

壳聚糖-羧甲基壳聚糖凝胶的温敏性及体外药物缓释试验

林友文, 庄小慧, 李光文, 康建军(福建医科大学药学院, 福州 350004)

摘要: 目的 研究壳聚糖/羧甲基壳聚糖/甘油磷酸钠(CS/CMCS/GPS)体系水凝胶的温敏性, 载药凝胶以及共混 β -环糊精(β -CD)包合物对药物的缓释性能。方法 试管倒置法研究不同配比, 不同 pH 值对 CS/CMCS/GPS 体系温敏凝胶化性能的影响; 饱和水溶液法制备吲哚美辛/ β -CD 包合物, 红外光谱表征包合物; 紫外分光光度法测定包合物载药量和药物的累积释放度。结果 2%CS-2%CMCS-56%GPS 体积比从 10:1:2 变为 10:10:2 (体系 pH 6.8), 37 °C 下凝胶化时间由 370 s 升至 490 s, 后又降至 90 s; 三者体积比从 10:3:1 变为 10:3:6 (体系 pH 6.8), 37 °C 下凝胶化时间从 407 s 降至 66 s。pH 值在 6.8~7.2 范围适合于体系凝胶化。调节体积比及合适的 pH 值, 在 37 °C 下可实现 CS/CMCS/GPS 体系快速凝胶化。以吲哚美辛和吲哚美辛/ β -CD 包合物为模型药物, 载有吲哚美辛温敏凝胶 12 h 的累积释放度为 65.2%, 载有吲哚美辛/ β -CD 包合物温敏凝胶累积释放度为 52.8%, 而吲哚美辛原药 12 h 的累积释放度为 87.6%, 吲哚美辛/ β -CD 包合物的累积释放度为 82.1%。结论 一定体积配比 CS/CMCS/GPS 体系在 37 °C 具有快速凝胶特性, β -CD 包合物与温敏性凝胶共混, 对药物具有更加明显的缓释作用。

关键词: 壳聚糖; 温敏性; 吲哚美辛; β -环糊精; 缓释

中图分类号: R943.41 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2010)07-0626-05

Temperature Sensitivity and Sustained *in Vitro* Drug Release of Chitosan-Carboxymethylchitosan Hydrogel

LIN Youwen, ZHUANG Xiaohui, LI Guangwen, KANG Jianjun (College of Pharmacy, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China)

ABSTRACT: **OBJECTIVE** To investigate temperature sensitivity of chitosan(CS)/carboxymethylchitosan(CMCS)/glycerphosphate(GPS) hydrogel and study drug release profile of CS/CMCS/GPS hydrogel loading indomethacin and indomethacin/ β -cyclodextrin inclusion complex. **METHODS** Using the method of inversion of test tube, temperature sensitivity of CS/CMCS/GPS hydrogel was studied under different ratio of CS and CMCS and GPS at various pH of the mixture solutions. β -cyclodextrin inclusion complex of indomethacin was prepared and characterized by IR. Drug loading and cumulative release of drug was detected by ultraviolet spectrophotometry. **RESULTS** The gelation time (GT) of CS/CMCS/GPS hydrogel was first increased from 370 s to 490 s and then decreased to 90 s at the condition of 37 °C and pH 6.8 when the ratio in volume of 2%CS-2%CMCS-56%GPS from 10:1:2 to 10:10:2. The GT was within 66-407 s when the volume ratio of CS-CMCS-GPS was from 10:3:1 to 10:3:6. The suitable pH to gelate for CS/CMCS/GPS system was at 6.8-7.2. This system could rapidly be gelated at 37 °C under the appropriate volume ratio of CS/CMCS/GPS and pH. The *in vitro* dissolution showed that the cumulative release at 12 h of thermosensitive CS/CMCS/GPS gel loading indomethacin or indomethacin/ β -cyclodextrin inclusion complexes was 65.2% and 52.8%, respectively, which was significantly lower than that of raw indomethacin for 87.6% and inclusion compound of indomethacin for 82.1%. **CONCLUSION** CS/CMCS/GPS system with appropriate the volume ratio and pH can be gelable fastly at 37 °C. Thermosensitive gel incorporating β -CD inclusion compound of drug showed more significant sustained release, and can be a good potential drug carrier for temperature sensitive and sustained drug delivery system.

