

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

※※※

※核殼型包覆藥物之乳膠顆粒之製造及其實際應用

※之研究

※

※

※※※

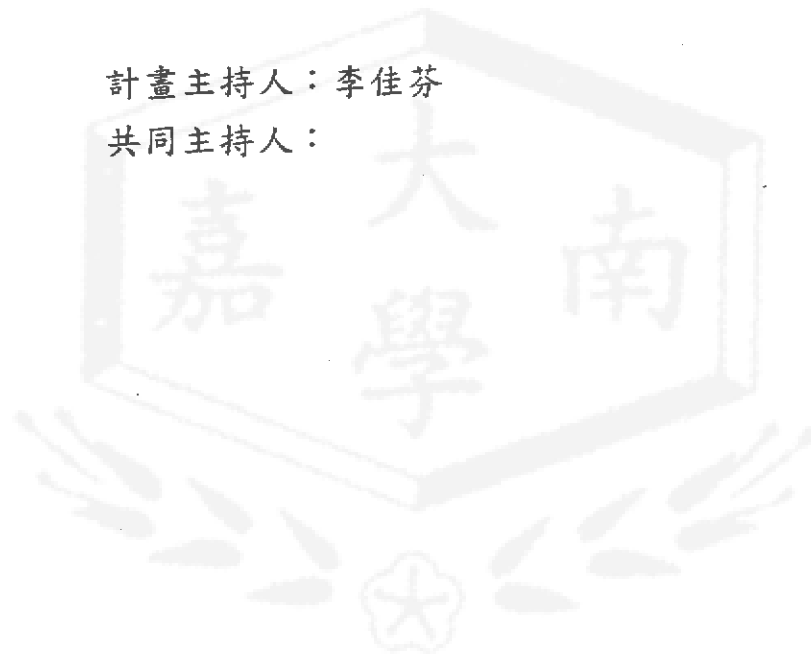
計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 89-2216-E-041-004-

執行期間：89年8月1日至 90年 7 月31日

計畫主持人：李佳芬

共同主持人：



本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：嘉南藥理科技大學化粧品應用與管理系

中華民國 90 年 10 月 16 日

執行期限: 89年8月1日至90年7月31日

主持人: 李佳芬 嘉南藥理科技大學化粧品應用與管理系

計畫參與人員: 溫家貞 國立台灣大學材料科學與工程研究所

Abstract

In this work, we discussed the synthesis, properties, and application of *N*-isopropyl acrylamide (NIPAAm)/Chitosan copolymer latexes. The NIPAAm/Chitosan crosslinked latex was synthesized by emulsion polymerization. Anionic initiator, ammonium persulfate [APS], and cationic initiator, 2,2'-Azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride [AIBA], were used to initiate the polymerization respectively. Therefrom latex particles of different morphology were obtained attributed to different reaction mechanisms. We changed several variables such as the proportion of Chitosan/NIPAAm, the concentration of crosslinking agent, solid content, the content of acetic acid and the content of initiator, and discussed their effects on particle size, reaction rate, zeta-potential etc. in the emulsion polymerization. We also studied the swelling and thermo-sensitive behavior of the film made by NIPAAm/Chitosan latexes. The effects of the proportion of Chitosan/NIPAAm, the concentration of crosslinking agent and the pH value of environment were discussed. Finally, we discussed the application of this latex on drug release with different proportion of Chitosan/NIPAAm and different concentration of crosslinking agent. Their effects on drug capsulation and drug release were examined.

摘要

本論文針對氮-異丙基丙烯醯胺(*N*-isopropylacrylamide)和幾丁聚醣(Chitosan)的共聚物其合成、性質及應用做一探討。在合成方面,以無乳化劑乳化聚合的方法合成NIPAAm和Chitosan的具交聯共聚物。分別使用陰離子型起始劑APS(ammonium persulfate)和陽離子型起始劑AIBA(2,2'-Azobis(2-methyl propionamide)),探討其合成機構的不同。在乳膠顆粒性質測定方面,改變各種變因包括:Chitosan/NIPAAm比例、交聯劑濃度、起始劑種類、固含量、醋酸含量、起始劑含量等,探討其對於乳膠顆粒粒徑大小、反應速率、表面電荷等性質的影響。在吸水性及溫度敏感性的測定上,本文探討不同起始劑種類、Chitosan/NIPAAm比例、交聯劑濃度,及環境pH值等因素對乳膠顆粒試片吸水膨潤性質的影響。最後,本文中也探討到此乳膠顆粒在不同Chitosan/NIPAAm比例、交聯劑濃度下,對於藥物包覆及藥物釋放的影响。

