	162.15	155.51		
R_K	78.39	74.10	69.48	7.44		
J_1	542.2	457.4	432.7	533.7		
J_2	517.5	428.2	547.2	514.7		
J_3	490.8	664.9	570.6	502.1		
R_J	51.4	236.7	137.9	31.6		

表2 方差分析结果

Table 2 Analysis of variance

因素	响应值	偏差平方和	自由度	F值	显著性
A	Y_1	1 080.877	2	110.192	0.009
	Y_2	440.549	2	2.611	0.277
B	Y_1	1 148.415	2	117.078	0.008
	Y_2	11 103.976	2	65.820	0.015
C	Y_1	810.564	2	82.635	0.012
	Y_2	3630.469	2	21.520	0.044
D	Y_1	9.810	2		
	Y_2	168.702	2		

可知,无论是在包封率指标还是粒径指标中,因素B均是最主要影响因素,结合表1,发现 B_2 最佳。表1表明,因素C为 C_2 时包封率指标最佳,而为 C_1 时粒径指标最佳,但因素C的包封率极差相对小于粒径极差,因此 C_2 最佳;因素A对包封率有影响,对粒径无影响,故 A_2 最优。综上所述,蟾毒灵PBCA纳米粒的优化工艺为 $A_2B_2C_2$,即乙醇体系的体积分数为98%, α -BCA的用量为50 μ L,水相pH值为4.0。在此工艺条件下,按“2.2”项下方法制备蟾毒灵PBCA纳米粒,对方剂进行验证,测定包封率为 $(70.812\pm 6.139)\%$ ($n=3$),平均粒径为 (151.2 ± 6.1) nm,载药量为 $(1.990\pm 0.291)\%$ 。

2.6 蟾毒灵纳米粒粒径及形态分布

取蟾毒灵PBCA纳米粒2 mL,用蒸馏水稀释至4 mL,用激光粒度仪检测粒径及电位,粒径分布图见图2。实验结果显示蟾毒灵PBCA纳米粒的平均粒径为 (151.2 ± 6.1) nm,多分散系数为 0.133 ± 0.024 ,Zeta电位为 (-7.09 ± 0.58) mV。

取蟾毒灵PBCA纳米粒适量,用蒸馏水稀释10倍后,取1滴滴在覆有碳支持膜的铜网上,放置片刻后,用滤纸吸去多余的纳米粒,滴加适量2%磷钨酸负染,待干燥后,用透射电子显微镜观察粒子形态,如图3所示。可见制得的蟾毒灵PBCA纳米粒形态呈规则球形。

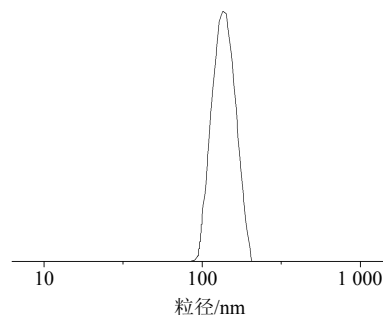


图2 粒径分布图

Fig. 2 Particle size distribution

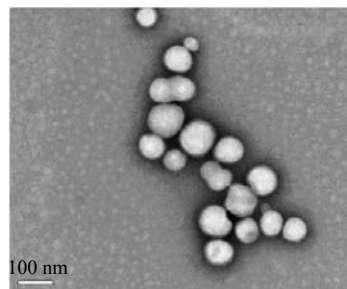


图3 蟾毒灵PBCA纳米粒透射电镜扫描图谱

Fig. 3 TEM photographs of BF-PBCA-NPs

2.7 溶血性实验

本研究制备的蟾毒灵 PBCA 纳米粒的给药方式为 iv 给药,为评价该剂型的安全性,采用体外试管法,观察蟾毒灵原料药组与蟾毒灵纳米粒组的溶血情况。

2.7.1 红细胞混悬液的配制 溶血性实验是通过考察药物体外与家兔红细胞的相互作用,红细胞混悬液的配制^[13]:抽取新西兰家兔兔血 10 mL,加入事先经肝素钠处理的离心管内,用玻璃棒轻微搅拌,并加入适量生理盐水,4 000 r/min 离心 10 min,倾出上清液。继续用生理盐水冲洗血细胞层,离心,重复冲洗多次直至上清液不显红色。用生理盐水将红细胞稀释至 2%,即为红细胞混悬液,4 ℃冷藏备用。

2.7.2 溶血性评价 取 12 支洁净的试管,分别标号,其中 1~5 号为原料药组(蟾毒灵质量浓度依次为 4、8、12、16、20 μg/mL);6~10 号为蟾毒灵

