科学通报 2009 年 第 54 卷 第 10 期: 1317 ~ 1321
专题: 生物医用材料 论 文 www.scichina.com csb.scichina.com
《中国科学》杂志社
SCIENCE IN CHINA PRESS

甘草次酸修饰的纳米粒子的制备与表征

田秦[①], 王蔚[①], 贺晓婷[①], 朱晓翠[①], 黄微[①], 张闯年[①], 袁直[①*], 陈学思[②]

① 功能高分子材料教育部重点实验室, 南开大学高分子化学研究所, 天津 300071;
② 高分子物理与化学国家重点实验室, 中国科学院长春应用化学研究所, 长春 130022
* 联系人, E-mail: zhiy@nankai.edu.cn

2008-11-27 收稿, 2009-02-20 接受
国家自然科学基金(批准号: 20634030)、天津市自然科学基金(编号: 07JCZDJC00700)和高分子物理与化学国家重点实验室科学基金资助项目

摘要 以丁二酸酯为间隔臂制备了甘草次酸修饰壳聚糖的肝靶向药物载体材料(mGA-suc-CTS), 通过 IR, NMR 及元素分析对产物的结构及取代度进行了表征; 以 BSA 为药物模型, 离子交联法制备了载药粒子, 初步研究了其体外释放性能. 结果表明, 载体材料中甘草次酸的含量可通过反应温度及投料比进行调控, 最高取代度可达 5.19%; 纳米粒子对 BSA 的负载量为 26.3%, 包封率为 81.5%; 体外释放表明, 生理条件下(pH 7.4)缓释可达 11 天.

关键词
甘草次酸
壳聚糖
药物释放

肝靶向给药系统[1](hepatic targeted drug delivery system, HTDDS)是药剂学研究领域中的热点之一, HTDDS可将药物有效地输送至肝脏, 减少用药剂量和给药次数, 并减少对其他脏器的伤害, 提高治疗效果. 随着对细胞表面结构功能认识的加深, 近年来受体介导的靶向给药系统成为研究的焦点[2]. 受体介导的靶向系统主要是用物理或化学的方法将特定的配体引入给药体系, 通过受体-配体之间相互作用, 实现靶向的目的. 在肝靶向给药系统中研究较多的配体是半乳糖类化合物, 它可被肝实质细胞上去唾液酸糖蛋白受体(ASGP-R)识别, 载体经半乳糖基化后具有明显的肝靶向性[3,4], 然而有研究发现大多数肝脏疾病患者的血清中存在结合抑制剂, 可导致ASGP-R对半乳糖基的特异识别作用降低[5]. 因此发现并利用新型配体对于实现高效受体介导的肝靶向给药意义重大.

甘草次酸(glycyrrhetinic acid, GA)和甘草酸(glycyrrhizic, GL) 是豆科植物甘草的有效成分, 甘草次酸是甘草酸的水解产物, 结构式如图 1 所示. 20 世纪 90 年代初, Negishi证实了大鼠肝细胞膜上含有甘草次酸及甘草酸结合位点[6], 随后一些研究也相应报道了以甘草次酸/甘草酸修饰的载体材料具有趋肝性[7,8]. 因此, 甘草次酸/甘草酸可作为肝靶向给药系统中的导向基团. 壳聚糖(CTS)是自然界中含量最丰富的碱性多糖, 具有良好的生物相容性和可降解性, 是一种优良的药物载体材料.

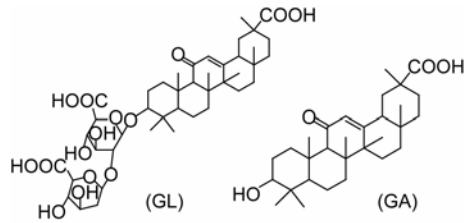

图 1 甘草酸(GL)和甘草次酸(GA)的结构式

本研究的最终目的是将甘草次酸的趋肝性及壳聚糖优良的生物学性能结合起来, 制备一类新型的肝靶向给药系统, 而首要的工作就是载体材料的合成. 甘草次酸上存在C_{30}羧基和C_3羟基两个可反应位点, 因此可从羧基或羟基出发制备不同位点改性的载体材料. 前期研究中我们已经制备了从甘草次酸羧基直接偶联壳聚糖的载体材料[9]. 本文尝试从甘草次酸的羟基出发, 以丁二酸酯为间隔臂, 将甘