前言

藥物控制釋放(drug controlled-release)技術從西元1960年開始受到重視,其目的在於使藥物在使用時,能夠依所需的速率施用於目標物(target)。由於藥物控制釋放系統可控制藥物進入人體內的釋放速率,因此可減少投藥的頻率、避免夜間投藥,且可減少藥物在血液中濃度的變動程度,使藥效更均勻。此外,由於藥物可針對目標物發揮療效,故可減少藥物的使用過量或浪費,同時避免對腸胃道的刺激。且對於一些毒性較強的藥物而言(例如:惡性腫瘤的化療藥物),有其局部投藥的必要性,以減少身體其他部位受到傷害。

有些材料的結構、性質會隨外在化學或物理性刺激(例如:PH、light、temperature...)而改變,這類材料稱為智慧型材料(intelligent materials),在近年來被廣泛應用於藥物控制上。

本研究欲合成有LCST(Lower Critical Solution Temperature)之溫度敏感性高分子,並與生物裂解性高分子聚合成具交聯的共聚物。其中,溫度敏感性高分子選用LCST值在體溫以下者,使得在實驗進行時(實驗溫度<LCST)為水溶性,藥物得以順利靠膨潤進入乳膠顆粒中;一旦此包

有藥物的乳膠顆粒進入體內(體溫>LCST),因溫度敏感性高分子變成非水溶性,可將藥物鎖在乳膠顆粒中,在到達目標物前,不會先行釋放。

藥物的釋放則靠生物裂解性高分子的裂解,控制藥物在要求的速率下釋放;且因外接有抗體,當乳膠顆粒遇目標物(疾病發生處)時會與疾病的抗原結合,乳膠顆粒停留在此需治療之處,使得藥物能作用在此目標物上。

實驗

- 1.藥品:氮-異丙基丙烯醯胺(*N*-isopropylacrylamide, NIPAAm)、幾丁聚醣(Chitosan)、交聯劑 *N,N'*-methylenebisacrylamide(MBA)、起始劑 ammonium persulfate(APS)、起始劑 2,2'-Azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride(AIBA)、醋酸(acetic acid)、磷酸鹽(PTA)、咖啡因(Caffeine)
- 2.合成 polyNIPAAm-Chitosan 共聚乳膠顆粒:反應瓶中加入 NIPAAm 單體、MBA 交聯劑、Chitosan、去離子水、醋酸,在室溫下攪拌。待攪拌均勻後,升溫至 50°C,轉速 300rpm,加入起始劑,反應 3 小時。改變 Chitosan 及交聯劑的濃度。
- 3.吸水性測試:將反應完成之乳液烘乾製成直徑約 1.5 公分之試片。分別在不同溫度的去離子水或 pH4、pH7、pH9 之緩衝溶液中測試膨潤比(SR, swelling ratio)。SR(swelling ratio) = $(W_s - W_d) / W_d$ 其中, W_s : 於溶液中膨潤後之試片重。 W_d : 乾燥後之試片重。
- 4.藥物包覆測試:首先,測定各種不同濃度之 Caffeine solution 在波長 272nm 之 UV 吸收值,建立 Caffeine 之 Calibration curve。再將透析過之乳液分別以乳液態與試片態進行 Caffeine 的包覆測試。
- 5.試片之藥物釋放測試

Process 1.濕試片進行藥物釋放:將包覆 Caffeine 之濕試片置於 50g 的 37°C pH7.4 磷酸鹽緩衝液中進行釋放,固定時間取出 2g 樣品溶液,同時補充 2g 新鮮 37°C pH7.4 磷酸鹽緩衝液,取出之樣品溶液進行波長 272nm 之 UV 吸收值測定。

