

阿托伐他汀钙缓释微球制备方法的优化

<https://doi.org/10.12307/2022.088>刘童斌¹, 林鹏², 张晓明¹, 董西玲¹, 曹飞¹, 王乐¹, 郭新星²

投稿日期: 2020-08-22

送审日期: 2020-08-26

采用日期: 2020-10-24

在线日期: 2021-03-31

中图分类号:

R459.9; R318.08; R915

文章编号:

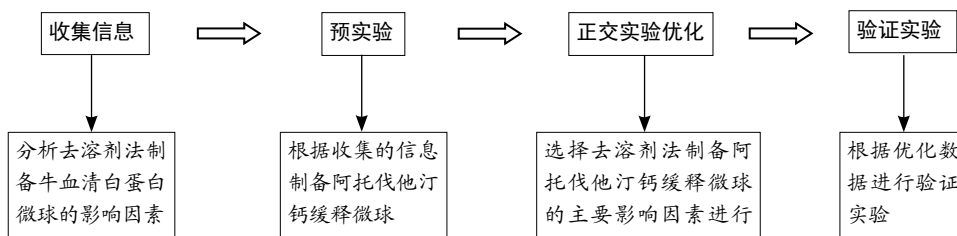
2095-4344(2022)04-00535-05

文献标识码: A

文章快速阅读:

文章特点—

△实验分析了影响去溶剂法制备阿托伐他汀钙缓释微球的主要影响因素, 包括牛血清白蛋白质量浓度、牛血清白蛋白溶液 pH 值、阿托伐他汀钙的用量、乙醇添加速度。



文题释义:

药物缓释剂: 是将药物包裹于特定的缓释介质中, 使药物可以按要求缓慢地从介质中释放的制剂。与普通药物制剂相比, 药物缓释剂可调整药物的理化特性、增加药物的稳定性、降低药物的不良反应; 临床上用药频率的减少能显著增加患者的依从性。

去溶剂法: 是在牛血清白蛋白水溶液中缓慢加入脱溶剂物质(例如无水乙醇), 由于牛血清白蛋白水溶性低, 脱溶剂活性剂的加入导致蛋白分子脱水, 从而致使蛋白分子构象改变, 逐渐变得卷曲, 最终成团。此时形成的蛋白颗粒是极不稳定的, 用水分散后仍可以重新溶解。

摘要

背景: 近年来研究发现, 他汀类药物在调节骨代谢、修复骨细微结构、抑制炎症、促进细胞增殖、修复血管内皮、调节信号通路传导等多方面具有显著效果。

目的: 对载阿托伐他汀钙缓释微球的制作参数进行优化, 以期制备出载药量大、形态规则的缓释微球。

方法: 采用去溶剂法制备载阿托伐他汀钙的牛血清白蛋白缓释微球, 筛选出影响去溶剂过程的主要影响因素, 包括血清白蛋白溶液质量浓度(40, 70, 100 g/L)及pH值(7, 8, 9)、阿托伐他汀钙的用量(200, 300, 400 μg)、乙醇添加速度(0.2, 0.5, 1 mL/min), 通过正交实验筛选出最佳封装率的制备条件。在最佳组合工艺参数下制备载阿托伐他汀钙的牛血清白蛋白缓释微球, 置于PBS中进行体外缓释性能测试。

结果与结论: ①最佳的制备工艺参数是: 牛血清白蛋白溶液质量浓度为100 g/L、pH值为7, 阿托伐他汀钙用量为400 μg, 乙醇添加速度为0.2 mL/min; ②在此参数下制备的微球形态规则, 表面光滑, 微球直径(425.0±13.8) nm, 药物封装率高达85.70%, 体外释放时间可持续48 h以上, 累积释放量达到73%, 具有较为良好的缓释效果; ③实验成功制备了负载阿托伐他汀钙的牛血清白蛋白缓释微球, 此药物缓释微球具有较高载药量及稳定性, 并可以实现的药物缓释。

关键词: 材料; 牛血清白蛋白; 微球; 阿托伐他汀钙; 药物缓释; 正交实验; 封装率

Optimization of preparation method of atorvastatin calcium sustained-release microspheres

Liu Tongbin¹, Lin Peng², Zhang Xiaoming¹, Dong Xiling¹, Cao Fei¹, Wang Le¹, Guo Xinxing²

¹Department of Prosthodontics, Binzhou Medical University Hospital, Binzhou 256600, Shandong Province, China; ²Department of Orthodontics, Jinan Stomatological Hospital, Jinan 250000, Shandong Province, China

Liu Tongbin, Master, Attending physician, Department of Prosthodontics, Binzhou Medical University Hospital, Binzhou 256600, Shandong Province, China

Lin Peng, Master, Attending physician, Department of Orthodontics, Jinan Stomatological Hospital, Jinan 250000, Shandong Province, China

Liu Tongbin and Lin Peng contributed equally to this article.

