

低分子肝素/壳聚糖/海藻酸钠复合微囊的制备及释药性能

丘晓琳 李国明* 叶俊生

(华南师范大学化学系 广州 510631)

摘 要 以低分子肝素(LMWH)为囊芯,通过乳化分散成微囊核,然后依次用壳聚糖(CS)和海藻酸钠(ALG)通过大分子自组装形成多层结构的复合胶囊。IR和SEM测试技术对微囊进行的结构表征和形态观察表明,CS与LMWH、CS与ALG均以静电作用相结合。微囊球形规整,粒度分散性好,平均粒径为 $(6.9 \pm 0.85) \mu\text{m}$ 。微囊对LMWH的包封率最高可达93.5%。微囊的体外药物释放实验表明,其半释放率的释放时间可长达72 h。随CS浓度或ALG浓度的增大,药物释放速率减缓,释药速率随药物与壳聚糖质量比的增大而加快,交联度越高,微囊的释药速率越小,微囊在酸性条件下释药较快。

关键词 壳聚糖 海藻酸钠 低分子肝素 微囊 释药性能

中图分类号:O637;TQ467

文献标识码:A

文章编号:1000-0518(2005)04-0361-06

低分子肝素(LMWH)是一类新型的高抗血栓活性药物,是由肝素分级或降解而得的阴离子低聚物,分子量范围一般为4 000~7 000。临床上用于血液透析的抗凝治疗,防治静脉血栓栓塞、肺血栓栓塞、脑血栓、血管内凝血等^[1]。将LMWH微胶囊化,制成适用于静脉注射的缓释型制剂,可提高LMWH的疗效,降低其毒副作用。目前以明胶^[2,3]或乙基纤维素^[4]为囊材的LMWH微囊的粒径大于100 μm ,粒径范围最小的为0.5~20 μm ,药物包封率低于90%,释放较快(约6~8 h释放完)。壳聚糖(CS)、海藻酸钠(ALG)是生物可降解性离子聚合物,无毒,有良好的生物相容性,成膜及成球性均较好。本文以CS、ALG为复合载体,根据乳化分散和大分子自组装原理,以戊二醛为交联剂,制备出以CS为内层,ALG为外壳的LMWH微囊,探讨了各种因素对微囊释药性能的影响。

1 实验部分

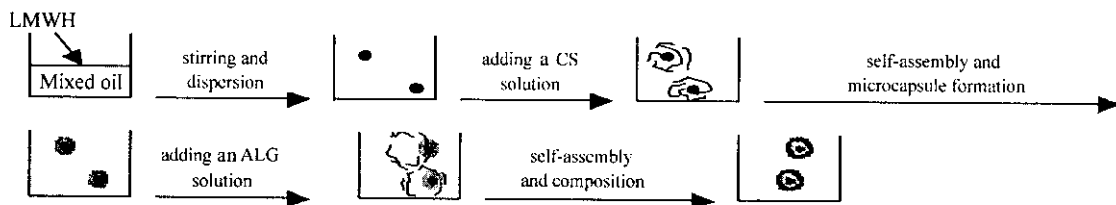
1.1 仪器和试剂

756M型紫外可见分光光度计(上海精密科学仪器厂);Perkin-Elmer FT-IR 1730型红外光谱仪(美国);HZ-24型旋转振荡槽(辽阳市恒温仪器厂);JSM-T300型扫描电子显微镜(日本电子);加速电压10 kV,样品经喷金处理。

