

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

新穎奈米微粒載體於抗癌藥物傳遞的研究 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 97-2221-E-468-001-
執行期間：97年08月01日至98年07月31日
執行單位：亞洲大學生物科技學系

計畫主持人：蔡政芳

計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：蕭凱文
碩士班研究生-兼任助理人員：謝歷輝

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中華民國 98年10月18日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告
 期中進度報告

(計畫名稱)

新穎奈米微粒載體於抗癌藥物傳遞的研究

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 97-2221-E-468-001-

執行期間：97年 8月 1日至 98年 7月 31日

計畫主持人：蔡政芳

共同主持人：

計畫參與人員：蕭凱文、謝歷輝

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、
列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：亞洲大學 生科系

中華民國 98年 10月 2日

計畫中文摘要

奈米藥物輸遞系統可藉由改變藥物在人體內的分佈，達到高度靶向、控制藥物釋放、提高難溶藥物的溶解率及吸收率，增加藥效及減少藥物毒性等目的。幾丁聚醣因具有生物可分解性、生物相容性及低毒性等特性，再加上其在藥物控制釋放上有延緩藥物釋放、生物附著及促進吸收等效果，因此這幾年來被拿來當作藥物載體之新素材。本研究以三聚磷酸鈉(sodium tripolyphosphate)與幾丁聚醣作用形成的奈米微粒，比較不同分子量與濃度的幾丁聚醣所製成奈米粒之特性的差異，對所製備的奈米粒子作粒徑分析、表面電荷分析與外觀型態的觀察等，進而找出形成奈米粒子的最佳條件。

在幾丁聚醣奈米粒的特性分析方面，結果顯示當幾丁聚醣溶液濃度減少和三聚磷酸鹽溶液濃度減少時，粒徑有變小的趨勢；粒徑分佈約在10~300 nm 之間。

將不同分子量之幾丁聚醣所製備出的奈米粒做比較，發現分子量較大的幾丁聚醣所製備出的奈米粒之粒徑，要比低分子量的幾丁聚醣奈米粒粒徑大。

關鍵字: 幾丁聚醣，奈米粒子，藥物釋放

Abstract

Nanoscale drug delivery system has been developed to convey a sufficient dose of drug to lesion, provide drug targeting, increase the efficiency of drug delivery and improve release profiles. Chitosan is a biodegradable, biocompatible, non-toxic polysaccharide. It has a potential to become an ingredient for novel drug delivery systems because it can delay the release of drug compounds and enhance drug absorption. The objectives of this study was to investigate the effect of chitosan molecular weight and concentration on chitosan nanoparticles characteristics prepared by ionotropic gelation.

As the concentration of chitosan solution and TPP decreased, the mean particle size of chitosan nanoparticles decreased. The averaged diameter was about 10~300 nm.

The particle size of nanoparticles prepared with high Mw (80 kDa) was larger than that of nanoparticles made of low Mw chitosan (40 kDa).

Key words: chitosan; nanoparticles, controlled drug delivery system

文獻探討

在二十一世紀的今天，由於科技的日新月異且人類對於材料尺度的需求更微小化，已從原來的微米 (10^{-6} m) 範圍進入了奈米 (10^{-9} m) 範圍，在未來的二十年裡奈米科學 (Nano-science) 與奈米技術 (Nano-technology)，將不僅只是單純的活躍在學術研究的領域裡，預料它將以一日千里的速度被應用在高科技的電子產業，或生物科技(Bio-technology) 產業上。

幾丁聚醣是天然高分子，與生體細胞有良好的生物相容性，不會造成排斥現象，並帶正電和具有活性之官能基的特色，使得幾丁聚醣常被應用在藥物載體，以增加藥物之生體可用率，並且可穩定藥物中之成分、促進藥物之吸收、控制藥物之溶解速度、幫助藥物送達目的器官(Yong et al., 2007)。

幾丁聚醣在包覆藥物上的特性(莊和陳，2006)：1. 可和帶負電的藥物形成交互作用，穩定藥物的結構。2. 促進藥物吸收，提升藥物在腸道的吸收率。3. 幫助藥物送達目標處。4. 延緩藥物的溶解速率。不同的製備方式與所攜帶的藥物皆會影響幾丁聚醣藥物載體之物理性質。

