

2 载 BSA 纳米粒的制备与表征

2.1 引言

PLGA 是一种生物可降解的高分子聚合物,具有良好的生物相容性,广泛应用于各种微球和纳米粒的制备,目前已有多种上市的微球制剂采用其作为载体材料。

目前,纳米粒的制备方法主要有:乳化蒸发法、溶剂扩散法、盐析法和纳米沉积法等。其中,纳米沉积法因其操作简单、可重复性强而广泛应用于纳米粒的制备。

本章将采用纳米沉积法,以 PLGA 为载体材料,制备粒径在 100—200 nm 的载 BSA 的纳米粒,采用考马斯亮蓝 G250 法测定其包封率和载药量,通过单因素实验考察纳米粒制备过程中的影响因素;并利用激光粒度仪和透射电子显微镜对所制备的纳米粒进行表征。

2.2 实验部分

2.2.1 实验仪器及试剂

2.2.1.1 主要仪器

BS110S 型分析天平	北京 Satrorius 仪器系统有限公司
KQ-100 型超声波清洗器	昆山市超声仪器有限公司
PHS-3C 型数字式酸度计	上海雷磁仪器厂
85-2 型恒温磁力搅拌器	常州国华电器有限公司
TDL-5-A 型台式离心机	上海安亭科学仪器厂
UV-2102PC 紫外可见分光光度计	尤尼柯仪器有限公司
MAN5004 型激光粒度分析仪	英国 Malvern 仪器公司
U410 Premium 型超低温冰箱	美国 New Brunswick Scientific 公司
Tecnai G2 20 型透射电子显微镜	荷兰 FEI 公司

2.2.1.2 主要试剂

PLGA (50:50, Mw=20 000)	药用级	山东岱罡生物材料有限责任公司
磷酸二氢钠	分析纯	天津市广成化学试剂有限公司
磷酸氢二钠	分析纯	天津市广成化学试剂有限公司
牛血清白蛋白		上海凌飞科技有限公司, Sigma 分装
丙酮	分析纯	上海试一化学试剂有限公司
考马斯亮蓝 G250	分析纯	Sigma 分装, 上海晶纯试剂有限公司
无水乙醇	分析纯	上海试一化学试剂有限公司
异丙醇	分析纯	上海试一化学试剂有限公司

2.2.2 实验方法

2.2.2.1 纳米粒的制备

根据文献资料总结, 本章采用纳米沉积法制备纳米粒, 其制备工艺为:

(1) 精密称取一定量的 PLGA, 加入丙酮使之完全溶解, 得到一定浓度的溶液, 即为有机相。

(2) 配置一定的分散相。分散相选择见下文。

(3) 量取一定体积的分散相, 置于恒温磁力搅拌器上搅拌, 向其中缓慢滴加一定体积的有机相。

(4) 继续搅拌约 4 h, 待有机溶剂完全挥发即形成纳米粒, 得纳米粒悬浮液。若出现沉淀, 经 0.8 μm 微孔滤膜过滤后供下一步使用, 或经真空冷冻干燥后得纳米粒的冻干粉。

2.2.2.2 载 BSA 纳米粒的制备

本文选用 BSA 作为模型蛋白, 根据文献资料总结和预实验, 蛋白质主要是通过缓冲液中孵育过夜而吸附于纳米粒上。具体方法如下:

称取一定量的 BSA, 磁力搅拌下, 向其中加入一定体积的纳米粒悬浮液, 搅拌约 24 h 后, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 15 000 rpm 离心 20 min, 用 0.9% NaCl 溶液洗涤三次, 所得的沉淀再以等体积的 0.9% NaCl 溶液或超纯水再悬浮, 备用。

2.2.2.3 纳米粒制备过程中的影响因素

经预试验, 在一定的范围内, 主要考察了以下几个因素对纳米粒制备的影响, 包括聚合物的浓度、分散相种类、有机相与水相比比例。纳米粒的制备, 主要考察了所得的纳米粒的体系的稳定性、粒径和 zeta 电位作为指标进行综合评价。同时, 还需考察 BSA 浓度对所得的纳米粒的体系的稳定性、粒径、zeta 电位、载药量和包封率的影响。

2.2.2.4 纳米粒中药物含量及包封率的测定

(1) 考马斯亮蓝 G250 试剂的配制

精密称取 50.00 mg 的考马斯亮蓝 G250, 加入 25 mL 的 95% 乙醇溶解后, 转入容量瓶中, 再向其中加入 85% 磷酸 50 mL, 定容到 500 mL, 备用。该溶液常温下可存放一个月。

