

·研究简报·

热磁双重响应性载药微囊的制备及其性能研究*

容建华^{1**} 段泰炜¹ 温鸿戈¹ 屈小中²

(¹暨南大学材料科学与工程系 广州 510632)

(²中国科学院化学研究所 高分子物理与化学国家重点实验室 北京 100190)

摘 要 采用LbL模板技术,将天然聚电解质壳聚糖CS和海藻酸钠ALG、磁性纳米颗粒 Fe_3O_4 或带负电荷或双亲性磷脂在单分散胶体表面进行组装,制备了一种具有热磁双重响应性的新型载药微囊.通过透射电镜、激光共聚焦显微镜、zeta-电位分析仪、紫外分光光度计等对微囊结构及载药、释药性能进行了表征.实验结果表明:微囊的载药量最高可达到22.40%,且具有磁导向作用.微囊外层组装具有热敏性质的磷脂层能有效地克服壳聚糖/海藻酸钠微囊通透性大而导致在较低温(正常生理环境)的输送过程中药物泄漏问题,而在较高温条件下又可使药物迅速释放,从而实现药物的可控释放.

关键词 逐层自组装, 微囊, 磷脂, 磁性纳米颗粒, 药物缓释

逐层(LbL)自组装技术是利用静电引力,在带电的表面上吸附带相反电荷的聚电解质、大分子和纳米粒子等,从而形成多层复合膜.1998年德国Max-Planck胶体与界面研究所的Möhwald教授等首次利用层-层(LbL)自组装模板技术制备了聚合物微囊^[1,2].目前人们已经利用基于经典的静电引力以及新发展的氢键、共价键作用力的层层自组装模板法,制备了各种纳米胶囊^[3~7].这一技术由于能够方便地在纳米尺度上调控膜壁的结构、组成和厚度,而具有其它方法所没有的优势,成为近年来广受瞩目的一项新技术.

Fe_3O_4 纳米颗粒生物相容性好,无毒副作用,可用于生物医学多个领域,如细胞标记和分离、核磁共振造影剂、导向药物载体和肿瘤磁热疗法等.大量研究表明磁性包药微球具有较强的磁性,在外磁场作用下能够实现靶向给药^[8~10].磷脂在溶液中能够形成具有有序结构的双分子层薄膜,当温度至其相转变温度(通常39~40℃)时双分子层脂质体中疏水链可从有序排列变为无序,从而引起一系列变化,如膜的厚度变小,流动性、通透性增加,聚集和结合蛋白质等生物学性质改变等^[11].Gaber等^[12]利用其相转变特性,以二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)和单棕榈酰磷脂酰胆碱(MPPC)为原料制备了热敏性脂质体,结果显示该载药脂质体在升温至39~40℃时可实现药

物释放,具有良好的温度控释特性.

本文利用LbL模板法,以壳聚糖CS和海藻酸钠ALG两种天然聚电解质为基质,制备可降解载药微囊,通过引入 Fe_3O_4 纳米颗粒和带负电荷的热敏性磷脂(lipid)分别赋予载药微囊磁靶向功能和热敏效应.以阿霉素为药物模型,分别考察了微囊的磁效应和热效应,为制备生物相容性好、高效且具有精确靶向性的载药微囊打下良好的基础.

1 材料与仪器

壳聚糖(CS,黏度20 mPa·s, Sigma),海藻酸钠(ALG,黏度250 mPa·s, Sigma),盐酸阿霉素(DOX,浙江海正药业),二棕榈磷脂酸(DPPA, Fluka),二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC, Sigma),氯化铁,2-吡咯烷酮,氯仿,戊二醛和四氢呋喃均为分析纯,实验中所用水电阻率为18.2 MΩ·cm.

透射电子显微镜(TECNAI 10, Philips Co., Netherlands), zeta-电位分析仪(zetaPALS, Brookhaven Co., USA),激光共聚焦显微镜(Zeiss LSM 510, Philips Co., Netherlands),紫外可见分光光度计(754PC,上海菁华科技仪器有限公司).

