

壳聚糖修饰的载穿心莲内酯介孔二氧化硅纳米粒的制备及其 pH 响应性释药性能考察

唐涛¹, 臧巧真¹, 龙凯花², 王春柳², 李晔^{2*}

(1. 陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712046; 2. 陕西省中医药研究院, 西安 710003)

[摘要] 目的:制备壳聚糖修饰的载穿心莲内酯介孔二氧化硅纳米粒(CS/Ap-MSN),对其进行体外质量评价及 pH 响应性释药性能考察。方法:根据改良经典 stober 法一步合成了氨基修饰的介孔二氧化硅纳米粒(NH₂-MSN),利用壳聚糖进行偶联修饰,表征其形貌及结构,通过体外释放试验考察 CS/Ap-MSN 在不同 pH 条件下的响应性释药性能。结果:CS/Ap-MSN 的平均粒径(178.0 ± 3.2) nm,多分散指数 0.378 ± 0.117, Zeta 电位(34.04 ± 0.22) mV,载药量和包封率分别为(27.8 ± 1.7)%、(63.6 ± 3.2)%,壳聚糖的修饰量 6.3%。CS/Ap-MSN 在 pH 5.0 的释放条件下,8 d 累计释药量达 53.3%;pH 7.4 的释放条件下,8 d 的累计释药量 23.4%。结论:CS/Ap-MSN 的体外释药具有 pH 响应性,累积释放量随 pH 减小而增大,且具有一定的缓释性能。

[关键词] 介孔二氧化硅;穿心莲内酯;壳聚糖;纳米粒;穿心莲;比表面积;失重率

[中图分类号] R283.6;R945;R284.1;R942 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)24-0014-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015240014

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20151028.1043.010.html>

[网络出版时间] 2015-10-28 10:43

Preparation and pH Responsive Release of Andrographolide-loaded Mesoporous Silica Nanoparticles Modified by Chitosan TANG Tao¹, ZANG Qiao-zhen¹, LONG Kai-hua², WANG Chun-liu², LI Ye^{2*}
(1. Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China; 2. Shaanxi Academy of Traditional Chinese Medicine, Xi'an 710003, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare andrographolide-loaded mesoporous silica nanoparticles modified by chitosan (CS/Ap-MSN) and investigate its quality and pH-responsive release behavior. **Method:** Mesoporous silica nanoparticles modified by amino (NH₂-MSN) were synthesized by modified stober method in one step. Chitosan was covalently attached to exterior surface of NH₂-MSN, morphology and structure of this product were characterized. *In vitro* drug release behavior of CS/Ap-MSN in different pH was investigated. **Result:** Mean particle size of CS/Ap-MSN was (178.0 ± 3.2) nm, PDI was 0.378 ± 0.117 and Zeta potential was (34.04 ± 0.22) mV, drug loading efficiency and encapsulation efficiency were (27.8 ± 1.7)% and (63.6 ± 3.2)%, respectively; modification amount of chitosan was 6.3%. Cumulative release amount of CS/Ap-MSN reached to 53.3% at pH of 5.0 after 8 days; while cumulative release amount of CS/Ap-MSN reached to 23.4% at pH of 7.4 after 8 days. **Conclusion:** *In vitro* release behavior of CS/Ap-MSN shows pH-responsive characteristic and sustained-release characteristic, cumulative release amount increases with decreasing of pH.

[Key words] mesoporous silica; andrographolide; chitosan; nanoparticles; Andrographis Herba; specific surface area; weight loss rate

穿心莲内酯又名穿心莲乙素,为半日花烷型二萜内酯类化合物,是穿心莲中的主要有效成分之一,

具有抗炎、抗感染、抗肿瘤、免疫调节等广泛药理作用,其抗细菌、抗真菌、抗病毒、抗原虫等抗感染作用

[收稿日期] 20150813(013)

[基金项目] 陕西省重点科技创新团队计划项目(2012KCT-18)

[第一作者] 唐涛,在读硕士,从事中药新型纳米给药系统研究, Tel:029-87251837, E-mail: tangtao_academic@126.com

[通讯作者] *李晔,硕士,研究员,从事中药新型给药系统研究, Tel:029-87251837, E-mail: liyelsj@163.com

显著^[1],被誉为“天然抗生素”。同时,穿心莲内酯广泛的抗肿瘤作用日益引起人们的关注,可以抑制多种肿瘤细胞(乳腺癌,结肠癌,肝癌等)的增殖^[2-3]。但该成分难溶于水、稳定性差、味道极苦,患者的依从性较差、口服生物利用度较低等问题极大地限制了其临床应用。