引用格式: 田秦, 王蔚, 贺晓婷, 等. 甘草次酸修饰的纳米粒子的制备与表征. 科学通报, 2009, 54: 1317~1321
Tian Q, Wang W, He X T, et al. Glycyrrhetinic acid-modified nanoparticles for drug delivery: preparation and characterization. Chinese Sci Bull, 2009, 54, doi: 10.1007/s11434-009-0249-5

草次酸偶联至壳聚糖, 制备从羟基位点出发甘草次酸改性壳聚糖的载体材料; 并以牛血清蛋白(BSA)为药物模型, 通过离子交联法制备载药粒子, 初步探讨其体外释放性能.

1 实验部分

1.1 试剂

甘草次酸(HPLC 纯度≥98%), 西安富捷药业有限公司; 壳聚糖(CTS, Mw: 50000, DD>95%), 浙江澳兴生物技术有限公司; 牛血清蛋白(BSA), Sigma; 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCl)及 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS), 上海吉尔生化有限公司; 其他化学试剂均为分析纯.

1.2 甘草次酸修饰壳聚糖(mGA-suc-CTS)的合成及表征

(ⅰ) 甘草次酸甲酯(mGA)的合成[10]. 将 7.5 g 甘草次酸(16.0 mmol)溶解在 200 mL甲醇中, 加入 1.0 g (5.8 mmol)对甲苯磺酸, 回流 3 天, 旋蒸浓缩, 将浓缩液倒入到水中, 二氯甲烷萃取, 有机相用 5%碳酸钠溶液洗涤, 硫酸镁干燥过夜. 将干燥过夜的有机相浓缩后, 用甲醇-水溶液进行重结晶, 得到产品.

(ⅱ) 甘草次酸甲酯-3-O-琥珀酸酯(mGA-suc)的合成[11]. 将 2.4 g(4.9 mmol) mGA, 2.0 g(20 mmol)的丁二酸酐(suc)溶解于 50 mL无水吡啶中, 回流 14~15 h. 反应完毕后, 用蒸馏水沉淀, 盐酸溶液节体系pH值至 3~4 之间, 过滤, 热水洗涤沉淀. 柱层析[v(乙醇):v(乙酸乙酯)=11:3]分离产物.

(ⅲ) 甘草次酸修饰壳聚糖(mGA-suc-CTS)的合成. 将 CTS 溶解于 1%醋酸中(1%, w/v), 滴加 DMF, 将一定量的 mGA-Suc 加入上述体系, 搅拌至溶液呈透明. 加入 EDC·HCl 和 NHS, [EDC:NHS:mGA-suc =1.2:1.2:1(摩尔比)], 室温搅拌 0.5 h 后升温, 反应 24 h, 甲醇沉淀, 过滤干燥.

甘草次酸改性壳聚糖的结构及取代度通过 IR (Bic-Rad FTS-6000), NMR(Varian 图, Plus-400)及元素分析(Vanio-EL,Heraeus, GER)进行表征.

1.3 mGA-suc-CTS/TPP 纳米粒子的制备及表征

采用离子交联法制备纳米粒子[12]: 2.0 mL三聚磷酸钠溶液(TPP, 1.0 mg/mL), 搅拌条件下滴加到 5.0 mL mGA-suc-CTS (2.0 mg/mL)溶液中, 形成纳米粒悬液. TEM (Philips TZOST, Philips Tecnai Co, NE-D)和PCS(BI-9000AT, Brookhaven Co., USA)对粒子形态及粒径分布进行表征.

1.4 mGA-suc-CTS/TPP 纳米粒子对牛血清蛋白(BSA)的包封及体外释放

将 BSA 加入到 5.0 mL mGA-suc-CTS 溶液中, 调整 BSA 的浓度为 0.2 mg/mL, mGA-suc-CTS 的浓度为 2.0 mg/mL, 室温磁力搅拌条件下加入 2.0 mL 1.0 mg/mL TPP 溶液, 生成包封有 BSA 的粒子. 悬液在 10℃下以 23000 r /min 离心 30 min, 分离出纳米粒子, 冷冻干燥. 上层清液用紫外分光光度仪(UV-4802H, Unic)测定λ = 278 nm 处的吸收, 计算游离的 BSA 质量, (1)和(2)式分别用来计算包封率(EE)和载药量(LC).

$$EE(\%)= (A-B)/A\times 100\%, \quad (1)$$

$$LC(\%)= (A-B)/C\times 100\%, \quad (2)$$

式中 A 表示 BSA 总量, B 表示游离 BSA 质量, C 表示纳米粒质量.