Corresponding author: Wang Le, Master, Department of Prosthodontics, Binzhou Medical University Hospital, Binzhou 256600, Shandong Province, China

Abstract

BACKGROUND: In recent years, studies have found that statins have significant effects on regulating bone metabolism, repairing bone microstructure, inhibiting inflammation, promoting cell proliferation, repairing vascular endothelium, and regulating signal pathway conduction.

¹滨州医学院附属医院口腔修复科, 山东省滨州市 256600; ²济南市口腔医院口腔正畸科, 山东省济南市 250000

第一作者: 刘童斌, 1989年生, 山东省滨州市人, 硕士, 主治医师, 主要从事口腔修复学研究。

共同第一作者: 林鹏, 1989年生, 山东省济南市人, 硕士, 主治医师, 主要从事口腔正畸学研究。

通讯作者: 王乐, 硕士, 滨州医学院附属医院口腔修复科, 山东省滨州市 256603

<https://orcid.org/0000-0003-3316-061X> (王乐)

基金资助: 山东省医药卫生科技发展计划项目(2016WS0121), 项目参与者: 郭新星、林鹏、刘童斌; 滨州医学院科技计划项目(BY2017KJ05), 项目负责人: 刘童斌

引用本文: 刘童斌, 林鹏, 张晓明, 董西玲, 曹飞, 王乐, 郭新星. 阿托伐他汀钙缓释微球制备方法的优化 [J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(4):535-539.



OBJECTIVE: To optimize the preparation parameters of atorvastatin calcium sustained-release microspheres, to prepare sustained-release microspheres with large drug loading and regular morphology.

METHODS: The bovine serum albumin sustained-release microspheres loaded with atorvastatin calcium were prepared by desolvent method. The main factors affected the preparation of the microspheres were screened out. The four key related factors were bovine serum albumin concentration (40, 70, 100 g/L), pH value (7, 8, 9), dosage of atorvastatin calcium (200, 300, 400 μg), and ethanol addition rate (0.2, 0.5, 1 mL/min). The optimal preparation conditions of large drug loading were screened by orthogonal test. Atorvastatin calcium-loaded bovine serum albumin sustained-release microspheres were prepared under optimal parameters and placed in PBS for sustained-release performance testing.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) The optimum preparation parameters were as follows. The concentration of bovine serum albumin was 100 g/L; the pH value was 7; the dosage of atorvastatin calcium was 400 μg ; the addition rate of ethanol was 0.2 mL/min. (2) The microspheres prepared under this parameter had regular morphology and smooth surface. The particle size was (425.0 \pm 13.8) nm and the encapsulation efficiency of drug loaded microspheres was up to 85.70%. The *in vitro* release time could last for more than 48 hours, and the cumulative release reached 73% which had a relatively good sustained release effect. (3) It is indicated that the stable sustained-release microspheres loaded with atorvastatin calcium were successfully prepared. The sustained-release microspheres with high drug loading and stability can achieve sustained drug release.

Key words: materials; bovine serum albumin; microspheres; atorvastatin calcium; drug release; orthogonal experiment; entrapment efficiency

Funding: the Medical and Health Science and Technology Development Plan Project of Shandong Province, No. 2016WS0121 (to GXX, LP, LTB); the Science and Technology Program of Binzhou Medical University, No. BY2017KJ05 (to LTB)

How to cite this article: LIU TB, LIN P, ZHANG XM, DONG XL, CAO F, WANG L, GUO XX. Optimization of preparation method of atorvastatin calcium sustained-release microspheres. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu.* 2022;26(4):535-539.

