

装载黄芩苷的溶菌酶-低相对分子质量壳聚糖纳米凝胶的制备及表征

姜玉勤¹, 陆 迅², 孙晓怡¹, 唐余燕¹, 刘何晶¹, 刘 扬³, 魏明刚^{1*}

1. 苏州大学附属第一医院, 江苏 苏州 215006

2. 苏州市立医院北区, 江苏 苏州 215000

3. 苏州大学药学院, 江苏 苏州 215123

摘要: **目的** 基于蛋白-多糖纳米凝胶的制备技术, 通过低相对分子质量壳聚糖对溶菌酶的修饰以及对环境因素的调节筛选, 控制溶菌酶的自组装行为, 制备一种绿色环保的具备核壳结构的溶菌酶-低相对分子质量壳聚糖纳米凝胶, 从而达到减小粒径, 提高包封率和载药量的目的, 使其更有利于肾靶向。**方法** 利用 Maillard 反应将溶菌酶与低相对分子质量壳聚糖按不同比例合成溶菌酶-低相对分子质量壳聚糖接合物, 通过 SDS-PAGE 蛋白电泳来优选出产量最高的合成比例; 对合成的产物进行内源荧光、紫外测定等表征, 并通过 2,4,6-三硝基苯磺酸 (2,4,6-trinitro-benzenesulfonic acid, TNBS) 法测定接枝率; 以粒径为评价指标, 对溶菌酶浓度, 反应体系 pH 值、加热温度等条件进行筛选优化, 得到空白纳米凝胶最佳合成条件; 选取适宜的载药方法, 得到了载黄芩苷纳米凝胶。**结果** 合成纳米凝胶的最佳工艺为溶菌酶与低相对分子质量壳聚糖比例 1:2、反应体系 pH 值 11、溶菌酶-壳聚糖接合物质量浓度为 0.6 mg/mL、加热温度 71 °C、加热时间 51 min。得到的溶菌酶-低相对分子质量壳聚糖接合物接枝率为 (24.7±2.9)%, 空白纳米凝胶的粒径范围为 16~120 nm、平均粒径为 49.02 nm、PDI 为 0.132, 载黄芩苷纳米凝胶的包封率为 (95.00±2.54)%, 载药量为 (17.00±1.26)%。**结论** 通过 Maillard 合成了溶菌酶-低相对分子质量壳聚糖纳米凝胶, 并找到了最优的合成工艺。制备的纳米凝胶包封率高, 粒径小, 分布均匀, 缓释效果明显。

关键词: 溶菌酶; 低相对分子质量壳聚糖; 黄芩苷; Maillard 反应; 自组装纳米凝胶; 肾靶向; SDS-PAGE

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)13-3831-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.13.007

Preparation and characterization of lysozyme-low molecular weight chitosan loaded with baicalin

JIANG Yu-qin¹, LU Xun², SUN Xiao-yi¹, TANG Yu-yan¹, LIU He-jing¹, LIU Yang³, WEI Ming-gang¹

1. The First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, China

2. Suzhou Municipal Hospital, Suzhou 215000, China

3. College of Pharmaceutical Sciences, Soochow University, Suzhou 215123, China

Abstract: Objective Based on the preparation technology of protein polysaccharide nanomaterials, through the modification of low molecular weight chitosan to lysozyme and the adjustment of environmental factors, by controlling the self-assembly behavior of lysozyme, to prepare a green environment-friendly lysozyme low molecular weight chitosan nanomer gel with core shell structure, thereby reducing gel size, increasing entrapment efficiency and drug loading, and making it more conducive to renal target. **Methods** Lysozyme and low molecular weight chitosan were synthesized by Maillard reaction and SDS-PAGE was used to optimize the ratio of lysozyme and low molecular weight chitosan with the highest yield; The synthesized products were characterized by endogenous fluorescence and UV detection, and the grafting rate was determined by TNBS method; The particle size was used as the evaluation index, The optimal conditions for the preparation of the blank nanomaterials were screened and optimized by optimizing the

收稿日期: 2020-11-11

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81673896); 苏州市科技局应用基础研究项目 (SYSD2019205); 苏州市科技局应用基础研究项目 (SYSD2019210); 苏州市科技局应用基础研究项目 (SYS2020119)

作者简介: 姜玉勤 (1991—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中西医结合肾脏病基础与临床。Tel: 13675517401 E-mail: 1113899366@qq.com

*通信作者: 魏明刚 (1975—), 男, 博士, 主任中医师, 博士生导师, 研究方向为中西医结合肾脏病基础与临床。

Tel: 13812791993 E-mail: weiminggang@suda.edu.cn

conditions of lysozyme concentration, reaction system pH and heating temperature. With the entrapment efficiency, the suitable drug loading methods were selected to obtain the nanogel loaded with baicalin. **Results** The content of lysozyme low molecular weight chitosan with a graft ratio of $(24.7 \pm 2.9)\%$ was obtained, and the blank nanogel with a particle size of 16—120 nm, an average particle size of 49.02 nm and a PDI 0.132, and a baicalin nanogel with a entrapment efficiency of $(95.00 \pm 2.54)\%$ and a drug loading of $(17.00 \pm 1.26)\%$ were obtained. **Conclusion** Lysozyme low molecular weight chitosan nanoscale gel by Maillard The optimal ratio of lysozyme to low molecular weight chitosan was synthesized by Maillard reaction and the best synthetic process was found. The prepared nano gel has high encapsulation efficiency, small particle size, uniform distribution and obvious sustained release effect.

Key words: lysozyme; low molecular weight chitosan; baicalin; Maillard reaction; self-assembled nanogels; kidney targeting; SDS-PAGE

靶向给药系统 (targeted drug delivery system, TDDS) 是使药物能到达靶器官、靶细胞, 甚至细胞内的结构, 并要求有一定浓度的药物停留相当长的时间, 以更好地发挥药效的给药系统。临床上用于肾脏疾病的药物因长期用药, 而且靶向性不强, 多数具有较大的毒性^[1]。为了减少不良反应并提高药物生物利用度, 肾靶向给药系统的研究成为人们关注的重点。

纳米凝胶 (nanoparticles) 纳米凝胶是由亲水性或两亲性高分子链组成的三维网状结构, 它能显著的溶胀于水但是不溶解于水, 由于水和凝胶网络的亲和性, 水可能以束缚水和自由水等形式存在于高分子网络中而失去流动性, 因此纳米凝胶能够保持一定的形状。它们可以作为一种药物载体, 而且也可以通过盐键、氢键或者疏水作用自发的结合一些生物活性分子^[2-3]。溶菌酶 (lysozyme, LZM) 和壳聚糖都是优良的生物分子材料, 具有良好的生物特性和机械性能, 是比较热门的研究对象。

