

文章编号 1006-8147(2018)06-0496-05

论 著

# 正交法制备羧甲基壳聚糖-纳米银纳米微球

史梦柔<sup>1,2</sup>, 姜建石<sup>1</sup>, 李光远<sup>1,2</sup>, 郑 夺<sup>2</sup>, 陈 斌<sup>2</sup>, 高 萍<sup>2</sup>, 李毅敏<sup>2</sup>

(1.天津医科大学药理学教研室, 天津 300070; 2.天津市医药科学研究所医用生物材料监测研究中心, 天津 300020)

**摘要** 目的:制备以纳米银为模型药物的羧甲基壳聚糖载药纳米微球,探索载药纳米微球的制备条件对粒径、包封率的影响,确定最佳制备工艺。方法:三聚磷酸钠为交联剂,采用离子交联法制备载药纳米微球,测量药物的包封率及粒径。紫外分光光度法测定该制剂中纳米银释放情况。结果:通过正交实验设计,优化了制备工艺条件,其最佳条件是羧甲基壳聚糖浓度4.2 mg/mL,滴速为5 s/滴,纳米银投药量为20 mg(500  $\mu$ L)。在此条件下进行实验,制备出的载药纳米微球的平均粒径为514.1 nm,多分散系数0.204,包封率61.67%。8 h内累计释放量达80%以上,方程拟合以一级动力学方程拟合效果最好。结论:该制备工艺简单、稳定,可制备出包封率高、粒径适宜的羧甲基壳聚糖-纳米银纳米微球。

**关键词** 羧甲基壳聚糖; 纳米银; 纳米微球; 离子交联法

中图分类号 R944.9

文献标志码 A

## Preparation of carboxymethyl chitosan-nano silver nanoparticles by orthogonal design

SHI Meng-rou<sup>1,2</sup>, LOU Jian-shi<sup>1</sup>, LI Guang-yuan<sup>1,2</sup>, ZHENG Duo<sup>2</sup>, CHEN Bin<sup>2</sup>, GAO Ping<sup>2</sup>, LI Yi-min<sup>2</sup>

(1.Department of Pharmacology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2.Medical biological material supervision and research center, Tianjin Institute of Medical and Pharmaceutical Sciences, Tianjin 300020, China)

**Abstract Objective:** To prepare carboxymethyl chitosan drug-loaded nanoparticles with nano silver as model drug the influence of the drug-loaded nanoparticles preparing conditions on the particle size and the encapsulation efficiency to select the optimum conditions for preparation. **Methods:** With sodium tripolyphosphate as crosslinking agent, Drug-loaded nanoparticles were prepared by ionic cross-linking method. The drug encapsulation efficiency and particle size were measured. The release of nano-silver from preparations by ultraviolet spectrophotometry was observed. **Results:** Through the orthogonal design, preparation method was optimized. The optimum conditions included the carboxymethyl chitosan concentration of 4.2 mg/mL, speed of 5 s/drops, and the best dosage of nano silver for 20 mg (500  $\mu$ L). In this experiment, the mean size of the preparation drug-loaded nanoparticles was 514.1 nm with the polydispersity index of 0.204, and the encapsulation efficiency was 61.67%. The accumulated amount of release in the preparations is more than 80% at 8 h. Equation of in vitro release model fitted best to Kinetic equation. **Conclusion:** This preparation method is simple and stable. The carboxymethyl chitosan-nano silver nanoparticles can be prepared with a high encapsulation efficiency and suitable particle size.

**Key words** carboxymethyl chitosan; nano silver; nanoparticles; ionic cross-linking method

以羧甲基壳聚糖为载体材料的纳米给药系统已被用于经皮给药的治疗研究<sup>[1-2]</sup>。该给药系统具有控制药物释放,降低毒副作用,延长药物作用时间,减少给药次数等优点。羧甲基壳聚糖具有良好的生物相容性、可降解性、不同程度的抗感染作用和较好的止血活性,是目前具有发展前途的天然高分子纳米粒载体材料<sup>[3]</sup>。纳米银是近年来抗菌药物的研究热点<sup>[4]</sup>,其抗菌机制独特,广谱杀菌且无耐药性,渗透性强,能够促进伤口的愈合,细胞的生长及受损细胞的修复,是最新一代的天然抗菌剂<sup>[5]</sup>。但银离子一旦游离,容易经人体创面吸收入血,通过肾脏从尿中大

