

包含金纳米粒子的聚电解质微囊的制备

孙雅洁, 朱家璧*, 郑春丽

(中国药科大学药剂研究所, 江苏 南京 210009)

摘要: 本文制备了含金纳米粒子的聚电解质微囊, 并进行了表征。以碳酸钙粒子为模板, 在其表面组装聚丙烯胺盐酸盐 [poly (allyamine hydrochloride), PAH] 和金纳米粒子, 得到以碳酸钙粒子为母核, PAH/金纳米粒子为壳的核壳结构微粒。用乙二胺四乙酸二钠 (EDTA) 溶解碳酸钙, 即可得到含金纳米粒子的聚电解质微囊。用扫描电镜表征碳酸钙粒子、含金纳米粒子的聚电解质微囊去掉母核前后的形状, 可观察到碳酸钙粒子表面包裹金纳米粒子前后的差别。用显微镜表征了微囊在溶液中的形态, 微囊在水中分散性良好。载入异硫氰酸荧光素标记的牛血清白蛋白 (FITC-bovine serum albumin, FITC-BSA) 作为模型药物, 用荧光显微镜可以观察到微囊内有一定的荧光强度, 检测得到牛血清白蛋白的包封率为 $(34.31 \pm 2.44) \%$, 聚电解质微囊载药量为 $(43.75 \pm 3.12) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

关键词: 金纳米粒子; 聚电解质微囊; 迭层自组装技术

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 03-0371-05

Preparation of polyelectrolyte microcapsules contained gold nanoparticles

SUN Ya-jie, ZHU Jia-bi*, ZHENG Chun-li

(Pharmaceutical Research Institute, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract: In this work, polyelectrolyte microcapsules containing gold nanoparticles were prepared via layer by layer assembly. Gold nanoparticles and poly (allyamine hydrochloride) (PAH) were coated on the CaCO_3 microparticles. And then EDTA was used to remove the CaCO_3 core. Scanning electron microscopy (SEM) was used to characterize the surface of microcapsules. SEM images indicate that the microcapsules and the polyelectrolyte multilayer were deposited on the surface of CaCO_3 microparticles. FITC-bovine serum albumin (FITC-BSA, 2 mg) was incorporated in the CaCO_3 microparticles by co-precipitation. Fluorescence microscopy was used to observe the fluorescence intensity of microcapsules. The encapsulation efficiency was $(34.31 \pm 2.44) \%$. The drug loading was $(43.75 \pm 3.12) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$.

Key words: gold nanoparticle; polyelectrolyte microcapsule; layer by layer assembly

近年来, 运用迭层 (layer by layer, LBL) 自组装技术制备结构、性能可调控的中空聚电解质微囊已引起了人们广泛的关注^[1-3]。聚电解质微囊作为一种全新的微粒给药系统, 与传统给药系统相比具有很多优势, 如微囊内药物的释放能达到定点、定位释放, 在药物传递领域有潜在的应用价值。迭层自组装技术

是指采用微米级或者纳米级的带电微球为模板, 在微球表面交替吸附聚电解质, 利用异种电荷之间的静电吸引力, 在微球表面形成多层聚电解质膜, 最后去除微球模板得到中空聚电解质微囊。通过迭层自组装技术制备的微囊性质可以通过改变模板或者囊壁材料等调控, 如调节模板的大小可以控制微囊的尺寸, 调整囊壁材料可以改变囊壁的厚度和通透性, 实现微囊内药物的缓慢释放, 还可以实现 pH、温度、电荷和光电磁等智能响应^[4-6]。Antipov 等^[7]首先发现用负电性的强聚电解质聚苯乙烯磺酸钠 [poly (so-

收稿日期: 2009-10-10.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30772663); “重大新药创制”科技重大专项 (2009ZX09310-004).

