

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学 号: 200445002

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

透析法制备载药纳米颗粒及其粒径控制

Preparation of Drug Loaded Nanoparticles with Controlled
Size by Direct Dialysis

刘敏

刘 敏

指导教师姓名: 张其清 教授/博导
翁建 副教授

专 业 名 称: 生物医学工程

论文提交日期: 2007 年 6 月

论文答辩日期: 2007 年 月

学位授予日期: 2007 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

指导教师 张其清教授/博导 翁建副教授

厦门大学

2007 年 6 月

厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：刘敏

2007年6月30日

厦门大学博硕士

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版,有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅,有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索,有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1. 保密 (), 在年解密后适用本授权书。
2. 不保密 ()

(请在以上相应括号内打“√”)

作者签名: 日期: 2007 年 6 月 30 日

导师签名: 日期: 年 月 日

厦门大学博硕

中文摘要	I
英文摘要	II
第一章 绪论	1
1.1 药物控缓释放系统	1
1.2 微粒药物载体控释系统	2
1.3 用作微粒缓释制剂药物载体的材料	3
1.4 微粒缓释系统载体的形式及特点	6
1.5 可降解高分子聚合物纳米颗粒的制备方法	12
1.6 表阿霉素的理化性质及药理学性质	18
1.7 本课题的提出和研究内容	19
参考文献	21
第二章 聚乳酸空白纳米颗粒制备、粒径的控制及形成机理探讨	27
2.1 引言	27
2.2 实验部分	28
2.3 结果与讨论	32
2.4 结论	48
参考文献	50
第三章 载表阿霉素聚乳酸纳米颗粒的制备及表征	52
3.1 引言	52
3.2 实验部分	52
3.3 结果与讨论	57
3.4 结论	71
参考文献	73
全文结论与展望	75
硕士期间发表论文情况	77
致谢	78

Contents

Abstract in Chinese	1
Abstract in English	11
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Drug delivery system	1
1.2 Particle drug delivery system.....	2
1.3 Materials using for nanoparticles drug delivery vectors.....	3
1.4 The form and features of nanoparticles drug delivery vectors.....	6
1.5 Preparation of biodegradable polymer nanoparticles.....	12
1.6 The physicochemical and pharmacological properties of epirubicin.....	18
1.7 Objective and content of this dissertation	19
References	21
Chapter 2 Formation of PLA nanoparticles with controlled Size . .	27
2.1 Introduction.....	27
2.2 Experiments.....	28
2.3 Results and disscussion.....	32
2.4 Summary.....	48
References	50
Chapter 3 Preparation and characterization of EPI loaded spheres	52
3.1 Introduction.....	52
3.2 Experiments.....	52
3.3 Results and Discussion	57
3.4 Summary.....	71
References.....	73
Conclusions and Future Works.	75
Publications	77
Acknowledgements	78

摘要

透析法是近年来兴起的一种用于制备聚合物缓释纳米颗粒的新方法。其制备过程简单，可以避免表面活性剂的应用，有望应用于工业化生产，因此受到人们越来越多的关注，具有重要的研究意义和应用前景。但目前这种方法尚不完善，如纳米颗粒粒径分布宽、载药量低，纳米颗粒的控缓释性能差等问题亟待解决。

聚乳酸（PLA）以其所特有的良好生物相容性和生物降解性在生物医学领域有着广泛的应用。表阿霉素（EPI）是一种广谱的抗肿瘤抗生素类药物，临床上主要剂型为注射用表阿霉素冻干粉。为了降低该药的给药量，减小毒副作用，本文以聚乳酸为药物载体，表阿霉素为模型药物，采用改进的透析法进行载药阿霉素聚乳酸纳米颗粒的制备和研究。具体内容摘要如下：