Process 2.乾試片進行藥物釋放:將包覆有 Caffeine 之濕試片置於真空烘箱,在室溫下真空烘 1 天,其餘步驟同 Process 1。

Process 3.經幾丁聚醣再包覆之乾試片進行藥物釋放:將包覆有 Caffeine 之濕試片置於真空烘箱,在室溫下真空烘 1 天,再將此包覆有 Caffeine 之乾試片置入重量百分濃度 0.6% 之幾丁聚醣醋酸水溶液(醋酸 2.5%)中 15 秒鐘進行再包覆。取出試片,於室溫下真空烘 1 天,可得到經幾丁聚醣再包覆之乾試片。其餘步驟同 Process 1。計算藥物釋放率。

結果與討論**1. NIPAAm-Chitosan 乳膠顆粒合成之機構探討:**

以 APS 為起始劑聚合 NIPAAm-Chitosan 時,形成同時包含 NIPAAm 及 Chitosan 的乳膠顆粒;以 AIBA 為起始劑者,形成的 NIPAAm 在內 Chitosan 在外的 core-shell 結構。

探究其原因,以 APS(陰離子型)為起始劑聚合 NIPAAm-Chitosan 時,可能發生的反應有三個:(一)、APS 的負電荷自由基起始 NIPAAm 單體而成核,進行聚合反應,形成表面帶有負電荷的 polyNIPAAm 顆粒。(二)、被 APS 起始的帶負電 NIPAAm 與帶正電的 Chitosan 鏈進行接枝而成核,形成 NIPAAm 和 Chitosan 的共聚乳膠顆粒。(三)、水溶液中帶正電荷的 Chitosan 分子。當(一)與(二)的成核反應發生時,(三)的正電荷 Chitosan 分子會靠近,扮演界面活性劑的角色。若在(一)(二)的成核中,(三)的正電荷 Chitosan 分子很快有足夠的靠近,包圍(一)(二)顆粒形成有效的界面活性劑保護,則形成的乳膠顆粒粒徑小,且此顆粒因表面 Chitosan 分子居多而帶正電荷;反之,若在(一)(二)成核時,(三)的正電荷 Chitosan 分子沒有馬上靠近形成保護,則

(一)(二)的顆粒因吸水性強，會凝聚(coagulation)成較大的顆粒，直到(三)的正電荷 Chitosan 分子形成足夠的界面保護為止，此乳膠顆粒因(一)(二)的成分居多，故帶負電荷。由於此兩種情形共存，因此在圖 1.(a)中，可看到在 300nm 和數十 nm 左右的兩種粒徑。且因為這兩種乳膠顆粒的電荷相異，因此會有相吸引的傾向，在 TEM 圖上可看到小顆粒往大顆粒靠的趨勢，部分小顆粒甚至也會進入大顆粒中。因此，所形成之顆粒為同時含有 polyNIPAAm 及 Chitosan 的乳膠顆粒，由 TEM 的染色切片圖可證實(請參照圖 1.(b))。

同理，以 AIBA(陽離子型)為起始劑聚合 NIPAAm-Chitosan 時，在圖 2(a)中可看到在 400nm 和數十 nm 左右的兩種粒徑。且因這兩種乳膠顆粒的電荷相同，因此小顆粒與大顆粒之間會保持距離，並沒有如以 APS 為起始劑時大小顆粒會相吸引的情形。由於以 AIBA 為起始劑時，(一)(二)兩種顆粒皆與(三)同樣為正電荷，使得 Chitosan 分子較不易很快靠近顆粒表面，形成界面保護，因此，顆粒間的凝聚較明顯，故以 AIBA 為起始劑時，所形成的乳膠顆粒粒徑較大。此外，由於以 AIBA 為起始劑時，polyNIPAAm 與 Chitosan 皆帶正電荷，推測 polyNIPAAm 與 Chitosan 接枝的效率較差，而且兩者互容性較差，因此，從 TEM 的染色切片圖看出，不同於 APS 所形成的同時含有 polyNIPAAm 及 Chitosan 的乳膠顆粒，以 AIBA 為起始劑者所形成的乳膠顆粒為 Chitosan(界面活性劑)在外、NIPAAm 在內的 core-shell 結構(請參照圖 2(b))。