溶菌酶在适当条件下, 可与多糖在酸或热诱导下形成纳米凝胶, 并在药物运输体系中发挥重要作用^[4]。溶菌酶属于低相对分子质量蛋白质 (low molecular weight protein, LMWP), LMWP 相对分子质量比药物大, 能够控制所结合药物的动力学性质: 可以经肾小球滤过, 并被肾近曲小管细胞重吸收。药物与 LMWP 形成的复合物能够很快离开循环系统, 而浓集于近曲小管细胞。在细胞中, LMWP 被转运到具有蛋白水解活性的溶酶体中, 被水解代谢为短肽和小分子氨基酸, 所载药物可被活化和释放出来^[5]。

药物可直接通过末端羧基与溶菌酶的赖氨酸相连, 也可通过不同的间隔基团, 如酸敏感间隔基、寡肽、 α -羟基酸、铂 (II) 通用联动系统 (ULS) 和 pH 敏感的顺-乌头碱间隔基与之间接相连^[6]。壳聚

糖为带阳离子的高分子碱性多糖聚合物, 聚合物脱乙酰化小分子壳聚糖 (low molecular weight chitosan, LMWC) 既有生物相容性又有生物可降解性, 近年来已经成功应用于肾靶向载体系统中^[7]。

研究表明低相对分子质量壳聚糖和溶菌酶是作为配体与近端肾小管 Megalin 和 Cubilin 受体结合而实现靶向^[8]的作用, 本实验旨在探究通过低相对分子质量壳聚糖对溶菌酶的修饰以及对环境因素的调节筛选, 控制溶菌酶的自组装行为, 制备一种绿色环保的具备核壳结构的溶菌酶-低相对分子质量壳聚糖纳米凝胶, 从而减小纳米凝胶粒径, 提高包封率和载药量, 使其更有利于肾靶向。

黄芩苷作为黄酮类化合物, 具有抗炎、调血脂、抗氧化等广泛的生物活性, 在体外可通过阻断脂多糖诱导的血管内皮细胞核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 活化发挥抗炎作用^[9]。实验发现在大鼠制模同时给予灌胃黄芩苷可降低体内血脂指标, 抑制 NF- κ B 活化, 减少人巨噬细胞趋化蛋白-1 (human macrophage chemoattractant protein-1, MCP-1) 分泌, 表明黄芩苷能较好地改善脂质代谢紊乱, 减弱氧化应激和炎症反应, 对预防肾小球肾炎, 延缓早期肾小球肾炎病理损害及保护肾脏功能具有重要意义^[10]。

基于纳米凝胶的优越性, 本实验通过低相对分子质量壳聚糖对溶菌酶的修饰以及对环境因素的调节筛选, 制备出一种绿色环保的具备核壳结构的溶菌酶-低相对分子质量壳聚糖纳米凝胶 (图 1), 对其进行表征, 并选取适宜方法将模型药物黄芩苷封装于其内部, 发现溶菌酶-低相对分子质量壳聚糖纳米凝胶给药系统具有较高包封率和载药量。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Min-Protean 垂直电泳仪, 美国伯乐有限公司;

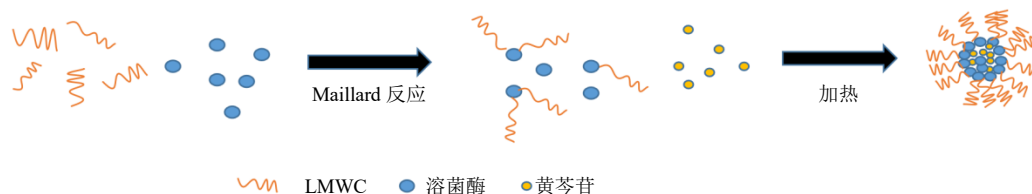


图 1 研究总思路

Fig. 1 General idea of research

DHG-9023A 烘箱, 上海精宏实验室设备有限公司; CHEMIDOC 粒成像仪, BIO-RAD 公司; UV-2600 紫外分光光度计, 日本岛津精密仪器公司; LS55 荧光分光光度计, 珀金埃尔默仪器有限公司; Model410 圆二色谱仪, 美国 AVIV 公司; Zetasizer Nano ZS90 纳米凝胶度及 Zeta 电位分析仪, 英国马尔文有限公司, H-600 透射电子显微镜 (TEM), 日本日立公司; HH-2 数显恒温水浴锅, 常州智博瑞仪器制造有限公司。

1.2 药品与试剂

低相对分子质量壳聚糖, 批号 PH170210, 平均相对分子质量 < 5000, 上海笛柏化学品技术有限公司; 溶菌酶, 批号 20201025, 质量分数大于 98%, 西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司; 考马斯亮蓝 R250, 上海金穗生物科技有限公司; 蛋白电泳试剂盒、十二烷基磺酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS, 批号 151026), 上海碧云天生物技术有限公司; KBr (批号 HZB50C)、磷酸二氢钠 (批号 113091013)、柠檬酸 (批号 90311)、柠檬酸钠 (批

号 153269), 国药集团化学试剂有限公司; 2,4,6-三硝基苯磺酸 (2,4,6-trinitro-benzenesulfonic acid, TNBS) 试剂盒, 批号 HZB50C, 东京化成工业株式会社; 黄芩苷, 批号 PC20170510, 质量分数 > 98%, 南京都莱生物技术有限公司。

2 方法与结果

2.1 复合物的制备

壳聚糖与溶菌酶的反应是通过 Maillard 反应来完成的^[11]。Maillard 反应也称羰氨反应, 它是醛、酮、还原糖以及脂肪氧化生成的羰基化合物与胺类、氨基酸、肽、蛋白质甚至氨水中的氨基之间的反应^[12]。本实验利用蛋白质溶菌酶 ε-氨基与 LMWC 还原性末端羰基之间发生的自发 Maillard 反应, 将蛋白与多糖偶联成一体, 得到 LZM-LMWC 复合物。具体操作是将溶菌酶和 LMWC 的混合物以 0.10 g/mL 质量浓度溶解于水中并冷冻干燥得到二者的混合粉末。将混合粉末在底部含有饱和 KBr 溶液的干燥器中 (此时的相对湿度为 79%), 在相对湿度 79%、60 °C 下反应 4 d^[13]。反应过程见图 2。

