

尺寸均一的壳聚糖微球的制备及其作为胰岛素控释载体的研究 Preparation of Uniform-sized Chitosan Microspheres and Application as Carriers for Protein Drugs

古永红^{1,2}, 王连艳², 谭天伟¹, 马光辉^{2*}

GU Yong-Hong^{1,2}, WANG Lian-Yan², TAN Tian-Wei¹ and MA Guang-Hui^{2*}

1 北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100029

2 中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室, 北京 100080

1 School of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China

2 State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China

摘 要 采用新型微孔膜乳化技术制备了载胰岛素的壳聚糖微球。研究表明,要制备粒径均一的壳聚糖微球,必须将亲水性膜修饰成疏水性;制得的微球粒径和所采用的膜孔径之间存在很好的线性关系,使得微球粒径可控;以胰岛素为模型药物,主要考察了交联剂用量和交联时间对微球表面形态、药物包埋率和微球体外释药特性的影响。结果表明当氨基与醛基的摩尔比为 1:0.7、交联时间为 1h 时,所得载药微球的包埋率最高,随着戊二醛用量的增加和交联时间的延长,药物体外释放速率减慢。

关键词 壳聚糖微球, 尺寸均一, 控制释放, 膜乳化, 胰岛素

中图分类号 R944.5 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)01-0150-06

Abstract Chitosan microsphere has been widely researched in controlled release of protein and peptide drug because of its excellent mucoadhesive and permeation enhancing effect across the biological surfaces. The control of the size and size distribution of microspheres is necessary in order to improve reproducibility, bioavailability, and repeatable release behavior. In this work, uniform-sized chitosan microspheres containing insulin were prepared by a novel membrane emulsification technique combined with glutaraldehyde crosslinking method. In order to prepare uniform-sized chitosan microspheres, it is necessary to modify hydrophilic membrane into hydrophobicity. It is found that there exists a linear relationship between the size of chitosan microspheres and pore size of the membrane used, so it is easy to control the size of microspheres by using membranes with different pore size. In this study, the effect of different amount of crosslinker and crosslinking time on microspheres' morphology, encapsulation efficiency (EE) and release profile of drug *in vitro* were investigated. It is shown that the morphology of microspheres is more smooth and spherical, and the release rate is slower with the increase of amount of glutaraldehyde and prolongation of crosslinking time. When the molar ratio of amino group of chitosan to aldehyde group of glutaraldehyde is 1:0.7, and crosslinking time is 1h, the highest EE was obtained (about 65%). Data obtained suggest that chitosan microspheres prepared by this new method would be a promising system for controlled release of protein drugs.

Key words chitosan microspheres, uniform-sized, controlled release, membrane emulsification, insulin

Received: August 26, 2005; Accepted: November 4, 2005.

This work was supported by the grant from the National 863 project (No.2002AA629040).

* Corresponding author. Tel:86-10-82627072; E-mail: ghma@home.ipe.ac.cn

国家高技术研究与发展计划项目资助(No.2002AA629040)。

随着生物技术的发展,蛋白质和多肽等具有生物活性的药物越来越多地用于疾病的预防和治疗当中,但这些具有生物活性药物单独用药存在很多缺陷,如它们在体内容易被酶类所降解,这将导致其在体内的生物利用度大大降低,而且这类药物在体内的循环半衰期较短,导致用药频繁,引起体内的血药浓度波动较大,严重的将引起毒副作用。因此将这些具有生物活性的药物制成缓释系统非常必要,许多缓释系统已经应用于蛋白质、多肽等活性药物的研究中,包括 PEG 化、与大分子物质偶联、脂质体、微囊、微球等。其中缓释微球是最有前景的方法之一。