KEY WORDS: chitosan; thermosensitive; indomethacin; β -cyclodextrin; sustained release

温度敏感性在体原位凝胶给药系统是指以液体给药后, 在药用部位因温度变化刺激(体温 37 °C)而发生固化或形成凝胶, 从而控制药物的释放, 已成为药剂学及生物材料领域研究的热点^[1-3]。可用于眼部给药、鼻腔给药、局部注射给药等^[4], 有效减少药物损失, 延长药物作用时间, 能大大改

善药物的生物利用度^[5]。可作组织修复植入给药, 既是组织缺损填充材料, 同时又作为药物释放载体^[6], 使载入药物只在病变组织部位释放, 不会在其他正常部位产生不良反应。

研究发现壳聚糖(2-氨基-2-脱氧- β -D-葡萄糖, CS)/甘油磷酸钠(glycerphosphate, GPS)体系水凝胶

基金项目: 福建省自然科学基金计划资助项目(C0710026)

作者简介: 林友文, 男, 教授, 硕士 Tel: (0591)83340296

E-mail: linhumor@sina.com

具有温敏性,并用于药物控释系统,但对小分子药物的缓释作用不明显^[7],且有些配方在 37 °C 下凝胶化时间太长^[8],在临床应用上有一定的局限性。CS 及其水溶性的衍生物羧甲基壳聚糖(carboxymethylchitosan, CMCS)具有良好生物相容性,可生物降解性,来源丰富等特点,在药物控释、智能生物材料等方面具有良好的应用前景。本试验研究在 37 °C 下可快速凝胶化的 CS/CMCS/GPS 体系,并通过 β -环糊精(β -cyclodextrin, β -CD)对非甾体抗炎药吲哚美辛进行包合,比较吲哚美辛及其 β -CD 包合物在温敏凝胶中外药物释放行为,以期有更佳的药物缓释作用。

1 材料与仪器

UV-2450 紫外分光光度计(日本岛津公司), ZRS-8G 智能溶出试验仪(天津大学无线电厂)。UV-9200 可见紫外分光光度计(南京昕航科学仪器有限公司), Avatar 330FT-IR 红外光谱仪(美国 Nicolet 公司), AL104 电子分析天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司)。SK-1 型快速混匀器(江苏医疗仪器厂), 501 型超级恒温器(上海实验仪器厂有限公司), pHS-3B 精密 pH 计(深圳市誉达科技有限公司)。

CS[脱乙酰度 95%,黏度 35 cpa·s (1%),大连鑫蝶甲壳素有限公司,本试验使用的 CS 均指以 0.1 mol·L⁻¹ 的 HCl 为溶剂配制的 2%CS 溶液], CMCS[黏度 750 cpa·s (3%),大连鑫蝶甲壳素有限公司,本试验使用的 CMCS 均指 2%CMCS 水溶液], GPS (美国 Alfa Aesar 公司,本试验使用的 GPS 均指 56%GPS 水溶液),吲哚美辛(福建闽东力捷迅药业有限公司,批号: 070917,纯度: 98.5%), β -CD(上海国药集团),其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 CS/CMCS/GPS 体系温敏性试验

1 g CS 溶解在 50 mL 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液中,配制 2%CS 溶液,移取一定体积该溶液于试管中,按比例逐滴加入 2%CMCS 水溶液和 56%GPS 溶液,振荡混匀后,以少量的 NaOH 溶液(0.02 mol·L⁻¹)调节混合液的 pH 值。放入水浴恒温器中,参照文献[9]用试管倒置法研究 CS/CMCS/GPS 体系的配比、pH 值及温度等条件对体系凝胶化性能的影响。即将装有 CS/CMCS/GPS 体系混合液的试管直立置于恒温水浴中,每隔约 30 s 将试管 45° 倾斜,并观察液面是否随试管倾斜,当观察到液面不随

着试管倾斜 45° 而倾斜,则再恒温约 30 s 后,将试管取出并完全倒置,若 15 s 内试管内溶液不再流动,则定义该溶液已凝胶固化,记录该温度下体系由液态转变为固态所需要的时间,即凝胶化时间(GT)。

2.1.1 不同配比对 GT 影响 在 37 °C, pH 6.8 时,CS-GPS 体积比固定为 10 : 2(2 mL : 0.4 mL),改变 CMCS 体积用量对 GT 的影响见图 1。CS-CMCS-GPS 体积比从为 10 : 1 : 2 变为 10 : 4 : 2,GT 不断延长,出现一个 GT 的最高点。而后随 CS-CMCS-GPS 体积比从 10 : 4 : 2 变为 10 : 8 : 2,GT 不断缩短。

