

引用格式:汪春江,李昇原,黄永鹏,等. 纳米碳酸钙负载奥曲肽可吸入缓释制剂研究[J]. 北京化工大学学报(自然科学版), 2023, 50(1): 79–88.

WANG ChunJiang, LI ShengYuan, HUANG YongPeng, et al. Inhalable sustained-release preparations of nano-calcium carbonate loaded with octreotide[J]. Journal of Beijing University of Chemical Technology (Natural Science), 2023, 50(1): 79–88.

纳米碳酸钙负载奥曲肽可吸入缓释制剂研究

汪春江¹ 李昇原¹ 黄永鹏¹ 唐 慧¹ 张建军^{2*} 陈 博^{1*}

(1. 国民核生化灾害防护国家重点实验室, 北京 102205; 2. 北京化工大学 化学工程学院, 北京 100029)

摘 要: 采用复分解法制备了 3 种不同微观形貌的纳米级碳酸钙, 研究了添加剂聚丙烯酸(PAA)和聚天冬氨酸钠(PASP)的引入对碳酸钙微观形貌和物相结构的影响; 以纳米碳酸钙材料作为药物载体, 通过浸渍吸附-冷冻干燥工艺装载药物奥曲肽, 构建了可吸入缓释微粉制剂; 测试了碳酸钙载体材料的理化性能及体内生物效应, 考察了微粉制剂的微观形貌、载药量、体外释药性能、体外吸入沉积性能。结果表明: 添加剂的引入可以实现对碳酸钙粒径、微观形貌和物相结构的调控; 纳米碳酸钙载体能够有效负载奥曲肽, 所制备的微粉制剂保持了载体原有的形貌; 在所制备的 3 种纳米碳酸钙载体材料中, 由球形与棒形混杂状纳米碳酸钙载体制备的微粉制剂的综合性能最佳, 其载药量为 31.3%, 有效部位沉积率达到 42%, 持续释药时间达到 48 h, 具有较好的体外吸入沉积性能和体外释药性能; 球形与棒形混杂状纳米碳酸钙对 THP-1 细胞无毒性, 低浓度时不会引起炎症效应, 并且可以将药物有效地递送至肺部并在肺部滞留 7 d, 具有作为可吸入缓释制剂载体的潜力。

关键词: 纳米碳酸钙; 奥曲肽; 聚天冬氨酸钠; 吸入制剂; 缓释制剂

中图分类号: R944.9 **DOI:** 10.13543/j.bhxbzr.2023.01.010

引 言

奥曲肽(octreotide, OCT)是由 8 个氨基酸组成的环状多肽, 是一种生长抑素类药物, 能够选择性抑制生长激素、胰血糖素、胰岛素的分泌, 是临床上治疗肢端肥大症的首选药物, 此外还可用于治疗消化道出血、内分泌肿瘤等疾病^[1-2]。OCT 通常需要长期用药, 且口服时药物稳定性差, 目前主要的给药形式为静脉注射和皮下注射。长期频繁的注射导致患者依从性降低, 并容易引发细胞组织感染, 因此迫切需要非侵入性的给药方式及其制剂。

人体肺泡-毛细血管区域的吸收面积大、血流丰富、交换距离短、酶降解作用弱, 因此肺部给药被

认为是多肽药物理想的新型给药方式^[3-4]。其中, 干粉吸入制剂是利用吸入装置与患者呼吸的气流作用将微粉化药物递送至肺部的制剂形式, 具有携带方便、操作简单、干扰因素少、药剂稳定性好、生物利用率高、递送剂量准确等优点, 因此在新药及新剂型研发领域广受瞩目。目前, 国内外 OCT 吸入制剂的相关研究较少, 并且均处于起步阶段^[5-6]。本课题组此前探索性开展了针对肢端肥大症的无载体 OCT 干粉吸入制剂研究, 结果表明 OCT 吸入制剂能够达到与皮下注射几乎相同的生物利用度, 证明这种新的给药途径与制剂形式具有可行性, 但是由于该微粉制剂没有缓释作用, 因此药物的半衰期较短^[7]。利用载体材料负载 OCT 制备可吸入缓释制剂, 能够同时结合吸入制剂和缓释制剂的优点, 在避免侵入性给药的同时延长药物作用时间、减少给药频率。

近年来, 将纳米碳酸钙($n\text{CaCO}_3$)用于药物载体的相关报道引起了研究者的关注^[8-9], 基于纳米碳酸钙的药物递送系统能够有效负载小分子药物^[8]

收稿日期: 2022-10-21

基金项目: 青年科技英才自主基金(2021F4001)

第一作者: 男, 1998 年生, 硕士生

* 通信联系人

张建军, E-mail: zhangjj@mail.buct.edu.cn

陈博, E-mail: NBC_BoChen@163.com

及蛋白^[10]并实现缓释、控释的效果,但给药途径仍以传统的注射或口服方式为主。纳米碳酸钙具有生物相容性好、比表面积大、孔隙率高等优点,理论上用于吸入制剂的理想载体材料,但目前尚无相关文献报道。复分解法是制备纳米碳酸钙最常用的方法,即利用水溶性钙盐与水溶性碳酸盐在溶液中反应得到纳米碳酸钙载体,通过引入聚丙烯酸(polyacrylic acid, PAA)、聚乙二醇(PEG)等添加剂,能够改变纳米碳酸钙的微观形貌与物相结构,进而可能会对吸入制剂的吸入性能与释放性能产生影响。

本研究采用复分解法制备用于干粉吸入制剂的纳米碳酸钙载体,创新性引入聚天冬氨酸钠(sodium of polyaspartic acid, PASP)等作为添加剂实现对碳酸钙载体形貌与晶型的调控;通过浸渍吸附-冷冻干燥工艺装载 OCT,构建可吸入缓释微粉制剂;对载体材料与吸入制剂进行微观形貌、物相结构、递送与释放、生物效应等研究,以期 OCT 提供一种新的药物递送方案。