*通讯作者 Tel: 86-25-83271316, E-mail: zhujiabi001@yahoo.com

dium styrene sulfonate), PSS] 和正电性的弱电解质聚烯丙基胺盐酸盐 [poly (allyamine hydrochloride), PAH] 配对组成的囊壁具有 pH 响应性。

作为囊壁材料之一的金属纳米材料具有纳米微粒的特性, 如量子尺寸效应、表面效应, 从而表现出独特的光学、电学和化学特性, 一直备受人们的关注。Skirtach 等^[8]发现含有银颗粒或红外染料的聚电解质微囊具有红外光响应。金纳米粒子是具有代表性的金属纳米材料之一, 但当金被制成纳米数量级的粉末时, 其表现出特殊的物理和化学性质, 如荧光特性、超分子和分子识别等特性。以金纳米粒子作为囊壁材料制备得到的微囊, 在低功率的近红外激光辐照下, 能吸收近红外区的激光, 产生局部高温破坏囊壁, 微囊发生破裂, 从而达到囊内药物的脉冲释放, 这使释放行为达到了光响应。Angelatos 等^[9]在 PSS/PAH 组成的微囊外包裹金纳米粒子, 用 1 064 nm 的近红外光激发微囊, 通过对比激发前后聚电解质微囊的扫描电镜图片, 发现微囊破裂, 实现了聚电解质微囊的光响应。这种远程控释手段十分有助于聚电解质微囊在医学上的应用。

本研究选择金纳米粒子和 PAH 为囊壁材料, 以碳酸钙粒子为母核, 在碳酸钙粒子上通过迭层自组装技术制备聚电解质微囊, 并用扫描电镜表征碳酸钙粒子, 包含金纳米粒子的聚电解质微囊去掉母核前后的形状, 微囊在溶液中的形态通过显微镜观察。并以异硫氰酸荧光素标记的牛血清白蛋白 (FITC-bovine serum albumin, FITC-BSA) 作为模型药物载入, 用荧光显微镜观察牛血清白蛋白在微囊内的分布情况, 并测定蛋白的包封率和聚电解质微囊的载药量。

材料与方法

仪器 DKW-III型电子节能控温仪 (南京科尔设备有限公司); S-3000 型扫描电子显微镜 (日本 Hitachi 公司); H-7650 型透射电子显微镜 (日本 Hitachi 公司); 热台偏振光显微镜 (Linkam DSC600); Agilent 8453 扫描可见紫外分光光度计 (美国 Agilent 公司); 200 倒置荧光显微镜 (Carl Zeiss Axiovert); RF-5301PC 荧光分光光度计 (日本岛津公司); Zeta-sizer 激光粒径测定仪 (英国 Malvern 公司)。

药品与试剂 柠檬酸钠 (上海试剂一厂); 氯金酸 (HAuCl_4 , $\geq 47.8\%$, 国药集团化学试剂有限公司); 乙二胺四乙酸二钠 (EDTA, 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 无水氯化钙 (分析纯, 广东汕头市西陇化工厂); 无水碳酸钠 (分析纯, 南京化学试剂有

限公司); 氯化钠 (南京化学试剂有限公司); 聚苯乙烯磺酸钠 (PSS, Sigma-Aldrich, 相对分子质量 70 000, 批号: 00527TD); 聚烯丙基胺盐酸盐 (PAH, Sigma-Aldrich, 相对分子质量 59 000, 批号 14808HD); 牛血清白蛋白 (BSA, 上海惠兴生化试剂有限公司, 批号 080328); 二甲基亚砷 (DMSO, 上海亭新化工试剂厂); 碳酸氢钠 (分析纯, 南京化学试剂有限公司); 异硫氰酸荧光素 (FITC, Sigma-Aldrich)。

金纳米粒子的制备 采用柠檬酸钠还原法制备金纳米粒子^[10, 11], 即在氯金酸溶液中加入还原剂柠檬酸钠, 并通过改变柠檬酸钠的量, 使氯金酸中的 Au^{3+} 被还原成 Au^0 , 形成粒径为 10~100 nm 的金纳米粒子。将 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 氯金酸溶液 5 mL 加入到 15 mL 的蒸馏水中加热, 用磁力搅拌在 $800 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下剧烈搅拌, 加热回流, 温度升至 115°C 时, 迅速加入 1.5% 柠檬酸钠溶液 0.7 mL。一段时间后, 溶液由氯金酸的浅黄色变为灰白色, 瞬间变为酒红色, 115°C 下继续加热回流 15 min, 之后移至冰浴中搅拌 20 min, 保存备用。

FITC-BSA 的制备 用碳酸盐缓冲液 (pH 9.3) 将牛血清白蛋白配制成浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 异硫氰酸荧光素溶于二甲基亚砷中配成 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 按照异硫氰酸荧光素/牛血清白蛋白 3:1 的摩尔比进行混合, 搅拌条件下将异硫氰酸荧光素溶液缓慢滴入牛血清白蛋白溶液中, 室温下搅拌 12 h, 装入透析袋, 在蒸馏水中透析 2 d, 冷冻干燥, 得到 FITC-BSA, 备用。

