

壳聚糖 - 海藻酸钠 - 丹参酮IIA微球的制备及其工艺优化

汤 芮, 史 浩, 郑佳琪, 李千金, 董祖琴, 张 腾

成都理工大学, 四川 成都

收稿日期: 2022年2月2日; 录用日期: 2022年2月28日; 发布日期: 2022年3月8日

摘 要

目的: 优化壳聚糖 - 海藻酸钠(CS-SA)包裹丹参酮IIA (TIIA)的工艺条件, 得到最佳工艺。方法: 研究海藻酸钠含量、壳聚糖含量、Ca²⁺含量、Span-80等工艺条件对微球粒径分布的影响, 在此基础上, 研究SA、CS、Ca²⁺含量对载药量的影响, 以工艺参数进行优化。结果: 最佳工艺条件: SA含量为1.5%、Ca²⁺含量30%、CS含量0.4%, 在该最佳工艺条件下, 最大载药量达到13.2%。结论: 为CS-SA包裹TIIA工业化生产应用提供了方向。

关键词

壳聚糖, 海藻酸钠, 丹参酮IIA, 微球

Preparation and Process Optimization of Chitosan-Sodium Alginate-Tanshinone IIA Microspheres

Rui Tang, Hao Shi, Jiaqi Zheng, Qianjin Li, Zuqin Dong, Teng Zhang

Chengdu University of Technology, Chengdu Sichuan

Received: Feb. 2nd, 2022; accepted: Feb. 28th, 2022; published: Mar. 8th, 2022

Abstract

Objective: The research aimed to optimize the process conditions of tanshinone IIA (TIIA) encapsulated by chitosan-sodium alginate (CS-SA) and obtain the best process. **Method:** The effects of sodium alginate content, chitosan content, Ca²⁺ content, Span-80 and other process conditions on the particle size distribution of microspheres were studied. **On this basis, the effects of SA, CS and**

Ca²⁺ content on drug loading were studied. The process parameters were optimized. Result: The optimal process conditions: SA content was 1.5%, Ca²⁺ content was 30%, CS content was 0.4%. Under the optimal process conditions, the maximum drug loading amount reached 13.2%. Conclusion: It provides a direction for the industrial production and application of CS-SA wrapped TIIA.

Keywords

Chitosan, Sodium Alginate, Tanshinone IIA, Microspheres

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

壳聚糖(CS)是可进行离子交联的聚合物类别中最通用的生物聚合物[1]。由于其通过碱性脱乙酰作用从几丁质(自然界中最丰富的多糖)中衍生而来,因此含量丰富,且成本低廉且对环境友好。此外,壳聚糖存在胺基结构,使其在略低的 pH 值下具有良好的水溶性;氢键容易在分子内和分子间形成;由于存在不同的官能团(-OH、-NH₂、-C-O-C),从而容易对其进行化学改性,因此具有出色的成膜能力。海藻酸钠(SA)是从褐藻中提取的一种线性阴离子多糖,由-1,4-D-麦芽糖酸(M)-1,4-L-古洛糖醛酸(G)和-1,4-L-古洛糖醛酸(G)单元交替排列而成,根据将 M 和 G 的排列组合,可以提供各种等级的 SA [2] [3]。丹参酮 IIA (Tanshinone IIA, TIIA)为丹参中的主要脂溶性有效成分,具有预防和治疗心血管疾病,脑血管疾病、改善微循环、和癌症等方面的多重药理作用[4] [5] [6] [7] [8]。但是,TIIA 的水溶性差(2.8 ng/mL)、半衰期短(1~2 小时) [9],导致口服生物利用度低。因此,研究对 TIIA 进行包裹并且充分利用 TIIA 有着十分重要的意义。为此,我们优化了 CS-SA 包裹 TIIA 的最佳工艺条件,为 TIIA 工业化生产应用提供了方向。

2. 材料与方法

2.1. 材料

2.1.1. 研究对象

丹参酮 IIA (TIIA)购买自阿拉丁试剂有限公司,纯度为 98%。

2.1.2. 试剂

海藻酸钠,化学纯,青岛海伽生物科技有限公司;壳聚糖,化学纯,山东奥康生物科技有限公司;碳酸钙、液体石蜡、乙酸、Span-80、皆为分析纯,来自成都金山化学试剂有限公司。

2.1.3. 主要仪器

752 型紫外分光光度计; Nicolet 6700 型傅里叶变换红外光谱仪; 飞纳 Prox 型扫描电镜; TG-20 离心机; Lab-1 A50 型冷冻干燥机。