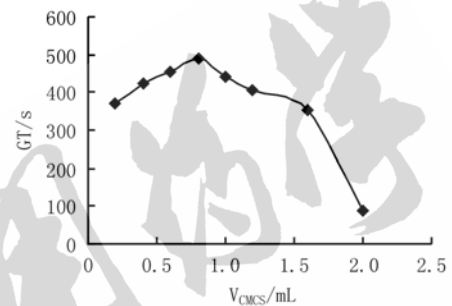


图 1 不同 CMCS 体积用量对 GT 的影响

Fig 1 Influence of volume of CMCS on GT

在 37 °C, pH 6.8 时,CS-CMCS 体积比为 10 : 3(2 mL : 0.6 mL),改变 GPS 用量对 GT 的影响见图 2。当 GPS 用量小于 0.4 mL 时,体系在 1 200 s 内不凝胶。随着 GPS 用量的增大,GT 不断缩短。

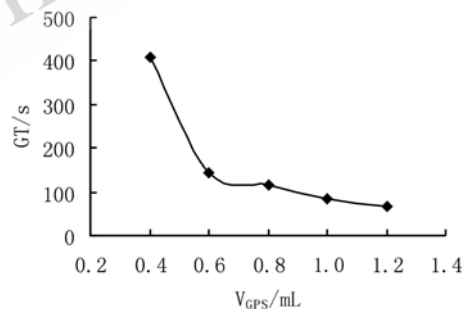


图 2 不同 GPS 体积用量对 GT 的影响

Fig 2 Influence of volume of GPS on GT

2.1.2 pH 对 GT 影响 CS-CMCS-GPS 体积比为 10 : 3 : 3 时,在 37 °C 下,不同 pH 对胶凝时间 GT 的影响见表 1。

第 1, 2, 3, 4 管在 1 200 s 内不胶凝,将水浴温度逐渐升高至 60 °C 时,第 3, 4 管有胶凝趋势但并不胶凝。表明 CS/CMCS/GPS 体系快速温敏凝胶的合适 pH 值范围为 pH 6.8~7.2。

表 1 不同 pH 值对 GT 的影响

Tab 1 Influence of pH on GT

管号	pH	GT
1	5.0	1 200 s 内不胶凝
2	5.5	1 200 s 内不胶凝
3	6.0	1 200 s 内不胶凝
4	6.5	1 200 s 内不胶凝
5	6.8	160 s
6	7.2	87 s
7	7.4	相分离, 不胶凝

2.1.3 温度对 GT 影响 不同体积比 CS/CMCS/GPS 混合液(pH 6.8)的 GT 随不同温度变化结果见表 2。

表 2 温度对 CS/CMCS/GPS 体系 GT 的影响

Tab 2 Influence of temperature on GT of CS/CMCS/GPS system

温度/ °C	体积比为 10:3:2 时 GT/s	体积比为 10:4:2 时 GT/s	体积比为 10:5:2 时 GT/s
25	1 200 s 不胶凝	1 200 s 不胶凝	1 200 s 不胶凝
30	1 200 s 不胶凝	1 200 s 不胶凝	1 200 s 不胶凝
35	585	527	465
37	454	490	440
42	196	169	112

实验结果表明, 选定的 3 组不同配比的 CS/CMCS/GPS 体系, 凝胶化时间均随温度升高而减少, 在 37 °C 时均显现快速凝胶化的特性。

2.2 吡啶美辛/ β -CD 的包合物制备、表征及载药量测定

2.2.1 吡啶美辛/ β -CD 的包合物制备、表征 按文献[10]方法制备吡啶美辛/ β -CD 的包合物。KBr 压片法对吡啶美辛、 β -CD 以及吡啶美辛/ β -CD 包合物进行红外光谱检测, 吡啶美辛/ β -CD 包合物的 IR 光谱不同于 β -CD 和吡啶美辛, 包合物中 $1\ 646.31\ \text{cm}^{-1}$ 出现了苯环骨架的吸收峰, $3\ 215.44\ \text{cm}^{-1}$ 处的 OH 振动吸收峰有明显增强, 吡啶美辛 $500\sim 850\ \text{cm}^{-1}$ 的指纹区吸收峰有明显的位移和变化, 说明吡啶美辛和 β -CD 的包合作用, 而不是简单的物理混合。

