

文章编号:1000-582X(2011)11-100-05

庆大霉素/水杨酸/壳聚糖复方纳米粒的制备及体外释放

季金苟,郝石磊,刘玮琦,吴丹君,徐 溢,陈际达

(重庆大学 化学化工学院,重庆 400030)

摘 要:通过壳聚糖与三聚磷酸钠的离子交联作用制备了具有拮抗庆大霉素耳毒性功效的庆大霉素/水杨酸复方壳聚糖纳米粒。用紫外分光光度计、纳米粒度仪和 Zeta 电位仪、透射电子显微镜、扫描电子显微镜、傅里叶变换红外光谱仪和 X 射线衍射仪等考察了壳聚糖纳米粒的粒径、zeta 电位、形态、载药能力及体外释放行为。结果显示复方纳米粒为球形,平均粒径为 40 nm;庆大霉素与水杨酸的包封率分别为 $(91.24 \pm 0.24)\%$ 和 $(80.75 \pm 0.15)\%$,载药量分别为 $(34.15 \pm 1.02)\%$ 和 $(38.35 \pm 0.48)\%$;在体外释放试验中,庆大霉素和水杨酸的释放都符合双指数动力学方程,实现了两者同时缓慢释放。这预示复方纳米粒可能具有拮抗庆大霉素耳毒性的功效,同时纳米粒的缓释效果也有望降低庆大霉素肾毒性的产生。

关键词:庆大霉素;耳毒性;水杨酸;壳聚糖;纳米粒

中图分类号:R978.1

文献标志码:A

Preparation of the gentamicin and salicylic acid-loaded chitosan nanoparticles and its in vitro releasing investigation

Ji Jin-gou, HAO Shi-lei, LIU Wei-qi, WU Dan-jun, XU Yi, CHEN Ji-da

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Chongqing University, Chongqing 400030, P. R. China)

Abstract: Gentamicin (GM) and salicylic acid (SA) loaded chitosan (CS) nanoparticles are prepared and used to inhibit the ototoxicity of GM. Nanoparticles are prepared via the cross-linking method by CS and sodium tripolyphosphate. The characteristics of nanoparticles such as size, zeta potential, shape, loading capacity, and in vitro release profiles are determined. The nanoparticles are spherical in shape with an average diameter of 40 nm. The entrapment efficient of GM and SA is $(91.24 \pm 0.24)\%$ and $(80.75 \pm 0.15)\%$ respectively, and loading capacity are $(34.15 \pm 1.02)\%$ and $(38.35 \pm 0.48)\%$. The drug release shows good sustained-release effect and follows ambixponent kinetic equation. It demonstrates that GM and SA loaded CS nanoparticles have promising potential effect on antagonism ototoxicity of GM, and the nephrotoxicity may be also decreased through the expected sustained-release characteristics of CS nanoparticles.

Key words: gentamicin; ototoxicity; salicylic acid; chitosan; nanoparticles

庆大霉素(Gentamicin, GM)是典型的氨基糖苷类药物,主要用于治疗革兰氏阴性菌感染,但时有 GM 不良反应的报道,如:耳毒性、肾毒性等。目前

普遍认为 GM 的耳毒性是由于其螯合 Fe^{3+} 从而催化自由基的产生而产生,自由基对耳毛细胞有损害作用^[1-2],使用自由基清除剂可以抑制 GM 耳毒

收稿日期:2011-06-15

基金项目:重庆市自然科学基金资助项目(CSTC2008BB4056);重庆大学研究生科技创新基金资助项目(201005A1A0010333);重庆大学211工程三期创新人才培养计划建设项目(S-09103)

