Scientific Journal of Frontier Chemical Development
June 2015, Volume 5, Issue 1, PP.8-12

Preparation and Characterization of Norfloxacin Chitosan Microspheres

Rong Pan [1,2], Ziru Lian [2†], Jiangtao Wang [1†]

1. Key Laboratory of Marine Chemistry Theory and Technology, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao, 266100, China

2. Marine College, Shandong University, Weihai, 264209, China

[†]Email: yoyo-lzr@hotmail.com (Z. Lian); jtwang@ouc.edu.cn (J. Wang)

Abstract

Norfloxacin (NFX)/ Chitosan (CS) microspheres were prepared by using inverse emulsion polymerization and cross-linking method. Glutaraldehyde was used as cross linker. Orthogonal design based on 4 factors: core-shell ratio, chitosan concentration, dosage of cross linker, agitation speed. Based on the entrapment efficiency and drug loading content of microspheres by orthogonal array analysis, the optimum condition for microspheres preparation was: core-shell ratio = 1:10, chitosan concentration (w/v) = 4%, dosage of cross linker (v/ v) = 1%, agitation speed = 800 rpm. The microspheres were characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and scanning electron microscopy (SEM). Cumulative release profile of NFX from the microspheres in seawater was measured in 48 h. The drug released slower as chitosan increases.

Keywords: Norfloxacin; Chitosan; Microspheres; Seawater; Controlled Release

诺氟沙星壳聚糖微球的制备及表征

潘容 [1, 2]，连子如 [2]，王江涛 [1]

1. 中国海洋大学海洋化学理论与工程技术教育部重点实验室，山东 青岛 266100

2. 山东大学(威海)，海洋学院，山东 威海 264209

摘　要：利用反相乳液聚合-化学交联法，以戊二醛作为交联剂制备诺氟沙星-壳聚糖微球。根据正交实验设计，考察核壳比、壳聚糖用量(w/v)、交联剂用量(v/v)和转速 4 个因素对微球制备的影响。基于微球的载药量和包封率综合，得到最佳制备条件：(1)核壳比 1:10，(2)壳聚糖用量(w/v) 4%，(3)交联剂用量(v/v)1%，(4)转速 800 rpm。利用扫描电镜、红外光谱对最佳制备条件下得到的微球进行表征。测定壳聚糖微球在天然海水环境中 48 h 内的释药速率，壳聚糖用量越大，药物释放越缓慢。

关键词：诺氟沙星；壳聚糖；微球；海水；缓释

引言

壳聚糖是由甲壳素脱乙酰基所得到的产物，是迄今为止自然界中唯一存在的具有天然碱性的多糖[1]。它具有良好的生物相容性和生物可降解性，亲水性强，无毒性、对环境友好，是一种常用的天然药物、基因载体材料[2]。壳聚糖潜在的良好性能使其具有广阔的前景，其作为高分子缓释载体材料的应用价值得到了越来越广泛的关注。通过控制壳聚糖的分子量、用量、载药量、交联度等可实现对药物的控制释放[3-5]。

诺氟沙星是一种氟喹诺酮类抗菌药，具有广谱抗菌作用，几乎不溶于水、脂溶性较差，药物穿透能力不强，生物利用度低[6]。可以将诺氟沙星和壳聚糖结合在一起，使诺氟沙星通过扩散等方式在一定时间内以一定的速度释放到环境中。通过药物缓释技术，用药后能在较长时间内持续释放药物，以达到长效作用，提高药物利用率[7-8]。

南美白对虾养殖业中时常有病害发生，其中由弧菌引起的红腿病发病率极高，达到 80~90%，对对虾的养成期危害较大，一般在养殖初期将诺氟沙星与饲料混合投喂防治[9]。将诺氟沙星制成缓释微球应用于对虾养殖中的相关研究报道较少，本研究中使用了两种不同分子量的壳聚糖混合制备诺氟沙星-壳聚糖微球，并对制备条件进行优化，同时对微球进行了表征并测定其在天然海水中的释药率。以期提高虾对诺氟沙星药物利用率，增大药在水体中作用时间，减少投药次数和使用量，同时减少诺氟沙星对近岸水体环境和其他生物污染，进而保护近岸水体环境。

1 实验

1.1 试剂与仪器

试剂为：壳聚糖（CS1，平均相对分子量为 120000，青岛海汇生物工程有限公司）；壳聚糖（CS2，平均相对分子量为 1500，肇庆长龙生物科技有限公司赠送）；诺氟沙星(Norfloxacin, NFX)和戊二醛(50%)购自上海阿拉丁试剂公司；其他药品和试剂均为分析纯。

