

微乳中复凝聚法制备壳聚糖-明胶纳米胶囊

薛 超, 朱银燕, 安学勤, 纽少晴, 李文龙, 王 玲

(南京师范大学化学与环境科学学院, 江苏省生物功能材料重点实验室, 江苏 南京 210097)

[摘要] 以明胶和壳聚糖作为包裹材料, 在 O/W 型微乳液模板中, 用复凝聚的方法制备纳米胶囊, 考察了影响合成纳米胶囊的主要因素, 并进行了分析. 结果表明, 本实验采用的在微乳中复凝聚法合成了分散性好、粒度均匀、粒径 200~400 nm 的球形纳米胶囊. 制备了尼莫地平 (NMP) 纳米胶囊, 得到包封率达到 90%、粒径 500~800 nm 的载药纳米胶囊.

[关键词] 微乳液, 复凝聚, 壳聚糖, 明胶, 纳米胶囊, 尼莫地平

[中图分类号] O 648 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2009)02-0069-04

Nanocapsules Preparation by Complex Coacervation in Microemulsion With Chitosan-gelatin

Xue Chao Zhu Yinyan, An Xueqin Niu Shaoqing Li Wenlong Wang Ling

(School of Chemistry and Environmental Science, Biofunctional Materials Key Lab of Jiangsu Province,
Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract Nanocapsules were prepared in O/W microemulsion by complex coacervation of chitosan and gelatin. The preparation conditions of polymeric nanocapsules were analyzed. The results demonstrate that the nanocapsules with size of 200~400 nm are spherical with uniform particle diameter distribution. Nanocapsule drug carrying NMP was prepared and the nanocapsules with size of 500~800 nm have entrapment efficiency of 90%.

Key words microemulsion, complex coacervation, chitosan, gelatin, nanocapsule, NMP

纳米胶囊是微胶囊中具有纳米尺寸的新型材料, 在生物医药领域主要用于包裹药物, 作为药物传递和控释的载体. 具有超微小体积的纳米胶囊的主要特性是: 可用于静脉注射, 很易通过毛细血管而不会造成血管阻塞, 用于肌肉注射时则可使药物集中在注射部位发挥药效, 且有保护药物、降低药物释放浓度、易于控制等特点^[1]. 壳聚糖作为无毒、来源丰富、具有良好的生物相容性及生物可降解性的天然物质, 近来被广泛应用为药用辅料之一^[2]. 已有报道利用单凝聚法^[3-5]、乳液复凝聚^[6,9]及反相乳液复凝聚法^[10]制备以壳聚糖为壁材的微胶囊, 但得到的载药微球粒径较大 (μm 级), 且对芯材的包封率不高. 将微乳液引入复凝聚法, 可得到粒径较小、可控的纳米胶囊^[11]. 采用壳聚糖作为包裹材料, 在微乳液中利用复凝聚法制备纳米胶囊未见文献报道. 本研究尝试以微乳液为模板, 以壳聚糖和明胶作为复凝聚的高分子材料, 旨在通过复凝聚的方法来合成纳米级的粒度均匀、尺寸可控的载药纳米胶囊, 并考察了各种因素对制备纳米胶囊的影响. 且以尼莫地平作为模型药物, 测定了该条件制备得到的载药纳米胶囊的包封率.

1 实验方法

1.1 试剂及仪器

壳聚糖 (Sigma 公司, $\text{DA} < 75\%$; viscosity 800~2000cp); 明胶 (type B, CR, 国药集团); 癸基聚葡萄糖苷 (C_{10}APG , 中国日用化学工业研究院, 气相色谱仪测得其平均组成为 $\text{C}_{10}\text{G}_{1.47}$); 正丁醇、乙酸乙酯、冰醋酸 (AR, 国药集团); 戊二醛 (BR, 国药集团, 25%). 所用水均为二次重蒸水, 并经 0.2 μm 水系滤膜过滤除

收稿日期: 2009-01-12

基金项目: 国家自然科学基金 (20673059)、江苏省普通高校自然科学基金计划 (07KJD150099) 资助项目.

