

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.01213

· 论 著 ·

聚电解质逐层组装的微凝胶脉冲释药系统的研制

周闰臣^{1,2}, 鲁莹¹, 张翻¹, 俞媛¹, 陈琰¹, 张国庆², 孙治国¹, 黄景彬¹, 刘俊杰¹, 于菲菲¹, 邹豪^{1*}, 钟延强^{1*}

1. 第二军医大学药学院药剂学教研室, 上海 200433

2. 第二军医大学东方肝胆外科医院药材料, 上海 200438

[摘要] **目的** 制备聚电解质逐层组装的壳聚糖海藻酸钠微凝胶脉冲制剂, 并对制剂的结构和体外释放行为进行考察。**方法** 使用高压静电成囊机制备海藻酸钠壳聚糖微凝胶核心, 通过静电吸附原理将聚电解质逐层包裹在微凝胶表面形成包衣层。通过单因素实验考察不同物料比对聚电解质包衣微凝胶膨胀性能、释放行为的影响。**结果** 聚电解质包衣微凝胶外观圆整, 粒径分布范围窄, 体外释放时滞 2.67 h, 时滞后药物迅速释放, 3 h 释放量为 72%。**结论** 以壳聚糖海藻酸钠为核心, 聚电解质为包衣层的微凝胶可以实现脉冲释放。

[关键词] 聚电解质; 微凝胶; 脉冲释药; 药物释放系统

[中图分类号] R 743.41 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)11-1213-05

Preparation of polyelectrolyte layer-by-layer coated microgels for pulsed drug delivery

ZHOU Gui-chen^{1,2}, LU Ying¹, ZHANG He¹, YU Yuan¹, CHENG Yan¹, ZHANG Guo-qing², SUN Zhi-guo¹, HUANG Jing-bin¹, LIU Jun-jie¹, YU Fei-fei¹, ZOU Hao^{1*}, ZHONG Yan-qiang^{1*}

1. Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of Pharmacy, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

[Abstract] **Objective** To investigate the preparation method, the release profile and structure of the polyelectrolyte layer-by-layer coated chitosan-alginate microgels. **Methods** The cores of the microgels were prepared by a high voltage electrostatic system, and the semipermeable membrane outside the microgel was polyelectrolyte deposits on the core surface through electrostatic attraction. The influences of different ratios of materials on the expansion property and the *in vitro* cumulative release of the coated microgels were evaluated by a single factor experiment. **Results** The prepared polyelectrolyte-coated microgels were well-shaped, with a narrow range of diameter distribution. The lag time of *in vitro* release was 2.67 h; the release was rapid after lagging, with the cumulative *in vitro* release being 72% within 3 h. **Conclusion** Polyelectrolyte layer-by-layer coated chitosan-alginate microgels can release payload in a pulsed fashion *in vitro*.

[Key words] polyelectrolyte; microgels; pulsed drug delivery; drug delivery systems

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(11):1213-1217]

传统缓、控释制剂可以在较长时间内维持血药浓度, 延长药物疗效, 但也逐渐暴露出弊端, 由于治疗期间受体长期与药物相互作用而导致受体脱敏, 耐药性增加, 治疗作用降低, 并且药物毒副作用大, 生物利用率低。而脉冲制剂是根据人体生物节律的变化特点, 按照生理和治疗的需要定时、定量释放药物, 在某些疾病的治疗上更具有优越性。现阶段的脉冲释放主要分为两种形式: 触发式和程序设定式。后者不需要外界因素触发, 药物释放只取决于

制剂内部结构和材料性能, 只要根据目标释放模式有目的地选择材料, 合理设计给药载体结构, 药物释放就可以按照预设的步骤, 自动、有序地进行。从患者依从性角度考虑, 程序设定式的释药方式具有明显优势, 按照其设计机制又可分为以下几种类型: 体系降解形成的脉冲释药, 膨胀压形成的脉冲释药, 体系降解和膨胀压共同形成的脉冲释药。

体系降解形成的脉冲释药体系时滞后释放时间过长, 而膨胀压形成的脉冲释药体系受到与消化液

[收稿日期] 2011-07-21

[接受日期] 2011-09-20

[基金项目] 国家自然科学基金(30801441). Supported by National Natural Science Foundation of China (30801441).

