

N-(4-咪唑甲基)-羟乙基壳聚糖自组装胶束载槲皮素的研究

夏晓静^{1,2}, 胡英², 金江², 徐蓓华², 周建平^{1*}

(¹中国药科大学药剂学教研室, 南京 210009; ²浙江医药高等专科学校, 宁波 315100)

摘要 为了提高天然黄酮类化合物槲皮素的水溶性, 将天然高分子材料壳聚糖进行两亲性衍生化制成 *N*-(4-咪唑甲基)-羟乙基壳聚糖(MHC), 作为槲皮素自组装聚合物胶束载体, 并采用¹H NMR、元素分析法、芘荧光光谱法等进行表征; 同时采用单因素考察法进行了MHC-槲皮素胶束的工艺优化。结果表明, 载体浓度为0.67%、槲皮素与MHC质量比为1:10时可以获得粒径为(99.21 ± 1.71) nm, Zeta电位为+(20.01 ± 0.72) mV, 载药量为(5.42 ± 0.32)%的聚合物胶束; 其体外释药曲线符合Higuchi方程 $Q = 0.110 t^{1/2} - 0.064$ 。槲皮素胶束和槲皮素溶液剂静脉注射给药后, 在大鼠体内平均滞留时间分别是21.42和0.30 h, AUC₀₋₁分别为57.49和2.50 μg·h/mL, 表明采用MHC为载体材料的槲皮素自组装胶束具有较好的增溶、缓释以及提高生物利用度的作用, 可作为槲皮素等抗肿瘤药物的载体。

关键词 槲皮素; *N*-(4-咪唑甲基)-羟乙基壳聚糖; 自组装胶束; 药代动力学

中图分类号 R944 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2017)01-0046-07

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20170107

引用本文 夏晓静, 胡英, 金江, 等. *N*-(4-咪唑甲基)-羟乙基壳聚糖自组装胶束载槲皮素的研究[J]. 中国药科大学学报, 2017, 48(1): 46-52.

Cite this article as: XIA Xiaojing, HU Ying, JIN Jiang, *et al.* Research on self-assembly micelles of *N*-(4-methylimidazole)-hydroxyethyl-chitosan loading quercetin[J]. *J China Pharm Univ*, 2017, 48(1): 46-52.

Research on self-assembly micelles of *N*-(4-methylimidazole)-hydroxyethyl-chitosan loading quercetin

XIA Xiaojing^{1,2}, HU Ying², JIN Jiang², XU Beihua², ZHOU Jianping^{1*}

¹Department of Pharmaceutics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009;

²Zhejiang Pharmaceutical College, Ningbo 315100, China

Abstract To improve the solubility of quercetin (QT), one of flavonoids that can inhibit the proliferation of various types of cancer cells, the novel amphiphilic polymer *N*-(4-methylimidazole)-hydroxyethyl-chitosan (MHC), synthesized by chemical derivatization from chitosan, was used as the self-assembly micelles of QT. The formed polymer was characterized by ¹H NMR, elemental analysis and pyrene fluorescence spectrometry. The formulation of MHC micelles loading quercetin was optimized through single factor experiment. Then the optimized formulation was obtained as follows: the concentration of MHC was 0.67% and the ratio of drug and carrier was 1:10. The micelles particle size was (99.21 ± 1.71) nm, Zeta potential was +(20.01 ± 0.72) mV and drug loading was (5.42 ± 0.32)%. The *in vitro* release curve was investigated and was found to conform to Higuchi equation of $Q = 0.110 t^{1/2} - 0.064$. The results of *in vivo* experiment showed that the mean retention time and bioavailability of the MHC-QT micelles were 21.42 h and 57.49 μg·h/mL, respectively, compared to 0.30 h and 2.50 μg·h/mL of the free QT solution. These indicated that the MHC micelles could significantly improve the solubility of QT, the drug sustained-release effect and bioavailability, which would used as carrier for the anti-tumor drugs.