2. 乳膠顆粒性質之測定

轉化率之測定：由表 1. 可看出，隨著 Chitosan / NIPAAm 比例增加，反應速率有增加的趨勢。原因是當 Chitosan 愈多，界面保護的效果愈好，形成的顆粒愈小、愈多，因此反應速率較快。由表 2 可看出，交聯劑濃度愈高，反應速率愈慢。原因是當交聯劑存在時，會限制單體的擴散作用，而使得反應速率變慢。

表 1. 不同 Chitosan / NIPAAm 比例與轉化率的關係

Chitosan/NIPAAm 重量比	交聯劑濃度	轉化率
1/10	3%	83.68
2/10		87.94
3/10		92.48

表 2. 交聯劑濃度與轉化率的關係

交聯劑濃度	Chitosan/NIPAAm	轉化率
0%	3/10	99.07
3%		92.48
5%		87.51

TEM：由圖 3、圖 4 可看出，當 Chitosan / NIPAAm 比例愈高，或交聯劑濃度愈高時，乳膠顆粒粒徑愈小。原因是在此乳化聚合中，Chitosan 扮演了界面活性劑的角色，當 Chitosan 的量愈多，界面活性劑效果愈好，可形成愈小、愈均勻之顆粒；當交聯劑濃度愈高時，整個聚合系統的成核數愈多，因此乳膠顆粒粒徑愈小。

Zeta-potential：由表 3 可看出，當 Chitosan 含量愈高，或交聯劑濃度愈高時，Zeta-potential 的值有愈大的趨勢。原因是，當 Chitosan 含量增加時，乳膠顆粒由原本因 APS 所造成的帶負電荷顆粒，轉為由 Chitosan 佔優勢而帶正電荷，且隨 Chitosan 含量愈高，Zeta-potential 的正值愈大。另一方面，當交聯劑濃度愈大時，polyNIPAAm 愈傾向形成疏水顆粒，會有較多帶正電荷的 Chitosan 在表面，且此時膨潤比愈小，電荷密度愈高，故 Zeta-potential 愈大。

表 3 不同交聯劑濃度與 Zeta-potential(單位:mV)的關係

	0/10	1/10	2/10	3/10	5/10
0%	-2.85	-1.60	-1.65	0.65	-1.15
3%	-3.35	-2.20	-1.85	5.97	6.87
5%	-2.90	-2.40	-1.05	6.50	3.73

探討不同起始劑種類對 Zeta-potential 的影響，由表 4 可看出，相較於以 APS(陰離子型)為起始劑的乳膠顆粒，以 AIBA(陽離子型)為起始劑的乳膠顆粒，由於 Chitosan 或 NIPAAm 表面皆為正電荷，故 Zeta-potential 值明顯較大。

表 4 不同起始劑種類與 Zeta-potential 的關係

起始劑種類	組成	Zeta potential(mV)
APS	2/10-3%	-1.85
AIBA		56.35

3. 吸水性及 LCST 測試

以 APS 為起始劑之 NIPAAm-Chitosan 試片，有介於 25-35°C 之間的 LCST，改變試片之 Chitosan 含量及交聯劑濃度，LCST 的範圍皆沒有明顯變化。在 LCST 以下時，Chitosan 含量愈高或交聯劑濃度愈高，膨潤比愈低，而在 LCST 以上，則有相反的趨勢(圖 5-8)。不同的 pH 環境中，pH 愈高，膨潤比愈小，吸水性愈差，而不同 Chitosan / NIPAAm 比例或不同交聯劑對吸水性的影響與前述相同(圖 9-10)。

