

# 载纳豆激酶的三甲基壳聚糖纳米粒的制备及体外释放度研究<sup>△</sup>

廖杰\*,任晓婷,尹宗宁<sup>#</sup>(四川大学华西药学院靶向药物与释药系统教育部重点实验室,成都 610041)

中图分类号 R943 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)31-4403-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.31.25

**摘要** 目的:制备载纳豆激酶(NK)的三甲基壳聚糖(TMC)纳米粒(TMC-NK-NPs),并研究其体外释放度。方法:合成季胺化度分别为15%、20%、25%的TMC(即TMC15、TMC20、TMC25),将其与NK自组装形成TMC-NK-NPs。测定TMC-NK-NPs的粒径、多分散系数(PDI)、Zeta电位,筛选TMC;观察并测定最优处方制备的TMC-NK-NPs的形态、包封率、载药量、4℃避光下30 d的稳定性、24 h内的体外累积释放度(Q)及NK活性。结果:采用TMC20所制TMC-NK-NPs的粒径较小[(161.0±4.8) nm],PDI最小(0.204),Zeta电位为(19.2±1.5) mV,呈球形或类球形;包封率为(45.4±1.51)%,载药量为(14.2±0.25)%;30 d内相对稳定;峰值 $Q_{12h}$ 为92.3%;NK活性在1 h时就达到最大(76.6%),但随着时间延长,活性降低。结论:成功制得形态圆整、包封率与载药量较高,且具有较好缓释作用的TMC-NK-NPs。

**关键词** 三甲基壳聚糖;纳豆激酶;纳米粒;体外释放度;制备

## Preparation of Nattokinase-loaded Trimethyl Chitosan Nanoparticles and Study on Its Release Rate *in vitro*

LIAO Jie, REN Xiaoting, YIN Zongning (Key Lab of Drug Targeting and Drug Delivery, Ministry of Education, West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To prepare nattokinase (NK)-loaded trimethyl chitosan (TMC) nanoparticles (TMC-NK-NPs), and to study its release rate *in vitro*. METHODS: TMC with different degree of quaternization (15%, 20%, 25%) were synthesized, i.e. TMC15, TMC20, TMC25; those were combined with NK to form TMC-NK-NPs by self-assembly. The particle size, polydispersity index (PDI) and Zeta potential were determined and TCM was screened; the morphology, entrapment efficiency (EE), drug-loading amount, 30 d stability at 4℃ and dark place, 24 h accumulative release rate *in vitro* (Q) and NK activity of TMC-NK-NPs by optimal formulation were observed and determined. RESULTS: Using TMC20, TMC-NK-NPs were smaller in particle size [(161.0±4.8) nm], the lowest in PDI (0.204); the Zeta potential was (19.2±1.5) mV, spherical or spherical-like, EE was (45.4±1.51)%, drug-loading amount was (14.2±0.25)%, stable within 30 d, the peak  $Q_{12h}$  was 92.3%. The maximum released activity of NK was 76.6% at 1 h, but then gradually decreased with time. CONCLUSIONS: TMC-NK-NPs are prepared successfully, round and complete with high EE and drug-loading amount, good sustained-release property.

