

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.08.09

壳聚糖-海藻酸钠载药微球制备工艺研究

史同瑞,崔宇超*,王丽坤,朱庆贺,杨旭东,张艳,高俊峰

(黑龙江省农业科学院畜牧兽医分院,黑龙江齐齐哈尔 161005)

[收稿日期] 2019-05-12 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 08-0056-10 [中图分类号] S859.79

[摘要] 为研究制备壳聚糖-海藻酸钠载药微球的新方法,研究采用 D 相乳化法,结合微乳及胶体制备技术,以硫酸小檗碱为模型药物,以药物包封率为评价指标,应用单因素试验考察了氯化钙溶液浓度、海藻酸钠溶液浓度、壳聚糖溶液浓度,以及初次凝胶时间对微球性能的影响。应用响应面法筛选优化了载药微球的制备工艺。结果表明,在微球制备及药物包封率的影响因素中,海藻酸钠溶液浓度、氯化钙溶液浓度对评价指标的影响最大,其次是壳聚糖溶液浓度和初次凝胶时间,筛选优化的载药微球生产工艺条件为海藻酸钠溶液浓度 1.57%,氯化钙溶液浓度 2.13%,壳聚糖溶液浓度 0.86%,初次凝胶时间 30.71 min,该条件下制备微球的平均粒径为 329 nm,药物包封率 94.09%。验证试验证实,本工艺可制备优良的硫酸小檗碱壳聚糖-海藻酸钠微球,且制备工艺简便,生产效率高,本技术为微球制剂的产业化生产奠定了一定基础。

[关键词] 壳聚糖;海藻酸钠;微球;制备工艺;包封率

Study on Preparation Process of Chitosan - Sodium Alginate Drug - loaded Microspheres

SHI Tong - rui, CUI Yu - chao*, WANG Li - kun, ZHU Qing - he,

YANG Xu - dong, ZHANG Yan, GAO Jun - feng

(Animal Husbandry and Veterinary Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Qiqihaer, Heilongjiang 161005)

Corresponding author: CUI Yu - chao, E - mail: chaoxixi_3553@126.com

Abstract: In order to develop a new method for preparing chitosan - sodium alginate drug - loaded microspheres, the D - phase emulsification method, combined with microemulsion and colloid preparation method was used in this study. Single - factor tests were used to investigate the effects of calcium chloride concentration, sodium alginate concentration, chitosan concentration and gel - forming time on the performance of microcapsules taking berberine sulfate as a model drug, and the drug encapsulation efficiency as evaluation index. The preparation process of drug - loaded microspheres was optimized by response surface methodology. The results showed that among the factors of

基金项目: 黑龙江省科研机构创新能力提升专项计划(YC2016D004)

作者简介: 史同瑞,硕士,从事动物疾病防治与兽药研究开发。

通讯作者: 崔宇超。E - mail: chaoxixi_3553@126.com

microsphere preparation, sodium alginate concentration and calcium chloride concentration had the greatest influence on the evaluation index, followed by chitosan concentration and gel-forming time of microspheres. The optimized drug-loaded microsphere preparation process was sodium alginate concentration of 1.57%, calcium chloride concentration of 2.13%, chitosan concentration of 0.86% and gel-forming time of 30.71 min. The average particle diameter of the prepared microspheres was 329 nm, and the drug encapsulation efficiency was 94.09%. The verification experiment confirmed that the application of the test process can prepare excellent berberine sulfate chitosan-sodium alginate microspheres, and the preparation process is simple and the production efficiency is high. The technology provided a basis for the industrial production of microsphere preparations.

Key words: chitosan; sodium alginate; microspheres; preparation process; encapsulation efficiency

微球 (microspheres, MS) 是指将药物溶解、分散、吸附或包裹在聚合物载体材料中,并制成载药的球状微粒。微球粒径一般是在 1 ~ 1000 μm 范围内,常见的微球粒径为 1 ~ 40 μm ,小于 1 μm 的微球称为纳米微球^[1]。微球作为一种载体体系,已在药物载体、酶固定化、细胞培养微反应器、基因运载等方面开展了较为深入的研究^[2,3]。微球作为药物的包封、缓释、控释与靶向释放的药物载体,具有保护敏感药物成分免受胃肠道环境破坏,提高药物稳定性,延长药物作用时间,提高药物的生物利用度等许多优点,因此,微球作为药物的载体具有广阔的开发应用前景^[4,5,6]。

微球多采用明胶、壳聚糖、海藻酸钠等可生物降解的高分子无毒天然材料制备而成,制备方法常采用滴注法、喷雾法、原位聚合法、静电法和乳化法等方法,然而这些方法均存在着一定的弊端:一是需要使用化学有机溶剂,这不仅会造成毒性物质残留等问题,而且还可能导致药物丧失活性;二是需要复杂的生产设备,生产效率低,这给载药微球产业化生产造成了障碍^[7],研究开发安全、简便、高效的生产方法是微球制剂实现产业化的技术需求。本试验结合微乳及胶体制备工艺^[8],采用 D 相乳化法,以硫酸小檗碱为模型药物,以药物包封率为评价指标,应用响应面法筛选优化了微球的制备工艺,并制备了优良的硫酸小檗碱壳聚糖-海藻酸钠微球,这为微球制剂的产业化开发奠定了一定的技术基础。