(2) BSA 标准曲线的建立

精密称取 25.00 mg BSA, 溶于 0.9% NaCl 溶液中, 定容到 25 mL, 配成浓度为 1.00 mg/mL 的 BSA 母液。

分别准确吸取母液 0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 mL 到 10 mL 容量瓶中, 加入 0.9% NaCl 溶液定容至 10.0 mL, 得待测样品。

分别准确量取上述样品 0.1 mL, 向其中加入考马斯亮蓝 G250 试剂 4.0 mL, 摇匀, 采用 0.9% NaCl 溶液同法制得的样品为空白对照, 在 2 min 至 1 h 内, 在紫外可见分光光度计上于 $\lambda = 595 \text{ nm}$ 处测定吸光度值 A。

将实验测得的吸光度值 A 与对应的 BSA 浓度关系线性拟合, 得到标准曲线。

(3) BSA 考马斯亮蓝法回收率的测定

精密称取一定量的 BSA, 以高、中、低三种浓度, 加入到适量空白纳米粒悬浮液中, 待 BSA 充分溶解后, 于 4℃ 下 15000 rpm 离心 20 min。用 0.9% NaCl 溶液洗涤三次, 收集上清液, 同标准曲线项下方法测定吸光度, 每个浓度三个平行样。代入按标准曲线, 得到上清液中的药物浓度, 计算平均方法回收率和标准偏差。

(4) 纳米粒中的聚合物含量

精密量取 2.0 mL 纳米粒悬浮液, 置于青霉素小瓶中, 经冷冻干燥后, 测定其中 PLGA 的含量, 平行三个样, 取其平均值。

(5) 载药量和包封率的测定

取纳米粒悬浮液，4℃下 15000 rpm 离心 20 min，用 0.9% NaCl 溶液洗涤三次，收集上清液，同标准曲线项下方法测定吸光度，按标准曲线换算得到上清液中的药物浓度，计算纳米粒的包封率(Entrapment Efficiency, EE%)和载药量(Drug Loading, DL%)。公式如下：

$$EE\% = \frac{(W_a - W_s)}{W_a} \times 100\%$$

$$DL\% = \frac{(W_a - W_s)}{W_t} \times 100\%$$

其中， W_a ：初始投药量 (mg)； W_s ：上清液中含药量 (mg)；

W_t ：纳米粒的总质量 (mg) (即纳米粒中聚合物的含量，经冷冻干燥后测定)

2.2.2.5 表征

(1) 纳米粒的表征

取一定量的纳米粒悬浮液，加超纯水稀释至 PLGA 含量为 0.5—1 mg/mL，采用激光粒度仪测定其粒径和 zeta 电位。

取一定量的纳米粒悬浮液，以超纯水稀释到 PLGA 含量为 0.5—1 mg/mL。取少量纳米粒悬浮液，滴至铺有碳膜的铜网上，下衬滤纸，再滴加 1% 磷钨酸负染色，自然晾干后在透射电子显微镜下观察纳米粒的表面形态。

(2) 载 BSA 纳米粒的表征

取冷冻干燥后的载 BSA 纳米粒，加 0.9% NaCl 溶液复溶后，稀释到 PLGA 含量为 0.5—1 mg/mL。取少量纳米粒悬浮液，滴至铺有碳膜的铜网上，下衬滤纸，再滴加 1% 磷钨酸负染色，自然晾干后在透射电子显微镜下观察纳米粒的表面形态

2.3 结果和讨论

2.3.1 纳米粒制备过程中的影响因素

2.3.1.1 PLGA 浓度对纳米粒的影响

以纳米粒的粒径及体系的稳定性为指标，以丙酮为有机相，水为分散相，固定

有机相与分散相体积比例,考察不同 PLGA 浓度对纳米粒制备的影响,结果见表 2.1。

表 2.1 PLGA 浓度对纳米粒制备的影响

No.	PLGA 浓度(mg/mL)	有机相/分散相(v/v)	粒径(nm)	体系的稳定性
1	2	1	86.1±12.34	较好, 沉淀较多
2	4	1	107.4±19.60	较好, 沉淀较少
3	5	1	110.1±19.77	较好, 沉淀较少
4	10	1	300.1±26.24	较好, 沉淀较多

