

多孔羟基磷灰石微球的药物缓释性能*

徐 为¹ 姚爱华^{1,2} 艾凡荣^{1,3} 王德平^{1,2} 黄文昆^{1,2}

1. 同济大学材料科学与工程学院 上海 200092

2. 先进土木工程材料教育部重点实验室 上海 200092

3. 南昌大学机电工程学院 南昌 330031

摘 要 用锂钙硼 (LCB) 玻璃在磷酸盐溶液中的原位转化反应制备多孔羟基磷灰石 (HA) 微球, 表征微球的物相组成、孔结构和形貌, 以溶菌酶为药物模型研究了药物的缓释性能。结果表明, 所制备的 HA 微球具有较好的孔结构。当溶菌酶溶液的浓度较低时, HA 微球将溶菌酶吸附在微球的外表面; 当浓度较高时, 更多的溶菌酶扩散进入 HA 微球的微孔中, 使缓释效果明显改善。当溶菌酶溶液的初始浓度为 1.0 mg/ml 时, 载药 HA 微球的释药周期可达 800 h 以上。

关键词 无机非金属材料, 羟基磷灰石, 多孔微球, 溶菌酶, 药物缓释载体

分类号 TB321

文章编号 1005-3093(2011)04-0439-05

Drug Release Behavior of Porous Hydroxyapatite Microspheres

XU Wei¹ YAO Aihua^{1,2**} AI Fanrong^{1,3} WANG Deping^{1,2} HUANG Wenhai^{1,2}

1. School of Materials Science and Engineering, Tongji University, Shanghai 200092

2. Key Laboratory of Advanced Civil Engineering Materials, Ministry of Education, Tongji University, Shanghai 200092

3. College of Mechanical and Electrical Engineering, Nanchang University, Nanchang 330031

* Supported by Key Project on Basic Research of Shanghai No. 08JC1419200 and Program for Young Excellent Talents in Tongji University.

Manuscript received March 30, 2011; in revised form May 9, 2011.

** To whom correspondence should be addressed, Tel: (021)69582117, E-mail: aihyao@126.com

ABSTRACT Porous hydroxyapatite (HA) microspheres were prepared by a situ Li-Ca-B glass conversion process. The phase composition, pore structure and morphology were characterized by XRD, SEM and BET. The results show that the resultant microspheres possess good internal porous structure. The release behavior of lysozyme as a model drug was investigated in the present work. The results show that lysozyme molecules mainly are absorbed on the external surface of the porous HA when concentration of lysozyme is low. A large amount of lysozyme is loaded in the pores of the microspheres when high concentration of lysozyme is used, which effectively prolonged the drug release. The loading behavior was successfully observed in the 1.0 mg/ml lysozyme solution and the drug can still be released after 800 hours.

KEY WORDS inorganic non-metallic materials, hydroxyapatite, porous microsphere, lysozyme, drug controlled-release carrier

药物缓释系统, 是将药物与具有较好生物相容性的材料以理化方式结合, 使其在人体内以扩散渗透等方式均匀持续释放^[1]。有机高分子类药物载体材料, 例如聚羟基乙酸 (PGA)、聚乳酸 (PLA) 和聚己内酯 (PCL) 等^[2,3], 具有良好的生物相容性和成分稳定性, 但是在降解过程中产生大量影响细胞环境的酸性分

子。同时, 控释体系的加工成型在高温或存在有机溶剂的条件下进行, 很多药物在此条件下极易失活^[4]。

羟基磷灰石 (Hydroxyapatite, 简称 HA) 是脊椎动物骨和牙齿的主要成分, 具有优良的生物相容性^[5], 将其植入人体后与骨组织形成良好的骨性键合^[6], 已应用于口腔种植、耳小骨替换、脊椎骨替换等多个方面^[7,8]。HA 的化学稳定性好, 因此可将其作为药物缓释载体^[9,10]。但是, 对于大块 HA 多孔体, 需要通过手术植入患处或取出; 而纳米 HA 粉体易团聚, 依靠吸附作用使其与药物复合, 不仅载药量有限, 且药物的释放速率不易控制。本文利用硼酸盐玻

