

## キトサン薬物キャリアシステムの合成と 特性解析の同時実行

Cary 3500 ペルチェ UV-Vis 分光光度計による  
架橋メカニズムのモニタリング



### 著者

Dr. Mohammad Al Kobaisi<sup>1</sup>

Dr. Matthew Quinn<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Swinburne University of Technology, School of Science, Faculty of Science Engineering and Technology, Melbourne, Australia

<sup>2</sup>Agilent Technologies, Inc. Melbourne, Australia

### はじめに

制御可能で安定した生体適合性のある薬物キャリアシステムは非常に重要であり、薬物およびワクチン送達システムに大きな影響を与える可能性があります<sup>(1, 2)</sup>。生体適合性の低い材料を使用しなくて済み、より安定したキャリアを用い、さらに調製経路をより簡単にするため、薬物キャリアシステムを調製する新規でより優れた方法を見つけることが求められています<sup>(3)</sup>。

キトサンは、カニやロブスターなどの甲殻類の殻に含まれる多糖類です。その非常に堅牢な化学的活性、生体適合性、および制御放出の能力のために広く研究されていることから<sup>(1, 4, 5)</sup>、検討対象として選択しました。キトサンは弱酸性の水系溶媒に溶解し、共有結合またはイオン架橋して、さまざまなサイズと形状のヒドロゲルデバイスを形成できます。ポリリン酸塩は、キトサンのナノおよびマイクロ粒子を生成するのによく使用されます。ここでは、キトサンのヒドロゲル化を誘導する新しいポリリン酸の研究を行います。オクタホスホネートテトラフェニルポルフィリン (OPP) は、キトサン架橋剤として利用できる光活性発色団分子です (図 1)。キトサンと OPP の間の架橋プロセスにより、OPP 発色団が自己集合します。このメカニズムにより、UV-Vis 分光光度計を使用してモニタリングできる分光学的変化が引き起こされます。

アニオン形態の OPP のリン酸基 (図 1) が、キトサンのプロトン化アミンと強く相互作用して、溶液中でポリマー鎖を架橋します。このプロセスの結果、直径約 1  $\mu\text{m}$  の粒子が形成され、ワクチン抗原や薬物などのさまざまな生物活性化合物をカプセル化することができます。

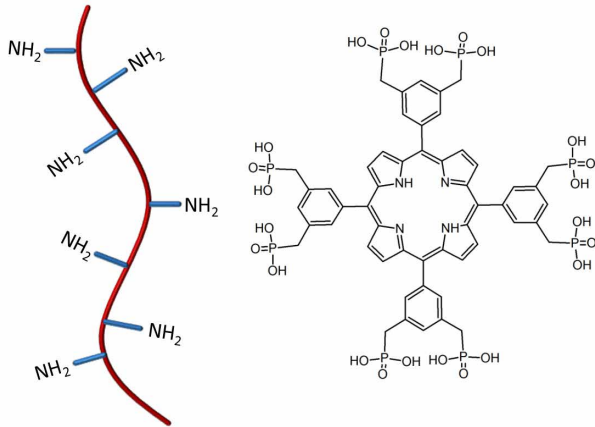


図 1. (左) 架橋に利用可能なアミン基を有するキトサンの模式図、および (右) 架橋に利用可能なリン酸基を有するオクタホスホネート テトラフェニルボルフィリン (OPP) の分子構造

本研究では、Agilent Cary 3500 UV-Vis 分光光度計を使用してモニタリングすることにより、OPP-キトサン架橋メカニズムについて調査しました。Cary 3500 は、ソフトウェア制御のキュベット内攪拌機能があり、周囲光の影響を受けないため、本研究に特に適しています。後者のおかげで、時間ベースの測定にデータに影響を与えることなく、試薬を順次追加することができます。合成を *in situ* で行うことにより、ステップ数が最小限に抑えられます。

## 実験方法

### キトサン-FITC-OPP マイクロハイドロゲルの調製とモニタリング

この実験では、1% 酢酸中のフルオレセインイソチオシアネート (FITC) 標識キトサン溶液を使用しました。サンプルは、キトサン溶液を一定量の OPP 溶液に次の設定で徐々に添加することにより調製しました。

1. pH を約 7 とした 0.125 mg/mL の OPP 2 mL を、星型 PTFE マグネティック攪拌子を入れた 3.5 mL 石英キュベットに加えました。

