

海藻酸钠-壳聚糖缓释微球的制备及性能*

王宏丽, 陈风雷, 陈 涛, 胡雪梅, 李 智, 辛 莹

(成都医学院 药学院, 四川 成都 610083)

摘要: 利用海藻酸钠 (SA) 聚阴离子及壳聚糖 (CS) 聚阳离子电解质的性质, 以顺铂 (DDP) 为模型药, 采用乳交联法制备海藻酸钠- DDP 缓释微球, 根据静电吸附原理合成 SA /DDP /CS 复合载药微球. 研究微球对药物分子的包载能力及释药特性. 结果显示, 制备的微球圆整, 载药微球表面致密且分散性好, 微球粒径在 11. 0~ 58. 8 μm 之间, 采用原子吸收分光光度计对载药微球的载药率、药物包封率和药物体外释放性质进行了测试和分析, 结果表明载药微球缓释效果明显, 减少了药物的投放量和投放次数, 降低了毒副作用.

关键词: 海藻酸钠; 壳聚糖; 顺铂; 缓释

中图分类号: O 629. 12 文献标识码: A 文章编号: 0258- 7971(2010) 04- 0469- 04

顺铂 (DDP) 属细胞周期非特异性药物, 可抑制细胞的 DNA 复制过程并损伤其细胞膜结构, 有较强的广谱抗癌作用^[1]. 但是 DDP 对人体正常细胞和癌细胞无选择性, 并有肾毒性、消化道反应和骨髓抑制等严重毒副作用, 使其应用受到限制^[2]. 同时 DDP 的抗癌活性不仅依赖于药物浓度的高低, 而且与暴露时间的长短有密切关系. 理想的剂型应是能将 DDP 选择性地输送到靶器官, 达到有效浓度并维持较长时间^[3-4], 因此对 DDP 控释的有关研究成为其抗癌应用研究的一个热点^[5-7]. 海藻酸钠 (SA) 是一种天然的具有生物活性、生物降解性的聚阴离子多糖^[8]. 壳聚糖 (CS) 是具有氨基的碱性多糖, 具有良好的生物降解性、生物相容性, 是一种无毒的聚阳离子电解质^[9]. 阴阳聚电解质可通过静电吸附形成沉淀^[10]. 因此, 本文利用乳交联法制备了海藻酸钠载顺铂的药物微球, 并在微球表面利用静电吸附技术制备 SA /DDP /CS 考察了缓释微球的形态、粒径、载药率、药物包封率和药物体外释放行为.

1 实验部分

1.1 仪器与药品 美国热电公司 M6 型原子吸收分光光度计; 中国丹东市百特仪器有限公司, BT-

9300H 型激光粒度分布仪; 美国 PE 公司的 Spectrum One 型傅里叶红外光谱仪; 日本日立 (HITACHI) S530 型扫描电镜. 海藻酸钠: 医用级, 青岛晶岩生物制品有限公司; 壳聚糖: 脱乙酰度 90%, 医用级, 济南海得贝生物工程有限公司生产; DDP 原料药, 购自 Sigma 公司; 其他试剂均为分析纯.

1.2 SA /DDP 药物微球的制备 取液体石蜡, 加 Span- 8Q Tween- 80 于三颈瓶中 40 °C 水浴, 高速乳匀 10 min, 加入含有顺铂的 4% (w) 海藻酸钠作为水相, 搅拌 30 min 逐滴加入氯化钙溶液后继续乳匀 3 h 用石油醚和异丙醇充分洗涤, 离心分离, 40 °C 干燥即得载顺铂海藻酸钠微球粉末. 制备过程如图 1 所示. 将上述制得的 SA /DDP 微球与一定浓度的壳聚糖溶液孵育 30 min 后离心, 收集微球, 用同样浓度的壳聚糖溶液清洗 1 次, 再用水洗涤 2 次后 40 °C 干燥, 即得 SA /DDP /CS 复合微球.