1 材料与方法

1.1 材料 壳聚糖,分析纯,脱乙酰度 DD% >

85%,批号 170902,武汉合中生化制造有限公司;海藻酸钠,分析纯,批号 S817372,上海麦克林生化科技有限公司。硫酸小檗碱,含量 98.21%,批号 180301,四川恒瑞通达生物科技有限公司;硫酸小檗碱标准品,含量 98.7%,中国兽医药品监察所;氯化钙,分析纯,天津市恒兴化学试剂制造有限公司;液体石蜡,批号 20160905,天津市巴斯夫化工有限公司;丙二醇、正丁醇和正戊醇,液体石蜡、司班-80、吐温-80,均为分析纯,天津市巴斯夫化工有限公司。

1.2 仪器 UV1900PC 型双光束紫外可见分光光度计,上海佑科仪器仪表有限公司;winner802 纳米粒度仪,济南微纳颗粒仪器股份有限公司;ZNCL-S 型恒温磁力搅拌器,上海羌强仪器设备有限公司;MS104TS/02 型电子分析天平,梅特勒-托利多有限公司。

1.3 微球制备方法 精密称取海藻酸钠 2 g,硫酸小檗碱 4 g,加入 100 mL 蒸馏水中,充分溶解,混合均匀;取制备的海藻酸钠-硫酸小檗碱混合液 100 mL,加入液体石蜡 50 mL,司班-80 5 mL,吐温-80 10 mL,丙二醇 5 mL,以 800 r/min 充分搅拌乳化,制成含有海藻酸钠及药物的水包油型乳剂。取适量乳剂,加入等量 1% 氯化钙溶液中,以 8000 ~ 1000 r/min 高速搅拌,胶凝反应一定时间,过滤得微球;按着微球与壳聚糖溶液体积比 1:10 比例将微球加入 2% 壳聚糖溶液中,再次胶凝 1 h,蒸馏水洗涤,过滤,干燥,即得载药微球。

1.4 微球评定指标测定

1.4.1 硫酸小檗碱含量测定

1.4.1.1 硫酸小檗碱标准品溶液制备 精密称取硫酸小檗碱标准品 0.1 g,置于 100 mL 容量瓶中,加入 20 mL 去离子水,充分震荡至完全溶解,再加去离子水至刻度,摇匀,制成硫酸小檗碱浓度为 1000 μg/mL 的标准品储备液。精确量取标准品储备液 0.05、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0 mL 分别置于 100 mL 容量瓶中,加水定容至刻度,摇匀,制成硫酸小檗碱浓度分别为 0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0 μg/mL 的标准溶液。

1.4.1.2 标准曲线绘制 取各浓度硫酸小檗碱标准液样品,以去离子水作空白对照。参照文献方法^[9]在 423 nm 波长处测定其吸光度,各浓度标准液样品重复测定 3 次。以硫酸小檗碱浓度为横坐标(x),吸光度值为纵坐标(y)进行线性回归,绘制标准曲线,计算回归方程。

1.4.2 微球评定指标测定

1.4.2.1 药物包封率测定 以药物包封率作为微球制备工艺的评定指标。取制备的微球悬液用 0.22 μm 滤膜过滤,并用适量去离子水冲洗 3 次。取滤液及冲洗液混合液,按照 1.4.1 方法于 423 nm 波长处测定药物吸光度,计算混合液中硫酸小檗碱含量及微球药物包封率^[10]。包封率(EE%) = 微球中药物量/总投药量 × 100%。

1.4.2.2 微球形态与粒径测定 取硫酸小檗碱壳聚糖-海藻酸钠微球样品置于载玻片上,用显微镜观察微球形态。应用纳米粒度仪测定微球的大小及其粒径分布。

1.5 制备工艺单因素试验 在单因素预选试验基础上,确定海藻酸钠溶液浓度、氯化钙溶液浓度、壳聚糖溶液浓度,以及初次胶凝时间是影响微球质量的主要因素。根据预试验结果,每个因素选择 5 个

水平进行单因素试验。

1.5.1 海藻酸钠溶液浓度筛选 在氯化钙溶液浓度 2.0%、壳聚糖溶液浓度 1.2%、初次胶凝时间 30 min 条件下,以海藻酸钠溶液浓度分别为 0.5%、1%、1.5%、2%、2.5% 水平制备载药微球,观察微球形态,测定微球药物包封率,确定海藻酸钠溶液最适浓度。试验重复 3 次。

1.5.2 氯化钙溶液浓度筛选 在海藻酸钠溶液浓度 1.5%、壳聚糖溶液浓度 1.2%、初次凝胶时间 30 min 条件下,以氯化钙溶液浓度分别为 1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0% 水平制备载药微球,观察微球形态,测定药物包封率,确定氯化钙溶液最适浓度。试验重复 3 次。

1.5.3 初次凝胶时间筛选 在海藻酸钠溶液浓度 1.5%、氯化钙溶液浓度 2.0%、壳聚糖溶液浓度 1.2% 条件下,以初次凝胶时间分别为 10、20、30、40、50 min 水平制备载药微球,观察微球形态,测定药物包封率,确定初次凝胶最适时间。试验重复 3 次。

1.5.4 壳聚糖溶液浓度 在海藻酸钠溶液浓度 1.5%、氯化钙溶液浓度 2.0%、初次凝胶时间 30 min 条件下,分别以为壳聚糖溶液浓度 0.4%、0.8%、1.2%、1.6%、2% 水平制备载药微球,观察微球形态,测定微球药物包封率,确定壳聚糖溶液最适浓度。试验重复 3 次。