称取一定量的吡啶美辛及吡啶美辛/ β -CD 包合物, 分别用含 5%乙醇的 pH 7.4 磷酸盐缓冲液溶解并定容, 配制成 $50\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的吡啶美辛溶液, 同法配制 β -CD 溶液。以含 5%乙醇的 pH 7.4 磷酸盐缓冲液为空白对照, 在 $200\sim 400\ \text{nm}$ 对以上溶液进行 UV 扫描。分别绘制 UV 吸收曲线图, 吡啶美辛和吡啶美辛/ β -CD 的吸收曲线基本一

致, 而 β -CD 在 $320\ \text{nm}$ 处无吸收, 故选定吡啶美辛的测定波长为 $320\ \text{nm}$ 。

2.2.2 吡啶美辛/ β -CD 包合物的载药量及包封率测定

按文献[11]方法建立标准曲线, 检测波长 $320\ \text{nm}$ 测定吡啶美辛/ β -CD 包合物中吡啶美辛含量及药物体外累积释放度。

精确配制浓度 $1.0\sim 50\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的吡啶美辛溶液, 将浓度对测得的吸收度进行回归得标准曲线方程: $A=0.018\ 5C+0.009\ 8$, $r=0.999\ 8$ 。在其范围内线性良好。根据标准曲线求得吡啶美辛/ β -CD 包合物中吡啶美辛载药量为 32.65%。吡啶美辛的包封率为 18.50%。

2.3 载药凝胶的制备及体外药物释放试验

2.3.1 载药凝胶的制备 由温敏性试验选定体积比 10:3:3 的 CS/CMCS/GPS 体系制备载药凝胶和空白凝胶。精确称取一定量吡啶美辛于试管中, 加入 2% CS 溶液和 2% CMCS 溶液, 振荡使药物溶解后, 逐滴加入 56% GPS 并混匀, 放入 $37\ ^\circ\text{C}$ 水浴中使其凝胶化, 制成载有吡啶美辛的凝胶。同法制备载有吡啶美辛/ β -CD 包合物凝胶以及空白凝胶(不加吡啶美辛)。

2.3.2 体外药物释放实验 将一定量载药凝胶小心地从试管中移至一端已封口的透析袋中, $5\ \text{mL}$ PBS(pH 7.4)淋洗试管, 淋洗液转入透析袋中, 并扎紧另一端封口。将透析袋放入转篮中, 以 $195\ \text{mL}$ 的 PBS(pH 7.4)为溶出介质, 在转速为 $100\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 温度为 $(37\pm 0.5)\ ^\circ\text{C}$ 下进行溶出实验。定时取样 $5\ \text{mL}$, 并及时补充 $37\ ^\circ\text{C}$ 的 PBS $5\ \text{mL}$ 。以 PBS 为空白对照, 在 $320\ \text{nm}$ 处测定各时间点处的吸光度 A 以及空白凝胶的吸光值 $A_{\text{空白}}$, 载药凝胶中溶出的药物吸光值 $A_{\text{药物释放}}=A_{\text{载药凝胶}}-A_{\text{空白}}$, 代入标准曲线计算浓度 C , 求各时间点处载药凝胶中药物累积释放度。同法测定吡啶美辛/ β -CD 包合物以及吡啶美辛原药在相同条件下体外释放的累积释放度。均平行实验 3 次, 以平均值表示。

结果显示, 载有吡啶美辛温敏凝胶 12 h 的累积释放度为 65.2%, 载有吡啶美辛/ β -CD 包合物温敏凝胶累积释放度为 52.8%, 而吡啶美辛原药 12 h 的累积释放度为 87.6%, 吡啶美辛/ β -CD 包合物累积释放度为 82.1%, 见图 3。表明凝胶包埋及 β -CD 包合均有一定的缓释作用, 而 β -CD 的包合和温敏凝胶的共混包埋对吡啶美辛具有更明显的缓释效果。

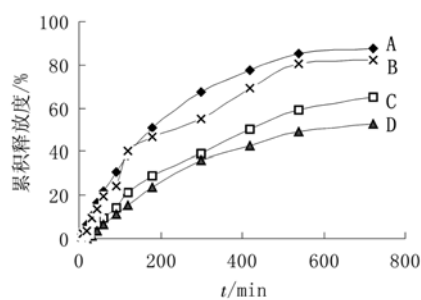


图3 累积释放曲线

A-吲哚美辛原药; B-吲哚美辛/ β -CD 包合物; C-吲哚美辛载药凝胶;
D-吲哚美辛/ β -CD 包合物载药凝胶

Fig 3 Cumulate releasing curves

A-raw indomethacin; B-indomethacin/ β -CD inclusion complex; C-gel loading indomethacin; D-gel loading indomethacin/ β -CD inclusion complex

