

## 两性霉素 B 聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒的制备及小鼠体内分布研究

徐楠<sup>1</sup>, 邹豪<sup>2</sup>, 范国荣<sup>3</sup>, 温海<sup>1</sup>, 陈江汉<sup>1\*</sup>

(1. 第二军医大学长征医院皮肤性病科, 上海 200003; 2. 第二军医大学药学院药剂学教研室, 上海 200433; 3. 第二军医大学药学院药物分析学教研室, 上海 200433)

**[摘要]** **目的:** 制备携带两性霉素的聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒 (AmB-PBCA-NP), 研究其对血脑屏障的透过能力。 **方法:** 孵化法制备 AmB-PBCA-NP, 以聚山梨酯-80 进行表面修饰, 建立高效液相色谱分析法, 流动相选择乙腈-水 (40 : 60) 及 4% 乙酸, 405 nm 处检测。小鼠分 3 组, 每组 28 只, 分别注射 AmB 粉针剂、脂质体 (AmB-L) 及纳米制剂 (AmB-PBCA-NP), 通过检测小鼠脑组织等脏器中的药物浓度, 评价其主动脑靶向作用。 **结果:** AmB-PBCA-NP 平均粒径 94.38 nm, 平均包封率为 82%, 载药量 56.1%。给药后 AmB 粉针剂组小鼠脑内未能检测出药物, AmB-L 组于 3 h 后测得微量浓度, 而 AmB-PBCA-NP 组小鼠 30 min 即测得可观浓度, 3 h 后达 133 ng/g。 **结论:** 聚山梨酯-80 修饰的 AmB-PBCA-NP 具有主动脑靶向作用。

**[关键词]** 脑膜炎, 隐球菌性; 两性霉素 B; 聚氰基丙烯酸正丁酯; 血脑屏障

**[中图分类号]** R 978.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)03-0242-04

## Preparation of amphotericin B-polybutylcyanoacrylate-loaded nanoparticles and its distribution in mice

XU Nan<sup>1</sup>, ZOU Hao<sup>2</sup>, FAN Guo-rong<sup>3</sup>, WEN Hai<sup>1</sup>, CHEN Jiang-han<sup>1\*</sup> (1. Department of Dermatology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433; 3. Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To prepare amphotericin B-polybutylcyanoacrylate-loaded nanoparticle (AmB-PBCA-NP) and to assess their ability to pass the blood-brain barrier. **Methods:** AmB-PBCA-NP was prepared by incubation, with the surface modified by polysorbate 80. High-performance liquid chromatography (HPLC) method was established using acetonitrile and water (40 : 60, 4% of acetic acid) as mobile phase; detection was done at 405 nm. Mice were divided into 3 groups: AmB-injected, AmB-lipid-injected, and AmB-PBCA-NP-injected group. Brain-targeting ability of AmB-PBCA-NP was then evaluated by determination of AmB concentrations in mice brain and other specimens. **Results:** The mean diameter of the prepared AmB-PBCA-NP was 94.38 nm; the mean entrapment efficiency of the particles was 82%; and the drug loading rate was 56.10%. It was found that AmB alone failed to pass the blood-brain barrier; only very low level of AmB was detected in AmB-lipid group 3 h after injection; moderate concentration of AmB was detected 30 min after injection of AmB-PBCA-NP and the concentration peaked at 133 ng/g 3 h after injection. **Conclusion:** AmB-PBCA-NP modified by polysorbate 80 can pass the blood-brain barrier.

**[KEY WORDS]** meningitis, cryptococcal; amphotericin B; polybutylcyanoacrylate; blood-brain barrier

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(3): 242-245]

两性霉素 B (AmB) 作为经典的抗真菌药物, 由于很难通过血脑屏障 (BBB) 以及严重的不良反应, 对于隐球菌性脑膜炎的临床疗效较差<sup>[1]</sup>; 近年新研制的两性霉素 B 脂质体 (AmB-L) 虽毒性降低, 但仍难于通过 BBB, 且昂贵的价格限制了广泛应用。

国内外研究发现聚氰基丙烯酸正丁酯 (PBCA) 经过聚山梨酯-80 修饰后能够透过 BBB, 有望成为提高脑内药物浓度的良好载体<sup>[2-3]</sup>。本研究采用 PBCA 作为载体材料, 制备出携带 AmB 的纳米复合体, 通过在小鼠体内药代动力学的初步研究, 探索其用于治疗隐球菌性脑膜炎的可行性。