2. 水のキュベットを、対照として参照チャンネルに設置しました。
3. 次に、OPP 溶液の pH を、1N 塩酸 (HCl) を使用して 4.5 に調整して、キトサン溶液の pH と一致させました。これにより、架橋プロセス中に観察された変化が pH 変化に起因するものではないことが保証されます。
4. 20 秒間平衡化させた後、波長スキャンを実行しました。
5. 2% w/v のキトサン-フルオレセインイソチオシアネート (FITC) を表 1 に従って数回続けて少量ずつ添加しました。各添加後、20 秒間の平衡化時間の後、波長スキャンを実行しました。
6. キトサン-FITC 添加の最後に、1 N 水酸化ナトリウム (NaOH) を加えて pH を 7 に戻しました。20 秒間の平衡化時間の後、波長スキャンをさらに実行しました。

表 1. 実験中のサンプルへの添加

実験 #	キトサン容量 (μL)	総量 (μL)	キトサン (mg/mL)	OPP (mg/mL)	pH
1	0	1500	0.000	0.125	7.0
2	0	1500	0.000	0.125	4.5
3	20	1520	0.263	0.123	4.5
5	40	1540	0.519	0.122	4.5
6	90	1590	1.132	0.118	4.5
7	140	1640	1.707	0.114	4.5
8	200	1700	2.353	0.110	4.5
9	300	1800	3.333	0.104	4.5
10	500	2000	5.000	0.094	4.5
11	700	2200	6.364	0.085	4.5
12	1000	2500	8.000	0.075	4.5
13	1500	3000	10.000	0.063	4.5
14					4.5
15					5.0
16					5.4
17					6.0
18					6.5
19	1500	3000	10.000	0.063	7
20	1500	1500	20.000	0	4.5

## 装置構成

本研究には、Agilent Cary 3500 コンパクト UV-Vis 分光光度計を用いました。機器パラメータを表 2 に示します。

表 2. UV-Vis 実験パラメータ

パラメータ	設定値
波長範囲 (nm)	1100 ~ 200
スペクトルバンド幅 (nm)	1
シグナル平均化時間 (秒)	0.1
データ間隔 (nm)	1
攪拌速度 (rpm)	500

## 結果と考察

### 粒子の調製

OPP 架橋キトサンの調製は、図 2 に示すように、pH 7 で 417 nm および pH 4.5 で 441 nm の主要な OPP ピークを追跡することによってモニタリングしました。酸性キトサンプリカーサ溶液の添加により pH が変化するのを避けるために、pH を 7 から 4.5 にシフトさせました。OPP の吸光度が pH に依存するため、pH の変更は重要です。

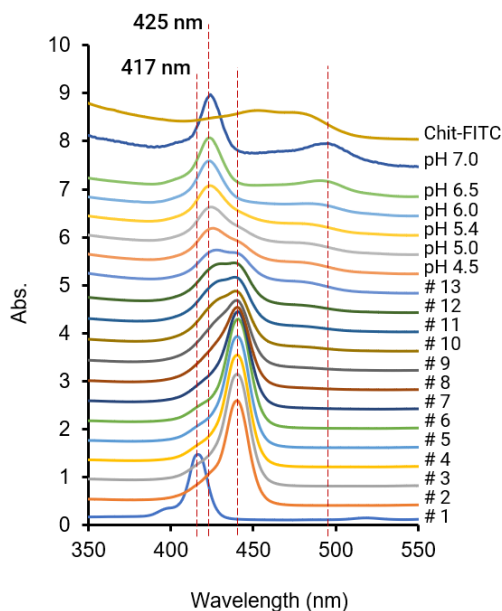


図 2. OPP を使用した架橋プロセス中のキトサン-FITC の波長スキャン (350 ~ 550 nm)。数字ラベル #1 ~ #13 は、表 1 に示す実験番号です。わかりやすく表示するために、スペクトルはずらしています。425 nm のピークは、架橋キトサン-FITC に関連する OPP を示しています。

pH を 4.5 に調整した後、キトサンプリカーサを少しずつ添加しました。このとき、キトサン-FITC 濃度が 0.261 %w/w に達するまでは、OPP の 417 nm ピークにほとんど影響が現れませんでした。この濃度に達した時点で 425 nm でのピークの出現が観察されました。

