

学校编码: 10384
学号: 20620071150903

分类号_____密级_____
UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

超临界流体技术制备牛血清白蛋白颗粒及
其复合颗粒

Bovine Serum Albumin Particles and Its Composite
Particles Prepared by Supercritical Fluid Techniques

王金献

指导教师姓名: 李军 教授
专业名称: 化学工艺
论文提交日期: 2010年06月
论文答辩时间: 2010年06月
学位授予日期: 2010年 月

答辩委员会主席:
评阅人:

2010年06月

厦门大学学位论文原创性声明

本人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其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文(包括纸质版和电子版)，允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

()1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于
年 月 日解密，解密后适用上述授权。

()2.不保密，适用上述授权。

(请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。)

声明人(签名)：

年 月 日

摘要

超临界流体技术对热敏感、结构不稳定和具有生物活性的物系的微粒化具有明显优势。本文以牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin, BSA)为模型蛋白药物,采用超临界流体技术制备牛血清白蛋白颗粒及其复合颗粒,探讨操作条件对颗粒的大小、形貌以及蛋白质活性的影响。

采用超临界流体抗溶剂-雾化 SAS-A(Supercritical Anti-Solvent Atomization)技术,以超临界二氧化碳在 50°C 下从 BSA/乙醇/水溶液中获取干燥的 BSA 颗粒。实验结果表明,在各种操作条件下制备的 BSA 产品均为球形颗粒,粒径在 0.1-5 μm 之间。增大操作压力得到更多小颗粒,但高压下颗粒不易干燥,且易团聚;增高 BSA 浓度会明显增大颗粒粒径,粒径分布也随之变宽;溶液流量增大,颗粒略有增大;乙醇浓度对颗粒的大小和形貌影响不大,但对活性影响明显。在所有操作条件下获得的 BSA 颗粒的活性损失在 0-24%之间。

采用 SAS-A 技术,以超临界氮气在 50°C 下从 BSA/乙醇/水溶液中获取干燥的 BSA 颗粒。实验结果表明,各种操作条件下制备的 BSA 产品均为球形颗粒,粒径在 0.1-5 μm 之间。改变操作条件可以有效地控制颗粒的形态和大小:增大压力使得粒径变小;增高 BSA 浓度颗粒略有增大;溶液流量增大颗粒增大;乙醇浓度对微粒的大小和形貌影响不大。在所有操作条件下获得的 BSA 颗粒的活性损失在 0-13%之间。

采用 SAS-A 技术制备 BSA/聚乙二醇复合颗粒,以及耦合 RESS 过程的 SAS-A 技术制备 BSA/三棕榈酸甘油酯复合颗粒,考察不同实验条件对复合颗粒的影响,并测定 BSA 复合颗粒的溶出度。对比原料的溶出度,BSA/PEG 复合颗粒溶出更快,表明 PEG 对 BSA 起到了增溶作用;BSA/三棕榈酸甘油酯复合颗粒尽管还存在一定的突释,但也显示较明显的缓释效果。

采用 PGSS 技术分别以超临界氮气和二氧化碳制备 BSA/脂肪酸复合颗粒,并研究 BSA 复合颗粒的溶出度。结果表明复合颗粒有较明显的缓释效果。以二氧化碳得到的复合颗粒释放速度比以氮气得到的复合颗粒的释放速度快。

关键词: 超临界流体; 颗粒; 牛血清白蛋白; 蛋白质药物; 复合颗粒

Abstract

Supercritical fluids techniques have many advantages while dealing with active substances and thermo-sensitive substances. In this study, several supercritical fluid techniques were applied to investigate the production of bovine serum albumin (BSA, a model protein drug) particles and its composite particles.

The supercritical anti-solvent atomization (SAS-A) process was employed to produce the BSA particles from ethanol/water solutions at 50°C. The effect of the operating pressure, the flow-rate of the protein/ethanol/water feed, and the protein and ethanol concentrations in the ethanol/water solutions, on the morphology, size and bioactivity of the produced BSA particles was evaluated. The formed primary particles are spherical and discrete with sizes in the range 0.1-5µm. The loss of the activity of the BSA powders varies between 0 to 24% of the unprocessed BSA material.

