

# 用作盲肠位点药物转载的交联凝胶的体外降解

殷以华, 秦东珍, 杨亚江\*, 徐辉碧

(华中科技大学化学系, 湖北 武汉 430074)

**摘要:** 目的 考察用作结肠位点药物转载体的偶氮苯交联凝胶的降解机制及影响因素。方法 凝胶经大鼠结肠菌培养, 在不同时间间隔内取出用蒸馏水洗净, 加 15% 氢氧化钠加热水解后, 用紫外光度法测定其降解率。结果 这类凝胶能被盲肠内的厌氧菌降解, 其降解率与凝胶的溶胀程度有关, 凝胶的溶胀程度越大, 其降解率越高。凝胶的降解率与溶胀程度间的关系主要取决于网络孔密度和孔尺寸。影响网络孔密度和孔尺寸的因素包括网络上疏水基的长度、交联程度及组成等, 通过改变这些因素可以达到调节网络孔密度和孔尺寸, 从而控制其降解率和药物释放的目的。结论 电子载体对凝胶降解率的影响研究, 不仅证实盲肠菌对芳香族偶氮化合物的还原发生在细胞体外, 而且亦显示偶氮还原酶存在于细胞体内, 电子载体的功能是穿梭于细胞内的偶氮还原酶与细胞外的偶氮基团之间起传递电子的作用。本实验结果对开发结肠位点的控释转载体有重要的指导意义。

**关键词:** 交联凝胶; 盲肠菌; 降解; 溶胀程度; 电子载体

中图分类号: R943.44; R977.3 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2001)11-0863-05

如何解决蛋白或酶类等药物的口服问题一直是生物医学界及药理学界倍受关注的研究课题。因为这些药物很容易被存在于胃部的胃酶及存在于小肠内的胰酶分解。解决此问题的途径就是将药物传给结肠, 此处分解蛋白的酶的活性显著降低。

将药物传递到结肠的最合适方法<sup>[1]</sup>之一是开发能被盲肠菌或盲肠酶降解并能在胃部和小肠内稳定存在的药物转载体。研究盲肠菌与可降解材料(尤其是采用交联大分子材料作为包囊材料时)之间的作用关系, 对控制药物的传递与释放非常重要。

因此我们设计并合成了既带有 pH 敏感的亲水基, 又带有疏水的长链侧基, 也含有盲肠菌可降解的偶氮交联基团的共聚凝胶体系。在胃部较低的 pH 范围内, 凝胶由于受疏水长链侧基的控制有很低的溶胀度, 可保护药物免遭胃酶破坏; 在小肠内, 凝胶虽然由于 pH 的增加溶胀度有所提高, 但由于受二级溶胀动力学控制(将另文发表), 药物仍被保护直到结肠; 在结肠内, 凝胶的溶胀已达到能让盲肠菌及电子载体导向偶氮还原位点的程度, 凝胶降解, 药物便释放出。本文研究了此类凝胶的体外大鼠盲肠菌

的降解。

## 材 料 和 方 法

**甲基丙烯酸酯和 4,4'-二(甲基丙烯酰氨基)偶氮苯的制备** 甲基丙烯酸正丁酯、甲基丙烯酸十二酯和甲基丙烯酸十六醇酯按文献[2]方法制备。用事先按文献[3,4]分别制得的甲基丙烯酰氯和 4,4'-二氨基偶氮苯为原料根据文献[5]方法合成 4,4'-二(甲基丙烯酰氨基)偶氮苯。

**凝胶的制备** 凝胶 I, II, III 和 IV 是以偶氮二异丁氰(2,2'-azobis(isobutyronitrile), AIBN)为引发剂、N,N'-二甲基甲酰胺(N,N'-dimethylformamide, DMF)为溶剂, 参照前文<sup>[6]</sup>方法制备。单体丙烯酰胺(acrylamide, AM)、丙烯酸(acrylic acid, AA)、甲基丙烯酸酯(methyl methacrylate esters, r-AMA)、交联剂 4,4'-二(甲基丙烯酰氨基)偶氮苯(4,4'-diaminoazobenzene, DAAB)、溶剂和引发剂的用量见表 1。

