

DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2017.04.010

牛血清白蛋白温敏凝胶给药系统的制备及释放度考察*

崔亚男 郭富双 管 华 孙珊珊 王慧云[△]

(济宁医学院药学院,日照 276826)

摘 要 **目的** 制备牛血清白蛋白(BSA)温敏凝胶给药系统,并考察给药系统的释放情况。**方法** 以温敏凝胶材料普朗尼克 F127 为载体,以相变温度为指标,通过倒置试管法筛选普朗尼克 F127 的浓度。通过 BCA 蛋白定量试剂盒测定 BSA 的含量。以 PBS 缓冲液为释放介质,考察凝胶给药系统中 BSA 的释放。**结果** 浓度为 20% (w/v) 的普朗尼克 F127 凝胶的相变温度为 23℃,载入 BSA 后相变温度不变。BSA 在普朗尼克 F127 凝胶系统中的释放 12h 可释放 80% 以上,具有缓释效果,且释放接近零级动力学过程。**结论** BSA-普朗尼克 F127 温敏凝胶系统制备方法简单,具有明显的缓释效果。

关键词 温敏凝胶;牛血清白蛋白;普朗尼克 F127;缓-控释制剂

中图分类号:R943 文献标识码:A 文章编号:1000-9760(2017)08-275-04

Study on the preparation and release properties of bovine serum albumin loaded temperature-sensitive gel

CUI Yanan, GUO Fushuang, GUAN Hua, SUN Shanshan, WANG Huiyun[△]

(School of Pharmacy, Jining Medical University, Rizhao 276826, China)

Abstract; Objective To study on the preparation of bovine serum albumin (BSA) loaded temperature-sensitive gel and the release property of BSA. **Methods** Pluronic F127 was selected as carriers. The concentration of pluronic F127 was optimized through the inverted test tube method using the phase-transition temperature as the index. The concentration of BSA was determined using BCA kits. The release property of BSA was investigated using PBS as the dissolution media. **Results** The phase-transition temperature of pluronic F127 with the concentration of 20% (w/v) was 23℃ and retained identically when BSA was loaded. The results of release showed that after 12h, more than 80% of BSA was released and the release property was nearly zero-order kinetics. **Conclusion** The preparation technique of BSA loaded pluronic F127 temperature-sensitive gel is feasible. The release of BSA could be well controlled.

Keywords: Temperature-sensitive gel; Bovine serum albumin; Pluronic F127; Modified-release preparation

蛋白多肽类药物由于其多样性和高度的专属性,在临床上应用于许多重大疾病的治疗^[1-4]。然而,由于其蛋白质和大分子的本性,蛋白多肽类药物体内稳定性差,容易被降解失活,同时跨膜转运困难,使得其在临床使用中存在很多重大问题和挑战^[5-7]。原位温敏凝胶给药系统具有多种给药

途径和剂型的优点^[8-9],有利于保持蛋白多肽类药物局部、长时间、有效。局部给药,能提高局部药物浓度,降低全身毒副作用,患者顺应性好^[10-11]。本文以牛血清白蛋白(BSA)为模型药物,采用经典的温敏凝胶材料普朗尼克 127 为载体,构建蛋白多肽的温敏凝胶局部给药系统,阐明其释放机制,为今后生物大分子药物给药系统新剂型的设计奠定基础,同时为生物制品给药系统的研发提供参考。

1 材料

* [基金项目] 济宁医学院科研计划重点项目(JY2013KJ002);济宁医学院青年基金项目(JYQ2011KM028)

△ [通信作者] 王慧云, E-mail: wang_huiyun@126.com

1.1 主要仪器

磁力加热搅拌器(T8-1 型,江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司);XW-80A 微型漩涡混合仪(上海泸西分析仪器厂有限公司);酶标分析仪 DNM-9602G(北京普朗新技术有限公司);双光束紫外可见分光光度计(Tu-1901,北京普析通用仪器公司)。

1.2 试剂

普朗尼克 F127(上海源叶生物科技有限公司);甲醇(分析纯,莱阳经济技术开发区精细化工厂);PBS 干粉(北京索莱宝科技有限公司);BCA 蛋白定量试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)。

2 方法与结果

2.1 BSA 含量分析方法的建立

2.1.1 储备液的制备 精密量取 100 μ l BSA 标准品于 2ml 的 EP 管中,加入 900 μ l PBS 缓冲液,使终浓度为 0.5mg/ml,备用。

