

文章编号:1673-1689(2009)02-0214-05

## “类乒乓球”状壳聚糖微球的制备及其缓释性能的研究

王珊<sup>1</sup>, 黄怡<sup>1</sup>, 叶光辉<sup>2</sup>, 郭金婵<sup>1</sup>

(1. 咸阳师范学院 化学系, 咸阳 712000; 2. 中国长庆油田勘探局钻井工程总公司, 西安 710021)

**摘要:**以液体石蜡作为有机分散介质,采用反相悬浮交联法制备出具有“类乒乓球”结构且粒径近单分散的壳聚糖微球。对产物的形貌及结构进行了初步表征。在模拟肠液的条件系统研究了壳聚糖微球承载和缓释牛血清白蛋白(BSA)的情况。结果表明,药物的负载效率与初始 BSA 浓度没有确定的线性关系,但随着初始 BSA 浓度的增加,吸附量增加;且在释药过程中,不同包药效率对承载有 BSA 的壳聚糖微球的释放性能影响不大;在模拟肠液条件下,壳聚糖微球吸附 BSA 的量与 BSA 溶液的 pH 值密切相关,实验发现 pH=5 时,壳聚糖微球吸附 BSA 的量最大。

**关键词:**壳聚糖微球;缓释;牛血清白蛋白

**中图分类号:**O 636.1

**文献标识码:**A

## The Preparation of Chitosan Microsphere and the Controlled Release of BSA

WANG Shan<sup>1</sup>, HUANG Yi<sup>1</sup>, YE Guang-hui<sup>2</sup>, GUO Jin-chan<sup>1</sup>

(1. The Chemistry Department of Xianyang Normal College, Xianyang 712000, China; 2. CNPC Changqing Petroleum, Xi'an 710021, China)

**Abstract:** The chitosan microgel was prepared with an inverse emulsion cross-link methods. During the preparation, Paraffin oil was used as a continuous phase. The structural and morphological studies of the microspheres were carried out with SEM and FTIR techniques. Combination of the ultrasonic treatment and SEM observation reveals the hollow structure nature of the microgels. Based on the special structure of the chitosan microgels, the adsorption of BSA (Bovine serum albumin) on the microgels and the controlled release of the protein were studied in detail. It was found that ① the percent of protein adsorbed does not depend linearly upon the initial concentration of the protein, but the adsorbed amount was increase along with increasing the initial concentration of the protein; ② the amount of protein adsorbed on the microgels has little effect on the releasing characteristics; ③ the amount of protein adsorbed is pH dependent.

**Key words:** chitosan microgel, the controlled release, bovine serum albumin

收稿日期:2008-01-08

基金项目:陕西省教育厅专项科研计划资助项目(07JK426);咸阳师范学院专项基金项目(04XSYK206)。

作者简介:王珊(1977-),女,陕西周至人,物理化学博士研究生,讲师,主要从事高分子合成研究。

Email:shanwang2005@163.com

随着生物技术的发展,用生物技术开发的多肽、蛋白质类生物大分子药物不断涌现,这些药物为疾病的预防及治疗提供了广阔的应用前景,但此类药物在体内极易降解,半衰期短,必须频繁给药,这给治疗带来诸多不便<sup>[1]</sup>。控制释放<sup>[2]</sup>是将药物或其他基质(一般为高分子材料)结合在一起,使药物通过扩散等方式在一定时间内,以某一速率释放到环境中的技术。这种方法能够有效地控制释放技术能控制药物浓度在一定的范围中,药物利用率可达到80%~90%,而常规使用药物的利用率仅能达到40%~60%。壳聚糖是自然界中存在的碱性多糖,它由蟹、虾壳中的甲壳素经脱乙酰化反应而得,由于其良好的粘合性、生物可降解性、生物相容性和无毒性而被广泛应用在医学、食品、化工、生物过程和环境监测等方面<sup>[3-4]</sup>。而且壳聚糖可与体内外各组织相互作用,在酶学、细胞学、分子生物学、免疫学等方面有重大作用。目前蛋白质在给药系统中有着重要的用途,口服给药是一种解决蛋白质给药的一种理想途径。但胃液的酸性往往会使蛋白质很快变性和降解,而用高分子微球或微胶囊包合蛋白质则可延缓释放<sup>[5-6]</sup>。Ibrahim El-Gibaly<sup>[7]</sup>用海藻酸钠作为阴离子交联剂制备出毫米级空心壳聚糖微球,并用其作为载体,研究了其在模拟胃肠液中载药和缓释的情况,发现其可以作为一种新型的口服制剂。浙江大学的朱康杰<sup>[8-9]</sup>等人采用乳化法制备了可注射的壳聚糖-海藻酸钠微囊用于缓释多肽蛋白药物,其缓释时间可持续几小时甚至长达半个月。将壳聚糖微球作为一种新型药用辅料,用于缓释给药的研究已经引起广泛关注<sup>[10-13]</sup>。

