

· 药剂与工艺 ·

十六烷基壳聚糖纳米微球负载紫杉醇的研究

代 昭, 孙多先*, 郭 瑶*
(天津大学化工学院, 天津 300072)

摘要: 目的 研究适用于水体系的紫杉醇的负载载体。方法 壳聚糖经烷基改性制得烷基取代的壳聚糖衍生物, 该衍生物在水中可自动形成粒径分布在 100 nm 左右的纳米微球, 并在磷酸缓冲液 (pH= 7.4) 中对负载紫杉醇的纳米微球进行了体外释放研究。结果 随着烷基取代度的增加, 紫杉醇的体外释放平衡浓度降低, 体外释放的半释放时间延长。结论 十六烷基壳聚糖纳米微球是一个优良的紫杉醇的水分散体系。

关键词: 紫杉醇; 十六烷基壳聚糖; 壳聚糖; 纳米微球; 负载体系

中图分类号: R283.3; R286.02 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)02-0120-03

Studies on cetyl-chitosan nanosphere as carriers for paclitaxel

DAI Zhao, SUN Duo-xian, GUO Yao

(School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract Object To prepare and study a suitable carrier for paclitaxel in water. **Methods** Cetyl-chitosan (CTCS), prepared by reacting chitosan (CS) with chlorocetane under alkaline condition, was soluble and spontaneously formed nanosphere about 100 nm in diameter. And the release *in vitro* from paclitaxel-loaded CTCS nanosphere was measured in phosphate buffer solution (PBS, pH= 7.4). **Results** The balanced release concentration of paclitaxel was decreased and half-release time ($t_{1/2}$) was delayed with the increase of substitution degree of alkyl. **Conclusion** This kind of nanosphere is an excellent carrier for paclitaxel in water.

Key words paclitaxel; cetyl-chitosan (CTCS); chitosan (CS); nanosphere; drug delivery system

紫杉醇 (paclitaxel, 商品名 taxol) 是一种复杂的二萜类化合物。1992 年美国 FDA 首次批准紫杉醇用于其他化疗药物感治的转移性卵巢癌, 后又批准其用于铂类药物难治的转移性乳腺癌。由于紫杉醇在水中的溶解度极低, 现用于临床的紫杉醇制剂多用聚氧乙基蓖麻油-乙醇 (1:1) 配制的溶液, 使用前需要预先稀释。这时因溶剂的转换, 紫杉醇易析出沉淀。并且聚氧乙基蓖麻油可能引起过敏反应, 甚至溶出输液装置中的增塑剂, 导致更严重的过敏反应发生。即使同时使用氢化可地松, 过敏反应的发生率仍达到 10%~30%^[1]。对不含聚氧乙基蓖麻油并能提高紫杉醇生物利用度的其他液体制剂的研究成为当前的热点, 其中包括合成紫杉醇的易溶性前体药物以及脂质体等。纳米微球由于其拥有靶向给药, 降低药物的毒副作用等优点, 成为目前药剂学研究的热点之一^[2]。壳聚糖 (chitosan, CS) 具有良好的生物相容性以及可降解性, 因此近年来逐渐成为生物医学

工程以及药物载体等领域研究较多的材料之一, 尤其是在药物的控释、缓释、靶向以及智能释药系统中的应用受到了广泛的关注^[3]。目前壳聚糖纳米微球已作为蛋白质^[4]、基因^[5]、抗肿瘤药物^[6]等某些水溶性药物给药体系, 但其中大部分是关于 PEG 改性壳聚糖的报道。PEG 的添加使壳聚糖微球具有所谓的半互穿网络结构 (semi-interpenetration networks), 但很难用作油性药物载体。为了解决上述问题, 本实验采用将壳聚糖长链烷基取代改性的方法, 制备了拥有两亲结构的壳聚糖烷基衍生物, 由于烷基的疏水作用导致这种壳聚糖链在水中能发生自凝聚, 形成纳米微球, 并且烷基的引入可以提高体系对于油性药物的负载性能。

1 原料与仪器

壳聚糖 (山东海得贝公司), 脱乙酰化度为 90%, 平均相对分子质量为 8 500; 透析袋 (TBD 生物发展有限公司), 截留相对分子质量为 6 000; 紫杉