通讯联系人: 安学勤, 教授, 博士生导师, 研究方向: 物理化学. E-mail: anxueqi@njnu.edu.cn

尘. 高效液相色谱仪 (Agilent LC1100); PHS- 2C 数显式 pH 计 (上海宇隆仪器); 透射电子显微镜 (日本日立公司, H 7650).

1. 2 空白纳米胶囊的制备及表征

以 C₁₀APG 为表面活性剂, 丁醇为助表面活性剂, 乙酸乙酯为油相, 按照一定比例配制得到 O/W 型微乳, 置于 40℃ 水浴中, 在微乳中滴加一定量壳聚糖溶液、明胶溶液, 搅拌至均匀, 以此溶液作为反应液. 用 10% 的 NaOH 溶液调节该反应液的 pH 值至一定值. 恒温反应一段时间. 将反应液降温至 4℃, 加入少量戊二醛交联固化. 再缓慢升温至 40℃, 加冰醋酸至 pH 的值为 4. 0 得到纳米胶囊的悬浊液.

将得到的纳米胶囊的悬浊液用二次重蒸水稀释后进行透射电镜 (TEM) 扫描.

1. 3 载药纳米胶囊的制备

将模型药物尼莫地平 (NMP) 溶于乙酸乙酯 (油相) 中, 用尼莫地平乙酸乙酯溶液代替空白纳米胶囊的制备方法中的油相 (乙酸乙酯), 按照该方法制备得到包载尼莫地平的载药纳米胶囊的悬浊液.

1. 4 载药纳米胶囊的形貌

将制得的载药纳米胶囊的悬浊液, 用重蒸水稀释 5 倍后, 进行 TEM 扫描, 获得该载药纳米胶囊的形貌和尺寸.

1. 5 载药纳米胶囊的包封率测定

液相色谱的条件^[12]: 色谱柱: Waters- C18 柱 (250 mm × 4. 6 mm, 5 μm); 流动相: 水 - 甲醇 - 乙腈 (体积比 27: 35: 38); 流速: 1. 0 mL / min; 检测波长: 237 nm; 柱温: 37℃; 进样量: 20 μL

将制得的载药纳米胶囊悬浊液, 高速离心分离 (16 000 r / min, 30 min), 取上层清液, 用流动相稀释 20 倍, HPLC 测定其中的 NMP 浓度, 根据下式计算 NMP 的包封率^[11]:

包封率 = (m_总 - m_{清液}) / m_总 * 100% ,

其中 m_总: 纳米胶囊悬浊液中 NMP 的总质量, m_{清液}: 离心后上层清液中 NMP 的质量.

2 结果和讨论

2. 1 复凝聚 pH 的选择

复凝聚是通过改变 pH, 使 2 种带有相反电荷的高分子电解质之间发生相互作用, 形成一种具有特殊性质的复合凝聚物. 前期实验表明, 明胶的等电点为 pH = 4. 8 而壳聚糖在 pH > 6. 7 时不溶解, 故反应液的 pH 范围为 5. 0~ 6. 5 有利于合成纳米胶囊. 本文中分别考察了在 pH 值为: 5. 0 5. 5 6. 0 6. 5 的反应液中采用复凝聚法合成纳米胶囊, 并用 TEM 观察所得纳米胶囊的粒径、形貌、分散性, 结果见图 1.