作者通过反相悬浮交联法制备出一种具有“类乒乓球”结构且粒径近单分散的新型微米级空心壳聚糖微球,初步研究了其承载并缓释牛血清白蛋白的性能。由于此种微球粒径小、具有空心结构,而且壳聚糖本身又无毒副作用,因此是一种理想的缓释材料。

## 1 材料与方 法

### 1.1 原料及所用仪器

壳聚糖:CS, Aldrich 公司产品;牛血清白蛋白:BSA, TBD 生物技术发展中心提供;液体石蜡:分析纯,天津市科密欧科技有限公司产品;石油醚:中国人民解放军第9066厂产品;其它试剂均为分析纯。

Nicolet NEXUS 670 FTIR,用于测定壳聚糖及壳聚糖空心球的结构;Philip XL-20 扫描电镜,用于

观察微球的形貌;Model EGR 9600 功率超声仪,UV-VIS 测量仪(TU-1901)用于测定微球中包覆的牛血清白蛋白及缓释的牛血清白蛋白的量;2400CHN 元素分析仪,用于检测壳聚糖微球中氨基交联度。

### 1.2 壳聚糖微球的制备

将0.5 g的壳聚糖(CS)溶解在盛有10 mL质量分数为2%的醋酸溶液中,约10 min后,真空抽气1 h,再加入50 mL液体石蜡,适量质量分数为1%的聚乙烯醇,以SPAN-20为表面活性剂,控制反应温度50℃,保持一定的搅拌速度,通氮气保护,反应1 h,待CS充分分散,加入一定量体积分数为3.7%的甲醛溶液进行交联,同时降低搅拌速度,0.5 h后补充一定量的甲醛,然后缓慢通入氨气,30 min后,停止反应。离心分离,用石油醚反复洗涤3次,在索氏提取器中用丙酮抽提3 h,样品自然干燥,即得到“类乒乓球”空心结构的壳聚糖微球<sup>[14]</sup>。

### 1.3 壳聚糖包覆 BSA 及药物释放性能测试

将50 mg壳聚糖微球浸泡于5 mL含不同浓度牛血清白蛋白(BSA)的PBS缓冲液(pH=5.1)中,保持搅拌。用紫外可见分光光度计测定上清液280 nm处吸光度的变化,确定平衡时间。从吸光度变化可以看出,大约4 d后吸附达到平衡。同时固定样品号,恒定温度为(37±0.5)℃,搅拌,将达到载药平衡的壳聚糖微球加入到5 mL模拟人工肠液中(pH=7.4),并用搅拌代替蠕动,用进样器每次取样0.1 mL,并补加等量Tris-HCl缓冲溶液,用紫外分光光度计测定其吸光度,并由此检测其浓度变化,以测定包覆BSA的壳聚糖微球缓释BSA的情况。<sup>[15-17]</sup>

## 2 结果与讨论

### 2.1 壳聚糖微球的形貌

图1(a)为壳聚糖微球尺寸分布和形貌图,图中可以观察到壳聚糖微球的单分散性较好,且平均粒径约74 μm。将其放大1300倍后(图1(b))可以观察到微球表面比较光滑。将此微球经功率为50 W超声处理15 min后放大1200倍观察(图1(c)),可以清楚地看出微球具有空心结构,且球壳较薄,结构类似乒乓球。考虑到壳聚糖的生物相容性和微球的结构特征,此种微球可能是蛋白质的良好载体<sup>[7,18]</sup>。

### 2.2 壳聚糖及其微球的红外光谱图

壳聚糖的羟基因氢键作用其伸缩振动吸收峰在3200~3500 cm<sup>-1</sup>范围内出现宽峰,它的红外光谱图在1571 cm<sup>-1</sup>处有较强的氨基吸收峰,而1675 cm<sup>-1</sup>处的酰胺I带及1320 cm<sup>-1</sup>酰胺III带的吸收峰