近年來，利用生物可降解的高分子聚合物所製成的奈米微粒受到極大的關注，由於這些載體除了具有能夠增加藥物傳遞效率、改善藥物釋放模式、提高藥物標的性能等優點外，還能夠達到藥物控制釋放、攜帶藥物至特定器官或組織、提高藥物生體可用率、增加藥物耐受性、降低藥物副作用等目的，因此他們被認為是相當有潛力的藥物傳遞系統 (Hu et al., 2002; Hans and Lowman, 2002)。

Xu and Du (2003) 指出當不同去醯度和不同分子量的幾丁聚醣在製備奈米微粒後，對於 bovine serum albumin(BSA)的包覆率其體外釋放實驗，會有影響，分子量越高，包覆率越高。

2004年 Zhang et al.以離子凝膠法製備奈米微粒包覆 BSA，改變參數包括溫度、pH 值和 chitosan/tripolyphosphate 比例，當幾丁聚醣去乙醯度愈高且有較窄的分子量分布時，愈可控制粒徑大小分佈，於釋放方面，模擬腸道時可有效延長超過 6 天。

Wu et al. (2005) 將 ammonium glycyrrhizinate 包覆在幾丁聚醣奈米微粒內，可包覆 ammonium glycyrrhizinate 濃度高達 0.5mg/mL，釋放曲線明顯有突釋現象，但於後續釋放時有緩慢連續釋放的功能。

高分子聚合物以生醫用途最為廣泛，例如利用幾丁聚醣結合聚乳酸-甘醇酸(PLGA)奈米微粒，利用離子鍵結力結合 DNA 以期作為非病毒基因療法載體 (Zhou et al., 2008)，也有一些以幾丁聚醣物質為基材所製備出奈米微粒 (Tang et al., 2003; Xu and Du, 2003)。例如，幾丁聚醣能與紫杉醇形成小於 100 nm 的顆粒，實驗發現此式之紫杉醇更能有效地送達腫瘤部位，而且與幾丁聚醣混合之紫杉醇對腫瘤細胞之抑制能力較游離態紫杉醇之功效佳 (Miwa et al., 1998)。

早期作為藥物傳遞系統的奈米級微粒所使用的材料中，以疏水性聚合物 poly(D,L-lactide)、poly(lactic acid)[PLA]、poly(cyanoacrylate) 等為主(李, 2001)。而近年來使用如 chitosan、sodium alginate、gelatin 等親水性聚合物來製備奈米級微粒已成為研究焦點，目前已經發展出幾種使用親水性聚合物製備奈米級微粒的方法(Soppimath et al., 2001)。其中以 ionic gelation 是製備奈米級微粒最常使用的方法，其製備流程為混合兩種分別帶正負電的水相高分子溶液(dropping methode)，可以在瞬間得到經由離子鍵結的奈米微粒，這種製備方法的優點在於製備過程不需要提高溫度也不需使用有機溶劑，整個過程都在溫和

的水相環境中進行，此過程有利於維持藥物的活性(Pan et al., 2002)。在各種親水性聚合物中，以幾丁聚醣(chitosan)製備的奈米微粒最被廣為討論，幾丁聚醣溶液混和另一帶負電荷的聚合物如三聚磷酸(tripolyphosphate)或聚丙烯酸(polyacrylic acid)，可以得到一表面帶有正電荷且用有奈米級尺寸的微粒，這樣的奈米微粒對於一些表面帶有負電荷的藥物有很好的包覆能力，在 in vivo 環境中更有著特定位置的藥物標的效果。

近年來以奈米微粒作為口服藥物輸遞系統受到廣泛的注意，主要是希望藉由聚由高度黏著性的奈米微粒延長藥劑停留在腸胃道的時間，進而增加藥物的吸收比例，提高生體可用率。所以像是以 poly (D,L-lactide)、poly (lactic acid) [PLA]、poly(glycolide) [PLG]、poly (lactide-co-glycolide) [PLGA]以及 poly(cyanoacrylate)等為材料的研究相當的多，但是這些以疏水性材料製備的奈米微粒的製備過程，免不了會使用有機溶劑或者需要提高製備溫度，這樣的製備條件對於一般親水性藥物，像是胜肽、蛋白質和一些抗癌藥物的包覆率或者是藥效皆有不良影響，所以完全以親水性材料製備的奈米微粒是近幾年來研究的焦點，常用的材料有 chitosan、sodium alginate、gelatin 等親水性聚合物，這些親水性奈米級微粒的製備條件溫和，對於藥物有很好的包覆能力亦不會影響藥物的活性，是一種很有潛力的藥物載體(Soppimath et al., 2001)。

