

甘草次酸修饰的壳寡糖-硬脂酸药物载体的合成及其胶束性质研究

韩晓燕¹, 张毅², 赵培莉², 谢春娴¹, 齐学洁¹, 张师愚¹

1. 天津中医药大学中药学院 天津市中药化学与分析重点实验室, 天津 300193

2. 天津中医药大学 实验教学部, 天津 300193

摘要: **目的** 制备壳寡糖-硬脂酸(COS-SA)及具有肝靶向性的甘草次酸-壳寡糖-硬脂酸(GA-COS-SA)药物载体, 并研究其形成胶束的理化性质。**方法** 采用碳二亚胺作为偶联剂, 使硬脂酸、甘草次酸先后与壳寡糖中氨基发生取代反应, 制得两种壳寡糖嫁接聚合物。采用超声方法制备二者的胶束溶液, 染料增溶法测定二者的临界胶束浓度(CMC), 激光光散射仪测定胶束的粒径, 透射电镜观察胶束的形态。**结果** 成功制得两种壳寡糖聚合物, 所形成的胶束具有较低的 CMC, 胶束粒子呈较规则的球形, 粒径分别为 250、228 nm, 且随疏水链段取代度增加, 粒径变小, CMC 降低。**结论** 胶束具有较好的物理化学性质, 是具有发展前景的药物载体。

关键词: 肝靶向; 甘草次酸; 壳寡糖-硬脂酸; 聚合物胶束; 药物载体

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)03-0505-05

Synthesis of glycyrrhetic acid-modified chitosan oligosaccharide-stearic acid drug carrier and its micellar properties

HAN Xiao-yan¹, ZHANG Yi², ZHAO Pei-li², XIE Chun-xian¹, QI Xue-jie¹, ZHANG Shi-yu¹

1. Tianjin Key Laboratory of Chemistry and Analysis of Chinese Materia Medica, College of Chinese Materia Medica, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Department of Experimental Teaching, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Key words: liver-targeting; glycyrrhetic acid (GA); chitosan oligosaccharide-stearic acid (COS-SA); polymeric micelle; drug carrier

肝靶向给药系统^[1]是药剂学研究领域的热点之一, 可将药物有效地输送至肝脏的病变部位, 提高药物的治疗效果, 减轻对其他脏器的损害, 减少用药剂量和给药次数。甘草有效成分甘草次酸(GA)具有良好的保肝、解毒及一定的抗癌作用, 并能促进癌细胞凋亡^[2-4], 同时它还具有较强的肝分布特征和肝细胞靶向性^[5]。1991年, Negishi等^[6]证实了大鼠肝细胞膜上含有GA及甘草酸结合位点, 随后国内外的一些学者相应报道了以GA及其衍生物修饰的脂质体或血清蛋白可在肝脏富集^[7-9], 为肝靶向给药系统的研究带来了一片曙光。

聚合物胶束可克服小分子表面活性剂胶束稳定性差、临界胶束浓度高的缺点, 减少胶束在稀释时的重新解离与药物渗漏。此外, 表面胶束嫁接配体(如叶酸等)也可在肿瘤部位特异性地释放药物, 实

现主动靶向给药。壳聚糖是自然界唯一大量存在的高分子碱性氨基多糖, 来源广泛、价格低廉、性质稳定及具有生物相容性和生物可降解性, 其降解后产物壳寡糖(COS, 相对分子质量10 000~50 000)具有很好的水溶性及生理活性^[10-11]。

本实验制备了两亲性壳寡糖-硬脂酸(COS-SA)聚合物, 并采用具有肝靶向性的GA修饰COS-SA聚合物, 以制得肝靶向药物载体, 进一步考察肝靶向纳米胶束的制备条件及胶束化行为。

1 试剂与仪器

COS(济南海得贝生物工程有限公司); 碳二亚胺(上海吉尔化工有限公司); GA(西安富捷科技发展有限公司); 苏丹红 III(上海楚定分析仪器有限公司); 透析袋(天津市中奥天元科技发展有限公司, 相对分子质量3 500)。高效液相色谱(HPLC)

收稿日期: 2010-11-02

基金项目: 天津市高等学校科技发展基金计划项目(20090227)