收稿日期 2016-10-13 *通信作者 Tel:025-83271102 E-mail:zhoujianp60@163.com

基金项目 宁波市自然科学基金资助项目(No. 2014A610203, No. 2014A610212); 浙江省教育厅课题资助项目(No. Y201226180); 宁波市科技创新团队资助项目(No. 2015C110027)

Key words quercetin; *N*-(4-methylimidazole)-hydroxyethyl-chitosan; self-assembly micelles; pharmacokinetics

This study was supported by Ningbo Municipal Natural Science Foundation (No. 2014A610203, No. 2014A610212); the Foundation of Zhejiang Provincial Department of Education (No. Y201226180); and the Science and Technology Innovation Team Project of Ningbo Science and Technology Bureau (No. 2015C110027)

在水果和蔬菜中广泛存在一种天然的黄酮类化合物——槲皮素(quercetin, QT), 研究结果表明, 槲皮素对于多种肿瘤细胞均具有显著抑制作用^[1-2]。然而槲皮素自身水溶性较差, 制成制剂时如采用表面活性剂进行增溶, 容易产生血管舒张、昏睡、心动过速、低血压等超敏反应, 患者顺应性差, 影响其抗肿瘤作用的发挥。

壳聚糖(chitosan, Cs)是由虾、蟹等甲壳类动物的外壳脱乙酰化而得, 是自然界唯一大量存在的高分子碱性氨基多糖, 具有良好的生物相容性和生物可降解性。壳聚糖分子链上带有大量活性氨基和羟基, 易于化学修饰。控制不同的合成条件和方法, 可制备具有不同特性的壳聚糖衍生物^[3-5]。在壳聚糖分子的伯氨基上易于接枝各种亲油性小分子, 引入了疏水基团, 即形成带有疏水长链的两亲性壳聚糖衍生物, 在水中可以自发形成纳米胶束, 成为具有保护药物、控制释放、体内被动靶向等特点的优良载体。

然而, 药物通过胶束运送进入细胞内后, 并不能保证稳定发挥药效, 药物还需经历内涵体吞噬, 并在内涵体进一步演变为溶酶体时被降解。质子海绵效应是由能在质子化条件下具有高缓冲能力且易于膨胀的试剂介导产生, 其中富含组氨酸的分子由于组氨酸上的咪唑环质子化后表现出缓冲效应, 可引发内涵体膜破裂从而实现内涵体逃逸^[6]。槲皮素作用机制是通过降低凋亡抑制基因 *Bcl-2* 表达、增加促凋亡蛋白 *Bax* 的数量、上调抑癌基因 *PTEN* 表达来诱导肿瘤细胞凋亡, 对二氢乳清酸脱氢酶, 二氢叶酸还原酶和胸苷酸合成酶等均具有一定的抑制作用, 因而使其从内涵体逃逸可更有效地发挥抗肿瘤作用^[7]。基于以上原因, 本研究以槲皮素为模型药物, 并以壳聚糖为母体, 对其进行结构改造, 制备成新型两亲性衍生化聚合物——*N*-(4-咪唑甲基)-羟乙基壳聚糖[*N*-(4-Methylimidazole)-hydroxyethyl-chitosan, MHC], 使其具有增溶、缓控释及引发内涵体破裂等功能。

1 材料

1.1 试剂

4-咪唑甲醛(1*H*-imidazole-4-carbaldehyde, 南京爱里凯德化工有限公司, 批号 2014010801); 壳聚糖(Cs, 50 kD, 脱乙酰度 95%, 浙江金壳药业有限公司); 槲皮素(标准品, 批号 E1527120)、槲皮素(纯度 97%)、苾(阿拉丁试剂公司); 甲醇、乙腈(色谱纯, 天津四友精细化学品有限公司); 环氧乙烷、硼氢化钠(化学纯, 国药集团化学试剂有限公司); 其他试剂均为市售分析纯。

1.2 仪器

XS105DU 电子天平(瑞士梅特勒公司); Ultimate 3000 高效液相色谱仪(美国戴安公司); JY92-IID 超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司); R-215 旋转蒸发仪(瑞士 Buchi 公司); Zetasizer Nano ZS90(英国马尔文公司); RF-5301 荧光分光光度计、Veeco3100 扫描探针显微镜(日本岛津公司); Avance 500 型核磁共振波谱仪(瑞士 Bruker 公司); PE2400 II 型有机元素分析仪(美国珀金-埃尔默公司); 透析袋(截留相对分子质量 8 000 ~ 14 000, 上海绿鸟科技发展有限公司)。

1.3 动物

健康 SD 大鼠, 雌雄各半, 体重 180 ~ 220 g, 由浙江省医学科学院实验动物中心提供, 动物许可证号 SCXK(浙)2014001。

2 方法

2.1 载体材料合成工艺及表征

2.1.1 MHC 的合成工艺

羟乙基壳聚糖(HE-Cs)的合成 称取壳聚糖 1.0 g, 加入 2% 的 HAc 10 mL, 搅拌至完全溶解后加入 50% NaOH 10 mL。之后升温至 40 ℃ 反应 12 h, 再加冰降温后加入环氧乙烷 10 mL, 升温至 50 ℃ 反应 18 h。冷却至室温加入 5 mol/L HCl 调节 pH 至中性。所得产物经 3 000 r/min 离心