在生醫材料的分類中，以高分子材料的應用性及其附加價值最高，再加上具有生物可分解性和生物可相容性使得生物可分解性高分子在藥醫學領域裡得以發展。因此本計畫希望發展以幾丁聚醣和三聚磷酸鹽為基材的生物可分解型親水性奈米級藥物載體，選擇以 ionic gelation 為製備的方法，利用其溫和的製備條件和材料的親水特性，期望提升奈米微粒對抗癌藥物的包覆率。

研究方法

1. 水溶性幾丁聚醣去乙醯度測定

參考 Toei and Kohara (1976) 之方法。精稱 0.5 g 水溶性幾丁聚醣，溶於 5% (v/v) 乙酸溶液 (99.5 g) 中，於室溫下攪拌溶解後，取此溶液 1.0 g 與去離子水 30 ml 充分混合後，加入一滴 0.1% toluidine blue 為指示劑，以 1/400 N PVSK (potassium polyvinyl sulfate solution, (C₂H₃O₄SK) n, n=1500 以上) 滴定至變色；以 cetylpyridinium chloride monohydrate 標定 PVSK 力價，利用下公式計算去乙醯度。

$$\text{去乙醯度(\%)} = [(X/161)/(X/161+Y/203)] \times 100$$

$$X = 1/400 \times 1/1000 \times F \times 161 \times V$$

$$Y = [0.5 \times 1/100] - X$$

$$V : = N/400 \text{ PVSK 之滴定 ml 數}$$

$$F : N/400 \text{ PVSK 之力價}$$

2. 小分子幾丁聚醣的製備

首先將 2 g 幾丁聚醣溶於 100 ml 的 1% 的醋酸溶液中，接著加入 0.1 g 纖維酵素，之後用 6 M 的 NaOH 將 pH 值調至 5.0。將配好的幾丁聚醣溶液在 37°C 環境下，攪拌反應 6~12 小時，之後以強鹼收集 pH 7.0~7.2 析出的沉澱物，最經由水洗和冷凍乾燥等純化步驟，可得到不同低分子量的幾丁聚醣。

3. 離子鍵結型奈米微粒製備

將去聚合後分子量 80,000 和 40,000 的幾丁聚醣如於醋酸溶液中，配置濃度為 0.01%、0.05%、0.1%、0.15%、0.2% 的溶液，溶液 pH 為 6.0。接著將三聚磷酸鹽分別配置濃度分別為 0.01%、0.05%、0.1%、0.15%、0.2% 的溶液。之後依序將不同濃度的三聚磷酸鹽溶液 2 ml，加入 10 ml 不同濃度的幾丁聚醣溶液中，在室溫下利用磁石攪拌反應，可以在瞬間得到經由離子鍵的奈米微粒。

4. 幾丁聚醣奈米微粒粒徑大小量測

實驗上首先要避免樣品中含有灰塵等大顆粒雜質，所以所使用的溶劑(去離子水)先用 0.2 μm 膜過濾後備用，配置樣品時要避免空氣中的灰塵掉入，試管或樣品瓶使用先前過濾過的溶劑洗滌。

5. 以電子顯微鏡觀察幾丁聚醣奈米微粒的結構

將所得到的幾丁聚醣奈米微粒溶液，以滴管滴在附膜的銅網上，沉降時間為 15 分鐘，用濾紙小心的把銅網表層上的液體吸乾，再將染色劑 phosphotungstic acid 2% (w/v) 滴在銅網上，染色時間為 2 分鐘，最後再把染色劑以濾紙吸乾，將銅網上放在室溫下風乾，以穿透式電子顯微鏡觀察。

結果與討論

1. 巨觀分析

在不同濃度的製備條件之下，在不同濃度的製備條件下，溶液會呈現兩種不同的外觀形態，分別為澄清的透明狀溶液、乳白色的霧狀溶液。為了方便定義奈米微粒形成的範圍，我們以符號代表溶液的想種不同外觀形態：□—澄清的透明狀溶液、○—乳白色的霧狀溶液，表 1 是分子量 80,000 的幾丁聚醣與三聚磷酸鹽在不同濃度製備條件下溶液的外觀形態分布情形。表 2 是分子量 40,000 的幾丁聚醣與三聚磷酸鹽在不同濃度製備條件下溶液的外觀形態分布情形。隨著幾丁聚醣和三聚磷酸鹽溶液濃度的提升，我們可以發現溶液外觀由透明澄清溶液轉為乳白色的霧狀溶液，經由粒徑分析儀初步判斷奈米微粒會在澄清著透明狀溶液與乳白色的霧狀溶液之中形成。