2.2. 方法

2.2.1. CS-SA 微球的制备方法

称取一定量海藻酸钠分散在 100 mL 蒸馏水中充分溶解后,按照设定比例添加适量碳酸钙,超声 5 min 作为水相。在液体石蜡中加入适量乳化剂 Span-80,搅拌混合均匀后作为油相。称取特定量壳聚糖分散在

100 mL 0.5%的醋酸溶液中,完全溶解后作为交联相。将上述水相缓慢滴加到油相中,机械搅拌乳化 30 min。然后加入醋酸与碳酸钙反应 2 h,使碳酸钙完全溶解。接着将所得乳液滴加至壳聚糖交联相中,滴加完毕后交联反应 30 min。离心过滤,蒸馏水洗涤,冷冻干燥 12 h,得到微球备用。

2.2.2. 单因素试验

1) SA 含量的选择。固定 Ca^{2+} 含量 40%、Span-80 含量 1%、CS 含量为 0.4%作为不变因素,设定 SA 的含量为 0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%,研究 SA 含量对 CS-SA 的粒径分布的影响。

2) Ca^{2+} 含量的选择。固定 SA 含量为 1.5%、Span-80 含量 1%、CS 含量为 0.4%作为不变因素,设定 Ca^{2+} 的含量为 10%、20%、30%、40%和 50%,研究 Ca^{2+} 含量对 CS-SA 的粒径分布的影响。

3) CS 含量的选择。固定 SA 含量为 1.5%、 Ca^{2+} 含量 40%作为不变因素,设定 CS 的含量为 0.2%、0.4%、0.8%和 1.6%,研究 CS 含量对 CS-SA 的粒径分布的影响。

2.2.3. 丹参酮 IIA 标准曲线的测定方法

精密称取一定量的丹参酮 IIA,将其分别溶于乙醇中配制成浓度分别为(3, 4, 5, 6, 7, 8) mg/mL 的溶液,用紫外分光光度计(752 型)在 270 nm 处测定吸光度值(A),求得回归标准曲线方程:“ $y = 0.0757x + 0.0716$ ”, $R^2 = 0.9992$ 。

2.2.4. 载药率测定

称取 15 mg 载药微球加入到柠檬酸三钠(0.06 mol/L)和碳酸氢钠(0.2 mol/L)中,超声使丹参酮 IIA 从微球中完全释放,后转移至容量瓶中定溶至 200 mL。在 270 nm 处紫外分光光度下测定所释放药物吸光度,根据方程计算出浓度,再计算出载药率。载药率(LC)用公式(1)计算:

$$LC(\%) = [(Ma - Mb)] / Mc \times 100\% \quad (1)$$

其中, Ma——初始丹参酮 IIA 重量; Mb——损失丹参酮 IIA 重量; Mc——干燥后载药微球重量。

3. 结果与分析

3.1. 各因素对粒径分布影响的结果分析

3.1.1. SA 含量对粒径分布的影响

由图 1 可知, SA 的含量对微球的粒径分布有显著影响,含量分别在 0.5%和 1%时,微球的粒径分布的大小均显著低于其含量为 1.5%与 2.0%、2.5%的水平。这是因为 SA 含量越多,与 Ca^{2+} 交联形成的水凝胶网络越牢固致密,但是交联固化程度越高,粒径分布也随之增加。SA 浓度为 1.5%、2.0%时的粒径分布与其浓度为 25%时的差异不显著,说明 SA 与 Ca^{2+} 的交联度达到最大,继续增加海藻酸钠含量并未增大粒径分布,反而会浪费材料。因此最终选用海藻酸钠含量为 1.5%作为该复合物的最佳水平。

3.1.2. Ca^{2+} 含量对粒径分布的影响

由图 2 可知,由 CS-SA 形成的聚合电解质物质并不牢固,因此需要加入交联剂固化。本试验结果表明 Ca^{2+} 含量对微球粒径分布影响显著。 Ca^{2+} 含量为 10%、20%时粒径分布不均匀,但当其浓度为 50%时粒径分布跨度小且均匀。造成差异的原因可能是当 Ca^{2+} 浓度为 10%、20%时,交联固化不充分,其粒径分布跨度远高于其他水平。因此筛选 Ca^{2+} 含量 40%为最佳条件。

3.1.3. CS 含量对粒径分布的影响

由图 3 可知,随着 CS 浓度的增加,微球的粒径分布均也呈现增加的趋势,表明 CS 用量适宜时,可以增大凝胶状物质的致密度,但随着 CS 含量的增加,反应体系的黏度也会明显增大,黏度过高会阻碍 CS 与 SA 反应的充分性。因此最后选取 CS 的含量为 0.4%。