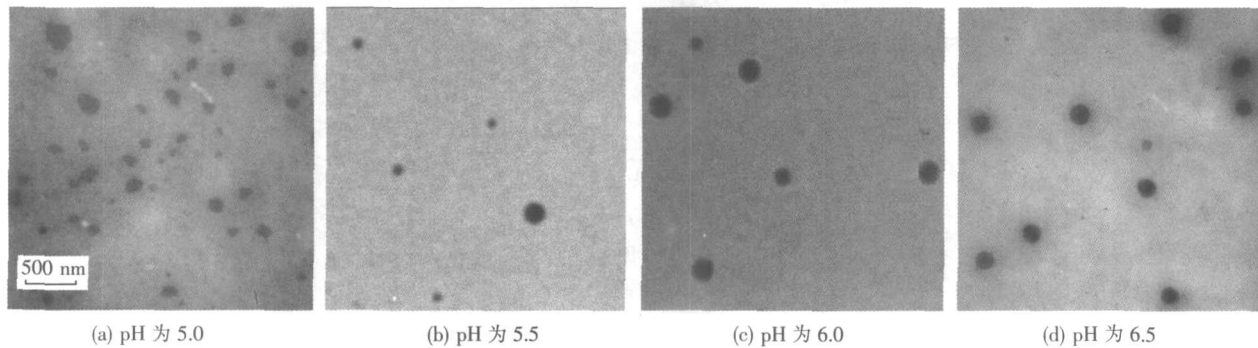


图 1 不同 pH 条件制备的纳米胶囊的透射电镜图

Fig.1 TEM photos of nanocapsules prepared in different coacervation pH

图 1 清楚表明: 随着 pH 的增加, 壁材复合凝聚物的量增加, 纳米胶囊逐渐形成, 且粒径渐大. 当 pH 介于 6. 0~ 6. 5 之间, 壳聚糖分子所带的正电荷量和明胶所带的负电荷量基本相等, 复凝聚反应完全, 能形成粒度均匀、分散性较好的球形纳米胶囊. 但 pH 小于 6. 0 形成的复合凝聚物的量太少, 无法完全包埋药物, 导致了纳米胶囊效率的降低.

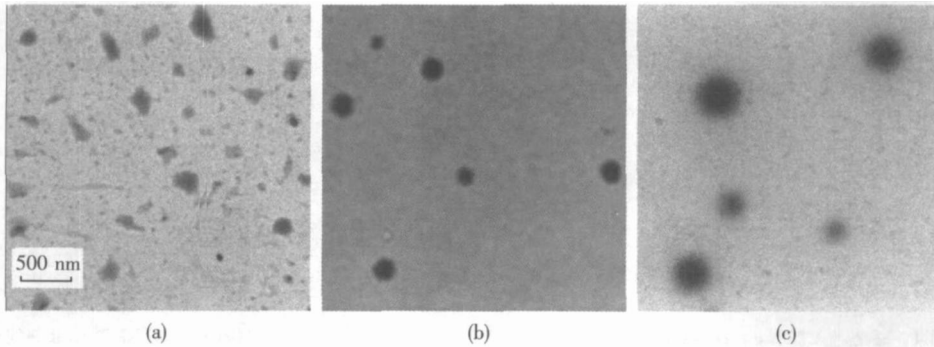
2. 2 复凝聚时间的选择

复凝聚的时间对纳米胶囊的粒径分布及分布宽度有较大影响. 本文分别考察了在 pH 6. 0 的反应液中

合成纳米胶囊的不同复凝聚时间 (10 m in 20 m in 30 m in 40 m in)对纳米胶囊合成的影响. 研究结果表明, 复凝聚最佳时间为 30 m in 低于该时间, 壳聚糖与明胶间的凝聚未完全, 所得纳米胶囊的颗粒较少, 效率较低; 高于该时间, 纳米胶囊的尺寸较大, 且粒径分布变宽.

2.3 交联剂的量的确定

复凝聚法制备纳米胶囊的固膜交联过程就是让包埋在药物表面的高分子物质相互交联, 囊膜封闭, 从而使药物完全被包覆, 获得稳定的纳米胶囊. 本实验将反应液 (此时体积约为 3 mL) 的温度降低至 4℃后, 分别加入 0.1 mL、0.25 mL、0.5 mL 戊二醛固化.



