

阿仑膦酸钠明胶纳米微粒制备和体外释药试验

李波 丛锐 雷伟 吴红 范黎 付索超 万世勇

摘要: 目的 探索阿仑膦酸钠明胶纳米微粒的制备方法,观察其体外缓释和酶降解释药的效果,并探讨其作为新型阿仑膦酸钠制剂的应用前景。方法 采用凝聚相分离法制备阿仑膦酸钠明胶纳米微粒,磷钼兰比色法测定其载药率和包封率及体外缓释能力,建立酶降解释药曲线,测定其降解性。结果 载药明胶纳米微粒平均粒径在 100 ~ 200 nm 之间;载药率为 2.14%,包封率为 56.73%;在生理盐水中的释药规律符合一级动力学方程, $t_{1/2}$ 为 36.75 min;胰蛋白酶对纳米微粒的降解作用持续时间较长(300 min),并能够完全降解纳米微粒。结论 阿仑膦酸钠明胶纳米微粒具有大小适中、缓释效果好和易降解的特点,具有良好的临床应用前景。

关键词: 阿仑膦酸钠; 明胶; 纳米微粒; 药物释放

Preparation and drug releasing property of sodium Alendronate gelatin Nanoparticles LI Bo, CONG Rui, LEI Wei, et al. Institute of Orthopedics, Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

Abstract: Objective To study the preparation techniques of gelatin nanometer particles encapsulated with sodium Alendronate and evaluate the effects of Drug release *in vitro* and in enzyme degradation. And to approach the prospect of the new preparation of Alendronate. **Methods** Alendronate-loaded gelatin nanometer particles were prepared by the coacervation-phase separation. The rate of encapsulation and loading drug were tested by colorimetric method. *In vitro* Drug release was also examined. We built a curve of drug release in enzyme degradation to determine the degradation nature. **Results** The size of nanometer particles was around 100 ~ 200 nm. The encapsulation rate was 56.73%. The drug content was 2.14%. The release profile *in vitro* showed sustained delay-releasing effects. $t_{1/2}$ were 36.75 min. Trypsin made a longer degradation towards nanometer particle. **Conclusion** Alendronate gelatin nanometer particles may be a promising systematical Alendronate release system.

Key words: Alendronate; Gelatin; Nanometer particles; Drug release

阿仑膦酸盐(alendronate, ALD, 商品名:福善美, alendros, fosamax)是临床治疗骨质疏松的药物之一,其抑制骨吸收和增加骨量疗效显著^[1]。由于口服 ALD 存在生物利用率低($<0.7\%$)^[2]、易出现胃肠道损伤并发症、服用不方便等自身无法克服的缺点^[3]。因此,有必要探索一种能够提高阿仑膦酸钠的生物利用度并能降低其不良反应的药物剂型。明胶纳米微粒制剂由于具有缓释性、靶向性和生物黏附性等特点,近年来得到了广泛关注,并已研制成功一系列

满足临床各种需要的不同粒径明胶微球,而其在骨质疏松症防治方面的应用国内外未见报道。

笔者尝试制备阿仑膦酸钠的纳米微粒制剂并进行体外释药试验,为临床应用的可行性提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 试剂与仪器

明胶(Sigma 公司产品, B 型, Bloom 225);阿仑膦酸钠(原料药,纯度 99.9%);25%戊二醛(E. Merk 公司进口分装);胰蛋白酶、蛋白酶、 α -糜蛋白酶(Sigma 公司进口分装, 10 U/mg);异丙醇、乙醚均为分析纯;电子透镜(S 22700 型,日本);透析袋 DM-36(截留分子量 6000 ~ 10 000);UV 2754 型分光光度计;SX-4-10 型马沸炉;BS-110 S 型电子天平。

基金项目: 陕西省科学技术研究发展计划项目(2004K 10-G5)
作者单位: 710032 西安,第四军医大学西京医院全军骨科研究所(李波、丛锐、雷伟、付索超、万世勇);第四军医大学基础部化学教研室(吴红、范黎)
通讯作者: 雷伟, Email: leiwei@fmmu.edu.cn