作者简介:季金苟(1962-),男,重庆大学副教授,博士,主要从事生物材料研究,(E-mail)725_tiger@sina.com。

性^[3-4]。水杨酸(Salicylic acid, SA)是很强的自由基消除剂,相关药理与临床实验证明 SA 类药物对 GM 耳毒性具有良好的拮抗效果^[5]。如代洪等^[6]使用 SA 拮抗 GM 耳毒性,结果显示 SA 能明显减轻 GM 的耳毒性。目前使用 SA 拮抗 GM 耳毒性主要是通过分别注射 GM 和 SA 来实施。因为自由基活性极强,一旦产生就会与附近的生命大分子作用,所以自由基清除剂必须在自由基附近,并且能以较快的速度抢先与自由基结合,而分别注射 GM 与 SA,会导致两者在体内吸收分布的协同性降低,从而降低了 SA 的拮抗效果;另外,研究还发现,GM 的肾毒性与其在体内的血药浓度过高有关。为了解决上述问题,复方纳米粒可能是一个良好的选择:即同时将 GM 与 SA 包埋于纳米粒中,实现 GM 与 SA 在体内同时缓慢释放,增强两者的协同性,拮抗 GM 耳毒性;而且利用纳米粒的缓释作用,降低 GM 肾毒性。

壳聚糖(Chitosan, CS)是甲壳素经强碱水解或酶解脱去乙酰基得到的高分子碳水化合物^[7-9],CS 具有良好的生物相容性和生物降解性^[10],通过使用 CS 游离的氨基与三聚磷酸钠(Sodium tripolyphosphate, TPP)离子交联可以制备纳米粒。实验证明,普通微米级粒子注入体内后,在体内迅速被单核吞噬细胞系统中的巨噬细胞所吞噬,造成其在体内循环时间短(静脉注射后的平均半衰期为 3~5 min)。Storm 等^[11]研究发现直径小于 100 nm 的壳聚糖(Chitosan, CS)纳米粒子被巨噬细胞吸收的量可以明显减少。Mitra 等^[12]将葡聚糖-阿霉素结合物包裹在直径 100 nm 的 CS 纳米粒子中,结果表明含该结合物的 CS 纳米粒子疗效优于游离的结合物,预期寿命更长。因此,如果将 GM 包埋到纳米粒内,可望增加其在体内的预期停留时间。笔者用 CS 与 TPP 离子交联,制备了 GM/SA/CS 复方纳米粒,通过正交试验确定了复方纳米粒的最佳制备工艺,并对其进行了表征和体外释放研究。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

Techaizo 透射电子显微镜(Philips 公司,荷兰);Tecrai 10 扫描电子显微镜(Philips 公司,荷兰);5DX/550 II 傅里叶变换红外光谱仪(Nicolet 公司,美国);Nano ZS90 纳米粒度和 Zeta 电位仪(Malvern 公司,英国);Shimadzu XRD6000X 射线衍射仪(Shimadzu 制作所,日本);FD-1 冷冻干燥机;激光粒度分析仪 RISE-2008;TG-16 高速离心机;T6-新世纪紫外分光光度计;7HZ-C 恒温空气震荡器。

壳聚糖(CS,脱乙酰度 95%以上,分子量

80 KD,购自浙江金壳生物化学有限公司);庆大霉素原料药(GM,购自华北制药集团华乐有限公司);水杨酸原料药(SA,购自武汉市合中生化制造有限公司);三聚磷酸钠(TPP,购自浙江省温州市东升化工试剂厂);其余试剂为分析纯。

1.2 GM/SA/CS 复方纳米粒最佳制备工艺筛选

1.2.1 GM/SA/CS 复方纳米粒的制备

将 CS 溶于 1% 的醋酸溶液中,配制一定浓度的 GM 和 SA 溶液,缓慢加入到 CS 溶液中,用 NaOH 调至适宜 pH 值。在 700 r/min 磁力搅拌下,将 TPP 滴入上述 CS 溶液中,得 GM/SA/CS 复方纳米粒混悬液。将此混悬液于 16 000 r/min 高速离心 30 min,收集沉淀物,冷冻干燥。