**凝胶溶胀程度的测定** 自上述凝胶中取下一小块(干重约 10 mg), 室温干燥 24 h, 然后 60℃再真空干燥 24 h, 称重( $W_0$ )。将此干燥的凝胶浸入不同 pH 的磷酸-柠檬酸-硼酸钠缓冲体系<sup>[7]</sup>中, 在不同时间间隔内取出, 用滤纸轻轻擦去表面多余的水分, 称重( $W$ )。此过程进行到 3 次连续称量被溶胀凝胶的重量不变为止。根据下列方程<sup>[8]</sup>计算溶胀程度:

$$\text{凝胶的吸水量}(\%) = 100(W - W_0)/W_0$$

收稿日期: 2001-03-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(29574160)

作者简介: 殷以华(1964-), 男, 博士, 讲师;

杨亚江(1950-), 男, 教授。

\* 通讯作者 Tel: (027) 87543132, Fax: (027) 87543632,

E-mail: yiyang@public.wh.hb.cn

**Table 1 Compositions of gels and conditions of preparation**

Gel	AM/ mol %	AA/ mol %	r-AMA/ mol %	DAAB/ mol %	AIBN/ mg	DMF/g	Total/g
I	49.8	40	10 (n=4)	0.2	30	7	10
II	49.5	40	10 (n=4)	0.5	30	7	10
III	66.8	30	3 (n=12)	0.2	30	7	10
IV	49.5	40	10 (n=16)	0.5	30	7	10

AM: Acrylamide; AA: Acrylic acid; r-AMA: r Alkyl methacrylate esters; DAAB: 4,4'-Diaminoazobenzene; AIBN: 2,2'-Azobis(isobutyronitrile); DMF: N,N-Dimethylformamide

**盲肠菌对凝胶的体外降解** 凝胶的降解按文献 [9] 方法, 取  $\delta$  SD 大鼠 (200 - 300 g) 盲肠用生理盐水漂洗, 剪碎, 悬浮于 VPI<sup>[10]</sup> 溶液中 (1 g 盲肠/25 mL VPI 溶液), 通氮排氧, 用玻璃棉过滤。然后分别取细胞悬浮液 5.0 mL 加到含中性红 (neutral red) 或蒸馏水  $\alpha$ -D 葡萄糖和 pH 7.4 上述缓冲溶液到达溶胀平衡的凝胶的不同试管中, 用磨口塞塞紧, 置于真空干燥器中。干燥器用氮气置换 3 次以上, 置于 35 °C 的恒温水浴中培养, 在不同时间间隔内取出一只或若干只试管进行偶氮还原分析。余下样品按上述方法进行氮气保护直到实验结束。

**凝胶降解率的测定** 将干燥器中凝胶取出经蒸馏水反复洗涤, 完全除去细胞悬浮液后, 加入 15% NaOH 溶液并加热使其完全水解, 然后注入 10 mL 量瓶中, 用蒸馏水稀释至刻度, 在 380 nm 测定吸光度。凝胶的降解率 (R) 被定义为:

$$R(\%) = 100(A_w - A_0) / A_0$$

式中  $A_w$  是在降解过程中某个时刻用降解凝胶测得的吸光度,  $A_0$  是用非降解凝胶测得的吸光度。

## 结 果

### 1 凝胶的平衡溶胀程度与 pH 的关系

4 种凝胶的平衡溶胀程度随缓冲溶液 pH 的变化曲线见图 1。在 pH 2.2 - 4.0, pH 对凝胶平衡溶胀程度的影响不大, 而且凝胶的溶胀平衡程度均很低; 但在 pH 4.0 - 6.0, 每种凝胶的溶胀程度都有不同程度的突变, 其突变程度为: I > II > III > IV。

### 2 凝胶的平衡溶胀程度与降解率之间的关系

35 °C 在 pH 7.4 的缓冲溶液中, 4 种不同结构的凝胶溶胀动力学曲线与体外盲肠菌的降解动力学曲线见图 2 与图 3。

从图 2, 3 可看出, 凝胶的降解率与其溶胀程度有较好的关联, 溶胀程度越大, 凝胶的降解率也越

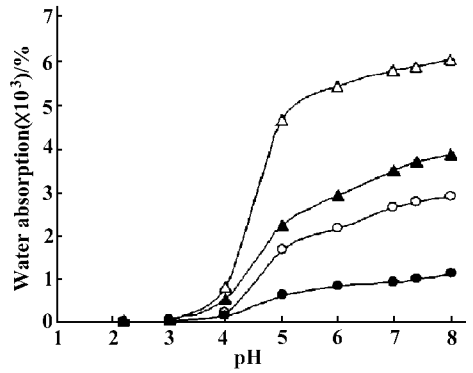


Figure 1 Equilibrium swelling behavior of gels (I, II, III, and IV) at various pH values of citrate-phosphate-borate buffer solution at 35 °C. The water absorption was measured as a function of pH. For composition of the gels see Table 1