2. 添加不同濃度的幾丁聚醣溶液和不同濃度的三聚磷酸鹽對粒徑的影響

圖 1 分子量 40,000 的幾丁聚醣與三聚磷酸鹽，在不同濃度製備條件下，經由粒徑分析儀的分析，溶液中奈米微粒的平均粒徑。數據顯示奈米微粒的粒徑隨著幾丁聚醣與三聚磷酸鹽濃度升高而增加，粒徑分佈範圍從 30 nm ~ 200 nm。

圖 2 分子量 80,000 的幾丁聚醣與三聚磷酸鹽，在不同濃度製備條件下，經由粒徑分析儀的分析，溶液中奈米微粒的平均粒徑。數據顯示奈米微粒的粒徑隨著幾丁聚醣與三聚磷酸鹽濃度升高而增加，粒徑分佈範圍從 30 nm ~ 300 nm。

圖 3 為分子量 40,000 的幾丁聚醣與三聚磷酸鹽製備的奈米微粒粒徑分佈圖形，分別代表平均粒徑為 13.6 ± 0.3 nm、 22.9 ± 3.0 nm、 83.8 ± 0.1 nm、 157.7 ± 2.5 nm 的粒徑分佈圖形，從圖形可以看出粒徑分佈集中，表是溶液中的為例尺寸大小均一。圖 4 為分子量 80,000 的幾丁聚醣與三聚磷酸鹽製備的奈米微粒粒徑分佈圖形，分別代表平均粒徑為 29.6 ± 2.9 nm、 42.9 ± 3.0 nm、 83.8 ± 0.1 nm、 157.6 ± 0.5 nm 的粒徑分佈圖形，從圖形可以看出粒徑分佈集中，表是溶液中的為例尺寸大小均一。

3. 穿透式電子顯微鏡(TEM)

圖 5 為分子量 80,000 的幾丁聚醣與三聚磷酸鹽，在兩者濃度皆為 0.01% 的條件下所製備出來的奈米微粒之 TEM 圖形。透過圖形我們可以看見製備出來的奈米微粒為表面平滑的球型顆粒。

結論

在這部分的實驗中，我們以分子量為 80,000 和 40,000 的幾丁聚醣與三聚磷酸鹽在不同濃度下製備奈米微粒，透過粒徑分析，我們可以初步判斷出奈米微粒形成範圍，再藉由粒徑分析儀和 TEM 的分析，更進一步確認製備出來的顆粒均為大小均一的奈米微粒。非常適合做為藥載體。

參考文獻

- 李昂。 2001。 奈米顆粒在藥物輸遞的應用。 化工資訊 10: 44-55。
- 莊仲揚、陳俊男。 2006。 幾丁聚醣於生醫產業上的應用。 化工資訊與商情 38 : 63-66。
- Hans, M. L. and Lowman, A. M. 2002. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Current Opinion in Solid and Materials Science* 6: 319-327.
- Hu, Y., Jiang, X., Ding, Y., Ge, H., Yuan, Y. and Yang, C. 2002. Synthesis and characterization of chitosan-poly(acrylic acid) nanoparticles,” *Biomaterials* 23: 3193-3201.
- Pan, Y., Li, Y., Zhao, H., Zheng, J., Xu, H., W. J. Hao, G. and Cui, F. 2002. Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo. *Int. J. Pharm.* 249 : 139-147.
- Soppimath, K. S., Aminabhavi, T. M., Kulkarni, A. R., Rudzinski, W. E. 2001. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J. Control. Release* 70: 1-20.
- Toei, K. and Koharw, T. 1976. A conductometric method for colloid titrations. *Analytica Chimica Acta.* 83-59.
- Wu, Y. and Yang, W. 2005, Chitosan nanoparticles as a novel delivery system for ammonium glycyrrhizinate. *Int. J. Pharm.* 295: 235-245.
- Xu Y. and Du, Y. 2003. Effect of molecular structure of chitosan: protein delivery properties of chitosan nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 250: 215-226.
- Zhang, Hong, Oh Megan, Allen Christine, and Kumacheva Eugenia. 2004. Monodisperse chitosan nanoparticles for mucosal drug delivery. *Biomacromolecules* 5: 2461-2468.
- Zhou, X., Zhang, X., Yu, X., Zha, X., Fu, Q., Liu, B., Wang, X., Chen, Y., Chen, Y., Shan, Y., Jin, Y., Wu, Y., Liu, J., Kong, W. and Shen, J. 2008. The effect of conjugation to gold nanoparticles on the ability of low molecular weight chitosan to transfer DNA vaccine. *Biomaterials*, 29(1): 111-117.