仪器为：S-4800 冷场发射扫描电子显微镜（日本日立公司）；Tensork-27 型傅立叶红外光谱仪（德国 Bruker 公司）；Hitachi L-2000 高效液相色谱仪（日本日立公司）；UV-2550 紫外分光光度计（日本岛津公司）；AnKe TDL-40B 飞鸽离心机（上海安亭科学仪器厂）；超纯水系统（美国 Millipore 公司制造）。

1.2 微球的制备

称取一定量的 CS1 和 CS2 混合溶于 8 mL 1%醋酸溶液中，搅拌并超声至完全溶解。称取一定量的 NFX 溶于 2 mL 的 0.1 mol/L 的盐酸溶液中，待完全溶解后，将诺氟沙星溶液加入到壳聚糖溶液中，搅拌使其混合均匀。混合物缓慢滴加到盛有 100 mL 石蜡油的三颈烧瓶中，以 2%的 Span80 作为乳化剂，高速搅拌乳化 1 h，形成稳定的微乳液，然后将一定量的戊二醛缓慢的逐滴滴入三颈烧瓶中交联固化，搅拌反应 3 h。冷却，用丙酮破乳、4000 rpm 离心 15 min、然后用石油醚和异丙醇交替洗涤沉淀并离心，沉淀在 60℃真空干燥，得橙黄色粉末，即诺氟沙星-壳聚糖微球(NFX-CSM)。采用同样方法，不加 NFX，得到空白壳聚糖微球(CSM)。

本实验综合考察了诺氟沙星-壳聚糖微球制备过程中的核壳比、壳聚糖用量、交联剂用量、转速 4 个因素，分 3 个水平，设计了 L9(3^4)正交实验。

1.3 表征和性能检测

1.3.1 NFX-CSM 的形貌表征

用 S-4800 冷场发射扫描电子显微镜对 NFX-CSM 样品形貌进行观察。

1.3.2 NFX-CSM 的结构表征

采用傅立叶外光谱仪分别对壳聚糖、壳聚糖微球和诺氟沙星样品进行红外光谱测试。样品采用 KBr 压片法，扫描范围从 400 到 4000 cm^{-1}，分辨率为 4 cm^{-1}。

1.3.3 NFX-CSM 的载药率和包封率的测定

精确称取一定量壳聚糖微球，放入 100 mL 圆底烧瓶，并加入一定量 0.1 mol/L 的盐酸溶液，水浴加热回流反应 2 h 至微球中药物充分溶解释放。过滤，冷却，滤液定容于 100 mL 容量瓶中，用紫外分光光度计测其吸光度（波长 278 nm），与标准曲线比较求出其浓度，壳聚糖微球载药率和包封率的计算公式分别为：

$$载药率(\%)=W_n/W_m\times 100\% \quad (1)$$

$$包封率(\%)=W_n/W_s\times 100\% \quad (2)$$

式中，Wm 为壳聚糖微球总质量(g)，Wn 为诺氟沙星被包裹入微球的质量(g)，Ws 为初始加入的诺氟沙星质量(g)。

1.3.4 天然海水中的缓释实验

准确称取一定量壳聚糖微球，加入到 100 mL 的天然海水中，定时取样 5 mL，用高效液相色谱分析其中诺氟沙星的浓度。根据标准曲线方程计算其浓度，绘制累积释药率-时间曲线。

色谱条件：Hitachi L-2000 高效液相色谱仪（日本日立公司），L-2455 二极管阵列检测器（日本日立公司）；色谱柱 C18（上海 Agela 公司，250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相 0.025 mol/L 磷酸溶液(用三乙胺将 pH 调至 3.00)-乙腈=87:13；检测波长 278 nm；流速 1 mL/min；柱温为室温；进样量 20 μL。

2 结果与讨论

2.1 正交实验优化实验条件

在预实验的基础上，选定两种壳聚糖配比为 CS1:CS2 为 1:3 制备壳聚糖微球，NFX-CSM 制备优化过程中采用正交矩阵分析。实验结果如表 1 所示：

表 1 正交实验结果

序号	核壳比	壳聚糖用量(w/v)/%	交联剂用量(v/v)/%	转速/rpm	包封率/%	载药量/%	载药率+包封率/%
1	1:5	2	1	500	29.3	5.4	34.7
2	1:5	3	2	800	34.5	5.1	39.6
3	1:5	4	3	1100	35.8	5.3	41.6
4	1:10	2	2	1100	33.5	4.7	38.2
5	1:10	3	3	500	32.8	4.4	37.2
6	1:10	4	1	800	40.5	5.0	45.5
7	1:15	2	3	800	32.0	3.1	35.1
8	1:15	3	1	1100	30.5	3.3	33.8
9	1:15	4	2	500	31.6	3.5	35.1
K_1	38.6	36.0	38.0	35.6			
K_2	40.3	36.9	37.6	40.1			
K_3	34.6	40.7	37.9	37.9			

