

## ·制剂与质量·

## 去甲斑蝥素 N-乳糖酰壳聚糖纳米粒的制备及其特性研究

王 钦,胡 玮,张学农,张 玮  
(苏州大学药学院 药剂学教研室,江苏 苏州 215123)

**摘 要:**目的 合成 N-乳糖酰壳聚糖作为肝靶向载体,制备去甲斑蝥素纳米粒。方法 通过碳二亚胺缩合法制备 N-乳糖酰壳聚糖,并以为之载体,采用离子诱导法制备去甲斑蝥素 N-乳糖酰壳聚糖纳米粒。以粒径分布、包封率、载药量为综合指标,正交试验设计优化载药纳米粒的制备工艺,并考察其体外释放特性。结果 合成的 N-乳糖酰壳聚糖的取代度为 8.92%。优化工艺制备的 N-乳糖酰壳聚糖载药纳米粒外观圆整,平均粒径 $(118.7 \pm 8.84)$  nm,包封率 $(57.92 \pm 0.40)$ %,载药量 $(10.38 \pm 0.06)$ %,其体外释药遵循 Higuchi 方程。结论 半乳糖修饰壳聚糖载药纳米粒具有良好的缓释特性。

**关键词:**去甲斑蝥素; N-乳糖酰壳聚糖;肝靶向;纳米粒

**中图分类号:**R284.2;286.02

**文献标识码:**A

**文章编号:**0253-2670(2009)01-0040-06

## Preparation of norcantharidin N-galactosylated chitosan nanoparticles and its characteristics

WANG Qin, HU Wei, ZHANG Xue-nong, ZHANG Wei

(Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Soochow University, Suzhou 215123, China)

**Abstract : Objective** To synthesize N-galactosylated chitosan as hepatocyte-targeting carrier and prepare loading norcantharidin nanoparticles. **Methods** N-Galactosylated chitosan was prepared by carbodiimide condensation reaction; loading norcantharidin nanoparticles were achieved by ionic cross-linkage process with N-galactosylated chitosan as carrier. Taking distribution of particle size, entrapment efficiency, and drug-loading capacity as comprehensive indexes, the orthogonal test design was used to optimize the preparation process and the *in vitro* release was investigated. **Results** Substitution degree of N-galactosylated chitosan reached to 8.92%. Novel nanoparticles were spherical, average in particle size  $(118.7 \pm 8.84)$  nm, entrapment efficiency  $(57.92 \pm 0.40)$ %, drug-loading capacity  $(10.38 \pm 0.06)$ %, and the *in vitro* release followed Higuchi equation. **Conclusion** Effect of drug sustained release of galactosylated chitosan nanoparticles is significant.

**Key words:** norcantharidin; N-galactosylated chitosan; hepatocyte-targeting; nanoparticles

去甲斑蝥素(norcantharidin)为斑蝥素的合成衍生物,是由我国首先开发的治疗肝癌的新药,主要用于原发性肝癌的治疗<sup>[1]</sup>。去甲斑蝥素主要以片剂和注射剂应用于临床,静脉注射在体内消除较快,6 h后药物浓度明显降低,24 h后大部分被消除。由于临床应用时去甲斑蝥素的泌尿系统毒性较大,因而对其临床最大用药剂量有严格限制<sup>[2]</sup>。主动靶向系利用配体与受体识别的特异性结合的专一性,从而设计出针对其受体为靶点的靶向药物载体系统。壳聚糖(chitosan)具有无毒、可生物降解和良好的生物相容性,是一种具有广阔前景的新型药物

辅料<sup>[3]</sup>。由于壳聚糖的分子为带有氨基的葡萄糖,可进行 N 位交联等多种化学反应对其进行修饰。利用 $\beta$ -D-半乳糖可以被肝细胞中的去唾液酸糖蛋白受体特异性识别,因此可以将其与壳聚糖交联,作为肝特异性主动靶向载体<sup>[4]</sup>。本研究采用低相对分子质量壳聚糖作为原料,采用碳二亚胺缩合法制备半乳糖修饰的 N-乳糖酰壳聚糖,并作为主动肝靶向载体制备去甲斑蝥素半乳糖修饰壳聚糖纳米粒,以期在体内被肝细胞的去唾液酸糖蛋白受体特异性识别,从被动靶向和主动靶向两个方面达到药物在体内的双重肝靶向识别和作用,减少去甲斑蝥素的不

①收稿日期:2008-06-03

基金项目:国家科技支撑计划资助课题(2006BAI09B00);国家科技部科技型中小企业技术创新基金资助项目(07C26223201333);江苏省“六大人才高峰”资助项目;江苏省卫生厅招标项目(H200630)