1.6 制备工艺优化

1.6.1 试验设计 基于单因素试验结果,应用 Box-Behnken 设计原理,设计四因素三水平响应曲面分析试验,优化载药微球制备的各因素最适水平,因素水平设计见表 1。

表 1 Box-Behnken 设计的因素水平
Tab 1 The factors and levels for Box-Behnken design

因素	海藻酸钠浓度/%	壳聚糖浓度/%	氯化钙浓度/%	初次凝胶时间/min
-1	1.25	0.7	1.75	25
0	1.5	0.8	2	30
1	1.75	0.9	2.25	35

1.6.2 数据处理及模型拟合 应用 Design Expert 与amp;各因素(自变量)进行多元线性回归和二项式方

8.0.6 软件中 Box – Behnken 方法,对制备硫酸小檗 程拟合,响应曲面法设计方案见表 2。

碱微球所得数据进行处理,将药物包封率(因变量)

表 2 响应曲面法设计方案

Tab 2 Response surface methodology design scheme					
试验编号	海藻酸钠浓度/%	壳聚糖浓度/%	氯化钙浓度/%	初次凝胶时间/min	包封率/%
1	0	1	1	0	94.03
2	0	–1	0	–1	76.41
3	–1	0	0	1	76.35
4	1	–1	0	0	81.45
5	0	–1	0	1	70.29
6	0	–1	–1	0	82.72
7	–1	0	–1	0	69.70
8	0	0	1	1	77.54
9	0	0	0	0	91.96
10	0	–1	1	0	74.79
11	0	1	0	1	85.17
12	0	1	–1	0	72.25
13	0	0	0	0	93.54
14	1	0	–1	0	85.75
15	1	0	0	–1	82.82
16	–1	1	0	0	77.33
17	0	0	0	0	92.78
18	0	1	0	–1	83.40
19	0	0	0	0	93.89
20	1	1	0	0	83.99
21	0	0	0	0	89.40
22	–1	0	1	0	84.57
23	1	0	1	0	89.08
24	–1	0	0	–1	75.77
25	0	0	–1	1	72.84
26	1	0	0	1	88.10
27	–1	–1	0	0	74.81
28	0	0	–1	–1	73.81
29	0	0	1	–1	75.96

1.6.3 验证试验 根据优化的海藻酸钠溶液浓 度、壳聚糖溶液浓度、氯化钙溶液浓度,以及初次凝 胶时间,按照制备工艺流程,测定微球的药物包封 率,并进行 3 次验证试验,验证预测结果的准确性。

2 结果与分析

2.1 标准曲线绘制 以吸光度值为纵坐标,硫酸 小檗碱浓度为横坐标绘制标准曲线,得出回归方 程: $y = 0.0129x + 0.0394 (R^2 = 0.999)$ 。由图 1 可

知,硫酸小檗碱质量浓度在 0.5 ~ 50 $\mu\text{g/mL}$ 范围内时,其吸收度与药物浓度的线性关系良好。

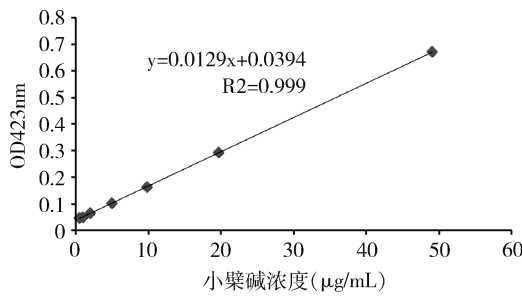


图 1 硫酸小檗碱标准曲线

Fig 1 Standard curve of Berberine Sulfate

2.2 单因素试验结果

2.2.1 海藻酸钠溶液浓度对微球性能的影响 由图 2 可知,随着海藻酸钠溶液浓度的增大,微球药物包封率逐渐升高,整齐度逐渐变好,粒径无明显变化。当海藻酸钠浓度超过 2.0% 时,虽然微球的包封率也逐渐升高,但微球的圆整度下降,制备微球难度加大。综合考虑各因素,选择海藻酸钠溶液的最佳浓度为 1.5%。

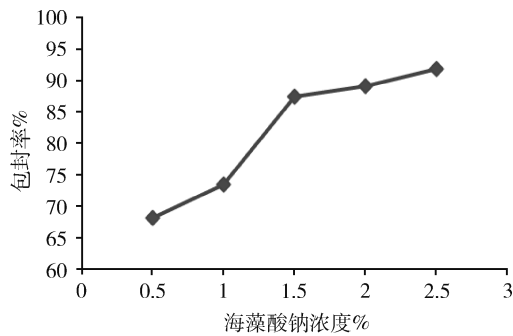


图 2 海藻酸钠浓度对微球包封率的影响 (n=3)

Fig 2 Effect of the sodium alginate concentration on encapsulation efficiency of microspheres

2.2.2 氯化钙溶液浓度对微球性能的影响 由图 3 可知,随着氯化钙溶液浓度的升高,药物的包封率也逐渐升高,但当氯化钙溶液浓度超过 2% 时,微囊的圆整度降低,脆性增大,因此,选择氯化钙溶液的最佳浓度为 2%。