探究其原因，Chitosan 和 NIPAAm 之中，NIPAAm 有較好的吸水性，因此在低溫時，Chitosan 含量愈高(亦即 NIPAAm 相對少時)，吸水性愈差，膨潤比愈小。從另一個角度來看，在低溫時，NIPAAm 有很好的吸水性，但當 Chitosan 比例愈高時，愈限制了 NIPAAm 的膨潤。而當溫度高於 LCST 時，除了原本吸水性就不好的 Chitosan 以外，NIPAAm 也呈現收縮的狀態，故改變 Chitosan/NIPAAm 的比例，膨潤比皆小(介於 0-2 之間)。且在 LCST 以上時，NIPAAm 欲收縮，但 Chitosan 的存在卻反而限制了 NIPAAm 的收縮，而使得在 LCST 以上，當 Chitosan / NIPAAm 比例愈高，膨潤比有愈高的趨勢。同樣的，在低溫時，交聯劑濃度愈高，膨潤愈受限制，膨潤比愈小；高溫時，NIPAAm 欲收縮，但當交聯劑濃度愈高時，就愈限制了試片能夠收縮的幅度，因此當溫度在 LCST 以上時，交聯劑濃度高者，膨潤比反而有愈大的現象。

改變不同 pH 環境，由於在 pH 愈高之環境中，Chitosan 長鏈愈不容易展開，且 polyNIPAAm 親水性愈低，故膨潤比愈小、吸水性愈差；反之，在 pH 愈低之環境中，Chitosan 的鏈愈易展開，polyNIPAAm 親水性愈好，故膨潤比愈大、吸水性愈好。

當起始劑改為 AIBA 時，發現試片並沒有溫度敏感性，在 pH4,7,9 中皆然(圖 11-12)。推測其可能原因，如前文所述，相較於 APS 可形成同時包含 NIPAAm 及 Chitosan 的乳膠顆粒，以 AIBA 起始者，乃形成 NIPAAm 在內、Chitosan 在外的 core-shell 乳膠顆粒，因此，當 polyNIPAAm 欲表現其溫度敏感性時，其結構受外部 Chitosan 的限制而無法自由收縮或膨潤，故幾乎沒有溫度敏感性。反之，以 APS 為起始劑之乳膠顆粒試片，其顆粒內部為 NIPAAm 及 Chitosan 皆同時存在的情形，因此，具有溫度敏感性的 NIPAAm 可自由地在不同溫度時，表現出不同的膨潤情形，故可看到明顯的 LCST。

4. 藥物包覆測試：Chitosan 含量愈高，或交聯劑濃度愈高，藥物包覆量有愈少的趨勢(圖 13、14)。原因是在此包覆的溶劑—去離子水之中，NIPAAm 較 Chitosan 有較好的吸水性，當 Chitosan/NIPAAm 比例愈高(NIPAAm 相對少)時，乳膠顆粒在水溶液中較不易膨潤，Caffeine 也愈不易隨水溶液進入乳膠顆粒中。另一方面，當交聯劑濃度愈高，顆粒愈不易膨潤，也愈不易使 Caffeine 隨著水溶液進入乳膠顆粒中。

5. 試片之藥物釋放測試
我們的目的是要控制藥物在沒有酵素存在下(Chitosan 的生物裂解性沒有發揮之時)，希望藥物盡量不要釋放出來。由圖 15-16 可看出，藥物釋放率 Process 3 < 2 < 1, Process 3 最能有效降低藥物的釋放量。

討論包有藥物的乾試片置入 37°C 緩衝液時，影響釋放的機制有兩個：一、試片在 20°C 膨潤包覆 Caffeine 後，經室溫烘乾後會留下孔洞，孔洞愈大，藥物在 37°C 時，經由孔洞而釋出的藥物釋放量也愈大。二、包有藥物的試片置於 37°C 的環境中，有一個在此溫度下的膨潤比(swelling ratio)，此膨潤比愈大，藥物隨膨潤而釋放出的量也會愈大。在此兩機制影響下，以 Process 2 為例，發現 Chitosan/NIPAAm 比例愈高，藥物釋放率愈高(較受機制二之影響)；而交聯劑濃度的影響並沒有單一的趨勢，呈現先降後升的情形(同時受二機制控制)。