## 1 材料和方法

1.1 材料和仪器 AmB 标准品 (上海新先锋药业提供, 批号: 041101, 纯度  $\geq 99\%$ ); AmB (25 mg/支, 上海新先锋药业); AmB-L (上海新先锋药业);  $\alpha$ -氰基丙烯酸正丁酯 (BCA, 北京瞬康医用胶有限公司);

**[基金项目]** 上海市科委纳米专项基金 (0452nm016)。Supported by Nano-fund From Shanghai Science and Technology Committee (0452nm016)。

**[作者简介]** 徐楠, 医师。E-mail: xnhrb@yahoo.com.cn

\* Corresponding author. E-mail: chenjianghan@126.com

右旋糖苷 Dextran T-70、Polxamer 188 (Pharmacia 公司,北京世纪华林生物科技有限公司),聚山梨酯-80(T-80,上海化学试剂公司);甲醇、乙腈、乙酸等均为色谱纯(德国 Merck 公司);槲皮素(上海君创生物科技有限公司)。

HJ-3 恒温磁力搅拌器(上海和欣仪器厂);pHS-25 型 pH 计(上海雷磁仪器厂);XW-80A 涡旋混合器(上海医科大学仪器厂);ChTGL-16C 高速离心机(上海安亭科学仪器厂);Zetasizer 纳米粒径分析仪(Malvern 公司);Shimadzu LC-10A 型高效液相色谱系统,配置 LC-10ATvp 型溶剂输送泵,SPC-10Avp 型可变波长紫外检测器,CTO-10ASvp 柱温箱(日本岛津公司);N2000 色谱数据工作站。

健康昆明小鼠,雌雄各半,6~8 周龄,体质量(25±5)g(第二军医大学实验动物中心)。

1.2 AmB-PBCA-NP 的制备及 T-80 的孵化 称取 300 mg 的 Dextran-70 加适量蒸馏水搅拌溶解,调节 pH 值至 3.0 后定容,室温及电磁搅拌下缓缓加入  $\alpha$ -BCA,4 h 后,调节 pH 至 8.5,加入 20 mg 的 AmB,在 pH 值 7.0 条件下搅拌 4 h。取 10 ml 上述溶液,加入 0.1 ml 的 T-80,搅拌 0.5 h,置 37℃ 恒温箱中孵化 2 h,得具有脑靶向性的 AmB-PBCA-NP,4℃ 冷藏备用。

1.3 粒径检测 室温条件下取胶体溶液适量,加注射用水分散,纳米粒径分析仪测定粒径大小及分布。

1.4 包封率和载药量的测定 取 AmB-PBCA-NP 溶液适量,于 4℃、35 000 r/min 离心 90 min,取上清液测定浓度,计为  $C_b$ (mg/ml),按投药量计算 AmB 的初始浓度,计为  $C$ (mg/ml),PBCA-NP 的初始浓度计为  $M$ (mg/ml)。包封率:  $E = \frac{C - C_b}{C} \times 100\%$ ;载

药量:  $Y(\text{mg/mg}) = \frac{C - C_b}{M} \times 100\%$ 。

1.5 组织内 AmB 浓度的测定

1.5.1 样品处理 脑、心、肺、肝、脾及肾等脏器组织按每 500 mg 1 ml 生理盐水的量混合匀浆,涡旋,离心(14 000 r/min,10 min)取上清液,按 1:1 比例加入槲皮素-乙腈,相同条件下再次离心 2 次,上清液用于 HPLC 检测。考察方法的分离度、线性范围、精密度和回收率等。

1.5.2 色谱条件 色谱柱: Dikma- $C_{18}$ (200 mm×4.6 mm);流动相:乙腈:水(40:60),乙酸 4%;流速:0.9 ml/min;检测波长:405 nm;柱温:37℃;进样

量 20  $\mu$ l。

1.6 AmB-PBCA-NP 在小鼠体内分布 健康小鼠分 3 组,每组 28 只,分别经尾静脉注射 AmB、AmB-L、AmB-PBCA-NP,注射后分别在 0.5、1、3、6、12、24 及 48 h 时断髓处死 4 只,整体灌注生理盐水约 20 ml,取脑及心、肺、肝、脾、肾等脏器,然后在 1.2.4 色谱条件下测定各脏器组织中 AmB 浓度。