▲—▲ gel I; △—△ gel II; ●—● gel III; ○—○ gel IV

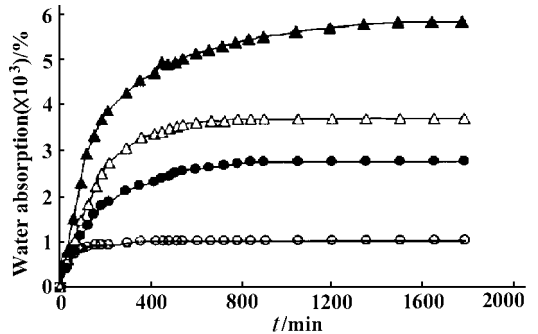


Figure 2 Swelling kinetics for gels (I, II, III, and IV) in a citrate-phosphate-borate buffer solution of pH 7.4 at 35 °C. For composition of gels see Table 1

▲—▲ gel I; △—△ gel II; ●—● gel III; ○—○ gel IV

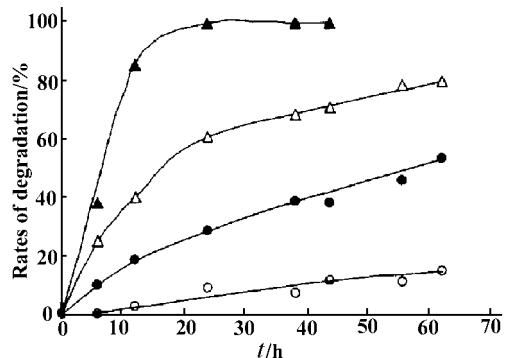


Figure 3 *In vitro* degradation of gels (I, II, III, and IV). Rates of degradation as a function of time of incubation. For composition of the gels see Table 1. Gels (dry weight: 10.0 mg) swollen to equilibrium at pH 7.4 of citrate-phosphate-borate buffer solution at 35 °C were immersed in a complex system consisting of 5.0 ceal suspension (1.0 g fresh male Sprague-Dawley rat ceal contents/25 mL VPI diluent<sup>[16]</sup>), 0.05 mL 20 wt %  $\alpha$ -D-glucose and 0.5 mL 0.001 mol·L<sup>-1</sup> neutral red at 35 °C for 62.5 h

▲—▲ gel I; △—△ gel II; ●—● gel III; ○—○ gel IV

大。由于在 pH 7.4 有最大溶胀程度的凝胶亦有最大的降解率,因而影响溶胀程度的各种因素亦必然影响降解率。凝胶分子结构上影响溶胀程度的因素主要有:亲水基/疏水基、交联程度等。从图 2 和图 3 还可看出:同一种凝胶,交联程度越大,降解率越小(见 I 和 II);交联程度相同而疏水基链长不同的凝胶,疏水基链越长,降解率越低(见 II 和 IV);凝胶 III 的疏水基含量及交联程度都低于 II,但其降解率比 II 低,显然其疏水基链较长起了主要作用。

由于芳香族偶氮交联基团是黄色,所以随交联剂的降解,凝胶的颜色从黄色逐渐变成无色。在其他条件均相同的情况下,低交联程度的凝胶变色的速度较高交联程度的凝胶要快。较高交联程度的凝胶在未完全降解的情况下呈现出一个黄色中心和一个无色的边缘。凝胶溶胀速度越快,溶胀程度越高,颜色变化越快。随着降解进行,凝胶块逐渐缩小变薄,最后完全溶解。凝胶降解过程中观察到的这些现象表明:凝胶的降解过程是从凝胶的表面开始,然后逐渐扩展到中部,最终完全降解。

### 3 电子载体对凝胶降解率的影响

盲肠菌还原芳香族偶氮化合物系统是一个复合系统,该系统的主要成分有:①芳香族偶氮基团(底物)( $R-C_6H_4-N=N-C_6H_4-R$ ),②盲肠菌(cecal bacteria),③电子载体(electron carrier/shuttle)。除了底物与盲肠菌之间的作用关系对结肠位点的药物传递很重要外,电子载体的功能亦不可忽视。