**KEYWORDS** Trimethyl chitosan; Nattokinase; Nanoparticles; Release rate *in vitro*; Preparation

血栓的形成是心脑血管疾病发病的主要原因,溶栓治疗是治疗血栓病最有效的方法<sup>[1]</sup>,目前主要治疗方法是静脉溶栓治疗。但临床应用的各种溶栓药物血浆半衰期短、靶向性不强,易引起体内出血等并发症<sup>[2]</sup>。纳豆激酶(Nattokinase, NK)作为一种新型溶栓药物,不仅在体内外有强烈的溶栓作用,而且还能诱导内源性溶栓<sup>[3]</sup>,但作为蛋白类药物,其在体内易降解失活。壳聚糖(CS)是自然界来源第二大丰富的亲水性多糖,生物相容性好,无不良反应,是良好的生物相容性材料<sup>[4]</sup>。其弱酸水溶液具有高黏性,带正电荷,已被广泛用于药物载体和医用辅料<sup>[5]</sup>。CS季胺化修饰后得到三甲基壳聚糖(TMC),其在更广泛的pH范围内都具有良好的溶解性<sup>[6]</sup>。目前用于研究自组装载药纳米粒的蛋白有内皮生长因子、卵清蛋白、胰岛素等<sup>[7-9]</sup>。本研究采用NK与TMC自组装形成纳米粒(TMC-NK-NPs),通过将NK制备成纳米给药系统,可以提高其稳定性、延长其体内半衰期、避免出血等副作用,使其更有效地治疗血栓类疾病。

## 1 材料

△基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81373338)

\* 硕士研究生。研究方向:缓控释给药系统。电话:028-85503617。E-mail:liaojiemu09@163.com

# 通信作者:教授,博士。研究方向:缓控释给药系统。电话:028-85502917。E-mail:yzn@scu.edu.cn

## 1.1 仪器

Unity Inova 400核磁共振仪(美国Varian公司); Cary 100紫外分光光度计(天美科学仪器有限公司); Varioskan Flash化学发光仪(美国Thermo Scientific公司); NanoSizer ZS90激光粒度分析仪(英国马尔文公司); H-6001V透射电子显微镜(日本Hitachi公司)。

## 1.2 药品与试剂

NK原料药(美国National Enzyme公司,批号:20130524,酶活性:40 000 FU/g); CS(上海瑞永生物科技有限公司,分子量:150 kDa); 二喹啉甲酸(BCA)蛋白浓度测定试剂盒(江苏碧云天生物科技有限公司); 对甲基苯磺酰-L-精氨酸甲酯(TAME,阿达玛斯试剂有限公司); 其余试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 TMC的合成与表征

采用一步合成法,制备不同季胺化度(DQ)的TMC。称取CS 2 g和碘化钠(NaI) 4.8 g,加入80 ml N-甲基-2-吡咯烷酮,在避光条件下60℃冷凝回流,反应2 h;向反应液中加入15%的氢氧化钠(NaOH) 11 ml和碘甲烷(CH<sub>3</sub>I) 11.5 ml,继续避光冷凝回流反应1~3 h。将反应液用乙醇沉淀,4 000 r/min(离心半径10.0 cm)离心10 min,再乙醚清洗沉淀,同上条件离心分离沉淀后溶于去离子水中,先后在氯化钠(NaCl)溶液和去离子水中透析3 d,冷冻干燥即得白色海绵状固体TMC<sup>[10]</sup>。取少量冻干后的TMC样品溶于0.5 ml重水(D<sub>2</sub>O)中,通过<sup>1</sup>H核磁

共振(<sup>1</sup>H-NMR)进行分析,计算TMC的DQ(%)=( $\int$ TM/ $\int$ H)×1/9×100%,式中 $\int$ TM是在3.2~3.4 ppm范围内季胺化氨基的积分; $\int$ H是在4.7~5.7 ppm范围内<sup>1</sup>H峰的积分<sup>[1]</sup>,控制DQ分别约为15%、20%、25%的TMC,即TMC15、TMC20、TMC25。TMC15、TMC20和TMC25的<sup>1</sup>H-NMR图见图1。