将 10.0 mg 包封有 BSA 的纳米粒子置于 5.0 mL 缓冲液中, 在(90±5) r/min 的摇床中于 37℃恒温处理, 一定时间间隔, 样品在 10℃下离心 30 min, 取出 2.0 mL 上层清液, 用新鲜缓冲液补充. 考马斯亮蓝法测定释放出的 BSA 的质量, 绘制释放曲线.

2 结果与讨论

2.1 mGA-suc-CTS 的合成

从甘草次酸 C_3 羟基位点改性壳聚糖的合成路线如图 2 所示.

(ⅰ) mGA-suc-CTS的核磁表征. 图 3 是原料甘草次酸及中间产物mGA-suc的核磁谱, 甘草次酸及mGA-suc主要峰归属如下[11,13]: GA(δ, ppm): 0.80, 0.83, 1.0, 1.13, 1.14, 1.22, 1.37 (7s, 21H, 7CH_3 (H28, H23, H24, H26, H25, H29 and H27)), 2.35 (s, 1H, H9), 2.76, 2.81(s, 1H, H18, α, β-isomers), 3.23 (m, 1H, H3), 5.61, 5.70 (s, 1H, H12, α, β-isomers). mGA-suc (δ, 10^{-6}): 0.73, 0.81, 1.05, 1.08, 1.09, 1.18, 1.29 (7s, 21H, 7CH_3 (H28, H23, H24, H26, H25, H29 and H27)), 2.29 (s, 1H, H9), 2.64 (m, 2H, H_a), 2.67 (m, 2H,H_b), 2.71,2.75 (s, 1H, H18, α, β-isomers), 3.62 (s,3H, OCH3), 4.47 (m, 1H, H3), 5.59 ,5.50 (s, 1H, H12, α,β-iso mers).

图 4 是原料壳聚糖(CTS)和甘草次酸接枝壳聚糖(mGA-suc-CTS)的核磁谱图, 各峰的主要归属如下, 壳聚糖 (δ, ppm): 2.0($NHCOCH_3$), 3.11(H2), 3.5~3.9 (H3, H4, H5, H6); 与壳聚糖原料图对比可以看出, mGA-suc-CTS 的谱图在 0.6~1.6 ppm 之间出现了甘草次酸的角甲基, 次甲基以及亚甲基质子峰.