目前许多可降解的聚合物被用于蛋白质、多肽药物的包埋,其中壳聚糖是应用最为广泛的天然可降解聚合物之一。壳聚糖是一种天然的、含有氨基的亲水性多糖,不仅具有生物降解性、无毒性、生物相容性和生物粘附性,而且还具有大多数聚合物所不具备的消炎作用和穿过生物膜表面的渗透促进效应^[1]。因此在近年来壳聚糖被广泛地应用于药物载体的研究中。

作为药物载体,壳聚糖多以微球的形式使用。目前壳聚糖微球的制备方法主要有乳化交联法^[2]、喷雾干燥法^[3]、乳化-溶剂蒸发法^[4]、单凝聚法和复凝聚法^[5,6]、过筛法^[7]等,这些方法中乳液制备大多采用机械搅拌法,所制备的乳液滴粒径很不均一,制备过程中小的乳滴易被大的乳滴融合,大的乳滴又会因剪切力的作用而破裂,从而不仅导致最终所制备的壳聚糖微球粒径很不均一,而且药物包埋率低。粒径不均一还会造成药物靶向性差、用药效果的重现性不好、药物的生物利用度低,同时由于粒径不均一,在临床上无法考察粒径与不同疾病及治疗效果之间的关系。为了克服传统方法的不足,本论文采用一种新型的微孔膜乳化技术^[8]制备了粒径均一的壳聚糖微球。该制备方法以氮气压为推动力,使含有药物的壳聚糖水溶液透过孔径均匀的微孔玻璃膜进入油相,从而获得极为均一的 W/O 乳液,然后加入交联剂交联制得粒径均一、尺寸可控的壳聚糖微球,制备过程中能耗低,条件温和,利于药物活性的保持和制备规模的放大。由于乳液和微球都很均一,克服了上述由于粒径不均一所带来的种种弊端。本文以胰岛素为模型药物,同时考察了交联剂用量及交联时间这两个主要因素对微球形态、药物包埋率和药物体外释放行为的影响。

1 材料与方 法

1.1 药品与试剂

实验所用的医用级壳聚糖购自福建莆田中盛伟业有限公司,其脱乙酰度为 89%,粘均分子量为 780 000,重组人胰岛素由北京甘李生物技术有限公司生产,25%的戊二醛水溶液由美国的 Sigma-Aldrich Inc. 公司提供,PO-500 乳化剂由日本的阪本药品工业株式会社生产,KP-18C 是由日本 Shin-Etsu 化学品公司生产,液体石蜡和石油醚由北京试剂公司生产,其它试剂均为分析纯。

1.2 仪器

研究中采用的 SPG 膜均购自日本的 SPG Technology Co.;微球形态的观察采用场发射扫描电子显微镜(JSM-6700F, JEOL, Japan);微球粒径分布的测定采用激光粒度仪(Coulter LS230, Coulter Co, USA);药物包埋率和体外药物累积释放量的测定采用紫外分光光度计(Ultrospec 2100 pro, Amersham, Sweden)。

1.3 微孔玻璃膜的修饰

根据经验,在膜乳化过程中分散相不得润湿膜孔。目前市场上商品化供应的此类微孔膜表面含有 Si-OH,是亲水性的,壳聚糖水溶液容易润湿膜孔,不适合制备粒径均一的 W/O 型壳聚糖乳滴,因此必须将亲水性的膜修饰成为疏水性膜。本试验采用的修饰方法的原理是使含有 18 个碳的硅烷偶联剂(KP-18C)在一定条件下与玻璃膜上的 Si-OH 基团发生反应,在膜表面接入长的碳链,从而使其具有疏水性。具体修饰工艺条件如下:首先,将干净的微孔膜在蒸馏水中超声 30min(超声强度 80Hz),然后将膜放入到含 3% (V/V) KP-18C 的水溶液中,并在 0.05 ~ 0.06MPa 下减压超声 2h,最后在 120 ~ 140 °C 下恒温反应 4h。冷却后取出置于膜乳化的油相中浸泡,用前再超声 30min。