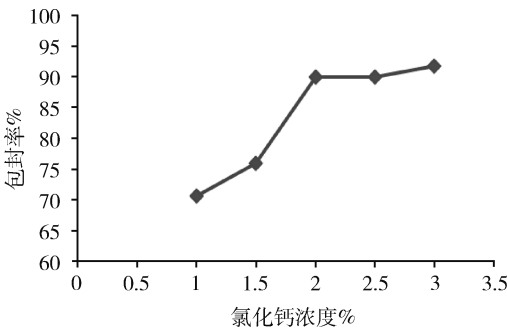


图 3 氯化钙浓度对微球包封率的影响 (n=3)

Fig 3 Effect of the calcium chloride concentration on encapsulation efficiency of microspheres

2.2.3 初次凝胶时间对微球性能的影响 由图 4 可知,随着初次凝胶时间由 10 min 延长至 30 min,微球的整齐度、药物包封率逐渐升高,但初次凝胶时间由 30 min 延长至 50 min 时,微球的整齐度和药物包封率变化不明显 ($P > 0.05$),因此,选择最佳初次凝胶时间为 30 min。

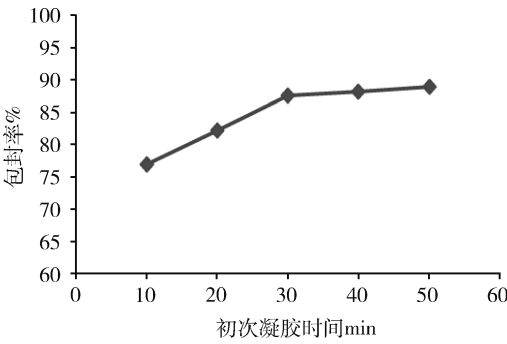


图 4 初次凝胶时间对微球包封率的影响 (n=3)

Fig 4 Effect of the gel-forming time on encapsulation efficiency of microspheres

2.2.4 壳聚糖溶液浓度对微球性能的影响 由图 5 可知,随着壳聚糖浓度增加,虽然微球的整齐度变化不明显,粒径也无明显变化,但壳聚糖溶液浓度为 0.8% 时,微球的药物包封率最高,因此,选择壳聚糖溶液最佳浓度为 0.8%。

2.3 制备工艺优化结果

2.3.1 统计模型与方差分析 通过回归分析,得多元回归方程: $Y = 92.31 + 4.39X_1 + 2.97X_2 + 3.24$

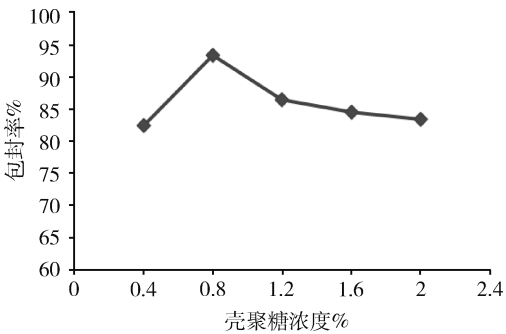


图 5 壳聚糖浓度对微球包封率的影响(n=3)

Fig 5 Effect of the chitosan concentration on encapsulation efficiency of microspheres

$X_3 + 0.18X_4 + 5.000E - 003X_1X_2 - 2.88X_1X_3 + 1.18X_1X_4 + 7.43X_2X_3 + 1.97X_2X_4 + 0.64X_3X_4 - 4.48X_{12} - 6.12X_{22} - 6.57X_{32} - 8.39X_{42}$, 回归系数 $R^2 = 0.9059$, 回归方程与实际模型拟合度良好。对二项式方程中各系数进行 F 检验, 由表 3 可知, X_1 、 X_2 、 X_3 为极显著因素, X_2 与 X_3 的交互作用极显著 ($P < 0.01$)。此模型的失拟项 $Pr > F$ 值为 0.0834, 大于 0.05, 模型失拟项不显著 ($P > 0.05$), 说明模型选择合理。

表 3 回归方程方差分析结果

Tab 3 Variance analysis of regression equation

来源	平方和	自由度	均方和	F 值	Pr > F 值
模型	1477.74	14	105.55	9.63	<0.0001
X_1	231.09	1	231.09	21.07	0.0004
X_2	106.21	1	106.21	9.69	0.0076
X_3	126.10	1	126.10	11.50	0.0044
X_4	0.37	1	0.37	0.034	0.8560
X_1X_2	1.000E - 004	1	1.000E - 004	9.119E - 006	0.9976
X_1X_3	33.29	1	33.29	3.04	0.1033
X_1X_4	5.52	1	5.52	0.50	0.4896
X_2X_3	220.67	1	220.67	20.12	0.0005
X_2X_4	15.56	1	15.56	1.42	0.2533
X_3X_4	1.63	1	1.63	0.15	0.7060
X_{12}	130.23	1	130.23	11.88	0.0039
X_{22}	242.61	1	242.61	22.12	0.0003
X_{32}	279.63	1	279.63	25.50	0.0002
X_{42}	456.41	1	456.61	41.62	<0.0001
残差	153.52	14	10.97		
失拟检验	140.70	10	14.07	4.39	0.0834
纯误差	12.82	4	3.21		
总离差	1631.27	28			

注: $Pr > F$ 值小于 0.05, 表明模型或考察因素有显著影响; $Pr > F$ 值小于 0.01, 表明模型或考察因素有极显著影响。
Notes: the value of $Pr > F$ less than 0.05 indicates that the model or inspection factors have a significant influence; the value of $Pr > F$ less than 0.01 indicates that the impact of the model or inspection factors is extremely significant.