由载药量和包封率综合考察了诺氟沙星-壳聚糖微球制备过程中的核壳比、壳聚糖用量(w/v)、交联剂用量(v/v)、转速 4 个因素，分 3 个水平，设计了 L9 (3^4)正交实验。对不同因素和个水平列出 9 种分析，根据表 1 结果，我们可以得到，微球制备的最佳条件为：核壳比为 1:10、壳聚糖用量(w/v)为 4%、交联剂用量(v/v)为 1%、转速为 800 rpm。且制备过程中各因素的重要次序依次为：核壳比>壳聚糖用量(w/v)>转速>交联剂用量(v/v)。根据最佳实验条件制的诺氟沙星-壳聚糖微球的载药量和包封率分别为 5.0%和 40.5%，以下实验所用诺氟沙星-壳聚糖微球均按最佳实验条件制得。

2.2 NFX-CSM 表面形态分析

载药微球的表面形态 SEM 照片如图 1 所示，由图可见微球呈球形良好，微球粒径分布在 1~4 μm 之间，有轻微团聚现象，粒径分布不均匀。药物释放速度与微球大小有一定关系，球形小释放速率快，反之球形大释放速率慢。

2.3 红外光谱分析

分别对 CS1、CS2、NFX-CSM、NFX 进行红外吸收光谱分析，结果如 2 所示。

从图中可以看出，CS1 和 CS2 的吸收峰位置一致，由于分子量大小差异，峰的大小有区别。对于 CS1 和 CS2 在 3385 cm^{-1} 处为壳聚糖分子中 O-H 和 N-H 伸缩振动吸收峰，1597 cm^{-1} 处为 N-H 弯曲振动吸收带。

NFX 特征吸收峰在 1728 cm^{-1} 和 1619 cm^{-1} 分别为羧基上羰基振动吸收峰和环上羰基吸收峰。在 825 cm^{-1} 和 751 cm^{-1} 处的峰为 CF=CH 中的 C-H 的面外变形振动峰，1256 cm^{-1} 处的峰为 C-N 伸缩振动峰。

NFX-CSM 在 1637 cm^{-1} 有吸收峰，而 1158 cm^{-1} 附近吸收峰消失，说明 CS 和戊二醛发生交联反应生成席夫碱。1715 cm^{-1} 处的吸收峰为 NFX 被 CS 包埋后特征吸收峰发生偏移。NFX-CSM 没有出现新的特征峰，说明 CSM 与 NFX 之间没有发生化学键的断裂和生成，主要是以物理包埋的方式进行结合。

