

透明质酸接枝十八烷基聚合物的合成及表征

刘艳华¹, 孙进², 王文苹¹, 何仲贵^{2*}

(1. 宁夏医科大学药学院, 银川 750004; 2. 沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016)

[摘要] **目的:**合成并表征透明质酸接枝十八烷基(HA-C₁₈)两亲性聚合物。**方法:**通过十八烷胺的氨基与透明质酸的羧基发生酰化反应,制得 HA-C₁₈ 聚合物,采用 FTIR 鉴定合成的 HA-C₁₈ 聚合物的化学结构,评价 HA-C₁₈ 聚合物的自聚集行为,测定其临界聚集浓度;以可静脉注射辅料 Tween 80 和 Cremophor EL 为参比,评价 HA-C₁₈ 聚合物的溶血性。**结果:**合成的 HA-C₁₈ 聚合物临界聚集质量浓度 10.0 mg·L⁻¹, HA-C₁₈ 胶束溶血性远远低于 Tween 80; Cremophor EL 溶血性略低于 HA-C₁₈ 胶束,但差异不明显。**结论:**HA-C₁₈ 聚合物是优良的可用于静脉注射的难溶性药物载体材料。

[关键词] 透明质酸; 透明质酸接枝十八烷基聚合物; 聚合物胶束; 临界聚集浓度; 溶血性

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)20-0049-04

Synthesis And Characterization of Hyaluronic Acid Grafted Octadecyl Polymer

LIU Yan-hua¹, SUN Jin², WANG Wen-ping¹, HE Zhong-gui^{2*}

(1. College of Pharmacy, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China;

2. College of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

[Abstract] **Objective:** To synthesize and characterize hyaluronic acid grafted octadecyl (HA-C₁₈) amphiphilic polymer. **Method:** HA-C₁₈ polymer was prepared by acylation reaction with carboxyl group of hyaluronic acid and amine group of octadecyl, chemical structure of HA-C₁₈ polymer were determined by FTIR analysis. Self-aggregation behavior of HA-C₁₈ polymer was evaluated, and critical aggregation concentration was determined; With intravenous accessories of Tween 80 and Cremophor EL as references, hemolysis of HA-C₁₈ polymer was evaluated. **Result:** The critical aggregation concentration of HA-C₁₈ copolymer was 10.0 mg·L⁻¹. Hemolysis of HA-C₁₈ micelle was far lower than Tween 80; But hemolysis of Cremophor EL was slightly lower than HA-C₁₈ micelles, but their difference was not obvious. **Conclusion:** HA-C₁₈ copolymer could be used as a novel injectable drug carrier for poor water soluble drugs.

[Key words] hyaluronic acid; hyaluronic acid grafted octadecyl copolymer; polymeric micelle; critical aggregation concentration; hemolysis

近年来,疏水化修饰多糖聚合物胶束给药系统的开发及应用受到研究者广泛关注。疏水化修饰多糖是在多糖(壳聚糖、透明质酸、肝素等)的亲水骨

架中引入疏水基团,如烷基链、胆固醇、脱氧胆酸等,使其具有两亲性。疏水化修饰多糖聚合物胶束作为纳米药物传递载体,具有载药量高、缓释、长循环等特性,广泛应用于包载疏水性药物和结合水溶性大分子,如蛋白质、多肽和 DNA 等。另外,还可通过被动或主动靶向策略对疏水化修饰多糖进行功能化修饰,以改变药物在体内的分布特性^[1-2]。

透明质酸(HA)是一种体内广泛存在的糖胺多糖,在维持细胞外基质结构及调节细胞内活动方面起重要作用。CD44 是存在于肿瘤组织细胞膜上的 HA 特异性受体。HA 作为抗肿瘤药物的靶向载体,

[收稿日期] 20120521(011)

[基金项目] 宁夏自然科学基金(NH12193)