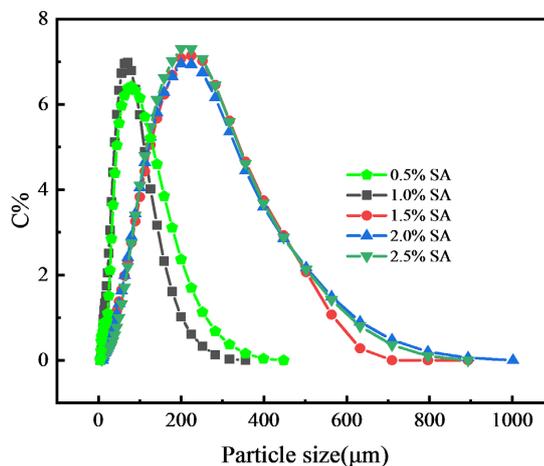


Figure 1. Effect of SA content on particle size distribution of CS-SA microspheres

图 1. SA 含量对 CS-SA 微球的粒径分布影响

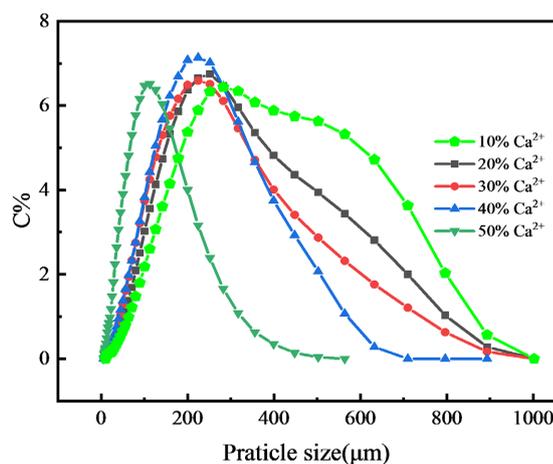


Figure 2. Effect of Ca^{2+} content on particle size distribution of CS-SA microspheres

图 2. Ca^{2+} 含量对 CS-SA 微球的粒径分布影响

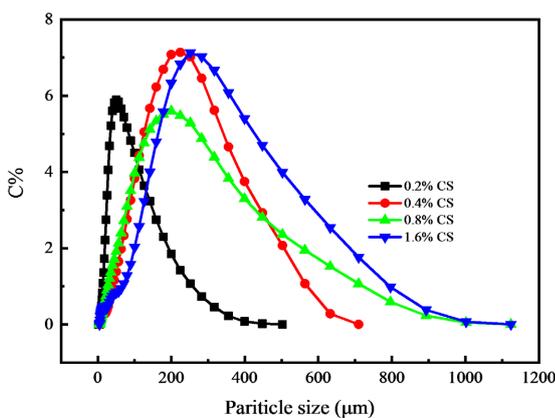


Figure 3. Effect of CS content on particle size distribution of CS-SA microspheres

图 3. CS 含量对 CS-SA 微球的粒径分布影响

3.2. 丹参酮 IIA (TIIA)标准曲线的绘制

图 4 是丹参酮 IIA 的标准曲线。如图所示, 其线性回归方程为: “ $y = 0.0757x + 0.0716$ ”, 方程相关系数 $R^2 = 0.9992$ 。表明在 3~8 mg/mL 浓度范围内, 丹参酮 IIA 紫外吸光度 A 与其浓度 C 具有良好的线性关系。