結論

本實驗合成含有 polyNIPAAm/Chitosan 的乳膠顆粒。分別使用陽離子型起始劑 AIBA 以及陰離子型起始劑 APS 進行聚合，發現以 AIBA 起始時，乳膠顆粒會形成 Chitosan 在外、NIPAAm 在內的 core-shell 結構；以 APS 為起始時，形成同時包含 NIPAAm 及 Chitosan 的乳膠顆粒，其中以後者較符合此乳膠顆粒欲應用在藥物釋放上的目的。

在顆粒大小上，Chitosan / NIPAAm 比例愈高，或是交聯劑濃度愈高，合成之乳膠顆粒愈小；在溫度敏感性上，以 APS 為起始劑的 NIPAAm-Chitosan 試片有介於 25-35°C 之間的 LCST，且不隨 Chitosan/NIPAAm 比例或交聯劑濃度的不同而改變，而以 AIBA 為起始劑者則無溫度敏感性。在吸水性方面，在 LCST 以下，Chitosan 含量愈高或交聯劑濃度愈高，膨潤比愈低；在 LCST 以上，則趨勢相反。不同的 pH 環境中，pH 愈高，膨潤比愈小，吸水性愈差，而不同 Chitosan/NIPAAm 比例或不同交聯劑濃度對吸水性的影響與前述相同。

在藥物包覆上，Chitosan 含量愈高，或交聯劑濃度愈高，藥物包覆量愈多。而在試片的藥物釋放上，在交聯劑濃度同為 3% 時，Chitosan/NIPAAm 比例愈高，藥物釋放率愈高；而交聯劑濃度的影響並沒有單一的趨勢，以本實驗 Chitosan/NIPAAm 為 2/10 時為例，交聯劑濃度 5% 時，能將藥物釋放率控制在最低。

參考文獻

1. Shiroya T., Tamura N., Yasui M., Fujimoto K., Kawaguchi H. "Enzyme immobilization on thermosensitive hydrogel microspheres," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 4, 267-274(1995).
2. Gehrke S. H., Palasis M., Akhtar M.K., "Effect of synthesis conditions on properties of poly(N-isopropylacrylamide) gels," *Polymer International*, 29, 29-36(1992).
3. Ataman M., *Coll. Polym. Sci.* 265, 19(1987)
4. Rao S.B., Sharma C.P., *J Biomed Res*, 34, 21(1997)
5. Tarsi R., Muzzarelli R.A.A., Guzman C.A., Pruzzo C., *J Dent Res*, 76, 665(1997)
6. Klokkevold P.R., Vandemark L., Kenney E.B., Bernard G.W., *J Periodontol*, 67, 1170(1996)
7. Muzzarelli R.A.A., Biagimi G., Bellardini M., Simonelli L., Castaldini C., Fratto G., Castaldini C., *Biomaterials*, 14(1), 39(1993)
8. Muzzarelli R.A.A., Zucchini C., Ilari P., Pugnali A., Mattioli Belmonte M., Biagimi G., Castaldini C., *Biomaterials*, 14(12), 925(1993)