[作者简介] 周闰臣, 硕士. E-mail: catzgc@163.com

* 通信作者(Corresponding authors). Tel: 021-81871287, E-mail: mrzou@sina.com; Tel: 021-81871285, E-mail: yqzhong68@163.com

接触时间的影响。体系降解和膨胀压共同形成的脉冲释药体系结合了上述两种脉冲释药体系的优势,既能够通过高分子自发降解可控性好的特点来改善脉冲“时滞”的精确控制,又能够通过膨胀压体系脉冲释放发生后释放响应快的特点来解决脉冲释放时间的问题。

体系降解和膨胀压共同形成的脉冲释药体系的典型释放模式是由可降解的高分子材料制成的微凝胶作为“核”,脂质或高分子作为“包衣层”,水可以自由通过该包衣层,而微凝胶的降解产物(降解的高分子片段)不能通过,随着微凝胶中高分子的不断降解,体系内部膨胀压不断增加,到达临界状态,“包衣”层被胀破,形成脉冲释药^[1-5]。

本课题以聚电解质聚 4-苯乙烯磺酸钠(PSS)和聚烯丙基胺盐酸盐(PAH)作为包衣材料,壳聚糖海藻酸钠微凝胶作为核心制备自膨胀微凝胶脉冲释药体系,并对聚电解质包衣微凝胶的结构、膨胀性能、药物分布状态以及释放行为进行考察,以期获得良好的脉冲释放效果,为新型脉冲制剂的研制开拓新方向。

1 试剂和材料

FITC 标记的葡聚糖 (FITC-dextran, 2 000 000, 美国 Sigma 公司); 聚烯丙基胺盐酸盐 (PAH, 56 000, 美国 Sigma 公司); 聚 4-苯乙烯磺酸钠 (PSS, 70 000, 美国 Sigma 公司); 罗丹明 (RBITC, 美国 Sigma 公司); 海藻酸钠 (化学纯, 国药集团化学试剂有限公司); 壳聚糖 (食品级, 浙江金壳生物有限公司)。SHZ-88 台式水浴恒温振荡器 (江苏太仓市实验设备厂); 高压静电场微胶囊成型装置 (上海理工大学); F-7000 荧光分光光度计 (日本日立公司); 85-2 恒温磁力搅拌器 (上海闵行虹浦仪器厂); 激光共聚焦显微镜 (德国 Leica 公司); TS5136MM 扫描电镜 (捷克 TESCAN 公司); Zetasizer nano ZS (英国 Malvern 公司); Mastersizer2000 (英国 Malvern 公司)。

2 方法和结果

2.1 以 FITC-dextran 为模型药物的壳聚糖海藻酸钠微凝胶的制备^[6-7] 调节高压微胶囊成型装置电压为 35 kV, 自动注射器速度 30 mm/h。自动注射器将含有模型药物 FITC-dextran 的 2% 海藻酸钠液体在电场力的作用下克服黏滞力和表面张力, 呈一

定粒径的液滴滴入 2% 的氯化钙、0.2% 壳聚糖 (100 000) 混合溶液 (用稀盐酸调节 pH 1.2) 中, 在磁力搅拌作用下固化成不溶于水的海藻酸钙壳聚糖微凝胶。待海藻酸钠全部成凝胶后, 关闭高压电场, 继续磁力搅拌 15 min, 使微凝胶固化充分。用筛网滤出微凝胶后, 去离子水洗涤, 4℃ 备用, 测得粒径为 (409.18 ± 6.47) μm。

2.2 聚电解质包衣微凝胶的制备^[8-9] 将微凝胶放入 1 mg/ml 的 PSS (含 0.5 mol/L NaCl) 水溶液中, 80 W 功率超声 15 min, 使 PSS 通过静电力的作用充分均匀地吸附在微凝胶的表面, 用筛网滤出微凝胶, 去离子水洗涤, 除去多余的 PSS。用同样方法将微凝胶置于 1 mg/ml 的 PAH 水溶液 (含 0.5 mol/L NaCl) 中, 超声、洗涤。交替吸附 PSS 与 PAH 至所需的聚电解质层数。

2.3 聚电解质包衣微凝胶的表面电位、粒径及形态变化 (PSS/PAH)₃ 包衣后, 粒子的粒径增至 (452.90 ± 2.71) μm, 在微凝胶核心包衣过程中, 表面电位呈正负交替变化 (图 1), 显示聚电解质已经成功吸附在粒子表面。用扫描电镜观察聚电解质包衣前后的形态 (图 2), 结果显示, 微凝胶外观圆整, 聚电解质包衣后的微凝胶表面较未包衣的光滑。

