

两亲性壳聚糖衍生物负载及缓释醋酸曲安奈德的性能*****◆

周怀胜¹, 蓝育青¹, 程良正², 张黎明², 杨立群²

Bioloading of amphiphilic chitosan derivatives and their sustained-release of triamcinolone acetonide acetate

Zhou Huai-sheng¹, Lan Yu-qing¹, Cheng Liang-zheng², Zhang Li-ming², Yang Li-qun²

Abstract

BACKGROUND: Triamcinolone acetonide acetate (TAA) has strong anti-inflammatory effects as a long-acting corticosteroid. TAA has shown good results in the treatment of intraocular diseases in recent years, however, it also brings some side effects, and needs multiple injections to prevent disease recurring. Grafted chitosan, a copolymer, can generate nanoparticles in aqueous solution, and can be used as a drug carrier for extending the duration of drugs, reducing its side effects and improving its bioavailability.

OBJECTIVE: To synthesize the amphiphilic chitosan derivative containing deoxycholic acid groups and to use it as a carrier to encapsulate TAA, to prepare drug-loading nanoparticles of sustained-release function, and to study the load and performance of sustained-release TAA.

METHODS: The amphiphilic chitosan derivative was synthesized through amidation reaction. Morphology and particle size of nanoparticles were observed by transmission electron microscopy, Zeta potential of nanoparticles was measured by Zeta potential analyzer. The entrapment efficiency, drug loading and *in vitro* drug release properties of TAA-loaded chitosan-deoxycholic acid nanoparticles were determined by *in vitro* release assay.

RESULTS AND CONCLUSION: The synthesized amphiphilic chitosan derivatives containing TAA could form drug-loaded nanoparticles, of which drug loading content was 82%. With the increasing drug loading content, the particle sizes of drug-loaded nanoparticles increased, while their Zeta potential values decreased. The result of *in vitro* release assay indicated that the drug-loaded nanoparticles constantly released TAA in a sustained manner within 72 hours. The drug-loaded nanoparticles based on the amphiphilic chitosan derivative exhibited a sustained-release behavior and is potential to increase the therapeutic effect of TAA.

Zhou HS, Lan YQ, Cheng LZ, Zhang LM, Yang LQ. Bioloading of amphiphilic chitosan derivatives and their sustained-release of triamcinolone acetonide acetate. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(29):5371-5374. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 醋酸曲安奈德是一种长效肾上腺糖皮质激素,具有较强的抗炎作用。近年来在眼内疾病的治疗中取得了较好的效果,但同时带来一些不良反应,且需多次注射,以防止疾病复发。壳聚糖经接枝改性,生成的共聚物可在水溶液中生成纳米粒,用于药物的缓释载体,延长药物作用时间,降低不良反应,提高生物利用度。

目的: 合成含脱氧胆酸基团的两亲性壳聚糖衍生物作为醋酸曲安奈德的载体材料,制备具有缓释功能的载药纳米胶束,研究其负载和缓释醋酸曲安奈德的性能。

方法: 通过酰胺化反应在壳聚糖上偶联脱氧胆酸基团,合成两亲性壳聚糖衍生物。透射电镜观察纳米粒的外观形态和粒径,Zeta 电位分析仪测定纳米粒的 Zeta 电位,体外释放实验检测负载醋酸曲安奈德的壳聚糖-脱氧胆酸纳米粒的封装率、载药量和体外释药性能。

结果与结论: 合成出含脱氧胆酸基团的两亲性壳聚糖衍生物,它能与醋酸曲安奈德形成载药纳米胶束,载药量可高达 82%。随着载药量的增加,载药纳米胶束的粒径逐渐增大,而 Zeta 电位则呈下降的趋势。体外释放的结果表明载药纳米胶束能起到 72 h 缓释醋酸曲安奈德的作用。提示以两亲性壳聚糖衍生物为载体的载药纳米胶束显示出较好的缓释醋酸曲安奈德性能,将有望提高醋酸曲安奈德的治疗效果。

关键词: 醋酸曲安奈德; 两亲性壳聚糖衍生物; 脱氧胆酸; 纳米胶束; 体外药物释放

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.29.013

周怀胜, 蓝育青, 程良正, 张黎明, 杨立群. 两亲性壳聚糖衍生物负载及缓释醋酸曲安奈德的性能[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(29):5371-5374. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