1.2.2 GM/SA/CS 复方纳米粒包封率与载药量的测定

取适量的 SA/GM/CS 复方纳米粒混悬液,于 16 000 r/min 下离心 30 min,收集上清液,采用紫外双波长法分别在 248 nm 和 297 nm 测定上清液中 GM 和 SA 的含量。用空白纳米粒进行校正。GM 和 SA 的包封率与载药量的计算式为

$$\text{包封率} = \frac{x - x_i}{x} \times 100\%, \quad (1)$$

$$\text{载药量} = \frac{x - x_i}{x_n} \times 100\%, \quad (2)$$

式中: x 为 GM(或 SA)总的投药量; x_i 为上清液中游离 GM(或 SA)的量; x_n 为冷冻干燥后的纳米粒质量。

1.2.3 GM/SA/CS 复方纳米粒工艺优化

取 CS 与 TPP 的质量比(A)、投药量(B)以及 CS 溶液的 pH 值(C)为因素,每个因素取 3 个水平,按正交设计 $L_9(3^4)$ 表安排实验(见表 1)。A 中 CS 与 TPP 的浓度均为 2 mg/mL;B 为 GM 与 SA 的混合溶液,其比例为 1.0:1.5,分别考察 GM 与 SA 的载药量 2 个指标,得到最佳制备工艺。

表 1 正交设计因素水平表

水平	因素		
	A	B/mL	C/pH
1	4	1.0	4.5
2	5	2.0	5.0
3	6	3.0	5.5

1.3 GM/SA/CS 纳米粒表征分析

用激光粒度分析仪测定纳米粒的粒径分布,用 Zeta 电位仪测定纳米粒的表面 Zeta 电位;用透射电镜(Transmission electron microscopy, TEM)和扫描电子显微镜(Scan electron microscopy, SEM)观察纳米粒形态。使用傅里叶变换红外光谱仪(Fourier transform infrared spectrophotometer,

FT-IR)和 X-射线衍射仪(X-ray diffraction, XRD)分别对 CS、GM、SA 及纳米粒进行表征。

1.4 GM/SA/CS 纳米粒的体外释放实验

采用透析法考察复方纳米粒的缓释效果。取适量经冷冻干燥后的复方纳米粒,溶于 5 mL pH 7.4 磷酸盐缓冲液中,装入透析袋内,悬浮于 50 mL pH 7.4 磷酸盐缓冲液,于 37°C 转速为 100 r/min 的恒温空气震荡箱中进行透析,在固定时间取样 5 mL,同时补加相同量介质,测定样品中的 GM 与 SA 含量,计算累积释放百分率($n=3$),使用空白纳米粒进行校正。

2 结果和讨论

2.1 GM/SA/CS 复方纳米粒的制备及工艺优化

纳米粒的包封率和载药量主要取决于 CS 与 TPP 的比例,溶液的 pH 值和投药量。只有 CS 与 TPP 的比例适当,较大的投药量,适宜的 pH 值,才能使纳米粒得到较大的包封率和载药量^[13-15]。根据上述原则设计正交实验,最终得到的最佳工艺配方为:CS 与 TPP 的浓度为 2.0 mg/mL,质量比为 5:1,投药量为 3 mL,CS 溶液的 pH 为 5。在最佳工艺

条件下制备的复方纳米粒,测得 GM 与 SA 的包封率分别为 $(91.24 \pm 0.24)\%$ 和 $(80.75 \pm 0.15)\%$,载药量分别为 $(34.15 \pm 1.02)\%$ 和 $(38.35 \pm 0.48)\%$ ($n=3$)。

2.2 GM/SA/CS 纳米粒的表征分析

由粒度分布图(见图 1)可以看出,复方纳米粒的平均粒径为 40 nm 左右;从 TEM 观察到纳米粒的形态是球形(见图 2(a)),粒径在 60 nm 左右,从 SEM 观察到的纳米粒和从 TEM 观察到的相仿(见图 2(b)),与使用激光粒度仪测定的结果基本相符。所制备的小粒径纳米粒具有特殊的优越性,可以延长药物在体内的循环时间,提高药物的生物利用度。复方纳米粒的 Zeta 电位为 +30.25 mV(见图 3),说明复方纳米粒具有较厚的双电子层,稳定性良好^[16]。