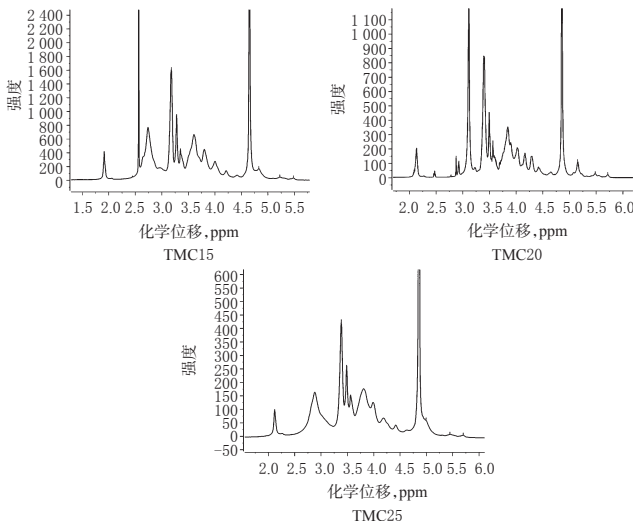


图1 TMC15、TMC20和TMC25的<sup>1</sup>H-NMR图

Fig 1 <sup>1</sup>H-NMR spectra of TMC15, TMC20 and TMC25

## 2.2 TMC-NK-NPs的制备

通过初步处方筛选,确定了NK溶液的pH为9.0,TMC与NK按相同质量浓度、等体积混合,可以得到较好的TMC-NK-NPs。将带负电荷的NK溶液(pH 9.0)与带正电荷的不同DQ的TMC(TMC15、TMC20和TMC25)等体积混合后,搅拌20 min,静置20 min,通过静电作用自组装形成稳定的TMC-NK-NPs,其pH为8.3~8.5。

## 2.3 TMC-NK-NPs的表征

采用激光粒度分析仪分别测定TMC-NK-NPs样品的粒径分布、多分散系数(PDI)、Zeta电位。设置测定粒径参数,温度为25℃,平衡时间为1 min,取1 ml样品加入样品池,重复测定样品3次,取平均值。设置测定电位参数,温度为25℃,取0.1 ml样品加入1 ml水稀释后注入电位测定样品池,确保无气泡,重复测定样品3次,取平均值。不同DQ的TMC所制TMC-NK-NPs的粒径分布、PDI、Zeta电位的测定结果见表1。

表1 不同DQ的TMC所制TMC-NK-NPs的粒径、PDI、Zeta电位的测定结果

Tab 1 Particle size, PDI and Zeta potential of TMC-NK-NPs prepared by TMC with different degree of quaternization

处方	TMC15, mg/ml	TMC20, mg/ml	TMC25, mg/ml	NK, mg/ml	粒径, nm	PDI	Zeta电位, mV
1	1.0	0	0	1.0	219.6	0.397	12.3
2	0	1.0	0	1.0	138.8	0.357	12.1
3	0	0	1.0	1.0	118.2	0.366	15.7
4	2.0	0	0	2.0	248.0	0.302	16.3
5	0	2.0	0	2.0	161.0	0.204	19.2
6	0	0	2.0	2.0	135.2	0.312	20.6
7	3.0	0	0	3.0	264.0	0.343	18.5
8	0	3.0	0	3.0	180.3	0.282	22.3
9	0	0	3.0	3.0	120.5	0.274	22.4

以粒径和PDI为指标筛选TMC-NK-NPs的处方。由表1可见,按处方5所制备的TMC-NK-NPs的粒径较小、PDI最小,

故选择处方5为最优处方。按最优处方制备TMC-NK-NPs,测得其粒径为(161.0±4.8) nm,Zeta电位为(19.2±1.5) mV。其粒径和Zeta电位分布见图2。

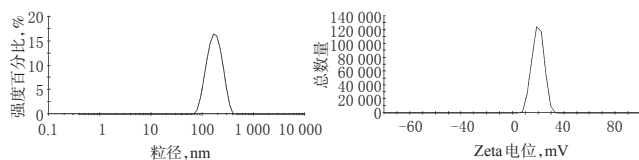


图2 TMC-NK-NPs的粒径和Zeta电位分布

Fig 2 Particle size and Zeta potential distribution of TMC-NK-NPs

## 2.4 TMC-NK-NPs形态的观察

采用透射电子显微镜观察最优处方制备的TMC-NK-NPs的形态。将TMC-NK-NPs样品静置于铜网上,经过1%乙酸铀染色10 min,再用适量滤纸吸走多余染液,自然晾干后在透射电镜下观察。结果显示,TMC-NK-NPs呈球形或类球形,分布较均匀。TMC-NK-NPs的透射电镜图见图3。