醋酸曲安奈德是一种长效皮质类固醇药物,可用于抑制眼内的炎症反应和纤维增殖等疾病。抗炎强度为氢化可的松的 5~20 倍,近年来开始用于玻璃体内注射治疗视网膜相关疾病^[1],但治疗效果随时间的延长而逐渐减

弱,需要多次反复的注射治疗,这将导致多种并发症的发生,如青光眼等^[2]。

课题组曾以海藻酸钠和羧甲基纤维素等多糖为原料,合成出两亲性多糖衍生物,它们能起到较好的负载和缓释疏水性药物的作用^[3-5]。在此基础上,实验以壳聚糖为原料,合成两亲性壳聚糖衍生物作为药物载体,用于负载醋酸曲安奈德,研究其缓释性能。

¹Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China;
²Institute of Polymer Science, School of Chemistry and Chemical Engineering, BME Center, State Key Laboratory of Optoelectronic Materials and Technologies, DSAPM Laboratory and PCFM Laboratory, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, Guangdong Province, China

Zhou Huai-sheng★, Studying for master's degree, Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China
zhhuais@163.com

Correspondence to: Lan Yu-qing, Doctor, Associate professor, Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China
lyqglp@163.com

Correspondence to: Yang Li-qun, Doctor, Associate professor, Institute of Polymer Science, School of Chemistry and Chemical Engineering, BME Center, State Key Laboratory of Optoelectronic Materials and Technologies, DSAPM Laboratory and PCFM Laboratory, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, Guangdong Province, China
yangliq@mail.sysu.edu.cn

Supported by: the
National Natural
Science Foundation
of China, No.
20574089*,
20974130*,
Guangdong
Provincial Science
and Technology Plan,
No.
2009B020313001*,
2007B031504006*,
Traditional Chinese
Medicine
Administration Fund
of Guangdong
Province, No.
2007106*

Received: 2010-03-25
Accepted: 2010-05-06

¹ 中山大学附属第二医院眼科, 广东省广州市 510120; ² 中山大学化学与化学工程学院高分子研究所, 新型聚合物材料设计合成与应用广东省高校重点实验室, 聚合物复合材料与功能材料教育部重点实验室, 广东省广州市 510275

周怀胜★, 1982年生, 湖南省郴州市人, 中山大学附属第二医院眼科在读硕士, 主要从事眼科疾病的研究。
zhhuash@163.com

通讯作者: 蓝育青, 医学博士, 副教授, 中山大学附属第二医院眼科, 广东省广州市 510120
lyqglp@163.com

并列通讯作者: 杨立群, 理学博士, 副教授, 中山大学化学与化学工程学院高分子研究所, 新型聚合物材料设计合成与应用广东省高校重点实验室, 聚合物复合材料与功能材料教育部重点实验室, 广东省广州市 510275
yanglq@mail.sysu.edu.cn

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225
(2010)29-05371-04

收稿日期: 2010-03-25
修回日期: 2010-05-06
(20100325002/M·Y)

1 材料和方法

设计: 重复测量设计。

时间及地点: 于2009-03/11在中山大学化学与化学工程学院实验室完成。

材料:

材料、试剂与仪器	来源
壳聚糖(脱乙酰度 ≥90.0%, 分子质量 4.5×10 ⁵ g/mol)	上海伯奥生物有限公司
脱氧胆酸	比利时 Acros 公司
1-乙基 3-(3-二甲氨基 基丙基)碳酰二亚 胺盐酸(EDC.HCl)	上海共价化学科技 有限公司
醋酸曲安奈德(TAA)	上海通用药业有限公司
UV-3150 型紫外可 见分光光度计	日本岛津
ZetaPALS 型 Zeta 电位分析仪	美国 Brookhaven 公司
JEM-100CX II 型 透射电镜	日本电子株式会社
傅里叶变换红外光谱仪	美国 Nicolet 公司

实验方法:

两亲性壳聚糖衍生物的合成及其化学结构分析:

参考文献[6]的合成方法, 称取1.0 g壳聚糖置于圆底烧瓶中, 加入1%醋酸溶液, 于室温搅拌下溶解。称取0.85 g的脱氧胆酸和0.62 g EDC.HCl 分别溶于3.0 mL无水乙醇, 依次缓慢地滴加到上述体系, 于室温下反应24 h。然后用乙醇/氨水溶液调节pH至弱碱性, 离心(5 000 r/min, 10 min), 将所得沉淀用乙醇洗涤两到三次, 离心(5 000 r/min, 10 min), 下层沉淀冷冻干燥后得到两亲性含脱氧胆酸的壳聚糖衍生物, 命名为 Chit-DC。通过红外光谱法(FTIR)分析 Chit-DC的化学结构。

