

文章编号: 1674-5566(2009)03-0321-06

恩诺沙星壳聚糖纳米粒的制备及其体外释药特性研究

龚露阳, 胡 鲲, 杨先乐

(上海海洋大学国家水生动物病原库, 上海 201306)

摘要:建立了离子交联法制备恩诺沙星壳聚糖纳米粒的方法,并优化了工艺条件,以低温超速离心法评价了恩诺沙星壳聚糖纳米粒包封率。利用透射电子显微镜分析了恩诺沙星壳聚糖纳米粒的显微形态,以透析法测定其体外释放度。结果表明:恩诺沙星壳聚糖纳米粒呈球形,外观形态饱满,表面光滑,分散性良好,平均粒径为 (131.1 ± 10.2) nm,平均包封率 $51.2\% \pm 2.9\%$ 。相比恩诺沙星原料药,恩诺沙星壳聚糖纳米粒在 1 h 内减少约 60% 药物的释放,24 h 总释放度为 79.9%。说明利用离子交联法制备恩诺沙星壳聚糖纳米粒快速、简便、操作性强,恩诺沙星壳聚糖纳米粒制剂缓释性能强,适于作为新剂型在水产药物中应用。

关键词:恩诺沙星;壳聚糖;纳米粒;体外释放

中图分类号: S 948 文献标识码: A

Preparation and release characteristics of enrofloxacin chitosan nanoparticles in vitro

GONG Lu-yang HU Kun YANG Xian-le

(State Collection Center of Aquatic Pathogen, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Enrofloxacin chitosan nanoparticles (ENR-CS-NPs) were prepared by using ionic gelation method. The preparing method was optimized through orthogonal design. Encapsulation efficiency was determined by the way of ultracentrifuge at 4°C and the content of enrofloxacin was determined by UV. The microstructure of nanoparticles was observed with transmission electron microscopy. In vitro release degree was measured by dialysis method. The nanoparticles observed by TEM were spherical with a mean particle size of (131.1 ± 10.2) nm. The encapsulation efficiency of ENR-CS-NPs was $51.2\% \pm 2.9\%$. The drug release degree of ENR-CS-NPs of about 60% decreased in 1 hour compared with ENR solution and the total drug release degree in 24 h is 79.9% with the sustained releasing behavior. Results showed that ionic gelation method is applicable to the preparation of ENR-CS-NPs.

Key words: enrofloxacin; chitosan; nanoparticles; in vitro release

恩诺沙星 (enrofloxacin, ENR) 又名乙基环丙沙星, 是畜禽和水产动物专用的第 3 代氟喹诺酮类抗菌药物, 能通过抑制细菌 DNA 螺旋酶来达到抗菌效果, 具有杀菌谱广、体内分布广泛、与其他药物无交叉

收稿日期: 2008-11-11

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划 (2006BAD03B04); 农业公益性行业科研专项 (200803013)

作者简介: 龚露阳 (1982-), 男, 上海市人, 硕士研究生, 专业方向为渔药药理学。E-mail: dlugong@163.com

通讯作者: 杨先乐, E-mail: xlyang@shou.edu.cn

耐药性等特点^[1]。通常 ENR 采用粉剂的形式在生产中使用。但由于粉剂等传统剂型存在生物利用度低、药效期短、肠胃刺激大等缺点^[2],且易产生耐药性,导致治疗过程中药物剂量增大、治疗周期延长等问题^[3-4],从而间接造成药物残留等水产品安全隐患。本试验通过改变药物剂型,以期改善 ENR 的口服生物利用度,降低其毒副作用。壳聚糖纳米粒(chitosan nanoparticles CS-NPs)是一种新型的药物制剂载体,具有靶向、缓释、增加药物吸收、提高药物稳定性等作用^[5],其生物膜的黏着性高,可通过肠 Peyer's 斑吸收而提高药物生物利用度^[6],在药物新剂型的研究和开发中得到了广泛的应用。鉴于水产养殖过程中的养殖和用药模式,壳聚糖纳米粒制剂具有明显的应用前景,目前该种药物剂型在国内外渔药制剂领域中尚是空白。本文以恩诺沙星为模式药物,采取离子交联法(ionic gelation)制备 ENR-CS-NPs 评价包封率、体外释放度等指标,为开发具有较强缓释能力的渔药新剂型进行了有益的尝试。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

Hitachi H600 透射电子显微镜; UNICAN 紫外分光光度计; Eppendorf centrifuge 5417R 型离心机。

ENR 含量 $\geq 98\%$,购于山东新阳光动物药业有限公司。CS 脱乙酰度 $>90\%$;三聚磷酸钠(TPP,化学纯);冰乙酸(分析纯)等化学试剂均购于国药集团化学试剂有限公司。