近年来,科研人员对难溶性药物载体的探索及开发做了大量的研究工作,无机材料因其结构稳定在药物传递方面的应用倍受关注。其中介孔二氧化硅纳米粒(mesoporous silica nanoparticles,MSN)是一种新型无机硅纳米材料^[4],与有机高分子载体相比具有体内稳定性强、生物相容性好、细胞毒性可忽略等优点^[5-6]。MSN 具有较高的比表面积及孔容积,这一特性可使载体获得较高载药量,兼具选择性修饰的内外表面,可连接不同的功能性分子,为药物的负载提供一种多功能化的平台,在中药靶向给药领域展现出广阔的应用前景。

临床研究发现,炎症及肿瘤组织间 pH 较低(pH 5.0~7.0)是绝大多数肿瘤病理特征的共性^[7]。壳聚糖是目前发现的唯一的天然碱性多糖,分子内存在大量的-NH₂和-OH,-NH₂质子化使壳聚糖溶解度随体系 pH 变化而变化,且易于化学修饰^[8-9]。以壳聚糖分子修饰 MSN 作为难溶性药物靶向释药的载体,可使药物载体响应体系 pH 变化定位释药^[10],使药物在靶组织高效富集,从而提高药物的生物利用度。本实验以 MSN 为载体材料,壳聚糖为修饰剂,制备了壳聚糖修饰的载穿心莲内酯介孔二氧化硅纳米粒,并对其进行了初步质量评价及体外释药行为考察,为难溶性中药有效成分的新型纳米制剂研发提供参考。

1 材料

1260 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),ZEN3600 型激光粒度仪(英国 Marloven 公司),H-600 型透射电子显微镜(日本日立公司),TriStar-3020 型比表面积和孔隙分析仪(美国 Micromeritics 公司),Pyris 1 型热重分析仪(美国珀金埃尔默公司),Tensor27 型傅里叶变换红外光谱仪(德国 Bruker 公司),Synergy 型超纯水系统(美国 Millipore 公司)。

十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)和正硅酸四乙酯(TEOS)均购自国药集团化学试剂有限公司,3-氨丙基三乙氧基硅烷(APTES)和壳聚糖(脱乙酰度≥95%)均购自上海晶纯生化科技股份有限公司,穿心莲内酯对照品(中国食品药品检定研究院,纯度>98.7%,批号 110797-201108),穿心莲内酯原料

药(西安天一生物科技有限公司,质量分数 98.0%,批号 TYM140216),试剂均为分析纯或色谱纯。

2 方法与结果

2.1 壳聚糖修饰载穿心莲内酯介孔二氧化硅纳米粒(CS/Ap-MSN)的制备

2.1.1 氨基修饰介孔二氧化硅纳米粒(NH₂-MSN)的制备 根据改良经典 stober 法^[11],一步合成了 NH₂-MSN。称取 CTAB 0.5 g 溶解于 240 mL 水中,经 80 °C 水浴磁力搅拌成透明溶液,加入 2 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液 1.75 mL,搅拌均匀,缓慢逐滴加入 TEOS 2.5 mL,快速搅拌 30 min,缓慢加入 APTES 1 mL,恒温继续反应 2 h,反应结束后静置熟化 10 h,离心 15 min(11 380 ×g,下同),取白色沉淀,依次用水和无水乙醇洗涤 3 次,每次 10 mL,60 °C 真空干燥得白色固体粉末。将固体粉末分散于含 10 g·L⁻¹ 硝酸铵的乙醇溶液 100 mL 中,80 °C 回流 10 h 以除去模板剂 CTAB,干燥后所得样品为 NH₂-MSN。

2.1.2 载穿心莲内酯介孔二氧化硅纳米粒(Ap-MSN)的制备 根据前期实验结果,选择穿心莲内酯与 NH₂-MSN 质量比 1:1 进行载药。称取适量的穿心莲内酯溶于无水乙醇溶液中,配成 5 g·L⁻¹ 穿心莲内酯乙醇溶液,按药物与载体质量比 1:1 称取适量载体,超声分散于 3 mL 上述溶液中,室温下磁力搅拌 24 h,离心 20 min,除去游离的穿心莲内酯,取白色沉淀,60 °C 真空干燥 12 h,得白色固体粉末,即 Ap-MSN。