1 实验部分

1.1 实验材料与仪器

1.1.1 实验材料

奥曲肽,纯度 99.1%,浙江湃肽生物有限公司,批号 2018053003-1;吸入 α -乳糖(粒径 74 μm)、十水碳酸钠、二水氯化钙、盐酸、氢氧化钠,化学纯,北京化工厂;聚丙烯酸(分子量 2 000)、聚天冬氨酸钠(分子量 7 000~8 000),阿拉丁试剂(上海)有限公司;纳米氧化铜(nCuO , 粒径 40 nm, 球形, 纯度 99.5%),3-氨丙基三乙氧基硅烷(APTES, 纯度 99%),N-羟基琥珀酰亚胺(NHS, 纯度 98%),1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC, 纯度 98.5%),L-酪氨酸(L-tyrosine, 纯度 99%),1,3,4,6-四氯-3 α ,6 α -二苯基甘脲(Iodogen, 纯度 44%),上海麦克林生化科技股份有限公司; Na^{125}I ,北京原子高科股份有限公司;THP-1 细胞、RPMI-1640 完全培养基(含 10% 胎牛血清(FBS)),武汉普诺赛生物科技有限公司;MTS 细胞毒性试剂盒、ELISA 检测试剂盒,上海钦诚生物科技有限公司;C57 小鼠模型,雄性,北京思科诺思生物科技有限公司。

1.1.2 实验仪器

LGJ-18S 型真空冷冻干燥机,北京松源华兴科技发展有限公司;3H-2000PS2 型比表面积及孔径

分析仪,贝士德仪器科技(北京)有限公司;SU8020 型扫描电子显微镜(SEM),日本日立公司;Tecnai G2 型场发射透射电子显微镜(TEM),美国 FEI 公司;D8-ADVANCE 型 X 射线衍射仪(XRD),德国布鲁克公司;Agilent 1260 型高效液相色谱仪(HPLC),美国安捷伦公司;JMT-3 型安德森级联撞击器(ACI),北京明杰蓝天科技有限公司;BT-90+ 型动态光散射纳米激光粒度仪,丹东百特仪器有限公司;ZS90 型纳米粒度电位仪,英国马尔文仪器有限公司;U-SPECT+/CT 型 SPECT/CT 成像系统,荷兰 MILabs 公司;371 型细胞培育箱,美国 Thermo Scientific 公司。

1.2 碳酸钙载体的制备

以在不加添加剂的条件下制备的碳酸钙 A 作为对比,同时选用 PAA 和 PASP 作为添加剂制备了 3 种不同微观形貌的纳米碳酸钙,并对交联时间、滴加速度、反应时间、离心时间等条件进行了优化,得到最佳制备条件如下:

菱形碳酸钙 A 配制 0.1 mol/L 碳酸钠溶液和 0.1 mol/L 氯化钙溶液,取碳酸钠溶液和氯化钙溶液各 20 mL,在搅拌下将碳酸钠溶液以 10 mL/min 的速度滴加至氯化钙溶液中。滴加结束后在 1 000 r/min 的转速下反应 12 h,反应结束后将悬浮液在 12 000 r/min 的转速下离心 30 min,用水和乙醇洗涤、离心后,在 50 $^{\circ}\text{C}$ 下干燥至恒重。

棒形纳米碳酸钙 B 选用 PAA 作为添加剂加入碳酸钠溶液。取 0.1 mol/L 碳酸钠溶液和 0.1 mol/L 氯化钙溶液各 20 mL,向碳酸钠溶液中加入 53 mg 的 PAA 并搅拌交联 30 min,然后在搅拌下将添加 PAA 的碳酸钠溶液以 10 mL/min 的速度滴加至氯化钙溶液中。滴加结束后于室温在 1 000 r/min 的转速下反应 12 h,反应结束后将悬浮液在 12 000 r/min 的转速下离心 30 min,用水和乙醇洗涤、离心后,在 50 $^{\circ}\text{C}$ 下干燥至恒重。

球形纳米碳酸钙 C 选用 PASP 作为添加剂与氯化钙交联。取 0.1 mol/L 碳酸钠溶液和 0.1 mol/L 氯化钙溶液各 20 mL,向氯化钙溶液中加入 666 mg 的 PASP 并搅拌交联 30 min,然后在搅拌下将碳酸钠溶液以 10 mL/min 的速度滴加至添加 PASP 的氯化钙溶液中。滴加结束后于室温在 1 000 r/min 的转速下反应 12 h,反应结束后将悬浮液在 12 000 r/min 的转速下离心 30 min,用水和乙醇洗

涤、离心后,在 50 ℃ 下干燥至恒重。

球棒混杂状纳米碳酸钙 D 选用 PASP 作为添加剂与氯化钙交联,PAA 作为添加剂加入碳酸钠溶液。取 0.1 mol/L 碳酸钠溶液和 0.1 mol/L 氯化钙溶液各 20 mL,向氯化钙溶液中加入 666 mg 的 PASP,向碳酸钠溶液中加入 106 mg 的 PAA 并搅拌交联 30 min,然后在搅拌下将添加 PAA 的碳酸钠溶液以 10 mL/min 的速度滴加至添加 PASP 的氯化钙溶液中。滴加结束后于室温在 1 000 r/min 的转速下反应 12 h,反应结束后将悬浮液在 12 000 r/min 的转速下离心 30 min,用水和乙醇洗涤、离心后,在 50 ℃ 下干燥至恒重。

1.3 碳酸钙载体的测试与表征

采用纳米激光粒度仪测定反应结束后悬浮液中碳酸钙颗粒的 Z 均粒径和多分散指数(PDI),以水为分散介质,平衡温度为 25 ℃;采用扫描电子显微镜观察碳酸钙粉末的微观形貌;采用场发射透射电子显微镜表征干燥后碳酸钙粉末的微观形貌与结构;采用 X 射线衍射仪表征碳酸钙粉末的物相结构,操作电压 40 kV,操作电流 40 mA,Cu 靶,波长 0.154 06 nm,扫描范围 10°~70°,扫描速率 2(°)/min;采用比表面积及孔径分析仪测定碳酸钙粉末的比表面积与孔径;采用纳米粒度电位仪测量碳酸钙粉末的 Zeta 电势,以水为分散介质,平衡温度为 25 ℃。

1.4 可吸入缓释微粉制剂的制备

配制 30 mg/mL 的 OCT 水溶液,取 50 mL 的 OCT 溶液分别加入 750 mg 不同的碳酸钙载体,超声 30 min,然后在 1 000 r/min 的转速下持续吸附 24 h。将 OCT 溶液与纳米碳酸钙的混合物过滤,分离固体后用超纯水洗涤 3 次,冷冻干燥,得到碳酸钙负载 OCT 的微粉制剂。将碳酸钙 A、B、C、D 制备的微粉制剂分别记为 J1、J2、J3、J4。

