

# 雷公藤甲素叶酸-壳聚糖纳米粒的 制备及其释药性能考察

童文婷<sup>1</sup>, 刘波<sup>1\*</sup>, 张睿<sup>2</sup>, 徐彭<sup>1</sup>, 管咏梅<sup>1</sup>, 聂斌<sup>1</sup>, 谈伟锋<sup>1</sup>

(1. 江西中医学院, 南昌 330004; 2. 江西工程职业学院, 南昌 330006)

**[摘要]** 目的:制备具有靶向性的雷公藤甲素叶酸-壳聚糖纳米粒,并考察其体外释药性能。方法:以粒径和 PDI 为指标,采用单因素试验和正交试验法,考察溶液 pH 值、反应温度、壳聚糖和多聚磷酸钠的比例及质量浓度对壳聚糖纳米粒的制备工艺的影响;通过雷公藤甲素与壳聚糖的偶联比及雷公藤甲素、叶酸活性酯和壳聚糖上的氨基反应确定最佳制备工艺,采用离子交联法制备雷公藤甲素叶酸-壳聚糖纳米粒。采用 HPLC 考察其体外释药特性。结果:最佳制备工艺为反应温度 25 ℃,溶液 pH 3.5,壳聚糖-多聚磷酸 3:1,壳聚糖与多聚磷酸钠的质量分数均为 0.3%,制得的纳米粒平均粒径约 170 nm,粒子分散指数(PDI)约 0.21。载药纳米粒的释放率于 4 h 后达平衡,最大释药率约 68%。结论:按优选工艺制备的雷公藤甲素叶酸-壳聚糖纳米粒质量稳定可靠,优选的工艺简便易行。

**[关键词]** 雷公藤甲素; 叶酸; 壳聚糖; 纳米粒; 正交设计; 体外释放

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)22-0049-04

## Preparation and *in vitro* Release Investigation of Triptolide-Folic Acid Chitosan Nanoparticle

TONG Wen-ting<sup>1</sup>, LIU Bo<sup>1\*</sup>, ZHANG Rui<sup>2</sup>, XU Peng<sup>1</sup>,  
GUAN Yong-mei<sup>1</sup>, NIE Bin<sup>1</sup>, TAN Wei-feng<sup>1</sup>

(1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;

2. Jiangxi Engineering Vocational College, Nanchang 330006, China)

**[Abstract]** **Objective:** To prepare triptolide- folic acid chitosan nanoparticle with targeting, and study on its *in vitro* release property. **Method:** With particle size and PDI as indexes, influence of solution pH, reaction temperature, proportion and mass concentration of chitosan and sodium polyphosphate on preparation technology of chitosan nanoparticle were investigated by single factor test and orthogonal design; Optimum preparation technology was selected by coupling ratio of triptolide and chitosan, amino reaction of triptolide, folic acid active ester and chitosan, triptolide-folic acid chitosan nanoparticle was prepared by ionic crosslinking method. *In vitro* release property was examined by HPLC. **Result:** Optimum preparation technology was as following: reaction temperature 25 ℃, solution pH of 3.5, chitosan-sodium polyphosphate 3: 1, the mass concentration of chitosan and sodium polyphosphate of all 0.3%. Average particle size of prepared nanoparticle was about 170 nm, PDI was about 0.21. Release rate of drug-loading nanoparticle reached equilibrium after 4 h, the maximum release rate was about 68%. **Conclusion:** Quality of triptolide-folic acid chitosan nanoparticle was stable and reliable, which was prepared by optimized preparation technology, and optimized technology was simple.