A nitrogen-assisted atomization process (SAS-A with nitrogen) was employed to prepare BSA particles by drying the protein's ethanol/water solution at 50°C. The effect of the operating pressure, the flow-rate of the protein/ethanol/water feed, and the protein and ethanol concentrations in the ethanol/water solutions, on the morphology, size and bioactivity of the produced BSA particles was evaluated. The formed primary particles are spherical and discrete with sizes in the range 0.1-5µm. The loss of the activity of the BSA powders varies between 0 to 13% of the unprocessed BSA.

The SAS-A process was employed to produce BSA/PEG composite particles, and a combination of RESS and SAS-atomization was proposed to produce BSA/tripalmitin composite particles. The effects of different operating conditions on particle formation were investigated. In vitro release studies, BSA/PEG composites show a quicker release comparing with the raw material, indicating that PEG can enhance the release of BSA, while BSA/tripalmitin composite particles show a control release although initial burst still exists.

The particle formation from gas-saturated solutions (PGSS) process was

employed to produce BSA/fatty acid composite particles. Nitrogen and carbon dioxide were both applied. In vitro release studies show obvious controlled release for the composite particles. The release rate of the composite particles prepared by carbon dioxide is faster than that by nitrogen.

Keywords: Supercritical fluid; particle; bovine serum albumin; protein drug; composite

厦门大学博硕士论文摘要库

目 录

第一章 文献综述	1
1.1 蛋白质药物	1
1.1.1 传统蛋白质药物颗粒化方法	2
1.1.2 传统蛋白质药物复合颗粒化方法	3
1.2 超临界流体	4
1.2.1 超临界流体技术	5
1.2.2 超临界流体微颗粒技术	5
1.3 本文立意和研究内容	10
第二章 SAS-A 技术制备牛血清白蛋白颗粒	12
2.1 引言	12
2.2 实验部分	13
2.2.1 实验材料	13
2.2.2 实验装置及流程	13
2.2.3 分析方法	15
2.3 实验结果与讨论	15
2.3.1 预膨胀压力对颗粒的影响	16
2.3.2 蛋白浓度对颗粒的影响	17
2.3.3 溶液流量对颗粒的影响	19
2.3.4 乙醇含量对颗粒的影响	20
2.3.5 产品蛋白生物活性研究	22
2.3.6 水含量测定	23
2.4 结论	23
第三章 氮气辅助雾化技术制备牛血清白蛋白颗粒	24
3.1 引言	24
3.2 实验部分	24

3.2.1 实验材料.....	24
3.2.2 实验装置及流程.....	24
3.2.3 分析方法.....	24
3.3 实验结果与讨论.....	25
3.3.1 预膨胀压力对颗粒的影响.....	25
3.3.2 蛋白浓度对颗粒的影响.....	26
3.3.3 溶液流量对颗粒的影响.....	28
3.3.4 乙醇含量对颗粒的影响.....	29
3.3.5 两个边界条件对比.....	31
3.3.6 产品蛋白生物活性研究.....	32
3.3.7 产品蛋白水含量测定.....	33
3.4 结 论.....	33
第四章 SAS-A 技术制备 BSA/聚乙二醇和 BSA/三棕榈酸甘油酯复合颗粒.....	35
4.1 引言.....	35
4.2 实验部分.....	36
4.2.1 实验材料.....	36
4.2.2 实验装置及流程.....	36
4.2.3 分析方法.....	37
4.3 实验结果与讨论.....	37
4.3.1 BSA/PEG 复合颗粒制备.....	37
4.3.2 BSA/tripalmitin 复合颗粒制备.....	39
4.3.3 溶出度测定.....	42
4.4 结 论.....	43
第五章 PGSS 技术制备 BSA/脂肪酸复合颗粒.....	45
5.1 引言.....	45
5.2 实验部分.....	46