2.3.2 响应曲面分析 利用 Design Expert 8.0.6 软件作响应曲面图及等高线图, 在筛选因素水平范围内, 微球药物包封率存在最大值, 即等高线图标

注的中心点。由图 6 可知, 当壳聚糖溶液浓度一定时, 随氯化钙溶液浓度的升高, 包封率快速增大, 然后又减小。当氯化钙溶液浓度一定时, 随着壳聚糖

溶液浓度的升高,包封率快速增大,然后又减小。响应曲面图的曲线比较陡峭,说明壳聚糖、氯化钙两因素的交互作用对包封率影响显著($P < 0.05$),包封率的最大值应在氯化钙浓度 1.95% ~ 2.15% 和壳聚糖浓度 0.80% ~ 0.90% 范围内。由图 7 可知,当初次凝胶时间一定时,随着海藻酸钠浓度的

升高,包封率快速增大,然后又减小。当海藻酸钠溶液浓度一定时,随着初次凝胶时间的延长,包封率快速增大,然后又减小,包封率的最优值应在海藻酸钠溶液浓度 1.45% ~ 1.65% 和初次凝胶时间 29 ~ 33 min 范围内。等高线图呈椭圆形,说明壳聚糖、氯化钙两因素具有一定的交互作用。

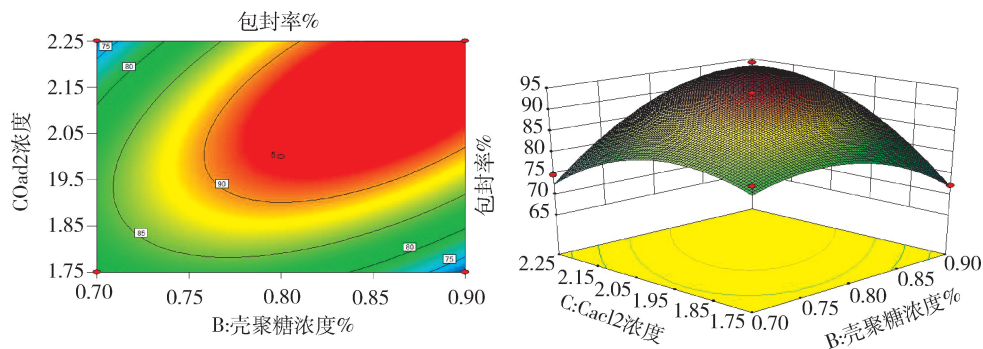


图 6 氯化钙浓度与壳聚糖浓度交互响应面图及其等高线图

Fig 6 Response surface and contour plots for the effect between calcium chloride concentration and chitosan concentration

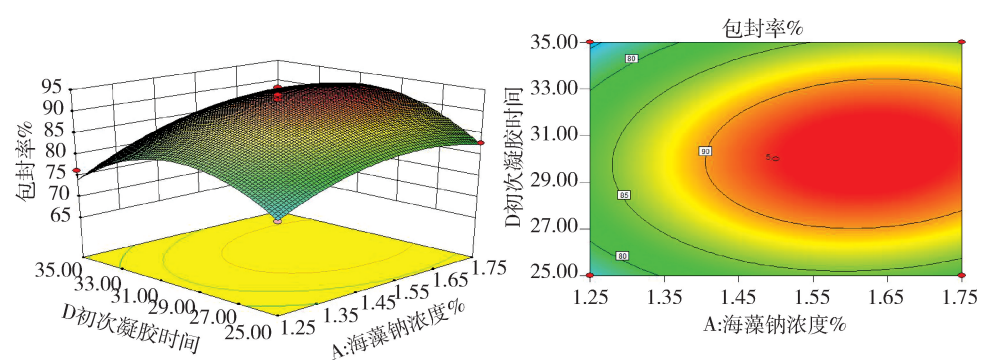


图 7 海藻酸钠浓度与凝胶时间交互响应面图及其等高线图

Fig 7 Response surface and contour plots for the effect between sodium alginate concentration and gel-forming time

2.3.3 优化分析 应用 Design Expert 8.0.6 软件,模拟的最佳工艺条件:海藻酸钠溶液浓度 1.57%,壳聚糖溶液浓度 0.86%,氯化钙溶液浓度 2.13%,初次凝胶时间为 30.71 min,在此条件下,硫酸小檗碱微球包封率理论值为 94.6991%。根据最优化工艺流程进行了 3 次验证试验,硫酸小檗碱包封率的实测平均值为 94.09%,这说明试验设计和数学模型具有可靠性和重现性。