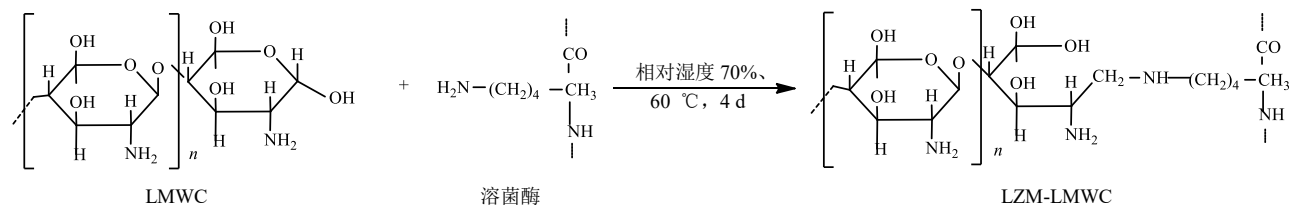


图 2 LZM-LMWC 反应流程

Fig. 2 LZM-LMWC reaction process

2.2 溶菌酶与 LMWC 最优混合物质的量比筛选

将溶菌酶和 LMWC 按混合物质的量比分别为 1 : 1、1 : 2、1 : 3、1 : 4 的比例, 按上述合成方法合成, 后将反应后的物质用去离子水溶解, 用截留相对分子质量为 14 000 的透析袋对复合物进行透析, 除去游离的溶菌酶和 LMWC, 透析 72 h, 后用 SDS-PAGE 电泳法对复合物含量进行检测。根据溶菌酶和壳聚糖的相对分子质量, 选择 15% 的分离胶, 上样量为 20 μL, 浓缩胶电压 80 V, 分离胶调节电

压为 120 V, 当蛋白 Marker 条带即将到达底部的时候, 停止电泳, 后进行染色和脱色。电泳后通过 BandsScan 软件程序对高相对分子质量条带和低相对分子质量条带的灰度进行观察分析。

如图 3 所示, 各比例条件下, LZM-LMWC 的合成产率基本都随着反应时间 (1~4 d) 的增加而不断增加, 且合成产率最高的比例为 1 : 2, 所以选取溶菌酶与 LMWC 的混合物质的量比为 1 : 2 的产物作为纳米凝胶的制备原料。

2.3 LZM-LMWC 复合物的表征测定

2.3.1 紫外-可见吸收光谱测定 将复合物 LZM-LMWC (溶菌酶与 LMWC 物质的量比 1:2)、物理混合物 (溶菌酶与 LMWC 物质的量比 1:2)、LMWC 和溶菌酶分别用水稀释至 0.1 mg/mL, 使用紫外分光光度计对样品扫描, 波长范围为 150~400 nm, 结果图 4。比较图 4 可见, 物理混合物在 150~400 nm 的吸收为溶菌酶和 LMWC 吸收的叠加, 溶菌酶与 LMWC 反应后的紫外吸收光谱在 260~280 nm 处的吸收峰已不明显, 吸收峰的几乎消失说明可能有新的化合物的形成, 此时溶菌酶与 LMWC 已经处于结合状态。同时, 210~225 nm 处的吸收

峰移至 230 nm 附近。吸收峰红移, 吸收强度减弱, 这可能与蛋白质的二级结构变化有关。

2.3.2 圆二色性光谱 (CD) 测定 天然溶菌酶与 LZM-LMWC (1:2) 分别溶于去离子水中, 配制成质量浓度为 30 $\mu\text{g/mL}$ 的样品液, 分别取适量样品液于光径为 0.1 cm 的比色池中, 使用圆二色谱仪进行检测, 环境温度为 25 $^{\circ}\text{C}$, 样品扫描波长范围 190~250 nm, 扫描速率 100 nm/min, 谱带宽度 1.0 nm, 灵敏度为 20 mdeg, 响应时间为 0.25 s。图谱经过仪器本底消除和溶液空白差减, 可计算样品的 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规卷曲二级结构的百分含量。如图 5 所示, 溶菌酶在 200 nm 正峰处具有最高椭圆率,

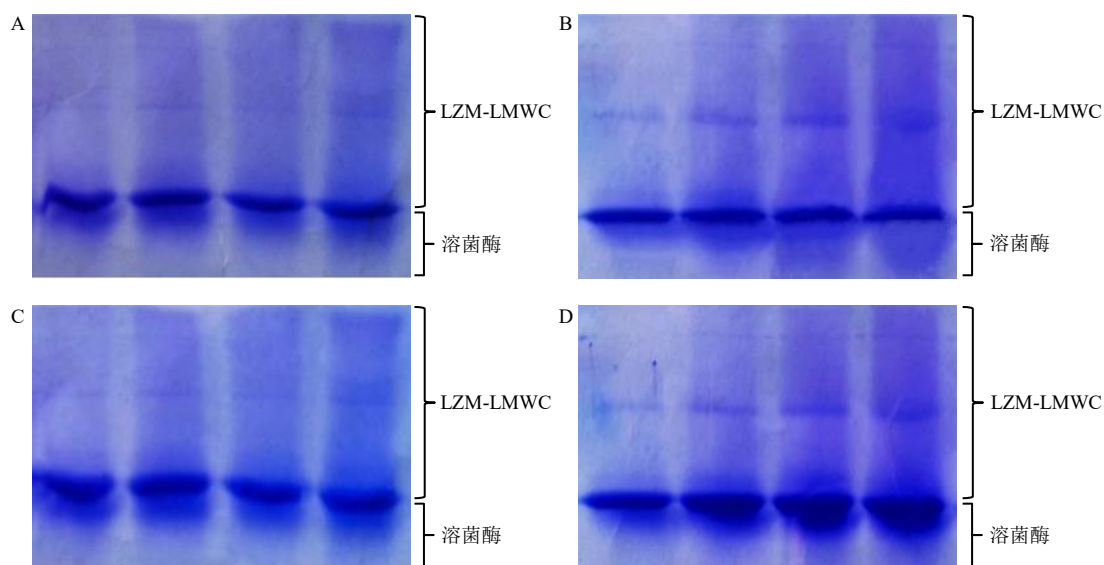


图 3 溶菌酶与 LMWC 不同混合物质的量比 (1:1, A; 1:2, B; 1:3, C; 1:4, D) 合成的反应产物的 SDS-PAGE 电泳图
Fig. 3 SDS-PAGE electrophoretogram of reaction products synthesized by lysozyme and LMWC with different molar ratios (1:1, A; 1:2, B; 1:3, C; 1:4, D)