量排泄的同时,可以在机体的肝、肾、角膜、粘膜组织和创面上皮处沉积<sup>[6]</sup>,且其粒径小,化学性质活泼,极易发生团聚,形成带有若干弱连接界面且尺寸较大的团聚体<sup>[7]</sup>,从而影响了纳米银粒子的实际应用效果,因此不适宜直接给药。制成载药纳米微球,既可以降低其毒性,又可通过羧甲基壳聚糖成分包覆纳米银离子以防止其被氧化或团聚而失去活性<sup>[8-10]</sup>。本研究采用离子交联法制备羧甲基壳聚糖-纳米银纳米微球,探讨其制备工艺和载药性能。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 试验试剂 纳米银溶液(张家港耐尔纳米科技有限公司 4 000 ppm),羧甲基壳聚糖(CMC,浙江澳兴生物科技有限公司,分子量30万,羧化度

基金项目 天津市卫生和计划生育委员会科技基金(2013KY38)

作者简介 史梦柔(1988-),女,硕士在读,研究方向:组织工程;通信

作者:姜建石, E-mail: Jianshilou@163.com。

80%),三聚磷酸钠(TPP,分析纯),去离子水(自制)。

1.1.2 仪器 AL204 电子天平(梅特勒-托利多有限公司),KQ-50E 超声清洗仪(昆山市超声仪器有限公司),T6 新世纪紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司),Model J2-21 低温高速离心机,Zetasize 粒径分析仪(Malvern 公司),透析袋(透过分子量 8 000-14 000,sigma),药物溶出仪(RC12A,天大天发)。

## 1.2 方法

1.2.1 纳米微球制备<sup>[2]</sup> 以 0.5%盐酸为溶剂,配制 4.2、6.3 和 8.4 mg/mL 的 CMC 溶液;以 0.5%盐酸为溶剂,配制 2.8、3.7、4.7、5.6、6.5、7.5 和 8.4 mg/mL 的 TPP 溶液。离子交联法制备空白纳米微球,取一定浓度的 CMC 溶液 20 mL,超声状态下滴入一定浓度的 TPP 溶液,继续超声 15 min,肉眼观察并记录不同配方体系的相变状态,体系呈现乳光时为形成纳米微球混悬液。

### 1.2.2 纳米银溶液含量测定方法的确定

1.2.2.1 测定波长的选择:精密量取 200  $\mu$ L 的纳米银溶液于 1 000 mL 棕色容量瓶中,用去离子水定容,配制成含纳米银 50.00 mg/L 的储备溶液,以去离子水作空白参比,利用紫外可见分光光度计,在 200~900 nm 范围内进行全波长扫描。

1.2.2.2 标准曲线的绘制:用移液管取储备液适量,精确配制成浓度为 2.00 mg/L、4.00 mg/L、8.00 mg/L、10.00 mg/L 的纳米银溶液。以去离子水为参比,在 410 nm 下使用可见紫外分光光度计测定其吸光度,每组平行测定 3 次,取 3 次平均值,并以浓度 C 对吸光度 A 作图。

1.2.2.3 稳定性试验:取浓度为 8.00 mg/L 纳米银溶液 50 mL,室温避光自然放置,于 0、2、4、6、8 h 取纳米银溶液 3 mL,测量其在 410 nm 处的吸光度,每组平行 3 次。

1.2.2.4 精密度试验:按照 1.2.2.2 项所示方法,取浓度为 4.00、6.00、8.00 mg/L 的纳米银溶液 3 mL,一天内重复测定 5 次及连续测定 5 d,分别计算日内、日间变异系数。

1.2.2.5 准确度试验:随机移取一定体积的纳米银溶液,经 PBS 缓冲液稀释分别获得精确浓度为 4.58 mg/L、7.95 mg/L 和 9.24 mg/L 的纳米银溶液。取各浓度纳米银溶液 3 mL,测定其 410 nm 处吸光度,每个浓度测 3 次。将测得的各浓度吸光度值代入回归方程,计算纳米银溶液的浓度,计算回收率。以回收率表示准确度。