作者简介:王 钦(1985—),男,江苏省东台市人,硕士研究生,主要研究方向为药物新剂型与新技术。

Tel:(0512)65881981 E-mail:wangqin@live.com

\*通讯作者 张学农 Tel:(0512)66998348 Fax:(0512)65880030 E-mail:zhangxuenong@163.com

良反应,增加抗肝癌疗效。

## 1 材料

日本岛津 LC-10A 高效液相色谱系统 (SPD-M10A 紫外检测器, SCL-10A 系统控制器, CTO-10AS 恒温箱, CR-10A 数据处理机), Pro Star LC240 红外分光光度计、Unity Inova 400 超导核磁共振谱仪 (美国瓦里安公司), HPP 5001 激光粒度分析仪 (英国 Malvern 公司), H-600 透射电子显微镜 (日本日立公司), ME2155 分析天平 (德国 Staroriorious 公司), Optima max 超速冷冻离心机 (美国贝克曼公司), Vivaflow50 超滤仪 (相对分子质量为  $1.0 \times 10^4$  聚砜醚滤膜, 德国 Staroriorious 公司), LG-5 真空冷冻干燥冻干机 (上海机械工艺研究所), JY92-II 超声波细胞粉碎机 (宁波新芝生物科技公司), SHZ-82 恒温振荡箱 (江苏富华仪器公司), 透析袋 (滤过最大相对分子质量为 3 500, 进口分装)。

去甲斑蝥素 (苏州苏瑞医药化工有限公司, 批号 20060508), 壳聚糖 (江苏南通兴成生物制品厂, 相对分子质量  $8 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ , 实验室自行脱乙酰化, 脱乙酰度: 93.1%, 黏度: 2.95 mPa·s), 乳糖酸钠 (南通华峰化工有限公司), 四甲基乙二胺 (TEMED) (Aldrich), 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC·HCl) (上海延长生化科技发展有限公司), *N*-羟基丁二酰亚胺 (NHS) (上海共价化学科技有限公司), 三聚磷酸钠 (TPP) (分析纯, 国药集团化学试剂有限公司), 乙腈 (色谱纯, 德国 Merck 公司), 其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

2.1 *N*-乳糖酰壳聚糖的合成: 将乳糖酸钠水溶液经 732 型阳离子交换树脂处理, 干燥得到乳糖酸。壳聚糖 (6 g, 6.41 mmol) 溶解于 1% HCl 200 mL 中, 搅拌形成溶液。将乳糖酸 (2.3 g, 6.41 mmol)、EDC·HCl (1.47 g, 7.69 mmol) 和 NHS (0.74 g, 6.41 mmol) 分别投入上述反应液中, 再用 TEMED 调 pH 值至 4.5。反应液磁力搅拌, 室温反应 72 h 后, 置透析袋 (滤过最大相对分子质量为 3 500) 中, 用蒸馏水透析 4 d, 滤液中加入过量丙酮, 析出产物, 抽滤, 滤饼用无水乙醇洗涤脱水, 干燥, 得淡黄色粉末, 约 4.8 g。合成反应见图 1。

*N*-乳糖酰壳聚糖的乳糖酰基取代度 ( $DS_{GC}$ ) 采用  $^1\text{H-NMR}$  法测定和计算<sup>[5]</sup>。*N*-乳糖酰壳聚糖的乳糖酰基取代度按下式计算, 为 8.92%。

$$DS_{GC} = [(H_{GC}(\delta 3.37 \sim 4.16) - H_{Chitosan}(\delta 3.32 \sim 3.89) / 12] \times 100 \%$$