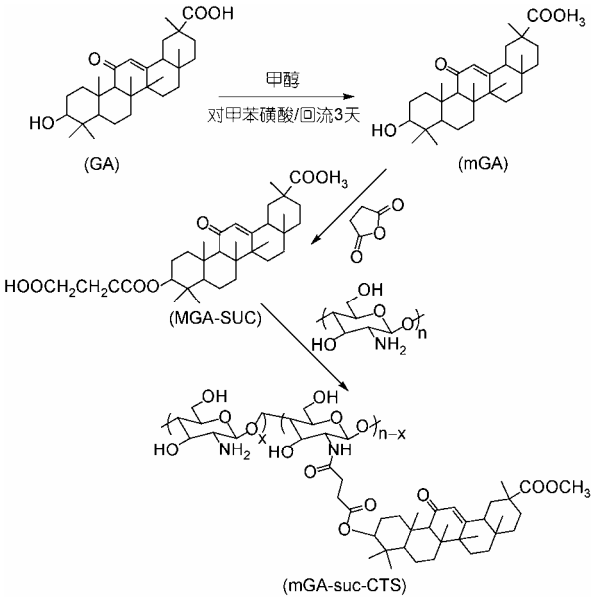

图 2　甘草次酸改性壳聚糖的合成路线

(ⅱ) mGA-suc-CTS的红外表征. 壳聚糖以及mGA-suc-CTS的红外谱图如图 5 所示. 壳聚糖[14]在3150~3450 cm^{-1} 处出现ν(O-H)和ν(N-H)伸缩振动吸收峰, 在 2882 cm^{-1} 处出现ν(CH_2) 伸缩振动吸收峰, 1651 cm^{-1} 弱的吸收峰为未完全脱乙酰度ν($NHCOCH_3$)的酰胺吸收峰, 1566 和 1319 cm^{-1} 为ν(NH_2)弯曲振动吸收峰及ν(C-N)振动吸收峰, 1427 cm^{-1} 附近为ν(O-H)和ν(C-H)弯曲振动吸收峰, 1153 cm^{-1} 处为ν(C-O)伸缩振动吸收峰, 在 1072 和 1022 cm^{-1} 附近出现多糖ν(C-OH)伸缩振动吸收峰. mGA-suc-CTS 的红外光图谱与壳聚糖相比, 1724 cm^{-1} 新增了酯键的吸收峰, 1654 cm^{-1} 的酰氨(Ⅰ)明显增强, 1566 cm^{-1} 处的氨基振动吸收峰减弱, 并向低波数移动至 1554 cm^{-1}, 和酰胺(Ⅱ)相重叠成为一个较宽的峰, 由此可知在壳聚糖氨基上进行了酰化反应.

(ⅲ) 反应温度及投料比对取代度的影响. 取代度随反应条件变化而变化, 本文研究了温度及投料比对取代度的影响. 如表 1 所示, 随着温度的增加, 取代度逐渐增大, 当反应温度大于 55℃时, 取代度增加变得缓慢; 摩尔投料比对取代度的影响见表 2, 投料比从 0.2 增加至 0.8, 取代度从 0.52%上升到 5.19%, 继续增加 mGA-suc 的量, 取代度稍有下降, 这是因为由于 mGA-suc 的量较大, 反应体系开始变得混浊, 分散不均匀导致取代度下降.

2.2　纳米粒子的表征

壳聚糖是阳离子聚电解质, 可与阴离子相互作用形成纳米粒子. 图 6 为所制备纳米粒子的粒径分布图, 平均粒径为 200.8 nm, 呈双峰分布(～63 nm和 227 nm), 主要是因为所用的壳聚糖未经提纯, 小的纳米粒子是TPP与低分子量的载体材料形成[12,15]. 透射电子显微镜观察(图 7)表明所制备的纳米粒子具有较规则的球形结构, 粒径小于 200 nm, 小于PCS得到的结果, 主要是因为透射电子显微所观测的是干态粒子

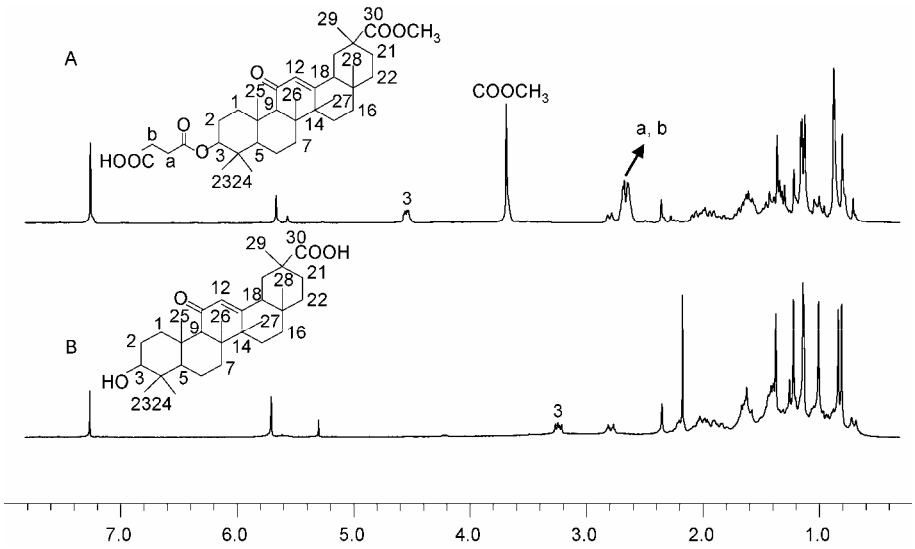

图 3　甘草次酸(A)及甘草次酸甲酯-3-O-琥珀酸酯(B)的核磁谱图(溶剂: 氘代氯仿)