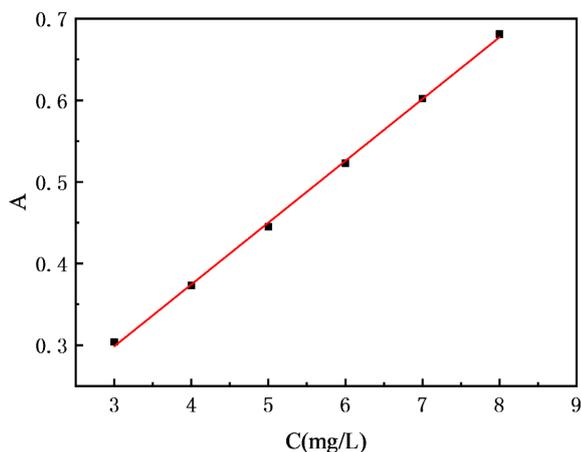


Figure 4. Tanshinone IIA standard curve

图 4. 丹参酮 IIA 标准曲线

3.3. 各因素对载药量影响的结果分析

3.3.1. SA 含量对载药量的影响

由图 5 分析可知, 随着 SA 含量的变化, TIIA 载药率在 8.2%~12.6%之间波动, 证明 TIIA 成功包裹到 CS-SA 微球中。SA 具有相对较大分子量, 含量增加后, 基体的结构更为致密, 使药物分子装载在微球的量更多, 另外增加 SA 含量意味着交联剂 Ca^{2+} 与 SA 的比例降低, 在凝胶生成过程中, 其中一部分微球的交联程度增大, 出现强度收缩, 形成更紧密的结构, 从而延长了药物释放路径, 避免了药物大量流失。但是 SA 含量在 2.5%时, 由于黏度过大, 在制备过程中可能导致药物损失, 造成浪费。

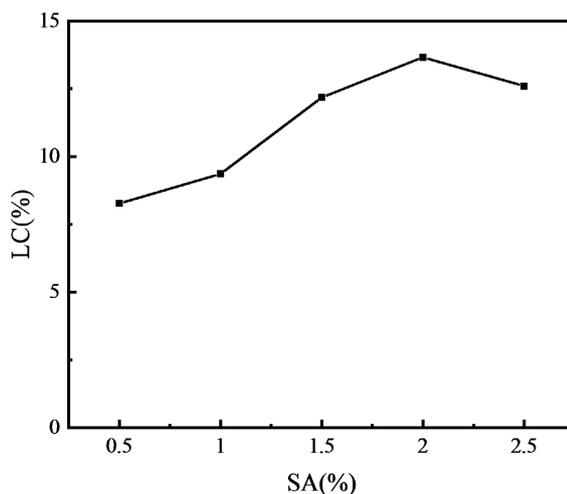


Figure 5. Effect of SA content on drug loading of CS-SA microspheres

图 5. SA 含量对 CS-SA 微球的载药量影响

3.3.2. CS 含量对载药量的影响

从图 6 中可以看出, CS 对载药率的影响也很大, 随着 CS 含量从 0% 增加到 0.8% 后, 药物负载效率从 8.1% 增加到 12.5%, 这表明 CS 中 -NH_3^+ 基团与 SA 中 -COO^- 基团形成复合凝胶结构, 仿佛给药物加盖一层外衣, 起到更好的保护作用。即 CS 浓度越高, 载药微球的外壳越厚, 使得药物在制备过程中会损失掉更少。但是当 CS 浓度增到 1.6% 的时候, 载药率有所下降, 这是因为随着壳聚糖浓度的增加, 交联相的黏度也会显著增加, 黏度过高会阻碍交联反应充分进行。

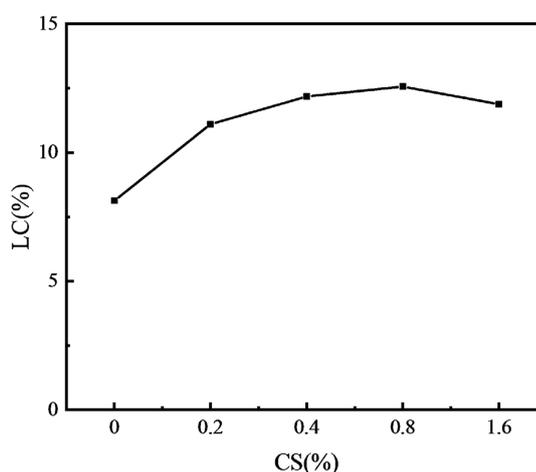


Figure 6. Effect of CS content on drug loading of CS-SA microspheres

图 6. CS 含量对 CS-SA 微球的载药量影响

3.3.3. Ca^{2+} 含量对载药量的影响

从图 7 可知, 随着 Ca^{2+} 含量从 10% 增加到 30%, LC 从 9.8% 增加到 13%, 这种行为可能由于 CS-SA 微球拥有更紧密、更平滑的表面, 减少了 TIIA 分子从 CS-SA 微球内核中转移出。当 Ca^{2+} 浓度从 30% 增加到 50%, LC 从 13.2% 减少到 4%, 这是因为 Ca^{2+} 与 SA 的缔结太过致密, 微球的核减小, 微球的内部表面积减小, TIIA 装载的量也随之减小。