作者简介: 韩晓燕(1976—), 女, 博士, 主要从事药物材料合成及其药剂学应用研究。Tel: 15022611743 E-mail: hanxiaoyan@tjutc.edu.cn

流动相为色谱纯试剂, 其他试剂均为分析纯。广角激光散射仪 (BI-200SM, Brookhaven, US); 红外光谱仪 (Bio-Rad FTS 135, Varian UNITY plus-400, US); 透射电镜 (TECHA 20, Philips, Co., Holland); 紫外光谱仪 (UV-2401, 日本岛津); UH-500A 型探头超声仪 (天津)。

2 方法

2.1 COS-SA 聚合物的制备

根据文献方法^[12], 以 COS 与长链硬脂酸 (SA) 为原料, 采用碳二亚胺 (EDC) 作为偶联剂, 使 SA 中的羧基与 COS 中 NH_2 基团发生反应, 制得两亲性的 COS-SA 聚合物。图 1 为 COS-SA 的合成路线图。具体步骤如下: 取 COS (相对分子质量 10 000) 100 mg, 溶于 20 mL 蒸馏水中; 另取一定量 SA, 溶于 10 mL 甲醇中, 80 °C 水浴条件下将两者混合, 加

入 10 mg EDC, 维持 250 r/min 搅拌 5 h 后停止加热, 待反应产物冷却后, 将其置于透析袋中 (相对分子质量 35 000), 用 10% 乙醇-水透析 48 h, 以除去副产物, 将透析液真空干燥, 得 COS-SA 聚合物固体粉末。其结构采用红外光谱进行表征, 氨基取代度 (substitution degree, SD) 采用电位滴定法测定。具体方法如下: 将 0.2 g COS 溶解在过量的 10 mL 的一定浓度的盐酸溶液中充分反应, 然后采用 0.01 mol/L NaOH 电位滴定法^[13]进行返滴定。绘制滴定曲线计算氨基量 ($\text{NH}_2\%_{\text{COS}}$)。COS-SA 复合物的氨基量 ($\text{NH}_2\%_{\text{COS-SA}}$) 测定, 操作同上。采用下式计算氨基 SD。

$$\text{SD} = \frac{\text{NH}_2\%_{\text{COS}} - \text{NH}_2\%_{\text{COS-SA}}}{\text{NH}_2\%_{\text{COS}}}$$

2.2 COS-SA 复合物与靶向分子的共价连接

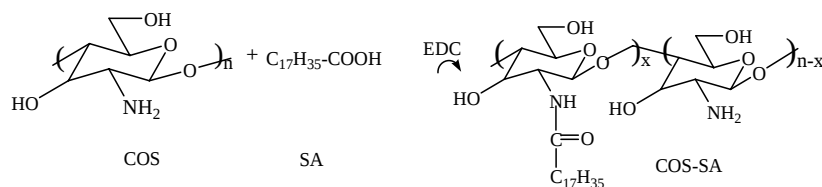


图 1 COS-SA 的合成路线

Fig. 1 Synthesis route of COS-SA

利用 COS-SA 聚合物中剩余的氨基与 GA 中的羧基继续发生偶联反应。图 2 为甘草次酸-壳聚糖-硬脂酸 (GA-COS-SA) 的合成路线图。按照文献步骤^[14], 但后处理方法不同, 将 1 g GA 溶于 50 mL N,N' -二甲基甲酰胺 (DMF), 与 COS-SA 的水溶液混合并搅拌均匀, 在 70 °C 下, 向混合液中缓慢滴加 EDC 水溶液, GA 与 EDC 摩尔比为 0.15 : 1, 反应 24 h 后冷却至室温, 后用蒸馏水及 10% 乙醇溶液分别透析 24 h, 以除去未反应的 EDC 和 GA, 透析液真空干燥, 得 GA-COS-SA 聚合物。产品结构采用

红外光谱表征; 进一步采用 NaOH 电位滴定法测定 GA-COS-SA 聚合物的氨基量, 方法同 “2.1” 项。采用下式计算 GA-COS-SA 聚合物氨基 SD:

$$\text{SD} = \frac{\text{NH}_2\%_{\text{COS-SA}} - \text{NH}_2\%_{\text{GA-COS-SA}}}{\text{NH}_2\%_{\text{COS-SA}}}$$