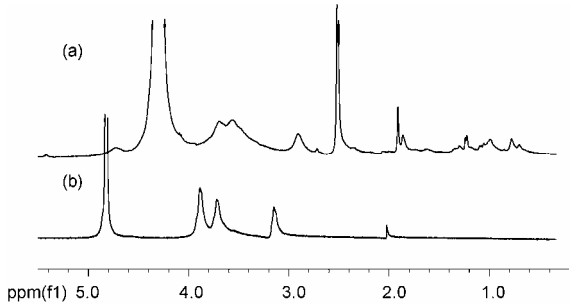

图 4 壳聚糖(a, 溶剂: 4%氘代盐酸)及甘草次酸接枝壳聚糖((b), 溶剂: 氘代二甲基亚砜: 4%氘代盐酸=3∶1)的核磁谱图

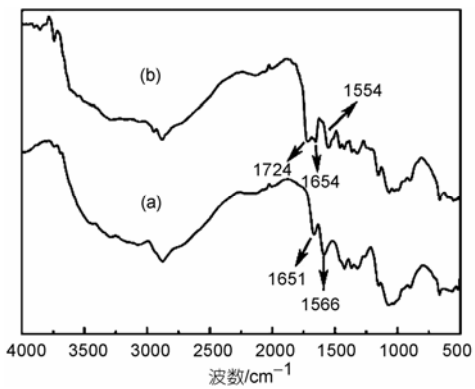

图 5 壳聚糖(a)及甘草次酸接枝壳聚糖(b)的红外谱图

表 1 反应温度对取代度的影响 a)

温度/℃	25	35	45	55	65	75
取代度(%)	0.89	2.28	3.33	4.31	4.63	4.88

a) 投料比: 甘草次酸甲酯-3-O-琥珀酸酯/壳聚糖=0.4, 反应时间: 24 h

表 2 摩尔投料比对取代度的影响 a)

甘草次酸甲酯-3-O-琥珀酸酯/壳聚糖	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
取代度(%)	0.52	4.63	4.83	5.19	4.89

a) 温度: 65℃, 反应时间: 24 h

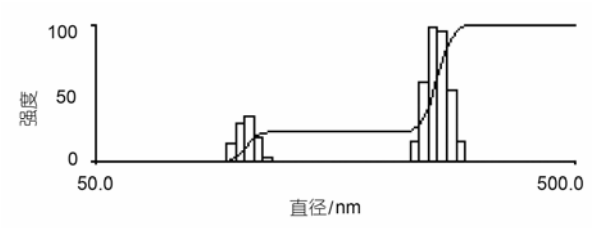

图 6 纳米粒子的粒径分布

的直径, PCS 得到的是纳米粒子的水合直径.

2.3 模型药物 BSA 的体外释放

我们以牛血清蛋白BSA为模型药物, 初步研究了mGA-suc-CTS/TPP纳米粒子对BSA的包载及其在生理条件下(pH 7.4)的体外释放性能. 纳米粒子对BSA的负载量为 26.3%, 包封率为 81.5%. 纳米粒子负载BSA的体外释放行为如图 8 所示: 12 h约 18.8%突释, 随后BSA缓慢释放, 缓释时间长达 11 天. BSA的释放过程是蛋白质与壳聚糖的解吸过程[16]. 释放初始, 吸附在或靠近在粒子表面的BSA分子首先释放, 并以较快的速度解离, 而贯穿在粒子中的BSA分子通过静电作用及氢键与载体材料结合紧密, 扩散较慢, 具有缓释行为.