1.4 微球的制备

壳聚糖微球采用一种新型的微孔玻璃膜乳化法结合戊二醛化学交联法制备。首先将一定量的壳聚糖(CS)溶于一定量的含有 0.9wt% NaCl 的 HAc-NaAc 缓冲液中(pH = 4.00),配成所需浓度的 CS 溶液,然后加入一定量的胰岛素,溶解后过滤去除不溶性杂质,滤液作为水相(分散相);以液体石蜡和石油醚按体积比 7:5 的混合物作为油相(连续相),油相中加入 4wt% 的 PO-500 作为油相乳化剂。取一定量的水相加入到膜乳化装置的特氟龙管中,在一定的

氮气压力下将水相通过均匀的膜孔压入到油相中得到粒径均一的 W/O 型乳液。乳化完成后向乳液中滴加一定量的戊二醛饱和的甲苯溶液 (GST) 于 300 r/min 进行交联, 交联剂的加入量按水相中壳聚糖所含氨基与 GST 中戊二醛所含有的醛基的摩尔比进行表征。交联一定时间后, 所得产品用离心机在 4000 r/min 下离心 5 min, 然后用石油醚洗涤离心 2 次, 再用蒸馏水抽滤后冷冻干燥制得成品微球。

1.5 微球的表征

1.5.1 微球表面形貌的观察: 取少量微球悬浮于蒸馏水中, 用吸管吸取少量此悬浮液滴在铝箔上, 使其在铝箔上均匀摊开, 自然晾干。剪下一小块粘有微球的铝箔纸用双面胶粘到样品台上, 将样品在真空条件下喷金处理后, 用扫描电子显微镜观察微球的表面形态。

1.5.2 粒径分布的测定: 取一定量的微球悬浮于一定体积的蒸馏水中, 采用超声使微球充分分散, 利用激光粒度仪进行微球粒径分布的测定。

1.5.3 包埋率的测定: 分别准确称量两份 5 mg 冻干空白微球和一份 5 mg 载胰岛素微球, 向其中一份空白微球中加入 2.5 mL 蒸馏水和 2.5 mL 2 mol/L 的 HCl 溶液 (含 1 mg/mL 的 NaNO_2) 并将其标记为“空白液”; 向另一份空白微球中加入 2.5 mL 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的胰岛素溶液和 2.5 mL 2 mol/L 的 HCl 溶液 (含 1 mg/mL 的 NaNO_2), 将其标记为“标准液”; 在载胰岛素微球中加入 2.5 mL 蒸馏水和 2.5 mL 2 mol/L 的 HCl 溶液 (含 1 mg/mL 的 NaNO_2) 并将其标记为“未知液”。将上述三份微球在 120 $^{\circ}\text{C}$ 下回流搅拌, 使微球完全降解, 以空白液做参比, 将空白液和标准液分别按一定体积混合后以 Lowry 法测定并制作标准曲线, 并以空白液做参比采用相同方法测定未知液吸光值。通过标准曲线计算未知液中胰岛素含量。

微球蛋白质药物包埋率 (EE) 按以下公式计算:

药物包埋率 (EE) = (实际测得的药物含量 / 所加药物完全被包埋在内时的理论药物量) \times 100%

1.5.4 体外释药特性研究: 分别准确称量 10 mg 冻干的空白微球和载胰岛素微球, 加入 3 mL PBS (pH 7.4) 缓冲液, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温振荡器上振摇 (120 r/min)。定期离心分离, 取出 0.5 mL 上清液, 同时补入 0.5 mL 新鲜 PBS 缓冲液。以 Lowry 法测定上清液中胰岛素含量, 根据上清液中胰岛素含量及微球中胰岛素总含量计算累积释放率。实验中探讨了壳聚糖微球的交联剂用量和交联时间两个主要因素对微球体外释药特性的影响。