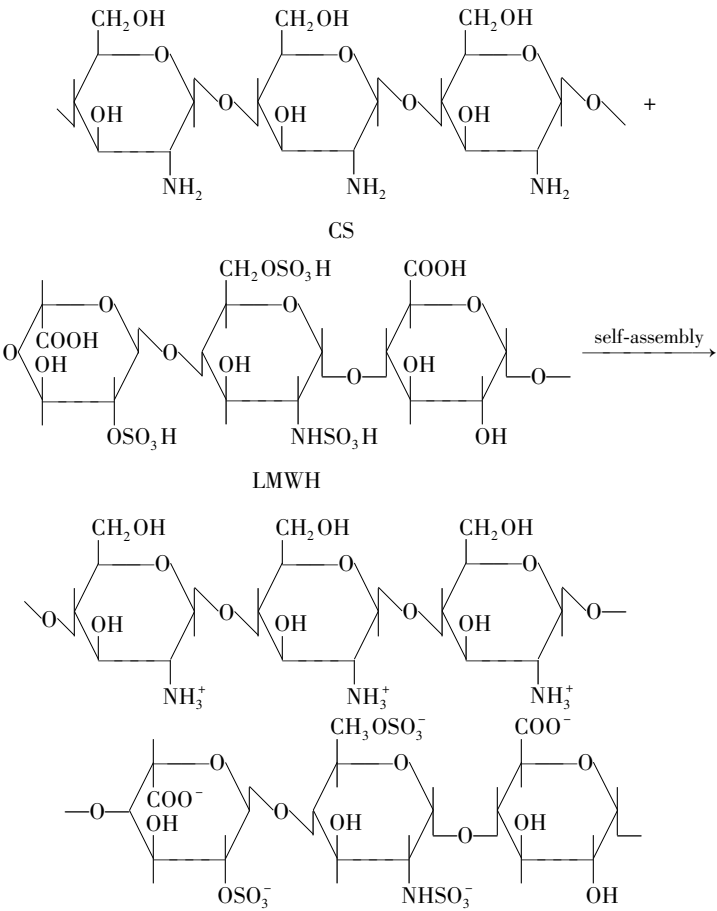
壳聚糖(CS)(浙江玉环县海洋生物化学有限公司),粘均分子量 $\overline{M}_\eta = 4.76 \times 10^5$,脱乙酰度91.18%;海藻酸钠(ALG,化学纯);低分子肝素(LMWH)(重庆道生生物化学有限公司);戊二醛(25%水溶液(生物化学试剂));其它试剂均为国产分析纯。

1.2 实验方法

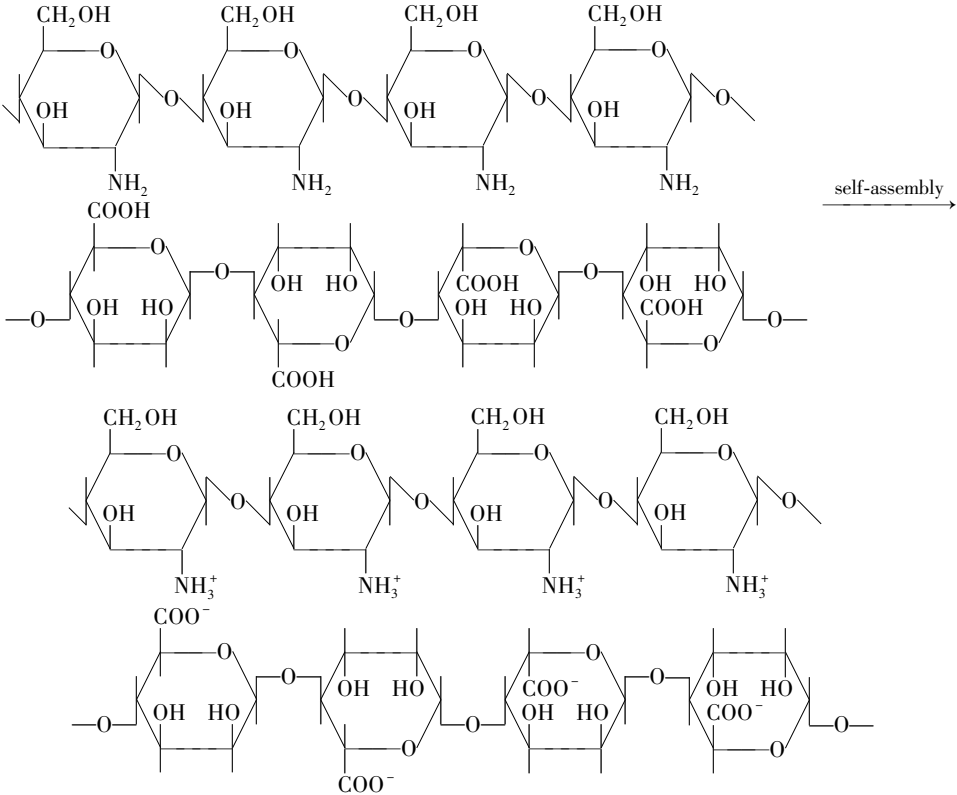
1.2.1 低分子肝素/壳聚糖/海藻酸钠(LMWH/CS/ALG)微囊的制备 微囊的制备过程见式1。LMWH与CS的自组装反应,CS与ALG的自组装反应以及戊二醛与CS的交联反应分别见式2、式3和式4。