表 1. 分子量 80,000 的幾丁聚醣與三聚磷酸鹽在不同濃度製備條件下溶液的外觀形態分布

CS STPP	0.01%	0.05%	0.1%	0.15%	0.2%
0.01%	□	□	□	□	□
0.05%		□	○	○	○
0.1%		□	○	○	○
0.15%			○	○	○

表 2. 分子量 40,000 的幾丁聚醣與三聚磷酸鹽在不同濃度製備條件下溶液的外觀形態分布

CS STPP	0.01%	0.05%	0.1%	0.15%	0.2%
0.01%	□	□	□	□	□
0.05%		□	□	□	□
0.1%		□	○	○	○
0.15%			○	○	○

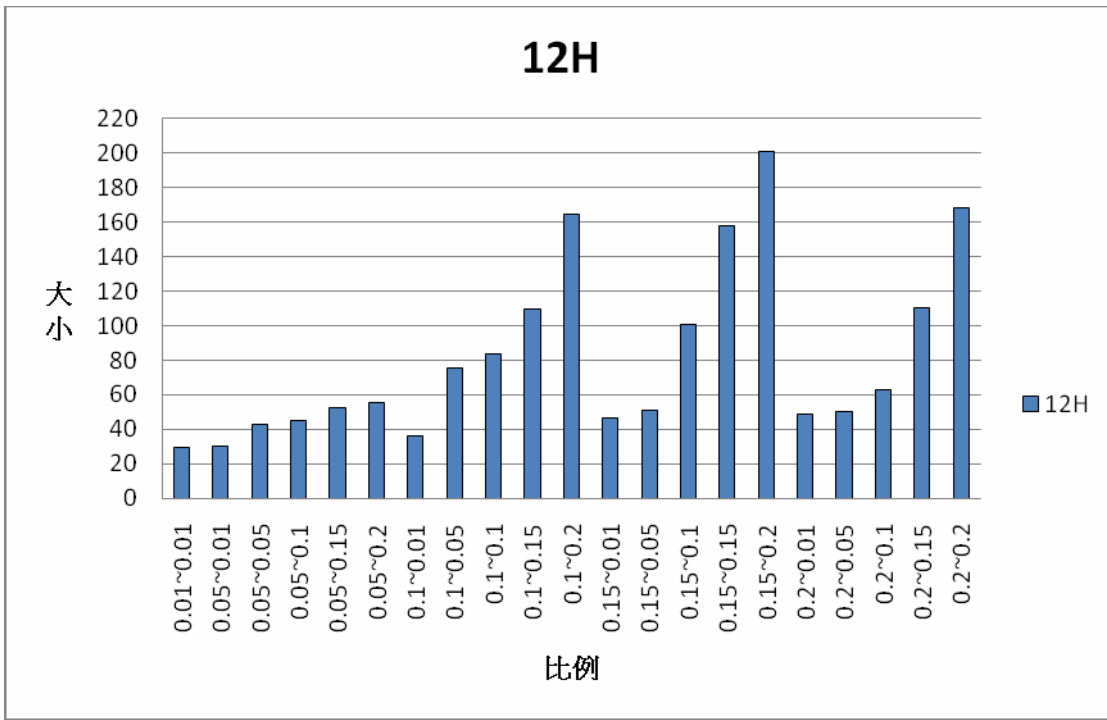


圖 1 是分子量 40,000 的幾丁聚醣與三聚磷酸鹽的奈米微粒粒徑分佈圖形。

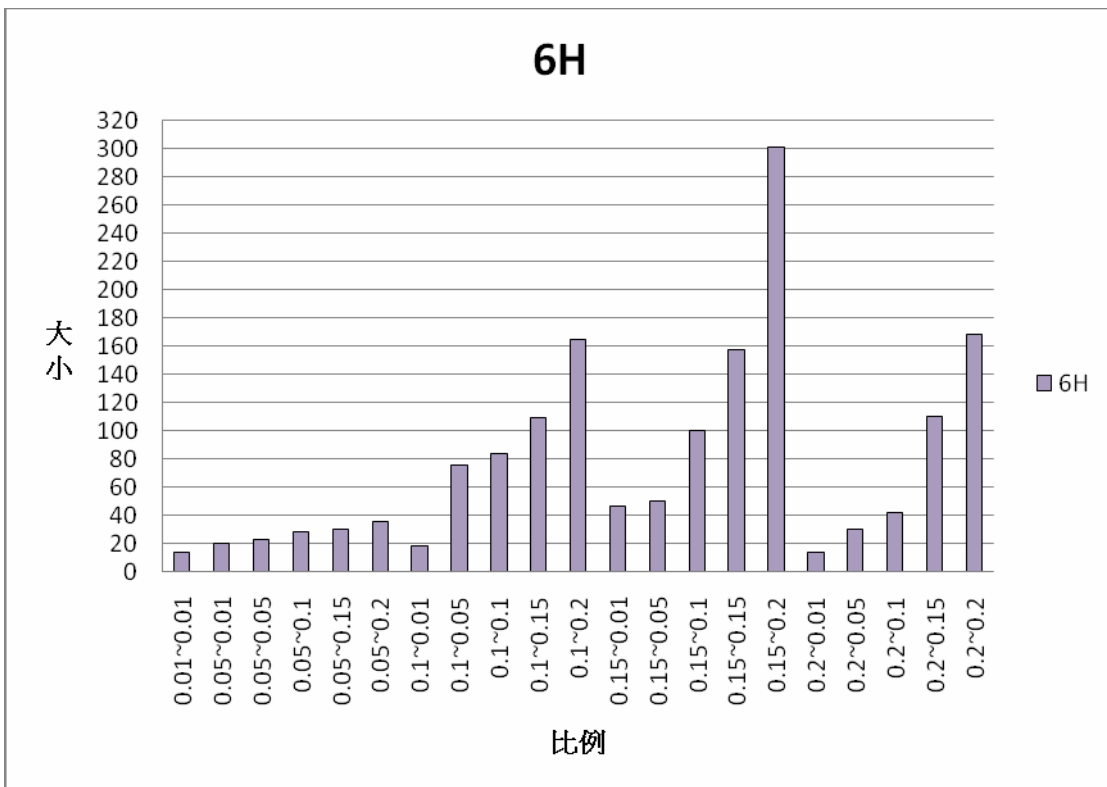


圖 2. 分子量 80,000 的幾丁聚醣與三聚磷酸鹽的奈米微粒粒徑分佈圖形。

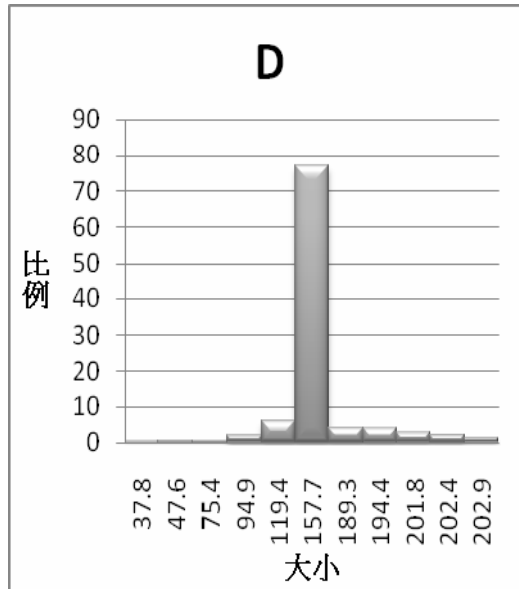