1.3 测试 采用美国 PE 公司的 Spectrum One 型傅里叶红外光谱仪测试壳聚糖微球样品的红外光谱 (IR), 以此为基础对海藻酸钠、壳聚糖静电吸附机理进行分析; 用日本日立 (HITACHI) S530 型扫描电镜 (SEM) 对载顺铂微球进行形貌和粒度观察, 用 BT- 9300H 型激光粒度分布仪测试载药样品的粒度分布. 利用美国热电公司 M6 型原子吸收分光

* 收稿日期: 2009- 11- 25

基金项目: 成都医学院研究基金资助项目 (NO. 08Z030).

作者简介: 王宏丽 (1975-), 女, 黑龙江人, 讲师, 博士生, 主要从事医用材料方面的研究.

光度计测试载顺铂复合微球的载药率和药物包封率。

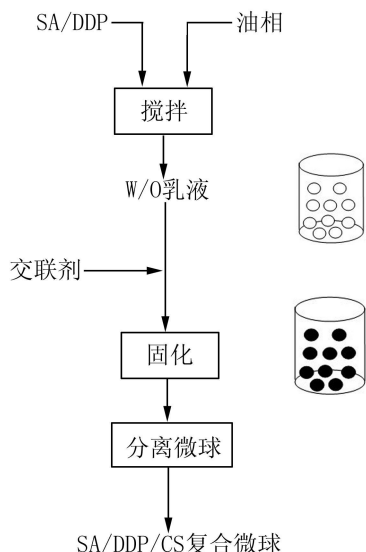


图 1 乳化交联法制备 SA/DDP 微球示意图

Fig 1 Schematic representation of preparation of SA/DDP microspheres by emulsion cross-linking method

分别取平行样品 3 个, 精确称量载药微球 10 mg 用 $w = 65\%$ 浓硝酸 2 mL 加热 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 至完全溶解, 定容至 100 mL, 用原子吸收分光光度计测试 SA/DDP/CS 复合微球中 Pt^{2+} 含量, 计算出 DDP 含量, 参照 2005 年版《中华人民共和国药典》规定^[11], 根据 (1), (2) 式计算 SA/DDP/CS 载药微球的载药率和包封率:

$$\text{载药率} = (\text{微球内药量} / \text{微球总质量}) \times 100\%, \quad (1)$$

$$\text{药物包封率} = (\text{微球内药量} / \text{加入的总药量}) \times 100\%. \quad (2)$$

1.4 载药微球药物体外释放性质 考察复合微球中所载药物顺铂在 pH 值为 7.4 的 PBS 介质中的释放性能. 各取平行样品 3 个, 精确称取载药复合微球 10 mg 装入 12.5 mm 透析袋中, 将透析袋两头扎牢使微球不外漏, 置于装有 pH 值为 7.4 的 20 mL PBS 缓冲溶液的试管中, 盖好盖子. $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴恒温振荡, 定时取出 PBS 并换入等量新鲜的 PBS, 用原子吸收分光光度计测定取出的溶液中 Pt^{2+} 浓度, 计算出 DDP 含量, 并绘制累积释药量-时间曲线.

2 结果与讨论

2.1 红外光谱分析 用红外光谱仪对 DDP, CS, SA 微球及载药微球 (SA/DDP/CS) 进行分析.

图 2 为顺铂、壳聚糖、海藻酸钠微球、SA/DDP/CS 自组装载药微球的红外谱图. 在 CS 的红外光谱 (图 2 (b)) 中, 3440 cm^{-1} 处宽峰是 $-\text{OH}$ 伸缩振动吸收峰与 $-\text{NH}$ 伸缩振动吸收峰重叠而增宽的多重吸收峰; 1629 cm^{-1} 处为 $-\text{NH}_2$ 的对称弯曲振动吸收峰; 1421 cm^{-1} 处吸收峰是 $-\text{CH}_2$ 的变形吸收峰. 图 2 (c) 是 SA 微球的红外光谱, 1615 cm^{-1} 是羰基的特征吸收峰; (a) 为顺铂的红外光谱, $1307, 801\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰为顺铂的特征峰; (d) 为包 1 层壳聚糖的载药微球的红外谱图, 1562 cm^{-1} 出现了一 $-\text{NH}_3^+$ 的反对称变形振动吸收峰, 由原来壳聚糖中 $-\text{NH}_2$ 的弯曲振动吸收峰 1629 cm^{-1} 向低波数移动 67 cm^{-1} , SA 的羰基对称伸缩振动峰在 1631 cm^{-1} , 由原来的 1615 cm^{-1} 向高波数移动 16 cm^{-1} , 证明了海藻酸钠的 $-\text{COO}^-$ 与壳聚糖的一 $-\text{NH}_2$ 通过静电作用形成了聚阴阳离子复合物, 静电吸附过程如图 3 所示.