1.2 试验方法

1.2.1 空白明胶纳米微粒的制备:采用凝聚相分离方法制备明胶纳米微粒^[4]。将一定量明胶溶于 35℃ 的双蒸水中,配制成 1% (w/v) 的溶液,取 10 mL 1% 明胶溶液,加入 0.5% 表面活性剂吐温-20 (w/v),加热至 35℃,200 rpm 速度下磁力搅拌。逐滴滴加 25% 硫酸钠约 7 mL,使明胶溶液去溶剂化,直至出现持续混浊(浊点),分光光度计于 826 nm 波长处观察记录浊点,然后逐滴滴加异丙醇约 1.2 mL,直至混浊消失。加入 0.1 mL 25% 戊二醛,高速搅拌下反应 15 min,然后加入适量 12% 偏亚硫酸钠。避光透析 2 h,用适量乙醚洗涤,挥去乙醚,在 2 mb、-40℃ 条件下冻干 24 h,得淡黄色海绵状微球。Co⁶⁰ 照射灭菌封存。

1.2.2 阿仑膦酸钠明胶纳米微粒的制备:准确称取明胶粉 0.1 g、阿仑膦酸钠纯品粉剂 5 mg,按照上述方法制备阿仑膦酸钠明胶纳米微粒。

1.2.3 ALD-明胶纳米微粒形态及粒径观察:使用磷酸钨染色电子透镜扫描分析纳米微粒的大小和形态。

1.2.4 ALD 浓度标准曲线的绘制:使用磷钼兰比色法^[5],精密称取干燥恒重的阿仑膦酸钠 0.09 g 置 100 mL 的量瓶中,加水使溶解,并稀释至刻度,摇匀,即得标准溶液(每 1 mL 含阿仑膦酸钠 900 μg)。精密量取标准溶液 1 mL 置坩埚中,加 0.2 g 氢氧化钙,摇匀,水浴蒸干,灼烧至灰白色,冷至室温,加稀盐酸 10 mL 使溶解,移置 50 mL 量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀。分别精密量取该溶液 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL,置 25 mL 量瓶中,加定磷试液(稀硫酸:2.5% 钼酸铵溶液:10% 抗坏血酸溶液为 3:1:1)5 mL,加水稀释至刻度,摇匀后,置 45℃ 水浴保温 30 min,照分光光度法^[6],在 826 nm 的波长处测定吸光度,用吸光值对浓度作标准曲线。

1.2.5 ALD 明胶纳米微粒的载药率及包封率测定:称取 ALD 明胶纳米微粒干粉 0.1 g 溶于去离子水中,加 1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠 2 mL 煮沸 10 min、静置冷却后加 1 mol·L⁻¹ 盐酸 2 mL,10 000 rpm,离心 5 min,取上清液,沉淀物再用同法反复处理 3 次,合并上清液,稀释至 50 mL,磷钼兰比色法测量磷酸盐浓度。

载药率 (%) = (ALD 质量 / ALD-GMS 质量) × 100%

包封率 (%) = (ALD-GMS 中 ALD 质量 / 投入 ALD 量) × 100%

1.2.6 ALD-GMS 体外释药试验:采用动态透析法测

定,称取 ALD 2.14 mg 和 ALD 明胶纳米微粒 100 mg 各 3 份,分别置透析袋内,加入 2 mL 等渗盐水混匀,封口,将透析袋分别置入两组溶出杯中,各加 150 mL 等渗盐水作为释放介质,加盖后置 37℃、100 rpm 磁力搅拌下,定时取样,同时补充等量释放介质,用磷钼兰比色法测定药物释放量,计算累积释药百分率。