Chit-DC载药纳米胶束的制备及其载药性能测试: 称取约10.0 mg Chit-DC, 置于圆底烧瓶中, 加入3.0 mL蒸馏水, 搅拌至Chit-DC溶解; 按表1比例称取一定量的醋酸曲安奈德, 溶于0.3 mL 四氢呋喃, 缓慢滴加到上述壳聚糖溶液中, 然后再缓慢滴加1.0 mL水, 持续搅拌至少24 h。接着在水浴40 °C中搅拌使四氢呋喃挥发。待四氢呋喃挥发后, 将混合液离心(5 000 r/min, 5 min), 上层清液即为负载药物的壳聚糖胶束。采用紫外分光光度法, 在 240 nm波长下测定醋酸曲安奈德的含量^[7], 通过公式(1)计算Chit-DC

纳米粒的载药量:

$$\text{载药量} = [(A-B)/C] \times 100\% \quad (1)$$

式中, A为加入的醋酸曲安奈德质量, B为未负载的醋酸曲安奈德质量, C为加入的Chit-DC质量。

Zeta电位测定: 通过Zeta电位分析仪测定不同载药量纳米胶束的Zeta电位。

透射电子显微镜分析: 将Chit-DC胶束溶液及其载药纳米胶束溶液滴至铜网支持膜上, 自然晾干后滴加2%磷钨酸溶液进行染色, 自然晾干, 通过透射电子显微镜观察微观形态。

体外释放实验: 将醋酸曲安奈德与Chit-DC配比为2:5的载药纳米胶束溶液3.5 mL装入透析袋(截留相对分子质量14 000)中, 将透析袋置于200 mL的释放介质(pH 6.2磷酸盐缓冲液/乙醇=80/20), 于37.0 °C慢速搅拌下进行体外释放实验。每隔一段时间取透析介质1.0 mL, 同时补加1.0 mL释放介质溶液。采用紫外分光光度法, 在240 nm波长下测定释放出的醋酸曲安奈德含量, 通过公式(2)计算药物的累积释放率:

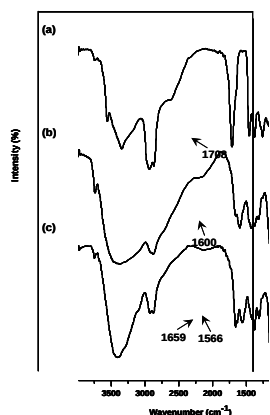
$$\text{药物释放率} = (m/m_0) \times 100\% \quad (2)$$

式中, m为释放介质中醋酸曲安奈德的质量, m₀为Chit-DC纳米粒中醋酸曲安奈德的质量。

设计、实施、评估者: 实验设计及资料收集为第一、三作者, 壳聚糖衍生物的合成由第三作者完成, 载药纳米粒的研究由第一作者完成, 评估为第二、四、五作者, 均经过正规专业培训。

2 结果

2.1 Chit-DC的化学结构分析 采用EDC偶联剂, 于室温下合成含脱氧胆酸基团的两亲性Chit-DC。红外光谱分析结果显示Chit-DC在1 659 cm⁻¹处的酰胺 I 带吸收峰增强, 1 600 cm⁻¹氨基的弯曲振动消失, 而1 566 cm⁻¹处出现酰胺 II 带的特征吸收峰, 表明脱氧胆酸上的-COOH与壳聚糖的-NH₂发生酰胺化反应。另外脱氧胆酸在1 708 cm⁻¹处的吸收峰完全消失, 1 659 cm⁻¹处吸收峰增强, 更加证明脱氧胆酸与壳聚糖发生了偶联, 见图1。



(a) Deoxycholic acid; (b) chitosan; (c) chitosan and deoxycholic acid

Figure 1 FTIR spectra of chitosan and deoxycholic acid-modified chitosan

图1 壳聚糖、脱氧胆酸改性壳聚糖 FTIR 谱图

Chit-DC的化学结构见图2。通过稳态荧光探针法,以芘为荧光探针测定Chit-DC形成纳米胶束的临界聚集质量浓度^[8],结果表明Chit-DC在水中的临界聚集质量浓度为0.32 g/L。