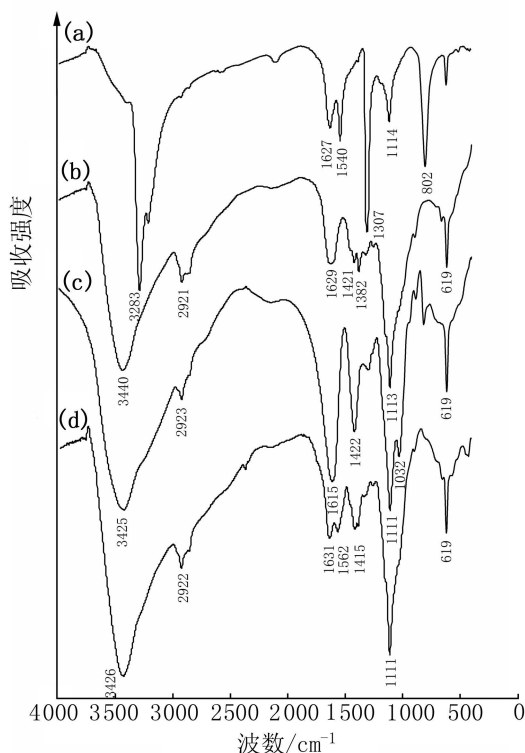


图 2 顺铂 (a)、壳聚糖 (b)、海藻酸钠微球 (c)、SA/DDP/CS 自组装载药微球 (d) 的红外光谱图

Fig 2 IR spectra of DDP (a), CS (b), SA microspheres (c), SA/DDP/CS microspheres (d)

2.2 自组装微球的形貌和粒度分布 以顺铂为模型药物, 采用乳化法得到的海藻酸钠载药微球, 其扫

描电镜形貌如图 4 (a) 所示. 图 4 (a) 表明, 实验所得海藻酸钠载药微球的球形度较好, 微球球径大多在 10~50 μm 之间, 分散性较好. 自组后的装载药微球形貌如图 4 (b) 所示, 球径较未组装前变化不明显, 但有少量微球之间有粘连现象, 这可能是静电吸附以及干燥过程中分子间团聚形成的结晶形貌.

载药微球样品的激光粒度分布如图 5 所示. SA / DDP 微球图 5 (a) 的中粒径 D_{50} 为 21.0 μm, 大部分分布在 6.5~46.5 μm ($D_{10} \sim D_{90}$) 范围内; SA / DDP / CS 复合微球的激光粒度分布如图 5 (b), D_{50} 为 31.7 μm, 大部分分布在 11.0~58.8 μm ($D_{10} \sim D_{90}$) 范围内, 粒径较 SA / DDP 载药微球略有增大.