10 min, 0.8 μm 微孔滤膜过滤, 透析冻干即得。

N-(4-咪唑甲基)-羟乙基壳聚糖 (MHC) 的合成 (图 1) 取上述产物 0.6 g, 加水 72 mL 完全溶解, 加适量 6% HAc 调节 pH 至 5, 加入 4-咪唑甲醛

0.14 g, 并升温至 80 $^{\circ}\text{C}$ 反应 24 h。冷却后加 4 mol/L NaOH 适量至中性, 并加入 10% 的 NaBH_4 , 加 5 mol/L HCl 调至中性, 离心后经 0.8 $\mu\text{mol/L}$ 微孔滤膜过滤, 滤液透析冻干即得。

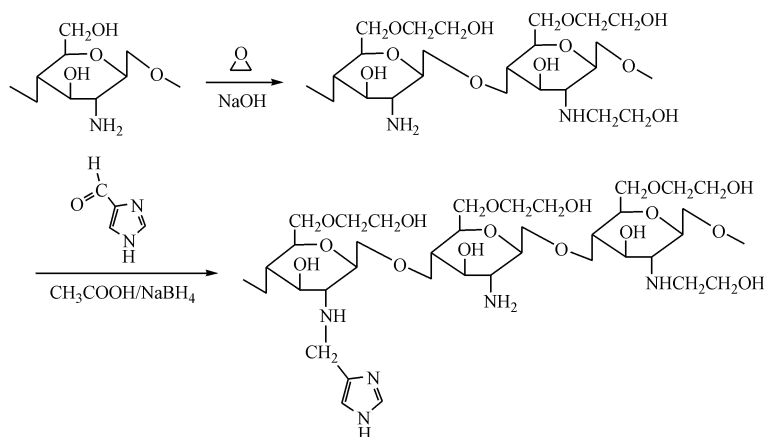


Figure 1 Synthesis of *N*-(4-methylimidazole)-hydroxyethyl-chitosan (MHC)

2.1.2 外观及溶解性评价 对 HE-Cs、MHC 的外观进行评价, 并对 MHC 在常见有机溶剂 (如甲醇、乙醇、乙腈、丙酮、二甲亚砜) 中的溶解性及水溶性进行初步研究。

2.1.3 临界胶束浓度 (CMC) 测定 采取荧光光谱法^[8]测定 MHC 的 CMC, 配制浓度为 6×10^{-6} mol/L 芘的丙酮溶液, 精密量取 1 mL 置于一系列 10 mL 量瓶中, 通氮气流挥去丙酮, 分别加入 MHC 的水溶液适量, 并加水稀释至刻度使 MHC 质量浓度分别为 0.2, 0.4, 1.0, 4.0, 10.0, 20.0, 50.0, 100.0, 250.0, 500.0, 1 000.0, 2 000.0, 5 000.0 $\mu\text{g/mL}$ 。上述溶液超声 30 min, 置于 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中孵育 1 h, 取出, 室温下暗处放置过夜。采用荧光光度计绘制芘的激发光谱, $\lambda_{\text{em}} = 390$ nm, 激发和发射狭缝宽度均为 3.0 nm。记录各溶液激发光谱的 I_{338}/I_{333} , 以 I_{338}/I_{333} 对 MHC 的对数浓度作图, 计算 CMC。

2.1.4 ^1H NMR 取适量 HE-Cs、MHC 溶于 D_2O , 500 MHz 频率照射, 核磁共振波谱仪记录图谱。

2.1.5 元素分析 有机元素分析仪测定壳聚糖、HE-Cs 的 C、N 的质量分数变化情况。根据式 (1) 和 (2) 计算出 HE-Cs 的单元糖环上的羟乙基取代度。

$$n_{\text{C}}/n_{\text{N}} = \frac{\text{C 元素质量分数}}{\text{N 元素质量分数}} \quad (1)$$

单位糖环上羟乙基基团的取代度按式 (2) 计算:

$$\text{取代度} = \frac{\left[\frac{n_{\text{C}}}{n_{\text{N}}} \right] \text{HE-Cs} - \frac{n_{\text{C}}}{n_{\text{N}}} \text{Cs}}{2} \quad (2)$$