2 结果与讨论

2.1 微孔膜的修饰

实验中分别采用了修饰前和修饰后的膜进行了壳聚糖微球的制备, 制备条件为: 壳聚糖浓度 1.5 wt%, 不加胰岛素, 水油相的体积比 1:10, 膜孔径 5.7 μm , 戊二醛用量为氨基与醛基摩尔比为 1:1, 交联时间为 1 h。所制得的微球电镜照片如图 1 所示。由图可以看出, 未经修饰的膜所制备的微球粒径很不均一, 而且, 由于较小微粒的比表面能高, 容易粘附在较大的微粒表面形成凝结核; 而修饰后由于膜具有疏水性, 由其所制备的微球粒径均一, 表面圆整光滑。

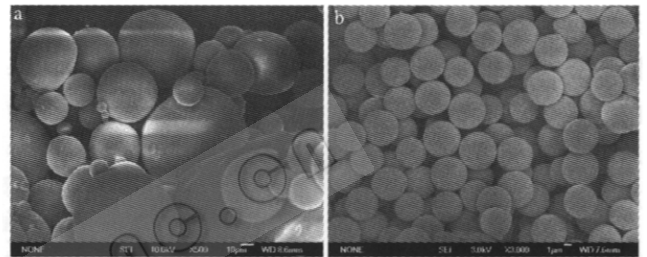


图 1 膜修饰前后所制备的壳聚糖微球的电镜照片

Fig. 1 SEM photographs of chitosan microspheres prepared by membrane emulsification technique

(a) before and (b) after modification of porous glass membrane.

2.2 微球粒径与膜孔径之间的关系

试验中采用不同孔径 (4.7 μm 、5.7 μm 、10.2 μm 、19.6 μm) 的膜制备了一系列粒径的壳聚糖微球, 制备条件如上节所述。微球的电镜照片如图 2 所示。将微球粒径对膜孔径作图, 发现粒径与膜孔径之间存在较好的线性关系, 如图 3 所示。因此可以通过选择适当孔径的膜制备出所需粒径的微球。试验结果表明, 微孔膜乳化法是制备尺寸均一、粒径可控的壳聚糖微球的较好方法。

2.3 交联剂用量和交联时间对微球形态的影响

实验中采用不同戊二醛用量 (氨基与醛基摩尔比 1:0.4、1:0.7、1:1) 制备了一系列的壳聚糖微球, 其中胰岛素用量为 500 μg 胰岛素/mL 水相, 其它条件与 3.1 中所述相同。图 4 所示为不同戊二醛用量下制备的微球的电镜照片。由图可以看出, 戊二醛用量较低时, 微球球形较差, 表面存在较多小突起。而随着戊二醛用量的增大, 微球逐渐变得光滑圆整, 尺寸也越来越均一。这主要是因为随着戊二醛用量的增加, 交联反应加强, 微球表面也就更致密光滑。

一系列不同交联时间 (20 min、40 min、60 min、80 min) 的微球在胰岛素用量为 500 μg 胰岛素/mL 水

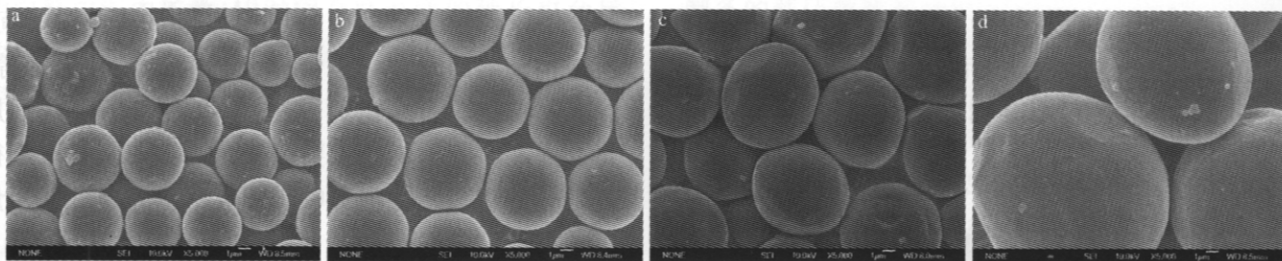


图2 不同膜孔径的SPG膜制备的壳聚糖微球的电镜照片:(a) 4.7μm; (b) 5.7μm; (c) 10.2μm; (d) 19.6μm

Fig. 2 SEM photographs of chitosan microspheres in dry state, prepared by the membrane with different pore sizes:
(a) 4.7μm; (b) 5.7μm; (c) 10.2μm; (d) 19.6μm