2.1.3 CS/Ap-MSN 的制备 称取适量壳聚糖,溶于 3% 乙酸水溶液 20 mL 中,得 1% 壳聚糖溶液,于 90 °C 水浴磁力搅拌下逐滴加入 37% 甲醛水溶液 2 mL,继续搅拌 1 h,混合物经旋转蒸发除去乙酸及未反应的甲醛。按壳聚糖与载药载体质量比 3:1 取适量载体分散于 30 mL 无水乙醇中,将分散液加至壳聚糖甲醛反应液中,90 °C 水浴继续反应 1 h,用 2 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液调 pH 9~10,离心 20 min,取淡黄色沉淀,依次用水和无水乙醇洗涤 3 次,每次 20 mL,60 °C 真空干燥,即得。

2.2 穿心莲内酯的含量测定

2.2.1 对照品溶液配制 称取穿心莲内酯对照品 2.55 mg,置于 10 mL 量瓶中,加甲醇使溶解并稀释至刻度,即得。

2.2.2 色谱条件 Zorbax Extend-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相甲醇-水(40:60),检测波长 225 nm,柱温 30 °C,流速 1.0 mL·min⁻¹,进样量 10 μL。

2.2.3 供试品溶液的制备 称取适量的 CS/Ap-MSN 分散于 10 mL 乙酸乙醇溶液 (pH 4 ~ 5) 中, 超声分散 0.5 h, 离心 20 min, 收集上清液; 精密量取上清液 100 μ L 于 10 mL 量瓶中, 用乙醇定容, 即得。

2.2.4 线性关系考察 分别精密移取穿心莲内酯对照品溶液 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 按 2.2.2 项下色谱条件测定, 以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得回归方程 $Y = 20.394X - 5.358$ ($r = 0.9999$), 线性范围 1.275 ~ 127.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.2.5 精密度试验 取穿心莲内酯对照品溶液, 配成质量浓度分别为 5.10, 25.50, 127.50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品溶液, 按 2.2.2 项下色谱条件测定, 分别于 1 d 内测定 5 次, 连续测定 5 d。计算低、中、高质量浓度对照品溶液的日内精密度 RSD 分别为 1.8%, 1.1%, 1.7%, 日间精密度 RSD 分别为 1.7%, 1.5%, 1.7%, 表明仪器精密度良好。

2.2.6 加样回收试验 准确移取已知含量的 CS/Ap-MSN 混悬液 1 mL, 分别精密加入 255.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 穿心莲内酯对照品溶液 0.2, 1.0, 5.0 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇适量超声并稀释至刻度, 配成高、中、低质量浓度的溶液, 按 2.2.2 项下色谱条件测定, 计算低、中、高质量浓度溶液的平均回收率分别为 97.6%, 99.7%, 98.6%, RSD 分别为 1.8%, 1.2%, 1.9%, 均满足方法学要求。

2.3 载药量及包封率的测定 按 2.2.3 项下方法制备供试液, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 按 2.2.2 项下色谱条件测定穿心莲内酯的含量, 依次按 $W_1/W_i \times 100\%$ 和 $W_1/W_0 \times 100\%$ 计算 CS/Ap-MSN 的载药量和包封率, 结果分别为 $(27.8 \pm 1.7)\%$ 和 $(63.6 \pm 3.2)\%$ 。式中 W_1 为测得的药物量, W_i 为 CS/Ap-MSN 的质量, W_0 为药物投入量。

2.4 纳米粒的外貌形态、粒径及 Zeta 电位 取 CS/Ap-MSN 2 mg, 加水 50 mL 超声分散, 利用激光粒度仪测定平均粒径及 Zeta 电位分别为 (178.0 ± 3.2) nm 和 (34.04 ± 0.22) mV, 多分散指数 (PDI) 0.378 ± 0.117 。吸取上述 CS/Ap-MSN 混悬液滴至铜网上, 静置 10 min 后用滤纸吸干, 采用透射电子显微镜观察纳米粒的形态, 见图 1。结果显示 CS/Ap-MSN 呈圆球形, 粒子间未见粘连与聚集。表明纳米粒粒径均匀、分散性良好且体外性质稳定。