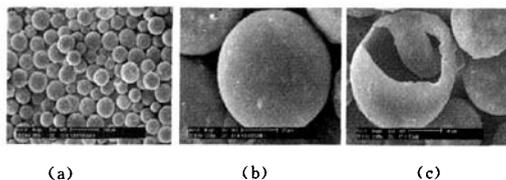


图1 壳聚糖微球扫描电镜图  
(a) 尺寸分布和形貌(放大倍数,  $\times 100$ ); (b) 表面形貌(放大倍数,  $\times 1300$ ); (c) 超声破碎后表面形貌(放大倍数,  $\times 1200$ )

图1 壳聚糖微球扫描电镜图

Fig. 1 The SEM of chitosan microsphere

较弱,而酰胺 II 带 ( $1555\text{ cm}^{-1}$ ) 处的吸收峰却无法观察到,  $1077\text{ cm}^{-1}$  及  $1020\text{ cm}^{-1}$  处的吸收峰为壳聚糖平行谱带分别为  $C_3$  上的二级羟基和  $C_6$  上的一级羟基的 C-O 伸缩振动吸收峰, 而  $C=O$ , C-O 在  $1706\text{ cm}^{-1}$ ,  $1228\text{ cm}^{-1}$  处的 O-酰基的特征吸收峰也比较明显<sup>[19]</sup>。

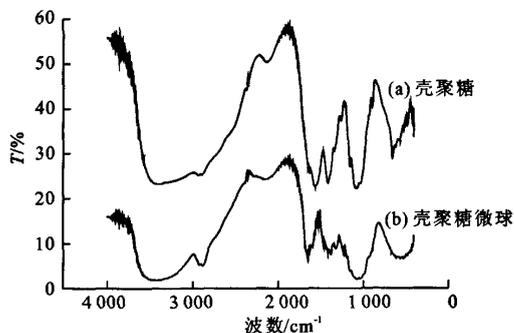


图2 壳聚糖(a)与壳聚糖微球(b)的红外光谱图

Fig. 2 Infrared spectra of chitosan(a) and chitosan microsphere(b)

经甲醛交联后的壳聚糖微球其吸收峰的变化很大。壳聚糖分子中的羟基因氢键作用其伸缩振动吸收峰在  $3200\sim 3500\text{ cm}^{-1}$  范围内的宽峰强度变小, 而在  $1154\text{ cm}^{-1}$  及  $896\text{ cm}^{-1}$  处的壳聚糖的  $\beta(1\rightarrow 4)$  糖苷键的特征吸收峰却比较明显地突现出来,  $1381\text{ cm}^{-1}$  处的  $C-CH_3$  处的变形振动峰的强度减小。进一步证明其与甲醛交联后它的吸收峰发生了变化。

### 2.3 壳聚糖微球的溶胀性能研究

由于壳聚糖凝胶具有三维网络结构, 因此它在水中表现出一定的溶胀行为。将实验制备得到的壳聚糖微球分别浸泡在 PBS 的缓冲液 ( $\text{pH}=4.9$ ) 和含有 BSA 的 PBS 的缓冲液 ( $\text{pH}=4.9$ ) 中, 测其溶胀度<sup>[20]</sup>。根据溶胀公式

$$SR = \frac{(W_t - W_0)}{W_0} \quad (1)$$

其中  $W_0$  为干态微球的初始质量;  $W_t$  为溶胀达到平衡时湿态微球的质量。每次实验重复 3 次, 最后求

其平均值。实验结果表明, 大约 1 h 时微球的溶胀即可达到平衡, 而且两种溶液颇为相似。经计算空白微球在  $\text{pH}=4.9$  的酸性溶液中的最大溶胀度为 8.33, 如图 3 所示。可以看出空白壳聚糖微球在偏酸性条件下具有很强的吸水性, 水溶性药物因此比较容易进入被吸附的微球内部。BSA 的等电点为 4.9。当  $\text{pH}>4.9$  时, 其表面电荷为负值, 而酸性条件下空心壳聚糖微球对外呈现正电荷, 因而相对比较容易吸附 BSA。实验结果证明, 在  $\text{pH}$  值一定的情况下, 无论是否加入 BSA, 其溶胀情形不发生改变。为了使壳聚糖吸附 BSA 的量达到最大, 通过精心优化实验条件, 选择  $\text{pH}=5$  为吸附牛血清白蛋白的最佳  $\text{pH}$  值。此时可达到较为理想的承载量。