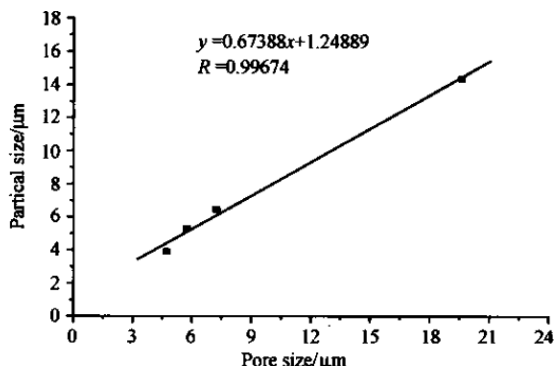


图3 壳聚糖微球粒径与膜孔径之间的关系

Fig. 3 Relationship between the size of chitosan microspheres and pore size of the membranes used

相、其它条件如3.1中所述制备。图5所示为不同交联时间的微球的电镜照片。由图上可以看出,随着交联时间的延长,微球也逐渐变得光滑圆整。戊

二醛用量和交联时间对微球形态具有相同趋势的影响。引起这种现象的原因可能是,当戊二醛用量较低,或交联时间较短时,交联度较低,微球表面结构比较疏松,在后续的离心洗涤和冷冻干燥的过程中微球容易变形。而戊二醛用量较高和交联时间较长时,微球结构紧密,制成成品后仍然圆整光滑。

2.4 交联剂用量和交联时间对包埋率的影响

实验中测定了上述制备的不同戊二醛用量和不同交联时间的微球的包埋率。结果如图6和图7所示,由图6可以看出,戊二醛用量对包埋率有较大的影响。在考察的范围内,随戊二醛用量增加,包埋率呈先升高后降低的趋势。当氨基:醛基=1:0.7时所得微球的包埋率最高,约65%。可能的原因是,戊二醛用量较低(1:0.4)时,形成的微球较为疏松,

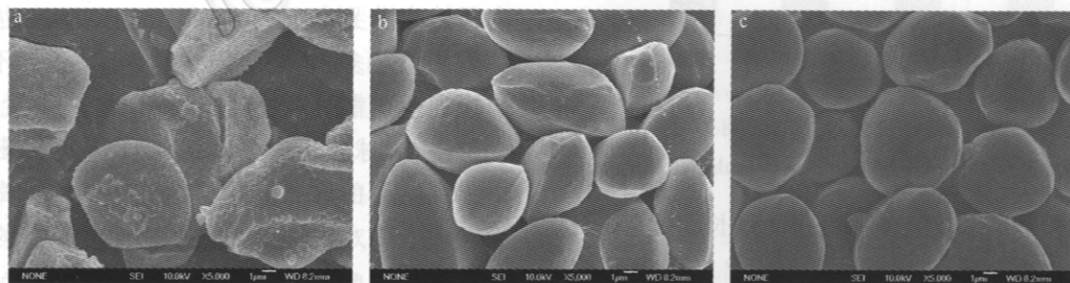


图4 不同戊二醛用量下制备的壳聚糖微球的电镜照片(氨基与醛基的摩尔比) (a) 1:0.4; (b) 1:0.7; (c) 1:1

Fig. 4 SEM photographs of chitosan microspheres with different amount of GST
(amino group: aldehyde group mol: mol) (a) 1:0.4; (b) 1:0.7; (c) 1:1