2 磁性 Fe_3O_4 的制备

采用热分解还原法制备了 Fe_3O_4 纳米粒子^[13].称取一定量的 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 于100 mL三口瓶中,加入2-吡咯烷酮50 mL,超声粉碎至完全溶

* 2009-09-25 收稿,2009-11-23 修稿;国家自然科学基金(基金号20604010)和暨南大学“211工程”生物材料与组织工程创新基金(基金号50621030)资助项目; ** 通讯联系人, E-mail: trng@jnu.edu.cn

解,通入 N_2 除氧 20 min. 在 800 r/min 速度搅拌下,加热至 2-吡咯烷酮的回流温度(251.7℃),反应一定时间后空冷到室温,得到黑褐色液体. 将甲醇-乙醚的混合沉淀液($V_{\text{甲醇}}:V_{\text{乙醚}}=1:3$) 150 mL 加入反应液中,然后以 9000 r/min 高速离心,收集黑色沉淀物,用丙酮洗涤 3 次后真空干燥,即可得纳米颗粒.

3 CS-ALG 微囊及 CS-ALG 磁性微囊的制备

将分散法制备的直径约 2 μm 的聚苯乙烯(PS)微球分散于水中,超声 10 min,配成约 1% 的悬浮液. 然后加入等体积的 CS 溶液(1 mg/mL, $\text{pH}=3.8$, $c_{\text{NaCl}}=0.2 \text{ mol/L}$)中,轻轻搅拌 20~30 min,以保证吸附达到平衡. 将所得悬浮液离心(3500 r/min, 8 min),移去上层清液,再将下层胶粒重新分散到超纯水中,重复此离心/洗涤/再分散过程 3~4 遍,除去过量的 CS,最后将洗涤干净的胶粒重新分散于水中. 在组装有一层 CS 的 PS 粒子悬浮液中加入等体积的 ALG 溶液(1 mg/mL, $c_{\text{NaCl}}=0.5 \text{ mol/L}$),轻轻搅拌 20~30 min,再将该悬浮液离心洗涤,过程如上所述. 在 PS 微球表面交替重复以上 CS 和 ALG 的吸附过程 5 次,得到 5 个双聚电解质层的壳-核型的胶体粒子 $\text{PS}/(\text{CS}/\text{ALG})_5$. 然后以带正电的纳米 Fe_3O_4 颗粒分散液(1 mg/mL)替代壳聚糖溶液进行组装,在壳-核型胶体粒子表面组装 Fe_3O_4 磁性纳米粒子,最后最外层组装一层 ALG 聚电解质.

取制得的包有 ALG、CS 和 Fe_3O_4 的壳-核型微球,加入一定量 1% 的戊二醛水溶液,室温下搅拌反应 12 h,使其中的壳聚糖发生交联. 将交联后的胶体粒子重复离心/洗涤/再分散的过程,除去过量的戊二醛.

取交联后的胶体微粒浸入四氢呋喃(THF)溶剂中,浸泡 12 h,离心分离. 重复此除核过程 3~5 次,以使 PS 核完全除去,从而得到中空微囊 $(\text{CS}/\text{ALG})_5 \text{Fe}_3\text{O}_4 \text{ALG}$. 去核后的微囊用去离子水反复洗涤几次,除去 THF,于冰箱中低温保存,备用.

4 盐酸阿霉素(DOX)在微囊中的装载

取一定量微囊分散液,加入到一定浓度的 DOX 溶液,一定温度下培养 12 h. 然后将上述混合溶液离心,去除上清液后用 $\text{pH}=7.4$ 的磷酸盐缓冲溶液(PBS)洗涤一次,然后用 PBS 稀释至一定浓度,以 PBS 作参比液,使用紫外可见分光光度计测定峰值 253 nm 处的吸收值. DOX 的标准曲线方程同样采用 253 nm 处的吸收值获得.