包含 FITC-BSA 的碳酸钙粒子的制备 采用共沉淀法制备碳酸钙粒子^[12-14]: 称取 Na_2CO_3 0.349 8 g 溶于 10 mL 量瓶中, 加入 PSS 0.02 g, 用蒸馏水稀释至刻度。称取 CaCl_2 0.366 3 g 溶于 10 mL 量瓶中, 加入 FITC-BSA 0.002 g, 用蒸馏水稀释至刻度。室温搅拌, 混合两个溶液, 继续搅拌 10 s, 静置 10 min, 即可得到碳酸钙粒子。离心收集上清液, 碳酸钙粒子用蒸馏水清洗 3 遍, 备用。

包含金纳米粒子的聚电解质微囊的制备 称取一定量的 PAH 配成 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 并在溶液中加入一定量的 NaCl。称取适量的碳酸钙粒子, 加入 PAH 溶液 1 mL, 轻摇 10 min, 保持碳酸钙粒子悬浮在溶液中。离心去除上层液体, 蒸馏水清洗 3 遍, 再取上述制备的金纳米粒子溶液, 加入至碳酸钙粒子中, 轻摇 10 min, 之后离心去除上层液体, 蒸馏水清洗 3 遍, 即完成 1 个双层包衣。重复上述操作 2 次, 即可得到包裹了 3 层 (PAH/金纳米粒子) 的碳酸钙粒子。

配制 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA 溶液 15 mL, 将上述制备的包裹了 3 层 (PAH/金纳米粒子) 的碳酸钙粒子稀释至 10 mL, 在磁力搅拌下将 EDTA 溶液缓慢滴加到碳酸钙混悬液中, 待反应完全后, 离心除去上清液, 蒸馏水清洗 3 遍, 冷冻干燥即可得到金纳米粒子包裹的微囊。

金纳米粒子的表征 金纳米粒子溶液用蒸馏水稀释 10 倍, 取适量滴至铜筛网上, 透射电镜拍照, 对形状和粒度进行观察。样品用紫外分光光度计扫描, 确定最大吸收峰位置。用激光粒径测定仪测定金纳米粒子的粒径及 zeta 电位。

包含金纳米粒子的聚电解质微囊的形状表征 称取一定量的碳酸钙粒子和聚电解质微囊分别溶于蒸馏水中, 用显微镜观察形态。用扫描电镜表征碳酸钙粒子、包含金纳米粒子的聚电解质微囊去掉母核前后的形状。用激光粒径测定仪测定碳酸钙粒子、包含金纳米粒子的聚电解质微囊的粒径及 zeta 电位。

包封率和载药量的测定 将制备碳酸钙粒子时收集得到的上清液, 用荧光分光光度计测定其荧光强度, 激发波长 500 nm, 发射波长 519 nm, 狭缝 5 nm, FITC-BSA 的包封率 (entrapment efficiency, EE) 可用下式求算:

$$\text{EE} \% = \frac{W_T - W_F}{W_T} \times 100\%$$

式中, W_T , W_F 分别表示加入的 FITC-BSA 总量和未被包封的游离蛋白量。

微囊的载药量 (drug loading, DL) 可用下式求算:

$$\text{DL} \% = \frac{W_{\text{pro}}}{W_T} \times 100\%$$

式中 W_T , W_{pro} 分别表示微囊的总质量和载入蛋白的质量。用荧光显微镜观察聚电解质微囊。

结果

1 金纳米粒子的表征

金纳米粒子溶液不同于氯金酸溶液的浅黄色而呈酒红色, 并且随着粒径的减小, 颜色逐渐变为橙红色, 这是表面等离子共振的结果。图 1 (a) 显示金纳米粒子溶液在 520 nm 处有强吸收, 这是因为金纳米粒子表面受到入射光电磁波影响而产生等离子共振, 等离子共振吸收是略高于费米能级的导带中自由电子在交变磁场的偶极振荡引起的, 不同的偶极振荡形式与粒径大小有一定的关系。因此不同尺寸的金纳米粒子在紫外吸收光谱中的吸收峰位置不同, 这可通过紫外光谱来确定金纳米粒子的尺寸。当金纳米粒子处于不同的体系, 或者表面有聚合物吸附时, 其共振峰位和峰型都会发生变化^[15]。图 1 (b) 显示金纳米粒子的圆形度较好, 粒径比较均匀, 单分散性较好。用激光粒径测定仪测定金纳米粒子平均粒径为 21.5 nm, zeta 电位为 $(-4.4 \pm 0.5) \text{ mV}$ 。

