

• 药剂与工艺 •

壳聚糖修饰雷公藤多苷纳米粒的制备及其体外释药研究

魏颖慧¹, 赵燕敏¹, 李静^{1,2}, 徐小玉¹, 郭曼曼¹, 李范珠¹

1. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053

2. 贵州大学, 贵州 贵阳 550025

摘要: 目的 制备壳聚糖修饰雷公藤多苷纳米粒 (LMWC-TG-NPs), 并研究其体外释药行为。方法 采用改良的自乳化溶剂扩散法制备 LMWC-TG-NPs; 正交试验设计优化雷公藤多苷纳米粒 (TG-NPs) 处方, 单因素试验考察壳聚糖 (LMWC) 修饰方式; 以含 20%乙醇的 PBS (pH 7.4) 为释放介质考察 LMWC-TG-NPs 的体外释药行为。结果 优化的处方工艺: 以 1.0% Poloxamer 188、80 mg PLA、12 mL 有机相、丙酮-乙醇 (2:3) 制备 TG-NPs 混悬液, 以与 TG-NPs 混悬液等体积的 10% LMWC 溶液修饰 TG-NPs 制备 LMWC-TG-NPs; 根据优化条件制备的 LMWC-TG-NPs, 外观呈圆形或类圆形, 平均粒径为 (207.6±3.4) nm, 多分散指数 (PDI) 为 0.078±0.009 (n=3), 包封率和载药量分别为 (61.83±2.43)%、(10.70±0.37)% (n=3); 体外释药符合 Higuchi 方程。结论 所制备的 LMWC-TG-NPs 包封率较高, 粒径小, 体外释药具有明显的缓释特征, 为后期研究其肾脏靶向和毒性奠定了基础。

关键词: 雷公藤多苷; 壳聚糖修饰; 纳米粒; 正交试验设计; 体外释药; 自乳化溶剂扩散法

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)05-0541-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.05.008

Preparation and *in vitro* release of tripterygium glycosides-loaded nanoparticles modified by chitosan

WEI Ying-hui¹, ZHAO Yan-min¹, LI Jing^{1,2}, XU Xiao-yu¹, GUO Man-man¹, LI Fan-zhu¹

1. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

2. Guizhou University, Guiyang 550025, China

Abstract: Objective To prepare tripterygium glycosides-loaded nanoparticles modified by 50% *N*-acetylated low molecular weight chitosan (LMWC-TG-NPs) and to investigate their *in vitro* release behavior. **Methods** The LMWC-TG-NPs were prepared by modified self-emulsifying solvent diffusion method; The formulation of TG-NPs was optimized by orthogonal design and the modified condition of LMWC was determined based on the single factor analysis. The *in vitro* drug release of LMWC-TG-NPs was characterized with PBS (pH 7.4) containing 20% ethanol. **Results** The optimized formulation of TG-NPs was as follows: Poloxamer 188 (1.0%), PLA (80 mg), organic phase (12 mL), and acetone-ethanol (2:3) were used to prepare TG-NPs suspension. The LMWC-TG-NPs were prepared by incubating TG-NPs suspension with 10% LMWC solution at the ratio of 1:1. The shape of the prepared LMWC-TG-NPs was spherical. The mean particle size, polydispersity index, entrapment efficiency, and drug loading were (207.6±3.4) nm, 0.078±0.009, (61.83±2.43)%, and (10.70±0.37)% (n=3), respectively. The *in vitro* release characteristics of LMWC-TG-NPs conform to Higuchi equation in PBS buffer composed of 20% ethanol at pH 7.4. **Conclusion** The prepared LMWC-TG-NPs show a sustained-release characteristics with well-distributed particle size as well as high entrapment efficiency and drug loading, which could lay the foundation for the research on kidney targeting and toxicity.