5.2.1 实验材料.....	46
5.2.2 实验装置及流程.....	46
5.2.3 分析方法.....	47
5.3 实验结果与讨论.....	47
5.3.1 肉豆蔻酸和棕榈酸混合物熔点测定.....	47
5.3.2 壁材的颗粒化.....	47
5.3.3 复合颗粒的制备.....	52
5.3.4 复合颗粒的溶出度测定.....	53
5.4 结论.....	54
第六章 结论.....	56
参考文献.....	57
致 谢.....	63

Contents

Chapter 1 Introduction.....	1
1.1 Protein drug	1
1.1.1 Traditional preparation methods of protein particles	2
1.1.2 Traditional preparation methods of protein microspheres	3
1.2 Supercritical fluids	4
1.2.1 Supercritical fluids technology	5
1.2.2 Particle formation methods using supercritical fluids	5
1.3 Research objectives and contents.....	10
Chapter 2 Bovine serum albumin microparticles by SAS-A.....	12
2.1 Introduction	12
2.2 Experimental.....	13
2.2.1 Materials	13
2.2.2 Apparatus and procedure.....	13
2.2.3 Analytical methods.....	15
2.3 Results and discussion.....	15
2.3.1 Effect of operating pressure	16
2.3.2 Effect of protein concentration in the water/ethanol solution.....	17
2.3.3 Effect of flow rate	19
2.3.4 Effect of ethanol content in the ethanol/water solution	20
2.3.5 Albumin biological activity.....	22
2.3.6 Moisture content	23
2.4 Conclusions	23
Chapter 3 Bovine serum albumin microparticles by nitrogen assisted atomization	24
3.1 Introduction	24

3.2 Experimental.....	24
3.2.1 Materials	24
3.2.2 Apparatus and procedure.....	24
3.2.3 Analytical methods.....	24
3.3 Results and Discussion	25
3.3.1 Effect of operating pressure	25
3.3.2 Effect of protein concentration in the water/ethanol solution.....	26
3.3.3 Effect of flow rate	28
3.3.4 Effect of ethanol content in the ethanol/water solution	29
3.3.5 Particles at extreme conditions	31
3.3.6 Albumin biological activity	32
3.3.7 Moisture content	33
3.4 Conclusions	33
Chapter 4 BSA/PEG and BSA/tripalmitin composites by SAS-A	35
4.1 Introduction	35
4.2 Experimental.....	36
4.2.1 Materials	36
4.2.2 Apparatus and procedure.....	36
4.2.3 Analytical methods.....	37
4.3 Results and discussion	37
4.3.1 BSA/PEG composites	37
4.3.2 BSA/tripalmitin composites.....	39
4.3.3 In vitro release studies	42
4.4 Conclusions	43
Chapter 5 BSA/fatty acid composites by PGSS	45
5.1 Introduction	45
5.2 Experimental.....	46
5.2.1 Materials	46

5.2.2 Apparatus and procedure.....	46
5.2.3 Analytical methods.....	47
5.3 Results and discussion.....	47
5.3.1 Melting point of myristic acid and palmitic acid mixtures.....	47
5.3.2 Micronization of wall material.....	47
5.3.3 BSA/fatty acid composites.....	52
5.3.4 In vitro release studies.....	53
5.4 Conclusions.....	54
Chapter 6 Conclusions.....	56
References.....	57
Acknowledgements.....	63

第一章 文献综述

本章介绍蛋白质药物和超临界流体颗粒化技术相关知识,并介绍超临界流体技术在蛋白质药物制剂方面的应用,最后对文献进行分析,提出本文的立意和研究内容。

1.1 蛋白质药物

蛋白质药物可定义为治疗人类疾病而由体外给予的配制蛋白质。蛋白质药物可分为多肽和基因工程药物、单克隆抗体和基因工程抗体、重组疫苗。由于成本低、成功率高、安全可靠,蛋白质药物已成为医药产品中的重要组成部分。1982年美国 Lilly 公司首先将重组胰岛素投放市场^[1],标志着第一个重组蛋白质药物的诞生。随着生物技术和遗传工程的发展,蛋白质药物的种类和数量日益增多。与以往的小分子药物相比,蛋白质药物具有高活性、特异性强、低毒性、生物功能明确、有利于临床应用等特点。但是蛋白质药物稳定性差、体内半衰期短、生物利用率低、极易被生物体内的酶分解等,这些缺点使它们在治疗学领域的应用受到很大限制。因此,如何将蛋白质药物制成药物制剂是一件极为重要的工作。