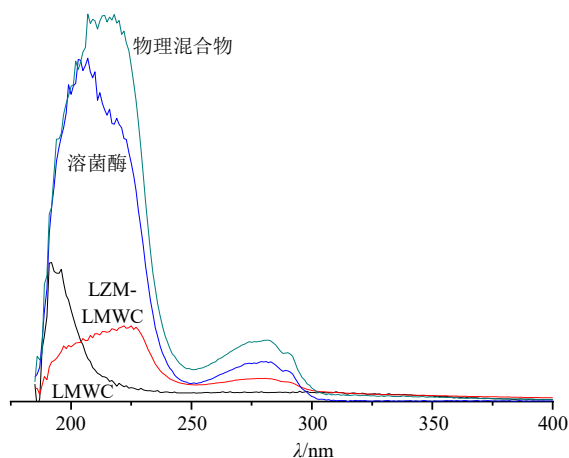


图 4 复合物 LZM-LMWC 和物理混合物的紫外吸收图
Fig. 4 Ultraviolet absorption charts of complex LZM-LMWC and physical mixture

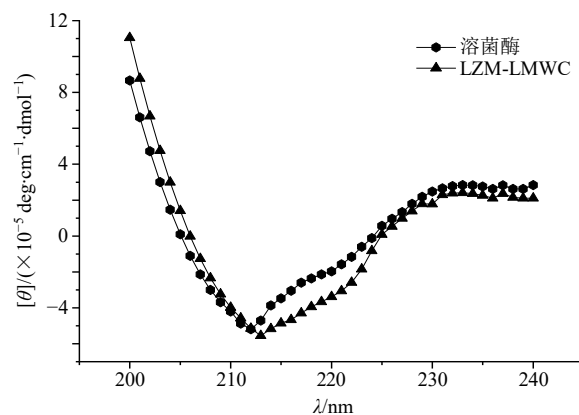


图 5 溶菌酶和 LZM-LMWC 的远紫外 CD 图
Fig. 5 Far-ultraviolet CD of lysozyme and LZM-LMWC
圆率, 表明溶菌酶的天然结构主要以 α -螺旋为主, 在 210~215 nm 处有最低椭圆率。合成的 LZM-

LMWC 接枝物正峰位置及负峰位置改变不明显, CD 图分析的蛋白质不同二级结构的比例变化如表 1 所示。在 LZM-LMWC 的合成过程中, 溶菌酶的二级结构 α -螺旋比例在降低, β -折叠与无规则卷曲比例升高, 可能在 60 °C 的加热条件下 α -螺旋少量的转化为了 β -折叠与无规则卷曲, 这与蛋白质的变性有关。

表 1 溶菌酶和 LZM-LMWC 的不同二级结构的比例
Table 1 Proportion of different secondary structures of lysozyme and LZM-LMWC

物质	α -螺旋/%	β -折叠/%	无规卷曲/%
溶菌酶	22.9	20.5	49.7
LZM-LMWC	17.8	21.3	52.4

2.3.3 内源荧光测定 溶菌酶与 LMWC 合成后产生褐变现象, 褐变是糖基化反应的显著特征。褐变的结果是有色物质的产生, 研究表明荧光物质是有色物质的前体物。因此, 通过对比反应前后物质的荧光强度可证实溶菌酶与 LMWC 发生了接枝反应。以 0.1 mol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲液 (PBS) 为溶剂配制 1.0 mmol/L 的溶菌酶标准溶液备用, LZM-LMWC 使用相同的溶液配成 1.0 mmol/L 的标准溶液备用。在激发和发射光栅狭缝均为 5 nm, 激发波长为 280 nm 条件下, 扫描一定波长范围内溶菌酶和 LZM-LMWC 的荧光光谱。由图 6 可见, 与溶菌酶相比, 复合物在 340 nm 处的荧光强度增大, 证实了溶菌酶与 LMWC 发生了接枝反应。

2.3.4 复合物接枝度测定 采用 2,4,6-三硝基苯磺酸 (2,4,6-trinitro-benzenesulfonic acid, TNBS) 法测定溶菌酶糖基化反应前后自由氨基的含量, 从而推

算出复合物的接枝度。取 1 mL 蛋白质量浓度为 1 mg/mL 的样品溶液分别与 1 mL 的 NaHCO₃ 溶液 (0.04 g/mL)、SDS 溶液 (0.10 g/mL) 与 TNBS 溶液 (1 mg/mL) 混合。随后置于 40 °C 的水浴锅中避光反应 2 h, 依次加入 0.5 mL 1 mol/L 的 HCl 和 5 mL 0.01 mol/L HCl 以终止反应。冷却后立即在 340 nm 处测定样品溶液的吸光度 (A)。利用接枝度的计算公式计算载体的接枝度为 (24.7±2.9) %。

$$\text{接枝度} = 1 - A_{\text{样}} C_{\text{白}} / A_{\text{白}} C_{\text{样}}$$

$A_{\text{样}}$ 与 $A_{\text{白}}$ 分别为接枝共聚物和溶菌酶的 A, $C_{\text{样}}$ 与 $C_{\text{白}}$ 分别为接枝共聚物和溶菌酶的蛋白质量浓度

2.4 空白纳米凝胶制备工艺的考察

球状蛋白质加热胶化理论是本实验选取的合成方法依据的最根本的理论, 对于常见的蛋白质分子来说, 加热变性胶化是一个非常重要的性质。球状蛋白质在不加入交联剂的情况下, 通过控制反应物的浓度、pH 值、加热温度及加热时间即可得到稳定的固态胶体。因此, 以空白纳米凝胶粒径及聚合物分散性指数 (polymer dispersity index, PDI) 为评价指标, 选取反应体系 pH 值、接枝物的质量浓度、加热温度及加热时间进行单因素实验及中心组合设计 (central composite design, CCD) 实验考察。

2.4.1 pH 值对粒径的影响 控制反应物的质量浓度为 1 mg/mL, 反应温度为 80 °C, 反应时间为 45 min, 在不同 pH 值的缓冲液中进行合成。在 pH 值为 11 缓冲体系中, 粒径分布更集中, 粒径也更小。所以选取 pH 值为 11 的 Na₂CO₃-NaOH 缓冲液作为纳米凝胶合成的反应体系。图 7 中明显可以看出在 pH 值为 11 缓冲体系中, 粒径分布更加集中, 粒径也更加小。所以选取 pH 值为 11 的 Na₂CO₃-NaOH 缓冲液作为纳米凝胶合成的反应体系。

2.4.2 溶菌酶-壳聚糖质量浓度对粒径影响 控制反应体系 pH 值为 11, 反应温度为 70 °C, 反应时间为 45 min, 选取质量浓度分别为 0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、2.1 mg/mL 的 LZM-LMWC 接枝物合成空白纳米凝胶。所得空白纳米凝胶粒径分别为 69.8、69.1、69.1、69.2、90.0、115.6、140.3、162.3、218.7 nm。可见, 随着溶菌酶-壳聚糖质量浓度的降低, 纳米凝胶的粒径不断降低, 当溶菌酶-壳聚糖质量浓度过低时, 合成体系中的粒子数过低, 质量浓度达到 0.6 mg/mL 后, 质量浓度对粒径的影响不大。所以最终选取溶菌酶-壳聚糖质量浓度为 0.6 mg/mL 作为纳米凝胶合成的条件。