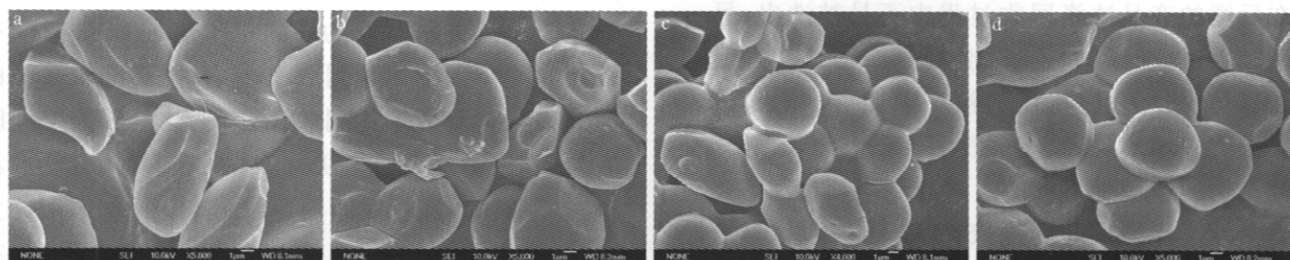


图5 不同交联时间下制备的壳聚糖微球的电镜照片 (a) 20min; (b) 40min; (c) 60min; (d) 80min

Fig. 5 SEM photographs of chitosan microspheres prepared with different crosslinking time
(a) 20min; (b) 40min; (c) 60min; (d) 80min

在微球后续洗涤处理过程中球内的药物易被洗出,导致包埋率较低;而戊二醛用量过大(1:1)时,乳滴在交联成微球的过程中会剧烈收缩,导致药物的泄漏,从而使包埋率下降。

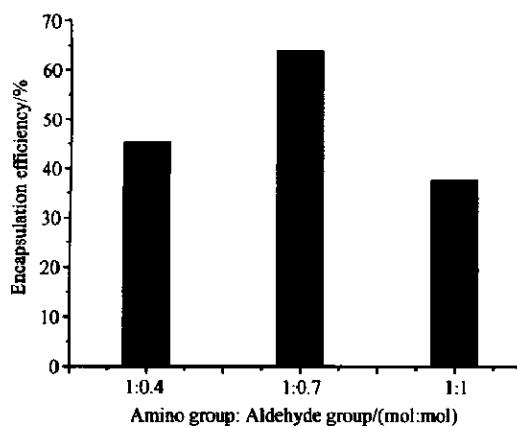


图6 戊二醛用量对包埋率的影响

Fig. 6 Effect of the amount of GST on the encapsulation efficiency

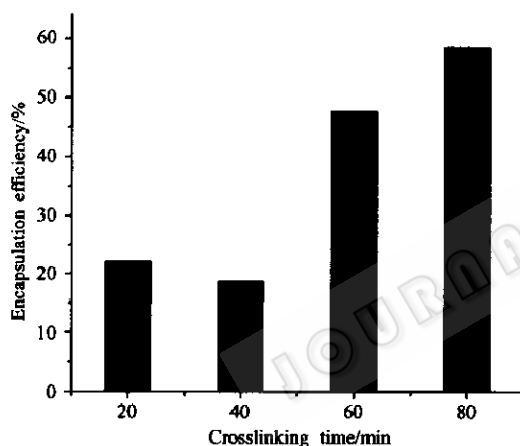


图7 交联时间对包埋率的影响

Fig. 7 Effect of crosslinking time on the encapsulation efficiency

由图7可以看出,随交联时间的延长,包埋率大体上呈上升趋势。这可能是因为,在戊二醛用量一定的情况下,戊二醛与壳聚糖上氨基之间所发生的希弗碱反应主要依赖于反应时间,随反应时间的延长,一方面微球表面交联得更致密,使球内包埋的药物在后续的产品洗涤回收过程中不易被洗出;另一方面随着反应时间的延长,会有更多的胰岛素上的氨基也与戊二醛反应,从而被交联到微球内部或表面。虽然包埋率提高,但药物活性损失也较多,这对活性药物的包埋是不利的。因此要得到包埋率高而药物活性又保持较好的壳聚糖微球,必须适当地控制戊二醛用量和交联反应的时间。