1.2.7 载药纳米微粒酶降解释药特性:按照 Roser and Kissel (1993) 的方法对载药纳米微粒进行酶降解^[7]。取 10 mL 双蒸水,配制 0.4 mg·mL⁻¹ 胰蛋白酶、α-糜蛋白酶和蛋白酶溶液。分别称取 40 mg 载药纳米微粒,在 37℃ 条件下溶于 50 mL 生理盐水中,避光、磁力搅拌(800 rpm)充分溶胀后,分别加入 10 mL 蛋白分解酶溶液(胰岛素溶液、α-糜蛋白酶和蛋白酶,浓度均为 0.4 mg·mL⁻¹),在预设时间间隔(5、15、30、60、120、240、360 min)下,取同等量混悬液 2 mL,在 10 000 rpm 条件下,离心 5 min 后,取上清液,沉淀物再用同法反复处理 3 次,合并上清液,用磷钼兰比色法测量药物浓度。

2 结果

2.1 ALD 明胶纳米微粒的制备工艺及形态观察

为了获得最佳工艺条件,本试验在单因素考察的基础上,对影响明胶纳米微粒成球性和分散性的主要因素—明胶浓度、交联剂用量及搅拌速度进行了重点考察,探索出了比较稳定的 ALD 明胶纳米微粒制备方法。电子透镜观察可见所制备 ALD 明胶纳米微粒形态近似球形,大小均匀,形态见图 1,分析显示纳米微粒粒径在 100 ~ 200 nm 范围内。在载药和空白纳米微粒之间粒径和形态无明显差异。

2.2 ALD 浓度标准曲线的建立

经 SPLM 统计软件分析,光吸收值与 ALD 浓度线性相关系数 $R^2 = 0.9966$,所得线性回归方程为: $y = 0.1688x$ (线性范围: 0.5 ~ 5 μg·mL⁻¹)。其中 x 为 ALD 浓度, y 为光吸收值。以磷钼兰比色法采用标准曲线法测得 ALD-GMS 的平均载药率为 2.14%,包封率为 56.73%。

2.3 ALD 明胶纳米微粒的体外缓释作用研究

ALD 明胶纳米微粒的体外累积释放曲线见图 2。

经 Table Curve 2 D 软件进行曲线拟合并计算,ALD 明胶纳米微粒的体外释放符合一级动力学方程 $y = 0.1689 \ln(t) - 0.1395$, $r = 0.9933$, t 为 ALD 浓度, y 为 ALD 浓度, $t_{1/2}$ 为 36.75 min,而溶液剂的 $t_{1/2}$