目前蛋白质药物大多数是通过注射给药,需要长期频繁给药。面对生物大分子在稳定性及吸收方面的问题,在研究和生产高质量注射制剂的同时,发展多种途径给药的新剂型是制剂工业和研究的重要任务。非注射给药方式包括:肺部给药、口服给药、直肠给药等。其中肺部给药具有以下优点:首先,肺部吸收表面积大,它是人体内可供药物传递利用的最大表面区域^[2],可以高效地递送蛋白质及多肽类等大分子药物;其次,肺是由单层上皮细胞构成,肺泡上皮的厚度仅0.1-0.2 μm ,具有高度的通透性并含有丰富的血管,药物经空气进入血液途径交换的距离短,速度快;再者,肺部给药可减少药物的首过效应,提高药物的生物利用度^[3]。肺部的生理结构要求药物粒子非常精细,且能渗透到肺的周边。一般认为肺部给药的理想药物粒径为1-5 μm ^[4],大于此范围的粒子不能进入细支气管内,更小的粒子又易随呼吸呼出。

如果药物在传递过程中能提供某些控制作用(时间的、空间的),则这类药物

就称为控制-释放型药物，或药物微胶囊^[5]。这类药物的优点包括：药物浓度可预测、减少服药次数、增强治疗效果及降低治疗费用。蛋白质药物缓释制剂主要分埋植剂和微球注射剂。其中生物可降解微球引起了研究者的广泛关注。微球制剂新技术经过几十年的研究已逐渐成熟，然而微球化过程蛋白质的失活及突释问题是限制多肽及蛋白类微球广泛应用的关键技术问题。

1.1.1 传统蛋白质药物颗粒化方法

1.1.1.1 研磨

可用于制备吸入级的药物颗粒的研磨(Milling Technology)方法包括：振动研磨、球磨、喷射研磨(高能流体粉碎)。研磨得到的颗粒形貌基本为扁平 and 近球形，然而研磨在处理柔软的有机生物物质(蛋白质)时，耗时长、效率低，而且容易改变颗粒表面和晶型，另外容易导致颗粒表面带电荷。Irngartinger 等^[6]采用研磨法制备粒子大小符合吸入给药级的西曲瑞克促性腺激素(十肽)，他们在-70℃ 下的低温保持器里研磨，结果表明研磨对该肽类物质的微粒化有效、温和，得到的可用于吸入给药大小的颗粒比例更高。

1.1.1.2 喷雾干燥

自 1940 年以来，喷雾干燥(Spray Drying)技术广泛被应用于食品、生物、医药材料的处理。喷雾干燥是利用雾化器将料液分散为细小的雾滴，并在热干燥介质中迅速蒸发溶剂形成干粉产品的过程，一般喷雾干燥包括四个阶段^[7]：(1)料液雾化；(2)雾群与热干燥介质接触混合；(3)雾滴的蒸发干燥；(4)干燥产品与干燥介质分离。料液的形式可以是溶液、悬浮液、乳浊液等泵可以输送的液体形式，干燥的产品可以是粉状、颗粒状或经过团聚的。喷雾干燥法在制备符合肺部给药的蛋白质药物颗粒存在一定的局限。一方面是 1-5 μm 超出喷雾干燥的极限，另一方面容易导致蛋白质活性损失。

1.1.1.3 喷雾冷冻干燥

喷雾冷冻干燥法(Spray Freeze Drying)是用于制备蛋白、多肽类微球的一种新

方法,即将溶解了蛋白质的溶液通过一个气雾喷嘴喷于冷的蒸汽相中,蒸汽相下面是低温液体层,小液滴通过蒸汽相的时候开始冻结,当接触到低温液体层时,小液滴完全冻结,将收集得到的冻结物置于冷冻干燥器中干燥,低温低压下使冰升华,得到干燥粉末^[8]。