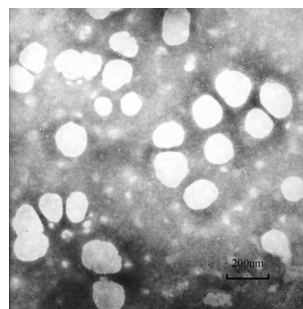


图3 TMC-NK-NPs的透射电镜图

Fig 3 TEM image of TMC-NK-NPs

## 2.5 TMC-NK-NPs包封率和载药量的测定

采用超滤法测定TMC-NK-NPs的包封率和载药量。将TMC-NK-NPs混悬液置于300 kDa的超滤离心管,在4℃下12 000 r/min(离心半径8.2 cm)离心15 min,取外管中滤过液,采用BCA蛋白浓度测定试剂盒测定游离NK的含量。按公式计算包封率和载药量:包封率(%)=(NK总量-游离NK的量)/NK总量×100%,载药量(%)=(NK总量-游离NK的量)/TMC-NK-NPs干质量×100%。结果显示,TMC-NK-NPs的包封率为(45.4±1.51)%,载药量为(14.2±0.25)%。

## 2.6 TMC-NK-NPs稳定性考察

将TMC-NK-NPs混悬液置于具塞西林瓶密封,4℃避光条件下储存,分别于0、1、2、7、14、30 d取样,用激光粒度分析仪测定粒径和PDI。结果显示,TMC-NK-NPs在放置过程中粒径逐渐增大,但PDI始终小于0.3,表明其在30 d内相对稳定。4℃避光下TMC-NK-NPs的粒径、PDI随时间变化曲线见图4。

## 2.7 TMC-NK-NPs体外释放考察

取8个5 ml加盖离心管,每个试管加入3 ml磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.4),全部置于37℃水浴锅,分别加入0.5 ml TMC-NK-NPs混悬液,100 r/min恒温振荡<sup>[12]</sup>。分别在0、0.5、1、2、4、8、12、24 h依次从离心管中取0.5 ml溶液至2.0 ml的超滤离心管内,4℃下12 000 r/min(离心半径8.2 cm)离心15 min,取外管滤过液,用BCA蛋白浓度测定试剂盒测定游离NK含量。试验重复3次,获得上述时间点所测NK平均值,绘制NK释放曲线。结果显示,TMC-NK-NPs在4 h内迅速释放NK达到83.8%,在12 h达到最大释放度92.3%,在12 h后,NK累积释

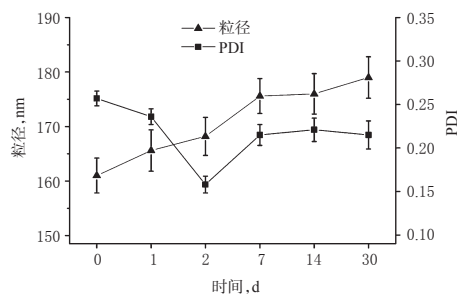


图4 4 °C避光下TMC-NK-NPs的粒径、PDI随时间变化曲线图  
Fig 4 Change curves for particle size and PDI of TMC-NK-NPs at 4 °C and dark place

放度缓慢减少。其原因可能是NK在释放条件下放置时间过长,少量的NK发生降解;另外,还可能是高分子材料TMC表面带有一定的正电荷,又将NK吸附回去,导致累积释放度降低。TMC-NK-NPs的体外释放曲线见图5。