由表 2.1 可知,随 PLGA 浓度增大而增加,纳米粒的粒径有增大的趋势,但纳米粒的稳定性却没有同样的趋势。随着 PLGA 的浓度的增加,同样的滴加速度下,其中 PLGA 的含量大,待丙酮挥发后,固化在一起形成纳米粒的聚合物浓度高,从而表现为纳米粒的粒径增大,这也就可能会导致该体系的稳定型下降。而随着制备时间的延长,由于纳米粒不够稳定,导致产生了一定的沉淀,这样可能会导致所获得的 PLGA 纳米粒的产率减小。

由上述的结果而知,采用 PLGA 浓度为 4.0-5.0 mg/mL 可得到粒径在 100—200 nm 的纳米粒。

2.3.1.2 有机相/分散相比例的影响

以纳米粒的粒径及稳定性为指标,固定 PLGA 浓度,以丙酮为有机相,水为分散相,考察有机相与分散相体积比对纳米粒制备的影响,结果见表 2.2。

表 2.2 有机相/分散相比例对纳米粒制备的影响*

No.	S/NS	PLGA (mg)	粒径(nm)	体系的稳定性
1	2/1	25	127.3 ± 13.75	一般, 沉淀较少
2	1/1	50	110.1 ± 19.77	较好, 沉淀较少
3	1/2	100	124.7 ± 9.02	较好, 沉淀较少
4	1/5	250	未测定	一般, 沉淀较多

*注: PLGA 浓度为 5 mg/mL, 同时, 为了实验需要, 固定有机相的体积为 10 mL。

由上表可以看出,有机相/分散相比例对纳米粒的影响不大,由此,在一定的范围内,可以根据实验需要选择不同的有机相/分散相比例。同时,用于有机相的体积

影响纳米粒固化的时间，也可能会使体系的稳定性发生变化，所以可以减小有机相/分散相比，以减少有机相的使用，同时也可以缩短纳米粒的制备时间，提高纳米粒的产率。

2.3.1.3 分散相选择

以纳米粒的粒径及稳定性为指标，固定 PLGA 浓度，以丙酮为有机相，有机相与分散相体积比为 1，以水、乙醇、异丙醇等作为分散相，在加入和不加入表面活性剂的情况下，制备纳米粒，考察不同分散相体系对纳米粒的影响，结果见表 2.3。

表 2.3 分散相选择对纳米粒制备的影响*

No.	分散相	表面活性剂（浓度）	体系的稳定性	粒径（nm）
1	水	—	较好，沉淀较少	110.1±19.77
2	水	Poloxamer 188（2%）	混浊	未测定
3	水	Poloxamer 407（2%）	混浊	未测定
4	乙醇:水（50:50）	—	混浊	未测定
5	乙醇:水（50:50）	Poloxamer 407（2%）	混浊	未测定
6	乙醇	—	较好，沉淀较少	181.3±13.60
7	异丙醇	—	混浊	未测定

*注：PLGA 浓度为：5 mg/mL，有机相为丙酮，有机相/分散相比为 1。

从表 2.3 可以看出，在不同的分散体系下，PLGA 纳米粒的分散行为有明显的不同。当有机相为丙酮时，PLGA 在水溶液中的分散粒径较小，而在其他体系下，粒径明显增大，或者不易形成纳米结构。

2.3.1.4 纳米粒制备工艺

本实验中，最后确定纳米粒的制备工艺参数为：

称取一定量的 PLGA，溶于有机溶剂丙酮，待 PLGA 完全溶解后，得到 PLGA 浓度为 5 mg/mL 的丙酮溶液作为有机相，以一定体积的水作为分散相，在一定的搅拌下，从其中缓慢滴加等体积的有机相，搅拌约 4 h 待丙酮充分挥发后得纳米粒悬浮液。

若出现沉淀，经 0.8 μm 微孔滤膜过滤后供下一步使用，或经真空冷冻干燥后得

纳米粒的冻干粉。

2.3.1.5 载 BSA 纳米粒的制备

以载药量和包封率为指标，取已制备好的纳米粒悬浮液，考察不同的药物浓度对载药量和包封率的影响，确定 BSA 的初始浓度。实验结果见表 2.4。

表 2.4 药物浓度对纳米粒制备的影响

No.	BSA 浓度(mg/mL)	稳定性	粒径 (nm) (PDI)	包封率 (%)
1	0.5	混浊, 不稳定	未测定	未测定
2	1	一般, 较稳定	233.1 (0.362)	未测定
3	2	较好, 稳定	155.3 (0.243)	44.09
4	5	较好, 稳定	125.5 (0.147)	57.02