1.5 可吸入缓释微粉制剂的性能分析

1.5.1 载药量

称取少量微粉制剂置于烧杯中,加入超纯水后以 1 000 r/min 的转速搅拌 2 h,然后超声 30 min。静置后吸取上清液,通过 0.45 μm 滤膜过滤后,采用 HPLC 进行定量分析^[11]。色谱柱为安捷伦 Eclipse plus C18 柱,流动相为乙腈与 0.25% (体积分数)高氯酸水溶液的混合液(二者体积比为 30:70),检测波长为 210 nm。根据式(1)计算载药量 D_L 。

$$D_L = \frac{m_d}{m_i} \times 100\% \quad (1)$$

式中: m_i 为微粉制剂的质量,mg; m_d 为微粉制剂中所含药物的质量,mg。

1.5.2 体外释放曲线

以超纯水(37 ± 0.5 ℃)作为溶出介质,称取适量微粉制剂置于透析袋中并加水至充满,用夹子封紧两端后浸没于 200 mL 溶出介质,在 37 ℃ 下以 100 r/min 的转速搅拌。搅拌开始后在 1、10、30、60、240、720、1 440、2 880 min 取样并补充溶出介质^[12],通过 HPLC 对样品进行定量分析。根据式(2)计算微粉制剂的溶出度 Q ,并绘制时间-溶出度体外释放曲线。

$$Q = \frac{C_n V_2 + V_1 \sum_{i=1}^{n-1} C_i}{m_i D_L} \times 100\% \quad (2)$$

式中: C_i 、 C_n 分别为第 i 次取样时和第 n 次(最后一次)取样时药物的质量浓度,mg/mL; V_1 为各时间点的固定取样体积,mL; V_2 为溶出介质的体积,mL。

1.5.3 排空率和有效部位沉积率

采用安德森级联撞击器 ACI 测定微粉制剂的排空率(emitted dose, E_d)和有效部位沉积率(fine particle fraction, F_p)。将微粉制剂与适量的乳糖混合均匀后装入胶囊中,称取 5 粒胶囊(约 500 mg)置于吸入器后连接 ACI。刺破胶囊并以 28.3 L/min 的气流流速抽吸 8 s,间隔 1 s 后复吸 8 s,重复 3 次^[12]。用超纯水回收被 ACI 中各级截留的微粉制剂,通过 HPLC 进行定量分析,根据式(3)和式(4)计算 E_d 和 F_p 。

$$E_d = \frac{\sum_{i=0}^{10} C_i V_i}{\sum_{i=0}^{11} C_i V_i} \times 100\% \quad (3)$$

$$F_p = \frac{\sum_{i=2}^8 C_i V_i}{\sum_{i=0}^{11} C_i V_i} \times 100\% \quad (4)$$

式中: C_i 为 ACI 中收集到的第 i 级的 OCT 质量浓度,mg/mL; V_i 为收集到的第 i 级的 OCT 体积,mL。

1.6 纳米碳酸钙载体的生物效应测定

1.6.1 细胞毒性

载体进入肺部后会在肺部与巨噬细胞发生相互作用,产生生物学效应。选用 THP-1 细胞系为细胞

模型,经诱导分化后,用 RPMI - 1640 完全培养基 (含 10% FBS) 分别配制质量浓度为 12.5、25、50、100、200 $\mu\text{g/mL}$ 的纳米碳酸钙 D 和纳米氧化铜悬浮液。将细胞在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培育箱中在 10 000 个细胞/孔、培养基 50 μL /孔的条件下培育 16 h。培育结束后吸取孔板中的上清液并弃掉,向其中分别加入纳米碳酸钙 D 悬浮液、纳米氧化铜悬浮液和培养基,在相同条件下培育 24 h 后通过 MTS 细胞毒性试剂盒检测细胞活性。以未加入任何颗粒物的细胞为空白对照,以细胞毒性很强的纳米氧化铜为阳性对照,通过细胞活性分析纳米碳酸钙 D 的细胞毒性。

1.6.2 炎性效应

巨噬细胞是体内炎症调控的重要单元,当外来物突破机体的物理屏障(如皮肤、黏膜等)时,细胞膜表面 Toll 样受体激活,经由 NF- κB 通路指导 mRNA 的合成,在细胞核指导细胞因子(如白介素 IL-6、IL- β 及肿瘤坏死因子 TNF- α 等)的合成,产生免疫细胞应答。选择 IL-1 β 和 TNF- α 两种细胞因子作为免疫炎症的标志物,研究纳米碳酸钙 D 引发的肺部炎性效应。将配制的纳米碳酸钙 D 悬浮液与细胞孵育 48 h 后,吸取细胞上清液并用 ELISA 检测试剂盒检测其中的 TNF- α 和 IL-1 β 含量。

1.6.3 体内分布

碳酸钙具有丰富的表面羟基,可运用 Iodogen 法将放射性 ^{125}I 标记在颗粒物表面,具体的标记策略如图 1 所示。在清洗掉游离的 ^{125}I 后,以 C57 小鼠为动物模型,将核素标记的颗粒物通过肺部滴灌的方式,按照 100 μCi /只的剂量递送至小鼠肺部。通过 SPECT/CT 成像系统观察纳米碳酸钙 D 进入肺部后在不同时间的体内分布情况。

2 结果与讨论

2.1 纳米碳酸钙的制备过程分析

采用复分解法制备纳米碳酸钙时,添加剂可与钙离子或碳酸根离子耦合形成复合物,复合物随着交联时间的延长而形成胶体粒子^[13],添加剂在结晶过程中影响晶胞的形成,诱导形成具有不同晶型与形貌的碳酸钙并抑制其向其他晶型转化。PAA 是合成纳米碳酸钙常用的添加剂,有关机理的研究较为成熟^[14]。PASP 是工业上常用的阻垢剂,能够与钙离子螯合抑制钙盐结垢^[15]。以 PASP 作为添加剂制备纳米碳酸钙 C 的过程如图 2 所示,碳酸钙