[第一作者] 刘艳华,博士,讲师,从事新型纳米给药系统研究, Tel:0951-6880581; E-mail:lyanhua1214@126.com

[通讯作者] * 何仲贵,博士,教授,从事药物新剂型与新技术研究, Tel: 024-23986320, E-mail: hezhgui@gmail.com

可借助其与肿瘤细胞表面 CD44 受体的特异性结合,靶向传递药物蓄积于肿瘤部位,有效地抑制肿瘤细胞的转移和生长^[3]。

本试验选用 HA 为亲水主链,经十八烷基(C₁₈)疏水化修饰,合成 HA-C₁₈ 聚合物;采用红外光谱技术对合成的 HA-C₁₈ 聚合物进行结构鉴定,并考察其自聚集行为;以可静脉注射辅料 Tween 80 和 Cremophor EL 为参比,评价 HA-C₁₈ 聚合物的溶血性,为其作为静脉注射用药物载体材料提供理论依据。

1 材料

DF-101S 型集热式恒温磁力搅拌器(巩义市英峪予华仪器厂),Eyela FDU-1100/DRC-1000 型冷冻干燥机(Tokyo Rikakikai 公司),F-2500 型荧光分光光度计(日本 Hitachi 公司)。

HA(相对分子量 11 kDa,山东福瑞达生物化工有限公司),十八烷胺(广州经纬制药有限公司),1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)均购自上海共价化学科技有限公司,聚山梨酯-80(Tween 80,天津市博迪化工有限

公司),苾(99.9%,Sigma 公司),聚氧乙烯蓖麻油(Cremophor EL,德国 BASF 公司),甲酰胺、无水乙醇、N,N-二甲基甲酰胺(DMF,天津康科德科技有限公司)。

2 方法与结果

2.1 透明质酸-十八烷基聚合物的合成

HA-C₁₈ 聚合物合成是 EDC 与 NHS 介导的,HA 结构中的-COOH 和十八烷胺结构上的-NH₂ 发生的酰化反应。

HA(100 mg,-COOH 摩尔数 2.5×10^{-4} mol)溶于 5 mL 无水甲酰胺中,50 °C 水浴加热搅拌溶解,冷却至室温。加入 EDC(96 mg)和 NHS(58 mg),冰浴下磁力搅拌 2 h。将十八烷胺(与 HA 结构中-COOH 摩尔比 3/2)溶于 5 mL 无水 DMF 中,缓慢滴加到 HA 混合液中,于 60 °C 氮气环境下搅拌反应 5 h,室温继续搅拌 24 h。反应液于过量的水/乙醇混合液(1:3 ~ 1:1)中依次透析 2 d,蒸馏水透析 2 d(透析袋截留相对分子量 7 000),过滤除去不溶性杂质,冷冻干燥,得白色粉末^[4]。合成路线见图 1。