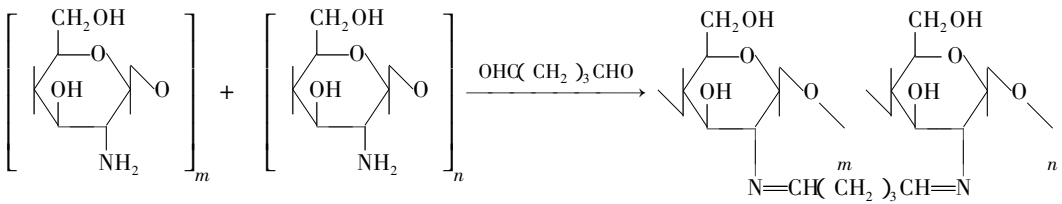
Scheme 1 The preparation process of the microcapsules



Scheme 2 The self-assembly of CS and LMWH



Scheme 3 The self-assembly of CS and ALG



Scheme 4 The cross-linking reaction of CS and glutaric dialdehyde

分别将 1.5、2.5 和 3.5 g CS 溶于 0.2 g/L 醋酸溶液中配制成质量浓度为 15、25 和 35 g/L 的 CS 醋酸溶液。

根据单因素及正交试验的结果采用乳化-化学交联法^[5]制备 LMWH/CS/ALG 微囊。按 $m(\text{LMWH}):m(\text{CS})$ 分别为 1:10、5:10 和 9:10 量取相应体积的质量分数为 30% 的 LMWH 水溶液加入含 15 g/L 的 span-80 和 5 g/L 的硬脂酸镁的真空泵油与石蜡油组成的混合油相中($V(\text{真空泵油}):V(\text{石蜡油})=1:1$), 在 40 ℃ 下通过高速机械搅拌分散成 W/O 乳液, 然后在 2 h 内分次缓慢滴加已配制好的 CS 醋酸溶液, 继续搅拌 1 h 后, 在 2 h 内分次缓慢滴加质量浓度分别为 5、8 和 12 g/L 的 ALG 水溶液, 继续搅拌 1 h, 然后按 $n(\text{CHO}):n(\text{葡萄糖残基})$ 分别为 2:1、1:1 和 1:2 加入相应量的戊二醛, 控制温度于 40 ℃ 反应 3 h 后停止搅拌, 离心分离, 汽油洗涤, 抽滤, 乙醇洗涤, 真空干燥。

1.2.2 微囊物理化学性能测试 粒径分布与形态用光学显微镜测量 500 个以上微球粒径并按下述公式(d_i 为单个微囊的粒径, n 是微囊的个数)计算平均粒径 d , DP 表示分散度^[6]。

$$d = \frac{\sum_{i=1}^n d_i}{n} \qquad \delta = \left[\frac{\sum_{i=1}^n (d_i - d)^2}{n - 1} \right]^{1/2} \qquad \text{DP} = \frac{\delta}{d}$$

称取一定量 LMWH 分别以去离子水、质量分数为 0.9% 的 NaCl 水溶液、磷酸氢钠-磷酸二氢钾缓冲溶液(pH = 7.4)和柠檬酸钠-盐酸缓冲溶液(pH = 3.95)为溶剂配制质量浓度为 0.3 ~ 0.78 mg/L 的标准溶液, 用紫外分光光度计在 232 nm 处测其吸光度, 拟合曲线得回归方程。