Key words: tripterygium glycosides; chitosan-modified; nanoparticles; orthogonal design; *in vitro* release; self-emulsifying solvent diffusion method

收稿日期: 2012-08-31

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30902007); 浙江省重点科技创新团队资助项目 (2012R10044-05)

作者简介: 魏颖慧 (1976—), 女, 河北省石家庄人, 副教授, 研究方向为药物新剂型与新技术。

Tel: 13335711581 (0571)86633173 Fax: (0571)86633030 E-mail: weiyinghui@163.com

网络出版时间: 2013-01-09 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20130109.1528.007.html>

雷公藤多苷 (tripterygium glycosides, TG) 系由卫矛科 (Celastraceae) 雷公藤属 *Tripterygium* Hook. f. 植物雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f. 根中提取的总苷, 由二萜内酯、生物碱、三萜等多种活性成分组成^[1], 具有抗炎、镇痛、抗肿瘤及免疫调节等作用, 临床常用于免疫调节、皮肤炎症、肾脏疾病及呼吸系统疾病的治疗^[2]。特别值得关注的是近年来凭借多组分协同作用的优势, TG 已成为临床治疗肾病综合症的有效药物^[3]。但长期应用 TG 亦可引起广泛、多系统器官的损害^[4], 如消化系统、造血系统、生殖系统、皮肤、心血管系统、神经系统, 甚至产生一定程度的肾脏毒性, 从而影响了用于肾脏疾病的治疗。

纳米粒作为药物输送载体具有诸多优势, 如可缓慢释放药物、靶向输送药物^[5-6]、减轻和避免毒副作用等。壳聚糖 (chitosan) 是纳米粒系统常用的一种载体材料^[7-9], 具有良好的生物相容性、生物可降解性、低免疫原性及无毒副作用等优点, 且有研究发现 50%乙酰度的低相对分子质量壳聚糖(LMWC) 具有较高的肾脏蓄积率和滞留性^[10-12]。但研究亦发现随着壳聚糖脱乙酰度及相对分子质量的降低, 将会导致纳米粒粒径增大, 包封率及载药量下降, 体外释药速率加快^[13]。因此, 考虑到肾脏靶向性和良好的药物释放控制两个方面, 本实验以聚乳酸 (polylactic acid, PLA) 为载体材料, LMWC 为修饰剂制备了 LMWC 修饰的 TG 纳米粒(LMWC-TG-NPs); 通过正交试验及单因素试验设计对方工艺进行了优化, 并对所制备 LMWC-TG-NPs 的体外释药行为进行了考察, 以期为 TG 肾脏靶向给药系统的研究奠定基础。

1 仪器与材料

HJ—6B 多头磁力加热搅拌机 (江苏金坛市金伟实验仪器厂); RE52CS 旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂); Labconco 冷冻干燥机 (美国 Labconco 公司); 马尔文粒度测定仪 (英国马尔文公司); Optima 超速低温离心机 (美国 Beckman 公司); Agilent1200 高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); CP225D 电子天平 (北京赛多利斯仪器系统有限公司); JEM—1200EX 透射电子显微镜 (日本 Jeol 公司); HZ—9212S 水浴恒温振荡器 (江苏太仓华利达实验设备公司); 透析袋 (上海绿鸟科技发展有限公司, 截留相对分子质量为 3 000)。

TG (上海诺特生物科技有限公司, 含雷公藤酯

甲为 0.56%, 批号 090320); 雷公藤酯甲对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号 111597-200503); PLA (批号 09111917, $M_w=10\ 000$, 山东岱罡生物科技有限公司); 50%脱乙酰度低相对分子质量壳聚糖 (批号 09071013, $M_r=19\ 000$, 南通绿神生物工程有限公司); Poloxamer 188 (批号 WPWA544C, 德国 BASF 公司); 乙腈 (HPLC 级, 美国 Honeywell Burdick & Jackson 公司); 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 LMWC-TG-NPs 的制备

2.1.1 雷公藤多苷纳米粒 (TG-NPs) 的制备 取处方量的 TG 和 PLA 溶于适当比例的丙酮-乙醇混合溶剂中, 构成有机相; 另取处方量的 Poloxamer 188 溶于适量水中, 构成水相; 在一定转速 (500 r/min) 搅拌下将有机相缓慢滴加至水相中, 滴毕, 继续搅拌 10 min, 40 °C 减压蒸去有机溶剂, 得到带有淡黄色乳光的 TG-NPs 混悬液。