较无电子载体,加入低电势( $E_0 = -200 - 350 \text{ mV}^{[10]}$ )的电子载体到偶氮还原系统中会显著的促进盲肠菌对交联凝胶的降解,且其降解率强烈的依赖电子载体的浓度。图 4 结果显示,加入中性红(neutral red, 电子载体)的还原系统凝胶的降解率明显高于不加入中性红的还原系统。图 5 表明,中性红的浓度愈大,凝胶的降解率愈高。这些结果与 Joseph PB 等<sup>[10]</sup>报道完全一致,亦与用体外细胞抽提物对偶氮染料<sup>[10,11]</sup>及高分子量的偶氮化合物<sup>[10]</sup>进行的还原研究结果类似。另外,图 5 亦显示了盲肠菌的浓度越大,凝胶还原率越高。

### 4 凝胶在溶胀平衡态时的孔密度

凝胶 I 的交联程度较低,疏水基侧链较短,溶胀平衡态的电镜照片显示它的网络上的孔密度最大(图 6A),所以其降解率亦最大。凝胶 II 与凝胶 I 尽管有相同的疏水基侧链及相同的亲水基(AA)含量,但由于其交联程度较大,溶胀平衡态的电镜照片显示它的网络上的孔密度明显的小于凝胶 I(图 6B),

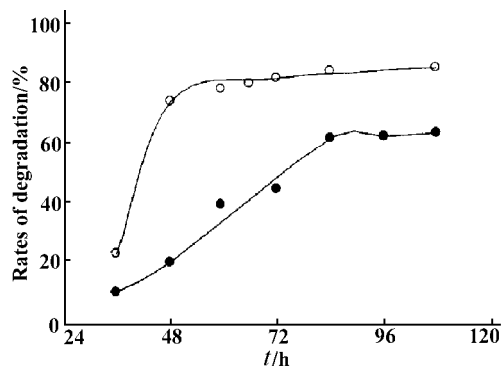


Figure 4 Time-independence of the influence of electron carrier on the rate of degradation of gel II. For composition of the gel see Table 1. Gel II (dry weight: 10.0 mg) swollen to equilibrium at pH 7.4 of citrate-phosphate-borate buffer solution at 35 °C were immersed in a complex system consisting of 5.0 cecal suspension (1.0 g fresh male Sprague-Dawley rat cecal contents/25 mL VPI diluent<sup>[16]</sup>), 0.05 mL 20%  $\alpha$ -D-glucose and 0.5 mL  $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  neutral red or 0.5 mL distilled water at 35 °C for 108 h  
○—○ Neutral red; ●—● Distilled water

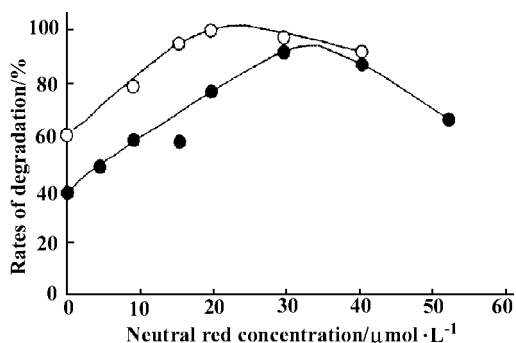


Figure 5 Influence of neutral red concentration on the rate of degradation of gel III. For composition of the gel see Table 1. Gel III (dry weight: 10.0 mg) swollen to equilibrium at pH 7.4 of citrate-phosphate-borate buffer solution at 35 °C were immersed in a complex system consisting of 0.05 mL 20%  $\alpha$ -D-glucose and 5.0 mL cecal suspension or cecal suspension\* at 35 °C for 24.5 h  
○—○ cecal suspension 1.0 g fresh male Sprague-Dawley rat cecal contents/25 mL VPI diluent<sup>[10]</sup>; ●—● cecal suspension\* 1/2 the concentration of cecal suspension

因而其降解率亦低于凝胶 I。亲水基(AA)含量最低,疏水基侧链较长的凝胶 III 显示出较低的降解率,这显然归因于它的孔密度较凝胶 I 小和孔尺寸较凝胶 II 小(图 6C)。疏水基侧链最长的凝胶 IV 的电镜照片显示其孔尺寸最小,许多孔处于塌缩状态(图 6D),所以它的降解率最低。