在体积约 3 mL 的反应液中加入戊二醛的量 a: 0.1 mL; b: 0.25 mL; c: 0.5 mL

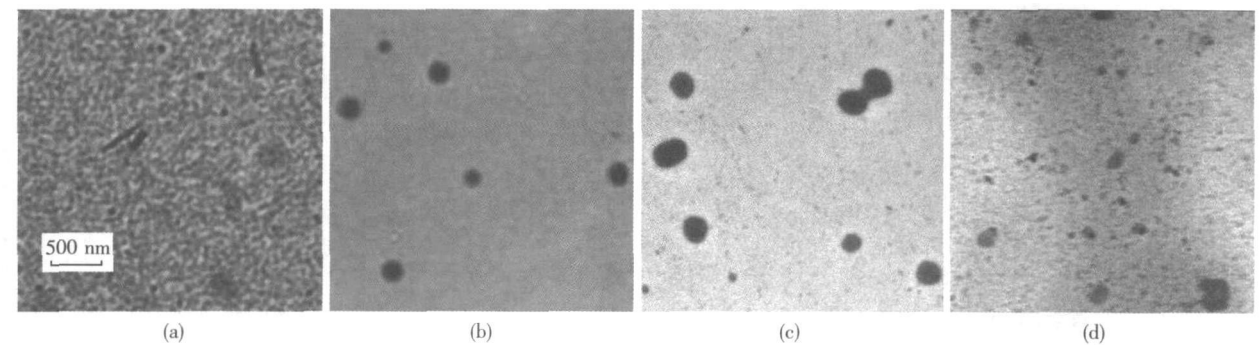
图 2 不同交联剂的量制备的纳米胶囊的透射电镜图

Fig.2 TEM photos of nanocapsules prepared with different amounts of crosslinker

电镜的结果见图 2 实验表明: 交联剂的量为 0.25 mL~0.5 mL 时, 均能得到分散性好、规则、呈球形的纳米胶囊. 戊二醛用量太少, 明胶与壳聚糖交联不完全, 未能形成规则的纳米胶囊. 而交联剂的量增加, 发生交联的高分子增多, 纳米胶囊的粒径增大.

2.4 交联时间的确定

交联是纳米胶囊制备过程中很重要的一个环节, 有效地防止因复凝聚反应中逆反应的发生所导致的复合物及其所形成微胶囊的分解, 故交联时间是合成纳米胶囊的重要参数. 本实验将反应液的温度降低至 4℃后, 加入 0.25 mL 戊二醛, 控制固化时间分别为: 30 m in 60 m in 90 m in 120 m in.



交联时间 a: 30 min; b: 60 min; c: 90 min; d: 120 min

图 3 不同交联时间制备的纳米胶囊的透射电镜图

Fig.3 TEM photos of nanocapsules prepared with different crosslinking time

电镜的结果 (见图 3) 表明: 交联时间太短, 高分子电解质未能完全交联, 形成胶囊的量较少. 而交联时间过长, 则会导致形成的胶囊相互间发生交联, 形状不规则, 甚至在搅拌作用下, 囊壁破碎, 得到的成型胶囊少. 故本实验最佳的交联时间为 60 m in.

2.5 载药纳米胶囊的形貌

根据“实验方法”1.3 中的方法制备了包载 NMP 的纳米胶囊, 透射电镜观察到该方法制备的载药纳米胶囊的形貌如图 4 所示.

电镜结果表明: 载药胶囊呈球形, 单分散性好, 规则, 平均粒径为 500~800 nm, 较空白纳米胶囊的粒径大.

2.6 包封率的测定

2.6.1 标准曲线的制作

取 NMP 约 10.0mg 精密称量,置 50mL 量瓶中,加流动相至刻度溶解,超声 5 m in 精取适量 (0.25 0.5 0.75 1 1.25 1.5 1.75 2 2.5mL),加流动相配成 10~ 100 ug /mL 系列标准溶液,按照色谱条件进样,以峰面积为纵坐标 A,浓度为横坐标 c,进行线性回归.