2.2 槲皮素胶束的制备及处方优化

根据预实验选择载药量较高的旋转蒸发法进行胶束制备, 即精密称取 MHC 约 20 mg, 加入超纯水适量, 搅拌下溶解。滴加 8 mg/mL 槲皮素乙醇溶液适量, 搅拌 30 min 后, 冰浴下探头超声 30 min, 3 000 r/min 离心 10 min, 0.8 μm 滤膜过滤, 旋转蒸发除去有机溶剂, 即得载药胶束。

采用单因素考察法比较槲皮素的不同溶媒 (乙醇、二甲亚砜、甲醇)、载体浓度 (1%、0.67%、0.5%) 以及药物和载体投料比 (1:25、1:10、1:5) 对载药量的影响。

2.3 粒径分布和 Zeta 电位

载药胶束 200 μL , 加超纯水 1 mL, 于马尔文粒径测定仪下测定胶束的粒径及 Zeta 电位。

2.4 槲皮素胶束的形态学观察

取胶束溶液 20 μL , 加水 100 μL , 振摇分散均匀。取分散后的胶束溶液 20 μL 滴加于洁净云母片上, 挥干水分, 于扫描探针显微镜下观察形态。

2.5 载药量测定

2.5.1 色谱条件 色谱条件: Aglient C_{18} 柱 (250

mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-乙腈-0.03 mol/L 磷酸二氢钠溶液(5:30:65), 检测波长 254 nm, 进样量 20 μL, 柱温 30 °C, 流速 1.0 mL/min。

2.5.2 含量测定 精密称取槲皮素标准品适量, 甲醇定容制成 50 μg/mL 的储备液备用。精密量取储备液适量, 分别置于 5 mL 量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 得一系列标准溶液, 按“2.5.1”项色谱条件测定, 得到标准曲线 $A = 1.317c - 0.5182$ ($n = 3$, $r = 0.99998$), 范围为 0.1 ~ 50 μg/mL。高、中、低 3 个质量浓度(20、10、1 μg/mL)的日内差小于 0.92%, 日间差小于 1.5%, 回收率(%)分别为 97.2、101.3 和 104.9。

精密称取胶束制剂冻干品约 2.0 mg, 放入 5 mL 量瓶中, 加甲醇超声 30 min, 定容至刻度。按“2.5.1”项色谱条件测定, 峰面积代入标准曲线方程计算可得槲皮素浓度, 进而计算出胶束中的槲皮素的含量。

2.6 体外释放试验

根据预实验为使槲皮素达到漏槽条件且稳定, 选择 0.1% 吐温 80、pH 7.4 磷酸盐缓冲液为释放介质。精密称取胶束冻干品加水复溶, 使槲皮素质量浓度为 1.0 mg/mL。精密吸取上述胶束溶液 1 mL 置于透析袋中, 两端扎紧, 放入 0.1% 吐温 80 的释放介质 30 mL。置于 37 °C 振荡器内进行释放度评价。取样时间为 1, 2, 4, 6, 8, 12 h, 取样 1 mL, 补液 1 mL。12 h 后更换全部释放介质, 并于 24 h 取样。按“2.5.1”项下色谱条件进行测定, 计算累积释放量。

2.7 药代动力学试验

2.7.1 给药及取样 健康 SD 大鼠 10 只, 体重 180 ~ 220 g, 随机分为 2 组, 每组 5 只。第 1 组为对照组, 第 2 组为制剂组。给药剂量 8 mg/kg。对照组采用尾静脉注射槲皮素溶液剂(精密称取槲皮素 10 mg, 加入无水乙醇 1 mL 溶解后, 加入生理盐水 9 mL 和适量的吐温 80 增溶, 超声使其溶解完全, 过 0.45 μm 微孔滤膜即得)。制剂组注射 QT-MHC 胶束制剂。取样时间点为给药后 0.017, 0.083, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24 h。大鼠眼眶静脉丛取血, 血样置于事先加有肝素的 EP 管中, 3 000 r/min 离心 15 min, 取上层血浆 200 μL 置于 -18 °C 冰箱中保存。按血样处理方法和测定方法进行操作, 所得结果代入标准曲线, 计算血药浓度。

2.7.2 大鼠血浆样品处理方法 采用酸水解蛋白处理血浆中槲皮素^[9]: 即将甲醇 500 μL 和 10 mol/L HCl 200 μL 加入小瓶中, 混合均匀后, 加入血浆 200 μL, 涡旋 3 min, 置于 90 °C 水浴放置 2 h 进行结合物水解。放冷, 加入乙酸乙酯 0.5 mL, 涡旋 1 min, 2 500 r/min 离心 10 min 取上清液, 挥干溶剂, 加入甲醇 500 μL 溶解残留物, 0.45 μm 滤膜过滤后进样。