0 引言 Introduction

目前社会环境下骨质疏松的发生率日趋上升,有些专家将目光放到了药物治疗骨质疏松症的可能性上,其中阿托伐他汀钙调节骨代谢的作用引起了学者们的广泛关注。他汀类药物的本质是3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶抑制剂,临床上主要是治疗高血脂^[1-2],近年来专家发现他汀类药物除了调节血脂外还可以激活成骨细胞,刺激骨形成、增加骨密度,显著降低降低了骨质疏松患者严重并发症——骨折的发生率^[3]。他汀类药物在抗骨质疏松方面目前主要是联合用药,相关研究将其与降钙素^[4]、低剂量雌激素^[5]、阿仑膦酸钠^[6]、唑来膦酸钠等药物联合使用,均表现出了良好抗骨质疏松的效果。虽然阿托伐他汀钙调节骨代谢作用的引起了专家学者的重视,但是缓释剂的研发相对空缺,限制了此药在很多领域的应用。基于以上研究成果,作者试图改变阿托伐他汀钙的用药方式,制备成药物缓释微球用于骨质疏松的局部,进一步加强和利用其调节骨代谢的作用。

伴着药物新剂型的不断研发,已经涌现出了众多缓释给药系统,其中微球给药系统表现出了较为突出的良好性能,但是由于微球缓释系统的研发时间较短,研究技术不够成熟,因而极具开发潜力。微球是高分子材料形成的微小球状实体,粒径较小、比表面积大,所以其具有较高的药物负载率,微球作为骨架包覆药物,通过药物的析出及材料的降解达到持续维持药物浓度的作用^[7-8]。目前微球的制备技术主要包括去溶剂法、热凝胶法、乳化法和层层自组装技术,其中去溶剂法是原理及操作最简便、取材最方便的一种制备方法。牛血清白蛋白是去溶剂法最常用的药物载体,其已被证实是一种无毒性、无免疫原性的物质,生物相容性好且生物可降解。在去溶剂法制备微球的过程中可形成牛血清白蛋白凝聚体,但是这种凝聚体极不稳定,与水接触容易发生解聚现象,故一般需要通过添加稳定剂使微球稳定。基于以上研究,实验设计以牛血清白蛋白作为药物的缓释载体,通过去溶剂法制备包覆阿托伐他汀钙的缓释微球,用无毒的低分子量壳聚糖代替有毒的戊二醛稳定微球^[9]。

去溶剂法制备载药物缓释微球过程受众多参数影响,实

验探讨主要的影响参数,以期制备出形态好、稳定性高且具有持续缓释效果的缓释微球。实验根据去溶剂法制备微球相关实验筛选出4个关键的因素,即牛血清白蛋白溶液质量浓度及pH值、阿托伐他汀钙的用量、乙醇添加速度,根据药物包封率通过正交实验筛选最佳制备条件。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 正交实验设计,对比观察实验。

1.2 时间及地点 实验于2019年4-11月在山东大学口腔医学院科研实验室和滨州医学临床医学实验室完成。

1.3 材料

主要试剂与材料:阿托伐他汀钙(美国瑞辉制药公司,国药准字J20070060);牛血清白蛋白、低分子量(50 000-190 000 Da, based on viscosity)壳聚糖(美国Sigma公司);无水乙醇、乙酸(国药制剂)。

主要仪器与设备:天平及pH仪(瑞士METTLER TOLEDO公司);搅拌机(江苏科析仪器有限公司);微量注射泵(深圳市通力维纳科技有限公司);紫外线分光光度计(日本Hitachi公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 载药微球的制备 将一定量的牛血清白蛋白加入到5 mL去离子水中,然后加入阿托伐他汀钙,调节溶液pH值,在持续连续搅拌下泵入脱溶剂——无水乙醇,继续持续搅拌混合液,搅拌时间不少于6 h。

1.4.2 载药微球的稳定 将醋酸稀释成稀醋酸,将20 mg低分子量壳聚糖加入20 mL稀醋酸中配置成质量浓度为1 g/L的壳聚糖溶液,以30 mL/h的速度加入连续搅拌的牛血清白蛋白混合溶液中,搅拌过夜。最终悬浊液以12 000 r/min高速转速离心15 min,收集最终的沉淀,低温冻干备用,冻干的粉末即壳聚糖稳定的载药微球。

1.4.3 独立变量的优化及选择

牛血清白蛋白溶液质量浓度对载药微球成球性、包封率的影响:将一定量的牛血清白蛋白粉剂溶解在5 mL去离子水中,配制成10, 40, 70, 100 g/L的牛血清白蛋白溶液;

将一定量的阿托伐他汀钙 (300 μg) 加入, 搅拌均匀后调节 pH 值至 8; 将 20 mL 的乙醇以 1 mL/min 的速度泵入溶液中, 搅拌速度为 600 r/min, 用壳聚糖进行稳定, 冻干备用。