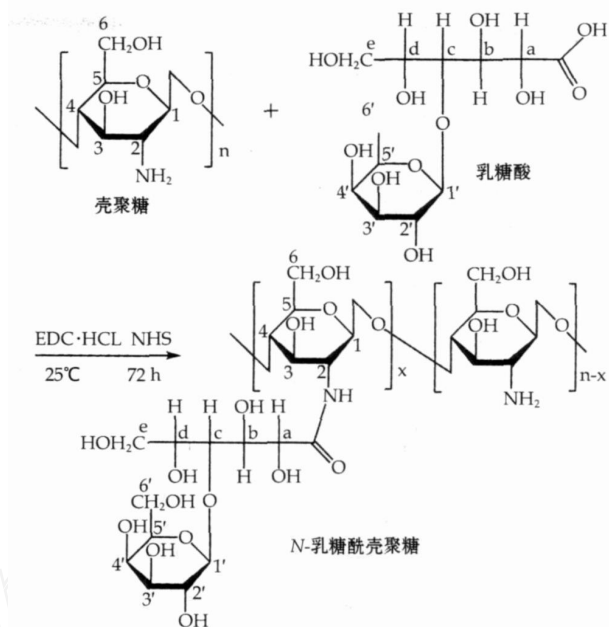


图1 *N*-乳糖酰壳聚糖的合成反应

Fig. 1 Synthesis of *N*-galactosylated chitosan

$H_{GC}(\delta 3.37 \sim 4.16)$ 、 $H_{Chitosan}(\delta 3.32 \sim 3.89)$  分别为 *N*-乳糖酰壳聚糖和壳聚糖  $^1\text{H-NMR}$  谱中  $\delta$  3.37~4.16、3.32~3.89 的氢质子数

## 2.2 *N*-乳糖酰壳聚糖的表征

2.2.1 红外图谱: 见图 2。壳聚糖的  $3429.2\text{ cm}^{-1}$  的宽峰是 O-H 的伸缩振动吸收峰与 N-H 伸缩振动吸收峰的重叠峰,  $1592.8\text{ cm}^{-1}$  为  $\text{-NH}_2$  的面内弯曲振动峰。*N*-乳糖酰壳聚糖的红外图谱与壳聚糖相比,  $3410.2\text{ cm}^{-1}$  的峰变得更宽, 是因为产物较壳聚糖羟基数目增加; 位于  $1658.9\text{ cm}^{-1}$  处出现了较明显的酰胺峰,  $1593.6\text{ cm}^{-1}$  的  $\text{-NH}_2$  峰较壳聚糖减弱, 说明在壳聚糖的氨基上发生了酰化反应。

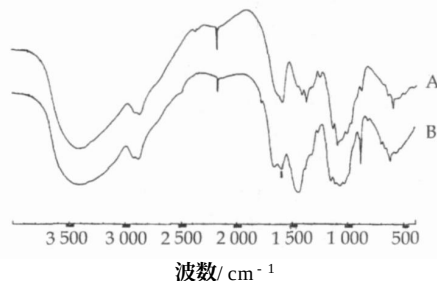


图2 壳聚糖(A)和 *N*-乳糖酰壳聚糖(B)红外图谱

Fig. 2 Infrared spectrum of chitosan (A) and *N*-galactosylated chitosan (B)

2.2.2  $^1\text{H-NMR}$  谱: 将壳聚糖和 *N*-乳糖酰壳聚糖溶于  $\text{D}_2\text{O}/\text{F}_3\text{CCOOH}$  中, 在 400 MHz 核磁共振仪上测定两者的  $^1\text{H-NMR}$  谱, 见图 3。壳聚糖的  $^1\text{H-NMR}$   $\delta$ : 4.59 ( $H_1$ )、2.91 ( $H_2$ )、3.32~3.89 ( $H_{3-6}$ )、1.92 ( $\text{NHCOCH}_3$ ); *N*-乳糖酰壳聚糖的  $^1\text{H-NMR}$   $\delta$ : 4.72

(H<sub>1</sub>)、4.43 (H<sub>1'</sub>、H<sub>c</sub>)、3.37~4.16 (H<sub>3~6</sub>、H<sub>2~6'</sub>、H<sub>a</sub>、H<sub>b</sub>、H<sub>d</sub>、H<sub>e</sub>)、3.02 (H<sub>2</sub>)、1.92 (NHCOCH<sub>3</sub>)。

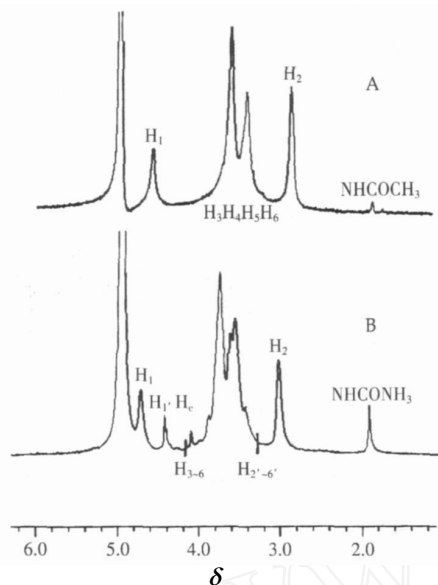


图3 壳聚糖(A)和N-乳糖酰壳聚糖(B)的<sup>1</sup>H NMR图谱

Fig. 3 <sup>1</sup>H NMR Spectra of chitosan (A) and N-galactosylated chitosan (B)