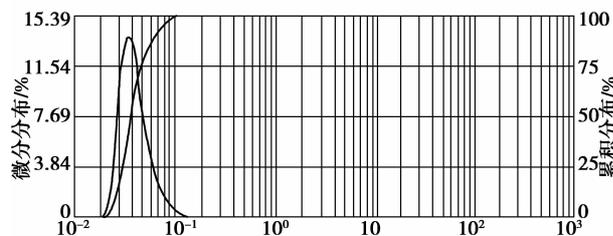


图 1 GM/SA/CS 纳米粒的粒径分布

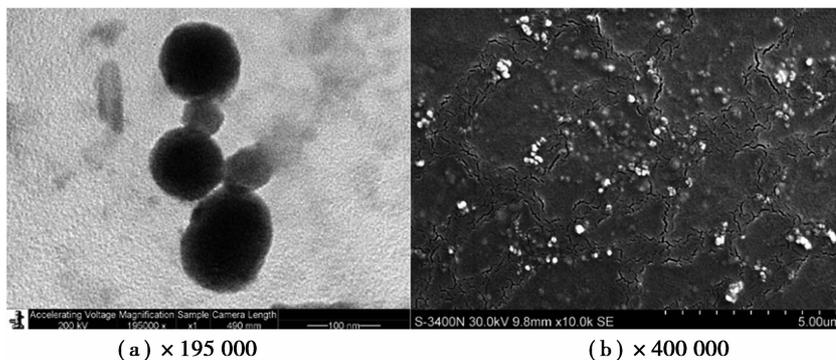


图 2 GM/SA/CS 纳米粒的 TEM 图

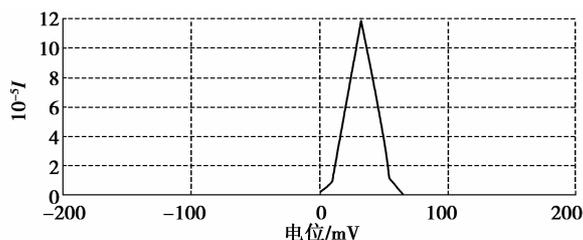


图 3 GM/SA/CS 纳米粒的 Zeta 电位图

图 4 为 CS、SA、GM 和 GM/SA/CS 复方纳米粒的 FTIR 图谱,从图 4 A 线可以看出, 1601.7 cm^{-1} 为 CS 氨基吸收峰, 1078 cm^{-1} 和 1031 cm^{-1} 分别是 $\text{C}_3\text{-OH}$ 和 $\text{C}_6\text{-OH}$ 的 C—O 伸缩振动的吸收峰,

3426 cm^{-1} 为 —OH 伸缩振动峰与 —NH₂ 振动吸收峰而增宽的多重吸收峰,在 1659 cm^{-1} 附近并没有出现酰胺 I 谱带峰,这可能是因为使用的 CS 的脱乙酰度较高所致。

图 4 B 线为 GM/SA/CS 复方纳米粒的红外图谱,在 CS 的 1601.7 cm^{-1} 的氨基吸收峰上位置出现了 1637.8 cm^{-1} 和 1542.9 cm^{-1} 2 个裂分吸收峰,这是因为 CS 的氨基与 GM 或者 SA 的 —OH 结合所致,在 1078 cm^{-1} 和 1031 cm^{-1} 的 $\text{C}_3\text{-OH}$ 与 $\text{C}_6\text{-OH}$ 的 C—O 峰出现了红移,可能是 CS 的 —OH 与 GM 的 —NH₂ 或者 —OH 以及 SA 的 —OH 产生了氢键的作用力,使得 C—O 键之间的作用力减弱所致。