2.4 微球形状与粒径分布 微球外观形状为规则球形,表面光滑圆整,无明显的聚集现象,见图 8。纳

米粒度仪测定结果表明,应用筛选的最佳工艺制备的微球平均粒径为 329 nm,且呈正态分布,见图 9。

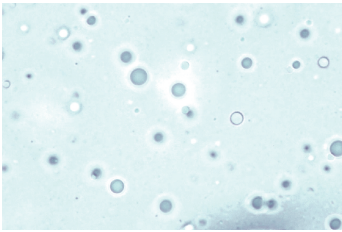


图 8 微球形态

Fig 8 Morphology of microspheres

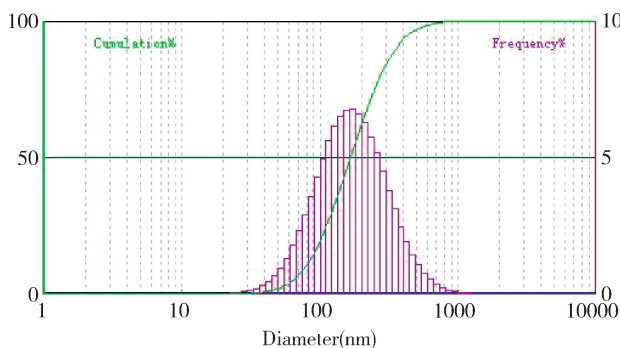


图 9 微球粒径分布

Fig 9 Distribution of particle sizes of microspheres

3 讨论与结论

3.1 微球制备的影响因素 海藻酸钠-壳聚糖载药微球的形状、致密度、药物包封率、微球降解速率,以及药物释放动力学等质量性能,主要取决于制备微球的高分子材料及其浓度、交联剂钙离子浓度、聚合反应时间、溶液 pH 值等因素。由于采取的制备方法、生产的原材料和包载药物的不同,因此微球制备的工艺条件也有差异。徐连敏等^[11]研究表明,决定微球质量和药物包封率的影响因素依次为壳聚糖浓度 > 氯化钙浓度 > 海藻酸钠浓度 > 药物载量。张华等^[12]确定的影响因素依次为海藻酸钠质量分数 > 壳聚糖质量分数 > 氯化钙质量分数 > 海藻酸钠与药物比。岳春华等^[13]证实,影响微球质量的因素依次是明胶用量 > 药料比 > 乳化剂用量 > 壳聚糖用量。本研究通过单因素试验和响应曲面法证实,决定微球质量的主要影响因素依次为:海藻酸钠溶液浓度 > 氯化钙溶液浓度 > 壳聚糖溶液浓度 > 胶凝时间,从总体试验结果看,本试验与其他学者的研究结果基本一致,由此可见,这些因素是决定微球制备的关键因素。

3.2 工艺条件的筛选 在微球制备过程中,钙离子作为交联剂,首先与海藻酸钠分子的 $-COO-$ 结合形成凝胶球,凝胶球再与壳聚糖溶液混合,海藻酸钠分子的羧基与壳聚糖分子的氨基络合,形成致密的微球^[14-15]。由于海藻酸钠溶液、氯化钙溶液及壳聚糖溶液浓度决定着溶液的粘度及其电荷数,所以溶液的浓度直接影响着微球的形成,在一定范

围内通过改变材料浓度可调节微球的质量特性。徐连敏等^[11]研究表明,使用 2% 海藻酸钠溶液、0.5% 氯化钙溶液和 0.4% 壳聚糖溶液,胶凝 10 min,可制备理想微球。张华等^[12]优化的制备工艺为 2% 海藻酸钠溶液、2% 氯化钙溶液、0.1% 壳聚糖溶液,海藻酸钠与药物比 3:1。岳春华等^[13]筛选的最佳制备条件为 2% 明胶、1% 壳聚糖、药料比 1:1,所得微球成球性好、粒径分布均匀。王家荣等^[16]试验证实,制备微球的适宜海藻酸钠浓度为 2%,氯化钙浓度为 1.5%。朱敏莉等^[17]研究显示,海藻酸钠溶液浓度为 3% 时,能制成分散的大小整齐的圆形微球。张志辰等^[18]研究认为,氯化钙浓度为 5% 时,形成微球强度高、形状规则、大小均匀。本研究表明,1.57% 海藻酸钠溶液、2.13% 氯化钙溶液、0.86% 壳聚糖溶液和初次凝胶时间为 30.71 min 时,可自备药物包封率最理想的微球。纵观各研究结果,虽然不同学者制备微球的材料浓度均有一定的差异,笔者认为微球形成的机理主要是海藻酸钠与钙的交联反应,以及海藻酸钠与壳聚糖的聚合反应,由于材料分子的电荷及数量的确定性,其各材料间的质量分数比例理论上应基本一致,差异只是制备微球的材料溶液浓度而已。

3.3 包封率的影响因素 微球的药物包封率是确定微球制备工艺优劣的重要指标之一。微球形成机理是在海藻酸钠水溶液中加入钙离子,海藻酸钠分子链的古罗糖醛酸的钠离子与钙离子发生交换反应,形成相互交联的网络结构海藻酸钙凝胶,海藻酸钠分子再与壳聚糖分子络合,最终形成具有机械强度和弹性的微球^[19]。由此可见,海藻酸钠浓度、壳聚糖浓度和氯化钙浓度决定着微球的形成速度和致密度,从而影响着药物的包封率。本研究表明,在一定浓度范围内适度提高海藻酸钠溶液和氯化钙溶液的浓度,有利于提高微球的形成速度和药物包封率,但过高的材料浓度又会降低微球圆滑度等物理特性,从而影响微球的性能。在本研究筛选工艺条件下,制备微球的药物平均包封率为 94.09%,明显高于何清义等^[20]制备微球的包封率 61%,与张华等^[12]制备鞣花酸壳聚糖-海藻酸钠

