壳寡糖/水杨酸接枝物纳米粒用于释放阿霉素的研究

黄佩文^{1,2},陈苏萍²,魏晓红^{2*},石森林^{1*}(1.浙江中医药大学药学院,杭州 310051; 2.杭州师范大学医学院药学系,杭州 310036)

摘要:目的 考察壳寡糖/水杨酸纳米粒负载碱化阿霉素的可能性,评价制备而得的微粒给药系统理化性质及其体外释放 行为。方法 以碳二亚胺为交联偶合剂合成壳寡糖/水杨酸接枝共聚物,三硝基苯磺酸法测定水杨酸接枝率。运用超声分 散法制备壳寡糖/水杨酸空白纳米粒,芘荧光法测定纳米粒临界聚集浓度,动态光散射法测定微粒粒径和表面电位,MTT 法考察空白纳米粒的细胞毒性。以碱化阿霉素为模型药物,透析法制备壳寡糖/水杨酸载药纳米粒,经透射电镜考察载药 纳米粒的形态,对其体外释放行为进行研究。结果 合成得到的壳寡糖/水杨酸纳米粒实际接枝率为 16.92%,空白纳米粒 的临界聚集浓度为 867.0 µg·mL⁻¹,空白纳米粒的粒径和表面 Zeta 电位分别为 434.0 nm 和 48.6 mV,对人肝癌细胞 Hep-G2 的半数抑制浓度为 1745 µg·mL⁻¹。在碱化阿霉素理论投药量为 10%时壳寡糖/水杨酸载药纳米粒的实际载药量为 8.52%, 包封率为 93.15%。载药纳米粒的粒径和表面电位分别为 214.2 nm 和 33.6 mV。体外释放结果表明药物的释放呈现 pH 敏 感性;并主要以溶蚀的方式从载体内部释放出来。结论 壳寡糖/水杨酸接枝物有望成为潜在的难溶性药物的载体材料。 关键词:壳寡糖/水杨酸接枝物;碱化阿霉素;纳米粒;体外释放

中图分类号: R943 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2014)01-0061-06

Chitosan Oligosaccharide/Salicylic Acid Nanoparticles for Doxorubicin Delivery

HUANG Peiwen^{1,2}, CHEN Suping², WEI Xiaohong^{2*}, SHI Senlin^{1*}(1.College of Pharmaceutical Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310051, China; 2.Department of Pharmaceutical, School of Medicine, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the probability of chitosan oligosaccharide (CSO)/salicylic acid (SA) nanoparticles to encapsulate alkalized doxorubicin and to evaluate the physicochemical properties and *in vitro* profile of drug delivery system. METHODS CSO/SA conjugates were synthesized by a reaction between amino-groups of CSO and carboxyl groups of SA using 1-ethyl-3-(3-dimethyla-minopropyl) carbodiimide as a coupling agent. The amino substitution degree(SD%) of CSO/SA was determined by a 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) test. The CSO/SA blank nanoparticles were prepared by ultrasonic dispersion method. The critical aggregation concentration of nanoparticles was obtained by the fluorescence pyrene study. Dynamic light scattering method was used to determine the size and Zeta potential of nanoparticles. MTT assay was used to evaluate the cytotoxicity of nanoparticles. Alkalizated doxorubicin was used as the model drug, drug-loaded CSO/SA nanoparticles were prepared by dialysis method. RESULTS The amino substitution degree was 16.92%, and the critical aggregation concentration of blank nanoparticles was 867.0 µg·mL⁻¹. The particle size and Zeta potential of blank nanoparticle were 434.0 nm and 48.6 mV, respectively. The IC₅₀ of the nanoparticles on cell Hep-G2 was 1 745 μ g·mL⁻¹. The drug content of nanoparticles was 8.52% and the loading efficiency was 93.15% when the amount of drug fed was 10%, the particle size and Zeta potential of drug-loaded nanoparticles were 214.2 nm and 33.6 mV, respectively. In vitro release results illustrated that drug-loading nanoparticles had pH sensitivity, and the drugs were released mostly in the way of erosion. CONCLUSION CSO/SA can encapsulate alkalized doxorubicin to form uniform, sustain drug delivery nanoparticles. The drug-loaded nanoparticles present pH-dependent property. CSO/SA nanoparticles may be a potential candidate to be a drug carrier material. KEY WORDS: chitosan oligosaccharide/salicylic acid; alkalized doxorubicin; nanoparticles; in vitro release