1.2.3 正交试验 选择 CMC 溶液浓度(A),TPP 溶

液滴速(B),纳米银投入量(C)和空白因素(D)为 4 个试验因素,TPP 溶液浓度为 3.1 项中所选 TPP 溶液浓度。每个因素设 3 个水平,按照  $L_9(3^4)$  正交设计(见表 1),以包封率、纳米微球粒径及多分散系数作为考察指标,选出最优工艺。设定包封率的权重系数为 0.4,纳米微球粒径的权重系数为 0.3,多分散系数的权重系数为 0.3,综合评分= $[0.4X/61.67+0.3(1\ 000-Y)/485.9+0.3(1-Z)/0.808]\times 100\%$ 。将纳米银溶液加入不同浓度的 20 mL CMC 溶液中,避光超声 10 min,待其完全溶解,超声状态下按照相应滴速滴入不同浓度的 TPP 溶液 5 mL,继续超声 10 min,各组制得的纳米微球混悬液于 4  $^{\circ}$ C,16 000 r/min 离心 10 min,取上清液,定容至 25 mL,稀释 50 倍,按照正交试验表分别取 3 mL 溶液测量吸光度,代入标准曲线计算上清液中纳米银溶液浓度和包封率。

包封率=(纳米银投入量-上清液中纳米银质量)/纳米银投入量 $\times 100\%$ 。

使用粒径分析仪测量各组试验纳米微球粒径范围和多分散系数。

表 1 正交因素水平表

Tab 1 Table of orthogonal factors

因素 水平	CMC 溶液浓度 (mg/mL, A)	滴速 (s/滴, B)	纳米银投入量 ( $\mu$ L)	误差项 (D)
1	8.4	5	750(30 mg)	-
2	6.3	2	500(20 mg)	-
3	4.2	1	250(10 mg)	-

1.2.4 纳米微球的体外释放试验 结合正交试验结果,选取综合评分最高的 3 组实验工艺制备出的纳米微球进行体外释放试验。将各组载药纳米微球混悬液 10 mL 置于处理后的透析袋内,扎牢两端,绑于溶出仪的搅拌桨上。释放条件:pH 7.4 的 PBS 缓冲液 500 mL,37  $^{\circ}$ C,50 r/min,在 15、30、45 min、1、2、3、4、5、6、7、8 h 取样 3 mL,补充相同体积的介质。紫外分光光度法测量样品 410 nm 处吸光值,平行 3 次,计算累计释放量,绘制体外释放曲线。每组工艺选取 3 批样品分别进行测定,结果取平均值。

1.2.5 纳米微球体外释放拟合 选择累计释放率最高组,使用 Origin 8 进行拟合,计算  $R^2$ 。

1.2.6 纳米微球的贮存稳定性测定 取 3 批最优工艺制备出的纳米银纳米微球样品,避光密封贮存于 4  $^{\circ}$ C 条件下,于第 0、1、7、14、30 d 按照 1.2.3 项中测定包封率的方法测定纳米微球离心后上清液的吸光度,代入标准曲线计算纳米银溶液浓度,以纳米银的析出量表示纳米微球的稳定性。

2 结果

2.1 纳米微球制备 选择每个配方中,体系呈现乳光时所用的最高TPP 溶液的浓度,作为之后正交分析时所用的 TPP 溶液浓度,此时纳米微粒的交联较充分。不同配方时体系的相变状态见表 2。

表 2 反应体系相变状态

Tab 2 Phase transition of the reaction system		TPP(mg/mL)						
CMC(mg/mL)		2.8	3.7	4.7	5.6	6.5	7.5	8.4
8.4	+	+	*	*	*	*	*	*
6.3	-	-	+	+	+	*	*	*
4.2	-	-	-	+	+	+	+	*

-澄清,+有乳光,\*有絮状沉淀

Note:- represents Clarity, + represents opalescence,\*represents floc

2.2 纳米银溶液含量测定方法的确定

2.2.1 测定波长的选择 扫描结果见图 1。显示纳米银溶液在 410 nm 处出现一特征峰。故拟在 410 nm 处讨论测定纳米银浓度的可行性。

2.2.2 标准曲线的绘制 得到回归方程  $A = 0.1541C + 0.008$ ,  $R^2 = 0.9999$ ,结果见图 2。显示纳米银溶液的浓度与吸光度之间存在线性关系。

2.2.3 稳定性试验 结果见表 3。显示溶液在 8 h 内稳定性良好。

表 3 纳米银稳定性试验结果( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

时间/h	0	2	4	6	8
吸光度	1.242	1.243	1.240	1.243	1.242
	1.241	1.243	1.240	1.241	1.240
	1.240	1.242	1.241	1.245	1.241
$\bar{x} \pm s$	1.241±0.001	1.243±0.001	1.242±0.002	1.243±0.002	1.241±0.001
RSD/%	0.08	0.05	0.17	0.16	0.08