2.3 N-乳糖酰壳聚糖特性黏度的测定<sup>[6]</sup>:将壳聚糖干燥至恒重,精密称取1~1.2 g,用0.1 mol/L 醋酸-0.2 mol/L NaCl 溶剂配成50 mL 样品溶液,样品溶液的浓度定为C<sub>1</sub>,滤过,精密量取滤液8 mL,移入乌氏黏度计粗管,25 °C保温10 min以上。另外2根支管口各接1根乳胶管,并用夹子夹住,用吸球自中间乳胶管口吸气,使溶液渐渐上升,直至刻度线a以上,移走吸球,使溶液在毛细管内自然下落,用秒表准确记录溶液下降时通过刻度线a和b的时间t<sub>1</sub>。先按上法测定溶剂的黏度,需用的溶剂为8 mL,测得的时间为t<sub>0</sub>。然后精确量取4 mL 溶剂加入黏度计中,此时浓度为C<sub>2</sub>,用同法测定其流经a和b的时间t<sub>2</sub>。再依次精确量取溶剂4 mL和4 mL,分次加入到黏度计中稀释,浓度分别为C<sub>3</sub>、C<sub>4</sub>,并分别测定t<sub>3</sub>、t<sub>4</sub>。稀释后的浓度分别为:C<sub>2</sub> = 2/3 C<sub>1</sub>、C<sub>3</sub> = 1/2 C<sub>1</sub>、C<sub>4</sub> = 1/3 C<sub>1</sub>;对应于各浓度的相对黏度(η<sub>r</sub>)为:η<sub>r1</sub> = t<sub>1</sub>/t<sub>0</sub>、η<sub>r2</sub> = t<sub>2</sub>/t<sub>0</sub>、η<sub>r3</sub> = t<sub>3</sub>/t<sub>0</sub>、η<sub>r4</sub> = t<sub>4</sub>/t<sub>0</sub>;增比黏度=η<sub>r1</sub>,比浓黏度为η<sub>sp/c</sub>。依次计算,得4个比浓黏度,并对浓度作回归直线,截距即为特性黏度(η)。结果壳聚糖的特性黏度曲线方程Y = 0.5088 X + 0.9558, r<sup>2</sup> = 0.9989。半乳糖酰修饰壳聚糖的特性黏度曲线方程Y = 0.6947 X + 0.7809, r<sup>2</sup> = 0.9980。N-乳糖酰壳聚糖的特性黏度为0.7809,比壳聚糖原料0.9558有所下降。这是由于脱乙酰和N-乳糖酰化反应时,壳聚糖的主链

和支链有所断裂造成特性黏度下降;另外,N位乳糖酰化也可能造成特性黏度下降。

2.4 去甲斑蝥素N-乳糖酰壳聚糖纳米粒的制备:将N-乳糖酰壳聚糖溶解于0.2%醋酸水溶液中,制得N-乳糖酰壳聚糖澄清溶液,再将适量去甲斑蝥素加入该溶液中溶解,在500 r/min 磁力搅拌下将适量1.2 mg/mL TPP 溶液逐滴缓慢滴入其中,直至溶液刚刚产生乳光为止。用0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得去甲斑蝥素N-乳糖酰壳聚糖纳米粒胶体。若不加去甲斑蝥素,同法可制得空白纳米粒。

## 2.5 去甲斑蝥素的测定<sup>[7]</sup>

2.5.1 标准曲线方程:取100 mg 去甲斑蝥素,置100 mL 量瓶中,另水超声溶解,定容至刻度,使成1 mg/mL 贮备液。精密吸取储备液配制成20、25、50、100、200、400、800 μg/mL 对照品溶液,进样20 μL,以峰面积(Y)对质量浓度(X)回归得Y = 925.374 X - 1778.8, r = 0.9999 (Y:峰面积;X:质量浓度),线性范围:20~800 μg/mL。

2.5.2 精密度试验:配制25、200、600 μg/mL 去甲斑蝥素0.2%醋酸溶液,得日内精密度数据:1.880%、0.172%、0.945% (n = 5)和日间精密度数据:1.420%、1.126%、1.468% (n = 5)。

2.5.3 回收率试验:精密称取10 mg 空白纳米粒冻干粉,分别加入3、9、12 mg 去甲斑蝥素,用0.2%醋酸溶液充分分散,并加入甲酸6 mL,用0.2%醋酸溶液定容至25 mL,置于超声波细胞粉碎机中超声消解,过0.45 μm 微孔滤膜,进样20 μL,测定去甲斑蝥素的质量浓度,代入标准曲线方程,计算得低、中、高质量浓度的回收率分别为97.79%、99.06%、100.8%。