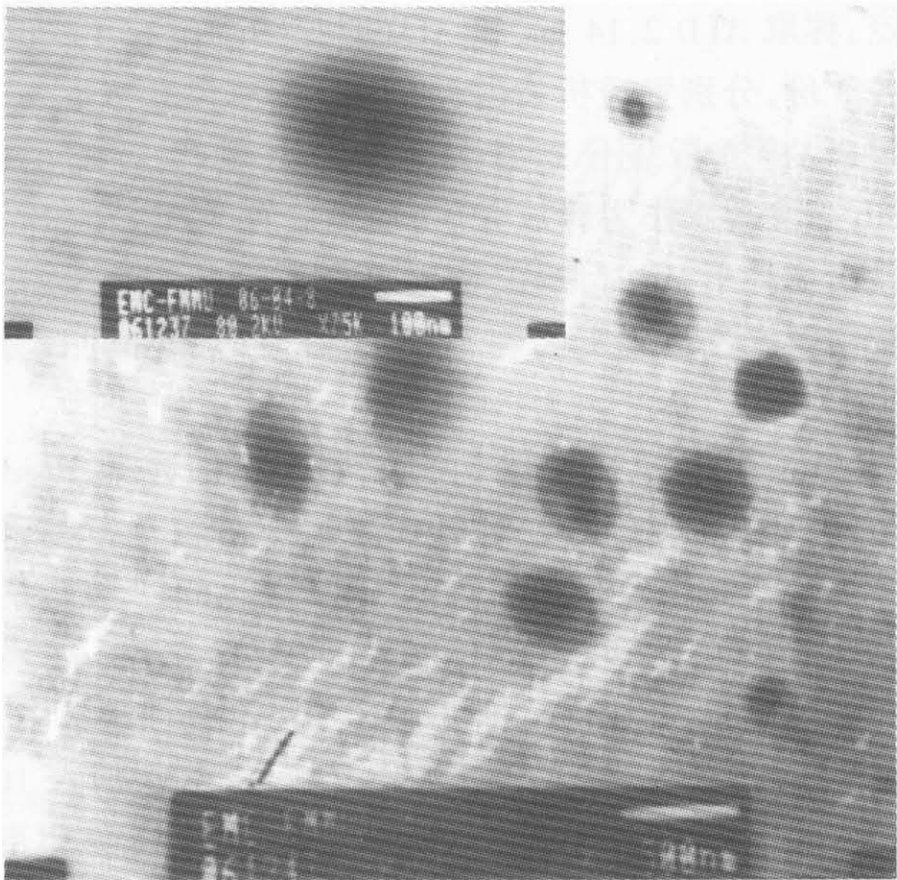


图 1 ALD 明胶纳米微粒的电子透镜照片(×75000)

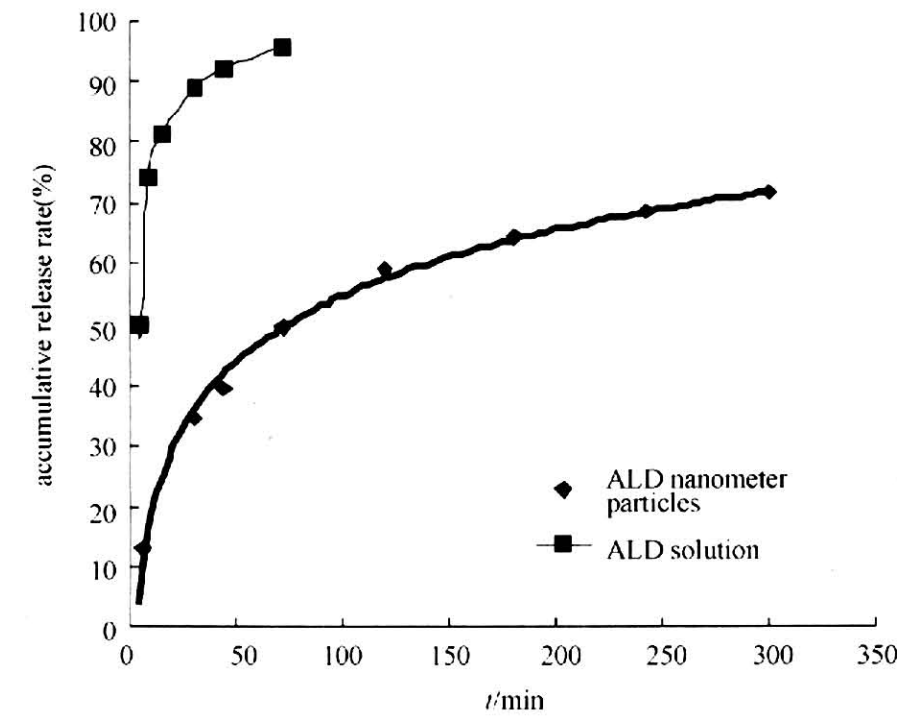


图 2 ALD 明胶纳米微粒和 ALD 溶液的体外释放曲线

为 8.16 min。说明与 ALD 溶液相比,ALD 明胶纳米微粒具有明显的缓释作用。

2.4 ALD 明胶纳米微粒的酶降解试验

室温条件下,ALD 明胶纳米微粒在 3 种蛋白水解酶(蛋白酶、 α -糜蛋白酶、胰蛋白酶,浓度均为 $0.4\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)中的降解曲线。