PBCA 纳米粒组(所含蟾毒灵质量浓度依次为 4、8、12、16、20 μg/mL);11 号与 12 号分别为阴性对照组与阳性对照组。按表 3 所列数据加样,将各组样品 37 ℃水浴保温,分别于 0.3、1.0、2.0、3.0、4.0、6.0 h 观察溶血现象^[14]。平行操作 3 次。并根据表 4 所示的溶血评判标准对各组结果进行评价,实验结果见表 3。由表 3 可见,0.3 h 时,原料药组 5 号管与制剂组 10 号管可观察到轻微溶血现象,阳性对照组(12 号管)出现全溶血现象,其余各管均无溶血现象。随着时间延长,1.0 h 时,原料药组 5 号管出现中度溶血现象;2.0 h 时,原料药组 4 号管出现轻微溶血现象;4.0 h 时,原料药组 5 号管出现重度溶血现象。而纳米粒组仅 10 号管出现轻微溶血现象,其余各管均无溶血现象。可见高剂量的蟾毒灵具有一定的溶血性,而蟾毒灵包载在 PBCA 纳米粒后仅在高剂量组出现轻微溶血现象,安全性大大增强。

表 3 溶血性实验各组加样量及结果

Table 3 Hemolytic experimental sample added in each group and results

序号	原料药/mL	蟾毒灵 PBCA 纳米粒/mL	蒸馏水/mL	生理盐水/mL	2%红细胞 混悬液/mL	t/h					
						0.3	1.0	2.0	3.0	4.0	6.0
1	0.1			2.4	2.5	----	----	----	----	----	----
2	0.2			2.3	2.5	----	----	----	----	----	----
3	0.3			2.2	2.5	----	----	----	----	----	----
4	0.4			2.1	2.5	----	----	---	---	---	---
5	0.5			2.0	2.5	---	---	---	---	---	---
6		0.1		2.4	2.5	----	----	----	----	----	----
7		0.2		2.3	2.5	----	----	----	----	----	----
8		0.3		2.2	2.5	----	----	----	----	----	----
9		0.4		2.1	2.5	----	----	----	----	----	----
10		0.5		2.0	2.5	---	---	---	---	---	---
11			2.5	2.5	2.5	----	----	----	----	----	----
12					2.5	++++	++++	++++	++++	++++	++++

表 4 溶血评判标准

Table 4 Hemolysis criteria

现象	结果	代表符号
红细胞全部下沉,上层液无色澄明	无溶血	----
溶液浅红色,管底有较多红细胞残留	轻微溶血	---
溶液明红色,管底有些许红细胞残留	中度溶血	---
溶液棕红色,管底有少量红细胞残留	重度溶血	---
溶液澄明红色,管底无红细胞残留	全溶血	++++
溶液中有棕红色或红棕色絮状沉淀,红细胞凝聚 摇匀后不分散		+++++

3 讨论

在研究中发现,α-BCA 在乙醇中亦可聚合且聚合速度较慢,易于控制,无需加酸调节,因此设计了醇中聚合法制备蟾毒灵 PBCA 纳米粒。该方法首先将 α-BCA 单体加至浓醇(98%)中使其发生聚合,进而转移至水相中形成纳米粒。通过预试验发现,随着乙醇体积分数的降低,α-BCA 单体的聚合速率加快,且不同体积分数下,纳米粒的包封率亦会发生变化,故推测大部分 α-BCA 单体的聚合是由醇羟基引发,发生在乙醇中,由于浓醇中含有极少量水

(约 2%), 也有部分聚合由羟基引发, 发生在醇水中。该方法可大大缩短药物与酸性介质的接触时间, 对于蟾毒灵这类具有内酯结构的中药单体, 有利于保证其稳定性。

单因素试验发现在乙醇体系中加入 F68 可起到稳定剂的作用, 随着体系中 F68 量的增加, 蟾毒灵的包封率随之提高, 但是, 当 F68 加入量超过 20% 时, 纳米粒的包封率未见明显增长, 且由于过多的表面活性剂有可能会造成毒副作用, 因此本研究进行正交设计试验时固定乙醇体系中 F68 的质量分数为 20%。亦曾考察水相中 F68 用量的影响, 发现水中 F68 质量分数的变化对包封率并无显著影响。