**[Key words]** triptolide; folic acid; chitosan; nanoparticle; orthogonal design; *in vitro* release

**[收稿日期]** 20120911(001)

**[基金项目]** 江西省教育厅科学技术研究项目(GJJ11543);江西省科技厅科技计划项目(20112026)

**[第一作者]** 童文婷,在读硕士,从事制剂生物学、药理学研究,Tel:0791-87118919,E-mail:tongwenting362204@163.com

**[通讯作者]** \* 刘波,博士,从事制剂生物学、药理学研究,Tel:0791-87118919,E-mail:liuboahr@yahoo.com.cn

雷公藤甲素来源于中药雷公藤的根,属于二萜内酯类成分,主要用于治疗肿瘤、类风湿等病<sup>[1]</sup>。雷公藤甲素对各种恶性肿瘤均具有良好的疗效,但易产生胃肠道毒性,会明显损害肝、肾功能<sup>[2]</sup>。近年来,通过化学修饰或将雷公藤甲素包裹在不同载体材料中制成药物控释体系,以降低雷公藤甲素毒、副作用,提高其肿瘤靶向性的研究已成为研究热点<sup>[3]</sup>。叶酸(FA)受体靶向是一种近年备受青睐的新型抗肿瘤机制,通过利用叶酸受体在某些肿瘤部位过度表达而使正常组织低水平表达的特性,实现叶酸偶联药物的靶向输送<sup>[4]</sup>。壳聚糖(CS)是一种价廉易得、便于修饰、无毒、生物相容性好的药物治疗载体<sup>[5]</sup>,通过运用 CS 制备偶联载体,有利于延长药物的体内保留时间,从而提高疗效<sup>[6-7]</sup>。本研究选择壳聚糖为抗肿瘤药物给药系统的载体材料,采用单因素试验和正交试验法,以雷公藤甲素为抗肿瘤模型药物,经叶酸活性酯与壳聚糖上的氨基反应,拟通过离子交联法<sup>[8-9]</sup>制备雷公藤甲素叶酸-壳聚糖纳米粒,并考察其体外释药性能。

## 1 材料

TT-6D 型药物透皮扩散试验仪(天津市正通科技有限公司),Nano-ZS-90 型马尔文激光粒度仪(英国马尔文仪器有限公司),A131252 型超声细胞粉碎仪(宁波新艺超声设备有限公司),Agilent 1260 型液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司生产),壳聚糖(阿拉丁公司生产,脱乙酰度 >95%),多聚磷酸钠(TPP,阿拉丁公司生产),雷公藤甲素对照品(朗泽公司生产,纯度 >98%,20120628),叶酸、无水二甲基亚砷(DMSO)、三乙胺、N-羧基琥珀酰亚胺(NHS)、二环己基碳二亚胺(DCC)等均购自 sigma 公司,其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 空白壳聚糖纳米粒的制备<sup>[10]</sup>** 称取适量 CS 溶解于 1% 乙酸中,配成质量浓度适量,pH 一定的溶液,用 0.45 μm 滤膜滤过。同样配制与 CS 溶液一致质量浓度和 pH 的 TPP 溶液,用 0.22 μm 滤膜滤过。取适量不同质量浓度的 CS 溶液于烧杯中,于水浴 25 ℃,转数 800 r·min<sup>-1</sup>持续搅拌,以 60 滴·min<sup>-1</sup>缓慢滴加适量 TPP 溶液。

### 2.2 单因素试验

**2.2.1 壳聚糖-多聚磷酸钠考察** 控制温度 25 ℃,CS 与 TPP 质量分数均为 0.3%,溶液 pH 5 的条件下,调节 CS-TPP 比例分别为 3:1,4:1,5:1,6:1,7:1,测定制得的纳米粒粒径分别为(390 ± 8.5),

(464 ± 33.0),(539 ± 117.5),(436 ± 23.0),(484 ± 58.0) nm;PDI 分别为(0.416 ± 0.028),(0.446 ± 0.211),(0.370 ± 0.046),(0.328 ± 0.005),(0.393 ± 0.005)。说明 CS-TPP 与粒径成正比,与 PDI 成反比,且各比例间无显著差异。

**2.2.2 壳聚糖与多聚磷酸钠质量分数考察** 固定反应温度 25 ℃,CS-TPP 6:1,溶液 pH 5,调节 CS 与 TPP 的质量分数均为 0.1%,0.2%,0.3%,0.4%,0.5%,结果制得的纳米粒粒径分别为(223 ± 15.5),(304 ± 10.5),(510 ± 27.5),(608 ± 3.5),(628 ± 10.5) nm;PDI 依次为(0.317 ± 0.104),(0.266 ± 0.004),(0.320 ± 0.038),(0.383 ± 0.059),(0.374 ± 0.032)。说明 CS,TPP 的质量分数与粒径成正比,与 PDI 成反比,各组间变化有显著意义。