* 收稿日期: 2002-06-19

作者简介: 代 昭 (1975-) 男, 湖南人, 天津大学 2000 级博士生, 主要从事生物医学材料研究。

Tel (022) 27891966 E-mail dai zhao@eyou.com

* 通讯作者 Tel (022) 27404645 E-mail tdx sun@eyou.com

醇(天津大学);氯代十六烷(上海医药公司),化学纯;其余试剂均为分析纯

Elementar Vario EL元素分析仪; BIO- BAD EX ALIBUR FTS3000 型红 外 光 谱 仪; Philips EM400ST透射电镜; UV-1100紫外分光光度计; LG10- 2. 4A型高速离心机。

2 实验部分

2. 1 十六烷基壳聚糖(cetyl-chitosan, CTCS)的制备: 取壳聚糖 1 g, KOH 2 g, 异丙醇 12 mL, 置于 100 mL三口瓶中, 搅拌并加热到 40℃, 维持搅拌 1 h使壳聚糖碱化。然后升温至 70℃, 加入一定量氯代十六烷反应 4~ 10 h。反应结束后将产物用甲醇洗出, 稀盐酸中和至中性, 再用丙酮沉淀后过滤。将所得产物用丙酮、乙醚反复洗涤后, 再将所得产物烘干后放入透析袋中动态透析 24 h, 用 AgNO₃ 检查产物中的 KCl清除情况, 最后可得到精制的十六烷基改性壳聚糖。

2. 2 紫杉醇工作曲线的确定: 准确称取 4. 3 mg 紫杉醇溶解于 5 mL无水乙醇中, 配成 8×10^{-3} mol/L 的标准溶液, 并稀释成 $1. 0 \times 10^{-6} \sim 2. 0 \times 10^{-5}$ mol/L的不同浓度溶液, 在 227 nm下测定其吸光度(A), 根据紫杉醇浓度(C)与 A 值作标准曲线, 经线性回归, 得方程: $A = 3. 08 \times 10^3 + 3. 285 \times 10^4 C$, $r = 0. 999\ 95$ 线性范围为 $1. 0 \times 10^{-6} \sim 2. 0 \times 10^{-5}$ mol/L。

2. 3 烷基壳聚糖纳米微球的制备以及紫杉醇的负载: 取 20 mg CTCS与 20 mL水, 维持超声 30 min, 得到 0. 1%的微球水分散液。将 4. 3 mg 紫杉醇溶解在 2 mL无水甲醇中, 并在超声下极缓慢滴加至微球水分散液中, 维持超声 30 min以除去甲醇, 得到负载紫杉醇的微球的水分散液。取 4 mL此分散液置透析袋中, 在 37℃恒温下放入 96 mL pH= 7. 4 的磷酸缓冲溶液中测量紫杉醇的释放情况, 并取 10 mL该水分散液于 12 000 r/min 下高速离心 30 min, 使所有微球沉降。取上层清液测量其游离药物含量, 以确定烷基壳聚糖微球对紫杉醇的载药量和包封率。

3 结果与讨论

3. 1 产物结构表征

3. 1. 1 元素分析: 由元素分析可进一步推算出产物的取代度(假定壳聚糖在反应前后没有发生明显降解), 结果见表 1。

反应时间和温度是取代反应中比较重要的两个参数, 从反应时间上看, 随着反应时间的延长, 取代

度也随之增高, 当反应时间从 6 h增加到 10 h, 产物取代度的增加变慢; 提高温度有利于取代反应, 但在 70℃反应 6 h之后, 产品的水溶性变差, 有不溶物产生, 可能是温度过高, 有氧化等副反应发生。

表 1 十六烷基壳聚糖元素分析及其取代度

Table 1 Element analysis results and substitution degree of CTCS

样品编号	反应时间 /h	N 含量 /%	取代度
CTCS-1	4	7. 10	0. 14
CTCS-2	6	6. 14	0. 28
CTCS-3	8	5. 98	0. 31
CTCS-4	10	5. 77	0. 35
CTCS-5	40	7. 21	0. 13
CTCS-6	50	6. 46	0. 23
CTCS-7	60	6. 14	0. 28
CTCS-8	70	5. 91	0. 32