2.7.3 方法学验证 在 2 mL 离心管中精密加入 QT 标准溶液, 挥干后加入空白血浆 200 μL, 涡旋 30 s 后按样品预处理及测定方法进行操作, 按“2.5.1”项色谱条件进行测定, 由于 373 nm 下血样杂质影响较小, 故在该波长下记录样品峰峰面积, 可得槲皮素血浆浓度与峰面积的标准曲线: $A = 0.3996c - 0.1780$ ($n = 3$, $r = 0.9993$), 范围为 0.1 ~ 20 μg/mL。高、中、低 3 个质量浓度(10、2、0.2 μg/mL)方法回收率(%)分别为 102.64、98.30 和 107.63, 日内差小于 5.3%, 日间差小于 8.6%。

3 结果和讨论

3.1 载体材料合成工艺及表征

3.1.1 载体材料的外观、溶解性 HE-Cs 冻干品颜色为淡黄色, 质地疏松。MHC 冻干品颜色呈类白色, 有光泽, 在水中可溶, 在二甲亚砆中略溶, 在甲醇、乙醇、乙腈、丙酮等溶剂中均不易溶解。

3.1.2 载体的临界胶束浓度 采用芘荧光光度法测定结果见图 2, 图中斜率发生显著变化的点(曲线拐点)即为形成胶束的临界点, 对应的浓度即为两亲性物质的 CMC。可得 MHC 的 CMC 为 242.67 μg/mL, 较常见的表面活性剂胶束的浓度低, 稳定性更好。

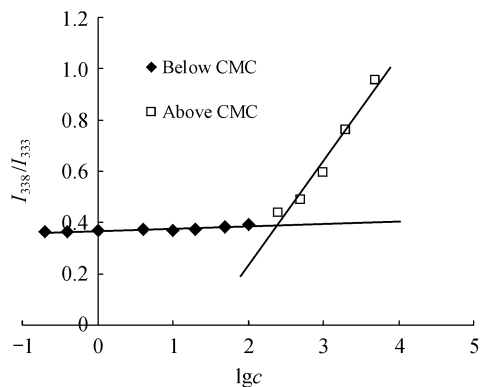


Figure 2 Quotient of vibrational band intensities (I_{338}/I_{333}) from excitation spectra of pyrene as a function of $\lg c$ of MHC in distilled water

3.1.3 载体的¹H NMR 由图 3 可见,MHC 的¹H NMR(D₂O)图谱与 HECs 的¹H NMR(D₂O)图谱相比,出现了两个新的质子峰,为咪唑杂环上的质子特征峰^[10]。另外 δ=3.5~4.0 处为羟乙基中的亚甲基上质子峰(-O-CH₂-CH₂-OH),以及壳聚糖骨架上的 H³-H⁶ 质子峰,它们互相重叠;δ=2.717 处为壳聚糖骨架上的 H² 质子峰^[11]。

咪唑甲基取代度可通过咪唑环上的 δ=7.788 H² 质子峰面积(A_{MH2}=1.0)与壳聚糖分子中 H² 质子峰面积(A_{H2}=5.13)比较得出咪唑甲基取代度为 0.195。

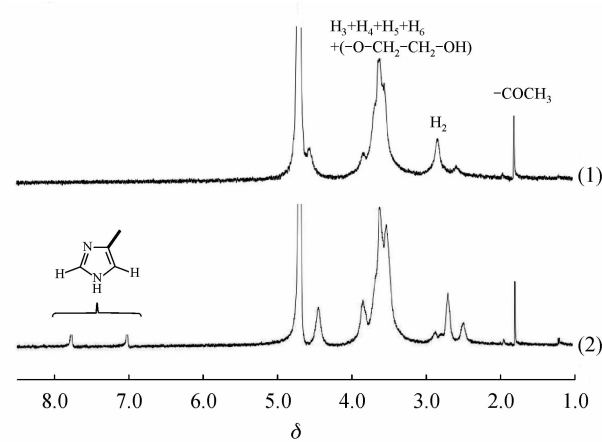


Figure 3 ¹H NMR spectra of hydroxyethyl-chitosan (HECs) (1) and MHC (2)

3.1.4 元素分析结果 元素分析结果表明,羟乙基在单元糖环上的取代度(degree of substitution)较高,达到 1.165。

Table 1 Elemental analysis of chitosan (Cs) and hydroxyethyl chitosan (HE-Cs)