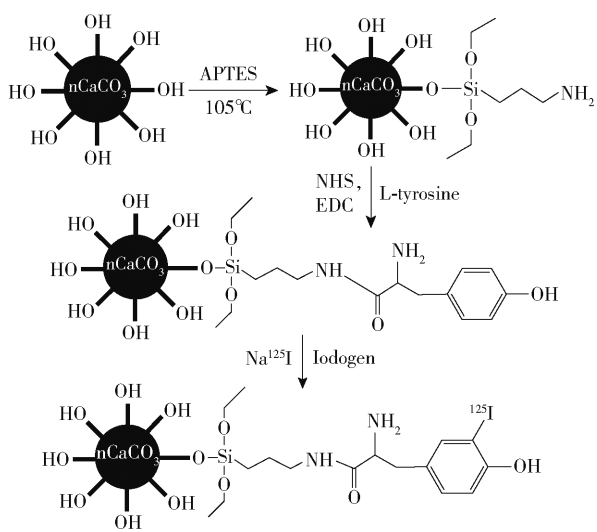


图 1 纳米碳酸钙的核素标记策略

Fig. 1 Nuclide labeling strategy for nano-calcium carbonate

A~D 在反应体系中的 Z 均粒径与多分散指数如表 1 所示。碳酸钙 A 的 Z 均粒径大于纳米碳酸钙 B、C、D,且多分散指数偏大(PDI > 0.4),粒径均一性较差。

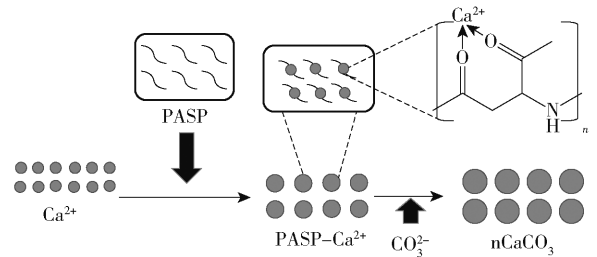


图 2 纳米碳酸钙 C 的制备过程

Fig. 2 Preparation process of nano-calcium carbonate C

表 1 不同碳酸钙载体材料的 Z 均粒径及多分散指数

Table 1 Z-average particle size and polydispersity index of different calcium carbonate carrier materials

碳酸钙载体	添加剂	Z 均粒径/nm	多分散指数
碳酸钙 A	无	1 544	0.456
纳米碳酸钙 B	PAA	230	0.270
纳米碳酸钙 C	PASP	372	0.137
纳米碳酸钙 D	PASP/PAA	317	0.148

2.2 碳酸钙载体材料的表征结果

2.2.1 微观形貌

不同碳酸钙载体材料的微观形貌如图 3 所示。

碳酸钙 A 由粒径约 2.4 μm 的实心菱方形碳酸钙组成;纳米碳酸钙 B 由长约 487 nm、宽约 135 nm 的棒形碳酸钙组成,棒形碳酸钙中存在孔道结构;纳米碳酸钙 C 由粒径约 430 nm 的球形碳酸钙组成,球形碳酸钙由更细小的颗粒紧密堆积而成,颗粒之间存在缝隙;纳米碳酸钙 D 由粒径约 230 nm 的球形碳酸钙和长约 280 nm、宽约 90 nm 的棒形碳酸钙混合组成。以上结果表明添加剂的引入成功实现了对纳米碳酸钙载体形貌的调控。

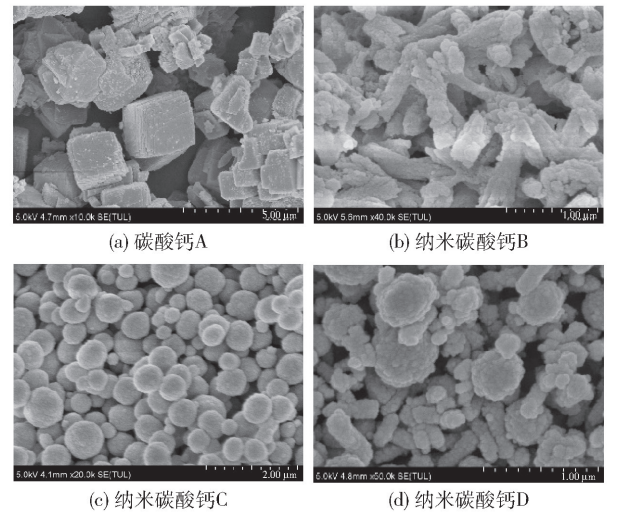


图 3 不同碳酸钙载体材料的 SEM 图

Fig. 3 SEM images of different calcium carbonate carrier materials

2.2.2 物相结构

不同碳酸钙载体材料的 XRD 谱图如图 4 所示,4 种碳酸钙具有不同的物相结构。自然界中的碳酸钙以方解石型、文石型、球霏石型和非晶态等多种形式存在,其中方解石是最稳定的晶型,菱方形是方解石的典型形貌,在没有其他物质的影响下碳酸钙多以方解石晶型存在。球霏石是热力学不稳定的碳酸钙晶型,具有良好的生物相容性、无毒性、可降解性以及较大的比表面积^[16],有利于药物的负载,可作为蛋白质^[17]、药物^[18]及疫苗^[19]的载体。添加剂参与了结晶过程并进入碳酸钙的晶胞,导致晶格的缺陷和畸变,诱导形成较为稳定的球霏石晶型,球形是球霏石的典型形貌。4 种碳酸钙中,碳酸钙 A 的粒径较大,衍射峰较强,为纯净的方解石。对 XRD 谱图进行精修后,通过 Jade6.5 软件进行物相组成分析,结果表明:纳米碳酸钙 B 中包含 36% (质量分数,下同)的球霏石和 64% 的方解石;纳米碳酸钙 C

中包含 77% 的球霏石和 23% 的方解石;纳米碳酸钙 D 中包含 57% 的球霏石和 43% 的方解石。载体材料的物相结构比较稳定,添加剂的引入成功实现了对纳米碳酸钙载体物相结构的调控。