恶性肿瘤是当今威胁人类健康和生存质量的 一大杀手,也是致死的主要原因之一,每年约有 700多万人死于肿瘤。近年来,我国恶性肿瘤的发 病率和死亡率逐年上升,每年发病人数 260 多万, 死亡达 180 万^[1]。目前临床的治疗方法包括手术切 除、化学治疗、放射治疗、中西医结合疗法等。 其中应用抗肿瘤药物进行化疗是手术治疗的重要 辅助手段,也是对恶性肿瘤全身治疗的主要方法。 化疗虽然已应用于临床多年,但仍然无法达到令 人满意的治疗效果。究其原因,临床应用的抗肿

基金项目:
 国家自然科学基金项目(30973683);
 浙江省科技厅钱江人才项目(2001R10059)

 作者简介:
 黄佩文,女,硕士生
 Tel:
 15158158433
 E-mail: huangpeiwen@sina.com
 *通信作者:
 魏晓红,女,博士,教授
 Tel:

 (0571)28869344
 E-mail: xiaohongweil@foxmail.com
 石森林,男,博士,教授
 Tel:
 (0571)86613524
 E-mail: pjstone@163.com

瘤化疗药物大多溶解度很小,难以吸收,生物利 用度低,增溶、助溶和采用微粒给药系统等制剂 学技术虽然能够在一定程度上改善难溶性药物的 溶解度,但存在的问题依然比较突出,比如在体 内遇到体液产生的不稳定性^[2-4],以及增溶材料和 溶剂所造成的不良反应^[5-7]等。因此,根据抗肿瘤 药物的结构和理化性质设计合成新型药物载体, 得到合适的药物辅料,是实现安全高效抗肿瘤新 制剂需要解决的关键问题之一,也是抗肿瘤药物 研究的关键突破点。

聚合物胶束纳米粒是在一个较长的亲水性骨 架上接枝一个较小的疏水性基团,自发在溶剂中 组装成的一种热力学稳定的胶体溶液^[8]: 疏水端自 发聚集形成核芯,而亲水端形成胶束的外层。若 能够将难溶的药物较为稳定地包裹于核芯中,则 能够暂时隐藏药物的性质,它在体内的过程和生 物相容性将取决于亲水外层的性质。在实际研究 中,选择何种基团作为聚合物胶束纳米粒的亲水 和疏水部分是关系到所包裹药物疗效的重要因 素,也是一切工作的前提;其中的疏水基团,担负 着包裹难溶性药物的任务:其化学组成、空间结构 和数量,决定着载体的载药量,直接影响到药物的 疗效。美国普度大学一学者曾以紫杉醇为模型药 物,对多达60个小分子化合物进行了筛选,结果发 现了能将难溶的紫杉醇在水中溶解度大大提高的一 类化合物——向水性化合物(Hydrotrope)^[9-10],对这 类化合物结构进行分析发现,该类化合物大都具 有一定的水溶性,通过π键与难溶性药物的π键相 互作用形成共轭,增加了二者之间的作用力,从 而提高难溶性药物的溶解度,同时也增加难溶性 药物在水溶性介质中的稳定性。其中,水杨酸钠 是该小组发现的、对紫杉醇具有最大增溶性的化 合物。水杨酸为小分子,在水中呈微溶状态,较 适合作为疏水基团接枝到亲水性主链上。对于亲 水基团,壳聚糖是一类天然存在的阳离子多糖, 毒性低,可生物降解,具有良好的生物相容性^[11], 适合作为药物的控缓释载体, 被广泛用于制剂研 究。壳聚糖分子上有活泼的羟基和氨基,也为结 构改性、接枝疏水基团提供了可能;其中经过酸 溶和酶解得到的低分子壳寡糖既保留了壳聚糖的 优点,又在一定程度上改进了高分子壳聚糖不溶 于一般的有机溶剂和水的缺点[12-16],是理想的亲 水性骨架材料,可用于聚合物纳米粒的构建。