2.1.2 LMWC-TG-NPs 的制备 取一定量 LMWC, 溶于 0.5% 醋酸水溶液中, 制得 10% LMWC 溶液。取与 TG-NPs 混悬液等体积的 10% LMWC 溶液, 持续搅拌下滴加至 TG-NPs 混悬液中, 充分搅拌, 37 °C 孵育 1 h, 得 LMWC-TG-NPs 混悬液。将纳米粒混悬液冷冻超速离心 (30 000 r/min) 30 min, 沉淀用蒸馏水洗涤 3 次, 经水分散并冻干后得 LMWC-TG-NPs 冻干粉。

2.2 LMWC-TG-NPs 中雷公藤酯甲的测定^[14]

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent Extend-C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水 (85:15); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 25 °C; 检测波长 210 nm; 进样量 20 μL。

2.2.2 线性关系考察 精密称取减压干燥至恒定质量的雷公藤酯甲对照品适量, 置 5 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 得质量浓度为 0.32 mg/mL 的雷公藤酯甲对照品储备液。分别精密量取储备液适量, 加流动相稀释为 0.32、1.60、3.20、6.40、12.80、25.60 μg/mL 的系列对照品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件测定, 以峰面积积分值 (Y) 对质量浓度 (X) 进行线性回归, 得回归方程 $Y=7.339\ 4X+4.764\ 6$, $r=0.999\ 8$, 表明雷公藤酯甲在 0.32~25.60 μg/mL 与峰面积呈良好的线性关系。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密吸取制备好的 LMWC-TG-NPs 混悬液 1 mL 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇适量, 超声, 并用甲醇稀释至刻度, 得破乳

LMWC-TG-NPs, 将其加至已处理好的含水分 3% 的中性氧化铝柱 (100~200 目, 5.0 g, 内径 1 cm, 湿法装柱) 上, 用丙酮 10 mL 洗脱, 收集洗脱液, 蒸干, 残渣用甲醇溶解, 转移至 1 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得供试品溶液。

2.2.4 精密度试验 取低、中、高 (1.60、6.40、25.60 $\mu\text{g/mL}$) 质量浓度的雷公藤酯甲对照品溶液, 分别于 1 d 内测定 5 次, 连续测定 5 d, 得日内 RSD 分别为 1.41%、1.36%、1.34%; 日间 RSD 分别为 1.29%、1.65%、1.62%。

2.2.5 回收率试验 按“2.1”项下方法操作, 不加 TG, 制备空白纳米粒混悬液, 吸取适量, 加入雷公藤酯甲储备液适量, 加甲醇稀释为低、中、高 (1.60、6.40、25.60 $\mu\text{g/mL}$) 3 个质量浓度的供试品溶液 (各质量浓度供试品溶液平行制备 3 份), 按“2.2.3”项下方法处理, 进样测定, 计算得雷公藤酯甲的平均回收率分别为 (99.25 \pm 1.70)%、(97.95 \pm 2.21)%、(95.59 \pm 1.29)%。

2.2.6 重复性试验 取同一批次制备的 LMWC-TG-NPs 混悬液 6 份, 精密吸取 1 mL 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 按“2.2.3”项下方法处理, 进样测定峰面积, 计算得雷公藤酯甲质量浓度的 RSD 为 1.90%。

2.2.7 稳定性试验 取同一供试品溶液于室温下放置, 分别于制备后 0、2、4、8、12 h 进样测定, 测得雷公藤酯甲峰面积的 RSD 为 1.57%。

2.3 包封率和载药量测定

精密量取 LMWC-TG-NPs 混悬液 1 mL, 加入具塞离心管中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 10 000 r/min 离心 30 min, 取上清液按“2.2.3”项下方法处理, 进样测定雷公藤酯甲的量, 记作 m_1 ; 另精密量取 LMWC-TG-NPs 混悬液 1 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 加入甲醇适量超声, 并稀释至刻度, 同上处理, 测定纳米粒中总的雷公藤酯甲的量, 记作 m_0 ; 分别计算包封率和载药量。