2 包含金纳米粒子的聚电解质微囊的形貌表征

2.1 扫描电镜观察碳酸钙粒子、包含金纳米粒子的聚电解质微囊 将碳酸钙粒子、包含金纳米粒子的聚电解质微囊去掉母核前后分别冷冻干燥, 用扫描电镜进行观察。图 2 (a) 显示碳酸钙粒子表面较为光滑, 没有明显的空洞。而图 2 (b) 显示表面包裹了金纳米粒子和 PAH 的碳酸钙粒子相对比较粗糙, 且有起伏, 衣膜紧紧吸附在碳酸钙粒子上。图 2 (c) 为除掉碳酸钙粒子后形成的聚电解质微囊, 可以观察到, 囊膜向内凹陷, 呈现多边形的空腔, 表面形成了很多褶皱。

2.2 显微镜观察碳酸钙粒子、包含金纳米粒子的聚电解质微囊 碳酸钙粒子分散在溶液中的形态见图 3 (a), 除掉碳酸钙母核后的聚电解质微囊分散在水中的形态见图 3 (b)。比较两图发现, 聚电解质微囊与碳酸钙粒子大小接近, 这说明碳酸钙母核的大小决定

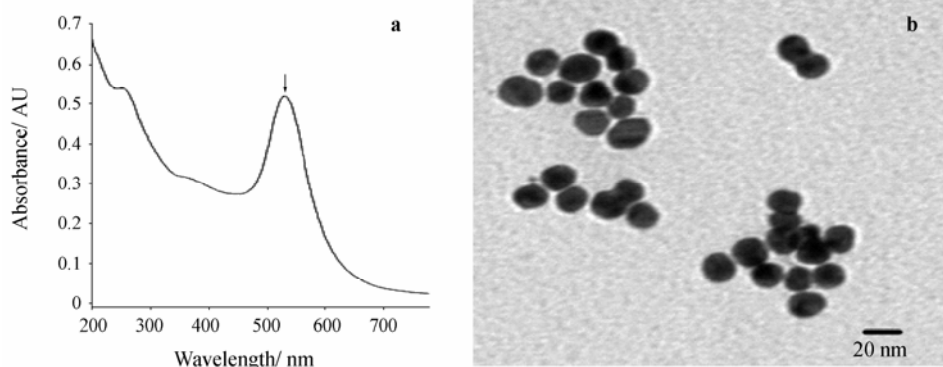


Figure 1 UV-vis absorption spectra of gold nanoparticles (a); TEM images of gold nanoparticles (b)

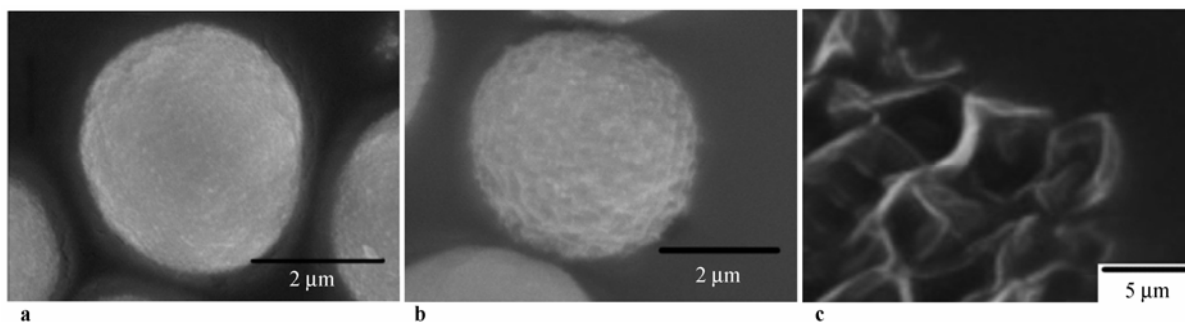


Figure 2 SEM images of CaCO₃ microparticles before LBL assembly (a); after coating with 3 bilayers PAH/gold nanoparticles (b); hollow (PAH/gold nanoparticles)₃ microcapsules obtained after dissolution of the CaCO₃ core (c)