载药量 = (系统中的总药量-液体介质中未包封的药量)/微囊总质量 $\times 100\%$

5 热敏性磷脂的组装

分别称取一定量的磷脂, DPPC、DPPA 和 90% DPPC-10% DPPA,溶于氯仿,配成浓度为 0.5 mg/mL 溶液. 将氯仿溶液置于旋转蒸发仪中,在 40℃ 下旋蒸成膜. 待溶剂蒸干后,加入一定量去离子水,使得磷脂的浓度为 1 mg/mL,超声分散 5 min,分别得到 3 种磷脂水分散液.

将制备好的载药微囊分散液离心去掉上清液,再分别加入磷脂水分散液(DPPA, DPPC, DPPA/DPPC),在较低转速下搅拌 30 min,保证充分吸附. 将所得微囊用去离子水离心洗涤 3 次,除去多余的磷脂,最后用 $\text{pH}=7.4$ 的 PBS 分散备用.

热磁敏感微囊的组装全过程见图 1.

6 载 DOX 微囊的释药性能测试

将一定量载药微囊装入透析袋,放入一定 pH 值的 PBS 透析液中,缓释体系的溶液总体积为 10 mL. 将缓释体系置于 37℃ 的恒温水浴振荡器中,每间隔一定时间,取样 2 mL,同时加入 2 mL 的 PBS 溶液,维持缓释体系的体积恒定. 将取得的样品溶液稀释,测定其在 253 nm 处的紫外吸收峰值,通过标准曲线方程得出样品的药物浓度.

7 载药微囊表征

使用 zeta-电位分析仪(ZetaPALS, 美国 Brookhaven 公司)测定胶体粒子表面电位在组装过程中的变化. 测试在中性水溶液中进行,每个数据测 3 次,取平均值;将 PS 微粒和微囊分散于水中,取少量分散液滴在镀有碳膜的铜网上,常温干燥,在透射电镜下(TECNAI 10, 荷兰 Philips 公司)观察;由于 DOX 自身可在 560~590 nm 范围内发射荧光,利用激光共聚焦显微镜可观察微囊的载药情况,新制备的载药微囊在激光共聚焦显微镜(Zeiss LSM 510, 荷兰 Philips 公司)下观察. 氧化铁纳米粒子磁性能采用振动样品磁强计(VSM)(BHV2525, 日本理研电子公司)进行检测.

8 微囊的制备及表征

热磁敏感微囊组装过程如图 1 所示. 以微米级聚苯乙烯微球为模板,采用 LbL 技术,首先将壳聚糖 CS 和海藻酸钠 ALG 两种天然聚电解质组装到颗粒表面,形成一定厚度的膜,然后将带正电荷的 Fe_3O_4 纳米颗粒和带负电荷的磷脂(lipid)组

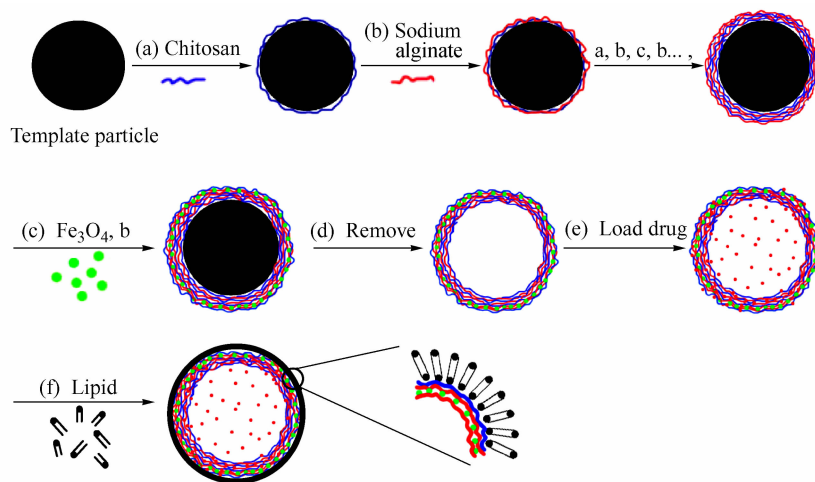


Fig. 1 Schematic illustration of the preparation of the drug loaded microcapsules with thermo- and magnetic-sensitivities