1. 聚乳酸纳米颗粒粒径的控制：通过改变透析方式、聚合物浓度、初始溶剂和初始水体积等各个参数使纳米颗粒的粒径得到了有效的控制，同时探讨了粒径变化的内在原因。
2. 聚乳酸纳米颗粒形成机制探讨：用扫描电镜、动态光散射和荧光探针法对透析过程中纳米颗粒的形态、粒径及状态进行了监测，结果表明纳米颗粒的形成主要分为三步：（1）PLA 缔和物的形成；（2）PLA 颗粒的形成与分裂；（3）PLA 纳米颗粒的形成及固化。
3. 载药纳米颗粒的制备和性能研究：采用表阿霉素为模型药物，系统研究了透析过程各个参数对载药纳米颗粒载药量、包封率的影响，探讨了纳米颗粒的载药过程，同时对载药纳米颗粒的热学性质、药物分布和药物释放性能进行了研究。结果表明通过改进的透析法可以获得较高的载药量和包封率，所得到的纳米颗粒为球形、表面圆滑、药物分布均匀，且药物释放速度可以得到有效的控制。

关键词：透析法；药物释放体系；聚乳酸

Abstract

Dialysis method was developed to prepare polymer particles in recent years. Dialysis method is an acceptable simple and effective preparation method for surfactant-free particles, which is expected to apply in industrial production. However, a systematic and in-depth evaluation of the effects of dialysis conditions on properties of particles is still not available in literature.

Poly(lactic acid) (PLA) is under extensive research because of its unique and excellent biocompatibility and biodegradability, particularly in biomedical field. Epirubicin (EPI) is a broad-spectrum antitumor antibiotic drug. To reduce the amount of administration and side effects, EPI loaded nanoparticles were prepared by dialysis. This paper focused on controlling the size of PLA nanoparticles, formation mechanism of nanoparticles during preparation process, and properties of drug-loaded nanoparticles. The contents are summarized as follows:

1. Particle size control: the size of the spheres could be well controlled by the preparation conditions such as the speed of dialysis, initial solvent, initial water content and polymer concentration and other parameters. The mechanism of size change was also studied.
2. The formation process of PLA spheres was investigated by dynamic light scattering technique (DLS), scanning electron microscopy (SEM), fluorescence probe *in situ*. Based on these experimental results, it was proposed that the PLA spheres were formed in three steps: (1) complexing – individual PLA chains got complexed with each other in solution; (2) formation and disruption of PLA particles; (3) solidification of PLA spheres.
3. Preparation and properties of EPI-loaded PLA nanoparticles: effects of dialysis process on drug content, encapsulation efficiency and drug loading process, in addition, thermal properties, drug distribution and drug release properties of drug-loaded nanoparticles were investigated in this thesis. The results showed

that drug content and drug encapsulation ration were high, particle with spherical shape was formed, and the drug release rate could be well controlled with pH of solution, drug content and size of nanoparticles.

Keywords: Dialysis; Drug delivery system; Polylactic acid (PLA)

廈門大學博碩

第一章 绪论

1.1 药物控缓释放系统

药物控缓释放系统 (Drug Controlled and Sustained Release System) (DCRS) 是药物传递系统 (Drug Delivery System) 中的一种, 它可以使药物以一种预定的速率缓慢释放, 从而达到控制体内药物浓度的目的^[1,2,3]。传统的给药方式使人体内的药物浓度只能维持较短的时间, 血液或体内组织中药物浓度上下波动较大, 时常超过人体的药物最高耐受剂量或最低有效剂量。为了维持体内必要的药物浓度, 只能采用一日数次定时服药或注射。药物控制释放系统是药剂学发展的一个新领域, 能使血液或组织中的药物浓度在较长时间内保持在有效治疗指数范围内^[4] (图 1.1), 具有安全、有效、使用方便等特点。相对于传统的给药方式, 药物控制释放系统具有很多的优点: 可以提高药物的疗效, 降低药物毒副作用, 减轻病人服药痛苦等。它已经成为当今给药技术的热点, 引起了人们的极大兴趣, 其理论和应用研究都取得了可喜的进展。