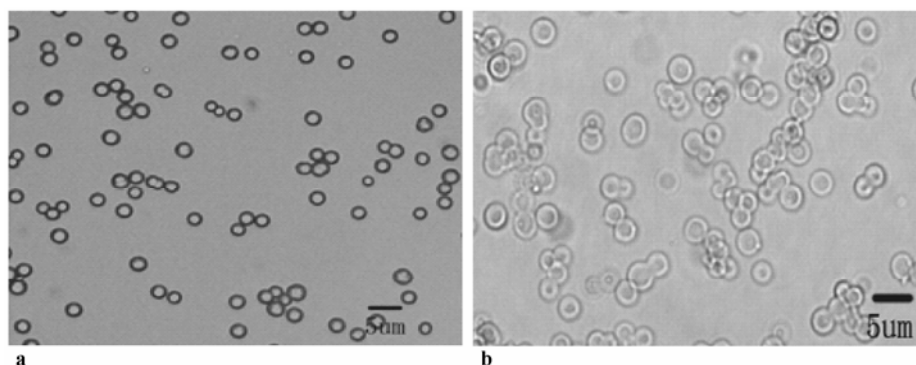


Figure 3 The microscopy images of CaCO₃ core (a) and microcapsules (b) in the water

微囊大小, 微囊呈圆形, 且分散良好, 无大块聚集。

2.3 碳酸钙粒子、包含金纳米粒子的聚电解质微囊的粒径及 zeta 电位 用激光粒径测定仪测定碳酸钙粒子平均粒径为 $(3.3 \pm 0.3) \mu\text{m}$, zeta 电位为 $(-21.5 \pm 0.7) \text{mV}$ 。包含金纳米粒子的聚电解质微囊的平均粒径为 $(3.2 \pm 0.1) \mu\text{m}$, zeta 电位为 $(-2.2 \pm 0.2) \text{mV}$ 。通过比较粒径大小, 发现聚电解质微囊与碳酸钙粒子大小接近, 这与在显微镜下观察到的结果一致, 说明碳酸钙母核的大小决定聚电解质微囊的大小。碳酸钙母核内部含有 PSS, 呈负电性, 而聚电解质微囊最外面一层为金纳米粒子, 带负电, 电位接近金纳米粒子的电位。

3 包封率的测定

FITC-BSA 在 $0.96 \sim 8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 线性关系良好, 以峰面积 (A) 对浓度 (C) 进行线性回归, 标准曲线为 $A = 0.0087C + 0.4598$, 相关系数 $r = 0.9996$, 日内和日间精密度 RSD 分别为 0.97% 和 0.54%。低、中、高 ($0.96, 3.2, 8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 3 种质量浓度的牛血清白蛋白回收率分别为 100.29%、99.86%、101.19%。聚电解质微囊对牛血清白蛋白的包封率为 $(34.31 \pm 2.44) \%$, 载药量为 $(43.75 \pm 3.12) \text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

在荧光显微镜下观察聚电解质微囊中牛血清白蛋白的分布情况见图 4, 微囊内一定的荧光强度说明

包裹有一定的牛血清白蛋白。

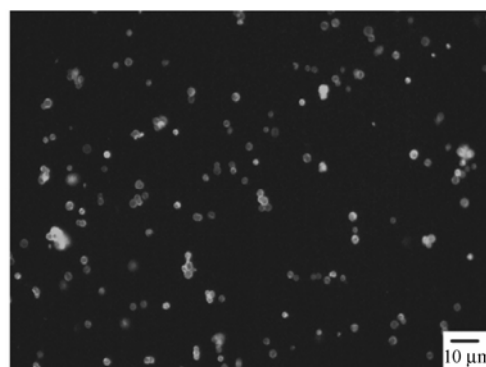


Figure 4 The fluorescence microscopy images of microcapsules contained FITC-BSA

讨论

制备了一定大小的金纳米粒子作为囊壁材料, 与聚电解质 PAH 配对, 采用迭层自组装方法将其交替轮流组装到碳酸钙母核上, 形成碳酸钙为核, 金纳米粒子和 PAH 为壳的核壳结构微粒。用 EDTA 溶解碳酸钙, 即可得到金纳米粒子包裹的聚电解质微囊, 用显微镜观察, 微囊在水中的分散性良好, 大小由碳酸钙粒子大小决定。用扫描电镜观察对比了金纳米粒子包裹碳酸钙粒子前后的形状, 并观察了去掉碳酸钙后形成的聚电解质微囊的形态。