$$\text{包封率} = (m_0 - m_1) / m_0$$

$$\text{载药量} = (m_0 - m_1) / m_1$$

m_0 为纳米粒混悬液中总药物量, m_1 为纳米粒混悬液中游离药物量, m_1 为载药纳米粒的总质量

2.4 LMWC-TG-NPs 的处方工艺优化

预试验考察中发现壳聚糖的修饰会使纳米粒的粒径增大, 但对包封率和载药量几乎无影响, 因此为了用较少的试验得到最佳的试验结果, 本研究拟

首先采用正交试验设计对 TG-NPs 的处方进行优化, 再结合单因素考察试验结果, 确定壳聚糖的修饰条件, 进而确定 LMWC-TG-NPs 的最优处方工艺。

2.4.1 正交试验设计优化 TG-NPs 处方 本实验选择 Poloxamer 188 用量 (A)、PLA 用量 (B)、有机相体积 (C)、丙酮与乙醇的体积比 (D) 为考察因素, 每个因素选取 3 个水平 (因素水平表见表 1), 按 $L_9(3^4)$ 正交设计表进行试验, 以粒径 (y_1)、包封率 (y_2) 和载药量 (y_3) 为指标筛选最佳处方组成。采用综合加权评分法对正交试验结果进行综合分析, y_1 、 y_2 、 y_3 分别按 40%、30%、30% 的系数积分, 综合评分 (y) = $40 \times (1 - y_1/y_{1\max}) + 30 \times y_2/y_{2\max} + 30 \times y_3/y_{3\max}$ 。正交试验设计与结果见表 1。

采用直观分析法, 由表 1 中极差值可知在以粒径、包封率和载药量为考察指标的各因素中, 影响程度大小依次为 $A > C > D > B$, 即 Poloxamer 188 用量 > 有机相体积 > 丙酮与乙醇的体积比 > PLA 用量, 各因素最佳水平为 $A_2B_1C_1D_2$ 。由方差分析结果 (表 2) 可知, 因素 A、C 对粒径、包封率和载药量影响显著 ($P < 0.05$), 而因素 D 对其影响不显著。通过综合分析, 本试验选择最佳处方组成为 $A_2B_1C_1D_2$, 即 Poloxamer 188 用量为 1.0%, PLA 用量为 80 mg, 有机相体积为 12 mL, 丙酮与乙醇的体积比为 2:3。

2.4.2 单因素试验确定壳聚糖的修饰条件 以未修饰壳聚糖的 TP-NPs 为参照, 考察两种壳聚糖修饰方式 (同时修饰和后修饰) 对纳米粒粒径、Zeta 电位、包封率及载药量的影响。其中未修饰壳聚糖的 TP-NPs 的制备按“2.1.1”项下方法进行; 同时修饰即在“2.1.1”项下所述的水相中加入壳聚糖; 后修饰即按“2.1.2”项下方法。结果 (表 3) 发现, 未修饰壳聚糖的 TP-NPs 的 Zeta 电位为负值, 修饰后均转为正值, 且经壳聚糖修饰后粒径明显变大; 壳聚糖修饰对包封率及载药量几无影响。考虑到同时修饰方式可能会使纳米粒具有较高的突释效应^[15], 本实验采用后修饰的方式制备 LMWC-TP-NPs。

2.4.3 LMWC-TG-NPs 最佳处方工艺 按正交试验优化所得的 TG-NPs 最佳处方组成, 根据单因素试验所确定的壳聚糖修饰条件, 以 10% 壳聚糖为修饰剂, 确定 LMWC-TG-NPs 的最佳处方工艺, 即: 称取 10.0 mg TG 和 80 mg PLA 溶于 12 mL 混合溶剂 (丙酮与乙醇体积比为 2:3) 中, 构成有机相; 以 1.0% Poloxamer 188 为水相 (30 mL); 在一定转速

表1 L₉(3⁴) 正交试验设计方案和结果 (n=3)
Table 1 Results of L₉(3⁴) orthogonal design (n=3)