2.3 胶束的制备及性质表征

采用直接溶解再超声的方法制备 2 种 COS 聚合物的胶束溶液, 备用。

2.3.1 临界胶束浓度 (CMC) 测定 采用染料增溶的方法^[15]来表征两种 COS 聚合物在水溶液中的自

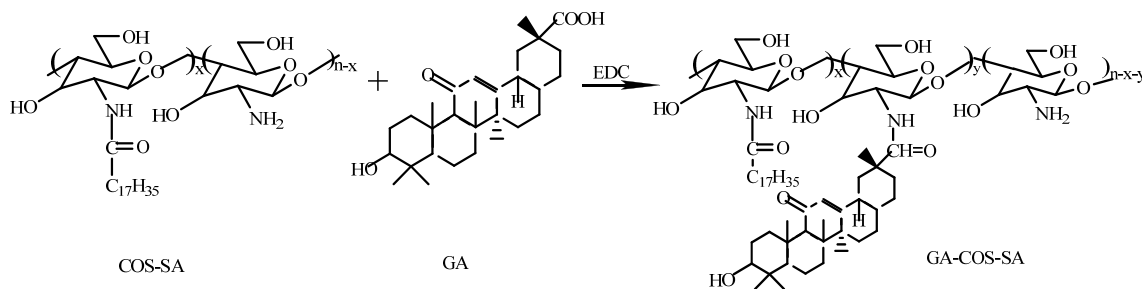


图 2 GA-COS-SA 聚合物的合成路线

Fig. 2 Synthesis route of GA-COS-SA polymer

聚集行为。分别配制成 0.01、0.02、0.04、0.06、0.08、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1 mg/mL 的不同质量浓度两种 COS 聚合物水溶液，加入适量苏丹红 III，室温震荡 2 d，溶液经 0.45 μm 滤膜滤过除去不溶的苏丹红 III。紫外光谱仪在 519 nm 处测定溶液的吸光度。分别绘制不同溶液吸光度与对应质量浓度的对数值的变化曲线，曲线拐点处对应的质量浓度即为 CMC。

2.3.2 胶束粒径测定 分别取 10 mg COS-SA 与 GA-COS-SA，精密称定，置 100 mL 烧杯中，加入 5 mL 去离子水分散，探头超声 20 次（400 W，工作 2 s 停 3 s），转移至容量瓶，并加去离子水定容至 10 mL，得到 2 种质量浓度为 1.0 mg/mL 的聚合物溶液。各取适量，用动态光散射技术测定胶束的流体力学直径和直径分布，测定前用 0.45 μm 滤膜滤过除杂。

2.3.3 胶束形态观察 取在蒸馏水中制备得到的纳米胶束，加蒸馏水稀释 10 倍，滴加于覆盖碳膜的铜网上，2%磷钨酸钠负染样品后，用透射电镜观察其形态和大小。

2.3.4 胶束的稳定性 将胶束溶液过 0.45 μm 微孔滤膜。取 2 mL 滤液加入到光学试剂瓶中，室温下保存，每间隔一段时间观察。

3 结果

3.1 COS-SA 与 COS-SA-GA 聚合物氨基 SD 测定

采用 NaOH 电位滴定法测定氨基量，原始 COS 中氨基量为 69.5%，取代物 COS-SA 聚合物中氨基最低量为 42.1%，GA 进一步修饰后 COS 聚合物中氨基量最低为 35.3%，由此可计算出 COS-SA 与 GA-COS-SA 聚合物的最大氨基 SD 分别为 0.39 和 0.162。即每 100 个糖单元上有 39 个 SA，每 100 个糖单元上有 16.2 个 GA。不同取代物中氨基量与 SD 的关系见表 1。