结果表明, 不同的药物浓度下, 所得到的纳米粒的粒径和稳定性均有一定的变化, 初始 BSA 越低, 所得到的体系越不稳定, 这可能是因为纳米粒粒径下, 比表面活性高, 而 BSA 浓度低, 容易使得纳米粒团聚, 得到的体系不稳定, 而在较高的初始浓度下, 所得的纳米粒的粒径及 PDI 变化均不明显, 同时, BSA 的包封率也较高, 因此, 本实验选择初始药物浓度为 5 mg/mL。

2.3.2 纳米粒中药物含量及包封率的测定

2.3.2.1 BSA 标准曲线的制作

准确称取 24.35 mg BSA, 依 2.2.2.4 项下方法, 制作 BSA 含量测定标准曲线。

测得的吸光度值如表 2.5 所示。

以吸光度与对应的药物浓度关系线性拟合, 得到标准曲线方程为:

$$y = 0.000842x - 0.0072 \quad (\text{相关系数 } R^2 = 0.9996)。$$

结果表明: BSA 在 50—770 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围, 其浓度与吸光度值 A 之间有良好的线性关系。如图 2.1 所示。

表 2.5 BSA 含量测定标准曲线结果

BSA 浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	吸光度值 A
48.7	0.028
97.4	0.090
146.1	0.113
194.8	0.146
389.6	0.330
584.4	0.481
779.2	0.647

注: $\lambda = 595 \text{ nm}$ (0.9% NaCl 溶液)

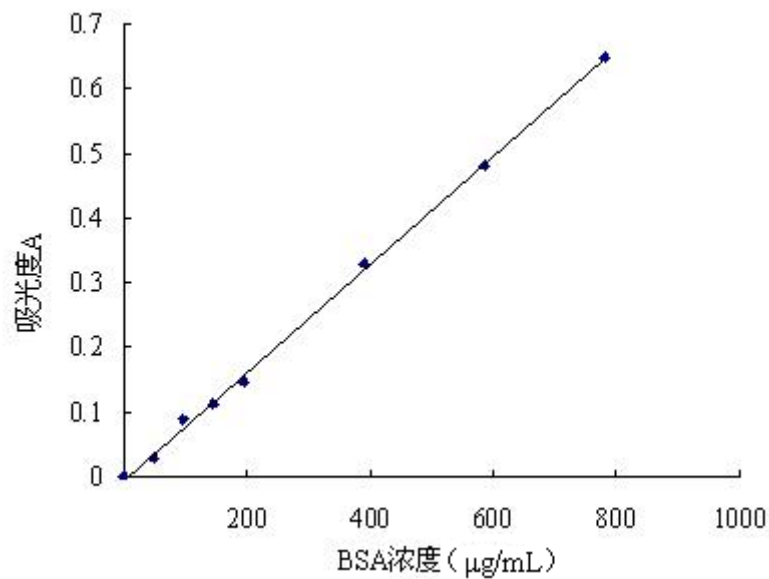


图 2.1 BSA 标准曲线图

2.3.2.2 BSA 含量测定方法回收率的测定

取一定量的 BSA, 加入适量空白纳米粒, 配制成高、中、低三种浓度的 0.9% NaCl 溶液, 分别为 6.00mg/mL、5.00mg/mL 和 4.00 mg/mL, 充分溶解混匀后, 于 4℃ 下 15000 rpm 离心 20 min。用 0.9% NaCl 溶液洗涤三次, 收集上清液, 同标准曲线项

下方法测定吸光度（每个浓度三个平行样）。以标准曲线法，计算上清液中的药物浓度，计算平均方法回收率和标准偏差。

表 2.6 BSA 含量测定方法回收率的测定

加入量 (mg/mL)	测得量平均值 (mg/mL)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
4.00	4.05	100.6	100.2	1.06
	3.95	98.7		
	3.97	99.3		
5.00	5.00	100.0		
	5.07	101.3		
	4.98	99.6		
6.00	6.04	100.6		
	6.18	103.0		
	5.91	98.5		

结果表明，该法测定的回收率较高，符合方法学的要求。

2.3.2.3 纳米粒中的聚合物的含量

精密量取 2.0 mL 纳米粒悬浮液，经冷冻干燥后称重，得纳米粒中聚合物的含量，结果见表 2.8。

表 2.7 纳米粒的含量 (n=3)