表 4 纳米银精密度试验结果( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

加入量(mg/L)	日内变异系数(n=5)		日间变异系数(n=5)	
	$\bar{x} \pm s/(mg/L)$	RSD/%	$\bar{x} \pm s/(mg/L)$	RSD/%
4.00	4.00±0.10	1.14	4.00±0.10	1.49
6.00	6.00±0.00	0.41	6.10±0.10	1.11
8.00	8.00±0.00	0.52	8.00±0.10	1.52

2.2.5 准确度试验 结果见表 5,显示回收率均符合含量测定要求。

2.3 正交试验 结果见表 6。利用 SPSS21.0 对正交试验结果进行方差分析,结果见表 7。

由表 6 可判断出在所选因素水平范围内,各因素的重要次序为 A>B>C,即羧甲基壳聚糖溶液浓

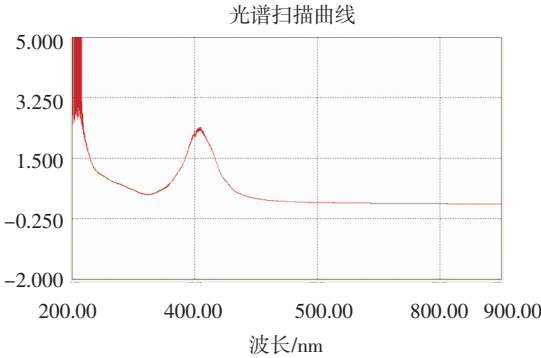


图 1 纳米银溶液的紫外-可见吸收光谱(20.00 mg/mL)

Fig 1 UV - Vis spectra of nanosilver solutions(20.00 mg/mL)

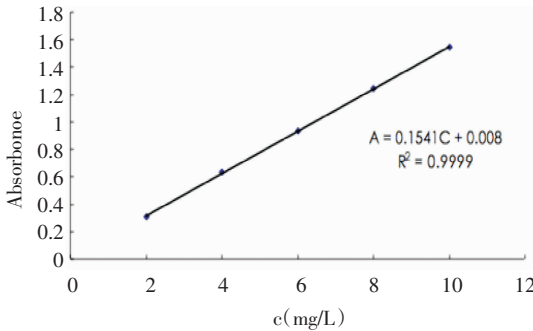


图 2 纳米银溶液标准曲线(410 nm)

Fig 2 Standard curve of nanosilver solutions(410 nm)

2.2.4 精密度试验 结果见表 4。日内日间精密度均符合含量测定要求。

表 5 纳米银回收率试验结果( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab 5 Results of recovery test of nanosilver( $\bar{x} \pm s, n=3$ )						
序号	配制浓度/(mg/L)	吸光度 A	测得浓度/(mg/L)	回收率	$\bar{x} \pm s/(mg/L)$	RSD/%
1	4.58	0.709	4.55	99.34	99.41±0.13	0.13
		0.710	4.56	99.56		
		0.709	4.55	99.34		
2	7.95	1.235	7.96	100.12	100.16±0.07	0.07
		1.235	7.96	100.12		
		1.236	7.97	100.25		
3	9.24	1.428	9.21	99.67	99.64±0.06	0.06
		1.426	9.20	99.57		
		1.428	9.21	99.67		

度>滴速>纳米银投入量。表 7 显示因素 A 有显著性影响,而因素 B 和 C 不具有显著性影响。选择 A3 作

表 6 正交试验结果

Tab 6 Results of orthogonal test

试验号	A	B	C	D	包封率 X/%	平均粒径 Y/nm	多分散系数 Z	综合评分
1	1	1	1	1	48.84	948.8	0.799	42.30
2	1	2	2	2	43.22	753.9	0.830	49.54
3	1	3	3	3	30.79	888.8	0.744	36.34
4	2	1	3	2	46.73	534.9	0.291	85.35
5	2	2	1	3	43.17	636.5	0.274	77.40
6	2	3	2	1	38.59	540.0	0.355	77.38
7	3	1	2	3	61.67	514.1	0.204	99.55
8	3	2	3	1	53.76	727.4	0.192	81.70
9	3	3	1	2	56.03	666.8	0.261	84.35
K1	128.18	227.20	204.05	201.38				
K2	240.13	208.64	226.47	219.24				
K3	265.60	198.07	203.39	213.29				
	42.73	75.73	68.02					
	80.04	69.55	75.49					
	88.53	66.02	67.80					
R	45.80	9.71	7.69					