试验号	A / %	B / mg	C / mL	D	y ₁ / nm	y ₂ / %	y ₃ / %	y
1	0.5 (1)	80 (1)	12 (1)	1 : 1 (1)	184.7	74.07	12.16	52.86
2	0.5 (1)	100 (2)	15 (2)	2 : 3 (2)	164.1	78.53	9.14	52.93
3	0.5 (1)	120 (3)	18 (3)	3 : 2 (3)	134.7	56.93	5.94	44.58
4	1.0 (2)	80 (1)	15 (2)	3 : 2 (3)	158.6	66.89	13.48	58.43
5	1.0 (2)	100 (2)	18 (3)	1 : 1 (1)	128.0	59.54	7.12	49.41
6	1.0 (2)	120 (3)	12 (1)	2 : 3 (2)	156.1	60.00	14.85	59.12
7	1.5 (3)	80 (1)	18 (3)	2 : 3 (2)	149.0	52.52	7.64	43.22
8	1.5 (3)	100 (2)	12 (1)	3 : 2 (3)	165.3	67.86	9.42	49.15
9	1.5 (3)	120 (3)	15 (2)	1 : 1 (1)	124.5	52.74	7.29	47.91
K ₁	150.37	154.51	161.13	150.18				
K ₂	166.96	151.49	159.27	155.27				
K ₃	140.28	151.61	137.21	152.16				
R	26.68	3.02	23.92	5.09				

表2 方差分析

Table 2 Analysis of variance

方差来源	离差平方和	自由度	F 值	显著性
A	120.984	2	62.075	P<0.05
C	118.030	2	60.559	P<0.05
D	4.389	2	2.252	
B (误差)	1.949	2		

F_{0.05}(2, 2)=19.00 F_{0.01}(2, 2)=99.00

表3 壳聚糖修饰方式对纳米粒的影响 (n=3)

Table 3 Influence of chitosan-modified methods on nanoparticles (n=3)

修饰方式	粒径 / nm	Zeta 电位 / mV	包封率 / %	载药量 / %
未修饰壳聚糖	127.4±1.7	-22.6±0.29	63.08	10.60
同时修饰	183.9±1.2	9.65±0.34	66.20	9.90
后修饰	204.5±1.9	9.90±0.87	60.81	10.25

(500 r/min) 搅拌下将有机相缓慢滴加至水相中, 滴毕, 继续搅拌 10 min, 40 °C 减压蒸出有机溶剂, 得到带有淡黄色乳光的 TG-NPs 混悬液。取与上述混悬液等体积的 10% LMWC-0.5% 醋酸水溶液, 持续搅拌下滴加至 TG-NPs 混悬液中, 充分搅拌, 37 °C 孵育 1 h, 得 LMWC-TG-NPs 混悬液。将纳米粒混悬液冷冻超速离心 (30 000 r/min) 30 min, 沉淀用蒸馏水洗涤 3 次, 经水分散并冻干后得 LMWC-TG-NPs 冻干粉。

2.5 LMWC-TG-NPs 外观形态、粒径及其分布

吸取少量 LMWC-TG-NPs 胶态混悬液滴至铜网上, 静置 10 min 后用滤纸片吸干, 再滴加 2.0% 磷钨酸溶液于铜网上负染 3 min, 自然挥干, 用透射电子显微镜观察并摄制照片, 见图 1。由透射电镜照片可知, LMWC-TG-NPs 呈圆形或类圆形, 大小及分布较均匀, 粒子之间未见粘连和聚集现象。

取 LMWC-TG-NPs 混悬液用适量蒸馏水稀释后, 采用激光粒径测定仪测定平均粒径及粒径分布, 结果分别见表 4 和图 2。

2.6 验证试验

按“2.4.3”项下 LMWC-TG-NPs 最佳处方工艺, 制备了 3 批 LMWC-TG-NPs 混悬液, 分别测定其粒径、多分散指数 (polydispersity index, PDI)、包封率和载药量, 结果粒径、PDI、包封率和载药量分别