表 1 COS-SA 与 GA-COS-SA 聚合物的性质

Table 1 Properties of COS-SA and GA-COS-SA polymers

样 品	氨基量/ %	取代度 SD ^a	糖单元/ SA	糖单元/ GA
COS-SA1	42.1	0.39	100/39	—
COS-SA2	51.4	0.26	100/26	—
GA-COS-SA1	35.3	0.162	100/39	100/16.2
GA-COS-SA2	50.8	0.105	100/26	100/10.5

COS-SA 取代度：为每 100 个糖单元所含 SA 的数目

GA-COS-SA 取代度：为 COS-SA 中每 100 个糖单元所含 GA 的数目

Substitution degree of CSO-SA was defined as the number of SA per hundred glucose units, and substitution degree of GA-CSO-SA was defined as the number of GA per hundred glucose units

随着 SA 和 GA 投料量增加，两种聚合物的氨基 SD 也逐渐增大。当一定量取代物嫁接到 COS 上后，可能由于空间位阻的原因，聚合物的氨基 SD 难以继续提高。随后的测试中均采用氨基 SD 最大的聚合物来进行。

3.2 COS-SA 与 GA-COS-SA 聚合物的红外表征

COS-SA 聚合物红外光谱见图 3-B。将该聚合物图谱与原始 COS 图谱图 3-A 进行比较，在 1 640、1 519 cm^{-1} 左右有酰胺峰，即由 COS 中的氨基与 SA 中的羧基形成的酰胺键。与 COS-SA 谱图相比，在 GA-COS-SA 的红外图谱图 3-C 中在 1 656 cm^{-1} 酰胺吸收峰明显加强，且在 1 690 cm^{-1} 处出现了羰基吸收峰，为糖链上引入的 GA 分子结构中双键共轭的羰基吸收峰。说明在 COS 氨基上进一步发生了取代反应，证明 COS 氨基上已经连接了 GA 基团。

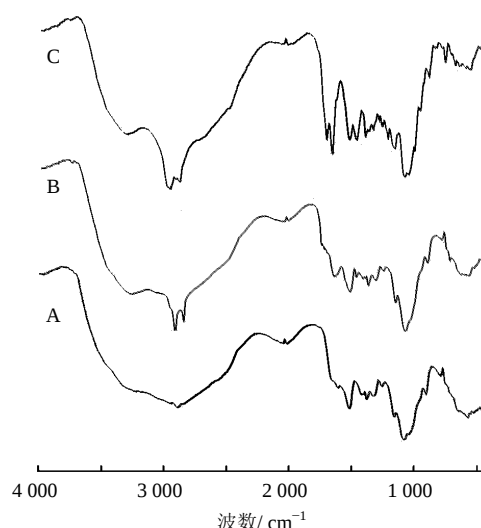


图 3 COS (A)、COS-SA (B)、GA-COS-SA (C) 的红外光谱图

Fig. 3 FT-IR spectra of original COS (A), COS-SA (B), and GA-COS-SA (C)

3.3 胶束溶液的 CMC 测定

从图 4 中可以得出 COS-SA 与 GA-COS-SA 聚合物胶束的 CMC 分别为 0.1 和 0.08 g/L，与多数聚合物胶束的 CMC 值接近。而常用的表面活性剂，如十二烷基硫酸钠的 CMC 在 2 g/L 左右。COS-SA 及 GA-COS-SA 聚合物胶束的临界聚集质量浓度较低，可保证在大比例稀释时不解聚，保持胶束在体液中稳定，为 COS-SA 及 GA-COS-SA 胶束作为药物载体提供了可能。

3.4 胶束的粒径和粒径分布

动态光散射测定结果显示 COS-SA 与 GA-COS-

SA 纳米胶束的平均水合粒径分别为 250、228 nm (图 5), 且均具有良好的分散性。

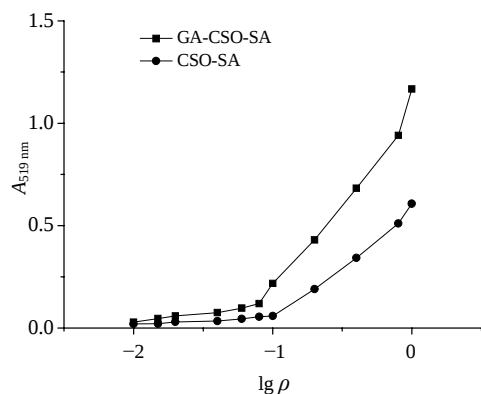


图 4 COS-SA 和 GA-COS-SA 吸光度随质量浓度对数值的变化曲线

Fig. 4 Absorbance curves of COS-SA and GA-COS-SA micelle solution at different concentrations