本实验室经过实验曾经证实,紫杉醇可被包 裹在壳寡糖/水杨酸接枝物的疏水内核中,有效提 高了它的水溶性,且具有明显的缓释效果^[15]。但 由于紫杉醇原料药基本从资源有限的红豆杉中提 取,使其产品的开发受到限制,难以满足市场需求。

阿霉素可人工合成,抗瘤谱较广,为周期非 特异性药物,对处于各个周期的肿瘤细胞均有杀 灭作用。通过对其化学结构的查阅,发现阿霉素 的分子中也存在大 π 键,有望与水杨酸形成共轭 结构,进而被包裹在壳寡糖/水杨酸接枝物的疏水 内核中。因此,笔者以疏水的碱化阿霉素为模型 药物,探讨壳寡糖/水杨酸接枝物的理化性质和细 胞毒性,考察壳寡糖/水杨酸能否成为碱化阿霉素 的载体材料,以及载药纳米粒的理化性质等。

1 材料与仪器

1.1 材料

壳寡糖(分子量为9000,由浙江大学药学院胡 富强教授课题组友情赠予);碳二亚胺(EDC,上海 共价公司);芘(美国 Sigma-Aldrich);2,4,6-三硝 基苯磺酸(TNBS,美国 Sigma 公司);盐酸阿霉素(杭 州海达医药化工有限公司,批号:U110803);人 肝癌细胞 Hep-G2(浙江大学医学院);细胞培养基 DMEM(美国 Gibco);新生牛血清(杭州四季青生物 材料有限公司);噻唑蓝(MTT,美国 Sigma-Aldrich);胰蛋白酶(美国 Hyclone);其他试剂均为 分析纯。

1.2 仪器

DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器(巩义 市京华仪器责任有限公司); SM-3 磁力搅拌器(上 海志威电器有限公司); Modulyod-230 冷冻干燥机 (美国 Thermo Electron Corporation); JY-92-11 超声 波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技有限公司); Sorvall fresco 台式高速冷冻离心机(美国 Biofuge Primo R); JF 2004 电子分析天平(余姚市金诺天平 仪器有限公司); Fluoromax-4 荧光分光光度计(日 本 Horiba Scientific); HZ-8812S 水浴恒温振荡器 (太仓市华利达实验设备有限公司);超低温冰箱 (美国 Thermo); UV-2550 紫外可见分光光度计(日 本 Shimadzu); HS-3120 超声波清洗器(天津市恒奥 科技发展有限公司); zs90 微粒粒度与表面电位分 析仪(德国 Malvern); SPA 3800N 透射电子显微镜 (TEM)(日本 SEIKO); Forma 3111 CO2 细胞培养箱 (美国 Thermo), iMark 酶联免疫检测仪(美国

Bio-Rad).

2 方法与结果

2.1 壳寡糖/水杨酸接枝物的制备

按文献报道^[15]的方法,以 EDC 为交联偶合剂 合成壳寡糖/水杨酸接枝物。实验中水杨酸与壳寡 糖游离氨基物质的量之比为 1:2。简述如下:

精密称取 EDC 1.488 3 g,水杨酸 0.214 5 g 于 30 mL 无水已醇中,搅拌使其完全溶解,形成 A 液。精密称取壳寡糖 0.5 g(Mw=9 000)于 25 mL 蒸 馏水中,搅拌使其完全溶解,形成 B 液。将 B 液 置于恒温磁力搅拌器中,25 ℃快速搅拌下缓慢滴 入 A 液。在此反应条件下恒温搅拌 53 h 后,将反 应液转入透析袋(截留分子量 7 000),以蒸馏水为 介质,持续更换介质透析 10 h 以除去乙醇和未反 应的小分子物质;透析完毕后将样品溶液冷冻干 燥,即得壳寡糖/水杨酸接枝物。