## 2 结果

2.1 粒径分布测定 激光粒度分析仪测定平均粒径为 94.38 nm,粒径分布范围如图 1。

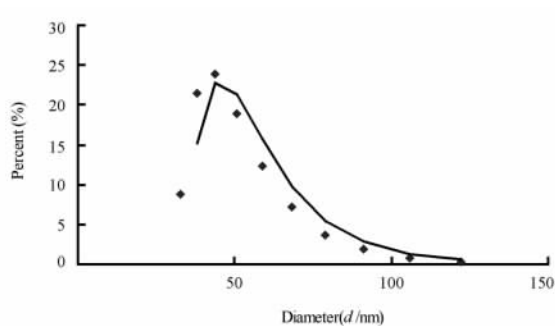


图 1 AmB-PBCA-NP 胶体溶液粒径分布  
Fig 1 Diameter distribution of AmB-PBCA-NP

2.2 包封率及载药量的测定结果 测得 AmB-PBCA-NP 平均包封率为 82%,载药量 56.1%。

2.3 HPLC 检测 AmB 的方法学考察

2.3.1 方法专属性 在以上的实验条件下,生物样品的内源性物质的色谱峰均对 AmB 色谱峰无干扰,AmB 和槲皮素两峰分离良好,可以满足生物样品的快速准确分析,结果见图 2。

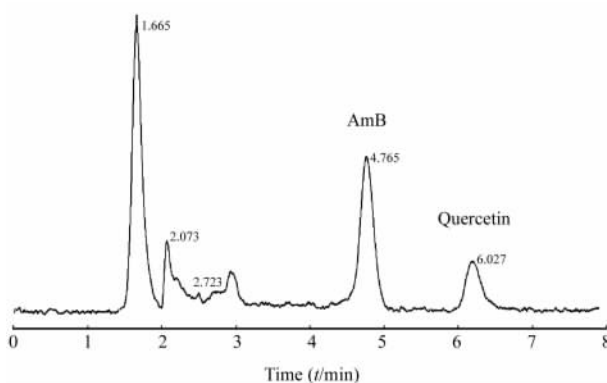


图 2 脑组织中 AmB 与杂质及内标分离效果的高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatogram of AmB in brain tissue

2.3.2 线性范围 以 AmB 浓度为 X 轴,峰面积为

Y轴,在 0.01~0.5 μg/ml 范围内,AmB 的吸收峰面积与其浓度呈良好的线性关系,AmB 线性回归方程为:Y=0.003 673X+0.044 481,r=0.999 7(n=5)。最低检测浓度为 0.01 μg/ml。

2.3.3 回收率和精密度的回收率为 94.10%~104.42%(n=5)。日内和日间精密度的均 <15%(n=5)。

2.4 脑组织中 AmB 浓度测定结果 图 3 显示,AmB-PBCA-NP 在给药后 3 h 达高峰[(132.52 ± 3.67) ng/g],48 h 后维持(66.10 ± 1.05) ng/g;AmB-L 在给药后 3 h 始能检测到微量,12~48 h 浓度维持在(65.00 ± 1.49) ng/g。

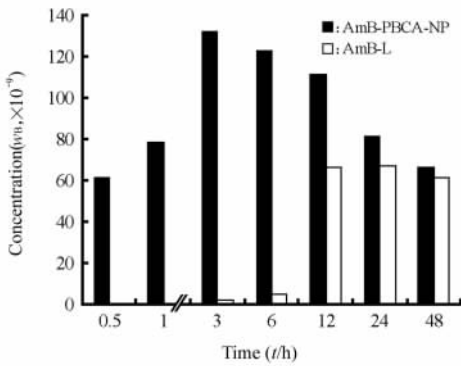


图 3 AmB-PBCA-NP 及 AmB-L 给药后不同时期脑内药物浓度对比情况

Fig 3 AmB distribution in brain specimens in AmB-PBCA-NP and AmB-L groups

2.5 AmB 在小鼠体内各脏器组织中浓度分布情况 如图 4 所示:AmB 组给药后主要分布在肝脏[12 h 达(24.59 ± 3.82) μg/g];AmB-L 分布趋势与 AmB 组相似,但浓度值明显降低;AmB-PBCA-NP 组肝、脾及肾脏中均未检出,肺脏 1 h 时浓度最高达(6.35 ± 0.98) μg/g,此后降低并保持恒定。