注: 以上取代度是以 N含量为基准计算而得的

Note Substitution degree calculated according to nitrogenium content of CTCS

3. 1. 2 红外光谱分析: 见图 1 可以看出有 3个区域的吸收峰发生了比较明显的变化。第一个区域是衍生化后位于 2 85和 2 923 cm⁻¹的 C-H的伸缩振动峰增强, 提示在壳聚糖分子中引入烷基取代基 -CH₂和 -CH₃^[7, 8]。第二个明显变化的区域是位于 1 531~ 1 637 cm⁻¹的吸收峰, 该区域应该是由壳聚糖的酰胺 I (C= O)、酰胺 II (N-H) 以及 -NH₂ (1 590 cm⁻¹) 的变形振动峰所构成的一个较宽的混合吸收谱带, 改性后这个混合谱带出现了明显的分峰, 处于中间的 -NH₂ (1 590 cm⁻¹) 的吸收峰消失, 提示在此反应体系中壳聚糖环上 -NH₂ 发生了取代反应; 而同时位于 1 030~ 1 080 cm⁻¹的伯仲醇吸收峰的变化不大, 提示在 C₆和 C₃位上发生取代的反应较少, 而氨基则是发生取代反应的主要基团。第三个明显变化的区域在 1 386 cm⁻¹的 C-H变形振动峰增强, 再次提示烷基的引入。

3. 2 不同取代度的十六烷基壳聚糖纳米微球对于紫杉醇的负载

3. 2. 1 负载紫杉醇的烷基壳聚糖纳米微球的体外释放性能: 不同取代度的十六烷基壳聚糖纳米微球负载紫杉醇后的体外释放曲线见图 2 可以看出经烷基改性后, 随着烷基取代度的增加, 壳聚糖纳米微球对紫杉醇的体外释放缓释作用增强, 其中 CTCS-1 和 CTCS-2的烷基取代度较小, 半释放时间(t_{1/2})浓度、平衡浓度较高, 而且这两者的 t_{1/2}时的浓度和平衡浓度很接近。而 CTCS-3和 CTCS-4的烷基取代度接近, t_{1/2}时的浓度和平衡浓度也较接近, 其原因可能是由烷基壳聚糖的亲油基(长链烷基)所构成的

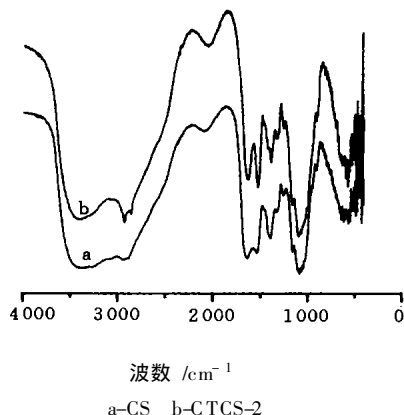


图 1 壳聚糖和十六烷基壳聚糖红外光谱图

Fig. 1 FTIR spectra of CS and CTCS-2

内核造成的。这层内核对于体系中的紫杉醇起到了关键性的吸附、增溶和缓释作用。随着烷基取代度的增加, CTCS-1~ CTCS-4的 $t_{1/2}$ 分别为 9.4, 12.7, 19.6和 21.8 h $t_{1/2}$ 有较为明显的延长,而且平衡浓度随之降低,这些都表明壳聚糖环上亲油基的数目对于紫杉醇的体外释放有明显的作用。随着壳聚糖分子链中烷基数目的增多,壳聚糖纳米微球对于紫杉醇的吸附和包容能力增强,平衡浓度降低,但是当烷基增加到一定程度(取代度> 0.3)以后,体系的不稳定性也随之增加,会有凝聚现象发生,因此应控制烷基的取代度不要过高。