* 上海市科委“创新行动计划”基础研究重点 08JC1419200 和同济大学青年优秀人才培养行动计划资助项目。

2011 年 3 月 30 日收到初稿; 2011 年 5 月 9 日收到修改稿。

本文联系人: 姚爱华

璃反应活性高的特点,使其与磷酸盐溶液反应,原位制备多孔 HA 微球,并以溶菌酶为药物模型,将其装载到多孔 HA 微球中,研究溶菌酶的体外释放行为。

1 实验方法

1.1 多孔 HA 微球的制备

称取适量的 Li_2CO_3 、 CaCO_3 、 H_3BO_3 粉料,充分混合后置于硅碳棒高温炉中,在 $1100\text{ }^\circ\text{C}$ 加热熔融 15 min 后水淬急冷,制得组分(质量分数,%)为 $10\text{Li}_2\text{O}-10\text{CaO}-80\text{B}_2\text{O}_3$ 的 LCB 玻璃。将其干燥破碎后筛取 $100-140$ 目之间的颗粒,在 $800\text{ }^\circ\text{C}$ 管式炉中球化两次。将球化后的颗粒浸泡于 0.25 mol/L , $\text{pH}=9$ 的 K_2HPO_4 溶液中,静置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 恒温箱中 7 d 后取出。用去离子水充分洗涤后在 $90\text{ }^\circ\text{C}$ 恒温干燥 24 h ,然后将微球置于 $600\text{ }^\circ\text{C}$ 马弗炉中热处理 2 h ,随炉冷却后即得到多孔 HA 微球。

1.2 多孔 HA 微球的表征

将玻璃微球与 K_2HPO_4 溶液的反应产物研磨成粉末,用 X 射线衍射(XRD, D/max 2550VB3+, PC, Japan) 分析物相组成;用扫描电子显微镜(SEM, S-2360, Japan) 观察微球的表面和断面形貌;用比表面积测定仪(BET, 3H-2000BET-A, China) 测定微球的比表面积和孔结构情况。

1.3 溶菌酶等温吸附曲线的测定和溶菌酶的体外释放

以溶菌酶为药物模型,采用压力渗透技术将其装载到多孔 HA 微球中。称取 0.2 g 多孔 HA 微球浸泡于 20 ml 浓度分别为 0.4 mg/ml 和 1.0 mg/ml , $\text{pH}=7.04$ 的溶菌酶 PBS 溶液中,于 $5\text{ }^\circ\text{C}$ 下置入 DZF-1 型真空干燥箱内,保持真空度 $<0.085\text{ MPa}$,以排除微球孔隙中的气体,并使溶菌酶溶液在压力作用下扩散进入微球的孔隙中。 10 min 后取出样品,用 PBS 液冲洗后冷冻干燥。

称取 0.2 g 多孔 HA 微球分别浸泡于 20 ml 浓度为 0.1 mg/ml , 0.2 mg/ml , 0.4 mg/ml , 0.6 mg/ml , 0.8 mg/ml , 1.0 mg/ml 和 2.0 mg/ml 的溶菌酶溶液中,在 $5\text{ }^\circ\text{C}$ 用压力渗透法吸附 10 min 后移取上层溶液,用紫外分光光度计(UV, 760CRT, China) 测定溶菌酶溶液吸光度。与标准曲线对照,计算各样品中溶菌酶的浓度和含量,并绘制等温吸附曲线。

将载有溶菌酶的多孔 HA 微球样品在室温下分别浸泡于 0.4 mg/ml 和 1.0 mg/ml , $\text{pH}=7.04$ 的溶菌酶 PBS 溶液中,将制备所得样品记为 A_4 和 A_{10} 。取 0.1 g 载药微球在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 浸泡于 10 ml , $\text{pH}=7.04$ 的 PBS 溶液中,依次在 2 h , 4 h , 6 h , 24 h 及随后每隔 1 d 测定上层溶液的吸光度,得到每段时间内药物的释放量和累积药物释放量。

2 结果与讨论

2.1 多孔 HA 微球的组成

图 1 为 LCB 玻璃微球在 0.25 mol/L K_2HPO_4 溶液中反应 7 d 后,产物的 XRD 图谱。由图 1 可知,产物微球的衍射图谱与羟基磷灰石的标准图谱(JSPDF: 09-0432)一致,说明反应产物为羟基磷灰石 $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ 。但其衍射峰较标准图谱有明显宽化,表明反应生成的羟基磷灰石结晶不完全或其晶粒尺寸较小。由图 1 还可看出,产物在 $600\text{ }^\circ\text{C}$ 热处理后,部分 HA 发生分解,形成 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 。