3 结论

本文从甘草次酸羟基位点出发, 以丁二酸酯为间隔臂制备了甘草次酸改性壳聚糖的载体材料, 红外及核磁对其结构进行了表征. 甘草次酸接枝壳聚糖的取

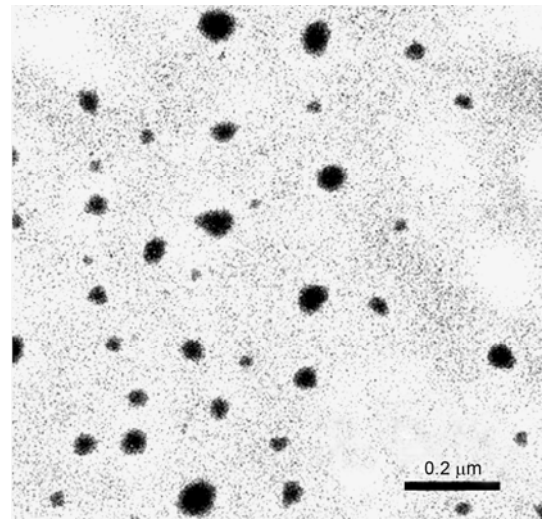

图 7 纳米粒子的形态

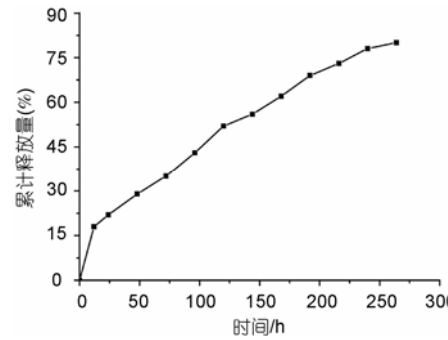

图 8 BSA 的体外释放曲线(pH 7.4)

代度可通过反应温度及投料比进行调控，取代度随温度增加逐渐增大，温度大于 55℃后，取代度增加趋势减缓；随着投料比的增加，取代度先增加后减小，最高取代度可达 5.19%. 以 BSA 为药物模型，离子交联法制备了载药粒子，载药量为 26.3%，包封率为 81.5%，生理条件下(pH 7.4)缓释可达 11 天

参考文献

1 Brannon-Peppas L, Blanchette J O. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. Adv Drug Deliver Rev, 2004, 56: 1649—1659[DOI]

2 Hussain N. Ligand-mediated tissue specific drug delivery. Adv Drug Deliver Rev, 2000, 43: 95—100[DOI]

3 Managit C, Kawakami S, Yamashita F, et al. Uptake characteristics of galactosylated emulsion by HepG2 hepatoma cells. Int J Pharm, 2005, 301: 255—261[DOI]

4 Shinoda T, Maeda A, Kagatani S, et al. Specific interaction between galactose branched-cyclodextrins and hepatocytes *in vitro*. Int J Pharm, 1998, 167: 147—154[DOI]

5 Stockert R J, Morell A G. Hepatic binding protein: the galactose-specific receptor of mammalian hepatocytes. Hepatology, 1983, 3: 750—757

6 Negishi M, Irie A, Nagata N, et al. Specific binding of glycyrrhetinic acid to the rat liver membrane. Biochim Biophys Acta, 1991, 1066: 77—82[DOI]

7 Mao S J, Hou S X, He R, et al. Uptake of albumin nanoparticle surface modified with glycyrrhizin by primary cultured rat hepatocytes. World J Gastroenterol, 2005, 11: 3075—3079

8 Lin A H, Liu Y M, Huang Y, et al. Glycyrrhizin surface-modified chitosan nanoparticles for hepatocyte-targeted delivery. Int J Pharm, 2008, 359: 247—253[DOI]

9 查瑞涛，贺晓婷，杜田. 肝靶向甘草次酸修饰的壳聚糖纳米粒子的合成和表征. 高等学校化学学报, 2007, 28: 1098—1100

10 Su X D, Lawrence H, Ganeshapillai D, et al. Novel 18β -glycyrrhetinic acid analogues as potent and selective inhibitors of 11β -hydroxysteroid dehydrogenases.Bioorg Med Chem, 2004, 12: 4439—4457[DOI]

11 Kondratenko R M, Mustafina S R, Baltina S R, et al. Synthesis and antiulcer activity of 3-O-acylated glycyrrhetic acid methylates. Pharm Chem J, 2001, 35: 243—246[DOI]

12 Janes K A, Alonso M J. Depolymerizied chitosan nanoparticles for protein delivery: preparation and characterization. J Appl Polym Sci, 2003, 88, 2769—2776[DOI]

13 Ignatov D V, Prokof' ev Y I, Ipatova O M, et al. A simple method for preparation of 18α-glycyrrhetinic acid and its derivatives. Rus J Bioorg Chem, 2003, 4: 390—394[DOI]

14 覃彩芹，杜予民. 壳聚糖的降解及其结构表征. 孝感学院学报, 2002, 22(6): 5—9

15 Zhang H, Oh M, Allen C, et al. Monodisperse chitosan nanoparticles for mucosal drug delivery. Biomacromolecules, 2004, 5: 2461—2468[DOI]

16 Calvo P, Remuñán-López C, Vila-Jato J L, et al. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. J Appl Polym Sci, 1997, 63: 125—132[DOI]