2.1.2 标准曲线的绘制 取储备液适量,加入 PBS 缓冲液稀释为系列浓度的标准品溶液。分别取标准品溶液 20 μ l,加入到 96 孔板中,然后每孔中加入 200 μ l 的工作液(BCA 试剂与 Cu 试剂的体积比为 50:1),将孔板置于 37 $^{\circ}$ C 放置 30min,用酶标仪在 562nm 波长处测定吸光度(表 1)。以吸光度对浓度进行线性回归,得到标准曲线方程 $A = 0.0037C + 0.0878$, $R^2 = 0.9902$ 。见图 1。

表 1 BSA 标准曲线的绘制

C(μ g/ml)	9.09	13.64	18.18	27.27	36.36	45.45
A	0.125	0.140	0.149	0.182	0.228	0.254

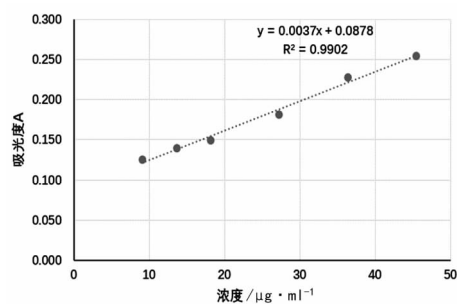


图 1 BSA 浓度-吸光度标准曲线

结果表明,BSA 在 9.09 ~ 45.45 μ g/ml 浓度范围内,吸光度与浓度线性关系良好。

2.1.3 精密度 精密量取 BSA 标准品储备液适量,分别以 PBS 稀释液制备高、中、低浓度标准液,

每份标准液各制备 6 份,于日内($n = 3$)和日间($n = 3$)测定吸光度。考察日内和日间精密度。日内和日间精密度考察结果。见表 2。

表 2 UV-Vis 法测定 BSA 含量的精密度考察($n = 6$)

C/ μ g $\cdot$ ml $^{-1}$	RSD/%	
	日内	日间
9.09	1.42	1.51
27.27	1.33	1.45
45.45	1.54	1.66

由表可知,日内和日间 RSD 值均小于 2%,重现性良好,符合方法学要求。

2.1.4 加样回收率 取 BSA 标准品储备液适量,加入 PBS 稀释至浓度为 9.09 μ g/ml 的溶液,备用。另取储备液适量,分别以 PBS 稀释制备高、中、低浓度标准液。

取 9.09 μ g/ml 的 BSA 标准品溶液 3 份(2ml/份),分别加入高、中、低浓度的标准液 1ml,混匀后测定各混合液的吸光度,计算加样后 BSA 的浓度和加样回收率。结果表明该方法的加样回收率良好。见表 3。

表 3 BSA 加样回收率的测定($n = 3$)

C/ μ g $\cdot$ ml $^{-1}$	回收率/%	RSD/%
9.09	102	1.56
27.27	104	1.34
45.45	101	1.45

2.2 BSA 温敏凝胶的制备

2.2.1 普朗尼克 F127 空白温敏凝胶的制备 称取 0.5g 普朗尼克 F127,加入 2ml 冰去离子水,于冰浴中磁力搅拌 2h 直至溶液呈澄清透明状即得。

2.2.2 BSA-温敏凝胶的制备 称取 BSA 原料药 40mg,加入 2ml 去离子水溶解,在冰浴搅拌下,缓缓加入 0.5g 的普朗尼克 F127 颗粒,继续搅拌 2h,至完全溶解。迅速将载有 BSA 的凝胶液置于 37 $^{\circ}$ C 水浴中,静置 10min,即得载有 BSA 的普朗尼克 F127 温敏凝胶,置于 37 $^{\circ}$ C 孵箱中保存备用。

2.3 相变温度的测定

本文采用倒置试管法测定相变温度。将普朗尼克 F127 凝胶置于预设温度的水浴锅中平衡 5min,取出后迅速倒置观察其流动性。若流动性良好,使水浴温度升高 1 $^{\circ}$ C,平衡 10min 后,继续上述步骤。直至液体变为凝胶状不再流动,记录此时的

温度即为相变温度。

2.3.1 普朗尼克 F127 浓度对相变温度的影响
分别测定 15%、20%、25% F127 温敏凝胶的相变温度。见表 4。

表 4 F127 浓度对相变温度的影响			
浓度 (w/v)	15%	20%	25%
相变温度 (°C)	40	23	20

由结果可知,普朗尼克 F127 温敏凝胶的相变温度随浓度升高而降低,在浓度为 20% 以上时,相变温度降低不明显。文献报道,同时兼顾凝胶的黏度及制备难易程度等因素,最终确定以 20% (w/v) 作为普朗尼克 F127 温敏凝胶的最终浓度。