微球的平均包封率 97.73%, 罗洋等^[21]制备的硒太子参多糖纳米微球包封率 92.46%, 以及徐连敏等^[11]制备地塞米松磷酸钠壳聚糖-海藻酸钠微球包封率 96.90% 相近, 这说明本试验筛选工艺制备微球的质量良好。

3.4 微球制备方法的比较 依据微球制备工艺, 微球的制备方法主要分为喷雾法和乳化法两类。喷雾法需要特殊的生产设备, 乳化法需要使用甲醛、丙酮等有机溶剂。这些方法不仅生产工艺复杂, 生产效率低, 而且使用的有机溶剂还存在着一定的毒性, 污染环境, 并可能导致药物的失活, 因此, 现有的制备技术严重制约了微球药剂的产业化进程^[22]。本研究综合 D 相乳化法, 以及乳剂、微乳及胶体的制备方法^[23], 创新了微球的传统制备方法和剂型。该方法首先制备不溶于水的乳胶, 然后再利用乳胶在水中的不溶性, 将乳胶依次加入氯化钙和壳聚糖溶液中, 乳化聚合制成载药凝胶微球。本研究采用搅拌乳化法制备微球, 克服了滴注法和喷雾法的弊端, 不需要特殊的生产设备, 生产工艺简单, 不使用有机溶剂, 乳化及交联条件温和, 制备微球整齐度好, 药物包封率高, 这为微球制剂的产业化生产奠定了技术基础。

3.5 结论 本试验应用海藻酸钠、壳聚糖可生物降解的无毒高分子材料, 优化的硫酸小檗碱壳聚糖-海藻酸钠微球制备工艺条件为: 海藻酸钠溶液浓度 1.57%, 氯化钙溶液浓度 2.13%, 壳聚糖溶液浓度 0.86%, 初次凝胶时间 30.71 min, 该工艺制备微球的平均粒径为 329 nm, 且呈正态分布, 药物包封率为 94.09%。

参考文献:

- [1] 李 勋, 韦 玮, 马光辉, 等. 缓释微球制剂的研究进展[J]. 北京化工大学学报(自然科学版), 2017, 44(6): 1-11.
- Li X, Wei Y, Ma G H, *et al.* Recent research and development prospects for sustained-release microspheres[J]. Journal of Beijing University of Chemical Technology (Natural Science Edition), 2017, 44(6): 1-11.
- [2] 赵彬然, 薛伟明, 张宏亮, 等. 壳聚糖/海藻酸钙微胶囊的通透性能[J]. 化工进展, 2009, 28(10): 1803-1805.

- Zhao B R, Xue W M, Zhang H L, *et al.* Permeability of chitosan/alginate microcapsules [J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2009, 28(10): 1803-1805.
- [3] Yapar E, Kayahan S K, Bozkurt A, *et al.* Immobilizing cholesterol oxidase in chitosan-alginic acid network [J]. Carbohydrate Polymers, 2009, 76(3): 430-436.
- [4] 李志强, 任彦荣. 微胶囊技术及其应用研究进展[J]. 化学推进剂与高分子材料, 2004, 2(6): 19-23.
- LI Z Q, REN Y R. Microencapsulation Technology and Research Progress of Its Application [J]. Chemical Propellants & Polymeric Materials, 2004, 2(6): 19-23.
- [5] 李方园, 姜永莉, 成 颖. PLGA 纳米粒抗肿瘤药物载体的研究进展[J]. 西北药学杂志, 2013, 28(6): 656-660.
- Li F Y, Jiang Y L, Cheng Y. Progress in the study of poly particles for anticancer agents delivery [J]. Northwest Pharmaceutical Journal, 2013, 28(6): 656-660.
- [6] Vandelli M A, Rivasi F, Guerra P, *et al.* Gelatin microspheres crosslinked with D,L-glyceraldehyde as a potential drug delivery system; preparation, characterisation, *in vitro* and *in vivo* studies [J]. Int J Pharm, 2001, 215(1-2): 175-184.
- [7] Woo J S, Piao M G, Li D X, *et al.* Development of cyclosporin A-loaded hyaluronic microsphere with enhanced oral bioavailability [J]. Int J Pharm, 2007, 345(1): 134-141.
- [8] 刘丽仙, 岳 娟, 蒋丽刚, 等. 新型乳化技术在化妆品中的应用 [J]. 日用化学品科学, 2017, (7): 40-43.
- Liu L X, Yue J, Jiang L G, *et al.* Application of innovative emulsification techniques in cosmetics [J]. Detergent & Cosmetics, 2017, (7): 40-43.
- [9] 李华岑, 刘素梅, 韩 立, 等. 分光光度法测定硫酸小檗碱注射液 [J]. 中国兽药杂志, 2012, 46(1): 40-41.
- Li H C, Liu S M, Han L, *et al.* Spectrophotometric Determination of Berberine Sulfate Injection [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2012, 46(1): 40-41.
- [10] 薛伟明, 于炜婷, 刘袖洞, 等. 载细胞海藻酸钠-壳聚糖微胶囊的化学破囊方法研究 [J]. 高等学校化学学报, 2004, 25(7): 1342-1346.
- Xue W M, Yu W T, Liu X D, *et al.* Chemical Method of Breaking the Cell-loaded Sodium Alginate/Chitosan Microcapsules [J]. Chemical Research In Chinese Universities, 2004, 25(7): 1342-1346.
- [11] 徐连敏, 陈改清, 刘敬楠. 地塞米松磷酸钠壳聚糖-海藻酸钠微囊的制备工艺研究 [J]. 中国现代应用药学杂志, 2005, 22(3): 212-214.
- Xu L M, Chen G Q, Liu J N. Preparation of dexamethsone sodium