### 3 讨论

目前研究已证明 PBCA 可以作为多种药物载体[4-6]。我们已成功地制备了携带 AmB 的 PBCA 纳米制剂,性质符合药剂学要求[7]。本实验结果显示,AmB-PBCA-NP 具有明显的脑主动靶向作用。纳米制剂组小鼠在给药 0.5 h 后脑内即测得明显的 AmB 浓度,且该浓度随时间推移逐渐上升,并达到稳定。已在临床上应用的 AmB-L 虽然也能通过 BBB,但 3 h 后才在脑内有微量药物测出,且浓度显著低于我们的纳米制剂。

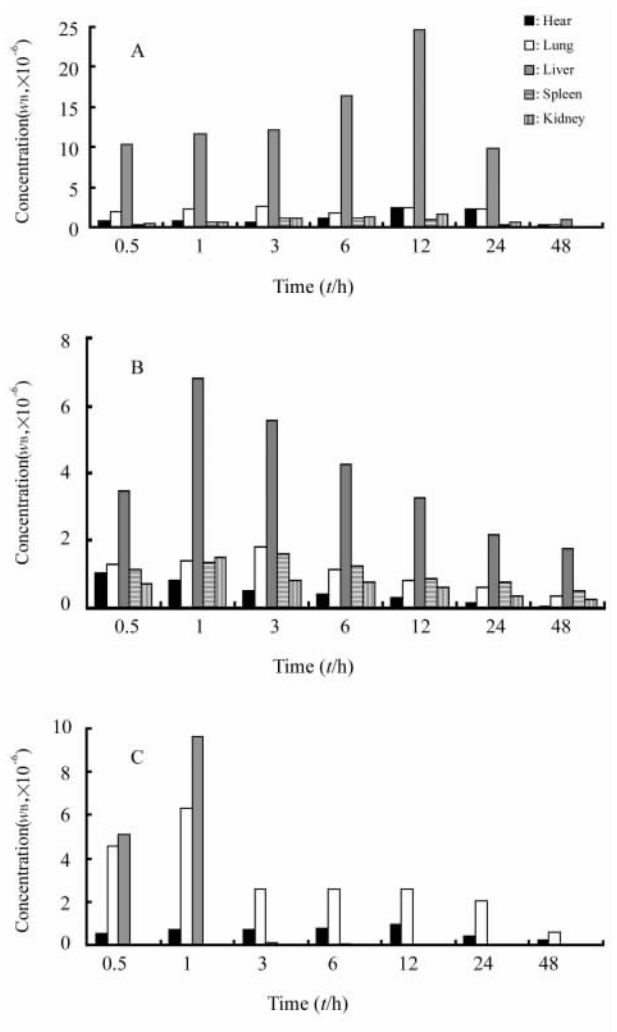


图 4 AmB 在不同脏器中的分布情况

Fig 4 AmB distribution in tissues of different organs A: AmB group;B: AmB-L group;C: AmB-PBCA-NP group

AmB-PBCA-NP 不但具有显著的脑主动靶向性,还显示出一定的器官选择性。由于肝脏是 AmB 的主要靶器官,给药 12 h 后浓度可达(24.59 ± 3.82) μg/g,24~48 h 后肝脏和肾脏中仍保留相当浓度的药物。这也许可以解释临床上发生的不良反应,由于肝细胞受到损伤,患者的转氨酶水平往往升高。肾脏积聚的大量药物使肾小球不能有效地滤过,肾功能出现不同程度的异常。AmB-L 虽在一定程度上降低了药物在组织中的贮留,但肝脏和脾脏仍为主要的靶器官,说明 AmB-L 粒径仍较大,容易被网状内皮系统所识别而被吞噬,同时肾脏中仍有较多药物贮留。

本研究中制备的 AmB-PBCA-NP 在给药后的观察时间(48 h)内,肝、脾及肾脏中均不能检测出 AmB 药物浓度。这也许可以用纳米材料特殊的作

用机制来解释。由于粒径足够小, T-80 的隐身修饰, 载药纳米粒可以逃避肝、脾及网状内皮系统的吞噬而长时间循环于体内血管中, 显著降低了各脏器的药物积蓄, 同时为药物入脑提供有效的浓度保障。纳米制剂除能明显逃避肝、脾等脏器的药物消耗外, 在肾脏中的浓度也非常低, 这对降低 AmB 的毒副作用意义重大(结果另文发表)。另外, 给药 1 h 后肺脏中显示药物浓度达  $(6.35 \pm 0.98) \mu\text{g/g}$ , 此后降低并保持 24 h 恒定。因为肺脏在人体隐球菌感染时是致病菌入侵的门户, 这种持续的高浓度对肺脏感染灶的清除可能起到有益的作用。

此外, AmB-PBCA-NP 还显示出一定的体内缓释作用。这种体内缓释作用更有利于药物持续发挥作用, 对药物入脑、减轻毒副作用具有重要意义。

#### [参考文献]

[1] Gallis H A, Drew R H, Pickard W W. Amphotericin B: 30 years of clinical experience. *Rev Infect Dis*[J]. 1990, 12: 308-329.