3 讨论

CS 分子内富含氨基和羟基,可形成氢键,因此 CS 不溶于水和有机溶剂,但可溶于(稀)酸溶液中,CS 经改性得到其水溶性衍生物 CMCS。它们在生物医用材料、药物制剂方面应用日趋广泛^[1-2, 9]。GPS 为弱碱性化合物(pKa 6.34),含羟基和磷酸根负离子,是对人体安全的双官能团阴离子偶联剂,可使壳聚糖溶液凝胶化,形成三维凝胶网络。凝胶网络的形成与环境温度有关,凝胶机制一般是认为与凝胶中存在的静电作用,氢键及亲、疏水平衡有关^[1,12]。

在 CS/CMCS/GPS 体系中主要存在着静电作用平衡、氢键作用平衡以及 CS 的疏水作用。这些相互作用力的平衡会随温度的改变而改变,CS/CMCS/GPS 水凝胶体系从而表现出温度敏感性^[1]。在温度高于低临界析相温度(lower critical solution temperature, LCST)时,弱碱性的 GPS 可以成功地夺取 NH_3^+ 上的质子,使 CS 分子链间氢键作用增强,同时 CS 与水之间氢键作用减弱,疏水作用占主导地位,于是 CS 分子链交联形成凝胶^[13]。当体系中 CS/GPS 配比一定时,随着 CMCS 同量增大,引入的羧甲基增多,羧基负离子与氨基的吸引力、羧基与磷酸根的离子斥力均增大,不利于 GPS 夺取 NH_3^+ 上的质子,因此体系的 GT 随 CMCS 同量增加升高,并出现一最大值,随后继续增加 CMCS 用量,则使 CS 与 GPS 之间的作用力逐渐减弱,CMCS 与 GPS 之间的作用力成为主导,CMCS 中的羧甲基负离子也发挥类似磷酸根负离子的交联基团作用,导致体系 GT 的降低^[14]。表 2 中 3 组不同配比的 CS/CMCS/GPS 体系的 GT

均随温度升高减少,也同样说明羧甲基的引入影响凝胶体系温敏性。

体系中 CS/CMCS 比例固定,随着 GPS 用量比的增加,GPS 夺取更多 NH_3^+ 质子,加速减弱 CS 链间静电斥力和增加氢键作用,使体系在 37 °C 下凝胶化时间减少。但用量增大到一定时(如 56% GPS 与 2% CS 等体积混合),因中和电荷、溶液碱性增加及达到溶解饱和等因素使混合液中的 CS 沉淀析出。

显然 pH 值对 CS/CMCS/GPS 体系凝胶化也有影响,当 $\text{pH} > 7.2$ 时,因 CS 的溶解性降低而沉淀析出。当 $\text{pH} 5\sim 6$ 时,壳聚糖链上的部分氨基质子化,链间存在较大的静电斥力而阻碍了链间氢键的形成,使得 CS/CMCS/GPS 体系凝胶化的温度升高,而 $\text{pH} < 5$ 时,氨基质子化程度提高,同时抑制 CMCS 羧基及 GPS 磷酸质子解离,CS 链以 NH_3^+ 基团的静电排斥占主导,不易交联凝胶化。故 CS/CMCS/GPS 体系快速凝胶化的较佳 pH 范围为 6.8~7.2。

研究发现 CS/GPS 温敏凝胶系统对小分子药物缓释作用较差,相对分子质量为 1.2~1.48 万的药物在此系统中能缓慢释放数天,而相对分子质量小于 1000 的小分子亲水性药物在此系统中数小时就完全释放^[7]。原因可能是该凝胶具有较大的网络孔道,含水量大,小分子药物容易从中扩散逸出,但把药物以脂质体形式包埋在温敏凝胶中,可有效延长小分子药物的释放时间^[15]。