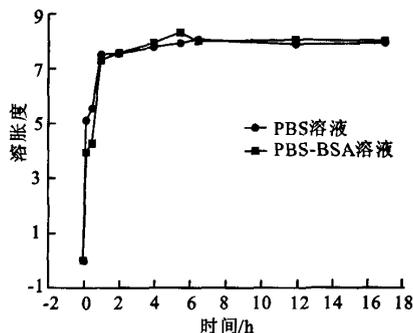


图3 壳聚糖微球在缓冲液的溶胀变化图

Fig. 3 The Swelling of the chitosan microsphere in buffer

### 2.4 壳聚糖对牛血清白蛋白的承载及其缓释作用

将药物包埋于高分子微球中, 经主动和被动控制, 进入预定的靶器官和组织, 缓慢进行释放, 从而可以降低药物的毒副作用, 并且提高其生物利用度<sup>[21]</sup>。由于壳聚糖微球在很宽的  $\text{pH}$  范围内稳定<sup>[22]</sup>, 因此用壳聚糖微球担载蛋白质, 可以有效防止胃液的强酸性对蛋白质的变性和降解作用, 保证药物安全输送到病变部位。

表 1 中 1~10 号样品是在总体积为 5 mL, 含不同浓度 BSA 的溶液中, 置入 50 mg 壳聚糖微球, 吸附 4 d 后, 微球所承载牛血清白蛋白的量。图 4 所示为壳聚糖微球承载牛血清白蛋白的示意图, 其中 1~5 号分别 1.5, 3, 4.5, 48, 96 h 吸附牛血清白蛋白的承载曲线图。由图 4 可以看出, 在给定 BSA 初始浓度下, 随着时间延长, 承载牛血清白蛋白的量越多。对同一吸附时间, 随着初始 BSA 浓度的增加, 吸附的量也是越大。96 h 后基本达到吸附平衡 (其中 1 号样品的吸附效率达到 95.5%), 与初始浓度相差不大。实验表明, 吸附效率与初始 BSA 的浓度并没有确定的线性关系。

表 1 吸附前溶液和吸附后壳聚糖微球中含 BSA 的质量  
Tab.1 The quantity of BSA in chitosan microsphere before and after adsorption

样品号	$W_{BSA}/\text{mg}$	$W_{\text{Loading}}/\text{mg}$
1	2.513	2.401
2	4.629	4.218
3	6.502	5.109
4	8.225	5.757
5	11.258	9.839
6	12.157	9.829
7	14.554	12.086
8	16.201	13.819
9	19.049	15.740
10	21.221	17.534

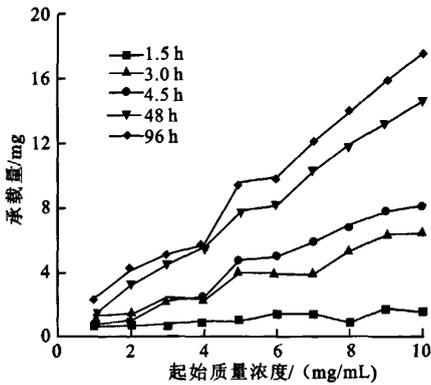


图 4 壳聚糖承载牛血清白蛋白线性图

Fig.4 The linearity spectra of loaded BSA in chitosan microsphere

将达到平衡的承载有牛血清白蛋白的壳聚糖微球 1 号, 2 号, 3 号样品(承载效率分别为 71.76%, 74.35% 和 61.44%)置于 5 mL pH 为 7.4 的 Tris-HCl 缓冲液中, 模拟肠液并将温度维持在  $(37 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ , 使牛血清白蛋白缓释, 利用下面公式:

$$\Delta V = W / \Delta t \quad (14)$$

计算缓释效率。其中  $W$  为在确定时间内缓释的质量,  $\Delta t$  为时间变量。

从图 5 可以看出初始释放速度特别高, 在 0~2 h 中, 3 种样品的释放速率均是最高, 这也就是药

物缓释中的突发效应。随后释放速率降低, 直至释放平衡。其中 1 号样品经过 4 d 平衡吸附后载药量 25.12 mg(承载量为 73.82%), 在缓释 22 h 时, 缓释效率已达到 72.68%, 缓释 46 h 时达到 87.98%。2 号样品吸附平衡后在 50 mg 壳聚糖中吸附的 BSA 量可达到 29.74 mg, 在缓释 22 h 缓释速率达到第二次高峰, 其缓释效率达到 59.66%, 当缓释至 46 h, 几乎缓释完全。3 号样品中承载牛血清白蛋白的量最多(承载效率为 61.44%), 因此其初始释放速率最高。随着时间的延长, 其释放速率逐渐变慢, 当缓释至 34 h 时就达到缓释平衡。而且从此图可以看出, 不同包药效率在人工肠液中释放性能基本相同, 表明承载量对微球释药性能影响不大。

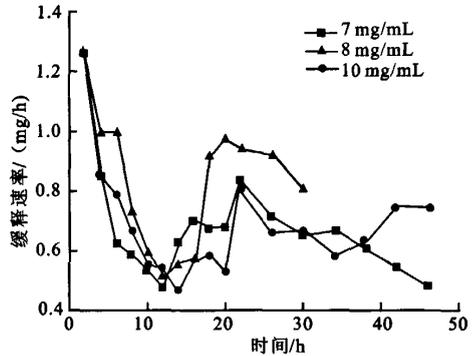


图 5 壳聚糖微球承载 BSA 的缓释

Fig.5 The release of BSA in chitosan microsphere

### 3 结 语

通过优化条件, 利用反相悬浮交联法可制备出具有空心结构的单分散性微米级壳聚糖微球。利用壳聚糖的生物相容性<sup>[24]</sup>, 将这种微球作为牛血清白蛋白的载体, 通过物理吸附法承载牛血清白蛋白, 对其承载及缓释蛋白质药物的性能进行了研究, 发现牛血清白蛋白溶液的初始浓度直接影响承载量。在缓释过程的突发阶段(0~2 h), 其释放效率基本相同, 即缓释过程不受载药量的影响。而且缓释过程持续大约 48 h 左右, 释放效率可达到约 80%。

### 参考文献(References):

[1] E Ruel-Gariepy, G Lezclair, P Hildgen, et al. Thermosensitive chitosan based hydrogel containing liposomes for the delivery hydrophilic molecules[J]. *J Control Release*, 2002, 82(2):373-383.  
 [2] 陈小娥, 夏文水, 余晓斌, 曲霉 CJ 222326 内切壳聚糖酶的分离纯化和性质[J]. 无锡轻工大学学报(食品与生物技术), 2004, 23(3): 10-14.  
 CHEN Xiao-e, XIA Wen-shui, YU Xiao-bin. Purification and Properties of Endo Chitosanase ChiB from Aspergillus sp CJ222326[J]. *J Wuxi University of Light Industry(Food Science and Biotechnology)*, 2004, 23(3): 10-14. (in Chinese)