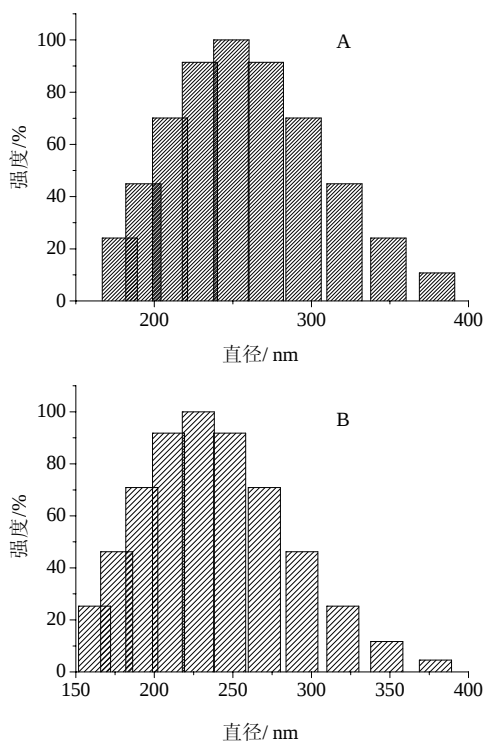


图 5 COS-SA (A) 及 GA-COS-SA (B) 胶束的动态光散射粒径图

Fig. 5 Sizes of dynamic light scattering for COS-SA (A) and GA-COS-SA (B) micelle

3.5 GA-COS-SA 聚合物胶束的形态

本实验制备的 COS-SA、GA-COS-SA 胶束为淡黄色溶液。从图 6 可看出纳米胶束为类圆形的球体, 粒径分别为 150、135 nm, 分布较均匀。电镜照片的结果较动态光散射仪测得粒径小, 可能是因为电

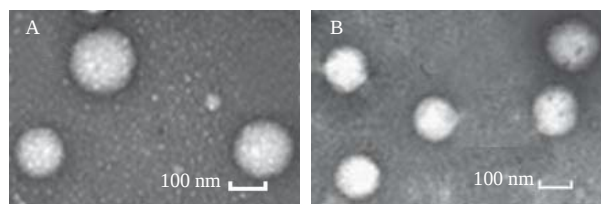


图 6 COS-SA (A) 及 GA-COS-SA (B) 聚合物的透射电镜照片

Fig. 6 TEM images of COS-SA (A) and GA-COS-SA (B) polymers

镜实验下水被蒸发, 胶束呈干态, 没有水合层, 故粒径变小。

3.6 GA-COS-SA 纳米胶束的稳定性

将过膜后的 COS-SA 及 GA-COS-SA 胶束溶液于室温下放置, 测定其稳定性。光散射研究发现过膜后的纳米胶束液可以稳定放置 6 个月而未发生明显变化。

4 讨论

在聚合物的合成反应中, EDC 将 SA 和 GA 共价结合到 COS 的氨基上, 即 COS 中有一定数目氨基的 H 原子分别被 SA 和 GA 所取代。通过测定 COS 分子取代前后的自由氨基数即可换算得到嫁接聚合物的氨基 SD (每 100 个糖环单元修饰 GA 的个数)。具体合成过程中可通过控制反应物之间比例及反应时间来制得不同氨基 SD 的嫁接聚合物。

聚合物的 CMC 是指聚合物分子在特定溶液中形成胶束时所需的最低聚合物质量浓度。测定方法有多种, 常用荧光法可用于考察两亲性聚合物在水性介质中的聚集情况, 本实验采用染料增溶法来测定两种聚合物的 CMC。结果表明, CMC 随着氨基 SD 的增大而降低。COS-SA 中的 SA 疏水链在水性介质中自聚集形成疏水性内核, 而亲水性的 COS 链插入水相中形成外壳。聚合物的氨基 SD 增大, 即 SA 疏水链增加, 从而使分子间的疏水作用增强。所以, 随着氨基 SD 的增大, 聚合物更容易形成胶束。当聚合物的质量浓度大于 CMC 值时, 在水中自聚集形成胶束。