2.5 比表面积、孔径及孔容积分析 将真空干燥 12 h 的样品装入样品管中, 采用比表面积和孔隙分析仪对样品进行测定, 绘制样品的氮气吸附-脱附等

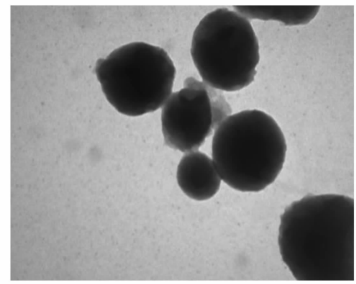


图 1 CS/Ap-MSN 透射电镜 ($\times 300\ 000$)
Fig. 1 TEM photograph of CS/Ap-MSN ($\times 300\ 000$)

温线, 见图 2。采用 BET 和 BJH 方程计算样品的比表面积和平均孔径分布。结果显示 NH_2 -MSN 具有较大的比表面积 ($794.3 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$), 样品具有典型的 IV 型吸附等温线, 吸附-脱附等温线几乎平行, 说明介孔较小且孔径均一, 为药物的负载提供了良好条件。经过载药过程, 载体的比表面积 ($539.7 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) 明显下降, 说明药物分子已经进入载体孔道和吸附于载体表面。载药载体经过壳聚糖的包封修饰, 粒径增大, 且封堵了载体的内外孔道, 比表面积 ($323.9 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) 进一步显著下降, 辅助证明了壳聚糖的成功修饰。

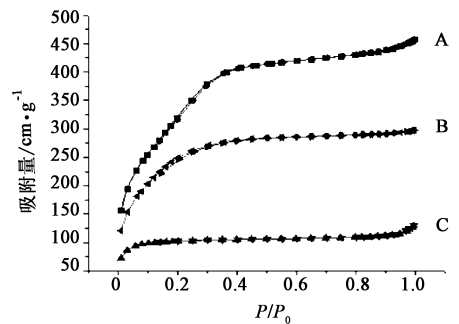


图 2 NH_2 -MSN (A), Ap-MSN (B) 和 CS/Ap-MSN (C) 的氮气吸附-脱附等温线
Fig. 2 N_2 adsorption-desorption isotherm of NH_2 -MSN (A), Ap-MSN (B) and CS/Ap-MSN (C)

2.6 热重分析 利用热重分析对壳聚糖的修饰量进行测定, 测试条件为空气气氛下, 气流 $30 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 升温速率 $10 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$, 样品由室温加热至 $800 \text{ }^\circ\text{C}$, 根据失重质量比率曲线绘制失重曲线, 见图 3。结果显示 NH_2 -MSN, CS-MSN 和 CS/Ap-MSN 的失重率分别为 27.1%, 33.4%, 63.2%, 壳聚糖的修饰量 6.3%, 进一步验证了载药量 29.8%, 与 HPLC 测定结果基本一致。

2.7 体外释药特性研究 选取 pH 分别为 7.4, 5.0 的磷酸盐缓冲液为释放介质, 考察 CS/Ap-MSN 的释药特性。精密称取适量 CS/Ap-MSN (含穿心莲内酯

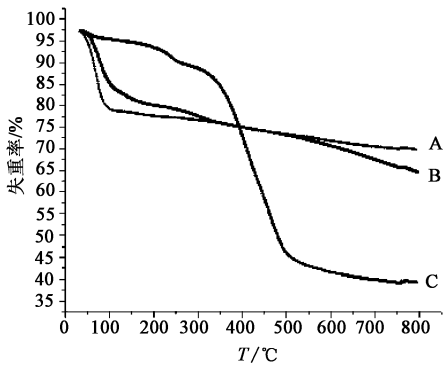


图 3 NH₂-MSN (A), Ap-MSN (B) 和 CS/Ap-MSN (C) 的热重分析
Fig. 3 TGA curves of NH₂-MSN (A), Ap-MSN (B) and CS/Ap-MSN (C)

4.74 mg) 分散于 2 mL 释放介质中,置于预先处理好的透析袋中,密封后置于 50 mL 释放介质中,于 (37 ± 0.5) °C 恒温水浴振荡,定时取样 2 mL,同时补加等温同体积释放介质,0.45 μm 微孔滤膜滤过,按 2.2.2 项下色谱条件测定,计算累计释放量,绘制体外释药曲线,见图 4。结果发现随着 pH 的降低,穿心莲内酯的释药量有所增加。在 pH 5.0 的释放条件下,8 d 累计释药量达 53.3%;pH 7.4 的释放条件下,8 d 的累计释药量 23.4%。说明 CS/Ap-MSN 的药物释放具有 pH 响应性及缓释特性。