样品的表面形貌及断面情况,如图 2 所示。由图 2a 可见,所得产物保持了较好的球形形貌,平均尺寸约为 $100\text{ }\mu\text{m}$ 。将表面局部区域放大(图 2b),可见微球表面存在大量的颗粒状的羟基磷灰石沉积物。图 2c、d 为产物微球的断面形貌,可见微球具有良好的多孔结构,在其表面存在厚度约为 $5\text{ }\mu\text{m}$ 的相对较为致密的壳层,而内部包含大量的羟基磷灰石颗粒,这些颗粒彼此烧结在一起,颗粒之间形成大量微孔。这样的孔结构可以保证药物在浓度梯度及压力作用下进入微球的孔隙中,且表面较为致密的壳层可以有效减少药物的突释,延长释放周期。

本文使用 $\text{Li}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{B}_2\text{O}_3$ (LCB) 硼酸盐玻璃作为制备 HA 的前躯体。在此类玻璃的网络结构单元中, B^{3+} 与 O^{2-} 形成 $[\text{BO}_3]$ 三角体和 $[\text{BO}_4]$ 四面体,其中 $[\text{BO}_3]$ 三角体属于层状结构,尽管在同一层中有 $\text{B}-\text{O}$ 键相连接,但层与层由分子引力维系在一起,是结构中的弱点,这样的结构特点决定了 LCB 玻璃具有较高的化学反应活性。因此,在碱性溶液中($\text{pH}=9$)LCB 玻璃的空间网络断裂并逐渐溶解,随即玻璃网络中的 Li^+ 和 BO_3^{3-} 离子溶出。而 Ca^{2+} 离子与溶液中的 $(\text{PO}_4)^{3-}$ 及 OH^- 反应形成溶解度较小的水化物 $\text{Ca}-\text{P}-\text{OH}$,原位沉积在微球表面;因 $\text{Ca}-\text{P}-$

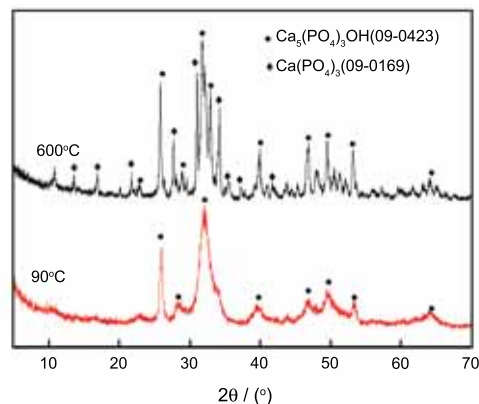


图 1 不同热处理温度下多孔 HA 微球的 XRD 图谱
Fig.1 XRD patterns of HA microspheres treated at different temperatures

OH 水化物具有高度多孔的结构, $(\text{PO}_4)^{3-}$ 极易通过该层向玻璃内部扩散, 继续与玻璃中溶出来的 Ca^{2+} 反应, 使磷灰石层由表及里逐渐增厚直到 LCB 玻璃消耗完全。在上述反应过程中, Ca^{2+} 与 PO_4^{3-} 、 OH^- 反应生成的水化物 Ca-P-OH 在玻璃表面原来 Ca^{2+} 占据的位置处沉积, 形成相对较为致密的微球壳, 而由 Li^+ 和 B^{3+} 占据的位置, 由于其溶出形成了孔隙 [12,13]。

用 BET 方法测定微球的比表面积和孔结构, 结果列于表 1。表 1 表明, 热处理对产物微球的比表面积和孔结构影响较大。未烧结的微球具有较大比表面积 ($176.0 \text{ m}^2/\text{g}$), 在 $600 \text{ }^\circ\text{C}$ 烧结后其比表面积和总孔体积显著降低, 比表面积仅为 $23.5 \text{ m}^2/\text{g}$, 这是在热处理过程中羟基磷灰石晶体的颗粒发生长大及球壳致密化引起的。从表 1 中的数据可以看出, 在热处理过程中样品的平均孔径增大。在颗粒长大过程中, 由颗粒堆积所形成的孔增大。