2.2 壳寡糖/水杨酸接枝物氨基取代度的测定

采用 TNBS 法^[16]测定壳寡糖/水杨酸接枝物的 氨基取代度。

精密称取分子量为 9 000 的壳寡糖和壳寡糖/ 水杨酸接枝物各 10 mg,分别溶于适量蒸馏水中, 定容至 10 mL,得到浓度为 1.0 mg·mL⁻¹的水溶液。 分别移取上述壳寡糖溶液 0, 20, 50, 100, 200, 500, 800, 1 000 µL 并加蒸馏水至 3.0 mL 后,加 入 4%的碳酸氢钠溶液 2.0 mL 以及 0.1%的 TNBS 溶液 2.0 mL,置于水浴恒温振荡器中,37 ℃孵育 2 h;取出后各管分别加入 2.0 mol·L⁻¹的盐酸 2.0 mL,采用紫外-可见分光光度计于 344 nm 处 测定吸光度,制备标准曲线。移取 1.0 mg·mL⁻¹的 壳寡糖/水杨酸接枝物水溶液 300 µL,用蒸馏水稀 释至 3.0 mL 后同法操作,由标准曲线计算壳寡糖/ 水杨酸接枝物的氨基取代度。实验测得壳寡糖 9 000/水杨酸 50%的氨基取代度为(16.92±0.95)%。

2.3 空白纳米粒的制备

精密称取壳寡糖/水杨酸接枝物冻干品,用蒸 馏水配制成 1 mg·mL⁻¹ 的溶液。冰水浴探头超声 (400 W,超声 2 s,间隔 4 s, 40 次)即得空白纳米粒。 2.4 壳寡糖/水杨酸纳米粒临界聚集浓度(critical aggregation concentration, CAC)的测定

采用花荧光法^[17]测定空白纳米粒的 CAC。精 密称定荧光探针物质芘 15 mg,溶于适量丙酮中, 定容至 250 mL,即得 60 μg·mL⁻¹ 芘的丙酮溶液。 移取上述溶液 1 mL 于 50 mL 量瓶中,用丙酮稀释 至刻度,即得 $1.2 \mu g \cdot mL^{-1}$ 花的丙酮溶液。取 $1.2 \mu g \cdot mL^{-1}$ 花的丙酮溶液各 0.5 mL 于 8 只试管中, 避光挥干丙酮。配制 10~4 000 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 空白纳米粒 的系列溶液,各取 5 mL 加入上述试管中,37 ℃振 摇 12 h。设定荧光分光光度仪激发波长为 339 nm, 扫描各样品在 350~450 nm 的发射光谱(激发狭宽 设置为 3 nm,发射狭宽设置为 5 nm)。以第 1 个吸 收峰 $I_1(374 nm)$ 和第 3 个吸收峰 $I_3(385 nm)$ 的比值 变化来确定 CAC。实验测得壳寡糖 9000/水杨酸 50%的 CAC 为 867.0 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 。结果见图 1。



图 1 壳聚糖 9000/水杨酸 50%的 CAC 图 Fig 1 CAC of CSO₉₀₀₀/SA_{50%}

2.5 壳寡糖/水杨酸接枝物的细胞毒性考察

采用噻唑蓝比色法评价壳寡糖/水杨酸接枝物 对人肝癌细胞 Hep-G2 的毒性, 无菌条件下将人肝 癌细胞 Hep-G2 置于含 10%新生牛血清的 DMEM 培养液(含青霉素,链霉素各 100 U·mL⁻¹)中连续培 养(培养条件: 37℃, 5%CO₂),用胰蛋白酶消化 法进行传代。细胞培养过程中取处于对数生长期 的 Hep-G2 细胞用胰蛋白酶消化后,用培养液调整 其密度使之成为每毫升含 5×10⁴ 个细胞的悬液, 将此细胞悬液以每孔 200 µL 接种于 96 孔板中,置 于 CO₂细胞培养箱中培养 24 h, 待细胞完全贴壁 后,分别向各孔中加入不同浓度的壳寡糖/水杨酸 纳米粒溶液后,补足培养液至 200 µL,使各孔中 纳米粒的终浓度分别为 100~2 400 µg·mL⁻¹, 以未 加纳米粒的空白细胞孔作为对照,每个浓度设置3 个复孔; 孵育 48 h 后, 向各孔中加入 5 $mg·mL^{-1}$ 的 MTT 溶液 20 µL, 置于培养箱中反应 4 h 后, 弃去上清液,向各孔中加入 150 μL DMSO,恒温 振荡 15 min,于 570 nm 测定吸光度,按下式计算 细胞抑制率:

·63 ·

细胞抑制率(%) =
$$(1 - \frac{A_{570(treated)}}{A_{570(control)}}) \times 100\%$$

其中 A_{570(treated)}为实验组的吸光度, A_{570(control)}为空白对照组的吸光度。

实验测得壳寡糖/水杨酸纳米粒对 Hep-G2 细胞的 IC₅₀值为 1 745 μg·mL⁻¹, 是安全的载体材料。 2.6 载药纳米粒的制备

2.6.1 阿霉素的碱化 参照文献^[18]略有改动,称 取适量盐酸阿霉素溶于 DMSO 中,使浓度为 10 g·L⁻¹,加入相当于盐酸阿霉素 2 倍摩尔量的三 乙胺,避光反应 12 h,再将反应液转入透析袋中(截 留分子量 1 000),以蒸馏水为介质,并持续更换 避光透析 12 h 以除去 DMSO 和未反应的三乙胺 后,冷冻干燥即得。

2.6.2 载阿霉素壳寡糖/水杨酸纳米粒的制备 用透析法^[18-19]制备壳寡糖/水杨酸载阿霉素纳米 粒。准确称取壳寡糖/水杨酸接枝物 10 mg 溶于 3 mL 蒸馏水中,冰浴探头超声(400 W,超声 2 s, 间隔 4 s, 20 次)后,定容至 5 mL,得到 2 mg·mL⁻¹ 的壳寡糖/水杨酸纳米粒溶液。用 DMSO 配制 1.0 mg·mL⁻¹ 的阿霉素溶液,在室温搅拌下向纳米 粒溶液中缓慢滴加阿霉素的 DMSO 溶液 1 mL,使 阿霉素的投药量为 10%;冰浴超声(400 W 超声 2 s, 间隔 4 s, 40 次),室温避光搅拌 12 h;将反应液 转移至透析袋(截留分子量 7 000)中,以蒸馏水为 介质,并持续更换介质,避光透析 12 h 以除去 DMSO,透析完毕后将产物以 4 000 r·min⁻¹,4℃ 离心 15 min 以除去尚未增溶的阿霉素固体,即得 阿霉素载药纳米粒溶液。

2.7 载药纳米粒包封率和载药量的测定

取 1.0 mg·mL⁻¹的阿霉素 DMSO 溶液,用混合 溶媒(DMSO:水=99:1)稀释成浓度分别为 1, 0.5,0.4,0.2,0.1,0.08,0.06,0.05 µg·mL⁻¹的 系列溶液,荧光分光光度仪检测各样品的荧光值 (EX=468 nm,EM=566 nm,狭缝宽 5 nm,工作电 压 700 mV),以样品的浓度为横坐标,吸光度为纵 坐标,绘制阿霉素标准曲线。结果线性方程为: y=160 464x+880.15,r=0.997 2,线性良好。

取一定量载药纳米粒溶液,同法操作,用 DMSO:水=99:1 混合溶媒稀释后,水浴超声 30 min,于上述波长测定吸光度,由稀释倍数计算 载药纳米粒包封率(entrapment rate, *EE*)和载药量 (drug-loading rate, DL), 计算公式如下:

$$EE(\%) = \frac{C \times V}{W_d}, \quad DL(\%) = \frac{C \times V}{W_c + C \times V}$$

式中 C 为实测药物总浓度, V 为载药纳米粒 溶液体积, W_d为实际投药量, W_c为载药纳米粒溶 液中载体的质量,由公式可计算出载药纳米粒的 包封率和载药量。

实验测得理论投药量为 10%的壳寡糖/水杨酸 载药纳米粒的实际载药量为 8.52%,包封率达到 93.15%。

2.8 纳米粒的粒径和表面电位

以微粒粒度及表面电位仪测定空白纳米粒和 载药纳米粒的粒径和表面电位。

空白纳米粒的粒径和表面电位分别为 434.0 nm(PDI为0.802)和(48.6±6.10)mV,载阿霉素 纳米粒的粒径和表面电位分别为214.2 nm(PDI为 0.601)和(33.6±5.72)mV。可以看出载药纳米粒与其 对应的空白纳米粒相比,载药纳米粒的粒径明显 变小;相应的表面电位值明显降低。