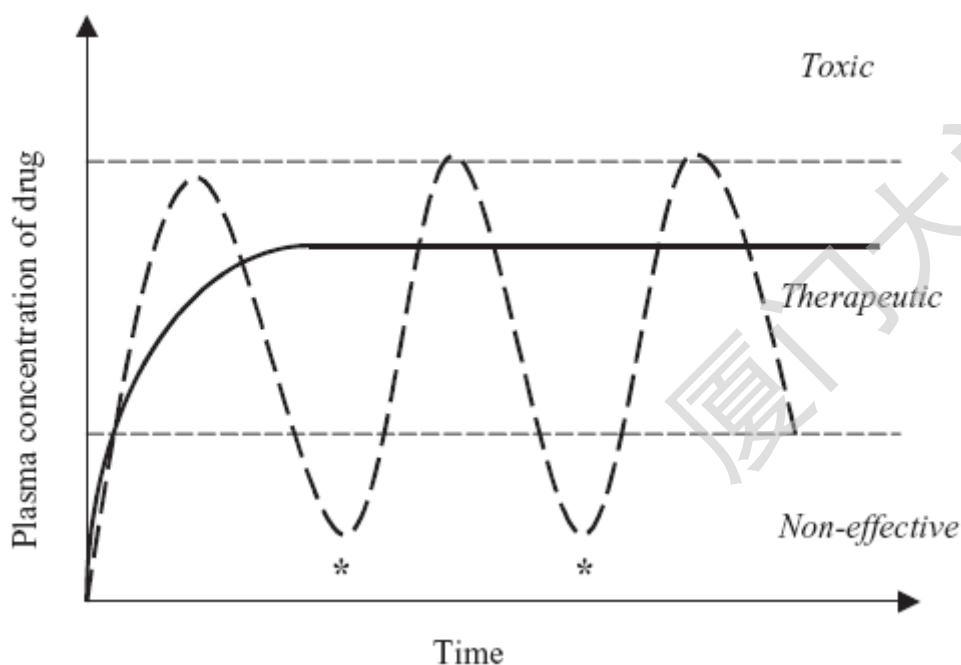


图1.1 服用传统药物制剂和缓释制剂后的血药浓度变化。

Fig 1.1 Drug concentration changes in blood after taking the traditional doses and drug delivery system.

人们对药物的缓释、控释进行了大量的研究工作，并总结出药物控释体系大致应具备以下功能：（1）药物控制释放功能：使需药部位的血药浓度维持在要求的范围内；（2）药物靶向释放功能：使药物只输送到治疗目标部位。理想的药物释放体系还应满足如下要求^[5,6]：（1）将药物直接输送到病患部位；（2）在达到要求疗效的前提下，尽量减少药物的投放量；（3）药物的毒副作用最小且安全、可靠；（4）服用方便，易于被患者接受；（5）在通常环境下具有一定的物理和化学稳定性。

药物若能准确无误的只作用于需药部位（器官、脏器或细胞等），可使药物高效地在需药部位富集，提高药物的利用率，并减少用药剂量，降低或防止药物对身体健康器官的伤害，以及减少肝、肾等器官对药物代谢的负担^[7]。“一次用药，长期有效”是用药者的愿望，对于癌症、心脏病、高血压、糖尿病的治疗以及避孕等需要长期服药者而言，更具重要意义。缓释系统主要用于毒副作用大，生物半衰期短，易被生物酶降解药物的给药，如抗癌药物、抗菌素、胰岛素等。

药物释放体系（药物剂型）的发展现已经历了五个阶段^[8]：第一个阶段是简单加工供口服与外用的膏、丹、丸、散等剂型；第二个阶段是片剂、注射剂、胶囊剂和气雾剂等；第三个阶段是缓释、控释剂型，它们不需要频繁给药，能在较长时间内维持体内药物的有效浓度；第四个阶段是靶向给药系统，它们能使药物富集于靶器官、靶组织、靶细胞等，提高疗效并降低全身毒副作用；第五个阶段是智能给药系统，它们能根据所接收的反馈信息自动调节释放药量的自调式给药，如在发病高峰时期在体内自动释药的给药系统。为使药物制剂具有以上所述的功能，作为药物载体的医用材料及载体的形式等起着关键作用。它们不仅仅起赋形剂的作用，同时还必须起到对药物缓释、导向、延长药物活性及用药简便的作用。