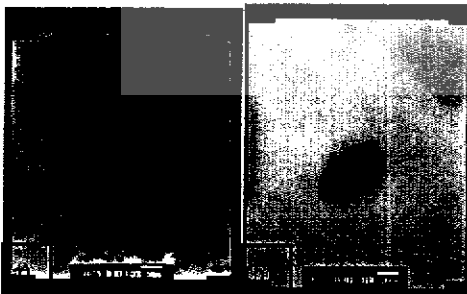


圖 1. TEM (a) 2/10-3%APS (b) 2/10-3%APS 反應 3 小時之染色切片

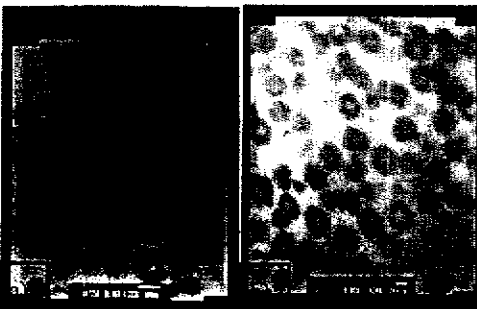


圖 2. TEM (a) 2/10-3%AIBA (b) 2/10-3%AIBA 反應 3 小時染色切片。

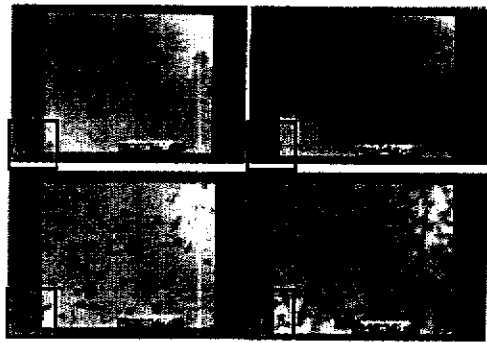


圖 3. TEM (a)1/10-3%APS (b)2/10-3%APS (c)3/10-3%APS (d)5/10-3%APS

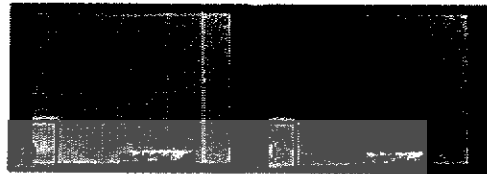


圖 4. TEM (a)1/10-3%APS (b)1/10-5%APS

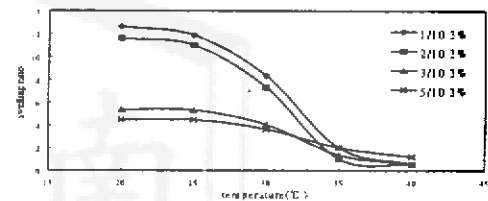


圖 5 在去離子水中不同 Chitosan/NIPAAm 比例之溫度與膨潤比的關係

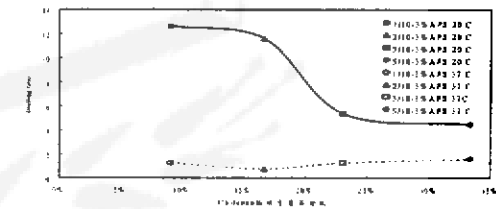


圖 6 在 20°C 和 37°C 去離子水中 Chitosan/NIPAAm 比例與膨潤比的關係

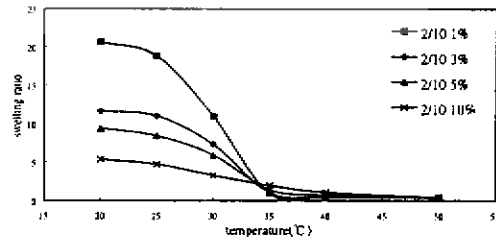


圖 7 在去離子水中不同交聯劑濃度之溫度與膨潤比的關係

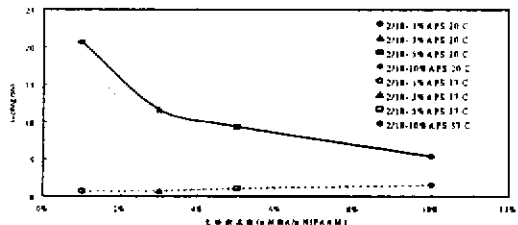


圖 8 在 20°C 和 37°C 去離子水中不同交聯劑濃度與膨潤比的關係

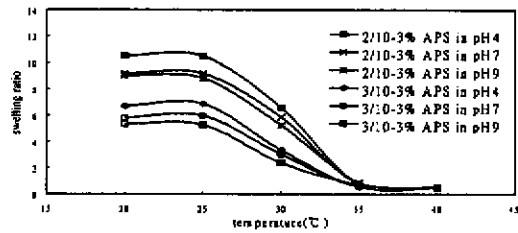