2.9 空白纳米粒和载药纳米粒的形态表征

配制 1 mg·mL⁻¹ 的空白壳寡糖/水杨酸纳米粒 溶液,用蒸馏水将制备得到的载药纳米粒溶液稀 释一定的倍数然后分别用滴管移取 1 滴样品溶液 于覆盖碳膜的铜网上,用 2%磷钨酸染色,红外干 燥后在透射电镜(TEM)下观察纳米粒的形态^[20]。空 白纳米粒和载药纳米粒的透射电镜照片见图 2(放 大倍数: 15 000 倍)。由图中可以看到空白纳米粒 和载药纳米粒均为类球形,分布较为均匀。



图 2 纳米粒的透射电镜照片 A-空白纳米粒; B-载药纳米粒 Fig 2 Image of nanoparticles A-blank nanoparticles; B-DOX-loaded nanoparticles

2.10 载药纳米粒的体外释放

取一定体积已知载药量的载药纳米粒溶液, 控制含药量为 47 μg,置于透析袋(截留分子量 7000)中,并将透析袋分别置于 5 mL 的不同 pH 值的磷酸缓冲盐溶液(pH 值分别为 5.0, 6.8, 7.4, 分别符合胃中, 肠道中以及血液中的 pH 值)中。 同法将含有 47 μg 阿霉素的阿霉素 DMSO 溶液置 于 5 mL 相应的缓冲液中,以游离药物溶液作为阴 性对照。每组平行 3 个样品,在 37 ℃,100 r·min⁻¹ 的水浴恒温振荡条件下,进行体外释放实验。分 别于 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36, 48, 60, 72 h 取样,荧光分光光度计测定吸光度。为 保证药物释放时达到漏槽条件,每次取样时均取 出全部释放介质,补充相应体积的新鲜介质于其 中。由标准曲线计算药物的累积释放量。

载药纳米粒在不同 pH 的 PBS 释放介质中的 释放结果见图 3。



图3 负载阿霉素的壳寡糖/水杨酸载药纳米粒和游离阿霉素在不同缓冲液中的体外释放

A-载阿霉素的壳寡糖/水杨酸载药纳米粒; B-游离阿霉素

Fig 3 Loads of adriamycin shell oligosaccharide/salicylic acid of drug-loading nanoparticles and free adriamycin *in vitro* release in different buffer

A-DOX-loaded CSO₉₀₀₀/SA_{50%} nanoparticle; B-DOX from DOX/DMSO

由图 3 可以看到载药纳米粒的体外释放速度 明显小于游离药物的体外释放,同时随着释放介 质 pH 下降,药物的释放呈现加速的特征,其中在 pH=5.0 的释放介质中药物的释放最快,在 pH=7.4 介质中药物的释放较慢,这可能与阿霉素在酸性 环境下溶解度较大有关。

为了进一步了解药物从纳米粒子中释放的情况,对药物的释放曲线进行了拟合,方程如下^[21-22]: $Q = \frac{Mt}{M^{\infty}} = kt^n$ 。其中 $\frac{Mt}{M^{\infty}}$ 代表在 t 时间药物的累积 释放度, n 为释放指数,代表着药物的释放机制, k 为一固定常数,一般认为当 n=0.5 时,药物是以 溶蚀的方式释放,而当 0.66<n<1 时,则认为药物 以扩散的方式释放。拟合结果见表 1。 表1 载药纳米粒在不同缓冲液中的释放曲线方程拟合

Tab 1 Equation fitting of the *in vitro* release behavior of the formed drug delivery systems in different buffer

释放介质	拟合方程	r
PBS (pH=5.0)	$Q = 0.034t^{0.5} + 0.015$	0.977 8
PBS (pH=6.8)	$Q = 0.021t^{0.5} + 0.006$	0.985 9
PBS (pH=7.4)	$Q = 0.015t^{0.5} + 0.004$	0.987 9