装到颗粒外层,去核后形成微囊;装载药物后,在载药微囊表面组装一层结构致密的磷脂膜,一方面有效地克服壳聚糖/海藻酸钠微囊通透性大而导致的药物泄漏的问题,另一方面引入热效应,使得微囊在较高温下释药。采用透射电子显微镜分别对模板微粒、 $(\text{CS}/\text{ALG})_5$ 聚电解质微囊、 $(\text{CS}/\text{ALG})_5 \text{Fe}_3\text{O}_4 \text{ALG}$ 磁性微囊,磁性载药微囊进行了表征。结果如图 2(a) 所示,合成的 PS 微球直径在 $2 \mu\text{m}$ 左右,表面光滑且具有较好的单分散性。

图 2(b) 为 $(\text{CS}/\text{ALG})_5$ 微囊,其尺寸比模板略大一些,这是因为在去核过程中,聚合物在微囊中的溶解产生了高渗透压,使微囊发生膨胀的缘故。从磁性微囊(图 2c 和 2d)结构中可观察到磁性粒子均匀分布于微囊表面,磁性粒子粒径约为 $5 \sim 10 \text{ nm}$ 。图 2(e) 和 2(f) 分别为热敏磁性载药微囊的 TEM 图片和激光共聚焦显微图片,微囊边缘颜色相对较深,可以推断大部分的 DOX 吸附在微囊表面和微囊层内,微囊内部药量较少。