1.2 微粒药物载体控释系统

近年来微粒系统作为药物的控缓释载体的应用发展很快，过去的几十年里，利用可降解聚合物微粒做高效药物投递载体引起了人们很大兴趣，收到国内外学者的广泛关注。

微粒控释系统是指将活性组分（药物、生物活性材料等）通过包埋、溶解或

吸附于微粒载体而形成的分散系统,包括纳米粒和微粒。目前国内外研究最多的载药系统也是微粒系统,如脂质体、微(纳)球、微囊、胶束等。制备微粒控释系统的载体材料绝大部分是高分子材料,包括可生物降解合成聚合物和天然大分子。前者如聚氰基丙烯酸烷基酯、聚乳酸、聚乳酸-聚乙醇酸共聚物等,后者如明胶、海藻酸钠、壳聚糖等。制备方法因载体材料及载体形式的不同而不同。

微粒载药体系应具备以下特性:①具有较高的载药量和包封率;②有适宜的制备及提纯方法;③载体材料可生物降解,毒性低或无毒性;④具有适当的粒径、形貌及表面电荷;⑤具有较长的体内循环时间。基于以上微粒系统所特有的性质,使其在药物传输方面有很多的优越性:①可缓释药物,从而延长药物作用时间,提高药物的生物利用度;②可达到通过粒径的控制或者表面修饰而达到被动靶向与主动靶向输送的目的;③可在保证药物作用的前提下,减少给药剂量,从而减轻或避免毒副作用;④可提高药物在体内外的稳定性,有利于储存。所以,微粒控释系统是一非常有前途的控释系统,对其研究越来越深入,其用途也越来越广泛。

1.3 用作微粒缓释制剂药物载体的材料

药物载体是微粒缓释制剂的重要组成部分,也是影响药效的主要因素。对于载体材料,要求具有优良的综合性能:性质稳定;要有合适的释药速度;无毒、无刺激性;能与药物匹配、不影响药理作用及含量测定;要有一定的强度及可塑性;具有合适的渗透性、亲水性、溶解性。药物释放体系所用的药物载体材料可分为无机材料和有机材料。后者又可分为非高分子材料和高分子材料。目前药物载体材料大多是高分子材料^[9,10]。高分子材料又可分为三类:

1.3.1 天然高分子材料

一些天然高分子材料因为具有性能稳定、无毒、应用安全、生物相容性好及成膜或成球性好、价格低廉等优点,常被用来作为药物的载体材料。常用的有以下几种。

(1) 明胶:明胶是胶原部分变性衍生物,它主要由独特氨基酸序列甘氨酸-脯氨酸-羟基脯氨酸组成。其分子量在15000~25000之间,通常是不同分子量的混合物。因制备时所用水解方法不同,有酸法水解明胶(A型明胶)和碱法水

解明胶(B型明胶)。通常可根据药物对酸碱度的要求而选用A型明胶或B型明胶。

(2) 海藻酸钠: 海藻酸是从褐藻或细菌中提取出的天然多糖。温和的溶胶-凝胶过程、良好的生物相容性使它适于作为释放或包埋药物、蛋白与细胞的微胶囊。海藻酸钠与钙(钡)离子发生离子交换,即形成不溶于水的海藻酸盐。利用这一特性,可用于制备其药物的微球/微囊型载体。

(3) 壳聚糖: 是由甲壳素脱乙酰化后制备所得的一种天然聚阳离子多糖,可溶于酸或酸性水溶液中,无毒、无抗原性,在体内能被溶菌酶等酶解,具有优良生物降解性和成膜性,在体内可溶胀成水凝胶。

1.3.2 半合成高分子材料

(1) 羧甲基纤维素钠: 常与明胶一起作复合材料使用,常用浓度为0.1%~0.5%。是一种阴离子电解质,遇水溶胀后,粘度大。在酸性溶液中不溶,不会发酵,具有抗盐能力和一定的热稳定性,置空气中能吸湿,几乎不溶于大多数有机溶剂。