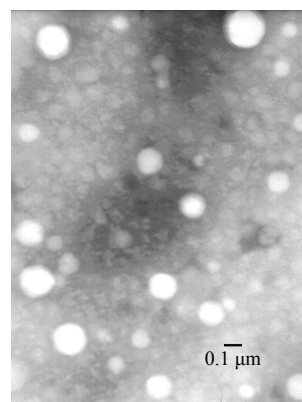


图1 LMWC-TG-NPs 透射电镜照片

Fig. 1 TEM photograph of LMWC-TG-NPs

表4 验证试验结果

批次	粒径 / nm	PDI	包封率 / %	载药量 / %
1	208.3	0.077	61.32	10.75
2	203.9	0.069	64.47	11.04
3	210.6	0.088	59.69	10.31

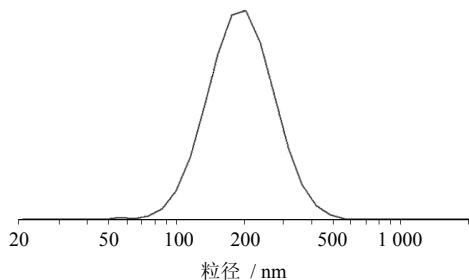


图2 LMWC-TG-NPs的粒径分布

Fig. 2 Particle size distribution of LMWC-TG-NPs

为 (207.6 ± 3.4) nm、 0.078 ± 0.009 、 (61.83 ± 2.43) %、 (10.70 ± 0.37) % ($n=3$)。

2.7 体外释药研究

分别精密称取 TG 原药粉末、LMWC-TG-NPs 干粉适量，分散于 2 mL 含 20%乙醇的 pH 7.4 PBS 中，装入预先处理好的透析袋中，密封后置于 50 mL 含 20%乙醇的 pH 7.4 PBS 中，于 (37 ± 0.5) °C 恒温水浴振荡 (75 r/min)，定时取样 1 mL，并立即补加等量同温释放介质，样品用 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过，取续滤液按“2.2.1”项下色谱条件测定，计算累积释药率 (Q)，绘制释药曲线，结果见图 3。

$$Q = (V_0 \times \rho_t + V \times \sum_{n=1}^{t-1} \rho_n) / w$$

ρ_t 为 t 时间点测得释放介质中的药物质量浓度 ($\mu\text{g/mL}$)， V 为每次取样体积 (mL)， V_0 为释放介质的总体积 (mL)， w 为纳米粒的载药量 (μg)， ρ_n 为各取样时间点的药物质量浓度 ($\mu\text{g/mL}$)

由图 3 可知，TG 原药在释放介质中释放很快，1.5 h 累积释药率达到 60.0%，至 6 h 时药物已基本释放完全，累积释药率达 96.1%；由释药曲线直接提取参数得 $t_{0.5}$ 为 1.14 h。LMWC-TG-NPs 在 6 h 时累积释药率为 57.8%，24 h 时累积释药率为 68.0%， $t_{0.5}$ 为 4.43 h，显示出明显的缓释特征。分别用零级动力学模型、一级动力学模型和 Higuchi 模型对 LMWC-TG-NPs 体外释药行为进行了拟合，结果表明 LMWC-TG-NPs 在 pH 7.4 PBS (含 20%乙醇) 中的释药行为符合 Higuchi 方程： $Q=0.195 1 t^{1/2}-0.039 2$ ， $r=0.824 7$ 。

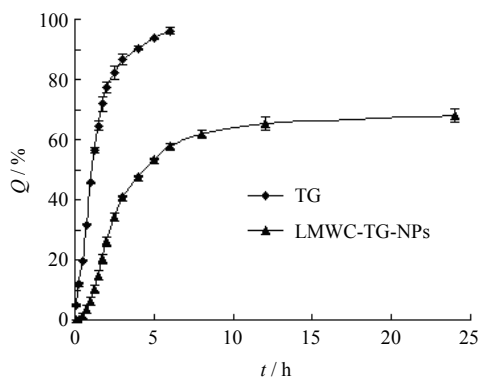


图3 LMWC-TG-NPs体外释药曲线 ($n=3$)

Fig. 3 *In vitro* release curves of LMWC-TG-NPs ($n=3$)