研究结果显示, 经 GA 修饰的 COS-SA 聚合物 CMC 进一步下降, 这是因为疏水性的 GA 分子通过与 COS-SA 亲水性糖链上的游离氨基发生化学反应, 进一步增加了 COS-SA 本身的氨基 SD, 使 COS 的疏水性修饰进一步提高, 从而增加了其在水性环境中的自聚能力。动态光散射和透射电镜检测结果

显示,疏水性小分子 GA 的进一步修饰使聚合物胶束粒径减小。

本实验成功制备了一种连有肝靶向性分子 GA 修饰的 COS-SA 聚合物,该药物载体具有良好的应用前景。本课题组将进一步考察 GA-COS-SA 胶束的载药及靶向性能。

参考文献

- [1] Brannon-Peppas L, Blanchette J O. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy [J]. *Adv Drug Deliver Rev*, 2004, 56(11): 1649-1659.
- [2] 左 风. 甘草甜素及其非对应体对人体肿瘤细胞生长的抑制作用 [J]. 国外医学: 中医中药分册, 1999, 21(5): 40-43.
- [3] 黄 炜, 黄济群, 张东方, 等. 全反式维甲酸, 18 β -甘草次酸和甘草酸诱导人癌细胞分化和凋亡的研究 [J]. 中西医结合肝病杂志, 2003, 13(3): 148-150.
- [4] Luo H L, Huang W, Zhang Z L, *et al.* 18 β -Glycyrrhetic acid-induced apoptosis and relation with intracellular Ca²⁺ release in human breast carcinoma cells [J]. *J Clin Oncol*, 2004, 3(3): 137-140.
- [5] 范 益, 丁建花, 刘苏怡, 等. α -和 β -甘草酸在小鼠体内分布的研究 [J]. 中国临床药理学与治疗, 2004, 9(6): 619-622.
- [6] Negishi M, Irie A, Nagata N, *et al.* Specific binding of glycyrrhetic acid to the rat liver membrane [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1991, 1066(1): 77-82.
- [7] Osaka S, Tsuji H, Kiwada H, Uptake of liposomes surface-modified with glycyrrhizin by primary cultures rat hepatocytes [J]. *Biol Pharm Bull*, 1994, 17(7): 940-943.
- [8] 吴 超, 郭伟英. 甘草次酸衍生物修饰去甲斑蝥素脂质体在小鼠体内肝靶向性研究 [J]. 辽宁医学院学报, 2008, 29(6): 490-492.
- [9] 张其胜, Luk J M, 张 健, 等. 甘草次酸靶向肝星状细胞治疗肝纤维化的体内研究 [J]. 中华肝脏病杂志, 2005, 13(9): 664-667.
- [10] Kumar M N, Muzzarelli R A, Muzzarelli C, *et al.* Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives [J]. *Chem Rev*, 2004, 104(12): 6017-6084.
- [11] 万丽卿, 胡富强, 袁 弘. A549 细胞对壳寡糖及其纳米粒的摄取作用 [J]. 药科学报, 2004, 39(3): 227-230.
- [12] 李樱红, 胡富强, 袁 弘. 壳寡糖硬脂酸接枝物纳米粒的制备及其体外释放 [J]. 中国药理学杂志, 2005, 40(14): 1083-1086.
- [13] 贾之慎, 李秀玲. 酸碱电导滴定法测定壳聚糖脱乙酰度 [J]. 分析化学, 2002, 30(7): 846-848.
- [14] 张闯年, 王 蔚, 王春红, 等. 肝靶向海藻酸钠载药纳米粒的细胞毒性研究 [J]. 中国科学 B: 化学, 2009, 39(9): 943-949.
- [15] Silva M, Ferreira E I, Leite C Q, *et al.* Preparation of polymeric micelles for use as carriers of tuberculostatic drugs tropical [J]. *J Pharm Res*, 2007, 6(4): 815-824.