(2) 乙基纤维素: 化学稳定性高,适用于做多种药物的载体,不溶于水、甘油和丙二醇,可溶于乙醇,遇强酸易水解,故对强酸性药物不适宜。

(3) 羟丙基甲基纤维素: 能溶于冷水成为粘性溶液,不溶于热水,长期贮存稳定,有表面活性,表面张力为 $(42 \sim 56) \times 10^{-5}$ N/cm。

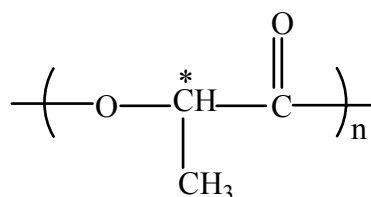
1.3.3 合成高分子材料

常用的有聚乙烯醇、聚碳酸酯、聚乙二醇、聚苯乙烯、聚酰胺、PVP、聚甲基丙烯酸甲酯以及聚甲基丙烯酸异丁酯等。

最近人工合成的生物可降解高分子材料越来越受到重视,如聚乳酸、聚羟基乙酸以及乳酸和羟基乙酸的共聚物、聚己内酯、聚酸酐、聚原酸酯、聚磷腈和氨基酸类聚合物。这些材料在体内随着其本身的水解变成水溶性片段和人体正常代谢产物后,随后从体内排出;与此同时,纳米粒子包载的药物也不断的在体内得到释放并发挥药效。

(1) 聚乳酸(PLA)

结构式如下图所示:



其分子中有一个不对称碳原子，因此有两种光学异构体，可形成四种不同构型的聚合物：两种立体规整性构型，右旋聚乳酸（PDLA）和左旋聚乳酸（PLLA），一种外消旋的聚乳酸（PDLLA）以及很少应用的内消旋的聚乳酸。是一种具有优良的生物相容性和生物降解性的聚合物，经FDA批准可用做医用手术缝合线和注射用微胶囊、微球及埋植剂等制剂的材料。PLA在体内代谢最终产物是CO₂和H₂O，中间产物是乳酸，也是体内正常代谢的产物，不会在重要器官聚集。所以早在50年代就开始了PLA的合成及应用研究，随着近年来纳米粒子的发展，PLA也进入了应用于药物载体研究阶段。

由于PLLA分子中的不对称碳链为规整构型，因而形成半结晶聚合物，熔点约185 °C，具有优良的力学强度并且降解吸收时间很长（一般为3~3.5年），适用于承载的装置，是制作内植骨固定装置的理想材料。与此相反，PDLLA分子中的不对称碳链为非规整结构，是无定形聚合物，T_g 约65 °C，降解和吸收速度较快，一般为3~6个月。这种聚乳酸有利于药物均匀分布在基质中，因此非常适用于药物释放系统，主要作药物控释的载体和软组织修复材料。

(2) 聚羟基乙酸（PGA）PGA由乙交酯开环聚合制得，降解后生成羟基乙酸。由于羟基乙酸和乳酸都是体内三羧酸循环的中间代谢物，且吸收和代谢机理已经明确并具有可靠的生物安全性，因而聚羟基乙酸和聚乳酸一样做为第一批可降解吸收材料被FDA批准用于临床。PGA具有简单规整的分子结构，形成结晶状聚合物。结晶一般为40%~50%，熔点约225 °C。它不溶于常用的有机溶剂，只溶于六氟异丙醇这样的强极性溶剂。可熔融纺丝加工成高强度纤维，开始是专为可吸收缝合线而研究的，由它制成了世界上第一个合成可吸收缝线“Dexon”。用PGA制作的内植骨钉已有商品（Biofix），但由于高结晶度和难溶解性，PGA均聚物不合作药物控释载体。