将载药微囊约 0.5 mL 装入 ϕ 8 mm 玻璃释放柱中, 用去离子水淋洗, 控制流量为 5 BV/h(BV 为倍床体积), 接收淋洗液, 每隔 9 h 取 5 mL 接受液, 测其紫外吸光度, 根据回归方程求出药物浓度。当接受液中的药物浓度低至无法测定时, 可认为药物已被完全洗出。累加各次接收液中药物含量, 按下述公式计算出微囊的含药量和包封率:

$$\text{载药量}(\%) = \frac{\text{微球中药物质量}}{\text{称取的微球质量}} \times 100\%$$
$$\text{包封率}(\%) = \frac{\text{药物含量}}{\text{投药分率}} \times 100\%$$

微囊中药物的体外释药实验: 准确称取载药微囊适量, 装入透析袋中, 紧密封口, 分别置于 50 mL 质量分数为 0.9% 的 NaCl 水溶液、磷酸氢钠-磷酸二氢钾缓冲溶液(pH = 7.4)和柠檬酸钠-盐酸缓冲溶液(pH = 3.95)释放介质中, 恒温(37 ± 0.5) ℃, 以 100 r/min 的速率振荡, 定时取 5 mL 释放介质, 测定其紫外吸光度, 同时补充等量释放液, 根据回归方程计算药物浓度, 并绘制累积释药率-时间曲线。

2 结果与讨论

2.1 粒径分布、包封率与形貌观察

经测量计算载药微囊的平均粒径为(6.9 ± 0.85) μm , 分散系数为 0.35, 药物包封率为 83.4% ~ 93.5%。在扫描电子显微镜下观察, 载药微囊为表面光滑的球状体(图 1)。

2.2 红外光谱分析

图 2 为 CS、ALG 与 CS/ALG 空白微球的红外光谱图。对比分析知, 在 CS/ALG 空白微球谱图中, 1 577 和 1 473 cm^{-1} 处出现了 $-\text{NH}_3^+$ 的特征峰, 而 CS 分子链段上的 $-\text{NH}_2$ 面内弯曲振动峰 1 604 cm^{-1} 消失; ALG 的 COO^- 对称伸缩振动峰由 1 615 cm^{-1} 向低波数移动了约 60 cm^{-1} , 表明 CS 与 ALG 发生了

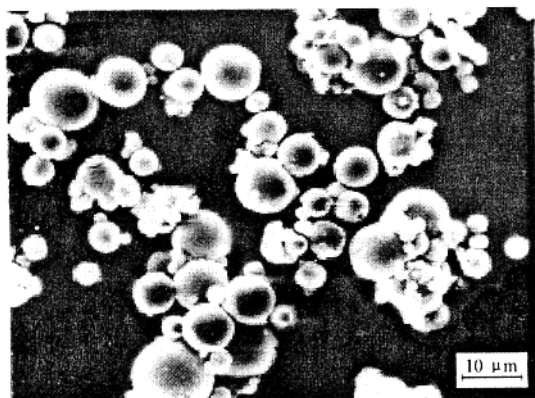


图1 LMWH/CS/ALG 微囊扫描电镜图

Fig. 1 SEM micrograph of LMWH/CS/ALG microcapsules

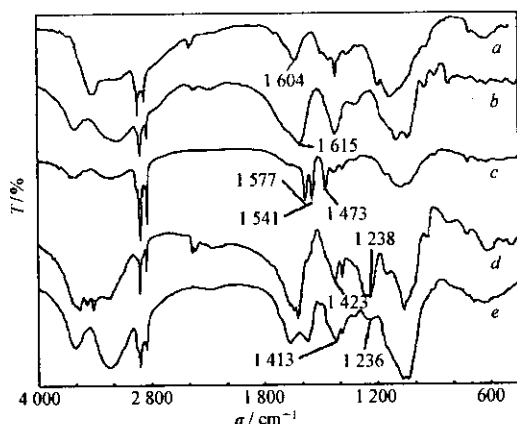


图2 LMWH/CS/ALG 微囊的红外光谱图

Fig. 2 IR spectra of (a) CS, (b) ALG, (c) CS/ALG, (d) LMWH and (e) LMWH/CS/ALG microcapsules