- [3] X Z Shu, K J Zhu. Controlled drug release properties of ionically cross-linked chitosan beads, the influence of anion structure[J]. *Int J Pharm*, 2002, 233(1):217-225.
- [4] D Henard, P Robert, L Lavenant, et al. Biopolymeric colloidal carriers for encapsulation or controlled release application [J]. *Int J Pharm*, 2002, 242(1): 163-183.
- [5] K C Gupta, M N V Ravi. Preparation, characterization and release profile of pH- sensitive chitosan beads[J]. *Polym Int*, 2000, 49(1): 141-143.
- [6] 刘海弟,陈运法,曾冬冬,等. 用于肺部给药的壳聚糖空心微球的制备[J]. 功能材料,2005, 36(4):616-618.  
H D Liu, Y F Chen, D D Zeng, et al. preparation of porous chitosan particles for pulmonary drug delivery[J]. *J Funct Mater*, 2005, 36(4):616-618.
- [7] T W Wong, L W Chan, S B Kho, et al. Design of controlled-release solid dosage forms of alginate and chitosan using microwave[J]. *J Control Release*, 2002, 84(1), 99-114.
- [8] Brahim El-Gibaly, Development and in vitro evaluation of novel floating chitosan microcapsules for oral use, comparison with non-floating chitosan microspheres[J]. *Int J Pharm*, 2002, 249(1):7-21.
- [9] 罗志敏, 马秀玲, 陈盛, 等. 磁性壳聚糖-聚丙烯酸微球的制备及表征[J]. 化学通报 2005,7:551-554.  
LUO Zhi-ming, MA Xiu-lin, CHEN Shen, et al. Synthesis and characteristic of magnetic chitosan-poly(acrylic acid) microspheres[J]. *Chemistry*, 2005,7:551-554. (in Chinese)
- [10] L M Daniel, E Gundu, H R Rao. Chitosan/polyethylene glyco l-alginate microcapsules for oral delivery of hirudin Thomas chandy[J]. *J Appl Polym Sci*, 1998, 70(9):2143-2153.
- [11] T Hayashi, Y J Ikada. Protease Immobilization onto porous chitosan beads[J]. *Appl Polym Sci*, 1991, 42(1): 85-89.
- [12] M L Huguet, A Groboillot, R J Neufeld, et al. Hemoglobin encaosulation in chitosan/Calcium alginate beads[J]. *J Appl Polym Sci*, 2000, 51(10): 1427-1431.
- [13] K C Gupta, M N V Ravi Kumar. Preparation, characterization and release profile of pH - sensitive chitosan beads[J]. *Appl Polym Sci*, 2000, 76(3), 672-683.
- [14] M Ding, J J Si, L X Huang, et al. The preparation of chitosan microsphere[J]. *Chem World*, 1998, 12(2):636-638.
- [15] 尹玉姬, 许美萱, 陈秀兰, 等. 壳聚糖/明胶网络聚合物微球药物释放行为研究[J]. 科学通报, 1995, 40(8):2241-2243.  
YI Yu-ji, XU Mei-xuan, CHEN Xiu-lan, et al. The studies in the release of chitosan/glutin polymer microsphere[J]. *Chinese Science Bulletin*, 1995, 40(8):2241-2243. (in Chinese)
- [16] 黄光佛, 卿胜波, 李盛彪, 等. 多糖类生物医用材料-甲壳素和壳聚糖的研究及应用[J]. 高分子通报, 2001, 3, 43-49.  
HUANG Guang-fu, QING Shen-bo, LI Shen-biao, et al. The advance of polysaccharide biomedical materials-chitin and chitosan[J]. *Polymer Bulletin*, 2001, 3, 43-49. (in Chinese)
- [17] J M Charles, J D Michael. Hollow latex particles, synthesis and application[J]. *Adv Colloid Int Sci*, 2002, 99(1):181-183.
- [18] T Sannan, K Kurita, K Oura, et al. Clonazepam release from core-shell type nano- particles in vitro[J]. *Polymer*, 1978, 19(2):458-462.
- [19] K C Gupta, M N V Ravi Kumar. Preparation, characterization and release profile of pH - sensitive chitosan beads[J]. *J Appl Polym Sci*, 2000, 76(3): 672-683.
- [20] 鲁中华, 罗传秋, 曹维孝. 放射性标记法研究壳聚糖与牛血清白蛋白的自组装超薄膜[J]. 高分子学报, 2002, 1, 116-119.  
LU Chong-hua, LUO Chuan-qiu, CAO Wei-xiao. Chitosan/Bovine Serum Albumin Ultrathin Films Studied By Radio-labeled Method[J]. *Acta Polymerica Sinica*, 2002, 1, 116-119. (in Chinese)
- [21] J A Ko, H J Park, S J H Wang, J B Park, et al. Preparation and characterization of chitosan microparticles intended for controlled drug delivery[J]. *Int J Pharm*. 2002, 249(1): 165-174.
- [22] 李雄伟, 肖锦, 李晓毅, 等. 微米级可生物降解高分子微球制备研究[J]. 高分子材料科学与工程, 1998, 14(3):20-23.  
LI Xiong-wei, XIAO Jin, LI Xian-yi, et al. The prepration of the degraded polymer microsphere[J]. *Polymer Materials Science and Engineering*, 1998, 14(3):20-23.
- [23] D Kuckling, V C Duan, S E Wohlrab. Preparation of nanogels with temperature- responsive core and pH-responsive arms by photo-cross-linking[J]. *Langmuir*, 2002, 245(18):4263-4269.

(责任编辑:朱明)