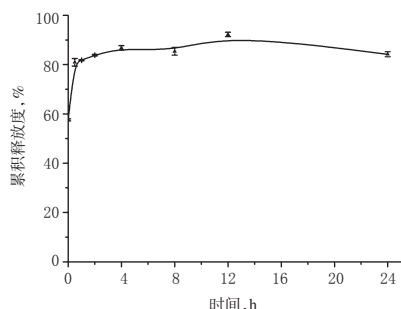


图5 TMC-NK-NPs的体外释放曲线  
Fig 5 Release curve of TMC-NK-NPs in vitro

### 2.8 体外释放NK的相对活性测定

采用TAME底物法测定NK的活性。其测定原理是:有活性的NK能催化TAME分解产生甲醇,其分解速度与NK的量成正比;分解产生的甲醇被高锰酸钾(KMnO<sub>4</sub>)氧化成甲醛,甲醛与变色酸反应生成蓝紫色复合物,此复合物在574 nm波长处有最大紫外吸收,可用于定量计算NK的相对活性。取TMC-NK-NPs混悬液,测定同“2.7”项下释放条件下释放出的NK活性。结果显示,TMC-NK-NPs在缓慢释放过程中,1 h内NK活性逐渐增加,且达到最大(76.6%),这是因为这段时间内NK累积释放度不断增加;1 h后NK活性逐渐降低,这说明在37 °C、100 r/min恒温振荡条件下NK在磷酸盐缓冲液(PBS)中不稳定。TMC-NK-NPs的释放活性曲线见图6。

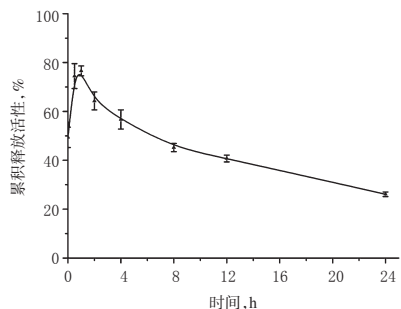


图6 TMC-NK-NPs的释放活性曲线  
Fig 6 Release activity curve of TMC-NK-NPs

## 3 讨论

包封率是评价纳米粒的一项重要指标,测定包封率的方法包括葡聚糖凝胶过滤法、透析法、离心法、超滤法。由于NK是一种混合物,分子质量为20~30 kDa,葡聚糖凝胶分离效果

不好。透析法需要较大截留分子质量的透析袋,且透析介质中游离的NK浓度较低,不便于测定。另外NK分子质量较大,直接采用高速离心取上层清液测定游离的NK含量,NK含量会随着离心时间的延长而减少,说明NK会因高速离心沉淀到试管底部,导致计算的包封率偏高。所以,本研究采用超滤离心管测定包封率,测定结果较为准确。

采用高分子聚合物和蛋白药物自组装,筛选大量处方,成功制备了TMC-NK-NPs。该制备方法简单,无需复杂设备,避免了有机溶剂、超声、加热等对蛋白稳定性的影响。制得的纳米粒粒径在纳米级,PDI也较小。测定纳米粒包封率和体外释放均采用了超滤管高速离心(12 000 r/min),若降低离心速度至6 000 r/min,则需要较长离心时间才能过滤完全,但两种条件下包封率相差不大,故采用时间较短的高速离心。体外释放采用透析袋释放时,由于高分子材料TMC的吸附作用,在100 kDa的透析袋中NK不能完全释放,最大释放度不超过50%,所以释放方法改为直接在释放介质中释放药物。笔者将CS甲基化得到的TMC直接溶于水,避免了加入有机溶剂对蛋白稳定性产生影响。TMC表面正电荷较高,能更好地包裹吸附溶液中带负电荷的NK。制备的TMC-NK-NPs可用于iv给药,相对于po给药,能避免首关效应;另外由于纳米粒载体对NK具有保护作用,而且粒径较小,能避免巨噬细胞的吞噬,提高药物疗效。本研究不足之处是,自组装方法制备的TMC-NK-NPs包封率不高,有待进一步改进。