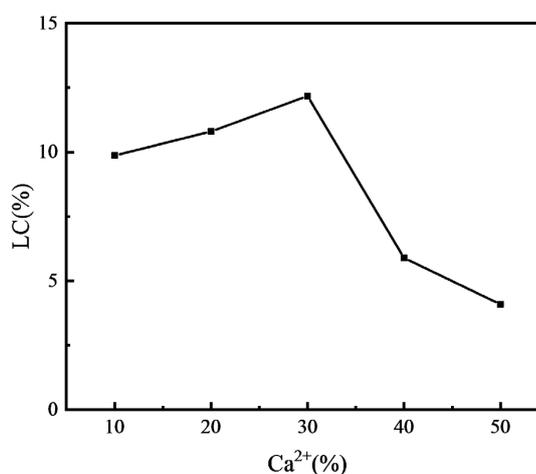


Figure 7. Effect of Ca^{2+} content on drug loading of CS-SA microspheres

图 7. Ca^{2+} 含量对 CS-SA 微球的载药量影响

4. 结论与讨论

壳聚糖 - 海藻酸钠微球具有无毒副作用、生物相容性高、生物可降解性和抗病毒等特点, 因此本文以其作为药物递送系统包裹丹参酮 IIA。采用乳化凝胶法壳制备壳聚糖 - 海藻酸钠(CS-SA)微球, 研究海藻酸钠含量、Ca²⁺含量、壳聚糖含量等工艺条件对微球粒径分布的影响; 以丹参酮 IIA (TIIA)为生物大分子药物, 研究对 CS-SA/TIIA 复合物的制备工艺进行优化。最佳工艺条件: SA 含量为 1.5%、Ca²⁺含量 30%、CS 含量 0.4%, 在该最佳工艺条件下, 最大载药量达到 13.2%。为 CS-SA 包裹 TIIA 工业化生产应用提供了方向。

致 谢

首先, 我要感谢我的导师, 没有史浩老师的悉心的指导帮助, 我不可能顺利完成实验和论文。其次, 我要感谢李泉、李千金、董祖琴、张腾等我师弟师妹们, 感谢他们在实验中给予的帮助和意见。最后对大学生创新创业计划的基金项目表达诚挚的谢意。

基金项目

大学生创新创业计划(201810616053)。

参考文献

- [1] Berger, J., Reist, M., Mayer, J.M., *et al.* (2004) Structure and Interactions in Covalently and Ionically Crosslinked Chitosan Hydrogels for Biomedical Applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **57**, 19-34. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(03\)00161-9](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(03)00161-9)
- [2] Caetano, L.A., Almeida, A.J. and Gonçalves, L. (2016) Effect of Experimental Parameters on Alginate/Chitosan Microparticle for BCG Encapsulation. *Marine Drugs*, **14**, 85-90. <https://doi.org/10.3390/md14050090>
- [3] Dragan, E.S. (2014) Design and Applications of Interpenetrating Polymer Network Hydrogels. *Chemical Engineering Journal*, **243**, 572-590. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.01.065>
- [4] Han, J.Y., Fan, J.Y., Horie, Y., *et al.* (2008) Ameliorating Effects of Compounds Derived from *Salvia miltiorrhiza* Root Extract on Microcirculatory Disturbance and Target Organ Injury by Ischemia and Reperfusion. *Pharmacology & Therapeutics*, **117**, 280-295. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.09.008>
- [5] Song, T., Yao, Y., Wang, T., *et al.* (2017) Tanshinone IIA Ameliorates Apoptosis of Myocardocytes by Up-Regulation of miR-133 and Suppression of Caspase-9. *European Journal of Pharmacology*, **815**, 343-350. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.08.041>
- [6] Fu, J.J., Huang, H.Q., Liu, J.J., *et al.* (2007) Tanshinone IIA Protects Cardiac Myocytes against Oxidative Stress-Triggered Damage and Apoptosis. *European Journal of Pharmacology*, **568**, 213-221. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.04.031>
- [7] Zhou, W. and Wang, Y.H. (2014) A Network-Based Analysis of the Types of Coronary Artery Disease from Traditional Chinese Medicine Perspective: Potential for Therapeutics and Drug Discovery. *Journal of Ethnopharmacology*, **151**, 66-77. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.11.007>
- [8] Lin, C.Y., Wang, L., Wang, L.L., *et al.* (2013) Tanshinone IIA Inhibits Breast Cancer Stem Cells Growth *in Vitro* and *in Vivo* through Attenuation of IL-6/STAT3/NF- κ B Signaling Pathways. *Journal of Cellular Biochemistry*, **114**, 2061-2070. <https://doi.org/10.1002/jcb.24553>
- [9] Zhang, W.L., He, H.L., Liu, J.P., *et al.* (2013) Pharmacokinetics and Atherosclerotic Lesions Targeting Effects of Tanshinone IIA Discoidal and Spherical Biomimetic High Density Lipoproteins. *Biomaterials*, **34**, 306-319. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.09.058>