以 FITC-BSA 为模型药物, 采用共沉淀法在制备碳酸钙粒子时, 牛血清白蛋白被大量吸附到碳酸钙粒子上, 在除掉碳酸钙母核后, 牛血清白蛋白即留在微囊中。在荧光显微镜下观察微囊, 可以观察到微囊内有一定强度的荧光, 说明微囊内包裹有一定量的牛血清白蛋白, 测得微囊的包封率为 $(34.31 \pm 2.44) \%$, 载药量为 $(43.75 \pm 3.12) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。微囊的释放性质和近红外激光响应还需要进一步研究。

本研究制备了含有金纳米粒子的聚电解质微囊, 并进行了表征, 载入 FITC-BSA 作为模型药物, 考察了模型药物的包封率和微囊的载药量, 为光响应型微粒给药系统的制备提供了新思路。

References

- [1] Donath E, Sukhorukov GB, Caruso F, et al. Preparation of uniform CdSe/polyelectrolyte multilayers on the surface of SiO_2 spheres [J]. *J Am Chem Soc*, 1998, 37: 2201–2205.
- [2] Tong WJ, Gao CY, Mohwald H. Stable weak polyelectrolyte microcapsules with pH-responsive permeability [J]. *Macromolecules*, 2006, 39: 335–340.
- [3] Zhang FX, Srinivasan MP. Layer-by-layer assembled gold nanoparticle films on amine-terminated substrates [J]. *J Colloid Interface Sci*, 2008, 319: 450–456.
- [4] Kim BS, Vinogradova O. pH-controlled swelling of polyelectrolyte multilayer microcapsules [J]. *J Phys Chem B*, 2004, 108: 8161–8165.
- [5] Lu ZH, Prouty MD, Guo ZH, et al. Magnetic switch of permeability for polyelectrolyte microcapsules embedded with $\text{Co} @ \text{Au}$ nanoparticles [J]. *Langmuir*, 2005, 21: 2042–2050.
- [6] Antipov AA, Sukhorukov GB, Fedutik YA, et al. Fabrication of a novel type of metallized colloids and hollow capsules [J]. *Langmuir*, 2002, 18: 6687–6693.
- [7] Antipov AA, Sukhorukov GB, Leporatti S, et al. Polyelectrolyte multilayer capsule permeability control [J]. *Colloids Surf A*, 2002, 198: 535–541.
- [8] Skirtach AG, Antipov AA, Shchukin DG, et al. Remote activation of capsules containing Ag nanoparticles and IR dye by laser light [J]. *Langmuir*, 2004, 20: 6988–6992.
- [9] Angelatos AS, Radt B, Caruso F, et al. Light-responsive polyelectrolyte/gold nanoparticle microcapsules [J]. *J Phys Chem B*, 2005, 109: 3071–3076.
- [10] Min YL, Wan Y, Yu SH. $\text{Au} @ \text{Y}_2\text{O}_3$: Eu^{3+} rare earth oxide hollow sub-microspheres with encapsulated gold nanoparticles and their optical properties [J]. *Solid State Sci*, 2009, 11: 96–101.
- [11] Mocanu A, Cernica I, Tomoaia G, et al. Self-assembly characteristics of gold nanoparticles in the presence of cysteine [J]. *Colloids Surf A*, 2009, 338: 93–101.
- [12] Sukhorukov GB, Volodkin DV, Gunther AM, et al. Porous calcium carbonate microparticles as templates for encapsulation of bioactive compounds [J]. *J Mater Chem*, 2004, 14: 2073–2081.
- [13] Wang CY, He CY, Tong Z, et al. Combination of adsorption by porous CaCO_3 microparticles and encapsulation by polyelectrolyte multilayer films for sustained drug delivery [J]. *Int J Pharm*, 2006, 308: 160–167.
- [14] Petrov AI, Volodkin DV, Sukhorukov GB. Protein-calcium carbonate coprecipitation: a tool for protein encapsulation [J]. *Biotechnol Prog*, 2005, 21: 918–925.
- [15] Sato S, Toda K, Oniki S. Kinetic study on the formation of colloidal gold in the presence of acetylenic glycol nonionic surfactant [J]. *J Colloid Interface Sci*, 1999, 218: 504–510.