(3) PGA主结构共聚物 共聚物可大大改善物理性能，最成功的是羟基乙酸和乳酸形成的无规共聚物（PLGA）。因为两种单体无规共聚后破坏了原均聚物的分子规整性，结晶度降低直至失去结晶性。组成各为50%的共聚物分子，达到最大限度的无规结构，完全变成无定形态。当羟基乙酸的比例降低到50%后，共聚物可溶解于一般的有机溶剂，如氯仿、甲苯、四氢呋喃、乙酸乙酯等。这些物理性质的改变使其除了可做为可吸收缝线的材料外，也可广泛应用到药物释放体

系，从而得到更广泛的开发利用。

(4) 聚己内酯 (PCL) PCL是线性的脂肪聚酯，为半结晶态聚合物，结晶度约为45 %左右。PCL具有其它聚酯所不具有的特性就是超低的玻璃态转变温度 ($T_g = -62\text{ }^\circ\text{C}$) 和低熔点 ($T_m = 57\text{ }^\circ\text{C}$)，在室温下呈橡胶态，这可能是PCL比其它聚酯有更好的药物通透性的原因。并且具有很好的热稳定性。聚己内酯和己内酯单体都无毒并且生物相容性良好，在生理环境中可水解，在某些情况下可以酶解。但PCL分子中含有较长的亚甲基链段，因此降解速度比PGA和PLA慢很多。

(5) 聚酸酐 首次问世于1909年，但由于其容易水解而未被应用。1983年 Langer^[2]等提出用聚酸酐做为药物控释基质，并对其性能和应用进行了深入的研究。对聚酸酐的毒理学综合评价认为，它的生物相容性很好，主要应用是药物控释载体，由于水分子不渗透，聚酸酐能很好的保护包埋的生物物质不受体内环境的破坏，应此特别适于释放不易扩散的大分子生物活性药物，如蛋白、多肽。

1.4 微粒缓释系统载体的形式及特点

目前，已出现由 FDA 批准或者已用于临床抗癌的各种不同的微粒药物载体，如微（纳）球、微胶囊、胶束（图 1.2）。不仅材料的性能影响载体的控制释放性能，载体形式的差异、尺寸的不同也很大程度上影响药物的传输与释放行为。表 1.1 显示，载体尺寸的不同，体内最终富集的组织或器官也相异^[11]。按照载体的结构与载药方式，缓释制剂的载体主要有以下几种形式：微（纳）球、微胶囊、水凝胶和胶束、脂质体。

1.4.1 微（纳）球

微（纳）球载体是指药物分子包埋在聚合物载体中或表面上而形成的微粒分散系统。几乎所有的可降解高分子都可用于制备微球载体。微球主要由药物和载体组成，目前研究较多的药物为抗癌药、抗生素、多肽等；此外，还可用于基因传递与表达^[12,13]。

不同的材料制备方法也不同。对于天然高分子，以壳聚糖为例，已有报道的方法包括乳液交联法、共凝聚法、共沉淀法、喷雾干燥法、离子凝胶法^[14,15]。由于良好的水溶性，天然高分子常要通过化学交联与离子交联方式使粒子固化。而

可降解的合成高分子中，研究最多的是聚乳酸（PLA）与聚乳酸-聚羟基乙酸（PLGA）。其常用的制备方法为溶剂挥发法、纳米沉淀法以及它们的一些改进技术^[16,17]。