2.5 不同制备条件对体外释药特性的影响

影响壳聚糖微球体外释药特性的因素有很多,

如球形、微球粒径、载药量、交联剂用量、交联时间、所包埋药物的物理化学性质、释放液的pH值等等。结合我们试验所采用的方法,主要考察了交联剂用量和交联时间这两个主要因素对载胰岛素壳聚糖微球的体外释药特性的影响。图8所示为戊二醛用量

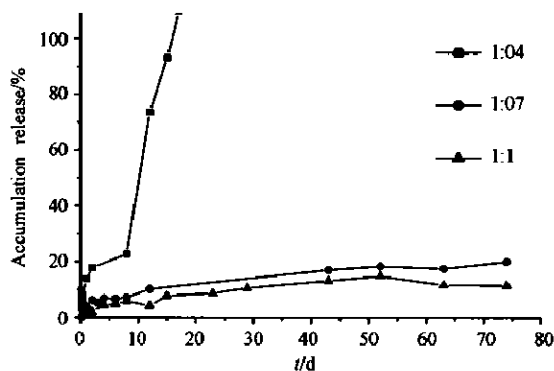


图8 不同戊二醛用量下制备壳聚糖微球胰岛素释放曲线

Fig. 8 Cumulative release profiles of insulin from microspheres prepared by various amount of GST

分别为1:0.4、1:0.7、1:1时制备的微球的释放曲线,由图上可以看出三者的突释都较小,不超过10%。随着戊二醛用量的增加,释放速率减慢。当用量为1:0.4时,释放率在第8d到第12d之间突然由22.72%增长到73.53%,这说明在这段时间里,微球表面的骨架结构已经破坏,导致大部分药物释放出来,其在17d左右药物就能完全释出。而戊二醛用量为1:0.7和1:1时,药物释放较为缓慢,74d内释放率分别仅为20%和11.5%。这也是由于戊二醛用量越多,微球表面交联越致密,越不利于球内药物通过扩散释放出来;同时戊二醛用量越大,交联度越高,微球越不容易降解,这也会导致药物释放缓慢;另外,高的戊二醛用量会使更多的胰岛素被交联到微球上而难以释放,这对于活性药物的包埋是不利的。图9所示为不用交联时间下制备的微球的体外释药曲线。由图可以看出,不同交联时间下制备的微球对胰岛素都有着较好的控制释放作用。随着交联时间的增长,释放速率和总的释放量均有较大的降低。当交联时间为20min和40min时,微球有较大的突释,24h内达到20%左右,随后能较平缓的释放,74d内释放率达到77%左右,这是因为交联时间较短时,微球表面交联的不够致密,球内药物容易通过扩散作用在短时间内释放出来。而交联时间为60min和80min的微球,则突释极小,释放平缓,在74d内的总释放率只有约10%。因为随着交联时间的增长,交联反应更充分,得到的微球表面更光滑紧密,不利于微球在释放液中的溶胀,从而阻止球内药