**2.2.3 溶液 pH 考察** 控制反应温度 25 ℃,CS-TPP 6:1,CS 与 TPP 质量分数均为 0.3%,改变溶液 pH 分别为 3,3.5,4,4.5,5,测定制得的纳米粒粒径分别为(295 ± 3.5),(355 ± 10.5),(372 ± 14.0),(366 ± 10.5),(459 ± 23.0) nm;PDI 依次为(0.317 ± 0.104),(0.266 ± 0.004),(0.320 ± 0.038),(0.383 ± 0.059),(0.374 ± 0.032),说明溶液 pH 变化与粒径成正比,与 PDI 成反比,对组间变化有显著影响。

**2.2.4 反应温度考察** 固定溶液 pH 5,CS-TPP 6:1,CS 与 TPP 质量分数均为 0.3%,调节反应温度分别为 20,25,30,37,测定制得的纳米粒粒径分别为(226 ± 0),(228 ± 21),(220 ± 26),(217 ± 23) nm;PDI 依次为(0.394 ± 0.077),(0.375 ± 0.070),(0.407 ± 0.067),(0.377 ± 0.034)。说明温度变化与粒径,PDI 均成反比,温度增高粒径和 PDI 均变小,且各组间变化无显著意义。

**2.3 正交设计试验** 在单因素试验基础上,选取 CS-TPP 比例,CS 与 TPP 的质量分数,CS 与 TPP 混合溶液 pH 及混合温度为考察因素,按 L<sub>16</sub>(4<sup>5</sup>)正交设计进行试验,因素水平见表 1,3 次重复的试验安排与结果见表 2。

表 1 空白壳聚糖纳米粒制备工艺正交试验因素水平

水平	A	B	C	D
	CS-TPP	CS 与 TPP 的质量分数/%	pH	反应温度/℃
1	3:1	0.1	3	20
2	4:1	0.2	3.5	25
3	5:1	0.3	4	30
4	6:1	0.4	4.5	37

表 2 空白壳聚糖纳米粒制备工艺正交试验安排及结果( $n=3$ )

No.	A	B	C	D	粒径/nm	PDI
1	1	1	1	1	115 ± 14.5	0.253 ± 0.017
2	1	2	2	2	138 ± 2.0	0.258 ± 0.028
3	1	3	3	3	162 ± 2.5	0.203 ± 0.009
4	1	4	4	4	228 ± 11.0	0.199 ± 0.009
5	2	1	2	3	158 ± 2.0	0.283 ± 0.007
6	2	2	1	4	158 ± 30.5	0.265 ± 0.029
7	2	3	4	1	228 ± 3.0	0.231 ± 0.029
8	2	4	3	2	213 ± 3.5	0.216 ± 0.005
9	3	1	3	4	202 ± 5.5	0.323 ± 0.031
10	3	2	4	3	239 ± 20.5	0.195 ± 0.019
11	3	3	1	2	189 ± 12.5	0.280 ± 0.024
12	3	4	2	1	265 ± 34.0	0.318 ± 0.006
13	4	1	4	2	268 ± 24	0.321 ± 0.005
14	4	2	3	1	260 ± 8.5	0.302 ± 0.056
15	4	3	2	4	259 ± 0.5	0.273 ± 0.033
16	4	4	1	3	332 ± 96.5	0.317 ± 0.007

采用 SPSS 18 统计软件对表 2 中数据进行方差分析,从粒径结果得出,因素 B 和 C 对试验结果有极显著影响,因素 A 对试验结果有显著影响,而因素 D 没有明显影响。从 PDI 结果得出,因素 B 和 C 对试验结果有一定影响,而因素 A 和 D 没有明显影响。综合以纳米粒粒径和 PDI 最小值为最佳条件,则组合  $A_1B_3C_2D_2$  即温度 25 °C,溶液 pH 3.5,CS-TPP 3:1,CS,TPP 质量分数 0.3% 为壳聚糖纳米粒制备的最优化条件。

**2.4 叶酸活性酯的制备**<sup>[11]</sup> 称取叶酸 300 mg ( $0.67 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),溶于无水 DMSO 10 mL 中,加入 DCC 93 mg ( $0.45 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 和 NHS 77 mg ( $0.67 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 及三乙胺 500  $\mu\text{L}$ ,过夜,过滤除去副产物二环己基脲(DCU),减压蒸馏除去部分溶剂,边搅拌边逐渐滴入冰冷的含 30% 丙酮的无水乙醚溶液,得到黄色沉淀物,过滤,真空干燥,即得。