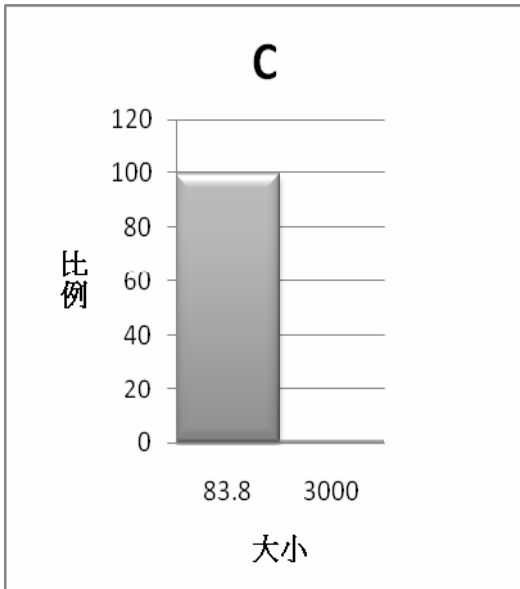
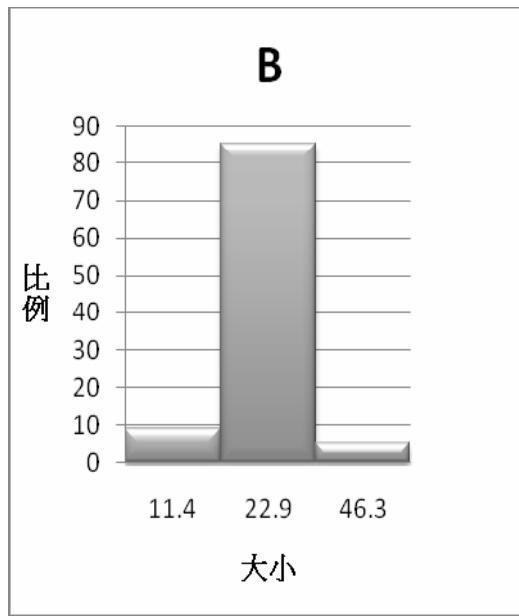
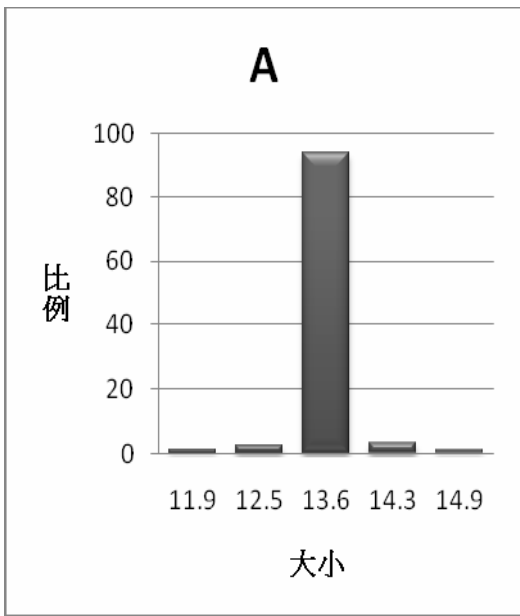


圖 3、(A) 平均粒徑為 13.6 ± 0.3 nm ; (B) 22.9 ± 3.0 nm ; (C) 83.8 ± 0.1 nm ; (D) 157.7 ± 2.5 nm 的粒徑分佈圖形