Sample	Content of carbon/%	Content of nitrogen/%	n _C /n _N	Degree of substitution ^a
Cs	40.76	7.48	6.36	1.165
HE-Cs	41.28	5.54	8.69	

^aThe degree of substitution of hydroxyethyl group in aminoglycoside unit

3.2 槲皮素胶束制剂的处方优化

根据表 2 可知,采用二甲基亚砜作为溶媒载药量较高,但考虑溶剂残留和机体相容性问题,最后采用乙醇为槲皮素的分散溶媒。载体浓度升高或槲皮素的比重上升,载药量有一定程度上升,但随之下降,这可能是由于槲皮素本身的水溶性、脂溶性不佳,与两亲性载体结合力较弱有关。由此,选择载体浓度在 0.67%、药物与载体投料比以 1:10

为最佳载药量。
优化后的处方工艺如下:精密称取 MHC 约 20 mg,加入超纯水 3 mL,搅拌下溶解。滴加 8 mg/mL 槲皮素的乙醇溶液 250 μL,搅拌 30 min 后,冰浴下探头超声 30 min,3 000 r/min 离心 10 min,0.8 μm 滤膜过滤,旋转蒸发除去有机溶剂,即得载药胶束,冻干可得冻干制品。
按优化后的处方工艺制备得 6 批次槲皮素胶束,载药量为(5.42±0.32)%。

Table 2 Optimization of formulation of MHC micelles loading quercetin (x̄±s,n=3)

Factor	Level	Drug loading/%
Solution	Methanol	5.38±0.21
	Ethanol	5.46±0.36
	DMSO	6.71±0.42
Concentration of MHC	1%	4.21±0.39
	0.67%	5.46±0.36
	0.5%	4.12±0.32
QT: MHC	1:25	3.23±0.24
	1:10	5.46±0.36
	1:5	3.83±0.43

QT:quercetin

3.3 粒径及形态学观察

粒径测定仪测定结果表明,6 批次的 QT-MHC 胶束的平均粒径为(99.21±1.71) nm,电位+(20.01±0.72) mV。扫描探针显微镜结果如图 4 所示,测量直径为 78~87 nm,较马尔文粒径测定粒径相比较小,这可能与 AFM 测定时水分丧失有关。

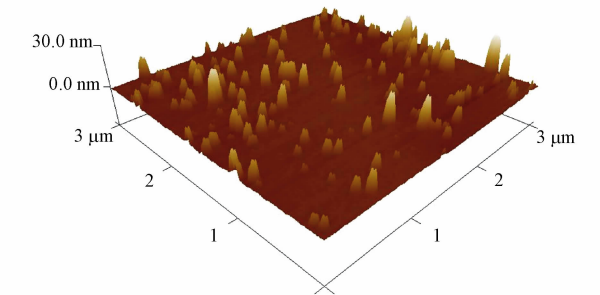


Figure 4 AFM image of MHC micelles loading quercetin

3.4 体外释放

QT-MHC 胶束累积释放百分率-时间的关系如图 5 所示,采用 Higuchi 方程拟合较好,即 Q=0.110 1t^{1/2}-0.064(r=0.991 3)。24 h 释放药量为(45.05±2.51)%,说明 MHC 胶束包载效果较稳定,药物达到缓释效果。

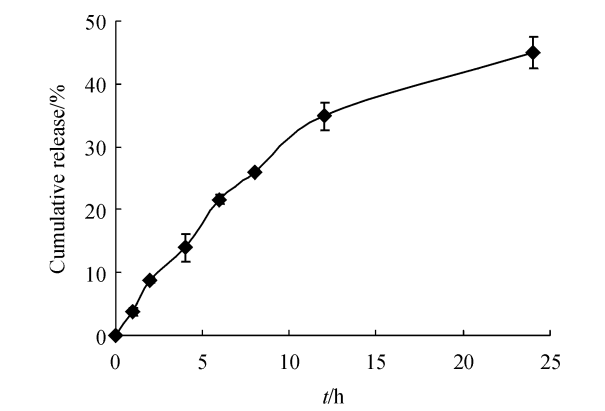


Figure 5 *In vitro* cumulative release of QT from MHC micelles ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