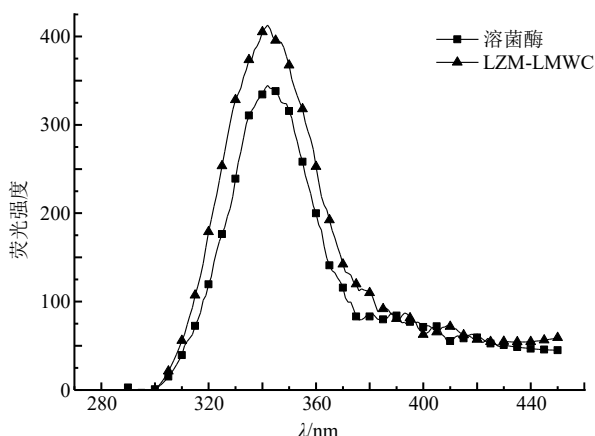


图 6 溶菌酶和 LZM-LMWC 的内源荧光图
Fig. 6 Endogenous fluorescence of lysozyme and LZM-LMWC

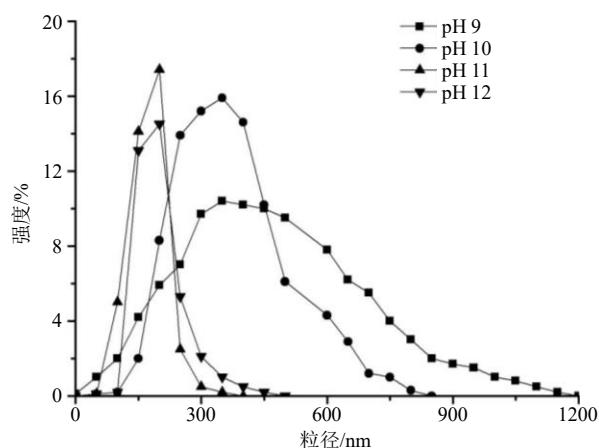


图 7 合成体系 pH 值 9~11 时的粒径分布图

Fig. 7 Particle size distribution map of synthetic system at pH 9–11

2.4.3 加热温度和时间对粒径的影响 控制反应体系 pH 值为 11, LZM-LMWC 接枝物质量浓度为 0.6 mg/mL, 加热时间为 45 min, 加热温度分别设置为 30、40、50、60、70、80、90 °C 合成空白纳米凝胶。所得空白纳米凝胶粒径分别为 133.4、145.2、153.2、126.7、97.6、180.3、121.0 nm。可见, 加热温度对纳米凝胶的粒径影响较为显著, 在 70 °C 时得到的纳米凝胶粒径最最小。

随后控制反应体系 pH 值为 11, LZM-LMWC 接枝物质量浓度为 0.6 mg/mL, 加热温度为 70 °C, 加热时间分别设置为 30、40、50、60 min 合成空白

纳米凝胶。所得空白纳米凝胶粒径分别为 125.7、137.5、114.3、116.8 nm。可见, 加热时间对空白纳米凝胶粒径的影响并不显著, 在加热时间 30~60 min, 粒径的变化并无太大波动。

2.4.4 空白纳米凝胶的制备条件多因素 CCD 考察 根据 CCD 的中心组合实验原理, 综合单因素试验结果, 选取反应体系 pH 值 (X_1)、反应物的质量浓度 (X_2)、加热温度 (X_3) 和加热时间 (X_4) 为响应面的自变量, 粒径大小 (Y) 为指标, 实验因素水平、实验设计及结果见表 2。

根据实验模型拟合结果及软件统计结果, 可以得到最终响应面的二次方程为 $Y=41.97+0.32 X_1+16.89 X_2+0.61 X_3+13.34 X_4-0.87 X_1 X_2-0.95 X_1 X_3+0.18 X_1 X_4-2.94 X_2 X_3+5.44 X_2 X_4-5.81 X_3 X_4+9.62 X_1^2+7.36 X_2^2+19.88 X_3^2+5.86 X_4^2$ 。

回归模型的方差分析结果见表 3。 $P<0.05$ 表明考察因素对于响应值具有显著性。进一步分析各方程中的各项, X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 对 Y 均有显著性影响。应用 Design-Expert 8.0.6 软件绘制不同考察因素对于各响应值的 3D 响应面图 (图 8)。3D 响应面图可用来评价各考察因素之间的交互作用以及确定各因素的最佳范围。

通过 Design-Expert 8.0.6 软件的优化模块, 得到空白纳米凝胶制备的最优反应条件为 pH 值 11, 质量浓度 0.6 mg/mL, 温度为 71 °C, 反应时间为

表 2 响应面实验因素水平设计及结果

Table 2 Factors and levels of response surface experiment and its results

试验号	X_1	X_2 /(mg·mL ⁻¹)	X_3 /°C	X_4 /min	Y /nm	试验号	X_1	X_2 /(mg·mL ⁻¹)	X_3 /°C	X_4 /min	Y /nm
1	11 (0)	0.44 (+1)	70 (0)	60 (+1)	79.64	16	10 (-1)	0.07 (0)	70 (0)	60 (+1)	71.91
2	11 (0)	0 (-1)	70 (0)	60 (+1)	65.32	17	11 (0)	0.44 (+1)	70 (0)	40 (-1)	52.16
3	10 (-1)	0.07 (0)	70 (0)	40 (-1)	80.26	18	11 (0)	0.07 (0)	70 (0)	50 (0)	64.83
4	12 (+1)	0.07 (0)	70 (0)	40 (-1)	76.43	19	10 (-1)	0 (-1)	70 (0)	50 (0)	83.57
5	11 (0)	0.44 (+1)	80 (+1)	50 (0)	69.51	20	12 (+1)	0.07 (0)	70 (0)	40 (-1)	76.82
6	11 (0)	0.07 (0)	60 (-1)	60 (+1)	59.48	21	10 (-1)	0.07 (0)	60 (-1)	50 (0)	70.19
7	11 (0)	0.07 (0)	80 (+1)	40 (-1)	81.79	22	12 (+1)	0 (-1)	70 (0)	50 (0)	64.63
8	11 (0)	0 (-1)	80 (+1)	50 (0)	67.43	23	10 (-1)	0.44 (+1)	70 (0)	50 (0)	49.34
9	11 (0)	0.44 (+1)	60 (-1)	50 (0)	58.01	24	12 (+1)	0.07 (0)	80 (+1)	50 (0)	66.22
10	11 (0)	0 (-1)	70 (0)	40 (-1)	82.31	25	11 (0)	0.07 (0)	70 (0)	50 (0)	56.71
11	10 (-1)	0.07 (0)	80 (+1)	50 (0)	66.64	26	11 (0)	0.07 (0)	70 (0)	50 (0)	73.35
12	11 (0)	0.07 (0)	70 (0)	50 (0)	73.35	27	11 (0)	0 (-1)	60 (-1)	50 (0)	80.17
13	12 (+1)	0.07 (0)	60 (-1)	50 (0)	79.52	28	11 (0)	0.07 (0)	60 (-1)	40 (-1)	49.55
14	12 (+1)	0.44 (+1)	70 (0)	50 (0)	70.21	29	11 (0)	0.07 (0)	80 (+1)	60 (+1)	46.72
15	11 (0)	0.07 (0)	70 (0)	50 (0)	65.16						