如图 3 所示,蛋白酶能够在 2 min 内降解 50% 的 ALD 明胶纳米微粒,蛋白酶和 α -糜蛋白酶对 ALD 明胶纳米微粒的降解反应在 30 min 后基本结束,并在 2 h 内不能完全降解(分别为 80% 和 85%)。然而,胰蛋白酶对纳米微粒的降解作用持续时间较长(约 300 min),并能够完全降解纳米微粒。

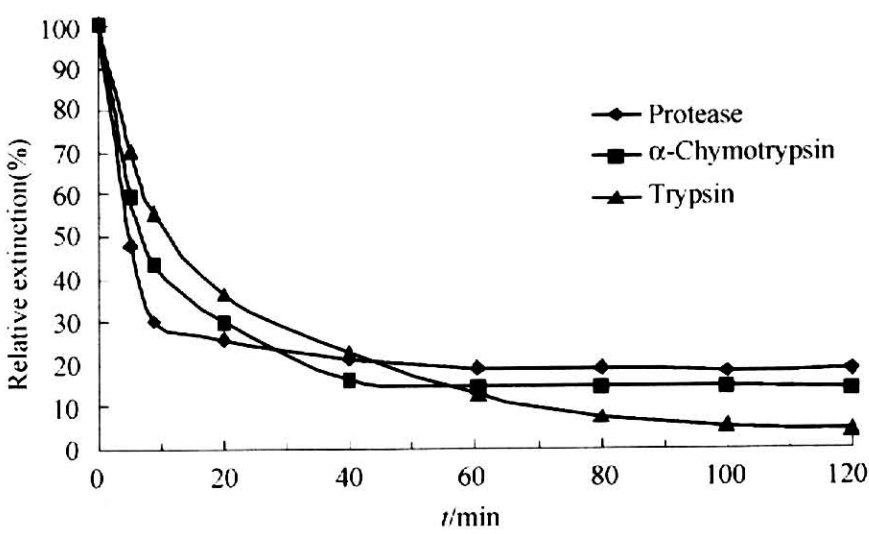


图 3 ALD 明胶纳米微粒的酶降解曲线

3 讨论

阿仑膦酸盐抑制骨吸收和增加骨量疗效显著^[1],且进入体内后具有自动靶向作用,主动沉积于骨代谢活跃部分^[8],为目前临床治疗骨质疏松症的主要药物。但研究发现经静脉给药时,药物大多沉积于脾脏和肝脏^[9],同时研究表明二膦酸盐药物经静脉给药主要沉积于脾、肝等非钙化部位,可能与静脉给药体内瞬时高药物浓度导致药物在体内发生反应而被吞噬有关^[10]。因此,目前临床应用主要为二膦酸盐的口服制剂,但最新研究显示口服二膦酸盐类药物有明显胃肠道损伤的不良反应和生物利用度低^[11]的缺点。而本实验将二膦酸盐类药物包封在粒径大小适合的载药微球中,可减小体内瞬时药物浓度,延长二膦酸盐类在体内的滞留时间,提高药物利用率,并可从根本上避免口服副作用的发生。为此,本试验以天然大分子材料明胶为载体,制备了 ALD 纳米微粒。利用体外释药和酶降解释药试验表明,ALD 明胶纳米微粒具有缓释性和体内易降解性。

血管内注射纳米微粒后,粒径在 $0.3\text{ }\mu\text{m} \sim 2\text{ }\mu\text{m}$ 的微粒被包裹在血液会迅速被网状内皮组织(RES)和肝脏中的多形核白细胞吸收,从而聚集在肝脏的星形细胞中,可有效地用于治疗肝脏疾病。而当粒径足够小($100\text{ nm} \sim 150\text{ nm}$),便可逃过 kupffer 细胞的吞噬。研究表明,本实验采用凝聚相分离法制备明胶纳米微粒,图 1 为磷酸钨染色透射电镜测定的微球形态图,从图中可看出微粒为规整球形,大小均一,粒径为 $100\text{ nm} \sim 200\text{ nm}$ 之间,粒径大小合适,RES 难以辨识,药物包裹可在血液内停留较长时间,从而达到缓释效应。