## 2.6 去甲斑蝥素N-乳糖酰壳聚糖纳米粒质量评价

2.6.1 粒径分布和多分散指数:取适量去甲斑蝥素N-乳糖酰壳聚糖纳米粒胶体,用激光粒度分析仪测定纳米粒粒径和多分散指数(PDI),得到粒径分布图。

2.6.2 包封率的测定:取纳米粒胶体,4 °C、30 000 r/min 离心45 min,将上清液20 μL 注入液相色谱仪,测定游离药物质量浓度,计算包封率(包封率 = 纳米粒中包封的药量/纳米粒中包封与未包封的总药量 × 100%)。

2.6.3 载药量的测定:按照处方中N-乳糖酰壳聚糖的加入量以及加药量,结合上述包封率的测定结果以及下述回收率的测定,计算载药量(载药量 = 纳

米粒中所含药物质量/纳米粒的总质量 ×100 %)。

2.7 纳米粒处方优化:综合单因素考察的数据,选择 *N*-乳糖酰壳聚糖质量浓度(A)、药物与载体的质量比例(B)和温度(C)3 种因素,每个因素选择 3 个水平;并以平均粒径、PDI、包封率、载药量为指标,由于平均粒径、PDI 越小越优,分别给 4 个指标 - 0.3、- 0.1、0.3、0.3 的权重,采用综合加权评分法<sup>[8,9]</sup>使用  $L_9(3^4)$  正交表(表 1)进行正交设计。综合评分公式:  $- 0.3 \times \text{平均粒径}/217.5 - 0.1 \times$

$\text{PDI}/1 + 0.3 \times \text{包封率}/58.37 + 0.3 \times \text{载药量}/9.94$ 。结果及方差分析见表 2 和 3。

表 1 因素水平

| Table 1 Factors and levels |      |      |       |
|----------------------------|------|------|-------|
| 水平                         | 因 素  |      |       |
|                            | A/ % | B/ % | C/ °C |
| 1                          | 1.0  | 10   | 30    |
| 2                          | 1.5  | 15   | 35    |
| 3                          | 2.0  | 20   | 40    |

表 2 正交设计与结果

| Table 2 Design and results of orthogonal test |       |       |       |          |       |        |        |         |
|-----------------------------------------------|-------|-------|-------|----------|-------|--------|--------|---------|
| 编号                                            | A     | B     | C     | 平均粒径/ nm | PDI   | 包封率/ % | 载药量/ % | 综合评分    |
| 1                                             | 1     | 10    | 30    | 155.1    | 0.117 | 28.49  | 2.77   | 0.004   |
| 2                                             | 1     | 15    | 35    | 195.5    | 0.315 | 37.96  | 5.39   | 0.057   |
| 3                                             | 1     | 20    | 40    | 209.9    | 0.367 | 28.70  | 5.43   | - 0.015 |
| 4                                             | 1.5   | 10    | 35    | 187.0    | 0.299 | 43.11  | 4.13   | 0.058   |
| 5                                             | 1.5   | 15    | 40    | 192.2    | 0.233 | 46.90  | 6.57   | 0.151   |
| 6                                             | 1.5   | 20    | 30    | 136.7    | 0.218 | 44.63  | 8.20   | 0.266   |
| 7                                             | 2     | 10    | 40    | 217.5    | 1.000 | 58.27  | 5.51   | 0.066   |
| 8                                             | 2     | 15    | 30    | 125.1    | 0.420 | 58.37  | 8.05   | 0.328   |
| 9                                             | 2     | 20    | 35    | 183.2    | 0.142 | 55.21  | 9.94   | 0.317   |
| $K_1$                                         | 0.015 | 0.043 | 0.199 |          |       |        |        |         |
| $K_2$                                         | 0.159 | 0.179 | 0.144 |          |       |        |        |         |
| $K_3$                                         | 0.237 | 0.190 | 0.067 |          |       |        |        |         |
| $R$                                           | 0.222 | 0.147 | 0.132 |          |       |        |        |         |

表 3 方差分析

| Table 3 Analysis of variance |        |     |       |       |            |
|------------------------------|--------|-----|-------|-------|------------|
| 方差来源                         | 离均差平方和 | 自由度 | 均方    | $F$ 值 | 显著性        |
| A                            | 0.076  | 2   | 0.038 | 38.0  | $P < 0.05$ |
| B                            | 0.040  | 2   | 0.020 | 20.0  | $P < 0.05$ |
| C                            | 0.020  | 2   | 0.010 | 13.5  |            |
| D(误差)                        | 0.002  | 2   | 0.001 | 1.0   |            |