反应,形成了聚阴阳离子复合膜。载药球谱图上 LMWH 的 COO^- 对称伸缩振动峰由 1423 cm^{-1} 向低波数移动了约 10 cm^{-1} , $\text{R-SO}_2\text{-OH}$ 反对称伸缩振动在 1238 cm^{-1} 处的分裂峰红移至 1236 cm^{-1} , 且吸收强度大大减弱, 证明 LMWH 与 CS 以静电作用相结合。

2.3 对微囊释药性能的影响因素

以不含药的空白 CS/ALG 复合微囊在同样条件下测定(模拟)释放前后的质量变化。结果表明,微囊的质量减小率都不超过 1.9%, 在实验操作误差范围之内, 由此可证明, ALG 没有伴随释放现象。

2.3.1 CS 质量浓度 图 3 给出了以不同质量浓度 CS 醋酸溶液制备的载药微囊的药物静态释放曲线。图中可见, 随着 CS 浓度的提高, 微囊的释药速率减缓, 突释减弱。因为提高 CS 质量浓度, 增大了分子链堆积密度, 导致微囊表面复合膜增厚。初期突释可能是微囊干燥时, 药物向微囊表面迁移富集所引起^[7]。随着 CS 质量浓度的提高, CS 包覆层随之变得致密, 使药物随水分挥发而向外层迁移变得困难, 因而药物的突释现象变得不明显。

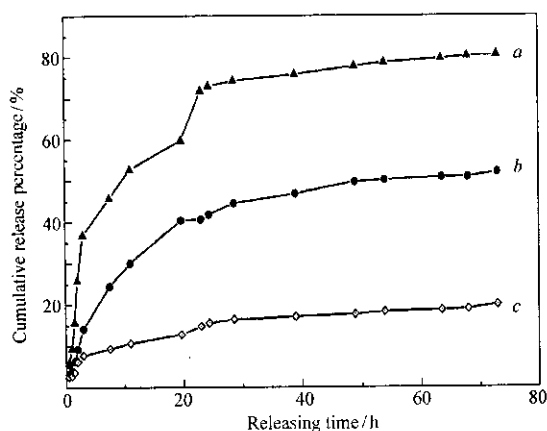


图3 不同浓度 CS 制备的 LMWH/CS/ALG 微囊释药曲线

Fig. 3 Drug-releasing curves of microcapsules with different mass concentrations of CS
(a) CS $(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$ 15; (b) 25; (c) 35

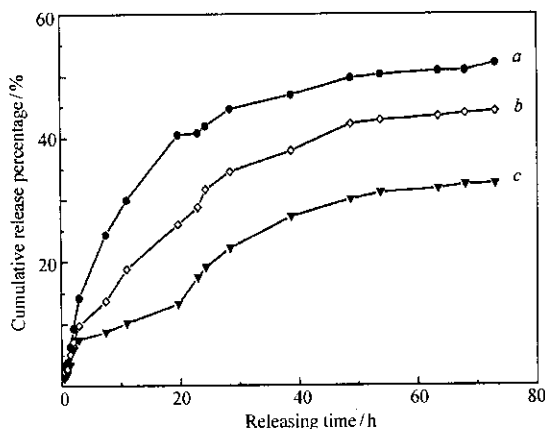


图4 不同浓度 ALG 制备的 LMWH/CS/ALG 微囊释药曲线

Fig. 4 Drug-releasing curves of microcapsules with different mass concentrations of ALG
(a) ALG $(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$ 5; (b) 8; (c) 12

2.3.2 ALG 质量浓度 如图 4 所示, 随 ALG 质量浓度的提高, 对药物初期突释的改善不如图 3 明显。这是因为制备微囊所用的 ALG 质量浓度的增幅小于 CS, CS 的阳离子特征使之与 LMWH 发生静电作用, 从而进一步延缓药物的释放。而 ALG 与 LMWH 均为阴离子聚合物, 不能发生类似作用, 故 ALG 浓