### 参考文献

- [1] Absar S, Choi S, Ahsan F, et al. Preparation and characterization of anionic oligopeptide-modified tissue plasminogen activator for triggered delivery: an approach for localized thrombolysis[J]. *Thromb Res*, 2013, 131(3):e91.
- [2] Mattila OS, Sairanen T, Laakso E, et al. Cerebral amyloid angiopathy related hemorrhage after stroke thrombolysis: case report and literature review[J]. *Neuropathology*, 2015, 35(1):70.
- [3] Wei X, Luo M, Liu H. Preparation of the antithrombotic and antimicrobial coating through layer-by-layer self-assembly of nattokinase-nanosilver complex and polyethyleneimine[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2014, doi: 10.1016/j.colsurfb.2014.01.034.
- [4] Sawaengsak C, Mori Y, Yamanishi K, et al. Chitosan nanoparticle encapsulated hemagglutinin-split influenza virus mucosal vaccine[J]. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2014, 15(2):317.
- [5] Bernkop-Schnürch A, Dünnhaupt S. Chitosan-based drug delivery systems[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2012, 81(3):463.
- [6] 郭哈,龚涛,黄园.黏液层对不同季铵化度的三甲基壳聚糖口服纳米粒的影响[J]. *中国药学杂志*, 2014, 49(13):1 147.
- [7] Huang M, Vitharana SN, Peek LJ, et al. Polyelectrolyte complexes stabilize and controllably release vascular endothelial growth factor[J]. *Biomacromolecules*, 2007, 8(5):1 607.
- [8] Cegnar M, Kerc J. Self-assembled polyelectrolyte nanocomplexes of alginate, chitosan and ovalbumin[J]. *Acta Chim Slov*, 2010, 57(2):431.
- [9] Song L, Zhi ZL, Pickup JC. Nanolayer encapsulation of insulin-chitosan complexes improves efficiency of oral in-

# 雪松松针总皂苷的超声提取工艺优选及体外抗肿瘤活性研究<sup>Δ</sup>

李 师<sup>1,2\*</sup>, 雷艳萍<sup>1</sup>, 石晓峰<sup>1,3#</sup>, 刘东彦<sup>3</sup>, 王斌利<sup>1</sup>, 张莉霞<sup>1</sup> [1. 甘肃中医药大学药学院/甘肃省高校中(藏)药化学与质量研究省级重点实验室, 兰州 730030; 2. 北京中医药大学药学院, 北京 100029; 3. 甘肃省医学科学研究院药物研究所, 兰州 730050]

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)31-4406-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.31.26

**摘要** 目的: 优选雪松松针总皂苷的超声提取工艺, 并考察其体外抗肿瘤活性。方法: 采用紫外分光光度法测定雪松松针总皂苷的含量。在单因素试验基础上, 以乙醇体积分数、液料比、提取时间为因素, 根据 Box-Behnken 设计进行试验, 以雪松松针总皂苷含量为响应值进行响应面分析, 对雪松松针总皂苷的超声提取工艺进行优化。考察所制雪松松针总皂苷对人肺癌 A549 细胞、人肝癌 HepG2 细胞和人胃癌 MKN45 细胞增殖的影响, 并计算半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>)。结果: 优选工艺为乙醇体积分数 73%, 液料比 13:1, 提取 2 次、每次 65 min; 以此工艺所得雪松松针总皂苷平均含量为 6.693 mg/g, 与预测值 6.508 mg/g 的相对误差为 2.84%。雪松松针总皂苷对 A549、HepG2、MKN45 细胞的增殖均有抑制作用, 且呈明显的浓度依赖性, IC<sub>50</sub> 分别为 (63.98 ± 6.79)、(154.91 ± 10.20)、(176.32 ± 14.26) μg/ml。结论: 优选的雪松松针总皂苷的超声提取工艺合理、可行; 其对 A549、HepG2、MKN45 细胞增殖均有一定的抑制作用, 其中对 A549 细胞作用最为明显。