圖 9 不同 Chitosan/NIPAAm 比例在不同 pH 緩衝溶液中溫度與膨潤比的關係

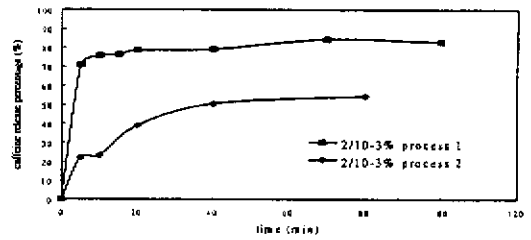


圖 15 試片 2/10-3% 在 Process 1 和 Process 2 之藥物釋放測試的比較

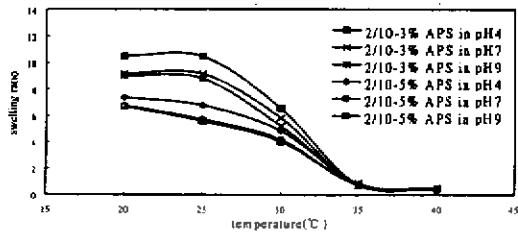


圖 10 不同交聯劑濃度在不同 pH 緩衝溶液中溫度與膨潤比的關係

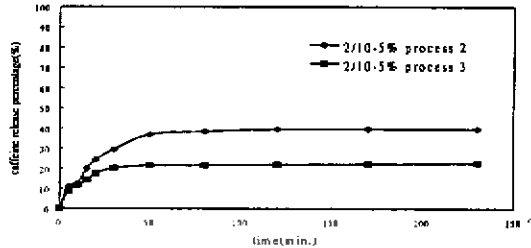


圖 16 試片 2/10-5% 在 Process 2 和 Process 3 之藥物釋放測試的比較

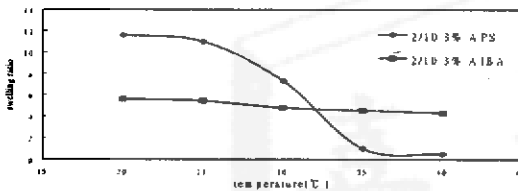


圖 11 在去離子水中起始劑 APS 與起始劑 AIBA 溫度與膨潤比的關係之比較

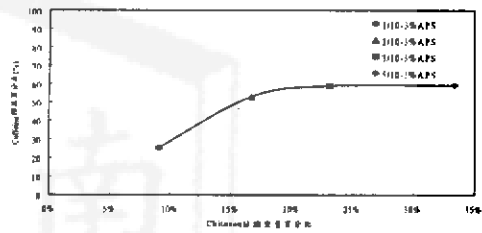


圖 17 不同 Chitosan/NIPAAm 比例之試片與釋放百分率的關係

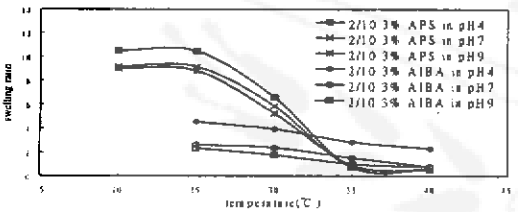


圖 12 起始劑 APS 及 AIBA 在不同 pH 緩衝溶液中溫度與膨潤比的關係

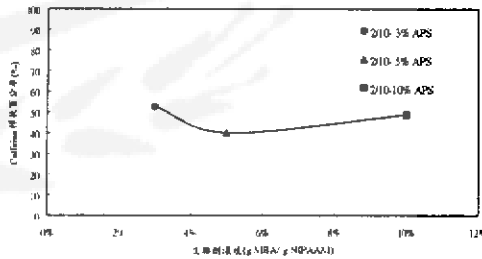


圖 18 試片交聯劑濃度與釋放百分率的關係

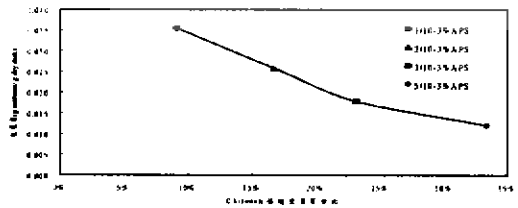


圖 13 不同 Chitosan/NIPAAm 比例之試片與包覆量的關係

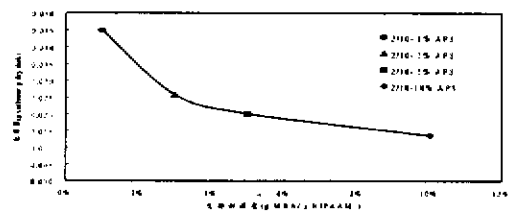


圖 14 不同交聯劑濃度之試片與包覆量的關係