$F_{0.05}(2,2) = 19.0 \quad F_{0.01}(2,2) = 99.0$

通过直观分析,因素对指标的影响大小:  $A > B > C$ ,最佳工艺为  $A_3B_3C_1$ ,即为 *N*-乳糖酰壳聚糖质量浓度 2%,药物与载体的质量比例 20%,温度 30 °C。方差分析表明:A、B 因素的差异有显著性意义( $P < 0.05$ )。

2.8 优化处方的验证:将 100 mg *N*-乳糖酰壳聚糖溶解于 0.2%醋酸水溶液中,制得 2% *N*-乳糖酰壳聚糖澄明溶液,再将 20 mg 去甲斑蝥素加入该溶液中溶解,在恒温 30 °C水浴、500 r/min 磁力搅拌下,将适量 1.2 mg/mL TPP 水溶液逐滴缓慢滴入其中,直至溶液刚刚产生乳光为止。用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得去甲斑蝥素 *N*-乳糖酰壳聚糖纳米粒

胶体。

按上述最优工艺制备 5 批去甲斑蝥素 *N*-乳糖酰壳聚糖纳米粒。纳米粒的粒径分布见图 4。纳米粒形态圆整,粒径分布均匀,平均粒径  $(118.7 \pm 8.84)$  nm, PDI  $(0.180 \pm 0.051)$ ,包封率  $(57.92 \pm 0.40)\%$ ,载药量  $(10.38 \pm 0.06)\%$ 。

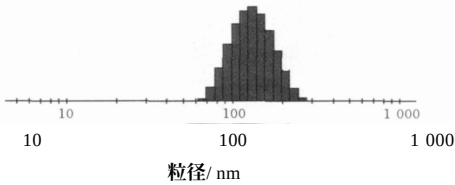


图 4 纳米粒粒径分布

Fig. 4 Distribution of particle size for nanoparticles

2.9 纳米粒的形态观察:取少量纳米粒胶体滴至铺有碳膜的铜网上,静置 5 min,用滤纸吸干,再滴加 2%磷钨酸负染 1 min,用滤纸吸干,于透射电子显微镜下观察纳米粒的形态。纳米粒的透射电镜照片见图 5,可见纳米粒形态圆整,粒径分布均匀,且与激光粒度分析仪的结果相近。

2.10 纳米粒的体外释放特性:取纳米粒胶体 10

mL 置透析袋中,用透析袋夹夹紧,投入装有 60 mL 释放介质的三角瓶中。将其放入恒温振荡箱中于  $(37 \pm 0.5)^\circ\text{C}$  恒温振荡,分别于不同时间取透析液 0.5 mL,过 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜,并补充同温释放介质 0.5 mL。将各个时间点的样品 20  $\mu\text{L}$  注入色谱仪, HPLC 法测定去甲斑蝥素的质量浓度,并计算累积药物释放率。采用 0.1 mol/L HCl、生理盐水 (0.9% NaCl)、PBS (pH 5.3)、PBS (pH 6.8)、PBS (pH 7.4) 作为释放介质,并用原料药的释放作为对照。

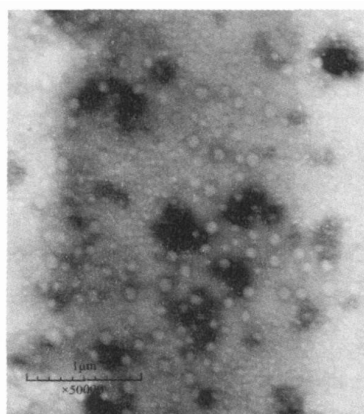


图 5 纳米粒的透射电镜照片

Fig. 5 TEM Photograph of nanoparticles

图 6 可以看出,纳米粒与原料药释放的对比,前者具有明显的缓释作用。纳米粒在 0.1 mol/L HCl 中可以完全释放,在生理盐水和 PBS (pH 5.3) 中可在 85% 附近达到平衡。而纳米粒在 PBS (pH 6.8)、PBS (pH 7.4) 两种释放介质中释放较缓慢,且在 60% 附近达到平衡。因而推断 pH 值对纳米粒的释放有影响, pH 值越低越有利于纳米粒的释放。将纳米粒在各个释放介质中的释放行为用 Higuchi 方程拟合 (表 4), 结果表明纳米粒在不同 pH 介质中的释放均符合 Higuchi 方程。