	1	2	3	平均值
质量 (mg)	6.13	5.25	7.27	6.22
含量 (mg/mL)	3.11			

本节所得的纳米粒中的聚合物的含量有一定的差异，分析其原因可能是在冻干后，纳米粒含水量有差异，因而表现其聚合物含量的差异。

2.3.2.4 载药量和包封率的测定结果

取初始 BSA 浓度为 5 mg/mL，依 2.3.1.4 项下方法制备三批纳米粒，依 2.2.2.4 项

下方法测定其包封率和载药量，结果见表 2.9。从表 2.9 可以看出，所制备的纳米粒的载药量为 $(47.83 \pm 1.67)\%$ ，包封率为 $(57.02 \pm 3.23)\%$ ，说明该法所制备的纳米粒的载药量和包封率均较好。

表 2.8 载 BSA 纳米粒的载药量和包封率 (n=3)

	1	2	3	平均值	RSD (%)
载药量 (%)	47.19	49.03	47.27	47.83	1.67
包封率 (%)	55.55	59.79	55.74	57.02	3.23

从上述实验结果可以看出，载 BSA 纳米粒的载药量较高，而包封率一般，这与文献中报道的结果有一定的差异，分析其原因可能是先测定游离药物浓度时，可能是处理的过程中 BSA 蛋白质变性或者构想发生了一定的变化，导致游离药物浓度偏低，引起的载药量的偏高，但也有可能是该体系能提高 BSA 的载药量。

2.3.3 纳米粒的表征

(1) 纳米粒的表征

根据文献总结，以超纯水将纳米粒悬浮液稀释至 PLGA 含量为 1 mg/mL，采用激光粒度仪测定其粒径和 zeta 电位，结果见表 2.10。

表 2.9 纳米粒的粒径和电位 (n=3)

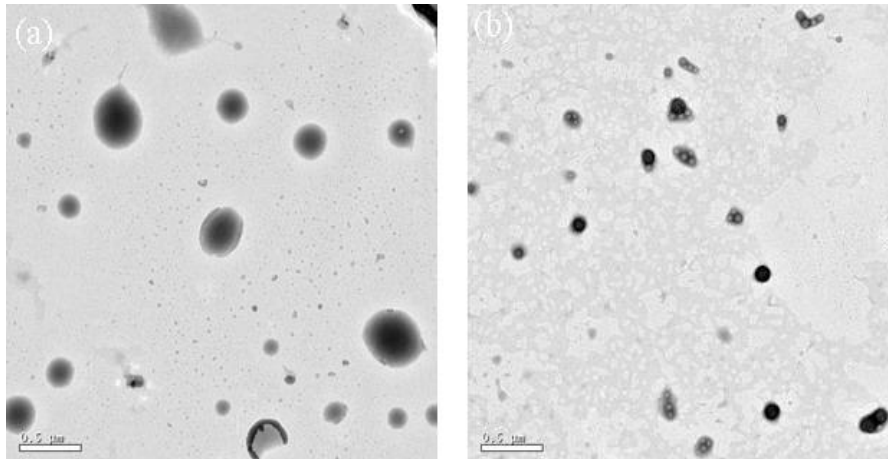
	粒径 (nm)	平均值 (nm)	PDI	Zeta 电位 (mV)	平均值 (mV)	
空白	1	104.6	105.43	0.120	-32.76	-31.85
纳米粒	2	107.4		0.087	-31.73	
	3	104.3		0.133	-31.06	
载 BSA 纳米粒	1	135.5	133.97	0.217	-21.95	-20.85
	2	133.5		0.225	-20.99	
	3	132.9		0.203	-19.62	