喷雾冷冻干燥可以制备粒径在 $5\mu\text{m}$ 以下甚至是纳米尺寸的颗粒。影响粒径大小的主要因素是雾化的氮气和液体的质量比。在喷雾冷冻干燥过程中,与冷冻和干燥相关的应力可能对蛋白质造成不可逆的破坏,如结构降解、聚集及再水化引起的酶活性损失。Webb 等^[9]已通过实验证明,由雾化引起重组人干扰素 $\gamma(\text{rhIFN-}\gamma)$ 在气-液表面的吸附会导致其显著降解。

1.1.2 传统蛋白质药物复合颗粒化方法

传统的蛋白质药物复合微粒(含微球和微胶囊)包括相分离、单乳化、复乳化、喷雾干燥等。以下简要介绍相分离、复乳化法。

1.1.2.1 相分离法

相分离法(Phase Separation)又称凝聚法^[10]。一般过程为:壁材首先溶解在有机溶剂O1中,水溶性药物溶解在水中并与有机相形成油包水(W/O1)乳液;然后将一种与O1互溶的有机非溶剂O2(不能溶解该壁材的有机溶剂)加到W/O1乳液系统中,搅拌,使得壁材相分离,并沉淀到水滴表面,凝聚成壳,得到非常柔软的包裹有药物的颗粒;最后将颗粒转移到另一种非溶剂O3中硬化形成最终的微球。该法可以满足低温操作的要求,适用于多肽蛋白质药物的微球制备。Mi等^[11]用该方法将不同比例的壳聚糖和聚乳酸-羟基乙酸共聚物(poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA)混合制备了牛血清白蛋白缓释颗粒。虽然相分离方法能成功地制备微球,但需要消耗大量的有机溶剂,而且容易导致蛋白质失活,除去微球中的残留有机溶剂也存在困难。这些都阻碍相分离技术在蛋白质药物微粒化应用。

1.1.2.2 复乳化方法

复乳法(Double Emulsion)(W/O/W型)是目前制备水溶性多肽、蛋白质药物微球最常用的方法。一般过程为:可生物降解材料先溶解在与水不互溶的挥发性有

机溶剂(O)中,与药物水溶液(W1)形成初乳(W1/O),然后再加入到有乳化剂存在的水相(W2)中乳化,形成W1/O/W2的复乳液,随着有机溶剂挥发,可生物降解材料沉淀出来,包在内水相外面形成微球^[12]。复乳化过程一般采用二氯甲烷为有机相,也有使用丙酮或醋酸乙酯为溶剂;W2水相中的乳化剂常选用聚乙烯醇(poly(vinyl alcohol), PVA)。

复乳法的优点是蛋白质在微球中分散较均匀,制备的微球突释较少;主要缺点是工艺过程需要控制的变量多,对蛋白质活性影响较大,工艺放大较为困难^[13]。

1.2 超临界流体

超临界流体(Supercritical fluid, SCF)是指温度和压力处于临界温度和临界压力以上的流体。处于超临界区域的流体兼具液体性质和气体性质,它基本上仍是一种气态,但又不同于一般气体,是一种稠密的气态。其密度比一般气体要大两个数量级,与液体相近。它的粘度比液体小,但扩散速度比液体快(约两个数量级),所以有较好的流动性和传递性能,表 1-1 给出超临界流体与气体和液体物理性质的比较。另外在临界点附近,温度和压强的微小改变可引起其密度发生急剧改变,并相应的表现为溶解度的变化。因此,人们可以通过改变压力、温度来实现萃取和分离的过程。

常见的 SCF 有二氧化碳、一氧化氮、水、乙烷、庚烷、氨等。其中二氧化碳的临界条件温和(临界温度 $T_c=31.3^{\circ}\text{C}$, 临界压力 $P_c=7.37\text{MPa}$),无色、无毒、无味、不易燃^[14]、化学性质不活泼、价格便宜、易制成高纯度气体等优点,故在实践中应用最多。另外,氮气(临界温度 $T_c=-147.0^{\circ}\text{C}$, 临界压力 $P_c=3.39\text{MPa}$)也具有上述其中的一些很好的特点,但其与有机溶剂的相溶性有限,限制了其应用。

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.

厦门大学博硕士论文摘要库