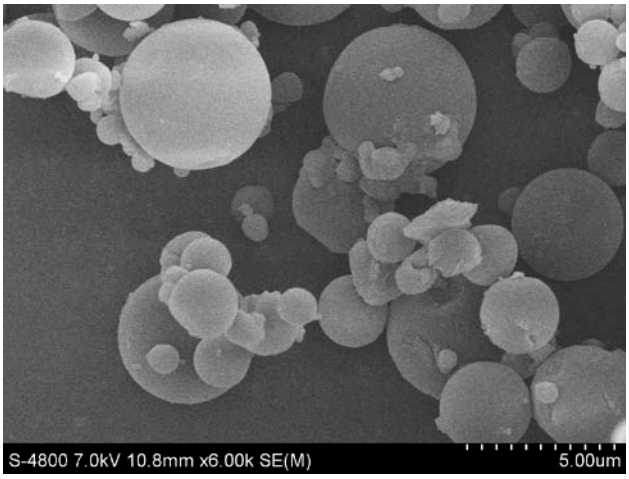


图 1 诺氟沙星-壳聚糖微球的扫描电镜图

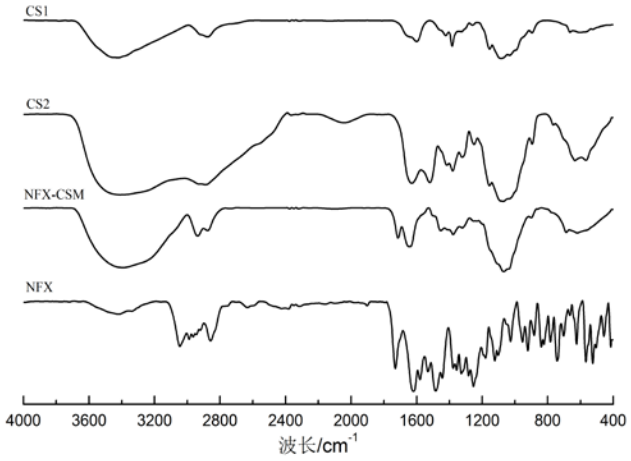


图 2 CS1，CS2，NFX-CSM 和 NFX 的红外吸收谱图

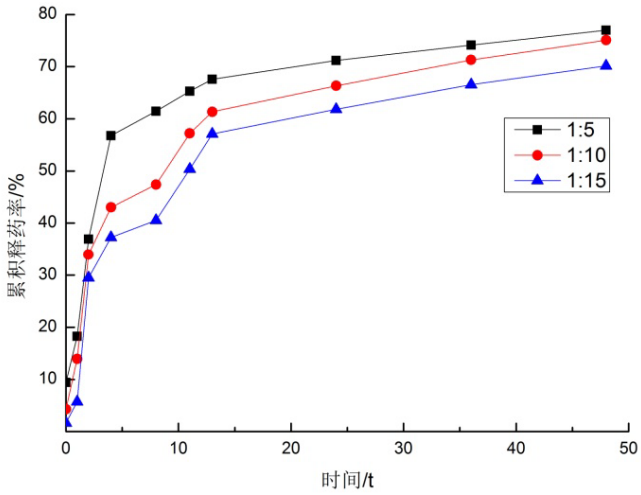


图 3 不同核壳比的 NFX-CSM 在天然海水中的释药曲线

2.4 天然海水中 NFX 的缓释研究

图 3 所示为不同核壳比条件下所制备的诺氟沙星-壳聚糖微球在天然海水中的释药曲线。从图中可以看出，微球对诺氟沙星的累积缓释率随着缓释时间的增加而逐渐增大，微球累积释药率达到 50%所用的时间分别为 4 h、9 h、11 h（核壳比为 1:5、1:10、1:15）。当核壳比为 1:5 时，在释药的前 5 h 内，累积释药率为 56%；当核壳比为 1:10 时，在释药的前 5 h 内，累积释药率为 43%；当核壳比为 1:15 时，在释药的前 5 h 内，累积释药率为 37%。在 48 h 时，核壳比 1:5、1:10、1:15 制成微球累积释药率均可达 70%以上，分别为 77%、75%、70%。

这个结果说明，壳聚糖的用量越多，药物被包埋的越紧密，药物释放的速率越缓慢，缓释效果越明显。

3 结论

a. 用反相乳液聚合−化学交联法，制备的微球球形圆整，药物主要以物理包埋方式与壳聚糖进行结合。

b. 在壳聚糖诺氟沙星微球制备过程中各因素的重要次序依次为：核壳比、壳聚糖用量、转速、交联剂用量。

c. 壳聚糖诺氟沙星微球在天然海水中缓释效果良好，增加壳聚糖的使用量可使得缓释速率变慢。

REFERENCES

[1] Wang A Q,Chitin Chemistry[M]. Science Press, 2008

[2] Yang T, Hou W L, Yang Y D.The Preparation of Chitosan Microspheres and Application in Biology and Medicine[J]. Polymer Bulletin 2011 (5): 51-56

[3] Hua S, Yang H, Wang W, et al. Controlled release of ofloxacin from chitosan–montmorillonite hydrogel[J]. Applied Clay Science, 2010, 50(1): 112-117

[4] Hui P C L, Wang W Y, Kan C W, et al. Preparation and characterisation of chitosan microcapsules loaded with Cortex Moutan[J]. International journal of biological macromolecules, 2013, 55: 32-38

[5] Huang L, Sui W, Wang Y, et al. Preparation of chitosan/chondroitin sulfate complex microcapsules and application in controlled release of 5-fluorouracil[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 80(1): 168-173

[6] Guo H Y, Ma Y G, Zhu L,et al. The Pharmacokinetics and Residual Regulation of Quinolones in Aquatic Animals[J].Journal of Hydroecology, 2008, 1(1): 34-41

[7] Zhang Z F, Zhou J P, Huo M R.Chitosan Microspheres Drug Delivery Systems[J]. Progress in Pharmaceutical Sciences, 2006, 30(6): 261-266

[8] Wang S, Ye G H, Zheng M Y,et al.The Application of Chitosan Microsphere[J]. Chemical Intermediates, 2008 (1): 30-34

[9] Shi H T, Wei M Y. Methods of prevention of Penaeus vannamei Vibrio[J].Shandong Fisheries, 2005, 22(3): 36-36

【作者简介】



[1] 潘容（1990-），男，汉族，理学学士学位，主要从事药物缓释研究，化学工程硕士研究生在读。
Email: 424242423@163.com

[2] 连子如（1982-），女，汉族，理学博士，讲师，主要从事海洋化学相关研究。Email: yoyo-lzr@hotmail.com

[3] 王江涛（1967-），男，蒙古族，理学博士，教授，主要从事海洋化学相关研究。Email: jtwang@ouc.edu.cn