牛血清白蛋白溶液 pH 值对载药微球成球性、包封率的影响: 在 100 g/L 牛血清白蛋白溶液中加入 300 μg 阿托伐他汀钙, 调节溶液 pH 值分别为 6, 7, 8, 9, 调节完成后分别以 1 mL/min 的速度将 20 mL 无水乙醇泵入溶液中, 继续持续搅拌至少 6 h, 用壳聚糖溶液进行稳定, 冻干备用。

乙醇添加速度对载药微球成球性、包封率的影响: 在 100 g/L 牛血清白蛋白溶液中加入 300 μg 阿托伐他汀钙, 调节溶液 pH 值至 8。将 20 mL 的乙醇泵入溶液中, 乙醇的添加速度设置为 0.2, 0.5, 1, 1.5 mL/min, 搅拌速度尽量快, 搅拌完成后用壳聚糖溶液进行稳定, 冻干。

阿托伐他汀钙用量对载药微球载药量、成球性的影响: 将 50, 100, 200, 300, 400, 500 μg 的阿托伐他汀钙分别加入搅拌好的 100 g/L 牛血清白蛋白溶液中搅拌均匀, 调节 pH 值至 8, 将 20 mL 乙醇以 1 mL/min 的速度泵入溶液中, 包覆壳聚糖稳定备用。

根据单因素实验结果, 以载药微球包封率为考察指标, 选取影响载药微球成球性、粒径、包封率的牛血清白蛋白质量浓度、溶液 pH 值、乙醇推进速度、阿托伐他汀钙含量 4 个因素, 各取 3 个水平, 进行 $L_9(3^4)$ 正交实验设计, 见表 1, 以确定载牛血清白蛋白壳聚糖微球的最佳制备工艺, 并进行验证实验。

表 1 | $L_9(3^4)$ 正交实验因素水平表

Table 1 | Factors and levels in the $L_9(3^4)$ orthogonal design

| 因素 | 水平 | | |
|--------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | 1 | 2 | 3 |
| A 牛血清白蛋白质量浓度 | 40 g/L | 70 g/L | 100 g/L |
| B 溶液 pH 值 | 7 | 8 | 9 |
| C 阿托伐他汀钙用量 | 200 μg | 300 μg | 400 μg |
| D 乙醇添加速度 | 0.2 mL/min | 0.5 mL/min | 1 mL/min |

1.4.4 载药微球的验证 采用最佳制备工艺制备载药微球。

透射电镜观察: 将制备好的微球沉淀收集起来, 在冻干之前保存在 1 mL 的稀释乙醇 (体积比 50 : 50) 混合液中, 充分搅拌后取 10 μL 悬浊液用无水乙醇扩大 200 倍, 取一滴扩大液体滴在载碳铜网表面, 自然晾干, 透射电镜下观察。观察时多个样本、多部位观察, 综合观察结果。

包封率及体外释药曲线: 将载药微球混合液的纯化上清液收集起来, 用紫外线分光光度计 (波长为 240 nm) 检测上清中的阿托伐他汀钙浓度, 此部分是未载入的药量, 通过以下公式换算微球包封率。包封率 (%) = (药物的总质量 - 上清液中药物的质量) / 药物的总质量 $\times 100\%$ 。

将 5 mg 的载药缓释冻干微球浸入含 5 mL PBS 的 15 mL 离心管内, 移入 37 $^{\circ}\text{C}$ 、100 r/min 恒温振荡箱中, 达到检测的预定时间取出 1 mL 溶液, 测定缓释液中的阿托伐他汀钙的浓度, 同时加入新鲜的 PBS 1 mL, 计算各时间点累计释放量。设置 3 个平行组, 取 3 组实验结果平均值作为结果。

1.5 主要观察指标 ①载药微球的阿托伐他汀钙包封率; ②

药物微球形形成量; ③药物缓释微球的形态及直径。

1.6 统计学分析 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示。所有数据资料应用 SPSS 18.0 统计学软件进行处理, 数据比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 时差异有显著性意义。

2 结果与讨论 Results and discussion

2.1 载药微球单因素实验结果

2.1.1 牛血清白蛋白溶液质量浓度 将牛血清白蛋白溶液的质量浓度设置在 10–100 g/L 之间, 其他实验条件固定不变。查阅文献得知, 在去溶剂法制作牛血清白蛋白缓释微球的相关实验中, 牛血清白蛋白常用的质量浓度为 10–70 g/L。但此次实验研究发现, 当牛血清白蛋白溶液的质量浓度过低时无法形成良好形态的微球, 同时 70 g/L 的质量浓度也不是极限, 大于 70 g/L 仍然可以形成良好形态、稳定性高的微球, 所以将 10 g/L 的牛血清白蛋白溶液去除, 结果见表 2。各组外观见图 1。