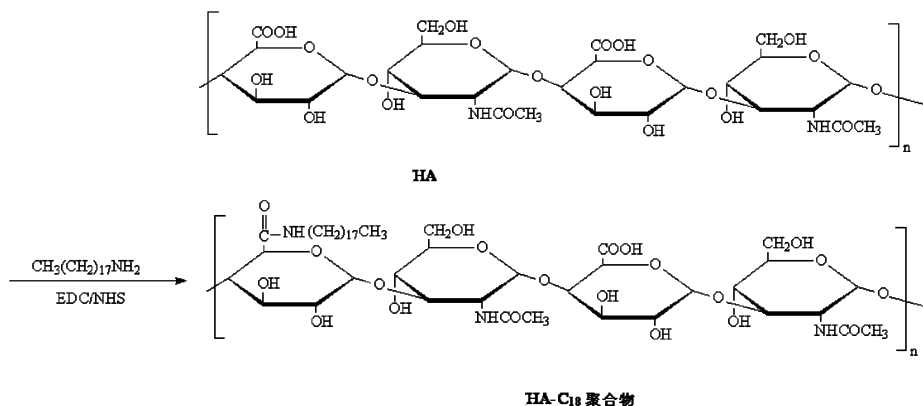


图 1 HA-C₁₈ 聚合物合成路线

2.2 结构确证

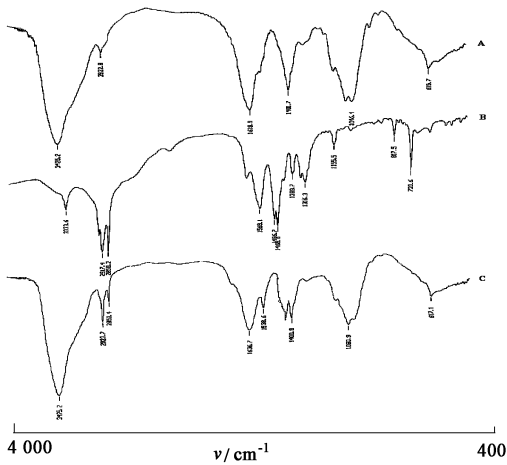
利用红外光谱(FTIR)确定 HA, HA-C₁₈ 的结构。分别取 HA, 十八烷胺和 HA-C₁₈ 聚合物适量,经 KBr 混合压片,采用 IFS55 红外光谱仪对其进行分析,验证结构。在 HA-C₁₈ 的 FTIR 图中,3 425 cm⁻¹ 左右的宽峰是 HA 结构中的-OH 和-COOH 的伸缩振动吸收峰重叠而成的多重吸收峰,2 917,2 850 cm⁻¹ 归属于-CH₃ 和-CH₂ 伸缩振动吸收峰,此峰强度较 HA 图谱中有显著增强,以及 1 401 cm⁻¹ 处-CH₃ 和-CH₂ 新吸收峰的出现,图谱信息均表明十八烷基成功接枝到 HA 主链上。

2.3 临界聚集浓度的测定

临界聚集浓度(CAC)是表征聚合物的自组装特性和胶束的体内外结构稳

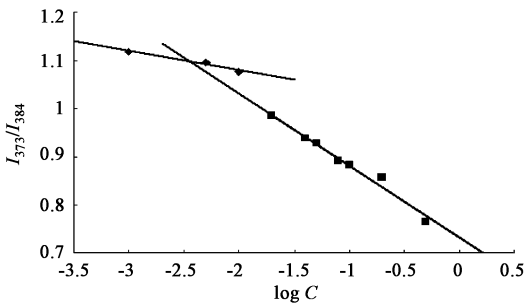
定性的重要参数。HA-C₁₈ 在水溶液中可通过疏水区域之间的相互作用形成具有内部疏水核的纳米粒,可通过苾荧光探针技术测定其 CAC。当胶束在水环境中形成时,苾倾向于扩散靠近或者进入胶束的疏水微区并发射强烈的荧光光谱。苾从水环境往胶束的疏水微区迁移,不但造成峰 1(I₁)与峰 3(I₃)荧光强度的增加,且使 I₁ 与 I₃ 比例发生变化,当胶束达到某个浓度时,I₁/I₃ 会显著降低,此时的浓度即为两性性聚合物的 CAC。

精密称定 HA-C₁₈ 10 mg,分散于蒸馏水中,探头超声 10 min(超声功率 200 W,工作 2 s,间歇 3 s)

A. HA; B. 十八烷胺; C. HA-C₁₈ 聚合物图2 HA, 十八烷胺及 HA-C₁₈ 聚合物 FTIR

后,以蒸馏水定容至 10 mL,将 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HA-C₁₈ 水溶液用水稀释成质量浓度分别为 1×10^{-3} , 5×10^{-3} , 1×10^{-2} , 2×10^{-2} , 4×10^{-2} , 5×10^{-2} , 8×10^{-2} , 1×10^{-1} , 2×10^{-1} , $5 \times 10^{-1} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HA-C₁₈ 水溶液,分别加入到经丙酮重结晶的定量苾(终浓度 $6 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$),混合液于 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴振荡过夜,采用荧光分光光度计测定苾的荧光强度。激发波长 336 nm ,发射波长 $I_1 = 373 \text{ nm}$, $I_3 = 384 \text{ nm}$ ^[5]。