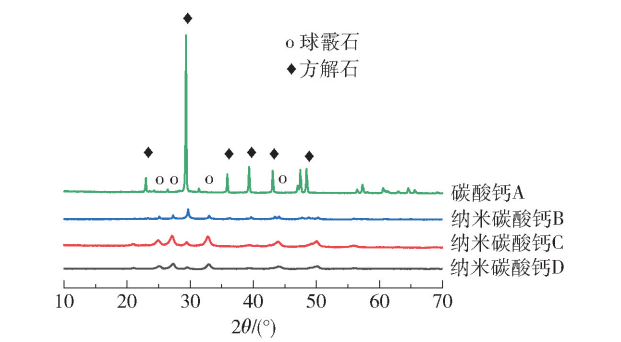


图 4 不同碳酸钙载体材料的 XRD 谱图

Fig. 4 XRD patterns of different calcium carbonate carrier materials

2.2.3 Zeta 电势、比表面积和比孔容

不同碳酸钙载体材料的 Zeta 电势、比表面积和比孔容如表 2 所示。由结果可以看出:所有碳酸钙载体材料的 Zeta 电势均为负值;与未加入添加剂相比,添加剂的引入明显提高了碳酸钙载体材料的比表面积和比孔容;碳酸钙 A 的平均孔径较大,可能是菱方形的碳酸钙之间相互堆叠形成的缝隙所致。

表 2 不同碳酸钙载体材料的 Zeta 电势、比表面积和比孔容

碳酸钙载体	Zeta 电势/mV	比表面积/ ($\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$)	平均孔径/nm	比孔容/ ($\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$)
碳酸钙 A	-5.85	0.134	47.7	0.00160
纳米碳酸钙 B	-0.304	85.6	14.1	0.302
纳米碳酸钙 C	-2.92	75.7	4.89	0.0926
纳米碳酸钙 D	-18.1	27.2	18.8	0.128

2.3 可吸入缓释微粉制剂的微观形貌及性能

2.3.1 微观形貌

在药物装载过程中,除碳酸钙 A 外,载体材料均能良好地分散在溶液中,冻干后得到的微粉制剂均为白色粉末。碳酸钙载体材料在载药前后的 TEM 图如图 5 所示。与载药前的载体碳酸钙相比,碳酸钙载药后微粉制剂的形态无显著改变,保持了原有形貌;微粉制剂 J1 中 OCT 附着在载体碳酸钙 A

的表面;微粉制剂 J2、J3、J4 中载体碳酸钙的颜色加深,药物装载于载体内部的缝隙与孔道之中。

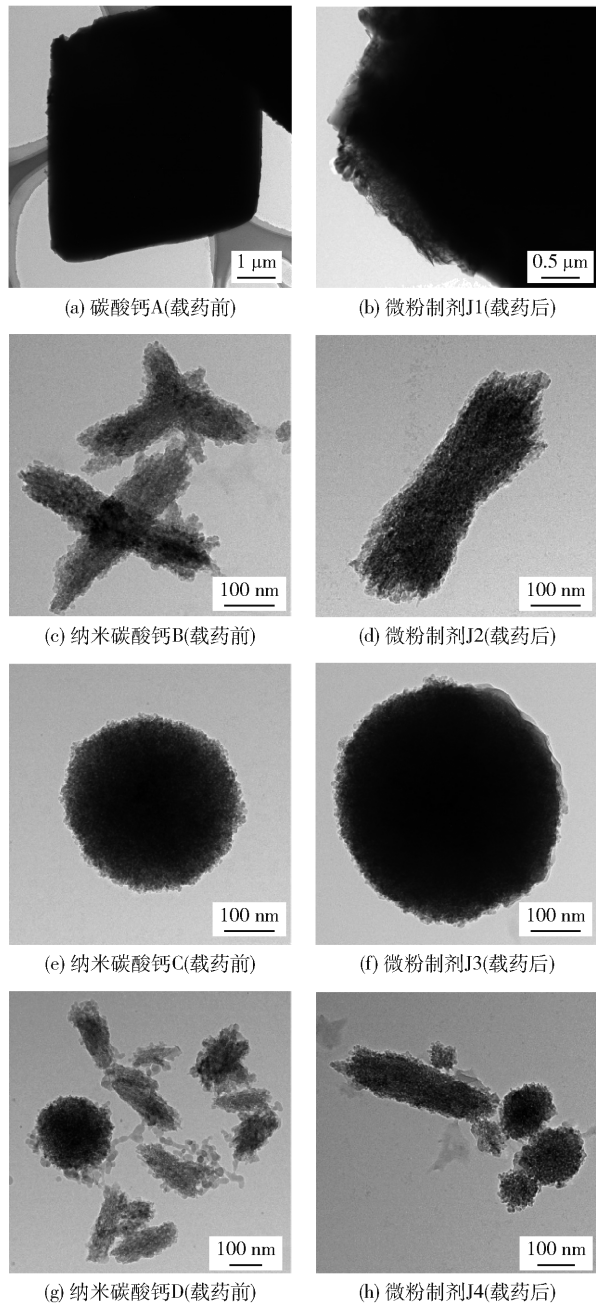


图5 不同碳酸钙载体材料在载药前后的 TEM 图

Fig. 5 TEM images of different calcium carbonate carrier materials before and after drug loading

2.3.2 载药量

不同碳酸钙载体制备的微粉制剂的载药量如图6所示。4种载体材料均成功装载药物,其中微粉制剂 J4 的载药量最高,为 31.3%;制剂 J1 的载药量最低,为 3.25%。经测定,OCT 水溶液的 Zeta 电势为正值,碳酸钙载体的 Zeta 电势为负值,因此碳

酸钙载体除了通过孔道装载 OCT 以外,还可以通过静电作用对 OCT 进行吸附装载。由于载体碳酸钙 A 几乎不具备孔道结构,OCT 只能通过静电作用吸附在载体表面,因此制剂 J1 的载药量较低;纳米级载体碳酸钙 B、C、D 在孔道装载以及静电吸附的共同作用下对 OCT 进行负载,因此相比于微米级载体碳酸钙 A 具有更高的载药量。

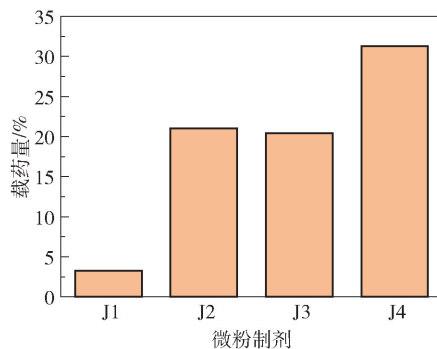


图6 不同碳酸钙载体制备的微粉制剂的载药量

Fig. 6 Drug loading of micro-powder preparations prepared by different calcium carbonate carriers