表 2 | 牛血清白蛋白溶液质量浓度对载药微球成球性的影响

Table 2 | Influence of bovine serum albumin concentration on ballability of drug loaded microspheres

| 牛血清白蛋白 溶液质量浓度 | 成球性 |
|------------------|----------------------------------|
| 10 g/L | 少量微球形成, 大部分为微球碎片, 微球形态不佳 |
| 40 g/L | 混合液变浑浊, 大量微球形成, 微球形态规则 |
| 70 g/L | 混合液变浑浊, 变混速度有所加快, 大量微球形成, 微球形态良好 |
| 100 g/L | 混合液变浑浊, 近似乳白色, 大量微球形成, 微球直径增大 |

2.1.2 pH 值 溶液的 pH 值强烈影响所得到的牛血清白蛋白纳米粒子尺寸, 主要规律是粒子直径随着 pH 值的增大而减小, 表明静电相互作用是控制粒子形成的主要因素。值得注意的是, 溶液 pH 值过小是无法形成微球的, 透射电镜显示形成大的团块样结构, 见图 2, 所以对 pH 值只研究中性及碱性的情况。当溶液 pH 值为 7, 8, 9, 10 时的粒径分别为 (473.0 \pm 13.6), (345.0 \pm 15.7), (301.0 \pm 14.3), (220.0 \pm 18.3) nm。

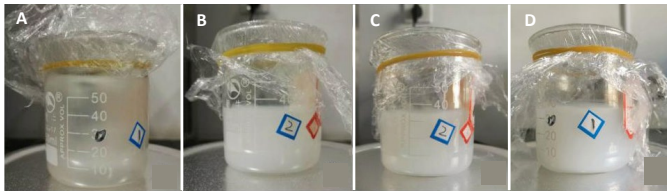
2.1.3 乙醇加入速度 有研究发现, 乙醇的添加速度影响微球粒径的均一性^[10], 乙醇的加入速度即脱水速度决定了过饱和速率和程度, 因此强烈地影响成核速率及颗粒生长, 专家更倾向于减缓添加速度, 有相关研究考虑间歇加入乙醇以获得直径更加均匀的微球^[11]。牛血清白蛋白纳米颗粒的尺寸均一性控制对获得一致及理想的生物活性物质的传递性能具有重要意义。研究发现, 减慢乙醇的加入速度更容易获得均一的微球, 并且微球的直径更小、表面更加光滑, 结果见表 3 所示。

表 3 | 乙醇加入速度对载药微球成球性及粒径的影响

Table 3 | Effect of ethanol addition rate on the ballability and particle size of drug loaded microspheres

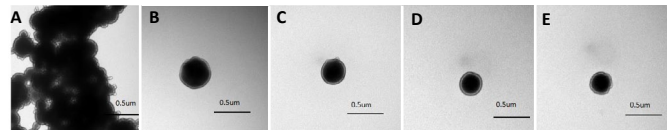
| 乙醇添加速度 | 微球直径 | 微球均一性 |
|------------|-----------------------|----------------------------|
| 0.2 mL/min | (305.0 \pm 15.3) nm | 大量微球形成, 镜下观察大小均匀表面光滑, 规则圆形 |
| 0.5 mL/min | (345.0 \pm 15.7) nm | 大量微球形成, 微球形态好, 均一性好 |
| 1 mL/min | (367.0 \pm 25.3) nm | 大量微球形成, 微球表面光滑度下降, 为较规则圆形 |
| 1.5 mL/min | (389.0 \pm 29.3) nm | 大量微球形成, 微球直径增大, 可见直径差异大的微球 |

2.1.4 阿托伐他汀钙的用量 当药物的用量较低时,因为溶液中药物含量过低,药物包封率欠佳,药物包封率会随着药物的增加逐渐提高,然而由于牛血清白蛋白的有效负载量有限,因此当阿托伐他汀钙的用量达到一定量时,即使继续增加其用量包封率也不会增加。具体结果见图 3。