**关键词** 雪松松针; 总皂苷; 超声提取工艺; Box-Behnken 响应面法; 抗肿瘤活性; 体外

## Optimization of the Ultrasonic Extraction Technology of Total Saponins from Pine Needle of *Cedrus deodara* and Study on Its *in vitro* Antitumor Activity

LI Shi<sup>1,2</sup>, LEI Yanping<sup>1</sup>, SHI Xiaofeng<sup>1,3</sup>, LIU Dongyan<sup>3</sup>, WANG Binli<sup>1</sup>, ZHANG Lixia<sup>1</sup> (1. School of Pharmacy, Gansu University of TCM/Key Laboratory of Chemistry and Quality of TCM of the College of Gansu Province, Lanzhou 730030, China; 2. School of Pharmacy, Beijing University of TCM, Beijing 100029, China; 3. Institute of Materia Medica, Gansu Academy of Medical Science, Lanzhou 730050, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To optimize the ultrasonic extraction technology of total saponins from pine needles of *Cedrus deodara* (TSPNCD), and to investigate its *in vitro* antitumor activity. METHODS: The content of TSPNCD was determined by UV spectrophotometry. Based on single factor test, ethanol volume fraction, solvent-material ratio and extraction time were selected as influential factors during ultrasonic extraction. According to Box-Behnken design, using the content of TSPNCD as response value, response surface analysis was conducted and used to optimize the ultrasonic extraction technology of TSPNCD. The effects of TSPNCD on the proliferation of human lung cancer A549 cells, human hepatocellular carcinoma HepG2 cells and human gastric cancer MKN45 cells were detected, and IC<sub>50</sub> of them were calculated. RESULTS: Optimal technology was that extraction solvent was 73% ethanol; solvent-material ratio was 13:1; ultrasonic extraction times was twice, each time for 65 min. Under the above conditions, the average content of TSPNCD reached 6.693 mg/g, and relative error between it and predicted value (6.508 mg/g) was 2.84%. TSPNCD inhibited the growth of A549 cells, HepG2 cells and MKN45 cells in a dose-dependent manner, with the IC<sub>50</sub> values of (63.98 ± 6.79), (154.91 ± 10.20), (176.32 ± 14.26) μg/ml, respectively. CONCLUSIONS: The ultrasonic extraction technology was verified as reasonable and feasible. TSPNCD has certain inhibitory effect on the proliferation of A549 cells, HepG2 cells and MKN45 cells, especially for A549 cells.

**KEYWORDS** Pine needles of *Cedrus deodara*; Total saponins; Ultrasonic extraction technology; Box-Behnken response surface methodology; Antitumor activity; *in vitro*

sulin delivery[J]. *Int J Nanomedicine*, 2014, doi: 10.2147/IJN.S59075.

[10] Sieval A, Thanou M, Verhoef J, et al. Preparation and

Δ 基金项目: 甘肃省科技支撑计划项目 (No. 甘财教[2012]197 号); 兰州市人才创新创业项目 (No. 2014-RC-62); 甘肃省高校中(藏)药化学与质量研究省级重点实验室开放基金项目 (No. zzy-2015-02)

\* 博士研究生。研究方向: 中药化学及中药制剂质量标准。电话: 0931-2302664。E-mail: 736663549@qq.com

# 通信作者: 主任药师。研究方向: 中药化学及中药制剂质量标准。电话: 0931-2302664。E-mail: shixiaofeng2005@sina.com

NMR characterization of highly substituted n-trimethyl chitosan chloride[J]. *Carbohydrate Polymers*, 1998, 36 (2): 157.

[11] 于书海, 王军, 何文. 不同季铵化程度的 N-三甲基壳聚糖对双氯芬酸钠体外经皮吸收的影响研究[J]. *中国药师*, 2013, 16(3): 337.

[12] 叶仕锋, 陈日来, 李玉珍, 等. 他克莫司类脂囊泡的构建及表征[J]. *中国药房*, 2015, 26(34): 4 853.

(收稿日期: 2016-01-29 修回日期: 2016-03-25)

(编辑: 邹丽娟)