**2.5 雷公藤甲素叶酸-壳聚糖纳米粒的制备** 按 CS-TPP-雷公藤甲素-FA 300:100:1:1 的比例向 CS 乙酸溶液(0.3%, pH 3.5)中加入适量叶酸活性酯(雷公藤甲素的投放比例是由制备后纳米粒载药量和释药要求决定),在水浴 25 °C,  $400 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  混合均匀,加入适量雷公藤甲素的 50% 乙醇溶液搅拌至均匀。于 60 °C 水浴预热 10 min,加入适量 0.3% TPP,于水浴 25 °C,  $400 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  的条件下,搅拌 20 min,取出静置,以超声细胞粉碎仪粉碎 3 min(150

W),于 4 °C 保存,即得。

## 2.6 体外释药性能考察

**2.6.1 雷公藤甲素含量测定色谱条件**<sup>[12]</sup> Agilent XDB-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ),流动相乙腈-水 30:70,流速  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,检测波长 219 nm,柱温 30 °C,进样量 20  $\mu\text{L}$ 。

**2.6.2 雷公藤甲素标准曲线绘制** 精密称取雷公藤甲素对照品 1 mg,加 50% 乙醇溶解并定容至 25 mL,依次稀释成 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312 5, 0.156 25  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  系列质量浓度的雷公藤甲素对照品溶液,进样 20  $\mu\text{L}$  ( $n=3$ )。以峰面积为纵坐标,对照品质量浓度为横坐标,得回归方程  $Y = 41.088X + 3.4944$ , ( $r = 0.9999$ ),表明雷公藤甲素质量浓度在 0.16 ~ 40  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  线性关系良好。

**2.6.3 纳米粒释放性能考察**<sup>[13]</sup> 将 15 mL 粉碎纳米粒溶液加至提前处理好的透析袋中(20 cm),溶液约占透析袋 2/3,将两端扎好,放在盛有 PBS(pH 7.4)的烧杯中,将透析袋浸没(大约超出透析袋 2 ~ 3 cm),烧杯置于 37 °C 恒温震荡箱中,于 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 30, 36, 48 h 从烧杯中取 7 mL 液,采用 HPLC 测定取出液中雷公藤甲素的含量,计算溶液的释放速度分别为 0, 0, 32%, 45%, 66%, 66%, 65%, 66%, 66%, 68%, 67%。结果表明雷公藤甲素叶酸-纳米粒溶液于释药后 4 h 达最大释放率,之后呈稳态。

**2.6.4 差示扫描量热法分析、红外光谱及原子力显微镜检测** 将雷公藤甲素微粒和雷公藤甲素叶酸-壳聚糖纳米粒烘干后,在  $\text{N}_2$  气流下,以  $10 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$  速度将温度从 0 °C 升至 300 °C 进行扫描,记录曲线进行差示扫描量热法分析(DSC);将雷公藤甲素叶酸-壳聚糖纳米粒及叶酸活性酯微粒用 KBr 压片,通过傅立叶变换红外光谱(FT-IR)检测 500 ~ 4 000  $\text{cm}^{-1}$  处各峰的变化;将雷公藤甲素叶酸-壳聚糖纳米粒样品分散在去离子水中,滴在云母片上,待干燥后放入原子力显微镜(AFM)进行观测。经激光粒度仪和 AFM 检测显示纳米粒已形成,分散较均匀,粒径约 170 nm, PDI 约 0.21(图 1)。通过 DSC 和 FT-IR 检测显示包裹前后的 CS、雷公藤甲素和 FA 的熔点、特征吸收峰的出峰位置均发生明显变化,说明各成分分子间产生了较强的分子作用力,表明制备的纳米粒中同时含有 CS 和雷公藤甲素,即雷公藤甲素成功被包裹。

## 3 讨论

雷公藤甲素用于临床治疗毒副作用明显<sup>[14-15]</sup>,

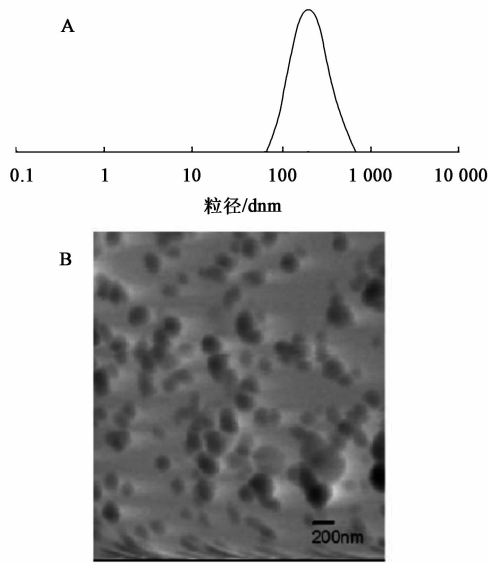


图 1 雷公藤甲素叶酸-壳聚糖纳米粒粒径 (A) 和原子力显微镜示 (B)