蛋白水解酶降解试验用于进一步测定纳米微粒降解效率,并对临床治疗给药途径的可行性进行评估,药物载体必须具有体内易降解性。用 3 种不同蛋白水解酶(胰蛋白酶、 α -糜蛋白酶或蛋白分解酶)

对空白和载药纳米微粒进行酶降解测定,空白和载药纳米微粒试验结果中没发现明显差异。从试验结果可看出明胶纳米微粒具有易降解性,可假设药物载体可在体内完全降解。此外,3 种降解酶的降解程度的不同提示了酶的特异性程度,胰蛋白酶显然是明胶纳米微粒的最合适降解酶。这些结果与胶原纳米微粒文献报道^[13]相符合。蛋白水解酶降解试验显示 3 种酶对 ALD 明胶纳米微粒可进行很好降解,因此可认为 ALD 明胶纳米微粒具有体内可降解性,同时胰蛋白酶可被用来作为消化纳米微粒的蛋白基质。

目前,ALD 明胶纳米微粒的研制虽还限于实验室阶段,但本试验初步证实了其在骨质疏松症治疗应用中的前景,有关 ALD 明胶纳米微粒体内药代动力学和作用机制仍需进一步研究。

【参 考 文 献】

- [1] Rodan G, Reszka A, Golub E, et al. Bone safety of long-term bisphosphonate treatment. *Curr Med Res Opin*, 2004, 20(8):1291-1300.
- [2] Gertz BJ, Holland SD, Kline WF, et al. Clinical pharmacology of alendronate sodium. *Osteopor Int*, 1993, 3(suppl 3):513-516.
- [3] Sener G, Sehirli O, Cetinel S, et al. Protective effect of taurine against alendronate-induced gastric damage in rats. *Fundam Clin Pharmacol*, 2005, 19(1):93-100.
- [4] Oppenheim RC, Stewart NF. The manufacture and tumor cell uptake of nanoparticles labelled with fluorescein isothiocyanate. *Drug Dev Ind Pharm*, 1979, 57(3):583-591.
- [5] Thompson R, Grinberg N, Perpall H, et al. Separation of organophosphonates by ion chromatography with indirect photometric detection. *Liq Chromatogr*, 1994, 17(11):2511.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部). 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [7] Roser M, Fischer D, Kissel T, et al. Surface-modified biodegradable albumin nano-microspheres Preparation and characterization. *Eur J Pharm Biopharm*, 1993, 39: 8-12.
- [8] Kasting GB, Francis MD. Retention of etidronate in human, dog and rat. *Bone Miner Res*, 1992, 7(5):513-522.
- [9] Mrnkkmen J, Yalitalo P. The tissue distribution of clodronate (dichloromethylene bisphosphonate) in mice. The effects of vehicle and the route of administration. *Eur J Drug Metab Pharmacokin*, 1990, 15(3):239-243.
- [10] Monkkonen J, Koponen HM, Ylitalo P. Comparison of the distribution of three bisphosphonates in mice. *Pharmacol Toxicol*, 1989, 66(4):294-298.
- [11] Khapra AP, Rose S. Drug injury in the upper gastrointestinal tract: effects of alendronate. *Gastrointest Endosc Clin N Am*, 2006, 16(1):99-110.
- [12] Oppenheim RC. Solid colloidal drug delivery system: nanoparticles. *Int J Pharm*, 1981, 8: 217-234.
- [13] El-Samalg MS, Rohdewald P. Reconstituted collagen nanoparticles, a novel drug carrier delivery system. *J Pharm Pharmacol*, 1983, 35(8):537-539.

(收稿日期: 2006-11-14)