为最优项,可以获得包封率较高,多分散系数较小的纳米微球。选择 B1 作为最优项,制备的纳米微球粒径更小。综合评分显示,A3B1C2 为最优工艺。

2.4 验证试验 选用最优工艺的配方重复试验 3 次,测得包封率分别为 61.52%、60.33%和 61.70%。

2.5 纳米微球的体外释放 根据正交试验结果,选取第 4 组、第 7 组、第 9 组工艺制备出的纳米微球进行体外释放试验,各组释放曲线见图 3。如图可见第 7 组纳米微球综合评分最高,纳米银释放过程前 2 h 内释放出约 50%的药量,之后释放比较平缓,8 h 累计释出 80%药量。与第 4 组和第 9 组比较,第 7 组纳米微球释药较完全。

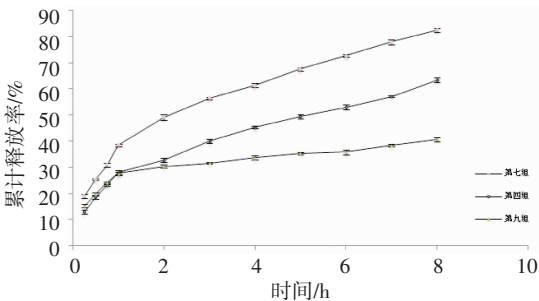


图 3 不同制备工艺的载药纳米微球的体外释放曲线(n=3)

Fig3 Releasing curve of drug-loadednanoparticles by different preparation techniques in vitro(n=3)

2.6 载纳米银纳米微球水凝胶体外释放拟合结果 结果见表 8。可见其一级方程拟合较好。

2.7 载纳米银纳米微球贮存稳定性测定 结果见表 9。载药纳米微球在 4℃下放置 30 d 无沉淀,离心

后其上清液中纳米银析出较少,结果显示其 30 d 内贮存稳定性良好。

表 7 方差分析

Tab 7 Analysis of variance

方差来源	离差平方和	自由度	F 比	F 临界值	P
A	3562.864	2	30.958	19.000	<0.05
B	144.973	2	1.260	19.000	>0.05
C	55.137	2	0.479	19.000	>0.05
D(误差项)	115.09	2	-	-	-

表 8 载药纳米微球体外释放拟合结果

Tab 8 The result of drug-loaded nanonanoparticles on relevant fitting

模型	拟合结果	拟合优度(R <sup>2</sup> )
零级	Q=6.91t+35.48	0.911
一级	Q=75.49(1-e <sup>-0.99x</sup> )	0.989
Higuchi	Q=24.59t <sup>1/2</sup> +17.91	0.942

表 9 载药纳米微球稳定性结果

Tab 9 The result of drug-loaded nanonanoparticles on stability

时间/d	0	1	7	14	30
纳米银溶液	6.14±0.08	6.12±0.10	6.19±0.10	6.21±0.08	6.25±0.05
浓度	6.71±0.07	6.69±0.11	6.70±0.10	6.75±0.09	6.75±0.10
$\bar{x}\pm s$ (mg/L)	6.33±0.10	6.33±0.10	6.38±0.12	6.37±0.09	6.41±0.11

3 讨论

离子交联法是制备纳米粒的一种常用方法。此方法的反应条件温和,不使用有机溶剂,且易于得到均一、可调整粒径范围的纳米粒<sup>[12]</sup>。邹竞<sup>[13]</sup>等采用离子交联法制备了壳聚糖载吡虫啉纳米微球,考察了其载药性能。张桂贤<sup>[2]</sup>等研究了乳化交联法制备



羧甲基壳聚糖-醋甲唑胺纳米微球,包封率达56%。本实验采用离子交联法制备载药纳米微球,利用无毒副作用的TPP对羧甲基壳聚糖进行离子诱导凝胶化而制备纳米粒,方法简单,工艺稳定且制得载药纳米微球包封率较高,粒径较小,分布均匀,为载银纳米微球的制备提供了最佳工艺。

本实验中使用4.2 mg/mL CMC溶液,7.5 mg/mL TPP溶液制备载药纳米微球,药物包封率高于使用其它两个浓度,可能是较高浓度的CMC溶液和较低浓度的TPP溶液在尚未交联完全时就趋向形成沉淀导致交联不完全。而此水平纳米微球分布较其它两水平更均匀,可能是由于若CMC溶液浓度过高,反应介质粘度增大,纳米银分散较差,导致在分散介质中发生团聚而使制得的纳米微球粒径增大且分布不均。实验中控制TPP溶液的滴速在5 s/滴,制备出的载药纳米微球粒径明显小于另外两个水平,可能是减慢了TPP溶液滴入CMC溶液中的速度,使CMC与TPP交联时间充足而制得载药纳米微球的粒径更小<sup>[14]</sup>。