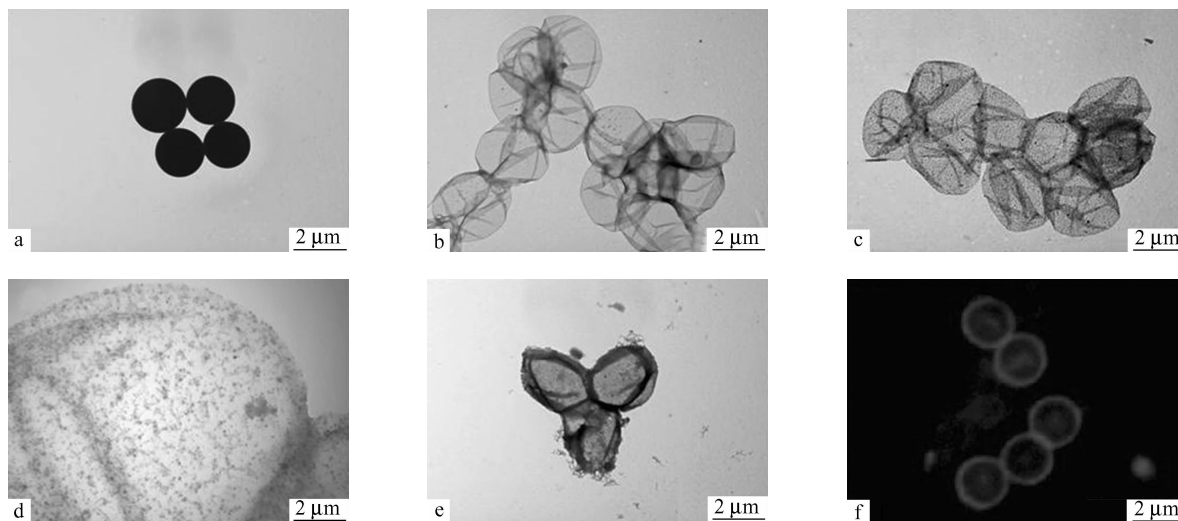


Fig. 2 TEM images of the (a) PS template, (b) $(\text{CS}/\text{ALG})_5$ microcapsules, (c, d) $(\text{CS}/\text{ALG})_5 \text{Fe}_3\text{O}_4 \text{ALG}$ magnetic capsules, (e) $(\text{CS}/\text{ALG})_5 \text{Fe}_3\text{O}_4 \text{ALG}/\text{DOX}$ microcapsules, (f) LSM image of the $(\text{CS}/\text{ALG})_5 \text{Fe}_3\text{O}_4 \text{ALG}/\text{DOX}$ microcapsules

图 3 给出了在逐层自组装过程中,PS 微球表面组装聚电解质及微粒后的 zeta-电位转变。在组装一层壳聚糖后,胶体粒子的 zeta-电位从 -28.04 mV 反转到 $+17.04 \text{ mV}$,而在组装上一层

海藻酸钠以后,电位变换为 -21.06 mV , Fe_3O_4 颗粒表面带有正电荷,组装后使微粒电位转变为 $+18.04 \text{ mV}$,最后组装的 ALG 层将胶粒表面电位转换为 -23.02 mV 。胶粒表面的电位转换过程,

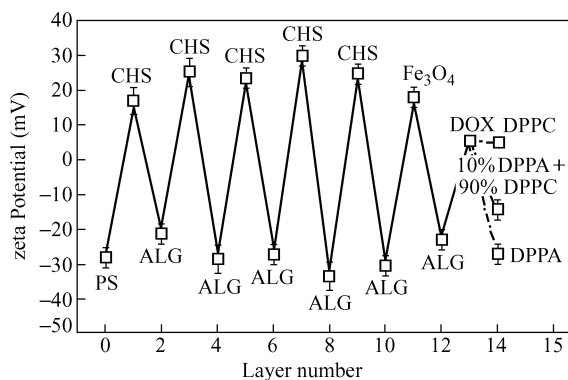


Fig. 3 zeta-potential of the polyelectrolyte deposited on the PS particle and of the magnetic microcapsules after being loaded with drug and deposited with lipids

说明了具有相反电荷的聚电解质和纳米颗粒能够成功组装到胶粒表面。除核并装载药物 DOX 后, 由于 DOX 在中性溶液中带微弱正电荷, 因此微囊表面 zeta-电位由 -23.02 mV 转为 $+5.31 \text{ mV}$ 。然

后在载药微囊表面分别组装磷脂 DPPA、DPPC 或复合磷脂 DPPC-DPPA,微囊的 zeta-电位分别转变为 -27.04 mV , $+5.04 \text{ mV}$, -14.17 mV DPPA 带负电荷,电荷的转变能够保证 DPPA 组装到微囊表面,但 DPPC 为中性磷脂,因此尚不能确定 DPPC 是否在微囊表面形成磷脂膜。

9 磁性微囊的磁响应性测定

将磁性微囊分散在超纯水中后,置于永久磁场中,随时间延长,磁性微囊逐渐向磁铁聚集,60 min 后,悬浮液中的水基本澄清(见图 4a~d),表明磁性微囊具备了磁导向作用,具有药物磁靶向治疗的潜在功能.去除磁场后,微囊能够重新均匀分散,可以有效地避免栓塞现象,四氧化三铁纳米颗粒的磁滞回线(图 5)中磁化曲线过零点,矫顽力 H_c 为零,剩余磁化强度 $M_r = 0$,说明样品在室温下均有超顺磁性,从而验证了微囊的可重新分散性.