以 $\log C$ 与苾在 $373, 384 \text{ nm}$ 波长处的荧光强度比值 (I_{373}/I_{384}) 作图,曲线的拐点即为 HA-C₁₈ 的 CAC 值(图 3)。测得 HA-C₁₈ 形成的胶束的 CAC 值 $10.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

图3 荧光强度 I_1/I_3 -HA-C₁₈ 聚合物质量浓度对数曲线

2.4 溶血性考察 鉴于本试验制备的胶束以静脉注射途径给药,故须考察胶束载体材料 HA-C₁₈ 聚合物的溶血性。以 2 个常用的可静脉注射的辅料 Tween 80, Cremophor EL 为参比,考察 HA-C₁₈ 的溶血性^[6]。

取新鲜兔血 4 mL,生理盐水离心 ($2500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min) 洗涤至上清液无色,移取 2 mL 血细胞混悬液到 100 mL 量瓶,生理盐水定容,得 2%

血细胞混悬液。分别配制 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Tween 80, HA-C₁₈ 和 Cremophor EL, 配制得到质量浓度为 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.5, 2, 4 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的样品溶液,摇匀,置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温水浴中。另配制 0% 溶血和 100% 溶血的样品溶液。 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 2 h 后, $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液,于 416 nm 处紫外分光光度计测定其吸收值,以空白样品为对照。按下列公式计算溶血率^[7]。

$$\text{溶血率} = \frac{A_{\text{样品}} - A_{0\%}}{A_{100\%} - A_{0\%}} \times 100\%$$

以样品终浓度为横坐标,以溶血率为纵坐标,得到溶血曲线(图 4)。质量浓度为 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, HA-C₁₈ 胶束仅溶血 13.7%, 15.7%; 而 Tween 80 组溶血 79.1%, 可见 HA-C₁₈ 胶束溶血性远远低于 Tween 80。Cremophor EL 溶血性略低于 HA-C₁₈ 胶束,但差异并不明显。因此,相对于 Tween 80 和 Cremophor EL 而言, HA-C₁₈ 是良好的可用于静脉注射的药用辅料。说明以 HA-C₁₈ 为载体制备的新型聚合物胶束系统表现出良好的自聚集特性和注射安全性。HA-C₁₈ 聚合物有望成为良好的包载 PTX 的纳米载体。

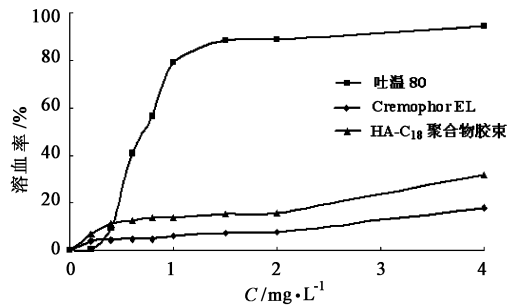


图4 Tween 80, Cremophor EL 和 HA-DOCA 空白胶束溶血百分数

3 讨论

以 EDC 和 NHS 为催化剂,通过与 HA 上的羧基生成活性酯,再与十八烷基胺上的氨基反应,形成酰胺键,合成 HA-C₁₈ 聚合物,赋予 HA 两亲性。本试验对催化剂的种类、用量,反应温度,反应时间及纯化方法等条件进行了优化,确定了最佳反应方案,以合成出纯度高,十八烷基取代度高的 HA-C₁₈ 聚合物。与天然多糖 HA 相比,疏水化修饰多糖 HA-C₁₈ 具有良好的自组装特性,同时保留了 HA 良好的生物相容性、生物可降解性等天然属性。