2.3.3 体外溶出曲线

不同碳酸钙载体制备的微粉制剂的体外溶出曲线如图7所示。微粉制剂 J1 的溶出曲线与纯 OCT 的溶出曲线基本一致,不具有缓释作用;微粉制剂 J2、J3、J4 均有效延长了溶出时间,具有一定的缓释效果。由于制剂 J1 中药物只能附着在载体碳酸钙 A 的表面,因此在溶出介质中迅速释药,释放速率快于制剂 J2、J3、J4。制剂 J2、J3、J4 中药物装载于碳酸钙载体内部,在溶出介质中释放速率较慢。制剂 J2、J3、J4 在 48 h 内持续溶出,在 48 h 时溶出度分别达到 98%、100%、99%。以上结果表明纳米级碳酸

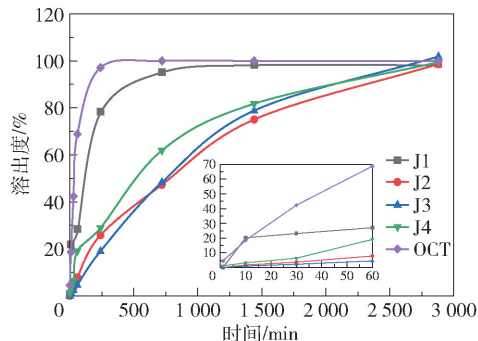


图7 不同碳酸钙载体制备的微粉制剂的体外溶出曲线

Fig. 7 In vitro dissolution curves of micro-powder preparations prepared by different calcium carbonate carriers

钙载体有效延长了释药时间,实现了缓释作用。

2.3.4 排空率和有效部位沉积率

排空率 E_d 用于评估制剂从吸入装置中排出的能力,有效部位沉积率 F_p 用于评估制剂在人体肺部进行深肺沉积的能力。表 3 为不同碳酸钙载体制备的微粉制剂的 E_d 和 F_p 。微粉制剂 J2、J4 的 E_d 达到 100%,表明其可以从吸入装置中全部排出;微粉制剂 J1、J3 的 E_d 稍小,但也达到 93% 以上。制剂 J2 的 F_p 最小,仅为 7.95%,大部分颗粒被预分离器截留,原因可能是棒形的碳酸钙 B 载药后颗粒团聚,造成流动性降低,从而被预分离器截留;制剂 J3 和 J4 的 F_p 均达到 40% 以上,制剂 J3 的 F_p 略小于制剂 J4,制剂 J4 中载体纳米碳酸钙 D 的粒径最小,在 ACI 中达到的层级最多,因此 F_p 最大;制剂 J1 的 F_p (34.9%) 稍小于制剂 J3 和 J4,原因是载体碳酸钙 A 的粒径较大,在同等流速的气流作用下流动性较差。

表 3 不同碳酸钙载体制备的微粉制剂的排空率 E_d 和有效部位沉积率 F_p

Table 3 Emitted dose and fine particle fraction of micro-powder preparations prepared by different calcium carbonate carriers

层级	截止直径 范围/ μm	OCT 沉积率/%			
		J1	J2	J3	J4
S11	吸入装置及胶囊	6.88	0	6.61	0
S10	L 型管	0	0	6.64	0
S9	>10	19.8	60.7	14.3	12.7
S0	9.0~10	18.7	21.7	19.6	25.8
S1	5.8~9.0	19.4	9.62	11.1	19.2
S2	4.7~5.8	11.1	7.95	13.2	14.8
S3	3.3~4.7	8.80	0	11.9	9.52
S4	2.1~3.3	8.19	0	9.60	6.89
S5	1.1~2.1	6.85	0	6.73	6.24
S6	0.7~1.1	0	0	0	4.56
S7	0.43~0.70	0	0	0	0
S8	0.22~0.43	0	0	0	0
$E_d/\%$		93.1	100	93.4	100
$F_p/\%$		34.9	7.95	41.4	42.0

以上结果表明,由载体纳米碳酸钙 D 制备的微粉制剂 J4 具有最佳的综合性能:载药量最高 ($D_L = 31.3\%$),体外吸入沉积性能最好 ($E_d = 100\%$, $F_p = 42\%$),缓释性能良好(持续释药 48 h),因此纳米碳

酸钙 D 具有作为可吸入缓释制剂载体的潜力。

2.4 纳米碳酸钙 D 载体的生物效应

2.4.1 细胞毒性

纳米碳酸钙 D 的细胞毒性如图 8 所示。结果表明,纳米碳酸钙 D 未表现出较为显著的细胞毒性,甚至在一定程度上还促进了细胞的增殖,细胞活性均高于 100%。纳米氧化铜具有较为明显的细胞毒性,导致了细胞的死亡。

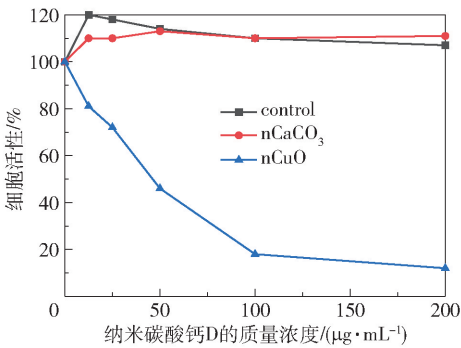


图 8 纳米碳酸钙 D 的细胞毒性

Fig. 8 Cytotoxicity of nano-calcium carbonate D

2.4.2 炎症效应

载体材料纳米碳酸钙 D 所造成炎症效应的结果如图 9 所示。纳米碳酸钙引发了少量细胞炎症,具体表现为:TNF- α 含量随碳酸钙颗粒的增加无明显变化,但高浓度的碳酸钙颗粒诱发了少量 IL-1 β 的分泌。IL-1 β 细胞因子分泌增加的原因可能是大量纳米碳酸钙被摄入后,引起溶酶体的损伤,导致组织蛋白酶(cathepsin B)的释放,从而激活 NLRP3 炎症小体;同时,大量纳米碳酸钙被分解后使钙离子浓度上升,线粒体大量摄入钙离子后导致线粒体的损伤,诱发了线粒体活性氧的释放,同样激活了 NLRP3 炎症小体。在两者的共同作用下大量纳米碳酸钙导致 IL-1 β 的分泌增加^[20]。