因此 n=0.5,即阿霉素主要以溶蚀的方式从纳 米粒内释放。从侧面证明水杨酸与阿霉素之间存 在作用力。

3 讨论

本实验以 EDC 为交联偶合剂合成壳寡糖/水 杨酸接枝共聚物,该合成方法条件安全,温和, 可重复,操作较为简便且可控性较好。本研究得 到的载体纳米粒的 CAC 比普通的表面活性剂(如 脱氧胆酸在水中的 CAC 为 1.0 mg·mL^{-1[23]})小 1 个 数量级左右,其较低的 CAC 使得它即使在较低的 浓度下也不易解聚,保持了纳米粒在体液中的稳 定性的同时,也使包裹于其中的药物不易于泄露。 空白纳米粒在水中的表面电位达到 48.6 mV,也从 另一个侧面证明了它的稳定性。因此,实验制备 的壳寡糖/水杨酸聚合物纳米粒有比表面活性剂更 好的稳定性,有作为药物载体的可能。

实验测得的载药纳米粒的粒径明显小于空白 纳米粒的粒径,载药纳米粒的表面电位比空白纳 米粒的低,推测可能是因为壳寡糖/水杨酸聚合物 纳米粒结构中含有π键,它们通过π键与碱化阿霉 素的π键相互作用,增加了与难溶性药物之间的作 用力,使纳米粒结合得更为紧密,从而导致了载 药纳米粒较空白纳米粒有更小的粒径。同时由于 药物与载体上的水杨酸的大π键作用,可能使得壳 寡糖链段缠绕更紧,原来和水分子形成氢键的自 由氨基部分转化为氨基之间的氢键,导致表面电 位下降。

细胞毒性试验结果表明,随着壳寡糖/水杨酸 纳米粒浓度的增加,Hep-G2 细胞的存活率有所下 降,IC₅₀值为1745 μg·mL⁻¹,是安全的载体材料。

透射电镜测得的空白纳米粒和载药纳米粒的 实际粒径大小与微粒粒度与表面电位分析仪测得 的水动半径相比偏小,原因可能是空白纳米粒和载 药纳米粒在真空状态过程中纳米粒失水收缩而致。

体外释放结果表明了实验制备的载药纳米粒 的体外释放具有一定的缓释效果,且主要以溶蚀 的方式从疏水核芯中释放出来;其释药速度受到 释放介质 pH 的影响,体外释放具有一定的 pH 依 赖性。这主要与药物的溶解度以及载体的性质有 关:阿霉素在酸性条件下的溶解度较大,而壳寡 糖/水杨酸纳米粒上残留的自由氨基,在酸性条件 下被质子化,将缠绕的纳米粒链段变得柔软,松散, 因此,被包裹的阿霉素被渐渐释放。实验中制得的 壳寡糖/水杨酸有望成为潜在的药物载体材料。

REFERENCES

- LU Y, CHEN D M, XIONG Y. Research progress and developing trends on anti-tumor drugs [J]. Chin Bull Life Sci(生命科学), 2012, 24(6): 535-542.
- [2] POUTON C W, PORTER C J. Formulation of lipid-based delivery systems for oral administration: Materials, methods and strategies [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2008, 60(6): 625-637.
- [3] CONSTANTINIDES P P, TUSTIAN A, KESSLER D R. Tocol emulsions for drug solubilization and parenteral delivery [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2004, 56(9): 1243 -1255.
- [4] CHEN M L. Lipid excipients and delivery systems for pharmaceutical development: A regulatory perspective [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2008, 60(6): 768-777.
- [5] LI C, WALLACE S. Polymer-drug conjugates. Recent development in clinical oncology [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2008, 60(8): 886-898.
- [6] VEGA-VILLA K R, TAKEMOTO J K, YAÑEZ J A, et al. Clinical toxicities of nanocarrier systems[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2008, 60(8): 929-938.
- [7] PEEK L J, MIDDAUGH C R, BERKLAND C. Nanotechnology in vaccine delivery [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2008,60(8): 915-928.
- [8] CUI F D. Pharmaceutics(药剂学) [M]. Peking: People's Medical Publishing House, 2008: 388.
- [9] LEE J L, SANG C, ACHARYA G, et al. Hydrotropic solubilization of paclitaxel: Analysis of chemical structures for hydrotropic property [J]. Pharm Res, 2003, 20(7): 1022-1030.
- [10] CHO Y W L, SANG C, HUH K M, et al. Hydrotropic agents for study of *in vitro* paclitaxel release from polymeric micelles [J]. J Control Release, 2004, 97(2): 249-257.
- [11] DE CAMPOS A M, SANCHEZ A, ALONSO M J. Chitosan nanoparticles: a new vehicle for the improvement of the delivery of drugs to the ocular surface. Application to

cyclosporin A [J]. Int J Pharm, 2001, 224(1/2): 159-168.