3 讨论

本实验制备的纳米粒系采用改良的自乳化溶剂扩散法 (M-SESD) 制备。根据 M-SESD 法制备 NPs 的形成机制，有机溶剂只有充分自发扩散至水相自乳化成较小的乳滴，才能形成大小均匀、圆整光滑的 NPs。实验结果表明，处方因素中有机相体积和 Poloxamer 188 用量对纳米粒形成过程影响显著。本实验中固定水相，发现随着有机相体积从 5 mL 增加至 15 mL (即有机相/水相的相体积比由 1:6 增加至 1:2)，NPs 的粒径和 PDI 逐渐减小，包封率也略有下降；但随着有机相体积进一步增大为 20~25 mL (相体积比增至 2:3~5:6)，NPs 粒径和 PDI 反而趋向增大，同时包封率显著降低。其原因可能为随着有机相体积的增大，使得载体材料 (PLA) 的浓度减小，有机相的黏度降低。当有机相向水相中扩散时，有机相在乳化剂的作用下，分散为均匀细小的乳滴，形成了相对稳定的分散体系，乳滴间团聚的机会减少，形成的 NPs 粒径越小且相对稳定。但是随着有机相体积进一步增加，则会使得有机相不易充分分散至水相，乳滴发生聚集，造成 NPs 的粒径和 PDI 增大；同时有机相体积过大，使得有机相的黏度显著降低，对药物分子扩散的阻力减小，增加了其向水相扩散的速率，从而使包封率降低。

本实验中采用的乳化剂 Poloxamer 188 兼具乳化和稳定的双重功能，在一定用量范围内 (0.25%~1.0%)，随着其用量增加，使体系的表面张力逐渐降低，有利于有机相在水相中的分散，且在有机相和水相界面形成了较厚的亲水性膜，可阻止粒子间的团聚，增强体系的稳定性，使 NPs 粒径减小；但若其用量过大，常会造成外水相过于黏稠，此时表面活性剂并不完全具有降低表面张力的特性，NPs

反而趋向于聚集, 致使 NPs 粒径增大。

本实验采用直接吸附法制备了壳聚糖修饰的 TG-NPs, 考察了壳聚糖质量分数对纳米粒 Zeta 电位的影响。结果表明, 随着壳聚糖质量分数的增大 (0~10%), 纳米粒 Zeta 电位明显增大, 但随着壳聚糖质量分数进一步增大 (10%~40%), Zeta 电位几乎不再变化, 表明壳聚糖在纳米粒表面的修饰已达到饱和, 因此本实验选择 10%壳聚糖为修饰剂。实验亦考察了壳聚糖溶液与 TG-NPs 混悬液体积比, 发现二者体积比为 1:1 时可制得性质稳定的纳米粒, 大于 1:1 时即出现浑浊, 因此本实验选择二者的体积比为 1:1。

制备 LMWC-TG-NPs 的过程实质上是壳聚糖与 TG-NPs 通过静电作用而结合的过程, 最终壳聚糖以环状和尾状物的方式吸附到纳米粒表面^[16]。与未修饰的 TG-NPs 相比, 壳聚糖修饰的纳米粒粒径明显增大, 粒径分布变宽 [TG-NPs 平均粒径及 PDI 分别为 (133.9±3.6) nm 和 0.064±0.006; LMWC-TG-NPs 平均粒径及 PDI 分别为 (207.6±3.4) nm 和 0.078±0.009]。Zeta 电位由负值转为正值 (电位的转变亦证实了壳聚糖的确包裹在纳米粒表面), 而包封率和载药量几无变化。壳聚糖修饰使得纳米粒粒径增大的原因主要是壳聚糖表面修饰增加了纳米粒的黏性, 从而使其更容易发生聚集的缘故^[17]。壳聚糖修饰后纳米粒的 Zeta 电位的转变是由于 TG-NPs 表面带负电荷, 壳聚糖带正电荷, 水合作用时由于静电吸附作用, 壳聚糖可以紧密吸附在纳米粒外表面所致。