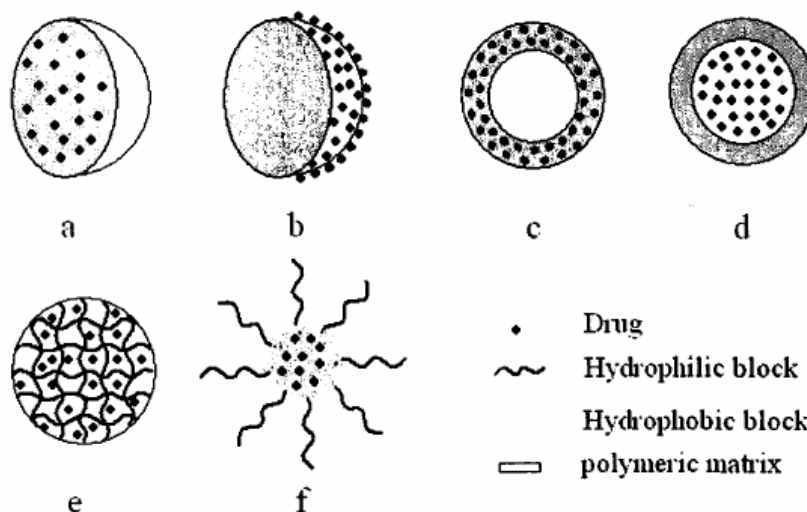


图 1.2 聚合物药物载体形式微球(a, b), 微胶囊(c, d), 水凝胶(e), 胶束(f)。

Fig 1.2 Various type of drug-loaded polymeric carrier including nanoparticles (a, b), microcapsules(c, d), hydrogel(e) and micelle(f).

纳米微粒由于粒径小，进入体循环后主要被网状内皮系统（RES）中的白细胞、单核细胞以及巨噬细胞吞噬，而 RES 系统主要包括肝、脾和骨髓（见表 1.1）。载药纳米粒进入血管后，靶向作用于 RES 系统，这对于治疗 RES 系统疾病（如内脏利什曼病、细胞内感染）有特殊的意义。因而近几年纳米微粒靶向给药系统成为微球载体的研究热点^[17]。

对于微球型药物载体，药物负载方式既可以是分散在聚合物基材中（图 1.2a），也可以是被吸附在微球表面（图 1.2b），通常两种方式都存在。药物主要通过三种机理释放^[13]：（1）从微球表面直接溶解释放；（2）从可溶胀基体中扩散；（3）材料的降解。大多数情况下，药物释放都不是通过单一的机理来完成。微球表面层的药物遵循释放机理（1），因而导致早期的突释现象。天然高分子一般为亲水聚合物，因此以前两种释放方式为主。疏水的合成高分子则主要通过材料的降解释放药物。

表 1.1 不同粒径的药物载体体内靶向的部位^[11]Table 1.1 The function of carrier size and the target location in the body^[11]

载体粒径	体内靶向
<50 nm	穿过肝脏或通过淋巴传输到脾和骨髓，也可到达肿瘤组织最终进入肝脏
0.1 μm~0.2 μm	被网状内皮系统吸收，最后富集于肝、脾中
1 μm	白细胞吞噬
2 μm~12 μm	毛细血管摄取，不仅可到达肺，也可进入肝、脾
7 μm~12 μm	在肺中富集
>12 μm	阻滞在毛细血管末端

1.4.2 微胶囊

微胶囊是指把分散的药物完全包封在致密膜中形成囊泡状结构的载体，一般粒径在 500 nm-1000 μm。微胶囊的形态可以呈现各种形状，如球形、粒状、肾形、谷粒形、絮状或块状。囊壁可以是单层结构也可以是多层结构，可以是单核也可以是多核。仅含一种液态物质为芯材的微胶囊呈球状，如果成膜材料的量足够，含有多种芯材的微胶囊也呈球形。芯材如果是固体或晶体，那么微胶囊形状可能会变得不规则。微胶囊壳材料的选择对于微胶囊性能影响起到决定性的作用。针对不同的应用，对于微胶囊囊壁材料有不同的要求。聚合物对包囊物质以及对于周围介质的溶解能力，聚合物的弹性、韧性、渗透性、熔点及玻璃化温度等性质都会对载体结构与性能产生很大影响。

作为微胶囊壁材的聚合物必须具备以下的性能：

- 1) 良好的弹性；
- 2) 适宜的囊壁渗透性；
- 3) 可降解性；
- 4) 适宜的物理、化学性能以便微胶囊的固化。

绝大多数高分子都可以作为囊材制备不同性能的微胶囊^[18,19]。以天然高分子材料作囊材制备微胶囊的方法很多，这类囊材具有成膜性、稳定性好的优点；但机械强度差，原料质量不稳定。半合成高分子材料主要是一些改性多糖，如羧甲

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

廈門大學博碩