2.2 多孔 HA 微球的药物装载及释放

用在 $600 \text{ }^\circ\text{C}$ 热处理的多孔 HA 微球进行溶菌酶

的装载实验, 并测定其在 $5 \text{ }^\circ\text{C}$ 时的等温吸附曲线, 结果如图 3 所示。由图 3 可知, 微球对溶菌酶的等温吸附过程分为两个阶段。当溶菌酶溶液的初始浓度比较低 ($<0.8 \text{ mg/ml}$) 时, 吸附量随着浓度的增加先迅速增加然后逐渐趋缓, 而当浓度较高 ($>0.8 \text{ mg/ml}$) 时, 吸附量又随浓度的增加快速增大, 两者近似线性关系。低浓度时的等温吸附曲线与 Langmuir 等温吸附曲线相近, 因此对低浓度时的吸附曲线用 Langmuir 方程进行拟合, 结果如图 4 所示。拟合直线相关系数为 0.99975, 说明具有非常好的相关性, 证明当初始浓度较低时, 溶菌酶在多孔微球表面的吸附为单分子层物理吸附。而当溶菌酶浓度较高时, 其吸附量随浓度的增加迅速增大, 吸附量与其溶度近似线性关系。其原因是, 当浓度较高时溶菌酶分子不仅被吸附在微球表面, 而且扩散进入微孔中, 使吸附量迅速增加。

图 5 给出了样品 A_4 和 A_{10} 的累积释放曲线。图 5 表明, A_4 样品中溶菌酶的释放速率较快, 在 48 h 内药物基本释放完全, 累积释放率达到 88%。 A_{10} 样品

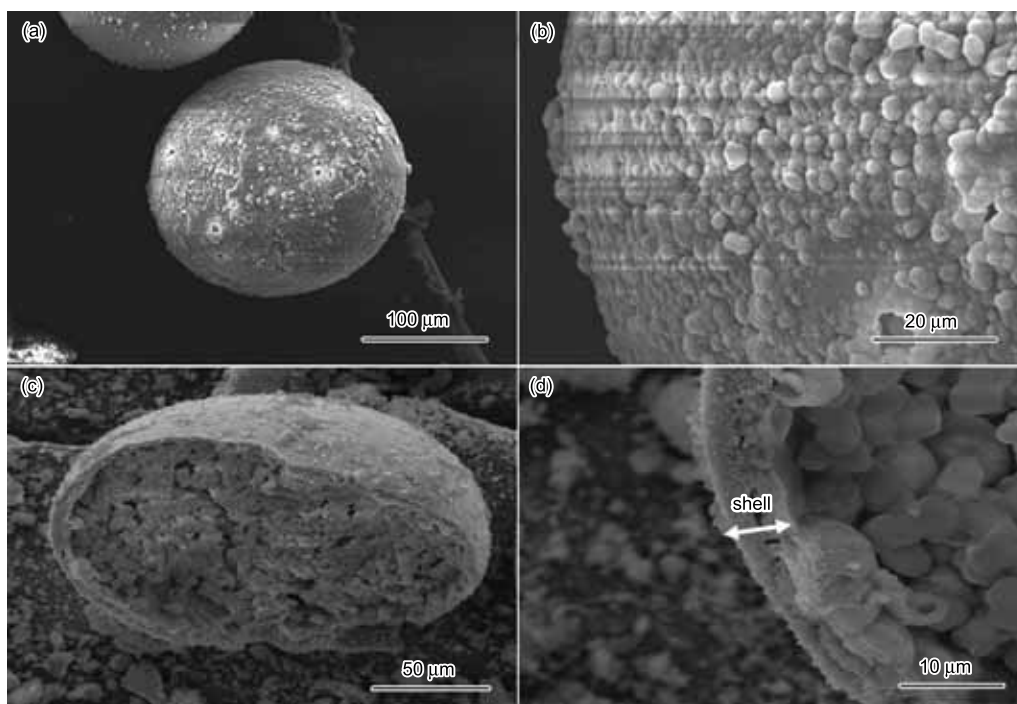


图 2 多孔 HA 微球的表面和断面 SEM 形貌

Fig.2 SEM images of HA microspheres (a), (b) surfaces; (c), (d) fractured section

表 1 多孔 HA 微球比表面积和孔结构分析

Table 1 Surface area and pore structures of the resulting HA microspheres

	Surface area (m^2/g)	Average pore size /nm	Pore volume ($\times 10^{-1} \text{ m}^3/\text{g}$)
As-prepared	176.0	10.5	4.614
Sintered at $600 \text{ }^\circ\text{C}$ (2 h)	23.5	33.9	1.989