本研究选取了正交试验综合评分最高的3组工艺制得的纳米微球进行体外释放考察,结果显示评分最高组较其他两组释药更完全且起始释放速率较快,这可能是由于此工艺制备出的纳米微球粒径更小<sup>[15]</sup>。粒径较大的纳米微球,其核心纳米银出现团聚的现象,释放时要通过载体材料较为困难,影响了释药效果。

从释放结果可以看出该制剂存在突释现象。在前2 h释放出约50%的药量,之后会缓慢释放。这种现象也出现在其他纳米微球缓释剂中。这是由于吸附在纳米微球表面的药物率先大量释放,而包裹入纳米球中的药物要透过载体材料释放或在载体材料崩解后释放,所以释放较为缓慢平稳<sup>[16]</sup>。感染早期,充足的释药量可以迅速提高血液中药物的浓度,使血药浓度更快地达到稳态,达到抑菌效果,之后缓慢释放,可以长时间维持药物有效浓度,减少给药次数。

在贮藏条件下,纳米微球稳定性良好,30 d内纳米银从微球中基本无析出,作为载体的羧甲基壳

聚糖没有出现溶解崩裂等现象,为该制剂今后的应用提供基础。

该实验证明通过离子交联法可制备出以羧甲基壳聚糖为载体,载纳米银的纳米微球,其安全性和局部抗感染作用还需进一步研究。

#### 参考文献

- [1] Dong-Jun Fu, Yu Jin, Mu-Qing Xie, et al. Preparation and characterization of m PEG grafted chitosan micelles as 5-fluorouracil carriers for effective anti-tumor activity[J]. Chinese Chemical Letters, 2014, 25(11): 1435
- [2] 张桂贤,陈斌,王晓辉,等.正交试验优选羧甲基壳聚糖-醋甲唑胺纳米微球的制备方案[J].天津药学, 2014, 26(2): 10
- [3] 朱寿进,刘法谦,王璟朝,等.新型羧甲基壳聚糖水凝胶的合成与表征[J].高等学校化学学报, 2014, 35(4): 863
- [4] Wu J, Zheng Y, Song W, et al. In situ synthesis of silver-nanoparticles/bacterial cellulose composites for slow-released antimicrobial wound dressing [J]. Carbohydrate Polymers, 2014(102): 762
- [5] 王智康,董政,刘樾,等.液体敷料治疗面部烧伤的临床观察[J].实用临床医药杂志, 2013, 17(09): 72
- [6] 陈炯,韩春茂,余朝恒.纳米银用于烧伤患者创面后银代谢的变化[J].中华烧伤杂志, 2004, 20(3): 161
- [7] 孙倩,李明春,马守栋.纳米银抗菌活性及生物安全性研究进展[J].药学研究, 2013, 32(2): 103
- [8] 蒋卫娟,关静,黄震.载银壳聚糖微球的制备及其抗菌性研究[J].包装工程, 2012, 33(21): 15
- [9] 李祖浩,王辰宇,王中汉,等.壳聚糖基水凝胶搭载抗菌剂在伤口愈合中的应用[J].中国组织工程研究, 2017, 21(30): 4885
- [10] Haider A, Haider S, Kang I K, et al. A novel use of cellulose based filter paper containing silver nanoparticles for its potential application as wound dressing agent [J]. 2017, (108): 455
- [11] 欧歌,廖德华,张凯,等.采用离子交联法制备壳聚糖胰岛素纳米粒的研究进展[J].中南药学, 2013, 11(2): 116
- [12] 陈思. 还原响应两亲性壳聚糖的制备及其作为纳米载体性能考察[D].广东药科大学, 2017
- [13] 邹竞,肖惠宁,何北海,等.壳聚糖纳米微粒的制备及其载药性能[J].造纸科学与技术, 2017, 36(2): 30
- [14] 王斌.聚乳酸载柚皮素复合纳米粒的制备、表征及其缓释与抗菌性能[D].太原理工大学, 2017
- [15] 赵凡.温度 pH 敏感微球的制备及对疟虫释放性能的研究[D].山东农业大学, 2013
- [16] 李光远,姜建石,陈斌,等.醋甲唑胺纳米球滴眼剂对家兔的降眼压作用及体外释放评价[J].中国新药杂志, 2015, 24(21): 2502

(2018-02-15 收稿)