次に、溶液を、OPP 開始 pH である生理学的に適切な pH 7 に徐々に調整していきました。pH 7 に調整された生成物溶液のスペクトルは、425 nm に明確なピークを示し、417 nm の元のピークはなくなりました。425 nm での吸光度は、架橋キトサン-FITC のみに関連する OPP に帰することができます。架橋キトサン粒子の存在は、光散乱を示す波長範囲全体の信号の増加 (波長の減少とともに増加) によっても説明できます。これはより低い波長でより明確に示され (レイリー散乱)、図 3 に示すように、約 300 nm で容易に観察できます。

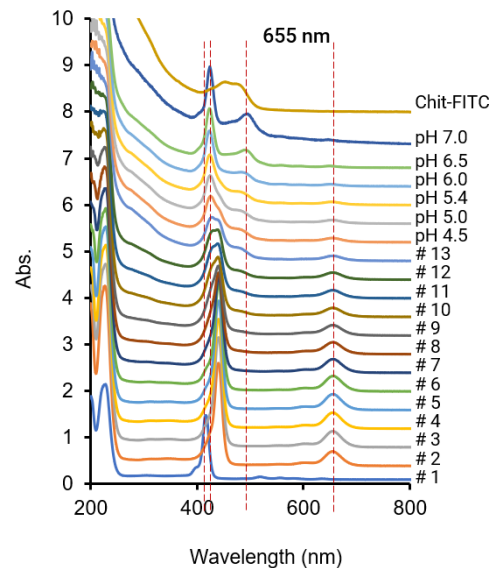


図 3. OPP を使用した架橋プロセス中のキトサン-FITC の波長スキャン (200 ~ 800 nm)。数字ラベル #1 ~ #13 は、表 1 に示す実験番号です。わかりやすく表示するために、スペクトルはずらしています。より低い波長での信号の増加は、粒子散乱を示しています。655 nm のピークは、遊離 OPP を示しています。

遊離 OPP は約 655 nm の波長の光を吸収します。655 nm のピークをモニタリングすることにより、OPP の消費を判断できます (図 3 を参照)。これにより、プロセスが滴定挙動を示し、等価点が観察されて反応終点が検出できることが実証されました。

OPP を含まないポリマーの波長スキャンにより、スペクトルピークシフトの変化と吸収強度の変化が OPP 発色団の環境の変化によるものであることが確認されました。これらのスペクトルの変化は、静電環境の変化および、架橋プロセス中の分子の凝集によって強化された芳香族コアの近接が原因であると言えます (図 2)。

## 結論

Cary 3500 コンパクト UV-Vis 分光光度計を使用して、新しいバイオポリマー薬物キャリアシステムであるキトサン-FITC-OPP マイクロヒドロゲルの合成をモニタリングしました。3500 のソフトウェア制御の攪拌機能により、キュベットに直接添加するだけで合成を行うことができました。波長スキャンを実行して合成を継続的にモニタリングすることにより、架橋剤の明確な吸光度ピークが 417 nm から 425 nm にシフトするポイントを特定できました。ピークシフトは、架橋が発生し、マイクロヒドロゲル粒子が形成されたことを示します。

## 参考文献

1. Mohammed, M. A.; Syeda, J. T. M.; Wasan, K. M.; Wasan, E. K. An Overview of Chitosan Nanoparticles and Its Application in Non-Parenteral Drug Delivery. *Pharmaceutics*, **2017**, 9 (4), 53.
2. Bernkop-Schnürch, A.; Dünnhaupt, S. Chitosan-based drug delivery systems. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2012**, 81 (3), 463.
3. Hu, L.; Sun, Y.; Wu, Y. Advances in chitosan-based drug delivery vehicles, *Nanoscale*, **2013**, 5 (8), 3103.
4. Bhosale, S. V.; Kalyankar, M. B.; Nalage, S. V.; Lalander, C. H.; Bhosale, S. V.; Langford, S. J.; Oliver, R. F. pH dependent molecular self-assembly of octaphosphonate porphyrin of nanoscale dimensions: nanosphere and nanorod aggregates. *Int. J. Mol. Sci.*, **2011**, 12 (3), 1464.
5. Giacalone, G.; Hillaireau, H.; Capiou, P.; Chacun, H.; Reynaud, F.; Fattal, E. Stabilization and cellular delivery of chitosan-polyphosphate nanoparticles by incorporation of iron. *J. Control. Release*, **2014**, 194, 211.

ホームページ

[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)

カスタムコンタクトセンター

**0120-477-111**

[email\\_japan@agilent.com](mailto:email_japan@agilent.com)

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2019

Printed in Japan, November 7, 2019

5994-1093JAJP