2.4.3 体内分布

纳米碳酸钙 D 载体的体内分布示踪结果如图 10 所示。通过核素标记的纳米碳酸钙 D 均经由呼吸道进入小鼠肺部,在进入小鼠的 12 h 时,肺部出现很强的放射性信号。碳酸钙载体在肺部具有滞留效应,具体表现为:在肺部滞留 7 d 左右,在这个过程中放射性信号逐渐减弱;在 9 d 时信号完全消失,说明碳酸钙通过气血屏障缓慢进入血液循环而逐步代谢。在 12 h 时,小鼠的胃部出现了放射性信

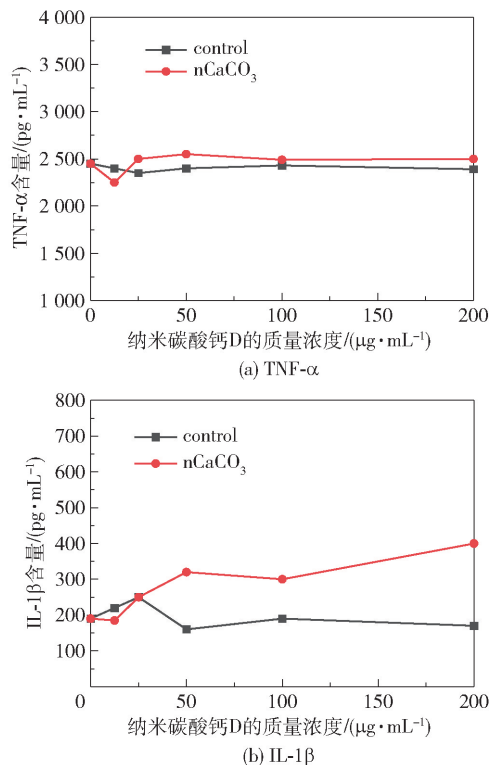


图9 TNF- α 与 IL-1 β 含量随纳米碳酸钙 D 质量浓度的变化

Fig. 9 Changes of TNF- α and IL-1 β contents with the mass concentration of nano-calcium carbonate D

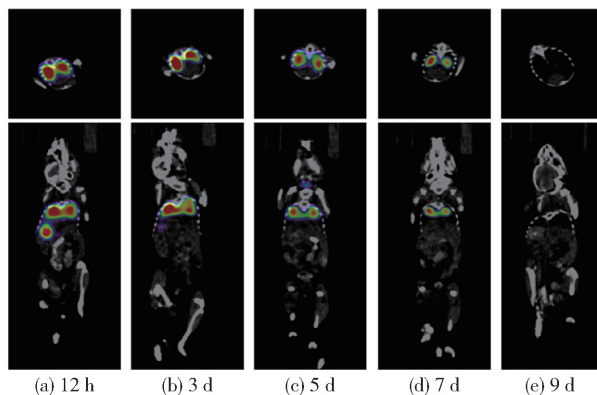


图10 不同时间下纳米碳酸钙 D 在小鼠体内的分布

Fig. 10 In vivo distribution of nano-calcium carbonate D in mice at different times

号,原因可能是在肺部滴注过程中部分碳酸钙颗粒被小鼠误吞咽至消化道,但很快通过消化道被排出体外(3 d 后信号消失)。

3 结论

(1) 采用复分解法,通过引入添加剂 PAA 和

PASP 成功制备了纳米级碳酸钙载体,实现了对碳酸钙载体晶型与形貌的调控。纳米碳酸钙仅由球霏石与方解石组成,其中纳米碳酸钙 B、C、D 中球霏石含量分别为 36%、77%、57%,形貌分别为棒形、球形以及球形与棒形的混合。

(2) 相比于微米级碳酸钙载体 A,纳米级碳酸钙载体 B、C、D 具有更高的载药量以及更好的缓释效果,因此更适合作为药物载体。由球形与棒形混杂状纳米碳酸钙 D 制备的微粉制剂 J4 的综合性能最佳,其载药量为 31.3%,排空率为 100%,有效部位沉积率达到 42%,持续释药时间达到 48 h。纳米碳酸钙 D 无细胞毒性,低浓度时不会引起炎症效应,并且可以将药物有效地递送至肺部并在肺部滞留 7 d,因此纳米碳酸钙 D 具有作为可吸入缓释制剂载体的潜力。

本研究利用纳米碳酸钙载体装载 OCT 制备了可吸入缓释制剂,该方法结合了吸入制剂和缓释制剂的优点,在治疗哮喘肥大症及内分泌性肿瘤方面具有明显的优势,可以为 OCT 及其他多肽药物的可吸入缓释制剂设计提供一种新的药物递送方案,具有较好的发展潜力。今后的工作将对纳米碳酸钙载体材料的载药性能与吸入性能进行设计优化,对负载药物后微粉制剂的体内生物学效应进行进一步研究。

参考文献:

- [1] LAMBERTS S W J, HOFLAND L J. Octreotide, 40 years later [J]. European Journal of Endocrinology, 2019, 181(5): R173 - R183.
- [2] KATO R, NISHIMURA A, MATSUMURA K, et al. Successful treatment of adult-onset nesidioblastosis by continuous subcutaneous octreotide infusion in a patient on hemodialysis [J]. Clinical Case Reports, 2020, 9(1): 278 - 281.
- [3] SMALDONE G, BERKLAND C, GONDA I, et al. Ask the experts: the benefits and challenges of pulmonary drug delivery [J]. Therapeutic Delivery, 2013, 4(8): 905 - 913.
- [4] SANDERS M. Pulmonary drug delivery: an historical overview [M]//SMYTH H D C, HICKEY A J. Controlled pulmonary drug delivery. New York: Springer, 2011: 51 - 73.
- [5] HOU A L, LI L, HUANG Y, et al. Fragmented particles