2.3.2 载有 BSA 温敏凝胶相变温度 按照 2.2.2 项下方法制备 BSA 温敏凝胶,BSA 的浓度为 20mg/ml,F127 的浓度为 20% (w/v),测定载药温敏凝胶的相变温度,结果表明,加入 BSA 后,温敏凝胶给药系统的相变温度无变化,仍为 23℃。

2.4 BSA 温敏凝胶释放度的考察

按照 2.2.2 项下方法制备 BSA 温敏凝胶,在低温下取 300μl 加入到 transwell 小皿中。然后将小皿迅速放入已预热至 37℃ 的 PBS 缓冲液中,缓冲液的体积为 15ml。设定恒温振荡器的振荡速率为 100rpm,温度为 37℃。在预设的时间点,取出释放液,并补充同温下相同体积的新鲜释放液。样品液采用 2.1 项下 BCA 法测定蛋白 BSA 的吸光度,代入标准曲线计算 BSA 的浓度,换算各时间点下凝胶制剂中释放出的 BSA 的量。结果如表 5 所示。以 BSA 的累计释放量为纵坐标,释放时间为横坐标作图。见图 2。

表 5 BSA-普朗尼克 F127 温敏凝胶系统释放度考察							
时间/h	0.5	1	2	4	6	8	12
A(n=3)	0.105	0.096	0.115	0.085	0.130	0.076	0.121
	0.184	0.097	0.111	0.120	0.148	0.090	0.095
	0.126	0.111	0.090	0.133	0.111	0.128	0.104
C(n=3)	4.559	2.306	7.351	-	11.405	-	9.153
	26.000	2.557	6.360	8.703	16.450	0.595	2.036
	10.324	6.270	0.608	12.306	6.360	10.865	4.559
Q(n=3)	8.352	12.578	26.048	24.991	45.889	40.376	57.147
	35.376	38.882	47.536	59.377	81.760	82.569	85.339
	16.759	26.937	28.049	48.025	58.350	75.987	83.386

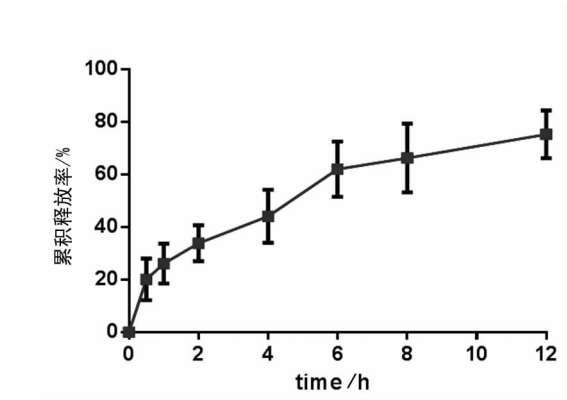


图 2 BSA-普朗尼克 F127 温敏凝胶给药系统中 BSA 释放曲线

由结果可知,BSA 载到普朗尼克 F127 温敏凝胶系统中后,具有缓释效果。释放时间可长达 12h,且整个过程 BSA 的释放较平缓,接近于零级释放。

3 讨论

普朗尼克,又名泊洛沙姆,是一种由聚氧乙烯 PEO 和聚氧丙烯 PPO 组成的三嵌段共聚物。其中普朗尼克 127(泊洛沙姆 407),其形成的水凝胶因具有温度敏感性质且是药用辅料,是目前应用较为经典的温敏凝胶材料。其在低温、低浓度下,F127 以单个分子存在;随着温度升高,F127 分子中疏水片段 PPO 脱水,形成内部为疏脱水,形成内部为疏水 PPO 核心、外部为溶胀的 PEO 片段的球形胶束。当达到一定温度和足够的浓度时,由于胶束的堆积缠绕形成凝胶。本文即选用该材料作为载体制备 BSA 温敏凝胶给药系统。

常用的局部给药系统包括药物植入剂、凝胶、薄片、棒和微粒给药系统等。凝胶是溶胶或溶液中的胶体粒子或高分子在一定条件下互相连接,形成的三维空间网状结构,结构空隙中充满了作为分散介质的液体。自从上世纪 60 年代被用于软性接触镜后,凝胶的使用以惊人的速度增长,现在已经被广泛地应用到药学和生物学领域。近十年来,研究兴趣转移到可注射的原位凝胶上,其形成的机制包括温度敏感性、pH 敏感性、光敏感性等等。温度敏感性的凝胶,即原位温敏凝胶,在体外呈现一种溶胶状态,可以包载各种药物。当其被注射进体内后,由于温度的升高,溶胶体系迅速形成半固体的凝胶,从而实现局部缓控释效 (下转第 281 页)