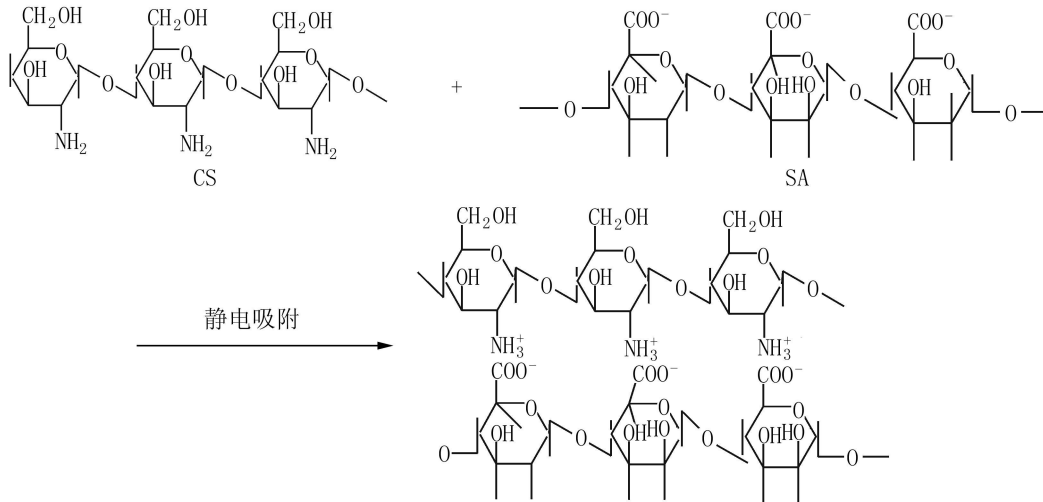


图 3 SA 和 CS 静电吸附示意图

Fig 3 The electrostatic absorption effect of SA and CS

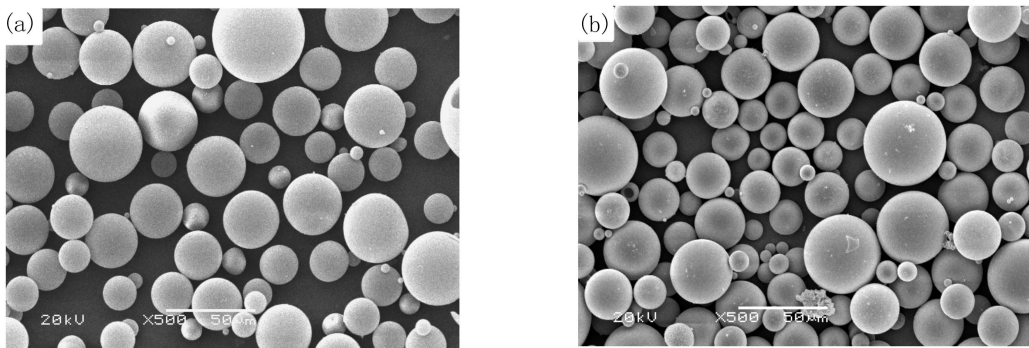


图 4 SA/DDP 微球 (a)、SA/DDP/CS 自组装载药微球 (b) 的 SEM 照片

Fig 4 SEM images of drug banded SA/DDP microspheres (a), SA/DDP/CS (b)

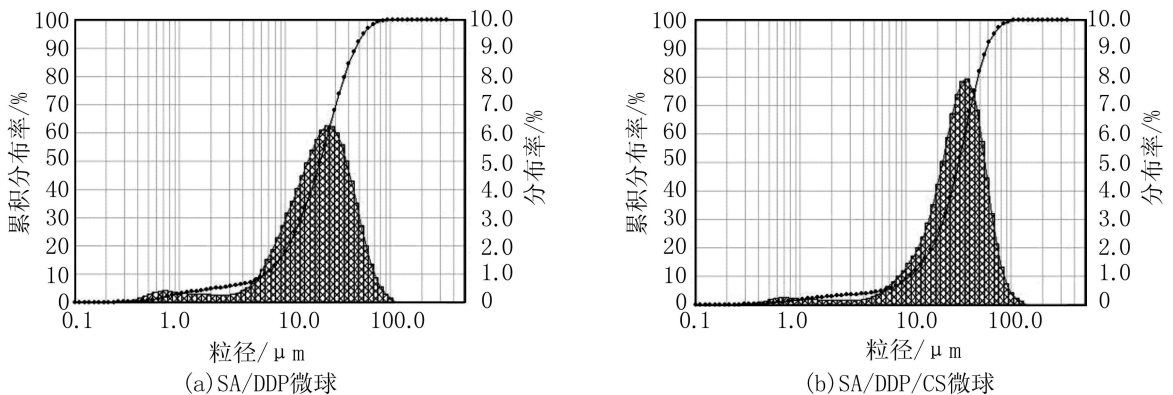


图 5 SA / DDP (a) 和 SA / CS / DDP (b) 微球的激光粒度分布图

Fig 5 Laser particle-size distributing graphs of (a) SA / DDP microspheres, SA / CS / DDP composite microspheres (b)