- containing octreotide acetate prepared by spray drying technique for dry powder inhalation [J]. *Drug Delivery and Translational Research*, 2018, 8(3): 693 – 701.
- [6] YANG L K, LUO J, SHI S J, et al. Development of a pulmonary peptide delivery system using porous nanoparticle-aggregate particles for systemic application [J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2013, 451(1 – 2): 104 – 111.
- [7] 向童欣. 奥曲肽可吸入微粉制备及其性能研究 [D]. 北京: 军事科学院, 2021.
- XIANG T X. Preparation and characterization of octreotide inhalable micropowders [D]. Beijing: Academy of Military Sciences, 2021. (in Chinese)
- [8] 窦佳红. 瞬时纳米沉淀法制备球霏石型碳酸钙及其负载抗癌药物缓控释的研究 [D]. 上海: 华东理工大学, 2020.
- DOU J H. Preparation of vaterite CaCO_3 particles by flash nano-precipitation technique for targeted and extended anticancer drug delivery [D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2020. (in Chinese)
- [9] DONG Z L, FENG L Z, ZHU W W, et al. CaCO_3 nanoparticles as an ultra-sensitive tumor-pH-responsive nano-platform enabling real-time drug release monitoring and cancer combination therapy [J]. *Biomaterials*, 2016, 110: 60 – 70.
- [10] VOLODKIN D V, LARIONOVA N I, SUKHORUKOV G B. Protein encapsulation via porous CaCO_3 microparticles templating [J]. *Biomacromolecules*, 2004, 5(5): 1962 – 1972.
- [11] 向童欣, 黄永鹏, 唐慧, 等. 高效液相色谱法定量分析奥曲肽 [J]. *化学分析计量*, 2020, 29(2): 79 – 82.
- XIANG T X, HUANG Y P, TANG H, et al. Quantitative analysis of octreotide by high performance liquid chromatography [J]. *Chemical Analysis and Meterage*, 2020, 29(2): 79 – 82. (in Chinese)
- [12] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 四部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 132 – 141.
- Chinese Pharmacopoeia Commission. *Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Volume 4* [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 132 – 141. (in Chinese)
- [13] HUANG S C, NAKA K, CHUJO Y. A carbonate controlled-addition method for amorphous calcium carbonate spheres stabilized by poly (acrylic acid) s [J]. *Langmuir*, 2007, 23(24): 12086 – 12095.
- [14] OUHENIA S, CHATEIGNER D, BELKHIR M A, et al. Synthesis of calcium carbonate polymorphs in the presence of polyacrylic acid [J]. *Journal of Crystal Growth*, 2008, 310(11): 2832 – 2841.
- [15] 王玉江, 方洪波, 姚明修. 碳酸钙阻垢剂研究进展及阻垢作用机理 [J]. *应用化工*, 2021, 50(12): 3430 – 3435.
- WANG Y J, FANG H B, YAO M X. The development and scale inhibition mechanism of scale inhibitor for calcium carbonate [J]. *Applied Chemical Industry*, 2021, 50(12): 3430 – 3435. (in Chinese)
- [16] 蒋久信, 吴月, 何瑶, 等. 亚稳态球霏石相碳酸钙的调控制备进展 [J]. *无机材料学报*, 2017, 32(7): 681 – 690.
- JIANG J X, WU Y, HE Y, et al. Progress in tuning of metastable vaterite calcium carbonate [J]. *Journal of Inorganic Materials*, 2017, 32(7): 681 – 690. (in Chinese)
- [17] DE TEMMERMAN M L, DEMEESTER J, DE VOS F, et al. Encapsulation performance of layer-by-layer microcapsules for proteins [J]. *Biomacromolecules*, 2011, 12(4): 1283 – 1289.
- [18] 李洁. 功能化石墨烯为模板仿生矿物材料的可控构筑及载药研究 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨工程大学, 2016.
- LI J. Design, fabrication and controlled drug release of biomimetic mineral materials by functionalized graphene [D]. Harbin: Harbin Engineering University, 2016. (in Chinese)
- [19] DE COCK L J, DE KOKER S, DE GEEST B G, et al. Polymeric multilayer capsules in drug delivery [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2010, 49(39): 6954 – 6973.
- [20] 张磊. 工程纳米羟基磷灰石佐剂的免疫调控能力研究 [D]. 大连: 大连理工大学, 2021.
- ZHANG L. Immunomodulatory potentials of engineered nano-hydroxyapatite adjuvants [D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2021. (in Chinese)

Inhalable sustained-release preparations of nano-calcium carbonate loaded with octreotide

WANG ChunJiang¹ LI ShengYuan¹ HUANG YongPeng¹ TANG Hui¹
ZHANG JianJun^{2*} CHEN Bo^{1*}

(1. State Key Laboratory of NBC Protection for Civilian, Beijing 102205;

2. College of Chemical Engineering, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: Three types of nano-calcium carbonate with different micromorphologies have been prepared by metathesis methods. The effects of adding polyacrylic acid (PAA) and sodium of polyaspartic acid (PASP) on the micro-morphology and phase structure of the calcium carbonate were studied. Using the nano-calcium carbonate as a drug carrier, the drug octreotide was loaded by an impregnation adsorption-freeze-drying process to afford an inhalable sustained-release micro-powder preparation. The physicochemical properties and in vivo biological effects of the calcium carbonate carrier materials were tested. The micromorphology, drug loading, in vitro release performance and in vitro inhalation deposition performance of the micro-powder preparations were studied. The results show that the addition of additives can control the particle size, microstructure and phase structure of the calcium carbonate. Octreotide can be effectively loaded on the nano-calcium carbonate carrier, and the resulting powder maintains the original morphology of the carrier. Of the three types of nano-calcium carbonate carrier materials prepared, the micro-powder prepared using a mixture of spherical and rod-shaped nano-calcium carbonate carrier particles had the best overall performance; its drug loading was 31.3%, the effective site deposition rate reached 42%, and the continuous release time was 48 h, with good in vitro inhalation deposition performance and in vitro drug release performance. The mixed spherical and rod-shaped nano-calcium carbonate had no toxicity to THP-1 cells, did not cause any inflammatory effects at low concentrations, and can effectively deliver the drug to the lungs and be retained in the lungs for seven days, showing that it is a potential carrier for practical inhalable sustained-release preparations.

Key words: nano-calcium carbonate; octreotide; sodium of polyaspartic acid; inhalation preparation; sustained-release preparation

(责任编辑:于少云)