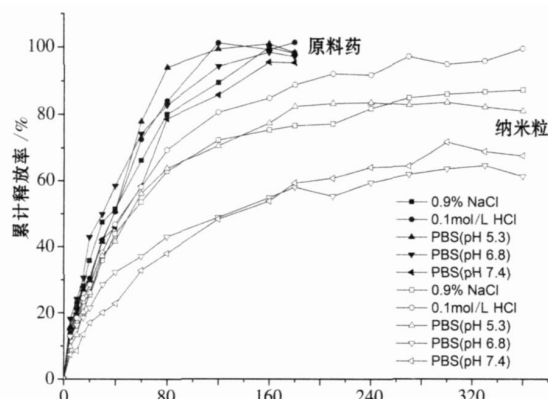


图 6 纳米粒的体外释放

Fig. 6 In vitro release of nanoparticles

表 4 纳米粒释放遵循的 Higuchi 方程

Table 4 Higuchi equation in vitro release of nanoparticles followed

| 释放介质          | Higuchi 方程                    | r      |
|---------------|-------------------------------|--------|
| 生理盐水          | $Q = 0.0729 t^{1/2} - 0.0456$ | 0.9904 |
| 0.1 mol/L HCl | $Q = 0.0820 t^{1/2} - 0.0655$ | 0.9947 |
| PBS (pH 5.3)  | $Q = 0.0854 t^{1/2} - 0.1154$ | 0.9927 |
| PBS (pH 6.8)  | $Q = 0.0410 t^{1/2} + 0.0425$ | 0.9916 |
| PBS (pH 7.4)  | $Q = 0.0456 t^{1/2} - 0.0394$ | 0.9938 |

### 3 讨论

壳聚糖的酰化反应一般在氨基上进行,早期的酰化反应是在酸酐或酰氯中进行的,存在着聚合物降解严重的缺点。乳糖酸无法直接与壳聚糖反应,只能借助于活化剂生成活性中间体再与壳聚糖反应。本法为碳二亚胺缩合法,已广泛用于多肽合成领域<sup>[10]</sup>。常用的碳二亚胺为 DCC,由于 DCC 水溶性不佳,而壳聚糖和乳糖酸皆为水溶性,故采用水溶性缩合剂 EDC · HCl。NHS 又简称 HOSu,它的作用在于保护活性中间体 O-酰基异脲,抑制其向副产物 N-酰基脲的转化;同时抑制最终产物的消旋化。TEMED 作用主要在于调节缓冲反应体系的 pH 值,以及与稀盐酸形成混合溶剂,有利于反应体系中各物质的结合和反应。

壳聚糖 (CS) 只溶于酸性水中,形成  $\text{CS-NH}_3^+$ ,但其乳糖酰化反应是壳聚糖原型  $\text{CS-NH}_2$  与活性中间体 O-酰基异脲反应,而壳聚糖原型在偏中性环境下才大量存在。但在碱性环境下中间体 O-酰基异脲容易转化为副产物 N-酰基脲,文献报道此反应在弱酸性环境 pH 4.7 合适<sup>[11,12]</sup>。故将反应体系的 pH 值定为弱酸性的 5 左右。

文献报道 pH 值对壳聚糖纳米粒包封率影响较大, pH 值越大有利于提高纳米粒的包封率, pH 值为 5 时包封率最大<sup>[13]</sup>。本研究尝试在 0.2% 醋酸溶液 (pH 4) 的基础上用 NaOH 调 pH 值为 5 时,包封率却略有下降。故仍然采用 0.2% 醋酸溶液作为制备液。提高制备液 pH 值,可以提高去甲斑蝥酸根阴离子的数目。但由于 pH 值增大后, N-乳糖酰壳聚糖中  $\text{NH}_3^+$  数目降低,更多以  $\text{NH}_2$  原型存在。因而,这种由 N-乳糖酰壳聚糖和去甲斑蝥素本身的性质造成的 pH 值矛盾制约了纳米粒包封率的进一步提高,致使以通过改变 pH 值达到提高包封率的期望受到限制。