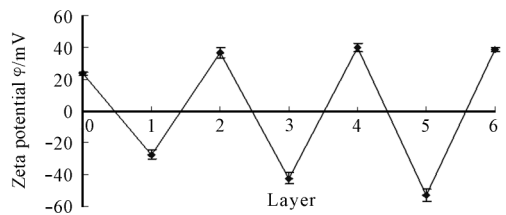


图 1 聚电解质逐层组装过程中粒子表面电位变化

Fig 1 Changes of zeta potentials of different layers during layer-by-layer coating
n = 3, x ± s

2.4 包封率的测定 将聚电解质包衣微凝胶用滤纸吸干水分, 精密称取 100 mg, 置 10 ml 容量瓶中, 加入 NaOH 溶液 (pH 13) 定容, 高速涡旋 5 min 使包衣微凝胶全部破裂, 立即取出 1 ml 移至 1.5 ml 离心管中, 9 000 × g 离心 5 min, 取上清液 0.6 ml 进入荧光分光光度计检测, 计算得 FITC-dextran 的含量。包封率 (%) = (包衣微凝胶中 FITC-dextran 的测得含量 / 制备时包衣微凝胶中 FITC-dextran 的理论载药量) × 100%; 载药量 (%) = (包衣微凝胶中 FITC-dextran 的测得含量 / 包衣微凝胶的总质量) × 100%。

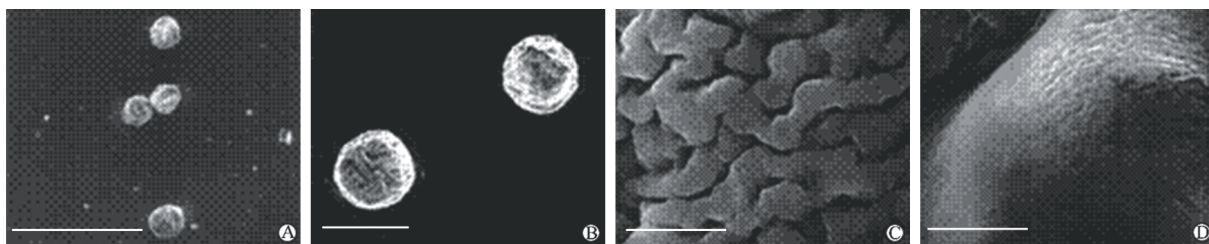


图 2 壳聚糖海藻酸钠微凝胶和聚电解质 (PSS/PAH)₃ 包衣微凝胶的扫描电镜图

Fig 2 SEM micrographs of chitosan-alginate microgels (A), polyelectrolyte coating (PSS/PAH)₃ microgels (C), and surface of uncoated (B) and coated (D) microgels

The scale is 500 μm (A), 200 μm (C), 5 μm (B and D), respectively

2.5 聚电解质包衣微凝胶的结构及药物分布 将包衣材料 PAH 用 RBITC 标记后制备聚电解质包衣微凝胶, 置于共聚焦显微镜下观察 (图 3)。在显微镜明场视野中, 包衣后的微凝胶 (图 3B2) 比未包衣的微凝胶 (图 3A2) 颜色略深, 提示聚电解质可能已经吸附在微凝胶上。由于 FITC-dextran 显绿色荧光, PAH-RBITC 显红色荧光, 从图 3B1 中可以清楚看到, 聚电解质均匀吸附在微凝胶的表面, 并没有浸染到核心内部。荧光强度图 (图 3C) 也证实了这一现象, 绿色荧光曲线强度变化不大, 药物在微凝胶中的分布比较均匀, 红色曲线只在球体边缘位置有荧光强度改变。在逐层切片图 4 中, 观察包衣微凝胶不同的横切面, 结果进一步证实了聚电解质包衣微凝胶的结构。

2.6 共聚焦显微镜下观察聚电解质逐层组装微凝胶释放 将包衣材料 PAH 用 RBITC 标记后制备聚电解质包衣微凝胶, 用滤纸擦干表面水分, 置于直径 3.5 cm 的塑料培养皿中, 滴入少量磷酸盐缓冲液 (为方便观察, 加速聚电解质包衣微凝胶的释放过程, 调至 pH 11), 固定于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温槽中, 在激光共聚焦显微镜下观察变化, 并拍摄变化全过程, 如图 5。