度的提高对释药速率的影响较 CS 为小。

2.3.3 交联剂用量及 LMWH 与 CS 的投料比 由图 5 比较分析可见 ,戊二醛的醛基与囊材的葡萄糖残基之比愈大 ,形成的交联网络密度愈大 ,对药物的包囊越紧密 ,同时减小囊材的溶胀度 ,使药物扩散的阻力增大。说明调节交联剂的用量使囊材充分交联 ,可使微囊的释药速率减缓。由图 6 可见 ,保持 LMWH 与 CS 的浓度不变 ,减少 LMWH 与 CS 的投料比 ,微囊药物释放速度降低。这是因为随着 CS 用量的提高 ,囊壁增厚。此外 ,也与 $m(\text{LMWH})$ 与 $m(\text{CS})$ 比值较高的微囊含药量较多有关。

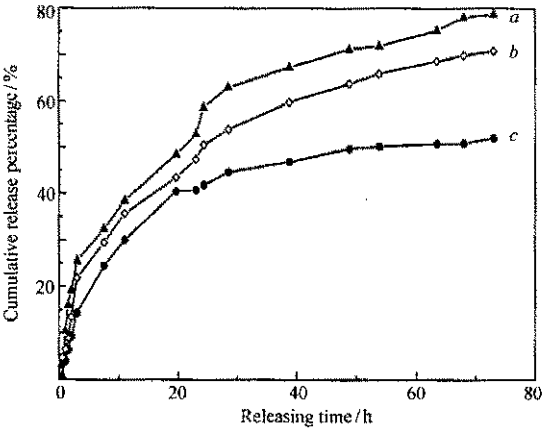


图 5 不同交联度的 LMWH/CS/ALG 微囊的释药曲线

Fig. 5 Drug-releasing curves of LMWH/CS/ALG microcapsules with different cross-linking degrees
 $n(\text{CHO}):n(\text{glucose residue})$ a. 1:2 ; b. 1:1 ; c. 2:1

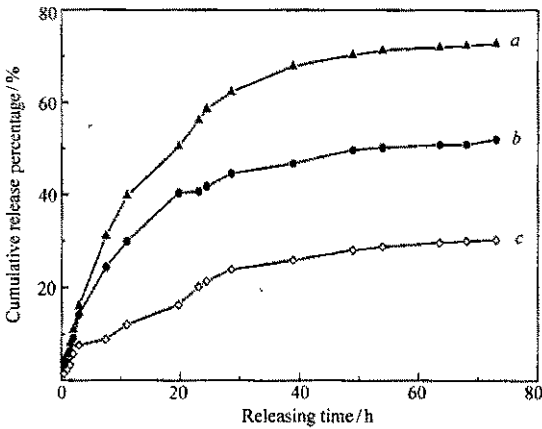


图 6 不同药载比的 LMWH/CS/ALG 微囊的释药曲线

Fig. 6 Drug-releasing curves of LMWH/CS/ALG microcapsules with different mass ratios of LMWH to CS
 $m(\text{LMWH}):m(\text{CS})$ a. 9:10 ; b. 5:10 ; c. 1:10

2.4.4 释放介质 pH 值 图 7 为微囊在不同 pH 值的介质中的释药曲线。由图可见 ,所制备的微囊在酸性或碱性介质中释药性能均良好 ,但具有 pH 依赖性 ,在酸性介质中释药速率较之在碱性介质中快。因为在酸性或碱性介质中 ,2 种囊材互为不溶性骨架。在酸性介质中 ,碱溶性的 ALG 为不溶性骨架 ,酸溶性的 CS 为可溶性凝胶 ;在碱性介质中则反之。药物通过溶解扩散及囊材溶蚀而释放。随着高分子在体内的降解 ,复合膜的结构逐渐变得疏松 ,使内含药物从中溶解和扩散的阻力减少 ,药物释放速率加快。当药物释放速率的加快恰好与含药量减少所引起的释药速率变慢一致时 ,药物的长期恒量释放得以实现 ,因而微囊在酸性和碱性条件下均显示出良好的释药性能。其 pH 依赖性的出现缘于作为内层的阳离子化合物 CS 与具阴离子本质的 LMWH 以静电作用紧密结合 ,酸性介质中 ,CS 的溶胀以及部分溶解大大削弱了它们之间的作用力而导致释药速率加快 ,此外 CS/ALG 聚电解质配合物的构象会随 pH 值变化 ,使复合膜的堆积密度产生 pH 依赖性^[8]。