从上表可以看出，载 BSA 后，纳米粒的粒径有一定的增大。这是因为该法所制备的纳米粒中的 BSA 为吸附在纳米粒的表面，在激光粒度仪下，粒径表现为增大。

(2) 纳米粒的形貌

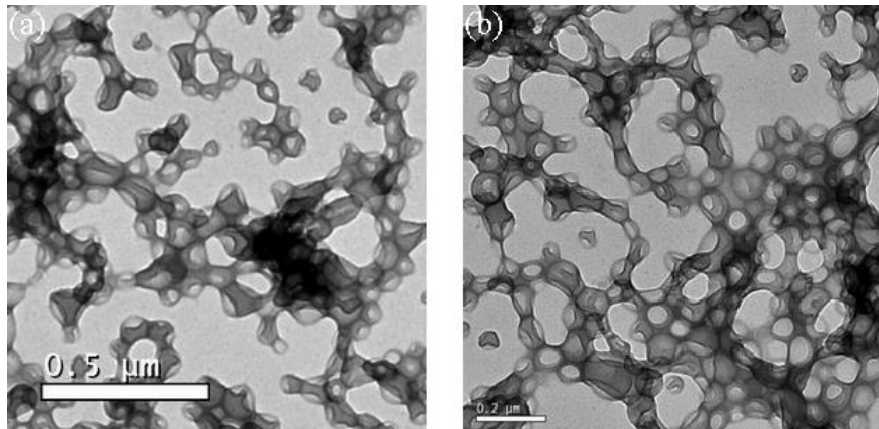
透射电子显微镜下观察纳米粒的表面形态。结果如图 2.2 和图 2.3。

从图 2.3 可以看出，电镜下纳米粒呈球形，粒径分布较均一。



(a) 标尺为 0.5 μm , (b) 标尺为 0.2 μm ;

图 2.2 空白纳米粒的透射电镜照片



(a) 标尺为 0.5 μm , (b) 标尺为 0.2 μm

图 2.3 载 BSA 纳米粒的透射电镜照片

2.4 本章总结

本章选用纳米沉积法制备了载 BSA 的纳米粒，考察了单因素对纳米粒制备的影响，并采用 TEM 和激光粒度仪对其进行了表征。

(1) 确定纳米粒的制备工艺为：称取一定量的 PLGA，溶于有机溶剂丙酮，待

PLGA 完全溶解后, 得到 PLGA 浓度为 5 mg/mL 的丙酮溶液作为有机相, 以一定体积的水作为分散相, 在一定的搅拌下, 从其中缓慢滴加等体积的有机相, 搅拌约 4 h 待丙酮充分挥发后得纳米粒悬浮液。若出现沉淀, 经 0.8 μm 微孔滤膜过滤后供下一步使用, 或经真空冷冻干燥后得纳米粒的冻干粉。若需载 BSA, 则以 5 mg/mL 的 BSA, 加入到纳米粒悬浮液中, 低速磁力搅拌约 24h 即可, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 15 000 rpm 离心 20 min, 用 0.9% NaCl 溶液洗涤三次, 所得的沉淀再以等体积的 0.9% NaCl 溶液或超纯水再悬浮, 备用。考马斯亮蓝 G250 法测得载 BSA 纳米粒的载药量为(47.83 \pm 1.67)%, 封装率为(57.02 \pm 3.23)%。

(2) 采用激光粒度仪测定了载 BSA 的纳米粒的粒径和 zeta 电位, 平均粒径为 133.97 nm, PDI 为 0.215, 平均 zeta 电位为 -20.85 mV。透射电子显微镜下观察到载 BSA 的纳米粒呈球形, 粒径分布均匀。

3 载 BSA 纳米粒的冷冻干燥工艺的研究

3.1 引言

由于纳米粒悬浮液放置一段时间后,会产生明显的团聚沉淀现象。如果将纳米粒悬浮液冷冻干燥成粉末,能显著提高纳米粒以及蛋白质类药物的稳定性,有利于药物的保存,同时,使得进一步研究其应用成为可能。为了保护药品的活性,通常在药品配方中添加适当的冻干保护剂。由于各种药物物理化学性质各异,对于不同的药物需要有不同的保护剂配方,有时需多种保护剂共同保护。

冻干制剂的质量一般以外观、复水性、pH 值、吸湿性、干燥失重、有效成分含量、稳定性等来衡量,若将药品制成纳米粒冻干粉,还需考察其再分散性、形态、粒径、包封率、载药量、体外释药特性等。

本章采用真空冷冻干燥法,制备了载 BSA 纳米粒子的冻干粉末,并考察了不同的冻干保护剂对冻干粉末的影响。

3.2 实验部分

3.2.1 实验仪器和试剂

3.2.1.1 实验仪器

Free Zone 型冷冻干燥机 美国 Labconco 公司

其他仪器同 2.2.1.1。

3.2.1.2 实验试剂

蔗糖	分析纯	汕头市光华化学厂
海藻糖	分析纯	Pharmachem (Wuhan) 有限公司
甘露醇	分析纯	上海山浦化工有限公司
聚乙烯吡咯烷酮 K30	分析纯	天津市远航化学品有限公司

其他试剂同 2.2.1.2。