如图 5A~5F 所示, 聚电解质包衣微凝胶逐渐膨胀, 粒径增大 (图 5A、5C, 选择任意 2 个包衣微凝胶粒子, 粒径由 477 μm 增大到 515 μm , 另一个由 352 μm 到 404 μm), 胀破包衣层 (红色荧光, 图 5D), 药物 (绿色荧光) 大量释放出来 (图 5E), 最后微凝胶失去圆整形态, 结构坍塌 (图 5F)。这一过程符合体系降解和膨胀压共同形成的脉冲释药系统的理论释放机制。

2.7 微凝胶的膨胀性能测定和包衣微凝胶体外释放

2.7.1 微凝胶核心膨胀性能的测定 将制备好的新鲜未包衣微凝胶分散于去离子水中, 取出一部分, 立即用激光粒度仪测其粒径, 得到未包衣微凝胶的原始粒径 L_0 ; 用筛网将剩余微凝胶收集起来, 滤去水分, 在 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液中重新分散, 置于

37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴摇床中, 分别于 1、2、3 h 后取出部分测其粒径 L_n , 计算 $(L_n/L_0) \times 100\%$, 得到粒径变化百分比, 以时间为横坐标、粒径变化百分比为纵坐标作图 6。结果显示, 微凝胶核心在 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液中 3 h 内可以膨胀至原体积的 150.1%。

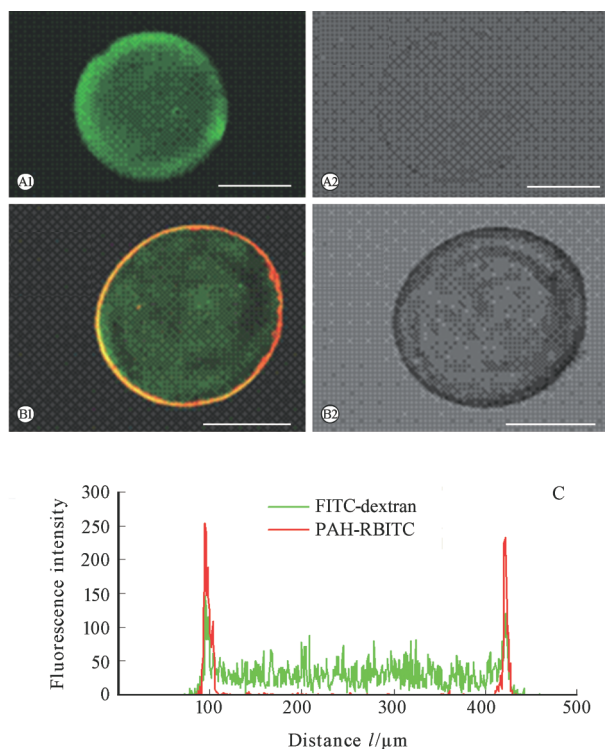


图 3 微凝胶核心 (A1, A2) 和聚电解质包衣微凝胶 (B1, B2) 的共聚焦显微镜图及荧光强度图 (C)

Fig 3 Confocal laser scanning microscopy images of FITC-dextran loaded uncoated microgels (A1, A2) and FITC-dextran (green colour) loaded microgels coated with (PSS/PAH-RBITC)₃ (B1, B2) and the fluorescence intensity of FITC-dextran and PAH-RBITC in coated microgels (C)

A1: Confocal microscopy image of uncoated microgel; A2: Optical microscopy image of uncoated microgel; B1: Confocal microscopy image of (PSS/PAH-RBITC)₃ coated microgel; B2: Optical microscopy image of (PSS/PAH-RBITC)₃ coated microgel. The PAH was fluorescently labeled with RBITC (red color). The scale bar represents 150 μm