磷酸缓冲液(PBS):用 8 g NaCl 0.2 g KCl 1.44 g Na_2HPO_4 和 0.24 g K_2HPO_4 ,用蒸馏水定容至 1 L。

1.2 ENR-CS-NPs 的优化制备

1.2.1 ENR-CS-NPs 的制备

精密称取一定量的 ENR 溶于 20 mL CS 的 1% 醋酸溶液,以 NaOH 调节 pH 至 5。在室温磁力搅拌下逐滴加入 TPP 溶液 8 mL 维持搅拌 10 min 加以固定,得 ENR-CS-NPs 混悬液。在制备过程中,以不加入 ENR 的 CS 溶液用同样方法制得空白 CS-NPs 混悬液。

1.2.2 ENR 浓度的测定

取 ENR 和空白 CS-NPs 适量,以 0.1 mol/L 的盐酸溶解并定量,用紫外分光光度计在 200~400 nm 的波长内测定吸光度,计算最大吸收波长和空白干扰。

精确称取 10.0 mg 恩诺沙星,加少量盐酸溶解,用双蒸水相定容至 100 mL 棕色容量瓶中,制成恩诺沙星母液。以上母液配制 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 不同浓度梯度的 ENR 标准溶液,以分光光度计测定最大吸收波长处的吸光度,并以浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$)为横坐标,以吸光度为纵坐标制作 ENR 标准曲线。

1.2.3 ENR-CS-NPs 包封率的测定

以低温超速离心法^[7]测定包封率:取 ENR-CS-NPs 混悬液 1.0 mL 以高速冷冻离心机在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 18 000 r/min 离心 30 min 分离出载药纳米粒,取上清液 3 倍稀释后,以 1.2.2 方法计算上清液中 ENR 总质量,并按以下公式计算其包封率:

$$\text{包封率} = (1 - \text{上清液中 ENR 总质量} / \text{混悬液中加入 ENR 总质量}) \times 100\%$$

1.2.4 ENR-CS-NPs 制备工艺的优化

参照文献[8-9],以 CS 溶液浓度、TPP 溶液浓度和 ENR 用量为 3 个影响因素,每个因素选取 3 个水平进行 $L_9(3^3)$ 正交试验来确定最优化制备工艺。正交试验因素水平表见表 1。以各实验组 ENR-CS-NPs 包封率为评价参数。

1.3 ENR-CS-NPs 的质量评价

1.3.1 ENR-CS-NPs 的形态观察

取适量 ENR-CS-NPs 混悬液滴加于铜网上,用 2% 磷钨酸钠负染,以透射电镜(TEM)观察其形态。

表 1 因素水平表
Tab. 1 The factors and levels

水平	CS浓度 (mg/mL)	TPP浓度 (mg/mL)	ENR加入量 (mg)
1	1.5	1.2	4
2	2	1.5	8
3	2.5	1.8	12

1.3.2 ENR-CS-NPs的粒径与粒度分布

在电子显微镜视野中观察,并通过放大倍数计算、测定粒径和粒度分布,测量的 ENR-CS-NPs总个数大于 500 个^[10]。

1.4 ENR-CS-NPs体外释放特性

精密移取 ENR-CS-NPs悬液 4 mL 加入经超纯水浸泡煮沸后处理过的透析袋中,两端夹紧,放入盛有 20 mL PBS溶液的烧杯中,室温磁力搅拌。分别于 0.167、0.5、1、2、4、6、8、12、24 h 取外液,同时补充等量 PBS溶液,以紫外分光光度计测定每批次外液中 ENR 含量,平行测定 3 次,并按下式计算释放度:

$$\text{释放度} = (\text{透析外液累计 ENR 总量} / \text{NPs混悬液 ENR 总量}) \times 100\%$$

2 结果

2.1 ENR-CS-NPs的制备及其鉴定

2.1.1 ENR-CS-NPs的制备

以 1.2.1 方法制得 ENR-CS-NPs混悬液为带蛋白色乳光的胶体溶液,无团聚和沉淀现象。

2.1.2 ENR 和空白 CS-NPs扫描光谱

ENR 紫外扫描光谱如图 1, ENR 最大吸收波长在 274 nm 左右。空白 CS-NPs 紫外扫描光谱图 2, CS-NPs 在 274 nm 吸光度很小,对 ENR 测定不造成干扰。