3.5 体内药代动力学

给药后血药浓度-时间曲线图如图 6 所示。槲皮素溶液剂组在血中清除很快,2 h 就接近检测限,4 h 已经无法测定,而槲皮素 MHC 胶束组则在 24 h 内均能检测到。采用药代动力学软件 Kinetica 5.0 对药代动力学参数处理,根据 AIC 最小原则,选择二室模型拟合较好。槲皮素溶液剂、槲皮素胶束制剂的药-时关系分别可采用 $c = 10.8e^{-20.07t} + 5.62e^{-2.80t}$, $c = 14.50e^{-7.7t} + 4.31e^{-0.059t}$ 进行表示,主要药代动力学参数见表 3。槲皮素胶束与槲皮素溶液剂相比 AUC_{0-24} 增加约 23 倍, MRT 延长约 71 倍,这与溶液剂时游离的槲皮素极易被血液清除,而制成槲皮素胶束后药物从胶束中释放较慢有关。说明槲皮素 MHC 胶束增溶效果显著,极大延长了药物在体内的停留时间,同时主药的生物利用度得到了很大的提高。

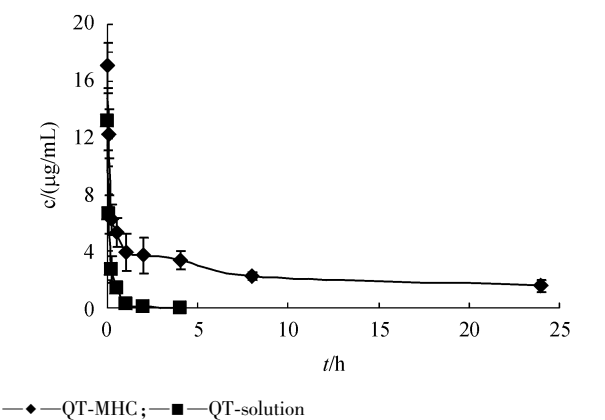


Figure 6 Plasma concentration-time profiles of QT after intravenous administration of QT solution and MHC micelles ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Table 3 Comparison of the mean pharmacokinetic parameters of QT from solution and MHC micelles in rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Parameter	QT-solution	QT-MHC-micelles
k_{10}/h^{-1}	6.57 ± 0.47	$0.23 \pm 0.08^{**}$
k_{12}/h^{-1}	7.40 ± 1.65	5.59 ± 1.23
k_{21}/h^{-1}	8.90 ± 4.20	1.97 ± 1.32
$t_{1/2\alpha}/h$	0.036 ± 0.011	0.096 ± 0.030
$t_{1/2\beta}/h$	0.26 ± 0.087	15.20 ± 7.72
MRT/h	0.30 ± 0.06	21.42 ± 10.85
CL/(L·kg/h)	3.26 ± 0.62	$0.10 \pm 0.04^{*}$
$C_0/(\mu g/mL)$	16.42 ± 2.45	18.81 ± 1.81
$AUC_{0-24}/(\mu g \cdot h/mL)$	2.50 ± 0.48	$57.49 \pm 6.69^{**}$
$AUC_{0-inf}/(\mu g \cdot h/mL)$	2.51 ± 0.47	$88.12 \pm 30.69^{*}$

$^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$

4 结 论

本研究通过壳聚糖衍生化制成新型胶束载体材料 *N*-(4-咪唑甲基)-羟乙基壳聚糖 (MHC), 采用¹H NMR 和元素分析法进行材料表征,并以槲皮素为模型药物制备了自组装胶束同时进行载药工艺优化,体外释放实验表明,QT-MHC 呈现明显的缓释特征;静脉注射给药后,大鼠体内的药代动力学研究表明,与槲皮素溶液相比,QT-MHC 胶束能明显改善药物在体内的储留时间,AUC 显著升高,从而增强其抗肿瘤作用。咪唑基团使载体具备质子海绵效应,可实现内涵体逃逸功能,能使抗肿瘤药物完整地进入细胞质,增强抗肿瘤作用,但该胶束的这一功能还有待于进一步通过细胞学和动物实验研究来证实。

参 考 文 献

[1] Yuan Z, Long C, Junming T, *et al.* Quercetin-induced apoptosis of HL-60 cells by reducing PI3K/Akt[J]. *Mol Biol Rep*, 2012, **39** (7): 7785 – 7793.

[2] Yang F, Jiang X, Song L, *et al.* Quercetin inhibits angiogenesis through thrombospondin-1 upregulation to antagonize human prostate cancer PC-3 cell growth *in vitro* and *in vivo* [J]. *Oncol Rep*, 2016, **35** (3): 1602 – 1610.

[3] Zhang Y, Huo MR, Zhou JP, *et al.* Potential of amphiphilically modified low molecular weight chitosan as a novel carrier for hydrophobic anticancer drug: synthesis, characterization, micellization and cytotoxicity evaluation [J]. *Carbohydr Polym*, 2009, **77**: 231 – 238.