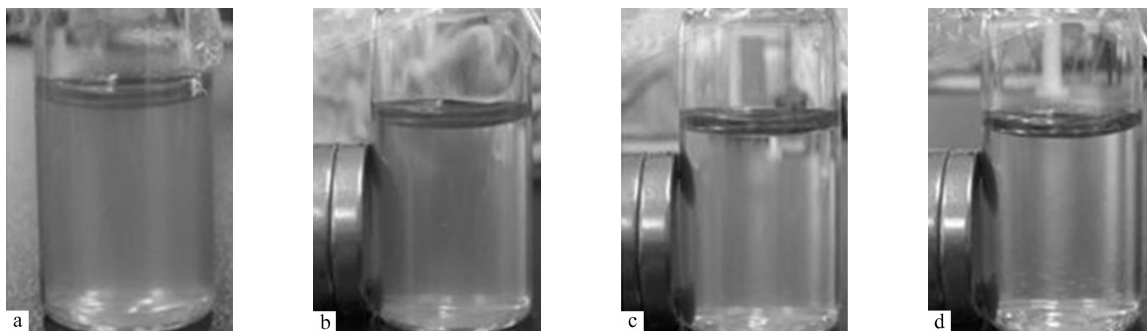


Fig. 4 Images of the magnetic capsules placed in the permanent magnetic field (a) no magnetic field, (b) 15 min, (c) 30 min, (d) 60 min

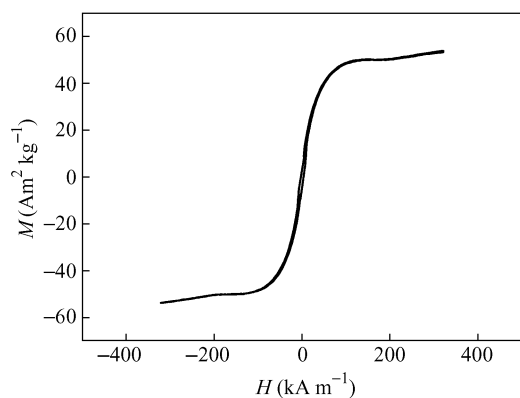


Fig. 5 Magnetization curves for Fe_3O_4 magnetic nanoparticles

10 药物的包覆

以阿霉素为模型药物,分别考察了药物初始浓度和温度对微囊载药量的影响.由图 6(a)可以

看出,随着药物浓度的增加,单位质量的微囊的载药量呈非线性增加,最高可以达到 16.78%,表明微囊载药量对微囊外部溶液的药物浓度增大而升高.图 6(b)显示在初始药物浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 时,随温度的升高,微囊的载药量增加,60 $^{\circ}\text{C}$ 时载药量可达 22.48%.这可能缘于聚电解质凝胶的热溶胀特性,由于温度升高减弱了聚电解质内部的离子键和氢键等相互作用,水对聚合物的溶剂化作用加强,使得链伸展,引起聚电解质层发生膨胀,从而为药物装载提供更多的空间,温度降低回复到室温后,聚电解质分子链回缩,从而包覆更多的药物.