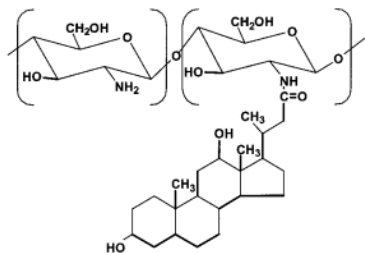


Figure 2 Chemical structure of amphiphilic chitosan derivatives

图2 两性性壳聚糖衍生物的化学结构

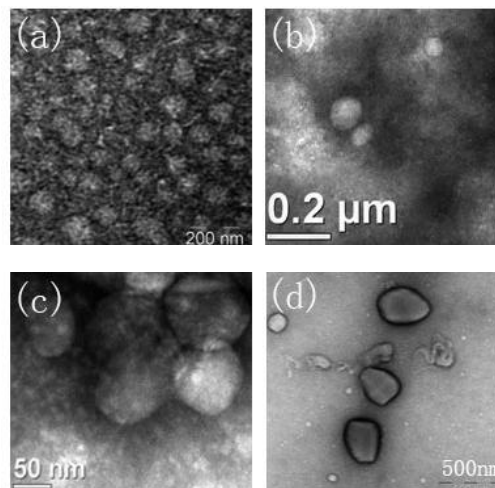
2.2 Chit-DC的载药性能 表1为Chit-DC纳米粒的载药量、Zeta电位和粒径结果,可以看出随着投药量增加,纳米粒的载药量增大,最高达到82%,并且Zeta电位随之降低。

表1 Chit-DC 载药纳米胶束的制备、载药量和 Zeta 电位
Table 1 Preparation of the drug-loaded Chit-DC nanoparticles and their drug-loading capacities and Zeta potential values

No.	TAA/Chit-DC (w/w)	Loading content (%)	Zeta potential ($\bar{x} \pm s$, mV)	Diameter (nm)
1	0/5	0	13.38 $\pm$ 0.56	30-50
2	1/5	12	12.29 $\pm$ 0.40	50-100
3	2/5	29	12.17 $\pm$ 0.72	100-150
4	3/5	48	11.81 $\pm$ 0.42	—
5	4/5	70	6.34 $\pm$ 0.76	—
6	5/5	82	5.01 $\pm$ 1.42	400-550

TAA: triamcinolone acetonide acetate; Chit-DC: chitosan and deoxycholic acid

从图3中的透射电镜照片可观察到,未负载药物的Chit-DC胶束呈较均匀的球形或类球形,粒径30~50 nm的粒子,见图3a。随着载药量增加,纳米胶束的粒径逐渐增大,见图3b~d,表1。



(a) Blank Chit-DC nanoparticles; (b) Drug-loaded Chit-DC nanoparticles at 1: 5 of TAA: Chit-DC; (c) Drug-loaded Chit-DC nanoparticles at 2: 5 of TAA: Chit-DC; (d) Drug-loaded Chit-DC nanoparticles at 3: 5 of TAA: Chit-DC

TAA: triamcinolone acetonide acetate; Chit-DC: chitosan and deoxycholic acid

Figure 3 Transmission electron microscopy images of drug-loaded Chit-DC nanoparticles

图3 Chit-DC 胶束负载药物前后的透射电镜照片

2.3 Chit-DC载药纳米胶束的体外释放行为 醋酸曲安奈德与Chit-DC配比为2:5的载药纳米胶束在体积分数为20%乙醇pH6.2磷酸盐缓冲溶液中的释放行为如图4所示,药物从纳米胶束中缓释72 h后达到平衡,累积释放药物量为31.8%。

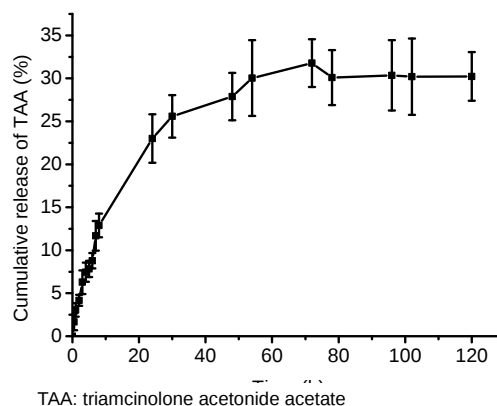


Figure 4 *In vitro* drug release behaviors of TAA-loaded Chit-DC nano-particles (2:5) in 20% ethanol/pH6.2 phosphate buffered solution