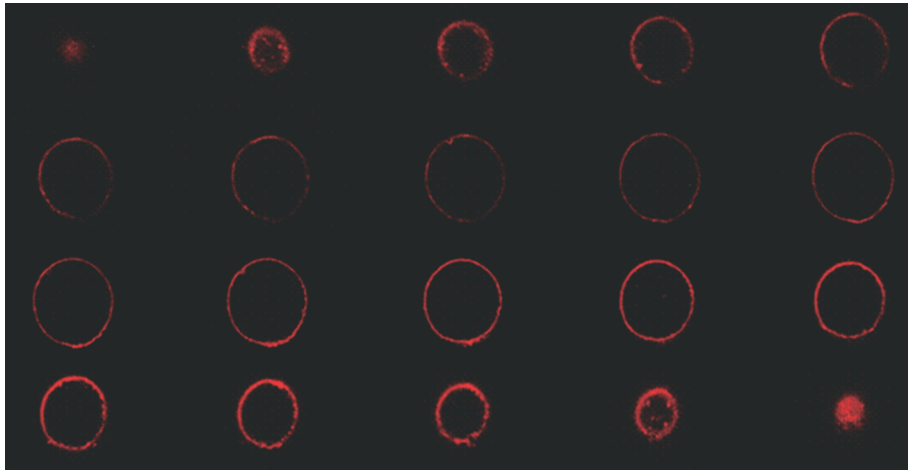


图 4 聚电解质包衣微凝胶的立体切片图

Fig 4 Confocal laser scanning microscopy images of different sections of microgels coated with (PSS/PAH-RBITC)₃

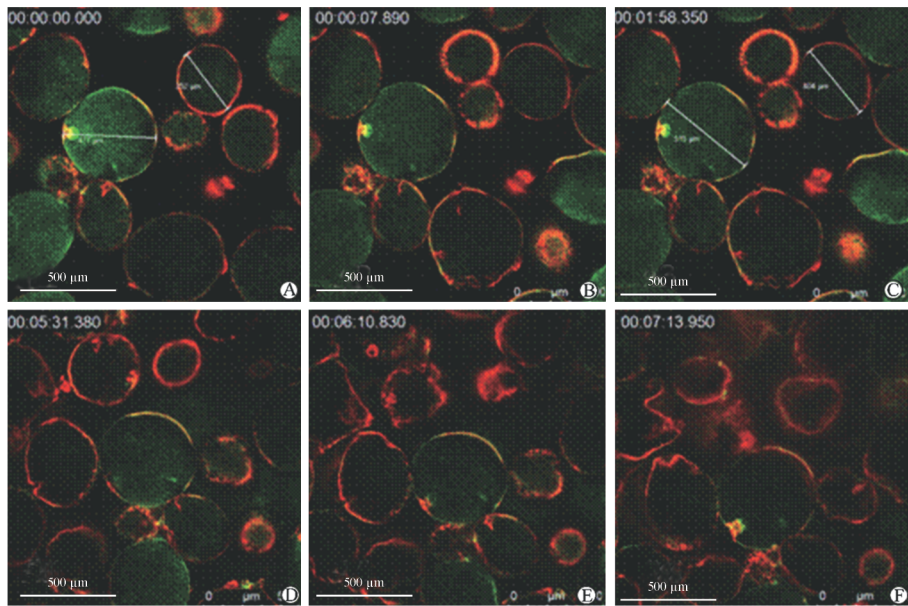


图 5 (PSS/PAH-RBITC)₃包衣微凝胶体外释放过程(A-F)的激光共聚焦显微镜图

Fig 5 Confocal laser scanning microscopy images of releasing process(A-F) of microgels coated with (PSS/PAH-RBITC)₃

A: 0 sec; B: 7 sec; C: 1 min and 58 sec; D: 5 min and 31 sec; E: 6 min and 10 sec; F: 7 min and 13 sec. The scale bar represents 500 μm

2.7.2 自组装微凝胶体外释放 将新鲜的载 FITC-dextran 的 (PSS/PAH)₄ 包衣微凝胶用滤纸吸干水分,精密称取 20 mg,并用移液管取 7 ml pH 7.4 的磷酸盐缓冲液,置于 50 ml 离心管中,将离心管放入 37℃ 水浴摇床中,在设定时间点(0、1、2、3、4、5、6、20 h)取样,离心、取上清液 0.7 ml,同时补足新鲜释放液 0.7 ml.用荧光分光光度计检测样品光密度值,计算累积释放量,以时间为横坐标、累积释放量为纵坐标作图 7.结果显示,制剂的释放时滞是 2.67 h,此后药物开始大量释放,形成脉冲,3 h 的释放量达 72%。