本研究通过正交试验设计对方剂进行优化, 发现乙醇体积分数为 98%、 α -BCA 单体用量为 50 μ L、pH 为 4.0 时, 所获的处方工艺最佳。可能是 ① 羟基引发 BCA 聚合的速率较快, 当体系中含水量较高时, 单体快速聚合, 使得药物难以有效包载; 而当体系中乙醇的体积分数达到 99% 时, 体系中的 OH⁻ 量过少, 醇羟基引发聚合的效率低于 OH⁻, BCA 聚合过缓, 在反应时间内难以聚合成 α -BCA 长链包载药物。② 当 α -BCA 单体用量为 20 μ L 时, 用量过低, 聚合形成的纳米粒不足以完全包载药物, 而用量过高时, 形成的纳米粒粒径偏大, 易被离心及过滤步骤除去。③ α -BCA 单体在乙醇体系中虽已基本完成 PBCA 长链的聚合, 但在加入到水相体系后可能仍有部分单体聚合发生, 并在水相体系形成纳米粒。pH 为 2.0 时, 酸性过强, 不利于纳米粒的形成; pH 为 7.0 时, BCA 在水相体系中的部分聚合发生过快, 也不利于形成稳定的纳米粒。

通过溶血性实验发现蟾毒灵 PBCA 纳米粒的安全性相较于蟾毒灵原料药显著增强。可能是由于本研究的制备方法能有效包封蟾毒灵, 减少其与血液接触, 同时, PBCA 纳米载体是一种生物相容性载体材料, 进一步降低了蟾毒灵的溶血性。

本研究采用醇中聚合法制备蟾毒灵 PBCA 纳米粒, 该方法单体的聚合在浓醇中进行, 可大大缩短药物与酸性介质的接触时间, 制备得到的纳米粒粒径均匀, 形态规则, 能有效的包封蟾毒灵, 并可有效降低蟾毒灵的溶血性。该方法有利于保证在酸性条件下易水解药物的稳定性, 可为在酸性条件中不稳定的中药单体 PBCA 纳米粒的制备提供一种新的思路和方法。

参考文献

- [1] 康小红, 龚亚斌, 王立芳, 等. 蟾毒灵逆转肺腺癌 H1975 细胞对吉非替尼耐药的体内实验研究 [J]. 肿瘤, 2013, 33(4): 304-308.
- [2] 暴蕾, 段海霞, 王则绯. 蟾毒灵对人卵巢癌 SKOV-3 细胞增殖的影响 [J]. 现代生物医学进展, 2014, 24(14): 4662-4665.
- [3] 殷佩浩. RGD 修饰的蟾毒灵多级靶向纳米粒的制备及其治疗大肠癌的机制研究 [D]. 上海: 第二军医大学, 2012.
- [4] Ying L, Hang Z, Lin R D, et al. Preparation, characterization and evaluation of bufalin liposomes coated with citrus pectin [J]. *Colloids Surf A: Physicochem Eng Aspects*, 2014, 444: 54-62.
- [5] Kiran R C, Mukesh U K, Arehalli S M, et al. Opsonization, biodistribution, cellular uptake and apoptosis study of PEG ylated PBCA nanoparticle as potential drug delivery carrier [J]. *Pharm Res*, 2012, 29(1): 53-68.
- [6] Vauthier C, Dubernet C, Fattal E, et al. Poly (alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2003, 55(4): 519-548.
- [7] 王博, 袁子民, 程岚. β -榄香烯聚氧基丙烯酸正丁酯纳米粒的制备工艺研究 [J]. 中草药, 2011, 42(3): 474-477.
- [8] Joshi S A, Chachan S S, Sawant K K. Rivastigmine-loaded PLGA and PBCA nanoparticles: preparation, optimization, characterization, *in vitro* and pharmacodynamic studies [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2010, 76(2): 189-199.
- [9] Fei R, Ruda C, Ying W, et al. Paclitaxel-loaded poly(*n*-butylcyanoacrylate) nanoparticle delivery system to overcome multidrug resistance in ovarian cancer [J]. *Pharm Res*, 2011, 28(4): 897-906.
- [10] 高士雅, 徐敏, 陈志鹏. 聚氧基丙烯酸正丁酯纳米粒在药物传输系统中的应用 [J]. 中国新药杂志, 2013, 22(11): 1278-1284.
- [11] 黄红娜, 张丹参, 张力, 等. 纳米囊及其制备方法的研究 [J]. 河北北方学院学报: 医学版, 2010, 27(3): 59-61.
- [12] Teresa M, Cinzia A. V, Claudia C, et al. Effects of external phase on *D*-cycloserine loaded W/O nanocapsules prepared by the interfacial polymerization method [J]. *Eur J Med Chem*, 2011, 46(7): 2828-2834.
- [13] Pei H Y, Yan W, Yan Y Q, et al. Bufalin-loaded mPEG-PLGA-PLL-cRGD nanoparticles: preparation, cellular uptake, tissue distribution, and anticancer activity [J]. *Int J Nanomed*, 2012, 7: 3961-3969.
- [14] 宗爽, 苏宏健, 苏云明, 等. 紫杉醇注射液对血管刺激性与溶血性试验研究 [J]. 黑龙江医药, 2013, 26(4): 605-607.