通过修饰建立药物传输体系,将雷公藤甲素定向转运至病变部位,不仅能提高其疗效,更能减少其毒、副作用。壳聚糖是无毒、生物相容性好的生物大分子,叶酸能与表达大量叶酸受体的肿瘤细胞特异性的结合,利用壳聚糖与雷公藤甲素和活性叶酸酯发生氨基反应,使氨基集团发生质子化,带有大量正电荷,与 TPP 的阴离子发生分子间及分子内交联反应获得雷公藤甲素叶酸-壳聚糖纳米粒,是一种新型的肿瘤靶向制剂。本研究发现壳聚糖与多聚磷酸钠的质量分数和溶液 pH 是影响纳米粒粒径及 PDI 的主要因素,调节壳聚糖与多聚磷酸钠的质量分数、比例、溶液 pH 和反应温度能明显调整纳米粒粒径范围,以满足临床生物医学的应用。

[参考文献]

[ 1 ] Wang W, Yang S, Su Y, et al. Enhanced antitumor effect of combined triptolide and ionizing radiation [J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(16):4891.  
[ 2 ] Leuenroth S J, Okuhara D, Shotwell J D, et al. Triptolide is a traditional chinese medicine-derived inhibitor of polycystic kidney disease [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(11):4389.

[ 3 ] Xu L, Chen H, Xu H, Yang X. Anti-tumour and immunomodulation effects of triptolide-loaded polymeric micelles [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2008, 70(3):741.  
[ 4 ] Meier R, Henning T D, Boddington S, et al. Breast cancer; MR imaging of folate-receptor expression with the folate-specific nanoparticle P1133 [J]. Radiology, 2010, 255(2):527.  
[ 5 ] Prabakaran M. Review paper: Chitosan derivatives as promising materials for controlled drug delivery [J]. J Biomater Appl, 2008, 23(1):5.  
[ 6 ] Lee K Y. Chitosan and its derivatives for gene delivery [J]. Macromol Res, 2007, 15(3):195.  
[ 7 ] Mishra S K, Philip A K, Pathak K. Passage-delaying microbeads for controlled delivery of loratadine [J]. PDA J Pharm Sci Technol, 2008, 62(6):421.  
[ 8 ] Agnihotri S A, Mallikarjuna N N, Aminabhavi T M. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery [J]. J Control Release, 2004, 100(1):5.  
[ 9 ] Calvo P, Remunan-Lopez C, Vila-Jato J L, et al. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers [J]. J Appl Polym Sci, 1997, 63(1):125.  
[ 10 ] 费轶博,李凤前,胡晋红,等.用离子交联-匀化工艺制备乙肝疫苗壳聚糖纳米粒 [J].药学服务与研究, 2008, 8(2):119.  
[ 11 ] 柳时,徐喆,罗智,等.叶酸偶联壳聚糖纳米粒的制备 [J].医药导报, 2006, 25(6):561.  
[ 12 ] 张普照,杨丽娟,侯志帆,等.雷公藤双向固体发酵过程中的化学成分变化研究 [J].中国实验方剂学杂志, 2010, 16(10):59.  
[ 13 ] 李晶,王森明,胡丽娟,等.盐酸洛拉曲克壳聚糖纳米粒的制备及其特性研究 [J].实用医学杂志, 2011, 27(9):1532.  
[ 14 ] 林建峰,朱惠,吴珊,等.紫云金对雷公藤内酯醇引起静脉炎的作用 [J].中国实验方剂学杂志, 2001, 7(1):36.  
[ 15 ] 林晓洁,张华,金少钢,等.盐酸青藤碱壳聚糖纳米粒的制备及体外释放性能的研究 [J].中国实验方剂学杂志, 2011, 17(4):22.

[责任编辑 全燕]