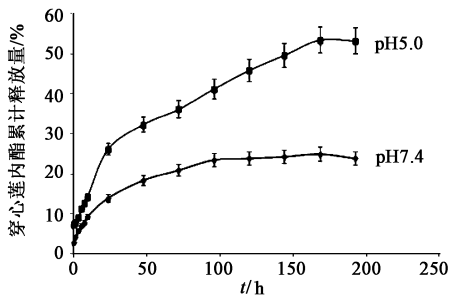


图 4 CS/Ap-MSN 在不同介质中的体外释药曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 4 In vitro release profiles of CS/Ap-MSN in different medium ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3 讨论

功能化的介孔二氧化硅纳米粒作为药物载体是近些年研究的热点,本文成功制备了壳聚糖修饰的介孔二氧化硅纳米粒,并对其形貌结构及多种理化性质进行了表征。体外释放试验表明壳聚糖修饰的介孔二氧化硅纳米粒在不同的 pH 环境下具有响应性释药行为。MSN 凭借较大的比表面积,可使药物高密度地负载于纳米载体的内外表面,有利于增加药物与治疗靶点的接触时间与接触面积。利用壳聚糖特殊的理化性质,制备有机-无机混合模式的 pH 敏感型药物释放体系可增强纳米载体靶向递药的效

果。此外,壳聚糖修饰的纳米载体由于表面带有正电荷,可与胃肠道黏膜表面荷负电的黏蛋白发生静电作用,延长载药载体的滞留时间^[12],促进药物的黏膜吸收,继而增强药效。在后续研究中,将进一步结合药代动力学研究该载体的体内分布及代谢,为抗肿瘤药物靶向递送系统的研究提供参考。

[参考文献]

- [1] 刘意,龙晓英,何琳,等. 穿心莲内酯微乳的制备及含量测定[J]. 中成药,2010,32(8):1424-1426.
- [2] Cheung M T, Ramalingam R, Lau K K, et al. Cell type-dependent effects of andrographolide on human cancer cell lines[J]. Life Sci,2012,91(15):751-760.
- [3] 吕巧莉,涂国刚,王嘉琦,等. 穿心莲内酯的研究进展及临床应用[J]. 南昌大学学报:医学版,2013,53(1):83-86.
- [4] Wu S H, Mou C Y, Lin H P. Synthesis of mesoporous silica nanoparticles[J]. Chem Soc Rev,2013,42(9):3862-3875.
- [5] Mamaeva V, Sahlgren C, Lindén M. Mesoporous silica nanoparticles in medicine-Recent advances[J]. Adv Drug Deliver Rev,2013,65(5):689-702.
- [6] Shen J, Song G S, An M, et al. The use of hollow mesoporous silica nanospheres to encapsulate bortezomib and improve efficacy for non-small cell lung cancer therapy[J]. Biomaterials,2014,35(1):316-326.
- [7] Karve S, Bandekar A, Ali M R, et al. The pH-dependent association with cancer cells of tunable functionalized lipid vesicles with encapsulated doxorubicin for high cell-kill selectivity[J]. Biomaterials,2010,31(15):4409-4416.
- [8] 窦金凤,刘秀菊,翟光喜. 壳聚糖衍生物及其在药物传递系统中的应用[J]. 中国新药与临床杂志,2013,32(5):352-357.
- [9] 武莹,杨建设. 姜黄素偶联 O-羟甲基壳聚糖纳米粒的制备及抗癌活性考察[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(19):1-4.
- [10] Vaghani S S, Patel M M, Satish C S. Synthesis and characterization of pH-sensitive hydrogel composed of carboxymethyl chitosan for colon targeted delivery of ornidazole[J]. Carbohydr Res,2012,347(1):76-82.
- [11] Stober W, Fink A, Bohn E. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the microsize range[J]. J Colloid Interf Sci,1968,26(1):62-69.
- [12] Park J H, Saravanakumar G, Kim K, et al. Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives[J]. Adv Drug Deliver Rev,2010,62(1):28-41.

[责任编辑 刘德文]