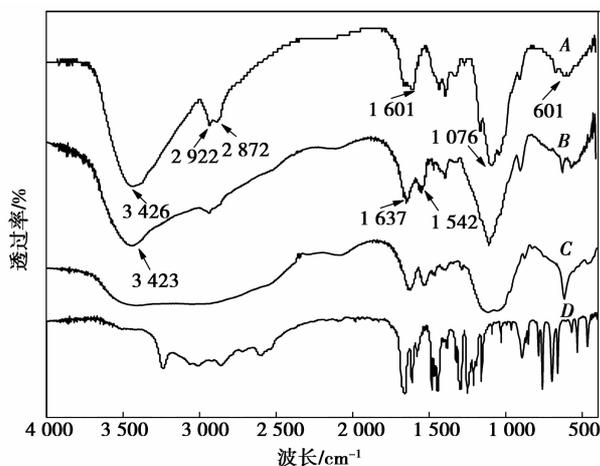


图 4 CS(A)、复方纳米粒(B)、GM(C)和 SA(D)的傅里叶红外图谱

图 4 C 线和图 4 D 线分别为 GM 和 SA 的红外图谱,但从图 4 B 线中均未明显发现这两者的特征吸收峰,这可能表明 SA 和 GM 的量相对较少所致。

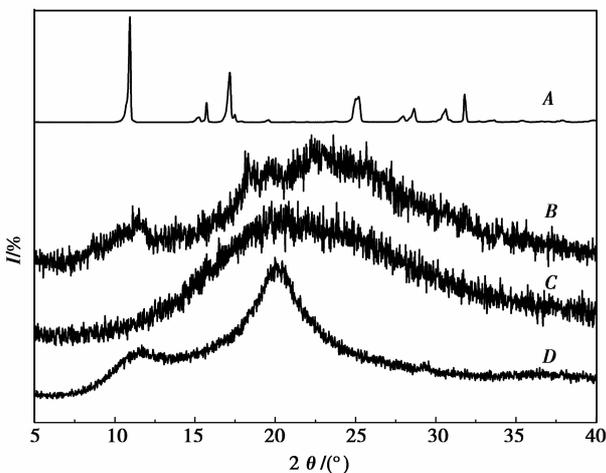


图 5 SA(A)、CS(B)、GM(C)和纳米粒(D)的 XRD 图谱

图 5 为 CS、SA、GM 和 GM/SA/CS 复方纳米粒的 XRD 图谱,从图上可以看到 SA 有很强的晶体吸收峰(见图 5 A 线);CS 呈现弱晶体特征,于 11°和 20°有 2 个吸收峰(见图 5 B 线);GM 的为无定性(见图 5 C 线)。当 SA 与 GM 被包埋进纳米粒后,CS

的晶型减弱,并且几乎看不到 GM 与 SA 的特征峰(见图 5 D 线),这可能说明在制得的复方纳米粒中,GM、SA 可能较好地分散进入了 CS 纳米粒中。

2.3 GM/SA/CS 复方纳米粒的体外释放试验

图 6 为 GM/SA/CS 复方纳米粒的体外释放曲线。GM 和 SA 的释放过程包括 2 个阶段:第 1 个阶段是吸附在纳米粒表面的药物快速释放,在前 1 h 大约释放了 30% 的药物;第 2 个阶段药物的缓慢释放是由于药物的扩散作用和聚合物的降解,在 72 h 大约有 90% 的药物从纳米粒进行了释放。

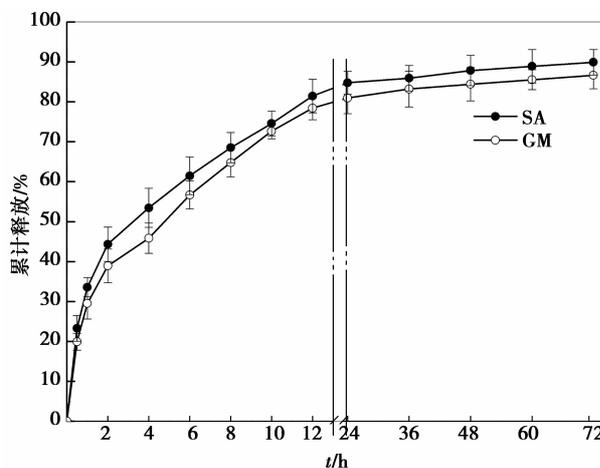


图 6 纳米粒中的 GM 与 SA 在 pH7.4 磷酸缓冲液中体外释放曲线(n=3)