[4] Liu WW, Zhang SY, Yang Y, *et al.* Preparation of tumor-targeting chitosan micelle with transmembrane effect [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2015, **46** (5): 561 – 567.

[5] Zheng YX, Zhang WN, He LP, *et al.* Trimethyl chitosan nanopar-

icles coated with Pluronic F-127 for oral insulin delivery system [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2016, **47**(4): 442-447.

[6] Varkouhi AK, Scholte M, Storm G, *et al.* Endosomal escape pathways for delivery of biologicals [J]. *J Control Release*, 2011, **151**(3): 220-228.

[7] Zhang MB, Li L, Sun YT, *et al.* Study on antitumor mechanism of quercetin based on molecular reverse docking method [J]. *Chin J Exper Tradit Med Formu* (中国实验方剂学杂志), 2012, **18**(23): 145-148.

[8] Hans M, Shimoni K, Danino D, *et al.* Synthesis and characterization of mPEG-PLA prodrug micelles [J]. *Biomacromolecules*, 2005, **6**(5): 2708-2717.

[9] Xia XJ, Xu BH, Zhang TQ, *et al.* Preparation, characterater and pharmacokinetics in rats of thiolated-chitosan microspheres loading quercetin [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2014, **45**(2): 185-191.

[10] Ghosn B, Singh A, Li M, *et al.* Efficient gene silencing in lungs and liver using imidazole-modified chitosan as a nanocarrier for small interfering RNA [J]. *Oligonucleotides*, 2010, **20**(3): 163-172.

[11] Zhong CH, Luo BH, Zhou CR, *et al.* Synthesis of hydroxyethyl chitosan and its compatibility with poly(D, L-lactide) [J]. *Chem Res App* (化学研究与应用), 2010, **22**(9): 1102-1107.

· 校园信息 ·

中国药科大学 2016 年 9 ~ 12 月专利授权情况

序号	专利名称	发明人
1	去氧鬼臼毒素的晶型及其制备方法	黄金龙, 朱雄, 王越, 殷之武
2	一种稳定的硫酸头孢喹肟油混悬液注射剂	肖衍宇, 余艾玲, 高士雅, 孟凡飞
3	诱发自噬的 2-氨基烟腈类化合物及其用途	张评浒, 杨晓慧, 郑祖国, 张陆勇
4	新型阳离子接枝共聚物及多重复合非病毒基因载体制备方法和应用	李娟, 尹少平, 王晶, 杨勇
5	短葶山麦冬薯蓣甾体皂苷类化合物的制备鉴定	余伯阳, 李永伟, 戚进, 黄桢
6	短葶山麦冬偏诺甾体皂苷类化合物的分离鉴定及用途	余伯阳, 李永伟, 戚进, 张媛媛, 寇俊萍, 黄桢
7	一种利用固定化酶筛选 I 型 17β 类固醇脱氢酶抑制剂的方法	苏梦翔, 周雯迪, 狄斌
8	基于壳聚糖的氨基化碳量子点的制备方法	何华, 肖得力, 袁丹华, 彭军, 李卉, 戴昊, 李洁, 皮埃尔·他目
9	一类 CA-4 的衍生物、其制法及其医药用途	徐云根, 刘坤, 宋晓翰, 陈泓竹, 张宏波, 张灵芝, 朱启华
10	C-芳基葡萄糖苷 SGLT2 抑制剂	黄文龙, 钱海, 王学堃, 李莹, 杨宝卫, 李政
11	一种磁性碳纳米管表面分子印迹材料的制备方法	何华, 肖得力, 李卉, 袁丹华, 戴昊, 彭军, 李洁, 皮埃尔·他目
12	一种药用复合聚合物材料水分散液及应用	栾立标, 沈亚光
13	冬青素衍生物、其制备方法及其抗血小板聚集活性及用途	梁敬钰, 林丽萍, 吴斐华
14	盐酸羟考酮缓控释制剂及其制备方法	尹莉芳, 张陆勇, 顾春燕, 王广基, 朱春莉, 何伟, 冯燕丽, 蒲道俊, 余春梅, 徐洁
15	质粒、重组工程菌及制备均一分子量透明质酸的方法	高向东, 姚文兵, 贾毓宁, 陈晓菲
16	PEG 修饰的透明质酸胆固醇酯	栾立标, 王文娟
17	抗人 AFP 单链抗体以及融合抗原肽的制备方法和应用	高向东, 姬晓南, 冯丽亚, 姚文兵, 张瑜

(科技处, 本刊编辑部)