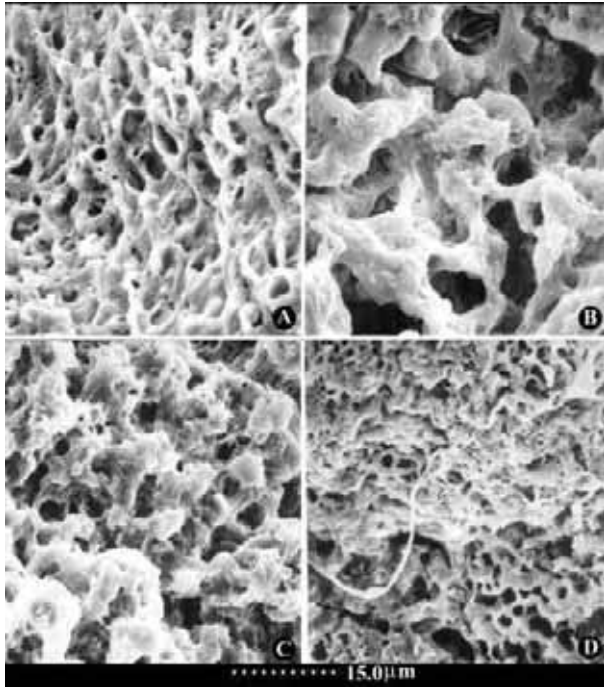


Figure 6 SEM photographs of gel I (A), gel II (B), gel III (C), and gel IV (D) at the surface in the equilibrium swollen state in a citrate-phosphate-borate buffer solution of pH 7.4 at 35 °C. For composition of gels see Table 1

## 讨 论

凝胶溶胀程度的突变性是羧基的离子化程度决定的。在较低的 pH 范围内,由于羧基未被离子化,因而 pH 的依赖性不明显;而在 pH 自低到高的过程中,由于羧基的离子化导致分子链从卷曲态到完全伸展态,因而出现溶胀程度有一个较大的突变;突变程度的大小主要取决于疏水效应和/或交联程度。人体胃部 pH 为 1 - 3.5,因此凝胶 I - IV 在胃部溶胀程度很低,将它们用作药物载体可避免药物在胃部因载体发生较大溶胀而释放。

芳香族偶氮化合物交联凝胶的降解实质是盲肠菌导致的偶氮键的断裂。这与盲肠菌及电子载体导向断裂位点的难易程度直接相关。由于盲肠菌的大尺寸,其渗透很难通过网络本体进行,只能依赖于网络的溶胀并通过网络上张开的孔进行。大的孔尺寸及孔密度会导致更多的盲肠菌和电子载体进入凝胶内部的偶氮还原位点,因而引起降解率的增加。

而在偶氮键的浓度及其他条件不变时,用细胞悬浮液,低分子的偶氮化合物与非交联的大分子偶氮化合物的偶氮还原率的结构与活性间的相关性较小<sup>[10]</sup>。Kopečková P 等<sup>[11]</sup>用体外细胞抽提液也得类

似结果。即盲肠菌及电子载体在导向交联大分子的偶氮位点的过程会受到网络的制约。通过改变凝胶的主链结构,亲水基/疏水基及交联剂的含量或长度,就可以调节凝胶网络的孔尺寸或孔密度从而达到控制其降解率和囊包药物释放的目的。

当药物通过 pH 敏感性传向小肠时,由于小肠内 pH 值的增大,凝胶会发生溶胀。通过疏水基、交联程度和厚度等控制囊材(凝胶)外部溶胀,内部不溶胀或很少溶胀,这样药物就不会在小肠内释放。经部分溶胀的囊材一旦到达结肠,由于盲肠菌的降解,药物即可释放出来。

对以芳香族偶氮化合物为交联剂而形成的网状大分子而言,偶氮基不可能穿过细胞膜进入到细胞内部与偶氮还原酶发生作用。证明偶氮还原是在细胞外进行的。由于偶氮还原率随着细胞开始凋亡而增加<sup>[12]</sup>,偶氮还原酶可能存在于细胞内。相反,若偶氮还原酶是在细胞外与偶氮基团直接发生作用,则加入低电势( $E_0 = -200 - -350 \text{ mV}^{[10]}$ )的电子载体到偶氮还原系统中应当对偶氮还原率的影响不大或无影响。中性红(电子载体)对偶氮还原率的影响结果不仅从反面证实偶氮还原酶是存在于细胞内,而且证明中性红(电子载体)有穿梭于细胞内的偶氮还原酶与细胞外的偶氮基团之间起传递电子的功能。