合成的 HA-C₁₈ 聚合物的 CAC 值远低于低分子量表面活性剂的临界胶束质量浓度(十二烷基硫酸钠在水中的临界胶束质量浓度为 $2.3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$),表明以 HA-C₁₈ 为载体材料制成的聚合物胶束在体内外具有良好的稀释稳定性。即经静脉注射进入体循环

正交试验法优选老鹳草巴布剂基质配方

宋信莉*, 刘文

(贵阳中医学院, 贵阳 550002)

[摘要] 目的: 优选老鹳草巴布剂基质配方。方法: 以成型巴布剂的黏着力、赋型性、综合感官为综合评价指标, 选取 NP700、酒石酸、PVP-K90、甘羟铝为考察因素, 采用 $L_9(3^4)$ 正交设计法评定不同材料配下巴布剂的性能。结果: 最佳基质配方为 NP700-酒石酸-PVPK90-甘羟铝 7.5:0.4:3:0.05。结论: 该巴布剂配方合理稳定, 且性能较好。

[关键词] 巴布剂; 基质; 正交试验法; 老鹳草

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)20-0052-03

Optimization of Matrix Formulation for *Geranium wilfordii* Cataplasm by Orthogonal Design

SONG Xin-li*, LIU Wen

(Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize matrix formulation of *Geranium wilfordii* cataplasm. **Method:** With adhesive force, shapability and general sensory as comprehensive evaluation index, ratio of NP700, tartaric acid, PVP-K90 and dihydroxy alumimun aminoacetate were chosen as investigated factors, $L_9(3^4)$ orthogonal experiment was used to evaluate properties of cataplasm with different materials ratio. **Result:** Optimum matrix

[收稿日期] 20120604(008)

[通讯作者] * 宋信莉, 讲师, 硕士, 从事中药药剂研究, Tel: 13765158121, E-mail: songxinli1982@126.com

后, HA-C₁₈ 胶束仍然能保持其胶束结构的完整性。

HA-C₁₈ 在水溶液中可自组装形成具有亲水外壳, 疏水内核的胶束, 当疏水性药物加入胶束水溶液时, 由于受到水的排斥力, 疏水性药物会自发进入聚合物胶束的疏水内核, 从而增加了药物在水中的溶解性。HA-C₁₈ 对难溶性药物表现出良好的增溶能力, 可作为包载难溶性药物的载体材料。

[参考文献]

- [1] Liu Y H, Sun J, Zhang P, et al. Amphiphilic polysaccharide-hydrophobicized graft polymeric micelles for drug delivery nanosystems[J]. *Curr Med Chem*, 2011, 18(17): 2638.
- [2] 蒋小红, 黄嫒, 黄雄, 等. 载药体系-聚合物胶束的应用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(10): 220.
- [3] Choi K Y, Chung H, Min K H, et al. Self-assembled hyaluronic acid nanoparticles for active tumor targeting

[J]. *Biomaterials*, 2010, 31(1): 106.

- [4] Choi K Y, Min K H, Na J H, et al. Self-assembled hyaluronic acid nanoparticles as a potential drug carrier for cancer therapy: synthesis, characterization, and *in vivo* biodistribution [J]. *J Mater Chem*, 2009, 19(24): 4102.
- [5] Xu X Y, Li L, Zhou J P, et al. Preparation and characterization of N-succinyl-N'-octyl chitosan micelles as doxorubicin carriers for effective anti-tumor activity [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2007, 55(2): 222.
- [6] 张海燕, 齐云, 廖永红, 等. 注射剂常用增容性药用辅料的安全与增溶研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(11): 1.
- [7] Gong J, Huo M R, Zhou J P, et al. Synthesis, characterization, drug-loading capacity and safety of novel octyl modified serum albumin micelles [J]. *Int J Pharm*, 2009, 376(12): 161.

[责任编辑 全燕]