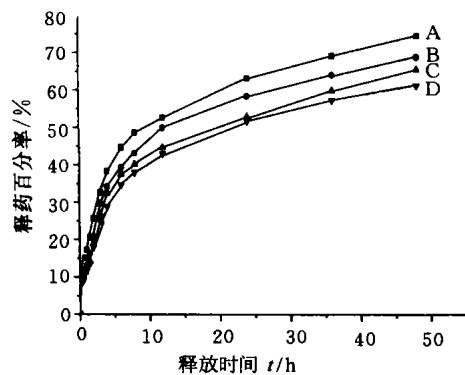


图 2 紫杉醇 CTCS微球体外累积释放曲线

Fig. 2 *In vitro* release of paclitaxel-loaded CTCS nanosphere

3.2.2 十六烷基壳聚糖纳米微球的包封率及载药量: 由于烷基的取代度不同,改性后单位壳聚糖环上亲油基的数量也是不同的,随着烷基数量的增加,烷基壳聚糖在水中的聚集状态也有所不同,这将影响体系对于紫杉醇的包埋和负载性能

0.1% CTCS-1的空白以及负载紫杉醇后的微球经磷钨酸负染色后的透射电镜可以看出,所得微

粒的粒径在 100 nm左右,而且能看见这些微球拥有核壳结构;负载紫杉醇以后,微球的粒径并没有发生非常大的变化,但是核层发生了比较明显的变化,因此推测,这是紫杉醇进入微球内部所造成的。紫杉醇的负载性能见表 2

表 2 CTCS纳米微球负载紫杉醇的包封率和载药量

Table 2 Loading content and encapsulation efficiency of paclitaxel-loaded CTCS nanosphere

样品编号	载药量 %	包封率 %
CTCS-1	9.2	43.5
CTCS-2	12.1	61.6
CTCS-3	13.9	66.7
CTCS-4	14.6	73.0

$$\text{包封率} = \frac{m_{\text{total}} - m_{\text{free}}}{m_{\text{total}}} \times 100\%$$

$$\text{载药量} = \frac{m_{\text{total}} - m_{\text{free}}}{m_{\text{CTCS}}} \times 100\%$$

式中: m_{total} 投入的紫杉醇总质量, m_{free} 体系中游离的紫杉醇的质量, m_{CTCS} 投入的烷基壳聚糖总质量。

从表 2可以看出,随着十六烷基取代度的增加,十六烷基壳聚糖纳米微球与紫杉醇之间的亲和作用增强,在延长了紫杉醇在体外的释放时间,降低平衡释放浓度的同时,也提高了对于紫杉醇的包封率和载药量。这表明,此纳米微球体系是一个优良的可分散于水介质的紫杉醇负载体系。

References

- [1] Chen D B, Iii W L, Yang T Z, *et al.* Preparation and characterization of long-circulating solid lipid nanoparticles containing paclitaxel [J]. *J Peking Univ Health Sci* (北京大学学报·医学版), 2002, 34(1): 57-60.
- [2] Kumares S S, Tejjraj M A, Anand Rao R K, *et al.* Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices [J]. *J Controlled Release*, 2001, 70 (1-2): 1-20.
- [3] Majeti N V, Ravi K. A review of chitin and chitosan applications [J]. *React Funct Polym*, 2000, 46(1): 1-27.
- [4] Pilar C, Remunan-López C, Vila-Jato J L, *et al.* Chitosan and chitosan/propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines [J]. *Pharm Res*, 1997, 14(10): 1431-1436.
- [5] Patrick E, Shaomin Z, Thierry B, *et al.* Chitosan-based vector/DNA complexes for gene delivery: biophysical characteristics and transfection ability [J]. *Pharm Res*, 1998, 15 (9): 1332-1339.
- [6] Kevin A J, Marie P F, Ana M, *et al.* Chitosan nanoparticles as delivery systems for doxorubicin [J]. *J Controlled Release*, 2001, 73(2-3): 255-267.
- [7] Dong Y M, Wang M, Wu Y S, *et al.* FTIR spectroscopic determinations of chitosan derivatives [J]. *J Cellulose Sci Tech* (纤维素科学与技术), 2001, 9(2): 42-56.
- [8] Wang A Q, Yu X D. Study on the preparation and properties of alkyl-chitosan derivatives [J]. *J Funct Polym*, 1998, 11 (1): 83-86.