- phosphate chitosan – alginate microencapsules[J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2005, 22(3): 212 – 214.
- [12] 张 华, 杨 丹, 靳诗英, 等. 鞣花酸壳聚糖 – 海藻酸钠微球的制备工艺[J]. 中国医院药学杂志, 2015, 35(17): 1605 – 1611.
- Zhang H, Yang D, Jin S Y, *et al.* Preparation procedd of chitosan – sodium alginatealginate ellagic acid microspheres [J]. Chin Hosp Pharm J, 2015, 35(17): 1605 – 1611.
- [13] 岳春华, 张志伟, 符大天, 等. 水杨酸壳聚糖 – 明胶微囊制备工艺的优化[J]. 华西药学杂志, 2014, 29(5): 494 – 496.
- Yue C H, Zhang Z W, Fu D T, *et al.* Optimization of salicylic acid chitosan – gelatin microcapsule preparation process[J]. West China Journal of Pharmaceutical Sciences, 2014, 29(5): 494 – 496.
- [14] Shent L, Howard J W, Scott B K, *et al.* Reaction kinetics and gel properties of bloeked diisocyanate crosslinked chitosan hydrogels[J]. Carbohydrate Polymers. 2003(54): 193 – 199.
- [15] 陈益清, 孙多先, 孙绵方. ACA 离子取代凝胶多价离子置换性能研究[J]. 高分子材料科学与工程. 2002, 18(6): 133 – 136.
- Chen Y Q, Sun D X, Sun J F. The Study on multivalent ion replacement of ACA ion replacement Gels[J]. Polymeric Materials Science & Engineering. 2002, 18(6): 133 – 136.
- [16] 王家荣, 金 谊, 刘望才, 等. 海藻酸钠 – 壳聚糖 – 海藻酸钠生物微胶囊的制备[J]. 宁波大学学报(理工版), 2007, 20(4): 516 – 573.
- Wang J R, Jin Y, Liu W C, *et al.* Preparation of sodium alginate – chitosan – alginate biomicrocapsule[J]. Journal of Ningbo University(Natural Science & Engineering Edition), 2007, 20(4): 516 – 573.
- [17] 朱敏莉, 薛伟明, 赵彬然, 等. ACA 液芯微胶囊制备工艺优化[J]. 化工进展, 2010, 29(1): 124 – 127.
- Zhu M L, Xue W M, Zhao B R, *et al.* Optimization of conditions for the preparation of alginate – chitosan – alginate microcapsules with liquid core[J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2010, 29(1): 124 – 127.
- [18] 张志辰, 王 英, 董明盛, 等. 壳聚糖 – 海藻酸钠液芯微胶囊机械强度优化研究[J]. 江苏农业科学, 2010(1): 268 – 269.
- Zhang Z C, Wang Y, Dong M S, *et al.* Optimization of the Strength of alginate – chitosan microcapsules[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2010(1): 268 – 269.
- [19] 魏靖明, 张志斌, 冯华林, 等. 海藻酸钠作为药物载体材料的研究进展[J]. 化工新型材料, 2007, 35(8): 20 – 22.
- Wei Q M, Zhang Z M, Fen H L, *et al.* Study on alginate as drug carrier material[J]. New Chemical Materials, 2007, 35(8): 20 – 22.
- [20] 何清义, 温立升, 李 强, 等. 海藻酸盐控释微球的制备及其体外释药特性[J]. 生物医学工程学杂志, 2007, 24(6): 1301 – 1304.
- He Q Y, Wen L S, Li Q, *et al.* Fabrication of alginate microsphere for controlled release and investigation of its release characteristics *in Vitro*[J]. Journal of Biomedical Engineering, 2007, 24(6): 1301 – 1304.
- [21] 罗 洋, 刘晓盼, 龙 瑶, 等. 响应曲面法优化硒太子参多糖纳米微球的制备工艺[J]. 中国兽医科学, 2018, 48(11): 1448 – 1457.
- Luo Y, Liu X P, Long Y, *et al.* Optimization of preparation technology of polysaccharideelenium polysaccharide nanospheres by response surface methodology [J]. Chinese Veterinary Science, 2018, 48(11): 1448 – 1457.
- [22] 徐一驰, 赵楚翘, 刘志辉. 海藻酸钠/壳聚糖微载体的研究进展[J]. 中国生物制品学杂志, 2018, 31(3): 332 – 335.
- Xu Y C, Zhao C Q, Liu Z H. Progress in research on sodium alginate/chitosan microcarriers[J]. Chinese Journal of Biologicals, 2018, 31(3): 332 – 335.
- [23] 史同瑞, 王 爽, 朱丹丹, 等. 液体石蜡乳的研制及稳定性试验[J]. 中国兽药杂志, 2014, 48(1): 31 – 34.
- Shi T R, Wang S, Zhu D D, *et al.* Preparation and stability evaluation of liquid paraffin – emulsion[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2018, 31(3): 332 – 335.

(编辑:陈 希)