## REFERENCES:

- [1] Friend D. Colonic-specific drug delivery [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 1991, **7**(1): 149 - 201.
- [2] Omori E, Zhang YC, Zhu CQ, et al translated. *Functional Acrylic Resin* [M]. Beijing: Chemistry Industry Press, 1993. 179 - 181.
- [3] Rehberg CE, Dixon MB, Fisher CH. Polymerizable esters of lactic acid.  $\alpha$  carbalkoxyethyl acrylates and methacrylates [J]. *J Am Chem Soc*, 1945, **67**(1): 208 - 210.
- [4] Witt ON, Charlottenburg EK. Derivatives of Azobenzene [J]. *Ber Bunsenges Phys Chem*, 1912, **45**: 1134 - 1154.
- [5] Přádny M, Kopeček J. Hydrogels for site-specific oral delivery: Poly [(acrylic acid)-co( butyl acrylate )] crosslinked with 4, 4'-bis ( methacryloylamino ) azobenzene [J]. *Makromol Chem*, 1990, **191**(8): 1887 - 1897.
- [6] Yang YJ, Engberts JBFN. Stimuli response of polysoap hydrogels in aqueous solution and DC electric fields [J]. *Colloids Surf A Physicochem Engin Asp*, 2000, **169**(3): 85 - 94.
- [7] Hariharan D, Peppas NA. Characterization, dynamic swelling behaviour and solute transport in cationic networks with applications to the development of swelling-controlled release systems [J]. *Polymer*, 1996, **37**(1): 149 - 161.

- [ 8 ] Yoshida M, Yang JS, Kumakura M, *et al.* Artificially intelligent hydrogels responding to external stimuli such as temperature and pH [ J ]. *Eur Polym J*, 1991, **27**(9) :997 - 1005 .
- [ 9 ] Brown JP, McGarraugh GV, Parkinson TM, *et al.* A polymeric drug for treatment of inflammatory bowel disease [ J ]. *J Med Chem*, 1983, **26**(9) :1300 - 1307 .
- [ 10 ] Brown JP. Reduction of polymeric azo and nitro dyes by intestinal bacteria [ J ]. *Appl Environ Microbiol*, 1981, **41**(5) :1283 - 1286 .
- [ 11 ] Kopečková P, Kopeček J. Release of 5-aminosalicylic acid from bioadhesive N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide copolymers by azoreductases *in vitro* [ J ]. *Makromol Chem*, 1990, **191**(9) :2037 - 2045 .
- [ 12 ] Dubin P, Wright KL. Reduction of azo food dyes in cultures of *Proteus vulgaris* [ J ]. *Xenobiotica*, 1975, **5**(9) :563 - 571 .

## DEGRADATION *IN VIVO* OF CROSS LINKED HYDROGELS FOR COLONIC-SITE DRUG DELIVERY

YIN Yr-hua, QIN Dong-zhen, YANG Ya-jiang, XU Hui-bi

( Department of Chemistry, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

**ABSTRACT:** **AIM** To investigate the mechanism of degradation by cecal bacteria of cross-linked hydrogels for colonic-site drug delivery. **METHODS** Hydrogels that were incubated with cecal bacteria from rats for different time were washed repeatedly in distilled water till complete removal of bacteria. 15 % NaOH solutions were added and heated till complete hydrolysis of the gels. The cleavage of azo bonds was monitored with a Lambda spectrophotometer. **RESULTS** The gels were degradable by anaerobes present in the colon. The rate of degradation was found to be related to the degree of swelling of the gels. The higher the degree of swelling, the higher the rate of degradation. The relation between the rate of degradation and the degree of swelling was attributed to the porosity and pore size of the networks. The lengths of hydrophobic side chains, the degree of cross-linking, the composition of structural units were shown to influence reduction of azo bonds. By changing the composition of structural units, the length of hydrophobic groups, it is possible to adjust the degree of swelling and thereby control the rate of degradation of the gels and the release of drugs. The study on the influence of electron carriers on the rate of degradation not only affirmed the hypothesis of extracellular reduction, but also appeared that there is an intracellular enzymatic component. Electron carriers function as exogenous electron shuttles between azo compound and enzyme. **CONCLUSION** The above-mentioned results are of important significance for the development of carriers for the delivery of colon-specific drugs.

**KEY WORDS:** cross-linked hydrogels; cecal bacteria; degradation; the degree of swelling; electron carriers