- [2] Schroder U, Sommerfeld P, Ulrich S, et al. Nanoparticle technology for delivery of drugs across the blood-brain barrier[J]. *J Pharm Sci*, 1998, 87: 1305-1307.
- [3] Lockman P R, Mumper R J, Khan M A, et al. Nanoparticle technology for drug delivery across the blood-brain barrier[J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2002, 28: 1-13
- [4] Goppert T M, Muller R H. Polysorbate-stabilized solid lipid nanoparticles as colloidal carriers for intravenous targeting of drugs to the brain: comparison of plasma protein adsorption patterns[J]. *J Drug Target*, 2005, 13: 179-187.
- [5] Alyautdin R N, Petrov V E, Langer K, et al. Delivery of loperamide across the blood-brain barrier with polysorbate-80 coated polybutylacrylate nanoparticles[J]. *Pharm Res*, 1997, 14: 325-328.
- [6] Gulyaev A E, Gelperina S E, Skidn I N, et al. Significant transport of doxorubicin into the brain with polysorbate-80 coated nanoparticles[J]. *Pharm Res*, 1999, 16: 1564-1569.
- [7] 徐楠, 邹豪, 温海, 等. 携带两性霉素 B 的聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒的制备及特性评价[J]. *第二军医大学学报*, 2006, 27: 1127-1130.

[收稿日期] 2006-12-06

[修回日期] 2007-01-26

[本文编辑] 尹荼

#### · 书 讯 ·

### 轻松过关考试丛书:

## 《2007 执业药师资格考试历年考点分级精解(药学类)》和 《2007 临床执业医师资格考试历年考点分级精解》已出版

《2007 执业药师资格考试历年考点分级精解(药学类)》由姚继红主编, 2006 年 12 月由人民军医出版社出版, 16 开, 平装, 567 页, 88.8 万字。本书是国家执业药师考试药学类的复习参考书, 全书共分为药事管理、药理学、药物分析、药剂学、药物化学和药学综合知识与技能 6 部分。作者按照考试大纲的内容要求和顺序, 在对历年考试情况进行深入研究的基础上, 共归纳、提炼出 719 个考点, 并根据考点的难度和出现的频率, 分级进行详解。在每个考点之后, 精选了若干道典型试题, 以强化对考点的理解, 巩固复习的效果。全书共有试题 2443 道。此外, 随书还配有试题光盘一张, 将书中的试题全部纳入到考试软件系统, 软件中提供了章节练习、错题重做、做题计时、模拟考试、学习计划安排、每日学习记录、学习情况统计等多项功能, 可以帮助考生有计划、系统地掌握考试重点, 从而达到顺利通关的目的。适用于本科及大、中专医学院校在校生、参加医科类考生。定价: 89.00 元。

《2007 临床执业医师资格考试历年考点分级精解》由赵文志主编, 2006 年 12 月出版, 16 开, 平装, 456 页, 71.9 万字。本书是国家执业医师考试临床医师笔试部分的复习参考书, 全书共分为 16 部分, 分别为医师考试大纲要求的 16 门课程。作者按照临床执业医师考试大纲的内容要求和顺序, 在对历年考试情况进行深入研究的基础上, 全书共归纳、提炼出 930 个考点, 并根据考点的难度和出现的频率, 分级进行详解。在每个考点之后, 精选了若干道典型试题, 以强化对考点的理解, 巩固复习的效果。全书共有试题 2441 道。此外, 随书还配有试题光盘一张, 将书中的试题全部纳入到考试软件系统, 软件中提供了章节练习、错题重做、做题计时、模拟考试、学习计划安排、每日学习记录、学习情况统计等多项功能, 可以帮助考生有计划、系统地掌握考试重点, 从而达到顺利通关的目的。适用于本科及大、中专医学院校在校生、参加医科类考生。定价: 78.00 元。

以上图书由人民军医出版社市场部发行。

通讯地址: 北京市 100036 信箱 188 分箱, 邮编: 100036

电话: 010-51927252; 010-51927300-8168. E-mail: wanglan@pmmpp.com.cn