- [12] ZHANG C Q, SUN Y J, WU X L, et al. Pharmacokinetics, biodistribution, efficacy and safety of N-octyl-O-sulfate chitosan micelles loaded with paclitaxel [J]. Biomaterials, 2008, 29(9): 1233-1241.
- [13] LI G, ZHUANG Y L, MU Q, et al. Preparation, characterization and aggregation behavior of amphiphilic chitosan derivative having poly (L-lactic acid) side chains [J]. Carbohyd Polym, 2008, 72(1): 60-66.
- [14] MIN K H P, BAE S M, JO H G, et al. Hydrophobically modified glycol chitosan nanoparticles-encapsulated camptothecin enhance the drug stability and tumor-targeting in cancer therapy [J]. J Control Release, 2008, 127(3): 208-218.
- [15] WEI X H, NIU Y P, XU Y Y, et al. Salicylic acid-grafted chitosan oligosaccharide nanoparticle for paclitaxel delivery [J]. J Bioactive Compatible Polymers, 2010, 25(3): 319-335.
- [16] ANDRES B S, MARTINA E K. Mucoadhesive polymers as platforms for peroral peptide delibery and absorption: synthesis and evaluation of different chitosan-EDTA conjugates [J]. J Control Release, 1998, 50(2/3): 215-223.
- [17] SLAUGHTER J N, SCHMIDT K M, BYRAM J L, et al. Synthesis andself-assembly properties of a novel [poly(ethyleneglycol)]-fluorocarbon-phospholipids triblock copolymer [J]. Tetrahedron Lett, 2007, 48(22): 3879-3882.
- [18] TANG H B, CHEN H L, ZHOU Z M, et al. Tumor-targeted nanoparticles derived from pullulan acetate conjugate: Preparation, stability and release *in vitro* [J]. Chin J Tiss Eng Res(中国组织工程研究), 2012, 16(34): 6326-6330.
- [19] LUO Y, LI L, WANG Y G, et al. Preparation of HCPT-PLA nanoparticals using dialysis method and the research of their chemical and physical properties [J]. J Xiamen Univ(Nat Sci)(厦门大学学报: 自然科学版), 2010, 49(6): 832-837.
- [20] LIU L N. Antitumor activity of doxorubicin conjugated stearic acid-g-chitosan oligosaccharide polymeric micelles [D]. Hangzhou, Zhejiang University, 2010.
- [21] KORSMEYER R W, GURNY R, DOELKER E, et al. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers [J]. Int J Pharm, 1983, 15(1): 25-35.
- [22] LEE P I, PEPPAS N A. Prediction of polymer dissolution in swellable controlled-release systems [J]. J Control Release, 1987, 6(1): 207-215.
- [23] KRATOHVIL J P, HSU W P, KWOK V. How large are the micelles of di-α-hydroxy bile salts at the critical micellization concentrations in aqueous electrolyte solutions? Results for sodium taurodeoxycholate and sodium deoxycholate [J]. Langmuir, 1986, 2(2): 256-258.

收稿日期: 2013-08-30

颈痛舒贴片中芍药苷的体外透皮吸收研究

王平, 刘善新(山东省中医药研究院, 济南 250014)

摘要:目的 研究颈痛舒贴片中芍药苷的体外透皮吸收特性,为其临床应用提供参考。方法 采用改良 Franz 扩散池法, 以离体小鼠皮肤为透皮屏障,生理盐水为接受介质,用高效液相色谱法进行测定,考察制剂中的芍药苷的累计透过量。 结果 芍药苷累计透过量 Higuich 方程为 Q=2.667t^{1/2}-4.204, r=0.859 3。结论 芍药苷的累计透过量符合 Higuich 方程。

作者简介:王平,女,硕士,副研究员 Tel: (0531)2949847

```
E-mail: wangpingjinan@163.com
```

基金项目:山东省自主创新成果转化重大专项(2012ZHZX1C0405);山东省科技发展计划项目(2010GSF10278);济南市青年科技明星计划专 项(20110117)