11 热响应性药物释放

对无磷脂层和组装不同磷脂(即 DPPA, DPPC, DPPA/DPPC)层的载药微囊进行药物缓释

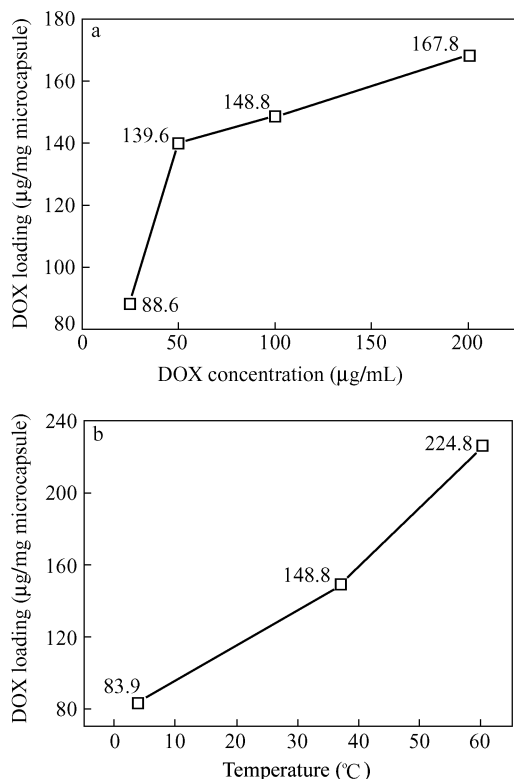


Fig. 6 The influence on the drug loading amount of the microcapsules

a) Drug concentration; b) Incubation temperature

效果考察. 本文中所选用的磷脂具有热敏性能, 即其在溶液中能够形成具有有序结构的双分子层薄膜, 当温度至其相转变温度(通常 $39 \sim 40^{\circ}\text{C}$)时双分子层脂质体中疏水链可从有序排列变为无序, 使膜的厚度变小, 流动性、通透性增加. 利用此特性, 我们将磷脂组装到微囊表面, 在低于其相变温度时磷脂保持致密结构从而防止输送过程中药物的泄露, 而到达靶向位点时通过升温作用致密结构遭到破坏, 药品随聚电解质的溶胀和降解而缓慢释放. 因此我们在两种温度下考察微囊的缓释效果, 即先将各缓释体系分别置于 37°C 的恒温水浴振荡器中恒温释放 12 h, 然后升温至 40°C 继续恒温释放, 整个缓释期间每隔 1 或 2 h 取样测试缓释液浓度. 对比图 7 中 4 条曲线可发现, 37°C 恒温释放 12 h 后, 无磷脂层载药微囊的累积释放量最高, 达到 51%, 而组装有 DPPA 的载药微囊药

物释放量最小, 约为 43%, 组装有 DPPC 和复合磷脂膜的载药微囊位于两者之间. 这一结果表明磷脂膜的存在, 在一定程度上延缓了载药微囊的药物泄露, 但可能由于所形成的磷脂膜结构有序致密性并不理想, 所以不能完全防止药物的泄露. 而含 DPPA 膜微囊效果较好, 可能是由于 DPPA 带有负电荷, 使得较多的磷脂组装在微囊表面, 从而膜的结构相对更加致密所致. 当温度升高时, 无磷脂层载药微囊的药物缓释效果没有明显变化, 而含磷脂膜微囊的药物缓释出现突变, 药物释放量突然增加, 这可能是当温度达到磷脂膜的相转变温度以上, 膜破裂导致通透量增加所造成的. 这再次证明磷脂膜确实起到了阻止药物无效释放的作用, 但阻止效果有待进一步改善.

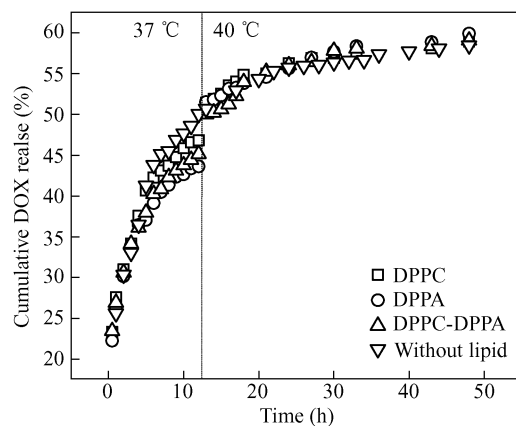


Fig. 7 Releasing curve of the DOX released from microcapsules deposited with different lipid components before and after phase-transition temperature

12 结论

本文通过 LbL 模板技术, 制备了具有磁性和热敏性的载药微囊, 形成的微囊直径约为 $2 \mu\text{m}$, 通过调整药物初始浓度和载药温度, DOX 载药量可达 22.40%; 微囊具有磁响应性, 另外微囊的热敏药物缓释结果显示磷脂膜的存在能够阻止药物输送过程中的无效释放, 磷脂膜的存在能够使微囊在正常生理环境下具有较低的释放速度, 而在较高温度下促进药物释放, 从而实现的药物的可控释放.