物向释放液中扩散;同时随交联时间的延长也会导致更多的胰岛素被交联到微球的内部或表面而难以释放,导致释放量的减少。

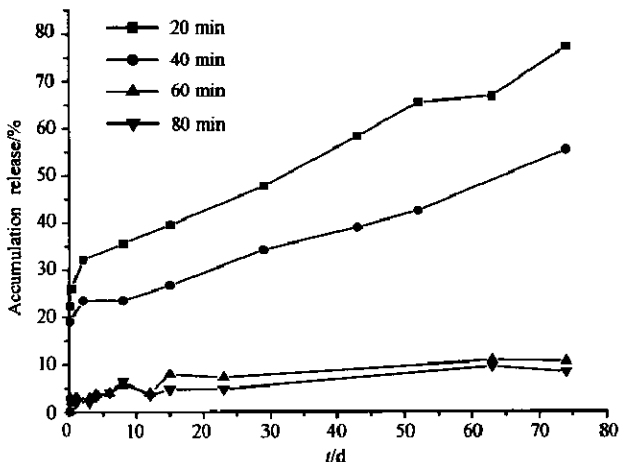


图9 不同交联时间下制备壳聚糖微球的胰岛素释放曲线

Fig. 9 Cumulative release profiles of insulin from microspheres prepared by various crosslinking times

3 结论

本文采用新型的膜乳化结合戊二醛化学交联法,以溶解了相应浓度壳聚糖和蛋白药物的 HAc-NaAc 缓冲液为水相,液体石蜡和石油醚按体积比 7:5 的混合物为油相,以 PO-500 (4wt%) 为油相乳化剂,制备出了尺寸均一、粒径可控的壳聚糖微球。

研究表明膜的亲、疏水性是能否制备粒径均一的壳聚糖微球的关键,只有当膜具有足够的疏水性时,水相才能与膜表面形成足够高的表面张力,得到尺寸均一的 W/O 型乳滴,进而制备得到粒径均一的壳聚糖微球。同时以胰岛素为模型蛋白、戊二醛饱和的甲苯溶液为交联剂,制备了载胰岛素微球并对其包埋率和体外控释行为进行了研究,研究结果表明,当戊二醛用量为氨基:醛基 = 1:0.7,交联时间为 1h 时,制得的微球包埋率最高,约为 65%。体外释放研究结果表明不同戊二醛用量和不同交联时间下

制备的载药微球都具有一定的缓释效果,戊二醛用量和交联时间对药物体外释放特性具有较大的影响。随戊二醛用量的增加,或随交联时间的延长,药物的释放速率均有所降低。通过改变戊二醛用量及交联时间,可以改变胰岛素的体外释放行为。因此,本论文为尺寸均一、粒径可控的壳聚糖载药微球的制备提供了一种可供借鉴的方法。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Thanou M, Verhoef JC, Junginger HE. Oral drug absorption enhancement by chitosan and its derivatives. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 52: 117 - 126
- [2] Mi Fwu-Long, Shyu Shin-Shing, Chen Chin-Ta *et al.* Porous chitosan microsphere for controlling the antigen release of Newcastle disease vaccine: preparation of antigen-adsorbed microsphere and in vitro release. *Biomaterials*, 1999, 20: 1603 - 1612
- [3] Filipović-Grčić J, Voinovich D, Moneghini M *et al.* Chitosan microspheres with hydrocortisone and hydrocortisone-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex. *Eur J Pharm Sci*, 2000, 9(4): 373 - 379
- [4] Perugini P, Genta I, Pavanetto F *et al.* Study on glycolic acid delivery by liposomes and microspheres. *Int J Pharm*, 2000, 196(1): 51 - 61
- [5] Pan Y, Li YJ, Zhao HY *et al.* Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin *in vivo*. *Int J Pharm*, 2002, 249(1-2): 139 - 147
- [6] Berger J, Reist M, Mayer JM *et al.* Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *Eur J Pharm and Biopharm*, 2004, 57(1): 19 - 34
- [7] Sunil A Agnibotri, Tejraj M Aminabhavi. Controlled release of clozapine through chitosan microparticles prepared by a novel method. *J Control Rel*, 2004, 96: 245 - 259
- [8] Wang Lianyan, Ma Guanghui, Su Zhiguo. Preparation of uniform sized chitosan microsphere by membrane emulsification technique and application as a carrier of protein drug. *J Control Rel*, 2005, 106(1-2): 62 - 75