在前期的释放过程中,可能是由于 SA 的分子量比 GM 小,SA 的释放速度要快一些,而这对 SA 拮抗 GM 耳毒性是有益的:即当 GM 释放时,其周围环境中已存在部分 SA,可有效拮抗 GM 产生的自由基。

药物释放模型方程常见的有零级动力学方程、一级动力学方程、Higuchi 释药方程以及双指数动力学方程。分别使用上述四种模型模拟 GM 与 SA 的释放过程,结果见表 2。

从表 2 可以看出,GM/SA/CS 复方纳米粒中 GM 与 SA 的释放行为与双指数动力学方程的拟合度最高,说明 GM 与 SA 的释放行为并不是一个单一的释放过程。

表 2 GM 与 SA 的体外释放动力学

模型	SA		GM	
	拟合方程	R	拟合方程	R
零级动力学	$Q_t = 0.8975t + 44.169$	0.7332	$Q_t = 0.9381t + 37.981$	0.7634
一级动力学方程	$\ln(1 - Q_t/Q_\infty) = -0.0312x - 0.6569$	0.8899	$\ln(1 - Q_t/Q_\infty) = -0.0272x - 0.541$	0.8714
Higuchi 方程	$Q_t = 9.947t^{1/2} + 27.691$	0.8779	$Q_t = 9.749t^{1/2} + 21.403$	0.8978
双指数动力学方程	$1 - Q_t = 0.6206\exp(-0.4211t) + 0.3392\exp(-0.0257t)$	0.9852	$1 - Q_t = 0.7429\exp(-0.1622t) + 0.1786\exp(-0.0047t)$	0.9748

一般认为,SA与GM的注射剂量比大于1.0:1.2时,SA能有效拮抗GM产生的耳毒性^[17],在本复方纳米粒72h内的释药过程中,SA与GM的释放量均大于1.0:1.0,在理论上可以满足拮抗庆大霉素耳毒性的效果。

3 结论

通过CS与TPP的离子交联作用制备出了GM/SA/CS复方纳米粒,纳米粒的平均粒径为40nm左右;TEM观察到的纳米粒为球形;制备的纳米粒GM与SA的包封率分别为(91.24±0.24)%和(80.75±0.15)%;FTIR和XRD证明GM和SA可能发生了较好地包埋;GM和SA在体外释放试验都符合双指数动力学方程,两者在体外释放前期有少量突释现象出现,而后同时进行缓慢释放,这预示复方纳米粒可能较好地拮抗庆大霉素的耳毒性,同时GM的缓释效果有望避免体内血药浓度过高的现象,从而有效抑制GM肾毒性的产生。

参考文献:

- [1] BRENDA R, EDWINA W, JOCHEN S. Morphological evidence of ototoxicity of the iron chelator deferoxamine [J]. *Hearing Research*, 1997, 112(1/2):44-48.
- [2] SONG B B, SHA S H, JOCHEN S. Iron chelators protect from aminoglycoside-induced cochleo-and vestibulo-toxicity [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 1998, 25(2):189-195.
- [3] ANDRA E T, JOCHEN S, NATHAN F G. Molecular and genetic aspects of aminoglycoside-induced hearing loss [J]. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, 2006, 3(1):119-124.
- [4] CHONG Y H, TAURA A, PAK K, et al. Generation of highly- reactive oxygen species is closely related to hair cell damage in rat organ of corti treated with gentamicin [J]. *Neuroscience*, 2009, 161(1):214-226.
- [5] CHEN Y, HUANG W G, ZHA D J, et al. Aspirin attenuates gentamicin ototoxicity: from the laboratory to the clinic [J]. *Hearing Research*, 2007, 226(1/2): 178-182.
- [6] 代洪,伍伟景,田丰,等.水杨酸钠中耳灌注对庆大霉素耳毒性的防护作用[J].*中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2007, 13(1):21-24.
DAI HONG, WU WEI-JING, TIAN FENG, et al. Protective effects of sodium salicylate via middle ear instillation on the ototoxicity of gentamicin [J]. *Chinese Journal of Otorhinolaryngology- Skull Base Surgery*, 2007, 13(1):21-24.
- [7] 祝连彩,王伯初.壳聚糖在中草药液澄清中的应用[J].*重庆大学学报:自然科学报*, 2003, 26(12):55-57.
ZHU LIAN-CAI, WANG BO-CHU. Application of chitosan to technology of clarification for Chinese traditional medicine extraction [J]. *Journal of Chongqing University: Natural Science Edition*, 2003, 26(12):55-57.
- [8] 付敏,任建敏,吴四维.壳聚糖/PVA微粒对Cr(VI)的吸附平衡与动力学[J].*重庆建筑大学学报*, 2006, 28(3):89-92.
FU MIN, REN JIAN-MIN, WU SI-WEI. Adsorption properties and kinetics of Cr(VI) on chitosan/PVA micro-particles [J]. *Journal of Chongqing Jianzhu University*, 2006, 28(3):89-92.
- [9] 任建敏,欧忠文.壳聚糖/PVA微粒吸附对PNP的热力学与动力学[J].*重庆建筑大学学报*, 2007, 29(3): 95-98.
REN JIAN-MIN, OU ZHONG-WEN. Thermodynamics and kinetics of p-nitrophenol sorption by chitosan/PVA micro-particles from water [J]. *Journal of Chongqing Jianzhu University*, 2007, 29(3):95-98.
- [10] 陈欣,胡燕,蔡开勇,等.基因活化聚乳酸表面工程的初步研究[J].*重庆大学学报*, 2008, 31(1):93-96.
CHEN XIN, HU YAN, CAI KAI-YONG, et al. Preliminary studies on the gene-activated poly (D,L-lactic acid) (PDLA) surface [J]. *Journal of Chongqing University*, 2008, 31(1):93-96.
- [11] STORM G, BELLLOT S, DAEMEN T, et al. Surface modification of nanoparticles to oppose uptake by the mononuclear phagocyte system [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1995, 17(1):31-48.
- [12] MITRA S, GAUR U, GOSH P C, et al. Tumor targeted delivery of encapsulated dextran-doxorubicin conjugate using chitosan nanoparticles as carrier [J]. *Journal of Controlled Release*, 2001, 74(1/3):317-323.
- [13] YAOWALAK B, AMPOL M, BERND W M. Chitosan drug binding by ionic interaction [J]. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2006, 62(3):267-274.
- [14] JI J G, HAO S L, LIU W Q, et al. Preparation, characterization of hydrophilic and hydrophobic drug incombine loaded chitosan/cyclodextrin nanoparticles and in vitro release study [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2010, 83(1):103-107.
- [15] JI J G, HAO S L, ZHANG J F, et al. Preparation of chitosan/ cyclodextrin/ trisodium citrate nanoparticles for the poor water drug carrier material [J]. *Advanced Materials Research*, 2011, 152/153: 1356-1359.
- [16] MOHAMMAD R A, ASSAL M S, NASSER M, et al. Preparation and in vitro evaluation of mucoadhesion and permeation enhancement of thiolated chitosan-pHEMA core-shell nanoparticles [J]. *Nanomedicine*, 2009, 5(2): 58-63.
- [17] SONG B B, JOCHEN S. Variable efficacy of radical scavengers and iron chelators to attenuate gentamicin ototoxicity in guinea pig in vivo [J]. *Hear Research*, 1996, 94(1/2):87-93.