文献报道 TG 在水、生理盐水及 PBS (pH 6.4、7.4) 中的溶解度均较低, 但在含有一定体积分数乙醇的 pH 7.4 PBS 中溶解性能较好^[14]。因此结合预试验结果, 本实验选用含有体积分数 20%乙醇的 pH 7.4 PBS 为释放介质进行了 LMWC-TG-NPs 的体外释药研究。结果表明, TG 原药 6 h 时已基本释放完全, 透析袋对 TG 几乎无吸附; LMWC-TG-NPs 中 TG 释放呈现明显的缓释特征。这可能是由于载体材料 PLA 的降解速度较慢, 同时在释放过程中 NPs 内部结构逐渐变得紧密而使释放介质渗入受阻导致药物释放缓慢。LMWC-TG-NPs 的缓释特征可能会与其体内毒性的降低有关^[18], 对本实验所制备的纳米粒的肾脏靶向性和毒性还有待于进一步深入研究。

参考文献

[1] 阙慧卿, 耿莹莹, 林 绥, 等. 雷公藤化学成分的研究

[J]. 中草药, 2005, 36(11): 1624-1625.

- [2] 冯先礼, 岑国栋. 雷公藤多苷对小鼠细胞免疫功能的影响 [J]. 现代药物与临床, 2009, 24(5): 289-291.
- [3] 陈志强, 曹 枫, 黄怀鹏, 等. 雷公藤多苷对肾小球细胞外基质以及 TGF-β1 的影响 [J]. 中草药, 2003, 34(6): 548-549.
- [4] 郭雪红. 雷公藤多苷的药理研究及临床应用概述 [J]. 中成药, 2010, 32(7): 1199-1202.
- [5] Guzmán M, Aberturas M R, Rodríguez-Puyol M, *et al.* Effect of nanoparticles on digitoxin uptake and pharmacologic activity in rat glomerular mesangial cell cultures [J]. *Drug Deliv*, 2000, 7(4): 215-222.
- [6] Choi C H J, Zuckerman J E, Webster P, *et al.* Targeting kidney mesangium by nanoparticles of defined size [J]. *P Nat Acad Sci USA*, 2011, 108(16): 6656-6661.
- [7] 赵 静, 曾建国, 邹剑锋, 等. 黄芩苷-血根碱离子对壳聚糖纳米粒的制备及表征 [J]. 中草药, 2012, 43(4): 676-682.
- [8] 周闻舞, 顾海铮. 壳聚糖微/纳米粒在定向给药系统中的应用研究 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(4): 290-295.
- [9] 仲 博, 张 岭, 张 莉, 等. 麻黄碱壳聚糖修饰脂质体凝胶剂的制备及体外透皮研究 [J]. 中草药, 2012, 43(1): 70-73.
- [10] Onishi H, Machida Y. Biodegradation and distribution of water-soluble chitosan in mice [J]. *Biomaterials*, 1999, 20(2): 175-182.
- [11] Yuan Z X, Sun X, Gong T, *et al.* Randomly 50% N-acetylated low molecular weight chitosan as a novel renal targeting carrier [J]. *J Drug Target*, 2007, 15(4): 269-278.
- [12] Yuan Z X, Zhang Z R, Zhu D, *et al.* Specific renal uptake of randomly 50% N-acetylated low molecular weight chitosan [J]. *Mol Pharm*, 2009, 6(1): 305-314.
- [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): 438-453.
- [14] 舒 薇, 刘继勇, 杨帝顺. 雷公藤多苷纳米乳的制备及体外透皮特性研究 [J]. 中国药学杂志, 2011, 46(21): 1651-1655.
- [15] 陈红丽, 吕洁丽, 晏 杰, 等. 壳聚糖修饰的 PLGA 纳米粒作为蛋白多肽类药物载体的研究 [J]. 功能材料, 2011, 42(2): 202-205.
- [16] Qu G W, Wu X L, Yin L F, *et al.* N-octyl-O-sulfate chitosan-modified liposomes for delivery of docetaxel: Preparation, characterization, and pharmacokinetics [J]. *Biomed Pharmacother*, 2012, 66(1): 46-51.
- [17] Chen H L, Yang W Z, Chen H, *et al.* Surface modification of mitoxantrone-loaded PLGA nanospheres with chitosan [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2009, 73(2): 212-218.
- [18] 刘明星, 董 静, 杨亚江, 等. 雷公藤甲素聚乳酸纳米粒的制备及毒性 [J]. 药学报, 2004, 39(7): 556-560.