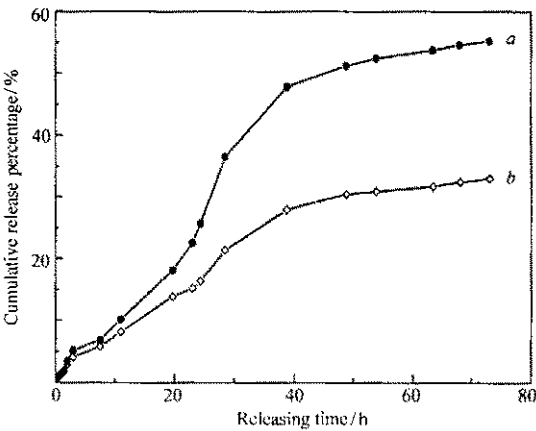


图 7 不同 pH 条件下微囊的释药曲线

Fig. 7 Drug-releasing curves of the microcapsule in different pH media
pH a. 3.95 ; b. 7.4

参 考 文 献

1 ZHANG Tian-Mir(张天民) ,CUI Hui-Wen(崔慧雯) ,WANG Feng-Shan(王凤山) ,et al. Chin J Pharm(中国医药工程杂志) J J ,1994 25(7) 301
2 ZHAI Guang-Xi(翟光喜) ,ZHAO Yan(赵焰) ,XIE Ning-Chang(谢宁昌) ,et al. J Chin Pharm Univ(中国药科大学学报) J J 2001 32(2) 98
3 ZHAI Guang-Xi(翟光喜) ,ZANG Heng-Chang(臧恒昌) ,YONG De-Qing(雍德卿) ,et al. J Shandong Univ(Hea Sci)

- (山东大学学报(医学版) [J] 2003 41(2) 200
- 4 ZHAI Guang-Xi(翟光喜) , ZANG Heng-Chang(臧恒昌) , DU Zhao-Xiang(杜兆香) , *et al.* *Chin Hosp Pharm J*(中国医院药学杂志 [J]) 2002 22(2) 78
- 5 HE Qiang-Fang(何强芳) , LI Guo-Ming(李国明) , WU Hai-Zher(巫海珍) , *et al.* *Chin J Appl Chem*(应用化学 [J]) , 2004 21(2) :192
- 6 LIU Li-Ping(刘丽萍) , LI Ping(李苹) , WU Ze-Zhi(吴泽志) , *et al.* *Chin Pharm J*(中国药学杂志 [J]) , 2003 , 38(10) 775
- 7 Calvo P , Remunan-lopez C , Vila-Jata J L , *et al.* *J Cell Physiol*[J] , 1992 152 422
- 8 LI Fang(李方) , ZHAO Feng(赵峰) , YIN Yu-Ji(尹玉姬) , *et al.* *Chem Bull*(化学通报 [J]) 2001 64(3) 130

Preparation of Low Molecular Weight Heparin/Chitosan/Alginate Microcapsules and Their Drug-release Performance

QIU Xiao-Lin , LI Guo-Ming* , YE Jun-Sheng

(Department of Chemistry , South China Normal University , Guangzhou 510631)

Abstract The microcapsular cores were prepared by dispersing low molecular weight heparin(LMWH) in emulsion , which were encapsulated with chitosan(CS) and then with alginate(ALG) by means of macromolecular self-assembly to form complex microcapsules with a multi-layer structure. The IR results indicated that there were strong electrostatic interactions between LMWH and CS and between CS and ALG. The SEM images showed the LMWH/CS/ALG microcapsules were spherical with an average diameter of $(6.9 \pm 0.85) \mu\text{m}$. The degree of encapsulation of the LMWH was as high as 93.5% . The results of the release kinetics experiments of the microcapsules show that the half-life of LMWH in the microcapsules reached 72 h. With the increase of the concentration of CS or ALG , the LMWH-releasing rate decreases ; the higher the mass ratio of LMWH to CS , the faster the drug-release rate of the microcapsules ; higher cross-linking degree results in a better drug-release performance ; and the drug releases slightly faster in acid media than in alkali ones.

Keywords chitosan , alginate , low molecular weight heparin , microcapsule , drug-release performance