图注: A-D 中牛血清白蛋白溶液质量浓度分别为 10, 40, 70, 100 g/L
图 1 | 不同牛血清白蛋白溶液质量浓度对载药微球成球性的影响

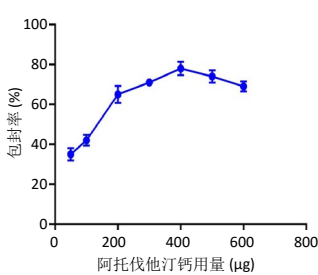
Figure 1 | Influence of bovine serum albumin concentration on ballability of drug loaded microspheres



图注: A-E 中溶液的 pH 值分别为 6, 7, 8, 9, 10, 其中当溶液的 pH 值为 6 时未成球, 形成了大的团块样结构

图 2 | 不同牛血清白蛋白溶液 pH 值对载药微球成球性的影响 (透射电镜, 标尺 =0.5 μm)

Figure 2 | Effect of different pH values of bovine serum albumin solution on the ballability of drug loaded microspheres (transmission electron microscope, scale bars=0.5 μm)



图注: 药物包封率会随着药物的增加逐渐提高, 当阿托伐他汀钙的用量达到 400 μg 时, 即使继续增加其用量包封率也不再增加

图 3 | 阿托伐他汀钙用量对载药微球包封率的影响

Figure 3 | Effect of dosage of atorvastatin calcium on encapsulation efficiency of drug loaded microspheres

2.2 正交实验结果 根据单因素实验结果, 选取影响载牛血清白蛋白壳聚糖微球成球性及包封率的牛血清白蛋白溶液的质量浓度及 pH 值、阿托伐他汀钙用量、乙醇添加速度 4 个因素, 各取 3 个水平, 进行 $L_9(3^4)$ 正交实验设计, 结果见表 4。

由正交实验结果可知, 这 4 个因素对载药微球包封率的影响顺序为 C>A> B>D, 即阿托伐他汀钙用量 > 牛血清白蛋白质量浓度 > 溶液 pH 值 > 乙醇添加速度, 因此最优工艺组合为 A3B1C3D1, 即牛血清白蛋白溶液质量浓度为 100 g/L、pH 值为 7, 阿托伐他汀钙用量 400 μg, 乙醇添加速度 0.2 mL/min。在此条件下进行验证实验得到的载药微球包封率可达 85.70%。

2.3 验证实验结果 为了验证模型进行了 3 次平行实验, 平均综合指标后载药微球包封率为 85.70%, 与预测值基本一致。体外释放系统显示, 该载药微球可以实现长达 48 h 以上的药

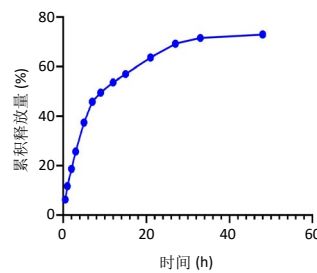
物缓释, 48 h 以后缓释基本平稳, 仅仅释放了 73% 的药物, 载药微球中仍然包含 27% 的药物, 所以实际的缓释时间长于 48 h, 见图 4。该载药微球直径 (425.0±13.8) nm, 透射电镜下观察照片可见微球形态规则, 表面光滑, 无粘连, 效果优异, 见图 5。

表 4 | $L_9(3^4)$ 正交实验结果

Table 4 | Results of $L_9(3^4)$ orthogonal design

| 实验号 | A 牛血清白蛋白溶液质量浓度 (g/L) | B 溶液 pH 值 | C 阿托伐他汀钙用量 (μg) | D 乙醇添加速度 (mL/min) | 包封率 (%) |
|-------|----------------------|-----------|-----------------|-------------------|---------|
| 1 | 40 | 7 | 200 | 0.2 | 44.3 |
| 2 | 40 | 8 | 300 | 0.5 | 61.5 |
| 3 | 40 | 9 | 400 | 1 | 71.2 |
| 4 | 70 | 7 | 300 | 1 | 67.7 |
| 5 | 70 | 8 | 400 | 0.2 | 79.6 |
| 6 | 70 | 9 | 200 | 0.5 | 44.7 |
| 7 | 100 | 7 | 400 | 0.5 | 85.1 |
| 8 | 100 | 8 | 200 | 1 | 47.3 |
| 9 | 100 | 9 | 300 | 0.2 | 66.9 |
| K_1 | 59 | 65.7 | 45.3 | 63.6 | |
| K_2 | 63.7 | 62.8 | 65.4 | 63.8 | |
| K_3 | 66.4 | 60.9 | 78.6 | 62.1 | |
| R | 7.4 | 4.8 | 33.3 | 1.5 | |