表 3 CCD 实验设计方差分析

Table 3 Variance of analysis of CCD experimental design

方差来源	平方和	自由度	均方值	F 值	P 值	方差来源	平方和	自由度	均方值	F 值	P 值
模型	24 913.87	14	1 779.56	3.97	0.006 0	X_2^2	1 485.12	1	1 485.12	3.31	0.088 7
X_1	2.53	1	2.53	5.66×10^{-3}	0.941 0	X_3^2	10 843.80	1	10 843.80	24.20	0.000 2
X_2	6 847.88	1	6 847.88	15.28	0.001 4	X_4^2	941.35	1	941.35	2.10	0.167 8
X_3	8.88	1	8.88	0.02	0.889 9	残差	6 721.35	15	448.09		
X_4	4 272.00	1	4 272.00	9.53	0.007 5	失拟项	6 721.28	10	672.13	45 826.87	<0.000 1
X_1X_2	12.25	1	12.25	0.027	0.870 9	纯误差	0.073	5	0.02		
X_1X_3	14.44	1	14.44	0.032	0.859 9	总误差	31 635.21	29			
X_1X_4	0.49	1	0.49	1.09×10^{-3}	0.974 1	Std.Dev	21.17			R^2	0.981 1
X_2X_3	138.06	1	138.06	0.31	0.587 0	Mean	76.14			R_{adj}^2	0.964 1
X_2X_4	473.06	1	473.06	1.06	0.320 5	C.V%	27.80			R_{pred}^2	0.854 6
X_3X_4	540.56	1	540.56	1.21	0.289 4	Press	38 714.65			R_{adeq}^2	21.473 0
X_1^2	2 538.80	1	2 538.80	5.67	0.031 0						

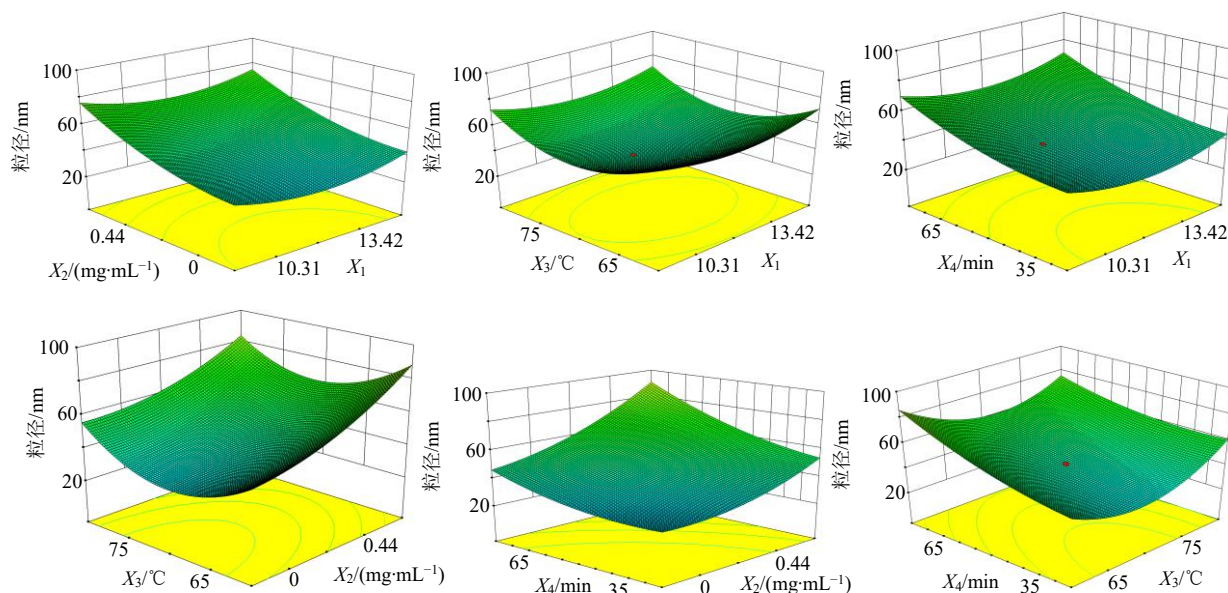


图 8 各因素对粒径大小影响的响应面图

Fig. 8 Response surface diagram of effect of various factors on particle size

51 min; 纳米凝胶的平均粒径 68.28 nm。

按照上述最优处方条件制备 3 批溶菌酶-LWMC 空白纳米凝胶, 测定纳米凝胶粒径、载药量及包封率, 结果见表 4, 平均粒径为 69.13 nm, 载药量 15.79%, 包封率 94.78%, RSD 在 2% 以内, 表明验证结果良好, 制备工艺稳定。

2.5 LZW-LMWC 空白纳米凝胶 (LZW-LMWC-NPs) 的制备及表征

2.5.1 LZW-LMWC-NPs 的制备 根据上述实验结果, 确定 LZW-LMWC-NPs 的合成方法为将 LZW-LMWC 溶解于去离子水中配成 0.6 mg/mL 的溶液,

表 4 最优条件的验证结果

Table 4 Verification results of optimal conditions

样品	粒径/nm	载药量/%	包封率/%
1	72.12	15.31	94.40
2	66.34	17.42	95.63
3	68.70	14.65	94.31
平均值	69.13	15.79	94.78
RSD/%	2.00	1.76	1.98