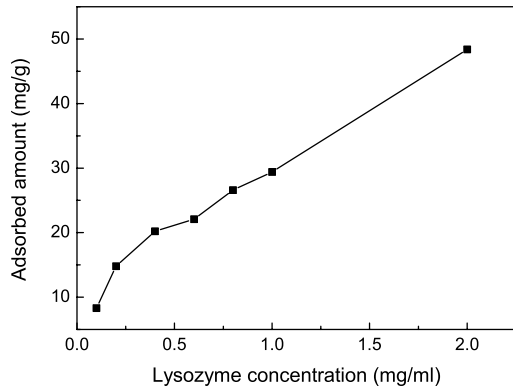


图3 溶菌酶的 5 °C 等温吸附曲线

Fig.3 Adsorption isotherms of Lysozyme at 5 °C

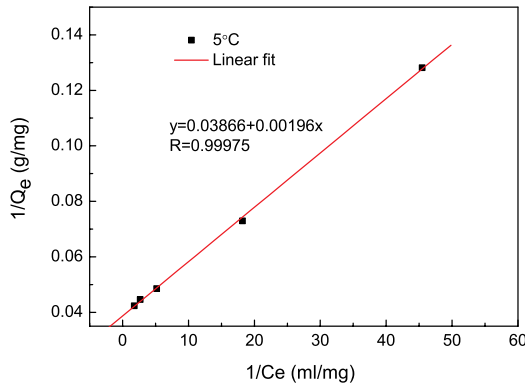


图4 用 Langmuir 模型拟合溶菌酶的等温吸附曲线

Fig.4 Langmuir linear regression of adsorption isotherms for Lysozyme

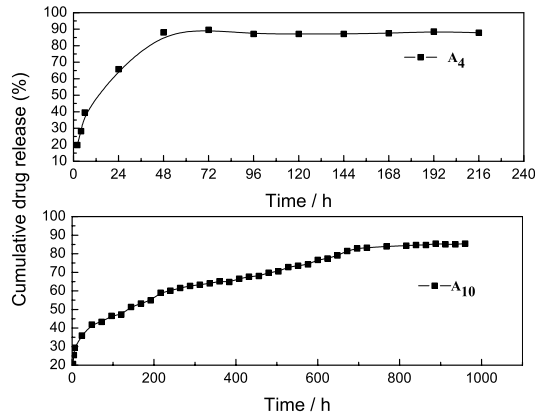


图5 A₄ 和 A₁₀ 样品的药物累积释放曲线

Fig.5 Cumulative drug release from A₄ and A₁₀ samples

中溶菌酶的释放周期要明显大于 A₄ 样品, 达到了 800 h(33d) 以上。从图 5 还可看出, A₁₀ 样品在前 48 h 内药物快速释放, 累积释放率达到了 41.8%, 然后随着释放时间的延长药物缓慢释放, 最后基本保持不变, 最终累积释放率约为 86%, 略比 A₄ 样品的 (88%)

低。由吸附模型可知, A₄ 样品中溶菌酶的吸附符合 Langmuir 吸附方程, 即溶菌酶单层吸附在微球的外表面, 因此较容易释放。而对于 A₁₀ 样品, 溶菌酶不仅吸附在微球外表面, 微孔中亦载有药物, 在释放初期 (48 h 内) 微球外表面的溶菌酶脱附, 因此释放速率较快。外表面的溶菌酶释放完全后, 微孔中的溶菌酶通过扩散作用持续向外释放。由于微球的球壳较为致密, 且微孔的孔径较小, 释放速率较低, 使缓释周期明显延长。

3 结 论

1. 用具有较高反应活性的 Li₂O-CaO-B₂O₃ 玻璃在 K₂HPO₄ 溶液中原位转化方法可制备多孔结构的 HA 微球。调节热处理温度可控制产物的结晶度、比表面积及孔结构, 进而控制药物的装载和释放性能。

2. 以溶菌酶为药物模型, 将多孔 HA 微球浸泡于不同浓度的溶菌酶溶液中, 用压力渗透技术进行药物装载。当溶菌酶溶液的初始浓度较低 (<0.8 mg/ml) 时 HA 微球对于溶菌酶的吸附主要发生在微球的外表面; 当浓度较高 (>0.8 mg/ml) 时更多的溶菌酶分子扩散进入微孔中, 使得缓释效果明显改善, 其释放周期达到 30 d 以上。