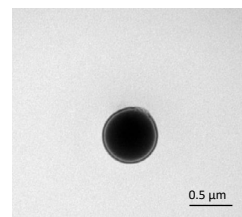
表注: K_1 表示“1”水平所对应的实验指标数值的平均数, K_2 表示“2”水平所对应的实验指标数值的平均数, K_3 表示“3”水平所对应的实验指标数值的平均数, R 表示相应实验指标 K 值的极差



图注: 该载药微球可以实现长达 48 h 以上的药物缓释, 48 h 以后缓释基本平稳, 仅仅释放了 73% 的药物, 载药微球中仍然包含 27% 的药物

图 4 | 载阿托伐他汀钙牛血清白蛋白缓释微球的体外药物释放

Figure 4 | In vitro drug release of atorvastatin calcium loaded bovine serum albumin sustained release microspheres



图注: 微球形态规则, 表面光滑, 无粘连
图 5 | 载阿托伐他汀钙牛血清白蛋白缓释微球的透射电镜图像

Figure 5 | Transmission electron microscopic image of bovine serum albumin microspheres loaded with atorvastatin calcium

3 讨论 Discussion

与传统支架比较, 微球形式的支架具有其独特优势, 微球溶液流动性好, 可注射用药, 并且能以微创的方式注入骨缺损区, 手术创伤显著降低^[12]; 其次, 微球较小的体积和圆形形态使得它可填充到不规则组织缺损区域^[13]; 再次, 微球一般用生物相容性好的材料制作而成, 无毒无害; 最后, 微球可携带多种药物、各类蛋白质和丰富的基因, 进一步提高其生物活性^[14]。实验设计的载阿托伐他汀钙牛血清白蛋白缓释微球具有上述微球支架的普遍优势, 微球冻干后大体观为粉末状, 利于保存及运输^[15], 使用时可直接填充于骨缺损区域, 也可溶解后注射至相应病变区域, 使用简单方便。

牛血清白蛋白基纳米粒子由于其生物降解性和缺乏毒性、非免疫原性、水溶性、易于获得而受到相当大的关注,被广泛应用于蛋白质结合研究和靶向给药应用^[16-17]。例如:白蛋白基纳米粒子的化疗药物紫杉醇,平均粒径为 130 nm, FDA 于 2005 年批准用于治疗转移性乳腺癌。实验采用牛血清白蛋白作为制作缓释微球的基质材料是出于两方面的考虑:一方面利用了其良好的生物相容性,另一方面它也是包埋药物的良好载体,可负载大量药物并对药物有一定的保护作用。去溶剂技术是制备白蛋白纳米颗粒最主要和最简单的方法,实验探究了影响去溶剂过程中的几个关键因素,制备出了药物包封率高且形态良好的微球,但该制剂是否具有良好生物相容性还需要进一步的体内实验证实^[2]。

实验采用去溶剂法制备了载阿托伐他汀钙牛血清白蛋白缓释微球,影响去溶剂法制备过程的因素有很多种,实验选择了可能对微球稳定性及包封率有较大影响的 4 个因素进行讨论,包括牛血清白蛋白溶液质量浓度及 pH 值、阿托伐他汀钙的用量及乙醇添加速度。根据实验结果可知,在一定范围内阿托伐他汀钙的用量对微球包封率起了主要影响作用,其次是牛血清白蛋白溶液质量浓度及 pH 值与乙醇添加速度。实验发现,在一定范围内的阿托伐他汀钙用量对载药微球的微观结构影响较小,不同药量制备的缓释微球之间其形态、直径、稳定性均差异较小。此外实验发现,对缓释微球直径影响较大是牛血清白蛋白溶液的 pH 值^[1],当溶液 pH 值为 10 时缓释微球直径最低可达到 200 nm 左右,当 pH 值为 7 时微球直径最高可达到 500 nm 左右,直径跨度比较大,同时溶液 pH 值对药物的包封率影响较小,所以可以适当调节 pH 值来调节缓释微球直径。验证实验表明成功制备出了载阿托伐他汀钙牛血清白蛋白缓释微球,通过优化参数制备的微球形态好且稳定性高,药物包封率高达 85.70%,具有明显的药物缓释效果及药物持续释放特性。