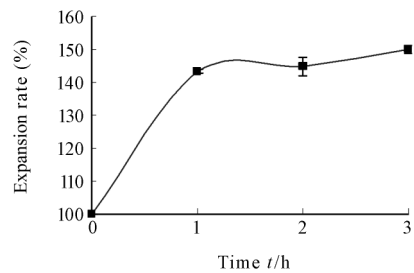


图 6 壳聚糖海藻酸钠微凝胶的膨胀率

Fig 6 Changes of expansion rates of chitosan-alginate microgels

n=3, $\bar{x} \pm s$

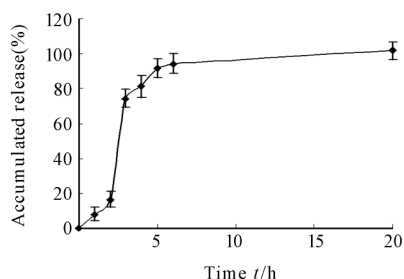


图 7 聚电解质 (PSS/PAH)₄ 包衣微凝胶在 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液中的体外释放曲线

Fig 7 *In vitro* release curve of FITC-dextran loaded polyelectrolyte coated microgels in pH 7.4 phosphate buffer solution
 $n=3, \bar{x} \pm s$

3 讨论

本实验建立了一种新型脉冲释药系统,它通过体系降解所形成的膨胀压力胀破聚电解质包衣层而自主释放药物,不依赖外界因素触发,提高了患者的依从性。在高压静电的控制下得到了粒径均一,外观圆整的壳聚糖海藻酸钠微凝胶;通过静电吸附原理,将聚电解质逐层包裹在微凝胶表面。同时观察了聚电解质包衣微凝胶的结构和药物分布,并考察其体外释放行为以及微凝胶核心的膨胀性能,证实该制剂是可以实现脉冲释放的,且体外释放过程符合体系降解和膨胀压共同作用的脉冲制剂的理论释放机制。本课题中(PSS/PSH)₄包衣后的微凝胶,体外释放时滞为 2.67 h,此后药物大量释放,3 h 累积释放量为 72%。其中,改变微凝胶中高分子材料的比例和黏度可以改变微凝胶核心的膨胀性能,改变聚电解质包衣层的厚度和疏松程度,调节包衣层的机械强度,可以调节该制剂的释药时滞以及时滞后的释放速度,从而使得释放行为灵活可控,满足不同临床治疗需要,这方面我们将在以后的研究中考察。

另外,本实验主要针对体外释放行为进行定量研究,下一步会着重于药代动力学指标,定量考察制剂在体内的确切释放行为。

[参考文献]

- [1] Stubbe B G, De Smedt S C, Demeester J. "Programmed polymeric devices" for pulsed drug delivery[J]. *Pharm Res*, 2004, 21:1732-1740.
- [2] Gazzaniga A, Palugan L, Foppoli A, Sangalli M E. Oral pulsatile delivery systems based on swellable hydrophilic polymers[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2008, 68:11-18.
- [3] De Geest B G, Stubbe B G, Jonas A M, Van Thienen T, Hinrichs W L, Demeester J, et al. Self-exploding lipid-coated microgels[J]. *Biomacromolecules*, 2006, 7:373-379.
- [4] Stubbe B G, Horkay F, Amsden B, Hennink W E, De Smedt S C, Demeester J. Tailoring the swelling pressure of degrading dextran hydroxyethyl methacrylate hydrogels [J]. *Biomacromolecules*, 2003, 4:691-695.
- [5] Stubbe B G, Braeckmans K, Horkay F, Hennink W E, De Smedt S C, Demeester J. Swelling pressure observations on degrading dex-HEMA hydrogels [J]. *Macromolecules*, 2002, 35: 2501-2505.
- [6] Zhang W J, Li B G, Zhang C, Xie X H, Tang T T. Biocompatibility and membrane strength of C3H10T1/2 cell-loaded alginate-based microcapsules[J]. *Cytherapy*, 2008, 10:90-97.
- [7] Abreu O M S, Bianchini C, Forte M C, Kist T B L. Influence of the composition and preparation method on the morphology and swelling behavior of alginate-chitosan hydrogels[J]. *Carbohydr Polym*, 2008, 7:283-289.
- [8] De Geest B G, Déjugnat C, Verhoeven E, Sukhorukov G B, Jonas A M, Plain J, et al. Layer-by-layer coating of degradable microgels for pulsed drug delivery[J]. *J Contr Rel*, 2006, 116:159-169.
- [9] Shao Y Y, Zhu B Q, Li J, Liu X R, Tan X, Yang X L. Novel chitosan microsphere-templated microcapsules suitable for spontaneous loading of heparin[J]. *Mater Sci Engin C*, 2009, 29:936-941.

[本文编辑] 尹 茶