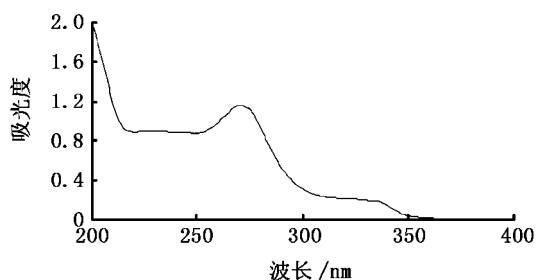


图 1 ENR 紫外扫描光谱
Fig 1 Ultraviolet spectrum of ENR

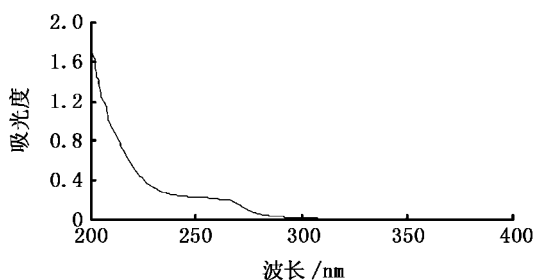


图 2 空白 CS-NPs 紫外扫描光谱
Fig 2 Ultraviolet spectrum of blank CS-NPs

2.1.3 ENR 标准曲线

以 274 nm 为检测波长,吸光度 A 值与相应浓度 C 作一元线性回归 (图 3), ENR 检测浓度在 10~200 $\mu\text{g/mL}$ 范围内与吸光度 A 线性关系良好,其回归方程为 $A=0.0151C+0.0594$, $r=0.9975$ 。

2.1.4 ENR-CS-NPs制备工艺的优化

ENR-CS-NPs制备条件的 $L_9(3^3)$ 正交试验设计如表 2。由极差分析 (表 3) 结果可见: TPP 的浓度对药物包封率影响最大, CS 浓度次之, ENR 用量影响最小,但 3 个因素对包封率均无显著性影响。制备 ENR⁰-CS-NPs 的最优化条件应为 CS 浓度 2 mg/mL

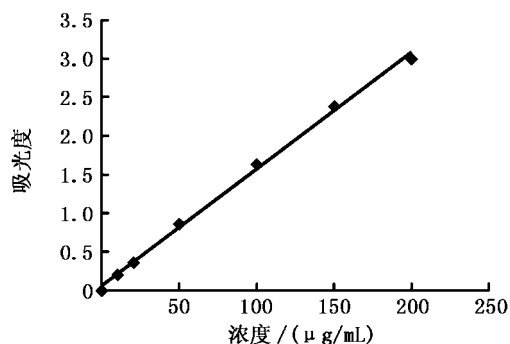


图 3 ENR 溶液标准曲线
Fig 3 Standard curve of ENR solution

TPP浓度 1.5 mg/mL, ENR用量为 8 mg, 以此最佳配比制备的 ENR-CS-NPs的平均包封率为 51.2% ± 2.9%。

表 2 $L_9(3^3)$ 正交试验结果

Tab. 2 Results of $L_9(3^3)$ orthogonal test

实验组	列号			包封率 (%)
	CS浓度	TPP浓度	ENR用量	
1	1	1	1	20.2
2	1	2	2	42.1
3	1	3	3	25.7
4	2	1	2	29.9
5	2	2	3	46.6
6	2	3	1	33.7
7	3	1	3	21.8
8	3	2	1	34.3
9	3	3	2	36.1
K_1	29.33	23.97	29.40	
K_2	36.73	41.00	36.03	
K_3	30.73	31.83	31.37	
极差 (R)	7.40	17.03	4.33	

表 3 方差分析

Tab. 3 Analysis of variance

方差来源	平方和	自由度	均方	F值
CS浓度	92.72	2	46.36	0.47
TPP浓度	436.05	2	218.03	2.19
ENR用量	69.65	2	34.83	0.35
误差	598.41	2	299.21	

注: $F_{0.10(2,2)} = 9.00$

2.2 ENR-CS-NPs的质量评价

2.2.1 ENR-CS-NPs的形态观察

从图 4可知: ENR-CS-NPs呈球形或类球形, 外观形态饱满, 表面光滑, 分散性良好, 无粘连现象。

2.2.2 ENR-CS-NPs的粒径和粒度分布

从图 5可知: ENR-CS-NPs平均粒径为 (131.1 ± 10.2) nm, 粒度分布范围主要在 50~250 nm 之间, 其中 100~150 nm 占 39.8%, 150~200 nm 占 33.6%。