在 25 °C 下用超声溶解仪使接枝物充分溶解分散。用 0.1 mol/L NaOH-Na₂CO₃ 缓冲液缓慢调节溶液 pH

值至 11, 随后放置在 71 °C 恒温水浴中孵育 51 min, 用冰浴终止反应。之后, 将产物在截留相对分子质量为 14 000 的透析袋中透析 3 d, 去除残留的单体及其他杂质。透析完成后, 将产物放在真空冷冻干燥机中冷冻干燥 48 h 去除水分, 获得干燥的纳米凝胶温室保存。

2.5.2 LZW-LMWC-NPs 的表征 采用 H-600 透射电子显微镜观察 LZW-LMWC-NPs 形态近为球形, 粒径大小分布较均一, 如图 9。粒径范围为 16~120 nm, 平均粒径为 49.02 nm, PDI 为 0.132, 说明粒径分散性良好, 见图 10。

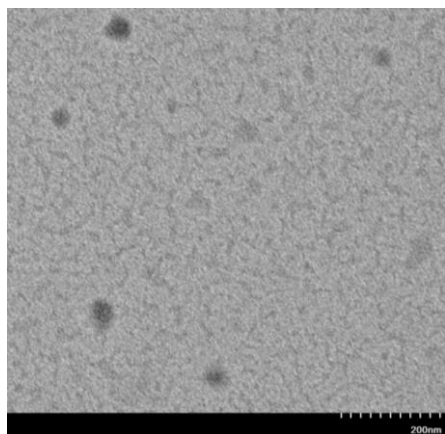


图 9 LZW-LMWC-NPs 的 TEM 图

Fig. 9 TEM of LZW-LMWC-NPs

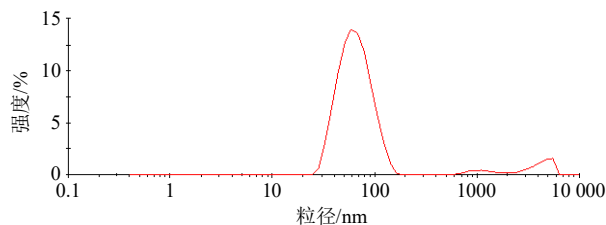


图 10 LZW-LMWC-NPs 粒径分布

Fig. 10 Size distribution of LZW-LMWC-NPs

2.6 黄芩苷-溶菌酶-低相对分子质量壳聚糖纳米凝胶(baicalin-lysozyme-low molecular weight chitosan-lysozyme-nanogels, BA-LZW-LMWC-NPs) 的制备

2.6.1 载黄芩苷纳米凝胶制备 取 0.1 g 制备好的 LZW-LMWC-NPs 复溶分散在 10 mL 去离子水中, 超声震荡 15 min 后缓慢加入用乙醇溶解的黄芩苷, 于磁力搅拌器搅拌, 用 Na_2CO_3 -NaOH 缓冲液调节反应体系 pH 值为 8~9, 滴完黄芩苷溶液后继续搅拌 10 min。在温度为 60 °C 的条件下加热 40 min 后将混合物小心地转移到离心管中, 并以 12 000 r/min 的速度离心 20 min, 移去含有未装载黄芩苷的上清

液, 小心收集底层物质并将其分散在去离子水中, 获得装载有黄芩苷的纳米凝胶, 即 BA-LZW-LMWC-NPs, 将其在冷冻干燥机中冷冻干燥 48 h, 干燥完成后密封保存。

2.6.2 黄芩苷体外测定方法的建立 紫外扫描显示, 黄芩苷有 244、278、315 nm 处 3 个吸收峰, 其中 278 nm 波长处有最大吸收, 所以选定 278 nm 作为黄芩苷的测定波长。

实验测定黄芩苷回归曲线方程 $Y=0.030\ 6\ X-0.006\ 7$, $r^2=0.999\ 9$, 线性范围 1~32 $\mu\text{g/mL}$ 。取 1、8、32 $\mu\text{g/mL}$ 高、中、低 3 个不同质量浓度样品溶液, 分别在 1 d 内 5 个固定时间点对其 A 值进行测定。并连续 5 d 进行, 然后计算 1 d 内和 5 d 内的 RSD。高、中、低 3 个质量浓度的日内精密度和日间精密度分别为 1.98%、0.96%、0.55% 和 1.86%、1.52%、0.88%, RSD 均 <2%, 表明该方法精密度高。

2.6.3 BA-LZW-LMWC-NPs 包封率和载药量的测定 实验采用高速离心的方法测定 BA-LZW-LMWC-NPs 的包封率。取适量制备好干燥的 BA-LZW-LMWC-NPs 粉末, 向其中加入 0.1 mol/L HCl 1 mL 使其分散, 以 12 000 r/min 离心 20 min, 取上层清液。使用紫外分光光度计测量上层清液在 480 nm 处的 A 值, 然后基于标准曲线计算游离黄芩苷的量, 从而获得负载在纳米凝胶上黄芩苷的量。

$$\text{包封率}=(M_3-M_2)/M_3$$

$$\text{载药量}=(M_3-M_2)/M_1$$

M_3 为总药物的量, M_2 为游离的药物的量, M_1 为载药纳米凝胶的总量

根据实验数据和公式计算, 载药纳米凝胶包封率为 $(95.00\pm2.54)\%$, 载药量 $(17.00\pm1.26)\%$ 。

2.6.4 黄芩苷及载药纳米凝胶的体外释放 实验研究结果显示, 黄芩苷在 pH 7.4 的 PBS 缓冲液中的平衡溶解度可达到 6.7 mg/mL, 故选其作为释放介质。分别称取适量的黄芩苷和 BA-LZW-LMWC-NPs 置于透析袋, 置于 500 mL pH 值为 7.4 的 PBS 中, 在 (37.0 ± 0.5) °C 的恒温水浴振荡器中持续搅拌 (100 r/min)。分别在 0、0.2、0.5、1、2、4、8、12、24 h 取样 5 mL, 立即用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液 4 mL 待测, 同时补充相同温度下保存的新鲜释放介质 5 mL。在 278 nm 波长下采用紫外分光光度计分析检测续滤液中黄芩苷含量, 计算黄芩苷的累积释放率 (Q)。

设置 3 个平行实验, 药物释放率通过公式计算得到。如图 11 所示, 随着时间的延长, 黄芩苷和 BA-LZM-LMWC-NGs 的累积释放率均逐渐增加。在 24 h 内, 黄芩苷释放了 98%, 黄芩苷从 BA-LZM-LMWC-NGs 中 72 h 内释放了 72%, 这一结果表明 BA-LZM-LMWC-NGs 中黄芩苷的释放有一定缓释效果。

$$Q=(V_0C_i+V\sum_{i=1}^{i-1}C_{i-1})/MX$$

V_0 和 V 分别表示释放液体积和每次取样体积, C 表示第 i 次取样时黄芩苷的释放质量浓度, M 表示 BA-LZM-LMWC-NGs 的质量, X 表示 BA-LZM-LMWC-NGs 的载药量