3. 用硼酸盐玻璃原位转化反应制备的多孔 HA 微球具有较好的药物缓释性能, 没有明显突释现象, 可实现药物的长期、稳定释放, 是一种理想的药物载体材料。

参 考 文 献

- ZHANG Gang, TAN Yinghui, Research progress of polypeptide, therapeutic grade protein carrier, Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, **19**(3), 220(2009) (张 纲, 谭颖徽, 多肽、蛋白质药物的载体相关研究. 口腔颌面外科杂志, **19**(3), 220(2009))
- M.Isobe, Y.Yamazaki, M.Mori, K.Ishihara, N.Nakabayashi, T.Amagasa, The role of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in PLGA capsules at an extraskeletal site of the rat, Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, **57**(6), 695(1999)
- J.B.Oldham, L.Lu, X.Zhu, B.D.Porter, T.E.Hefferan, D.R.Larson, Biological activity of rhBMP-2 released from PLGA microspheres, Journal of Biomechanical Engineering, **122**(3), 289(2000)
- YANG Weizhong, ZHOU Dali, YIN Guangfu, YIN Shanya, ZHENG Changqiong, Hydraulic characteristic and osteoinduction capacity of calcium phosphate/BMP bioactive bone cement, Journal of Inorganic Materials, **20**(5), 1174(2005) (杨为中, 周大利, 尹光福, 尹绍雅, 郑昌琼, 磷酸钙/BMP 复合生物活性骨水泥水化性能及诱导成骨特性研究, 无机材料学报, **20**(5), 1174(2005))

- 5 WANG Haiting, CHEN Lei, JIN Xueling, ZHU Haitao, The research and development of hydroxyapatite in the bioceramics, *Shandong Ceramics*, **25**(2), 3(2002)
(王海亭, 陈磊, 羟基磷灰石 (HAP) 材料在生物材料中的研究与开发, *山东陶瓷*, **25**(2), 3(2002))
- 6 M.P.Ferraz, F.J.Monteiro, C.M.Manuel, Hydroxyapatite nanoparticles: a review of preparation methodologies, *Journal of Applied Biomaterials & Biomechanics*, **2**, 74(2004)
- 7 L.L Hench, *Biomaterials, Science*, **208**(23), 826(1980)
- 8 W.Höland, V.Rheinberger, E.Apel, C.Van Thoen, M.Höland, A.Dommann, M.Obrecht, C.Mauth, U.Graf-Hausner, Clinical applications of glass-ceramics in dentistry, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **17**(11), 1037(2006)
- 9 B.Palazzo, M.C.Sidoti, N.Roveri, A.Tampieri, M.Sandri, L.Bertolazzi, F.Galbusera, G.Dubini, P.Vena, R.Contro, Controlled drug delivery from porous hydroxyapatite grafts: An experimental and theoretical approach, *Materials Science and Engineering C*, **25**, 207(2005)
- 10 A.M.Rauschmanna, A.T.Wichelhaus, V.Stirnal, E.Dingeldein, L.Zichner, R.Schettler, V.Alt, Nanocrystalline hydroxyapatite and calcium sulphate as biodegradable composite carrier material for local delivery of antibiotics in bone infections, *Biomaterials*, **26**(15), 2677(2005)
- 11 CUI Daichao, FAN Tianyuan, Applications of microspheres in tissue engineering, *Journal of International Pharmaceutical Research*, **37**(4), 287(2010)
(崔代超, 范田园, 微球在组织工程中的应用, *国际药学研究杂志*, **37**(4), 287(2010))
- 12 A.H.Yao, F.R.Ai, X.Liu, D.P.Wang, W.H.Huang, W.Xu, Preparation of hollow hydroxyapatite microspheres by the conversion of borate glass at near room temperature, *Materials Research Bulletin*, **45**, 2010, 25(2010)
- 13 ZHAO Ying, XU Wei, YAO Aihua, HUANG Wenhai, Porous hydroxyapatite microspheres formed by a situ conversion process, *Journal of Functional Materials*, **41**(7), 1124(2010)
(赵颖, 徐为, 姚爱华, 多孔羟基磷灰石微球的原位转化制备研究, *功能材料*, **41**(7), 1124(2010))