6 小结

高被引论文情况分析有助于提高期刊选稿的针对性和目的性,对期刊的选题规划和提高用稿质量有直接和重要的参考价值^[5]。《济宁医学院学报》2006—2016 年高被引论文的发表时间集中在 2008—2011 年,热点学科是社会医学和天然药物化学、临床医学、调查、基础医学、综述和专家论坛是读者关注度高的栏目。这些高被引论文基本符合“二八定律”,即较少的高被引论文产生了较高的被引频次,期刊编辑部应重点关注关键栏目、关键作者。因此,《济宁医学院学报》应加强信息情报的收集及分析,加强重点栏目建设,提高期刊选稿的针对性和目的性,将最新医学研究成果呈现给广大读者,促进期刊的可持续发展

参考文献:

- [1] Francis H. The information-seeking behavior of social

science faculty at the university of the west indies, St. Augustine Campus [J]. The Journal of Academic Librarianship, 2005, 31(1): 67-72. DOI: 10. 1016/j. acalib. 2004. 11. 003.

- [2] Belkin N J, Oddy R N, Brooks H M. Ask for information retrieval: Part i. background and theory [J]. Journal of Documentation, 1982, 38(2): 61-71. DOI: 10. 1108/eb026722.
- [3] 林琳, 石俊强, 甘慧敏. 《济宁医学院学报》2010-2014 年载文被引情况分析 [J]. 济宁医学院学报, 2015, 38(3): 197-199. DOI: 10. 3969/j. issn. 1000-9760. 2015. 03. 014.
- [4] 安秀芬, 王景文, 黄晓鹏. 《中国科技期刊研究》1990 - 2002 年的载文分析 [J]. 中国科技期刊研究, 2003, 14(3): 264-266.
- [5] 张建合. 《编辑学报》高被引论文分析 [J]. 编辑学报, 2010, 22(6): 562-564.

(收稿日期 2017-06-09)

(本文编辑: 石俊强)

(上接第 277 页)

果。本文制备的 BSA-普朗尼克 F127 温敏凝胶系统, 相变温度在 23℃, 释放时间可达 12h, 接近于零级释放。

参考文献:

- [1] Brekke OH, Sandlie I. Therapeutic antibodies for human diseases at the dawn of the twenty-first century [J]. Nat Rev Drug Discov, 2003, 2(1): 52-62.
- [2] Coelho T, Adams D, Silva A, et al. Safety and efficacy of RNAi therapy for transthyretin amyloidosis [J]. N Engl J Med, 2013, 369(9): 819-829.
- [3] Kim HJ, Kim A, Miyata K, et al. Recent progress in development of siRNA delivery vehicles for cancer therapy [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2016, 104: 61-77.
- [4] Beck A, Wurch T, Bailly C, et al. Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies [J]. Nat Rev Immunol, 2010, 10(5): 345-352.
- [5] Weiner GJ. Building better monoclonal antibody-based therapeutics [J]. Nat Rev Cancer, 2015, 15(6): 361-370.
- [6] Moroz E, Matoori S, Leroux JC. Oral delivery of macromolecular drugs: Where we are after almost 100 years of

attempts [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2016, 101: 108-121.

- [7] Ye M, Kim S, Park K. Issues in long-term protein delivery using biodegradable microparticles [J]. J Control Release, 2010, 146(2): 241-60.
- [8] Colson YL, Liu R, Southard EB, et al. The performance of expansile nanoparticles in a murine model of peritoneal carcinomatosis [J]. Biomaterials, 2011, 32(3): 832-840.
- [9] Kamat AA, Kim TJ, Landen CN, et al. Metronomic chemotherapy enhances the efficacy of antivasculature therapy in ovarian cancer [J]. Cancer Res, 2007, 67(1): 281-288.
- [10] Vassileva V, Allen CJ, Piquette-Miller M. Effects of sustained and intermittent paclitaxel therapy on tumor repopulation in ovarian cancer [J]. Mol Cancer Ther, 2008, 7(3): 630-637.
- [11] Vassileva V, Grant J, De Souza R, et al. Novel biocompatible intraperitoneal drug delivery system increases tolerability and therapeutic efficacy of paclitaxel in a human ovarian cancer xenograft model [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2007, 60(6): 907-914.

(收稿日期 2017-07-11)

(本文编辑: 林琳)