本实验通过条件优化所制备的去甲斑蝥素 N-

乳糖酰壳聚糖纳米粒形态圆整,粒径较小,分布均匀,包封率稳定,载药量较高。有关半乳糖修饰纳米粒的主动靶向特性尚需进一步考察。

#### 参考文献:

- [1] Stewart S G, Hill T A, Gilbert J, *et al.* Synthesis and biological evaluation of norcantharidin analogues: towards PP1 selectivity [J]. *Bioorg Med Chem*, 2007, 15(23):7301-7310.
- [2] 魏春敏,王本杰,马 娅,等.  $^3\text{H}$ -去甲斑蝥素小鼠体内药代动力学与组织分布[J]. *药学报*, 2007, 42(5):516-519.
- [3] Lim S T, Mrtin G P, Berry D J, *et al.* Preparation and evaluation of the *in vitro* drug release properties and mucoadhesion of novel microspheres of hyaluronic acid and chitosan [J]. *J Controlled Release*, 2000, 66(2-3):281-292.
- [4] Chung T W, Yang J, Akaike T, *et al.* Preparation of alginate/galactosylated chitosan scaffold for hepatocyte attachment [J]. *Biomaterials*, 2002, 23(14):2827-2834.
- [5] 王银松,韩月莲,李英霞,等. 甲氨喋呤-乳糖酰基壳聚糖的制备及其体外实验[J]. *高等学校化学学报*, 2007, 28(6):1092-1097.
- [6] 蒋挺大. 壳聚糖[M]. 第2版. 北京:化学工业出版社,2006.
- [7] 王 钦,成 艳,张 玮,等. 去甲斑蝥素壳聚糖微球的制备及其体外释放特性[J]. *中国新药杂志*, 2008, 17(11):947-951.
- [8] 许 卉,王峰涛,刘生生,等. 多指标综合评分法优选木香挥发油提取工艺[J]. *中国药学杂志*, 2006, 41(16):1214-1216.
- [9] 李群力. 双黄连滴丸制备工艺的研究[J]. *中草药*, 2005, 36(4):537-539.
- [10] Ishii A, Hojo H, Nakahara Y, *et al.* Silyl linker-based approach to the solid-phase synthesis of Fmoc glycopeptides thioesters [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2002, 66(2):225-232.
- [11] Park I K, Ihm J E, Park Y H, *et al.* Galactosylated chitosan (GC)-graft-poly(vinyl pyrrolidone) (PVP) as hepatocyte-targeting DNA carrier Preparation and physicochemical characterization of GC-graft-PVP/DNA complex [J]. *J Controlled Release*, 2003, 86(2-3):349-359.
- [12] Park I K, Yang J, Jeong H J, *et al.* Galactosylated chitosan as a synthetic extracellular matrix for hepatocytes attachment [J]. *Biomaterials*, 2003, 24(13):2331-2337.
- [13] 何 文,匡长春,张 洪,等. 壳聚糖的分子参数对载药壳聚糖纳米粒体外性质的影响研究[J]. *中国药学杂志*, 2005, 40(6):428-453.

## 均匀设计优选舒胸片处方药材的微波辅助提取工艺的研究

张 萍,廖正根,梁新丽,赵国巍

(江西中医学院 现代中药制剂教育部重点实验室,江西 南昌 330004)

**摘 要:**目的 研究微波辅助提取舒胸片中阿魏酸和羟基红花黄色素 A 的优化工艺,并与传统工艺进行比较,确定微波用于舒胸片中川芎、红花辅助提取工艺的可行性。方法 以阿魏酸、羟基红花黄色素 A 的提取率为指标,采用均匀设计优选微波辅助提取工艺,比较微波辅助与传统提取工艺的提取效果。结果 微波功率、微波辐射时间、溶剂用量对阿魏酸和羟基红花黄色素 A 的提取有交互作用,优选出的川芎提取工艺为微波功率 790 W,提取时间 30 min,料液比为 1:24;红花提取工艺为微波功率 790 W,提取时间 24 min,料液比为 1:22。结论 微波辅助提取时间短、有效成分提取率高,可用于舒胸片的提取工艺。

**关键词:**舒胸片;均匀设计;微波辅助提取

中图分类号:R284.1; R286.02

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)01-0045-05

### Microwave-assisted extraction of Shuxiong Tablets prescription by uniform design

ZHANG Ping, LIAO Zheng-gen, LIANG Xin-li, ZHAO Guo-wei

(Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education,

Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

**Abstract : Objective** To optimize the feasible technique on extracting ferulic acid and hydrosafflower yellow A from Shuxiong Tablets by microwave-assisted extraction and compare the extract yield with the conventional extraction. **Methods** Taking the extract yield of ferulic acid and hydrosafflower yellow A as indexes, microwave-assisted extraction of Shuxiong Tablets was investigated by uniform design. **Results** Some parameters, such as the microwave power, radiation time, and solvent consumption had the interactions on the extraction of ferulic acid and hydrosafflower yellow A, the optimal technique parameters of extracting chuanxiong and safflower were 790 W as the microwave power, 30 and 24 min as the extracting time, 1:24 and 1:22 as the ratios of raw material to solvent, respectively. **Conclusion** The microwave

①收稿日期:2008-04-25

基金项目:国家“十一五”科技支撑计划资助项目(2006BAI09B07-05)

作者简介:张 萍(1983—),女,江西省人,在读硕士研究生,主要从事中药新剂型与新技术。

Tel: (0791) 7119190 E-mail: dolphin\_717@sohu.com

\*通讯作者 廖正根 Tel: (0791) 7119011 E-mail: lyzlyg@163.com