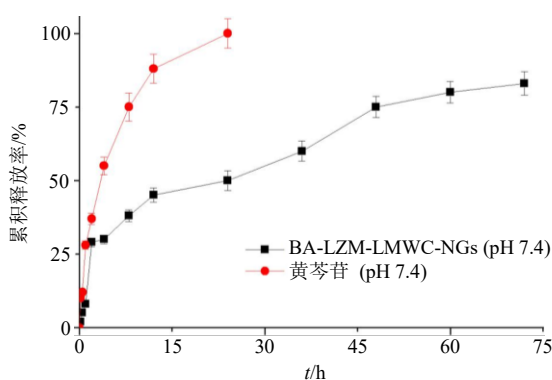


图 11 黄芩苷及 BA-LZM-LMWC-NGs 的体外释放曲线
Fig. 11 Baicalin and BA-LZM-LMWC-NGs *in vitro* release

3 讨论

具有高功能的纳米凝胶因其制造有低成本、低环境负荷、低能耗等特点, 成为目前人们研究的热点。目前已采用不同的材料, 如高分子聚合物、脂质体/脂质、金属/金以及蛋白质等制成不同类型的纳米载药体系, 以提高灌注治疗效果, 并降低药物的毒副作用。蛋白质和多糖作为天然、无毒、可降解的天然高分子, 更受研究者的青睐^[14]。两亲性高分子衍生物, 如壳聚糖、羧甲基纤维素等, 既可通过电荷与蛋白质质肽类药物相互作用, 又可通过其疏水基团与蛋白质质肽类药物的脂溶性基团相互作用, 双重作用更有利于纳米载体对蛋白质质肽类药物的负载^[15-17]。

基于上述研究结论, 本实验用 Maillard 反应和球状蛋白质加热粒化理论, 以溶菌酶和壳聚糖为原料, 得到粒径范围为 16~120 nm, 平均粒径为 49.02 nm, PDI 为 0.132 的 LZM-LMWC 纳米凝胶粒。利用 TNBS 法通过测定溶菌酶糖基化反应前、后自由氨基的含量, 推算出 LZM-LMWC 的接枝率为

(24.7±2.9) %。通过紫外分光光度计测定分析了 LZM-LMWC 纳米凝胶的载药量和包封率及 BA-LZM-LMWC-NGs 体外释放率, 并通过对比发现 LZM-LMWC 纳米凝胶对黄芩苷的释放可产生缓释效应, 增加药物的生物利用度。LZM-LMWC 纳米凝胶粒物理性能稳定, 大小分布均匀, 为进一步在体实验提供了基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 张俞, 张常然. 肾脏靶向治疗研究进展 [J]. 临床和实验医学杂志, 2010, 9(24): 1901-1903.
- [2] Ma Y K, Ge Y X, Li L B. Advancement of multifunctional hybrid nanogel systems: Construction and application in drug co-delivery and imaging technique [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2017, 71: 1281-1292.
- [3] Zhang H, Zhai Y J, Wang J, *et al*. New progress and prospects: The application of nanogel in drug delivery [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2016, 60: 560-568.
- [4] Ren D Y, Qi J R, Xie A Q, *et al*. Encapsulation in lysozyme/A. Sphaerocephala Krasch polysaccharide nanoparticles increases stability and bioefficacy of curcumin [J]. *J Funct Foods*, 2017, 38: 100-109.
- [5] He H N, Ye J X, Liu E G, *et al*. Low molecular weight protamine (LMWP): A nontoxic protamine substitute and an effective cell-penetrating peptide [J]. *J Control Release*, 2014, 193: 63-73.
- [6] Lin L F, Xu W, Liang H S, *et al*. Construction of pH-sensitive lysozyme/pectin nanogel for tumor methotrexate delivery [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2015, 126: 459-466.
- [7] Liang Z, Gong T, Sun X, *et al*. Chitosan oligomers as drug carriers for renal delivery of zidovudine [J]. *Carbohydr Polym*, 2012, 87(3): 2284-2290.
- [8] He X K, Yuan Z X, Wu X J, *et al*. Low molecular weight hydroxyethyl chitosan-prednisolone conjugate for renal targeting therapy: Synthesis, characterization and *in vivo* studies [J]. *Theranostics*, 2012, 2(11): 1054-1063.
- [9] Wang T M, Shi G X, Shao J, *et al*. *In vitro* antifungal activity of baicalin against *Candida albicans* biofilms via apoptotic induction [J]. *Microb Pathog*, 2015, 87: 21-29.
- [10] 李绚, 阎蓉华, 彭谨. 黄芩苷通过降低高脂血症大鼠肾小球核因子 κ B 及可溶性单核细胞趋化蛋白表达抑制肾脏炎症反应 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2010, 18(8): 611-613.
- [11] Fu L L, Wang C, Wang J B, *et al*. Maillard reaction with ribose, galacto-oligosaccharide or chitosan-oligosaccharide reduced the allergenicity of shrimp

- tropomyosin by inducing conformational changes [J]. *Food Chem*, 2019, 274: 789-795.
- [12] 魏玉娇, 郭晓强, 周婷. 酪蛋白-羧甲基壳聚糖美拉德产物的制备及表征 [J]. 中国调味品, 2021, 46(2): 19-22.
- [13] Song Y T, Babiker E E, Usui M, *et al.* Emulsifying properties and bactericidal action of chitosan-lysozyme conjugates [J]. *Food Res Int*, 2002, 35(5): 459-466.
- [14] Xie C X, Feng Y J, Cao W P, *et al.* Novel biodegradable flocculating agents prepared by phosphate modification of Konjac [J]. *Carbohydr Polym*, 2007, 67(4): 566-571.
- [15] Zhang K, Li P, He Y P, *et al.* Synergistic retention strategy of RGD active targeting and radiofrequency-enhanced permeability for intensified RF & chemotherapy synergistic tumor treatment [J]. *Biomaterials*, 2016, 99: 34-46.
- [16] Zhang K, Xu H, Jia X, *et al.* Ultrasound-triggered nitric oxide release platform based on energy transformation for targeted inhibition of pancreatic tumor [J]. *ACS Nano*, 2016, 10(12): 10816-10828.
- [17] Jiang T Y, Zhang Z H, Zhang Y L, *et al.* Dual-functional liposomes based on pH-responsive cell-penetrating peptide and hyaluronic acid for tumor-targeted anticancer drug delivery [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(36): 9246-9258.

[责任编辑 郑礼胜]