2.3 载药率和药物包封率 表 1 是 SA/DDP, SA/DDP/CS 复合微球的载药率和药物包封率数据列表。从表中数据可以看出, SA/DDP, SA/DDP/CS 复合微球的载药率分别为 21.32%, 19.93%, 药物包封率分别为 82.67%, 77.28%, 表明包覆 CS 层后, 载药量下降。这可能是在静电吸附过程中离心、水洗及转移损失一定的药物。总体数据和未组装前的 SA 微球载药量 (21.32%) 比较, 下降不大, 较理想。

表 1 复合微球的载药率和药物包封率

Tab 1 Contents of DDP loading ratio and encapsulation efficiency of composite microspheres (mean \pm SD, $n = 3$)

载药微球	理论载药率 /%	载药率 /%	药物包封率 /%
SA/DDP	25.79	21.32 \pm 1.45	82.67 \pm 1.86
SA/DDP/CS	25.79	19.93 \pm 1.62	77.28 \pm 2.42

2.4 载药微球的体外药物释放实验 图 6 是 DDP, SA/DDP 和 SA/DDP/CS 在 pH 值为 7.4 的 PBS 中的体外释放曲线图。由图可知 DDP 的溶解速度快, 在 1h 时有约 92% 的 DDP 通过透析袋溶解在 PBS 溶液中, 3h 后溶液中 DDP 含量基本无变化。SA/DDP 和 SA/DDP/CS 的累积释放量达到 50% 的时间分别约为 17h 和 22h。在 24h 内 2 种微球中 DDP 的释放量均较高, 其累积释放量分别为 65% 和 57%。24h 后 2 种微球的 DDP 释放量明显减少, 到 48h 时 2 种微球的累积释放量分别为 83% 和 73%, 经过静电吸附后, 载药微球的释放速率与未包覆 CS 的微球比较, 累积释放量下降较大, 释放平稳, 初期暴释现象有所减少。CS 使得微球厚度增加, 微球的表面细孔部分关闭, 导致多层膜渗透性下降, 减缓了药物分子的释放速率, 从而有效延长释放时间。

3 结论

以 SA 和 CS 为复合载体, 顺铂为模型药制备出以 SA 为内层, CS 为外层的载药 SA/DDP/CS 复合微粒, 粒径分析和 SEM 形态观察结果表明复合微球的直径较 SA/DDP 微球略有增加, 球型规整, 分散性好, 载药率和包封率较 SA/DDP 微球低, 体外药物释放时间明显延长, 具有良好的缓释效果, 减少了药物的投放量和投放次数, 降低了毒副作用。

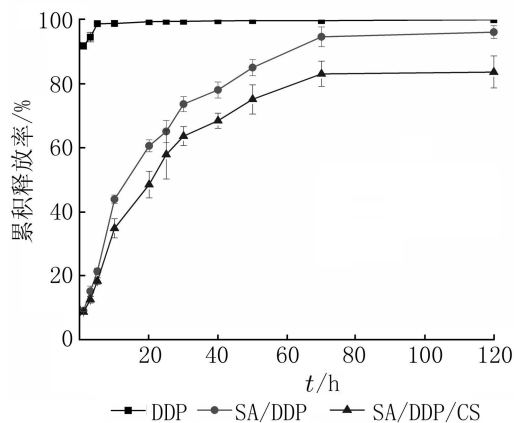


图 6 样品的体外 DDP 释放曲线

Fig 6 In vitro DDP release curves of samples (mean \pm SD, $n = 3$)

参考文献:

- [1] ROSE P G, BUNDY B N, WATKINS E B, et al Concurrent cisplatin-based radiotherapy and chemotherapy for locally advanced cervical cancer [J]. The New England Journal of Medicine, 1999, 340(15): 1144-1153.
- [2] YAN X, GEMENHART R A. Cisplatin delivery from poly(acrylic acid-co-methyl methacrylate) microparticles [J]. Journal of Controlled Release, 2005, 106(1/2): 198-208.
- [3] 揭志军. 抗癌药顺铂缓释制剂的研究进展 [J]. 国外医学: 肿瘤学分册, 1997, 24(6): 338-341.
- [4] KESKAR V, MOHANTY P S, GEMENHART E J et al Cervical cancer treatment with a locally insertable controlled release delivery system [J]. Journal of Controlled Release, 2006, 115(3): 280-288.
- [5] FUJIYAMA J, NAKASE Y, OSAKI K, et al Cisplatin incorporated microspheres development and fundamental studies for its clinical application [J]. Journal of Controlled Release, 2003, 89(3): 397-408.
- [6] HWANG T L, LEE W R, HUA S C, et al Cisplatin encapsulated in phosphatidylethanolamine liposomes enhances the in vitro cytotoxicity and in vivo intratumor drug accumulation against melanomas [J]. Journal of Dermatological Science, 2007, 46(1): 11-20.
- [7] KONISHI M, TABATA Y, KARIYA M, et al In vivo anti-tumor effect of dual release of cisplatin and adriamycin from biodegradable gelatin hydrogel [J]. Journal of Controlled Release, 2005, 103(1): 7-19.
- [8] 仲静洁, 王东凯, 张翠霞, 等. 海藻酸钠在药物制剂中的研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2007, 16(8): 591-594.

A study on the insect-resistant mechanism of *ChIFN* - γ transgenic tobacco

WU Yong-jun^{1,2,3}, ZHAO De-gang^{1,2}, ZHAN Shou-nian¹, LI Ya-zhong¹

(1. College of Life Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025, China

2. Guizhou Key Laboratory of Agro-Bioengineering

College of Life Sciences, South Campus of Guizhou University, Guiyang 550025, China

3. Key Laboratory of Green Pesticide and Agro-Bioengineering, Ministry of Education, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract To study the insect-resistant mechanism of transgenic *ChIFN* - γ tobacco, the protease activity of tobacco budworm after feeding on fresh tobacco leaves, tobacco volatile components, and the epidermal trichome density were investigated in the current case. The results showed that insects had a smaller quantity of transgenic tobacco leaves, which may result in less body endocrine protease and lower activity. Compared with the wild type (WT, control), the T₀ and T₁ generation of transgenic tobacco demonstrated an obviously higher contents of Duvatrienol and 4, 8, 13-Duvatriene-1, 3-diol. The density of trichome in transgenic tobacco leaves was 49.2% higher than WT. It possibly happened when some transcription factors were activated by *ChIFN* - γ and bind the cis-regulatory elements of trichome development-related genes, increased the expression of the trichome-related genes, consequently led to the secretion of terpenoid, which may be ascribed to the main mechanisms of the transgenic *ChIFN* - γ gene tobaccos.

Key words chicken interferon gamma, transgenic tobacco leaves, trichome, terpenoid, insect-resistant mechanism

* * * * *

(上接第 472 页)

- [9] MARGUERITE R. Chitin and chitosan properties and applications [J]. *Chem Inform*, 2007, 38(27): 603-632
- [10] DECHER G, HONG J D. Makromol Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly Process I consecutive adsorption of anionic and cationic kipoles amphiphiles [J]. *Makromol Chem Macromol Symp* 1991, 46: 321-327.
- [11] 中华人民共和国药典 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005.

Preparation and property of alginate/chitosan microspheres for controlled releasing

WANG Hong-li, CHEN Feng-lei, CHEN Tao, HU Xue-mei, LI Zhijun, XN Ying

(School of Pharmacology, Chengdu Medical College, Chengdu 610083, China)

Abstract Alginate (SA) and Chitosan (CS) were anion and cation polyelectrolyte, respectively. Using cis-Diamminedichloroplatinum (DDP) as the model drug, microspheres baded with DDP were prepared by crosslinking-emulsion method. Electrostatic absorption technique was used to prepare DDP microspheres coated with CS. The drug loaded in SA/CS/DDP microspheres was observed by SEM, and the results indicated that these microspheres showed dense surface and excellent sphere-forming ability, and the sizes of microspheres are in the range of 11.0—58.8 μ m. In addition, the drug loading ratio and efficiency as well as drug releasing curves were also investigated in vitro, and the results showed that SA/DDP/CS microspheres displayed an excellent drug controlled releasing.

Key words alginate, chitosan, cis-diamminedichloroplatinum, controlled release