REFERENCES

- Caruso F, Caruso R A, Möhwald H. Science, 1998, 282: 1111 ~ 1116
- Zhang Xi (张希). Acta Polymerica Sinica (高分子学报), 2007, (10): 905 ~ 912
- Georgieva R, Moya S, Hin M, Mitlöhner R, Donath E, Kiesewetter H, Möhwald H, Bäuml H. Biomacromolecules, 2002, 3: 517 ~ 524

- 4 Caruso F. *Top Curr Chem*, 2003, 227: 145 ~ 168
- 5 Zhang Y J, Guan Y, Yang S G, Xu J, Han C C. *Adv Mater*, 2003, 15: 832 ~ 835
- 6 Shenoy D B, Antipov A A, Sukhorukov G B, Möhwald H. *Biomacromolecules*, 2003, 4: 265 ~ 272
- 7 Ye S Q, Wang C Y, Liu X X, Tong Z. *J Biomater Sci, Polym Ed*, 2005, 16: 909 ~ 923
- 8 Neuberger T, Schopf B, Hofmann H, Hofmann M, Rechenberg B. *J Magn Magn Mater*, 2005, 293: 483 ~ 496
- 9 Hu S H, Tsai C H, Liao C F, Liu D M, Chen S Y. *Langmuir*, 2008, 24: 11811 ~ 11818
- 10 Wang S H, Shi X Y, van Antwerp M, Cao Z, Swanson S D, Bi X, Baker J R Jr. *Adv Funct Mater*, 2007, 17: 3043 ~ 3050
- 11 Gaber M H, Hong K, Huang S K, Papahadjopoulos D. *Pharm Res*, 1995, 12: 1407 ~ 1411
- 12 Moya S, Donath E, Sukhorukov G B, Auch M, Bäuml H, Lichtenfeld H, Möhwald H. *Macromolecules*, 2000, 33: 4538 ~ 4544
- 13 Li Z, Sun Q, Gao M. *Angew Chem Int Ed*, 2005, 44: 123 ~ 126

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF THE DRUG LOADED MICROCAPSULES WITH THERMO- AND MAGNETIC-SENSITIVITIES

RONG Jianhua¹, DUAN Taiwei¹, WEN Hongge¹, QU Xiaozhong²

(¹Department of Materials Science and Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632)

(²State Key Laboratory of Polymer Physics and Chemistry,
Institute of Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190)

Abstract A novel targeted carrier of drug loaded microcapsules with thermo- and magnetic-sensitivities was fabricated by the layer-by-layer self-assembly technique. Natural polyelectrolytes such as chitosan and sodium alginate, magnetic nanoparticles Fe_3O_4 , and lipid dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphate (monosodium salt) (DPPA), (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) (DPPC) or their composite 10% DPPA/90% DPPC were used as components of microcapsule. The structure, drug loading and thermo-sensitive drug release of the microcapsules were characterized by TEM, SEM, laser scanning confocal microscope and ultraviolet spectrophotometer. The results showed that positive Fe_3O_4 nanoparticles with superparamagnetic property were successfully assembled on the microcapsules, which could be effectively trapped by solid permanent magnet. The drug entrapment efficiency is affected by the drug concentration and the temperature. The highest drug loading amount could reach to 22.40% when the temperature reached 60°C. The drug release properties of microcapsules were measured at 37°C and 40°C, which were lower and higher than the phase transition of DPPA lipid film respectively. The results showed that the microcapsules with lipid film were sensitive to temperature. The thermo-sensitive lipid film assembled on the surface of microcapsule could effectively prevent drug from being released at the lower temperature, which will favor the drug to reach the targeted site with less drug loss.

Keywords Microcapsule, Drug delivery, Magnetic nanoparticle, Lipid, Thermo-sensitivity