β -CD 具有一定尺寸的疏水空腔,利用疏水作用力、氢键和范德华力等作用力可与众多的有机药物分子形成包合物,在药物缓、控释新剂型中已有应用^[16]。本试验通过 β -CD 包合药物吲哚美辛,一方面可提高难溶性药物吲哚美辛的水溶性和稳定性^[17],另一方面是将包合物载入温敏凝胶可进一步延缓药物的释放。经 β -CD 包合的吲哚美辛再包埋于凝胶中,药物的释放须先从 β -CD 的圆筒形结构中解离,再经凝胶网络通道扩散进入溶出介质,故释放更加缓慢。

不同配比的 CS/CMCS/GPS 体系在 37°C 时均有快速凝胶化的特性,材料均具有良好的生物相容性,CS/CMCS/GPS 凝胶体系是温度敏感性缓释给药系统的理想载体,温敏体系与 β -CD 包合共混具有更显著的药物缓释效果。

REFERENCES

- [1] CHENITE A, CHAPUT C, WANG D, et al. Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ [J]. *Biomaterials*, 2000, 21(21): 2155-2161.
- [2] RUEL-GARIEPY E, JEAN-CHRISTOPHE L. In situ-forming hydrogels: review of temperature-sensitive systems [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2004, 58(2): 409-426.
- [3] LIU X M, WANG L S, WANG L, et al. The effect of salt and pH on the phase-transition behaviors of temperature-sensitive copolymers based on *N*-isopropylacrylamide [J]. *Biomaterials*, 2004, 25(25): 5659-5666.
- [4] WEI G, XU H, ZHENG J M. In situ gels: the mechanism of formation and its application in controlled-release drug delivery [J]. *Chin Pharm J (中国药学杂志)*, 2003, 38(8): 564-568.
- [5] KAMEL A H. *In vitro* and *in vivo* evaluation of Pluronic F127-based ocular delivery system for timolol maleate [J]. *Int J Pharm*, 2002, 241(1): 47-55.
- [6] DONG J, JIANG S G, PING Q N. Development of injectable biodegradable in-situ forming gel implants [J]. *Prog Pharm Sci (药学进展)*, 2007, 31 (3): 109-113.
- [7] RUEL-GARIEPY E, SHIVE M, BICHARA A, et al. A thermosensitive chitosan-based hydrogel for the local delivery of paclitaxel [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2004, 57 (1): 53-63.
- [8] JIANG W L, LI Z, DONG J X, et al. Preparation and thermo-sensitivity of the hydrogels based on chitosan [J]. *Shanghai J Biomed Eng (上海生物医学工程)*, 2002, 23(2): 19-21.
- [9] JEONG B, BAE Y H, KIM S W. Thermoreversible gelation of PEG-PLGA-PEG triblock copolymer aqueous solutions [J]. *Macromolecules*, 1999, 32 (21): 7064-7069.
- [10] CUI D F. *Pharmacy (药剂学)* [M]. 6th ed. Beijing: People's Health Press, 2007: 230.
- [11] FENG C Y, YAO F, LI X F, et al. Preparation of sustained-release capsules containing indomethacin and its study of eluting rate *in vitro* [J]. *Pharm J Chin PLA (解放军药学报)*, 2000, 16 (4): 195-196, 223.
- [12] WINNIK F M. Fluorescence studies of aqueous solutions of poly (*N*-isopropylacrylamide) below and above their LCST [J]. *Macromolecules*, 1990, 23(2): 233-242.
- [13] ZENG R, FENG Z C, SMITH R, et al. Exploring study of chitosan/glycerophosphate thermosensitive hydrogel with variable-temperature NMR [J]. *Acta Chim Sin (化学学报)*, 2007, 65 (21): 2459-2465.
- [14] WU Y, CHENG G X, QU B. Preparation of the thermo-sensitive transparent hydrogels based on a carboxymethyl-chitosan complex [J]. *Polym Mater Sci Eng (高分子材料科学与工程)*, 2006, 22 (3): 223-226.
- [15] RUEL-GARIEPY E, LECLAIR G, HILDGEN P, et al. Thermo-sensitive chitosan based hydrogel containing liposomes for the delivery of hydrophilic molecules [J]. *J Controlled Release*, 2002, 82 (3): 373-383.
- [16] SHIMPI S, CHAUHAN B, SHIMPI P. Cyclodextrins: Application in different routes of drug administration [J]. *Acta Pharm*, 2005, 55 (1): 139-156.
- [17] BACKENFELD T, MULLER B W, WIESE M, et al. Effect of cyclodextrin derivatives on indomethacin stability in aqueous solution [J]. *Pharm Res*, 1990, 7(5): 484-490.

收稿日期: 2009-08-10