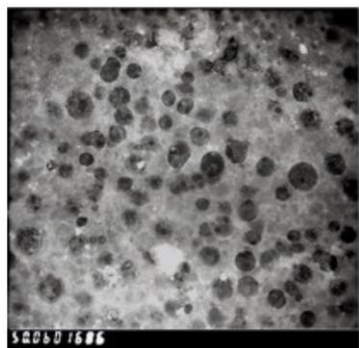


图 4 ENR-CS-NPs透射电镜照片 ($\times 50\,000$)

Fig. 4 TEM of ENR-CS-NPs

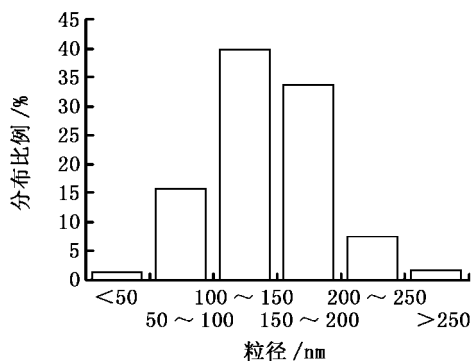


图 5 ENR-CS-NPs粒度分布

Fig. 5 Frequency of ENR-CS-NPs

2.3 ENR-CS-NPs体外释放特性

ENR-CS-NPs和 ENR 溶液的 24 h 溶出曲线如图 6。ENR 溶液在 1 h 内完全溶出,与之相比,ENR-CS-NPs 在 1 h 内释放率为 41.1%,减缓了约 60% 药物的释放,表现出有明显的缓释性;其在 2 h 内总释放率接近 50%,4 h 内释放率接近 60%,24 h 释放率接近 80%,仍有 20% 左右 ENR 未释出。

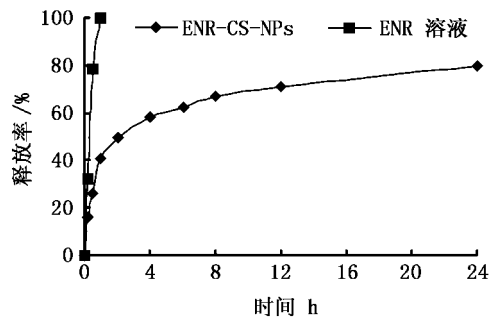


图 6 ENR-CS-NPs和 ENR 溶液体外释放特性

Fig 6 Release profiles of ENR-CS-NPs and ENR solution in vitro

3 讨论

3.1 ENR-CS-NPs的应用价值

现有的渔药剂型在生产实践中存在药效低、毒副作用强、用药剂量大等局限性,已不能满足目前无公害养殖的生产需要^[2 11-12]。纳米粒作为新一代剂型具有良好的缓释、控释能力和靶向能力^[13-14],可提高药物口服的生物利用度^[15],并能降低用药剂量和毒副作用。

壳聚糖是甲壳素脱乙酰化的产物,具有良好的生物降解性和生物黏附性,能延长药物在吸收部位的滞留时间^[16],在药物传递系统的研究中具有广泛的应用^[17-18]。此外,窦志芳等^[19]提出,壳聚糖还可提高机体非特异性免疫功能。以壳聚糖为载体材料制备的 CS-NPs 原料来源广泛、降解性好、无毒无害,在高效低毒渔药剂型的开发和应用中具有良好的发展前景^[20]。

3.2 ENR-CS-NPs的制备方法

ENR-CS-NPs的制备方法有凝聚沉淀法、乳滴聚结法、离子交联法和反相胶束法等^[5]。本文采用的离子交联法主要通过 CS 的阳离子基团与 TPP 的阴离子物理交联产生纳米粒。该方法操作简便,条件温和,产物均一可调,在制备过程中不使用戊二醛等化学交联剂,避免了可能存在的潜在安全隐患。

张俊山等^[21]指出:TPP 与 CS 分子间的交联是凝胶化过程的关键,因此纳米粒的形成只有在特定的 CS 和 TPP 浓度范围内发生。本文中,当 CS 和 TPP 浓度过低或过高时,前者无法形成纳米粒,后者凝聚过度而产生凝絮,只有在 CS 浓度 1.0~5.0 mg/L,TPP 浓度 1.0~3.0 mg/L 时,可观察到明显带乳光的纳米粒胶体混悬液,证明 CS 和 TPP 浓度是影响纳米粒形成及其质量的重要因素。作者在该范围内,以优化条件制备的 ENR-CS-NPs 在 TEM 观察下表面光滑圆润,粒度分布范围较小,无粘连现象,平均粒径 131.1 nm,平均包封率达 51.2%。