图4 醋酸曲安奈德与Chit-DC 配比为2:5的载药纳米胶束在体积分数为20%乙醇 pH6.2 磷酸盐缓冲溶液中的释放曲线

3 讨论

目前疏水改性多糖是一个重要的研究方向^[9-12]。实验中合成的两亲性壳聚糖衍生物能在水中自组装形成纳米胶束。醋酸曲安奈德为一类疏水性很强的药物,难溶于水,它与两亲性壳聚糖衍生物中的疏水性脱氧胆酸基团通过非极性相互作用,则能形成Chit-DC载药纳米胶束。随着投药量的增加,载药量也随之增加,Chit-DC载药纳米胶束的粒径不断增大,相关的研究中有类似报道^[13-14]。

Zeta电位分析的结果显示Chit-DC纳米胶束带正电荷,负载醋酸曲安奈德药物后,纳米胶束仍带正电荷,随载药量的增加而下降。当载药量大于48%时,下降明显(表1),这可能是由于醋酸曲安奈德带负电荷,当载药量较低时对胶束的表面电荷影响不大;当载药量较高时,部分药物可能吸附于胶束的表面,中和了胶束表面部分电荷,因而电荷降低明显。但Zeta电位仍始终保持正值,说明大部分药物可能负载于胶束内部,这与Pignatello等^[15]研究报道的一致。纳米胶束表面带正电荷,这有利于与带负电荷的细胞膜相互作用,增强细胞对载药纳米胶束的摄取^[16-18]。另外,有研究表明能够在玻璃体内自由扩散到达视网膜的最大纳米粒径在220~575 nm范围内^[19],因此本工作中所制备出的Chit-DC载药纳米胶束较适合于眼玻璃体内注射。

由于醋酸曲安奈德难溶于水,因此参照文献报道的方法^[20-21],选用乙醇作为药物的增溶剂,研究Chit-DC载药纳米胶束在pH6.2磷酸盐缓冲液/乙醇(80/20)混合溶剂中的体外释放行为。实验结果表明Chit-DC载药纳米胶束缓释药物的时间达72 h,具有良好的缓释效能。Chit-DC载药纳米胶束中尚未释放出来的醋酸曲安奈德,有可能在体内通过溶菌酶降解两亲性壳聚糖衍生物的作用进一步释放出来^[22-23]。

结论:通过酰胺化反应合成出含胆汁酸基团的两亲性壳聚糖衍生物,它能与醋酸曲安奈德形成载药纳米胶束,载药量可高达82%。随着载药量的增加,载药纳米胶束的粒径逐渐增大,而Zeta电位则呈下降的趋势。体外释放的结果表明载药纳米胶束能起到72 h缓释醋酸曲安奈德的作用,因此将有希望提高醋酸曲安奈德治疗眼科疾病的效果。

4 参考文献

- [1] Jermak CM, Dellacroce JT, Heffez J, et al. Triamcinolone acetonide in ocular therapeutics. *Surv Ophthalmol*. 2007;52(5):503-522.
- [2] Ozkiris A, Erkilic K. Complications of intravitreal injection of triamcinolone acetonide. *Can J Ophthalmol*. 2005;40(1):63-68.
- [3] Yang L, Kuang J, Wang J, et al. Loading and in vitro controlled release of indomethacin using amphiphilic cholesteryl-bearing carboxymethylcellulose derivatives. *Macromol Biosci*. 2008;8(3):279-286.