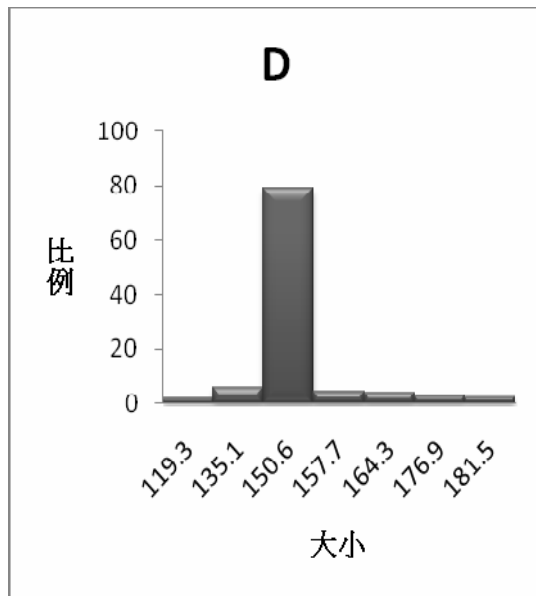
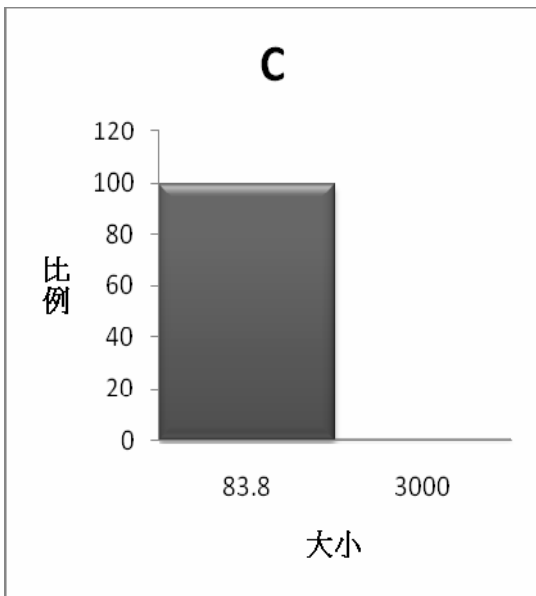
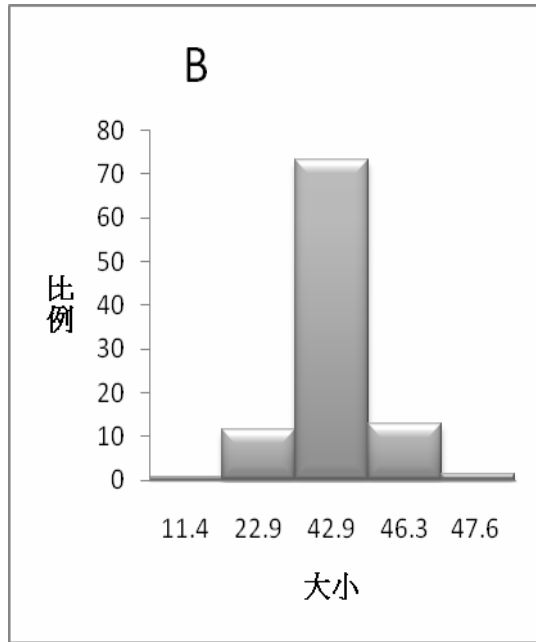
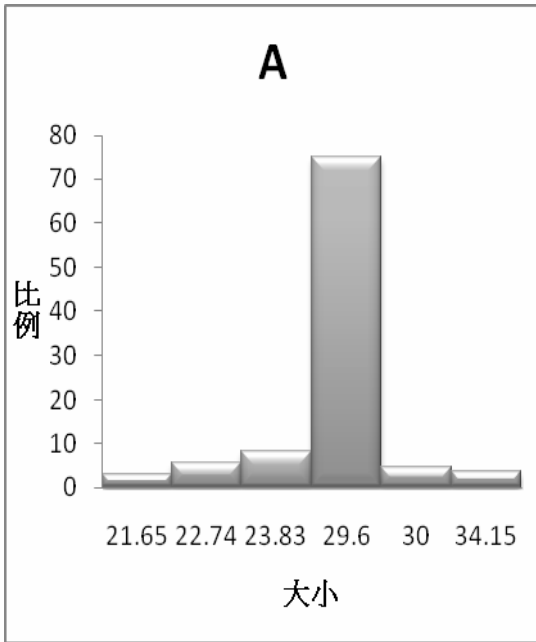


圖 4. (A) 平均粒徑為 29.6 ± 2.9 nm ; (B) 42.9 ± 3.0 nm ; (C) 83.8 ± 0.1 nm ; (D) 150.6 ± 0.5 nm 的粒徑分佈圖形

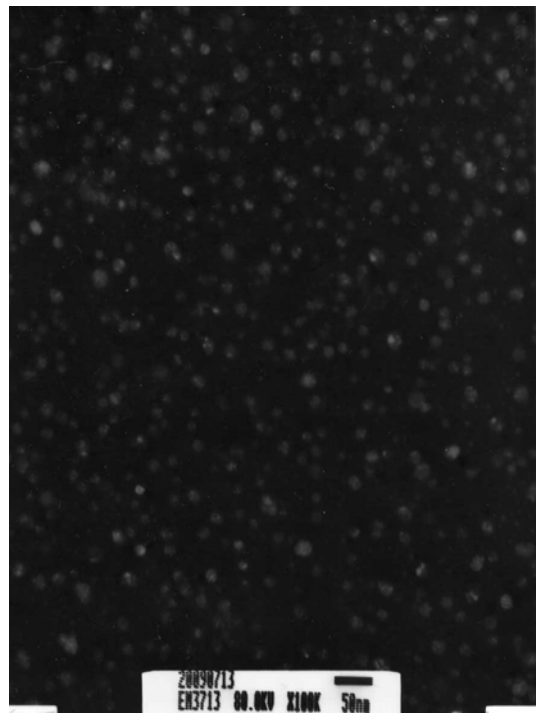


圖 5. 穿透式電子顯微鏡(TEM)觀測奈米微粒的表面型態

計畫成果自評

本計畫所建立以離子鍵結方式製備奈米微粒載體，利用幾丁聚醣與三聚磷酸鹽中的正負電荷關係，使其所製備出大小均一且粒徑控制至30-300 nm 的奈米微粒。因此本計畫的執行成果均能符合預定進度。