3.3 ENR-CS-NPs的体外释放特点

CS-NPs 的体外释药一般经历突释、扩散和降解三个阶段。ENR-CS-NPs 在释放初期存在明显的突释现象,这可能是由悬液中的游离 ENR 及部分在纳米粒表面吸附或镶嵌的 ENR 造成。此后 ENR-CS-NPs 的释放主要通过渗透和扩散作用,其释药速率平缓,释放均匀,表现出良好的控释性能。在体外释药试验中,有 20% 左右的 ENR 最终仍无法释放,但口服给药时,在消化道内多种酶与菌群作用下,纳米粒可被完全降解并释出药物。

孙红祥等^[22]对长效恩诺沙星注射液的体内、体外研究表明:相比普通剂型,该剂型体外缓释性能更为优异,其体内的生物利用度和药物作用时间也均有显著提高,表现出良好的体外、体内相关性。因此,ENR-CS-NPs 在体外释药中表现出缓释和控释能力,对该剂型在口服给药中持续传递能力、减少给药剂量和降低药物毒性方面具一定参考意义。

参考文献:

- [1] 朱模忠. 兽药手册 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 103-104.
- [2] 邓永强, 汪开毓, 黄小丽, 等. 水产药物制剂生产存在的问题与对策 [J]. 科学养鱼, 2004, (7): 42.

- [3] 杨先乐. 新编渔药手册 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2005: 208—209.
- [4] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 2000年版 (一部) [S]. 北京: 化学工业出版社, 2000: 186—189.
- [5] 林爱华, 平其能. 壳聚糖载药纳米粒研究进展 [J]. 药学专论, 2006, 15(21): 25—27.
- [6] Behrens I, Pena A, I Alonso M, J et al. Comparative uptake studies of bioadhesive and non-bioadhesive nanoparticles in human intestinal cell lines and rats: the effect of mucus on particle adsorption and transport [J]. *Pharmaceutical Research* 2002, 19(8): 1185.
- [7] 袁晓佳, 张志荣, 何勤. 胸腺五肽三甲基壳聚糖纳米粒包封率的测定 [J]. 华西药学杂志, 2005, 20(2): 131—133.
- [8] 方开泰, 马长兴. 正交与均匀试验设计 [M]. 北京: 科学出版社, 2001: 175—183.
- [9] 黄宣运, 胡鲲, 方伟, 等. 环丙沙星偶联物的制备及其产物的鉴定 [J]. 上海水产大学学报, 2008, 17(5): 585—590.
- [10] Shilpa Sant, Veronique Nadeau, Patrice Hildgen. Effect of porosity on the release kinetics of propafenone-loaded PEG-g-PLA nanoparticles [J]. *Journal of Controlled Release* 2005, 107: 203—214.
- [11] 胡鲲, 杨先乐, 龚幼兰, 等. 恩诺沙星微胶囊的制备及其抗紫外、热稳定性的研究 [J]. 上海水产大学学报, 2006, 15(1): 25—29.
- [12] 胡鲲, 朱泽闻, 杨先乐, 等. 恩诺沙星微胶囊的制备及其缓释性能的研究 [J]. 上海水产大学学报, 2006, 15(3): 375—379.
- [13] 潘卫三. 新药制剂技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 116—127.
- [14] 汤爱国, 张阳德. O-羧甲基糖酰化壳聚糖-聚乳酸阿霉素纳米粒在大鼠体内的靶向性研究 [J]. 中国现代医学杂志, 2006, 16(13): 1941—1943.
- [15] Prego C, Fabre M, Torres D, et al. Efficacy and mechanism of action of chitosan nanocapsules for oral peptide delivery [J]. *Pharmaceutical Research* 2006, 23(3): 549—556.
- [16] 张峻. 壳聚糖的药剂学应用 [J]. 食品与药品, 2007, 7(8): 29—31.
- [17] Janes K A, Calonso B, Alonso M J. Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for micromolecules [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2001, 47(1): 83—97.
- [18] 罗华丽, 鲁在君. 壳聚糖作为药物缓释载体的研究进展 [J]. 高分子通报, 2007, 7: 25—30.
- [19] 窦志芳, 冯前进, 闫娟丽, 等. 壳聚糖免疫调节作用的研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2007, 25(10): 2075—2076.
- [20] 张程亮, 孙纳. 壳聚糖用于抗肿瘤治疗的研究进展 [J]. 中国药房, 2005, 16(7): 549.
- [21] 张俊山, 陈晓青, 蒋新宇, 等. 纳米药物研究进展 [J]. 中国现代医学杂志, 2002, 12(14): 39—40.
- [22] 孙红祥, 严新星. 长效恩诺沙星注射液体外释药实验及在山羊体内的药动学研究 [J]. 畜牧兽医学报, 2004, 35(1): 111—114.