实验研究了去溶剂法制备载阿托伐他汀钙牛血清白蛋白缓释微球的过程,并进行了制作工艺参数的优化,结果发现,牛血清白蛋白溶液质量浓度及 pH 值、阿托伐他汀钙的用量、乙醇添加速度等因素对微球的成球形、稳定性及包封率等影响较大,通过单因素分析及正交实验选择出了最佳制备参数。在最佳参数值下制作的载药微球包封率高达 85.70%,形态规则且稳定性好,在体外能够实现药物持续缓慢释放,为进一步实验提供了参数参考。

作者贡献: 刘童斌和王乐共同设计实验,资料收集为林鹏和郭新星,资料整理统计分析工作为所有作者,同时所有作者共同参与实验实施,最终由第一作者成文,通讯作者审核。

经费支持: 该文章接受了“山东省医药卫生科技发展计划项目(2016WS0121)及滨州医学院科技计划项目(BY2017KJ05)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明: 该文统计学方法已经滨州医学院生物统计学专家审核。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- TAN J, YANG N, FU X, et al. Single-Dose Local Simvastatin Injection Improves Implant Fixation via Increased Angiogenesis and Bone Formation in an Ovariectomized Rat Model. *Med Sci Monit.* 2015;21:1428-1439.
- SRIPRIYALAKSHMI S, ANJALI HC, C GEORGE PDC, et al. BSA Nanoparticle Loaded Atorvastatin Calcium- A New Facet for an Old Drug. *PLoS One.* 2014;9(2):e86317.
- AN T, HAO J, SUN S, et al. Efficacy of statins for osteoporosis: a systematic review and meta-analysis. *Osteoporos Int.* 2017;28(1):47-57.
- 谢海风. 阿托伐他汀联合降钙素对绝经期女性骨质疏松患者骨代谢指标的影响 [J]. *中国妇幼保健*, 2020,35(3):495-497.
- 刘淑平, 朱晓红, 梁菊红, 等. 阿托伐他汀钙与低剂量雌激素联合治疗围绝经期女性骨质疏松的临床效果 [J]. *贵州医药*, 2019,43(3):395-396.
- 陈卫平. 阿仑膦酸钠联合阿托伐他汀钙片治疗老年骨质疏松临床效果 [J]. *中国合理用药探索*, 2020,17(5):61-66.
- 梁雪莉, 朱秋兰, 刘端玉, 等. 载牛血清白蛋白壳聚糖微球的制备与检测 [J]. *华夏医学*, 2018,31(1):42-46.
- 李思阳, 朱吉人, 孔庆新, 等. 载牛血清白蛋白壳聚糖微球的制备及其体外释药特性评价 [J]. *食品工业科技*, 2016,37(17):157-161.
- TIAN X, YIN H, ZHANG S, et al. Bufalin loaded biotinylated chitosan nanoparticles: An efficient drug delivery system for targeted chemotherapy against breast carcinoma. *Eur J Pharm Biopharm.* 2014;87(3):445-453.
- LI FQ, SU H, WANG J, et al. Preparation and characterization of sodium ferulate entrapped bovine serum albumin nanoparticles for liver targeting. *Int J Pharm.* 2008;349(1):274-282.
- PAIK S, NGUYEN H H, RYU J, et al. Robust size control of bovine serum albumin (BSA) nanoparticles by intermittent addition of a desolvating agent and the particle formation mechanism. *Food Chemistry.* 2013;141(2):695-701.
- XU F, DING H, SONG F, et al. Effects of preparation methods on the bone formation potential of apatite-coated chitosan microspheres. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2014;25(18):2080-2093.
- WU C, ZREIQAT H. Porous bioactive diopside (CaMgSi₂O₆) ceramic microspheres for drug delivery. *Acta Biomater.* 2010;6(3):820-829.
- WANG H, LEEUWENBURGH SCG, LI Y, et al. The Use of Micro- and Nanospheres as Functional Components for Bone Tissue Regeneration. *Tissue Eng Part B Rev.* 2012;18(1):24-39.
- LI Y, SONG H, XIONG S, et al. Chitosan-stabilized bovine serum albumin nanoparticles having ability to control the release of NELL-1 protein. *Int J Biol Macromol.* 2018;109:672-680.
- JAHANBAN-ESFAHLAN A, PANAHI-AZAR V, SAJEDI S. Spectroscopic and molecular docking studies on the interaction between N-acetyl cysteine and bovine serum albumin. *Biopolymers.* 2015;103(11):638-645.
- JAHANBAN-ESFAHLAN A, PANAHI-AZAR V. Interaction of glutathione with bovine serum albumin: Spectroscopy and molecular docking. *Food Chem.* 2016;202(1):426-431.

(责任编辑: GW, ZN, SX)