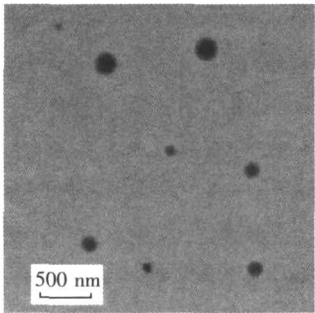


图 4 载药纳米胶囊的包射电镜图

Fig.4 TEM photo of NMP loaded nanocapsules

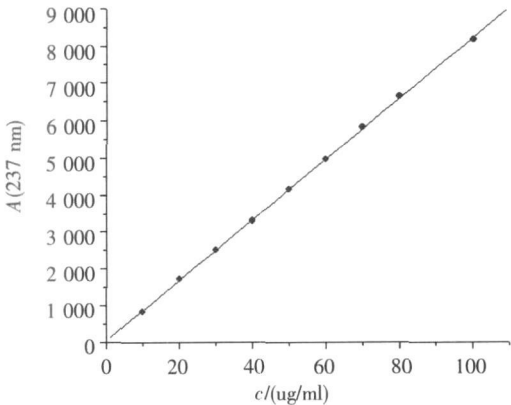


图 5 HPLC 测定 NMP 标准曲线图

Fig.5 The standard curve of NMP for HPLC

标准曲线方程: $A = 44.89774 + 81.83244c$ $R = 0.9998$

2.6.2 载药纳米胶囊包封率的测定

制备 3 份平行载药纳米胶囊样品, NMP 在纳米胶囊中的包封率用液相色谱法进行测定,结果见表 1

结论:按照本实验得到的最佳制备条件制得的载药纳米胶囊中 NMP 的包封率较高,约为 90% .

表 1 NMP 载药纳米胶囊的包封率

Table 1 The encapsulation efficiency of NMP loaded nanocapsules

| 载药纳米胶囊 | 样品 1 | 样品 2 | 样品 3 |
|--------|------|------|------|
| 包封率 % | 91.2 | 90.8 | 87.9 |

3 结论

本实验利用微乳液作为模板,以明胶和壳聚糖为包裹材料,用复凝聚的方法合成纳米胶囊,通过考察各种因素对纳米胶囊的影响,确定了最佳制备条件:复凝聚 pH 为 6.0~ 6.5 复凝聚时间为 30 m in; 交联剂的量为 0.25mL~ 0.5mL; 交联剂时间为 60 m in,可以得到粒度均匀、粒径较小的空白纳米胶囊.采用 NMP 作为模型药物,实验得到载药纳米胶囊的单分散性好、规则,包封率达到 90%,是脂溶性药物的良好载体.

[参考文献]

[1] 张团红,胡小玲,乔吉超,等. 纳米胶囊的制备与应用进展 [J]. 材料科学与工程学报, 2007, 25(1): 143-146
[2] 林爱华,平其能. 壳聚糖载药纳米粒研究进展 [J]. 药学专论, 2006 15(21): 25-27.
[3] 刘文波,宋湛谦,于钢,等. 壳聚糖单凝聚法制备超细胶囊研究 [J]. 林产化学与工业, 2005, 3(25): 115-119
[4] Vasilu S Popa M. Polyelectrolyte capsules made of two biocompatible natural polymers [J]. European Polymer Journal 2005, 41(5): 923-932
[5] 王锦成,陈思浩,徐子成,等. 辣椒素的纳米胶囊的合成及性能研究 [J]. 化工新型材料, 2007, 35(2): 55-57.
[6] Camen Remunan-Lopez et al Effect of formulation and process variables on the formation of chitosan-gelatin coacervates [J]. Intemational Journal of Pharmaceutics 1996, 135(1/2): 63-72
[7] 李强,吴彩娥. 明胶-壳聚糖复凝聚法制备八角茴香油微胶囊 [J]. 中国粮油学报, 2007, 3(22): 122-125
[8] 吴婉莹,李云谷. 金雀异黄酮壳聚糖微球的制备方法 [J]. 中国中药杂志, 2002, 27(5): 353-355
[9] 李柱来,王津,陈莉敏,等. 头孢曲松壳聚糖-海藻酸钠(钙)微球制备及性能研究 [J]. 中国抗生素杂志, 2008 33(6): 355-358
[10] 王碧,刘凯,张良英. 2,4-D 在明胶-壳聚糖微球中的包埋与释放 [J]. 内江师范学院学报, 2008 6(23): 57-60
[11] 朱银燕,张高勇,洪昕林,等. 微乳中纳米胶囊的复凝聚制备 [J]. 化学学报, 2005, 63(16): 1505-1509
[12] 何选林,王群英. 高效液相色谱法测定尼莫地平原料的含量 [J]. 药物鉴定, 2008, 17(6): 34

[责任编辑: 顾晓天]