- [4] Yang L, Zhang B, Wen L, et al. Amphiphilic cholesteryl grafted sodium alginate derivative: Synthesis and self-assembly in aqueous solution. *Carbohydrate Polymers*. 2007; 68:218-225.
- [5] Yang L, Kuang J, Li Z, et al. Amphiphilic cholesteryl-bearing carboxymethylcellulose derivatives: self-assembly and rheological behaviour in aqueous solution. *Cellulose*. 2008; 15:659-669.
- [6] Kim YH, Gihm SH, Park CR, et al. Structural characteristics of size-controlled self-aggregates of deoxycholic acid-modified chitosan and their application as a DNA delivery carrier. *Bioconjug Chem*. 2001;12(6):932-938.
- [7] Huang JN, Zhang X. Shanghai Jiaotong Daxue Xuebao: Yixueban. 2008;28(6):745-747.
- [8] 黄建南,张哲.醋酸曲安奈德在兔眼玻璃体腔不同部位注射后药物浓度比较[J].上海交通大学学报:医学版,2008,28(6):745-747.
- [9] Cheng LZ. Guangzhou: Sun Yat-sen University. 2009.
- [10] 程良正.壳聚糖衍生物药物缓释载体的研究[D].广州:中山大学,2009.
- [11] Sun SJ, Liu WG, Yao KD, Huaxue Jinzhan. 2004;16(6):984-988.
- [12] 孙书军,刘文广,姚康德.壳聚糖及其疏水衍生物自缔合行为[J].化学进展,2004,16(6):984-988.
- [13] Wang YH, Sui WP, Wang EF. Jinan Daxue Xuebao: Ziran Kexueban. 2007;21(2):140-144.
- [14] 汪源浩,隋卫平,王恩峰.壳聚糖的化学改性及应用研究进展[J].济南大学学报:自然科学版,2007,21(2):140-144.
- [15] Zhou TW, Tang WQ, Sheng Q. Gaofenzi Tongbao. 2008;11:54-65.
- [16] 周天韩,唐文琼,沈青.壳聚糖改性技术的新进展 1. 烷基化、酰化以及接枝化改性[J].高分子通报,2008,11:54-65.
- [17] Gaucher G, Dufresne MH, Sant VP, et al. Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery. *J Control Release*. 2005;109(1-3):169-188.
- [18] Wang YS, Wang YM, Li RS, et al. Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao. 2008;29(5):1065-1069.
- [19] 王银松,王玉玫,李荣珊,等.新型壳聚糖基自组装纳米胶束紫杉醇药物释放载体[J].高等学校化学学报,2008,29(5):1065-1069.
- [20] Lee KY, Kim JH, Kwon IC, et al. Self-aggregates of deoxycholic acid-modified chitosan as a novel carrier of adriamycin. *Colloid Polym Sci*. 2000;278:1216-1219.
- [21] Pignatello R, Bucolo C, Ferrara P, et al. Eudragit RS100 nanosuspensions for the ophthalmic controlled delivery of ibuprofen. *Eur J Pharm Sci*. 2002;16(1-2):53-61.
- [22] Kichler A, Mason AJ, Bechinger B. Cationic amphiphilic histidine-rich peptides for gene delivery. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1758(3):301-307.
- [23] Mislick KA, Baldeschwieler JD. Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(22):12349-12354.
- [24] Nam HY, Kwon SM, Chung H, et al. Cellular uptake mechanism and intracellular fate of hydrophobically modified glycol chitosan nanoparticles. *J Control Release*. 2009;135(3):259-267.
- [25] Peeters L, Sanders NN, Braeckmans K, et al. Vitreous: a barrier to nonviral ocular gene therapy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46(10):3553-3561.
- [26] Liu W, Hu M, Liu W, et al. Investigation of the carbopol gel of solid lipid nanoparticles for the transdermal iontophoretic delivery of triamcinolone acetonide acetate. *Int J Pharm*. 2008;364(1):135-141.
- [27] Pan ChJ, Tang JJ, Weng YJ, et al. Preparation, characterization and anticoagulation of curcumin-eluting controlled biodegradable coating stents. *J Control Release*. 2006;116(1):42-49.
- [28] de Campos AM, Diebold Y, Carvalho EL, et al. Chitosan nanoparticles as new ocular drug delivery systems: in vitro stability, in vivo fate, and cellular toxicity. *Pharm Res*. 200;21(5):803-810.
- [29] Barbu E, Verestiuc L, Iancu M, et al. Hybrid polymeric hydrogels for ocular drug delivery: nanoparticulate systems from copolymers of acrylic acid-functionalized chitosan and N-isopropylacrylamide or 2-hydroxyethyl methacrylate. *Nanotechnology*. 2009;20(22):225108.

来自本文课题的更多信息——

基金资助: 国家自然科学基金(20574089, 20974130), 广东省科技计划项目 (2009B020313001, 2007B031504006), 广东省中医药管理基金(2007106)。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

课题的意义: 本课题合成的具有缓释作用的载药纳米粒可有望解决这一难题,延长药物作用时间,提高药物的生物利用度,使糖尿病视网膜病变的治疗获得满意效果,具有较好的应用前景。

设计或课题的偏倚与不足: 实验如能在合成载药纳米粒基础上,对其表面靶向因子修饰,使其能主动靶向作用于病变部位,那么该药物将具备控释、高效及特异等一系列优点。