

透明质酸-瑞巴派特偶联物及其自组装纳米颗粒的制备与表征



毛楷凡¹, 薛松^{1, 2}, 王丽丽¹, 刘正平^{1, 2, 3}, 杨雪华^{1, 3}, 张宏倩¹, 王颖超¹, 王金虎¹, 李大伟^{1, 2, 3}

1. 山东省药科学院新型缓控释制剂与药物靶向递送系统山东省工程研究中心 (济南 250101)

2. 山东省靶向递药与高端制剂重点实验室 (济南 250101)

3. 国家药品监督管理局药物制剂技术与评价重点实验室 (济南 250101)

【摘要】目的 通过酯键将透明质酸与瑞巴派特进行偶联, 制备透明质酸-瑞巴派特偶联物, 改善瑞巴派特的溶解性, 将透明质酸的保湿作用与瑞巴派特的促黏蛋白分泌作用相结合, 以期实现对干眼症的协同治疗。**方法** 使用羧基二咪唑活化瑞巴派特, 将活化后的瑞巴派特与透明质酸进行酯化反应得到透明质酸瑞巴派特偶联物。通过核磁共振氢谱、红外光谱以及紫外光谱对偶联物的结构进行表征, 将偶联物溶解在水中, 并采用紫外分光光度法测定偶联物中瑞巴派特的含量与溶解度。**结果** 不同的投料比可获得不同瑞巴派特含量的偶联物, 当瑞巴派特含量为 $(5.73 \pm 0.10)\%$ 时, 其粒径为 (159.68 ± 1.20) nm, Zeta 电位为 (-18.82 ± 0.37) mV, 当瑞巴派特含量为 $(6.02 \pm 0.05)\%$ 时, 其粒径为 (210.86 ± 3.50) nm, Zeta 电位为 (-22.59 ± 0.22) mV。随着瑞巴派特含量的增加, 纳米颗粒的粒径也随之变大。形成偶联物后瑞巴派特在水中的溶解度最高为 (0.60 ± 0.07) mg/mL。**结论** 本试验所制备的透明质酸瑞巴派特偶联物, 可有效提高瑞巴派特在水中的溶解度, 高取代度的偶联物能够形成粒径均一的纳米颗粒, 进一步扩展瑞巴派特在眼用制剂中的应用。

【关键词】 透明质酸-瑞巴派特偶联物; 瑞巴派特; 纳米颗粒

【中图分类号】 R943

【文献标识码】 A

Preparation and characterization of hyaluronic acid-rebamipide conjugate and the conjugate self-assembled nanoparticles

MAO Kaifan¹, XUE Song^{1,2}, WANG Lili¹, LIU Zhengping^{1,2,3}, YANG Xuehua^{1,3}, ZHANG Hongqian¹, WANG Yingchao¹, WANG Jinhu¹, LI Dawei^{1,2,3}

1. Shandong Engineering Research Center of New Sustained and Controlled Release Formulations and Drug Targeted Delivery Systems, Shandong Academy of Pharmaceutical Sciences, Jinan 250101, China

2. Shandong Key Laboratory of Targeted Drug Delivery and Advanced Pharmaceuticals, Jinan 250101, China

3. National Medical Products Administration Key Laboratory for Technology Research and Evaluation of Drug Products, Jinan 250101, China

Corresponding author: LI Dawei, Email: lidawei@sdaps.cn

【Abstract】Objective To prepare hyaluronic acid-rebamipide conjugate by coupling hyaluronic acid with rebamipide through ester bonds, improve the solubility of rebamipide, combine the moisturizing effect of hyaluronic acid with the promotion of mucin secretion by rebamipide, and

DOI: 10.12173/j.issn.2097-4922.202502015

通信作者: 李大伟, 硕士, 主任药师, Email: lidawei@sdaps.cn

realize collaborative treatment for dry eye syndrome. **Methods** Carbonyl diimidazole (CDI) was used to activate rebamipide, and the activated rebamipide was esterified with hyaluronic acid to obtain the hyaluronic acid-rebamipide conjugate. The structure of the conjugate was characterized by ^1H NMR, IR and UV spectrophotometry. The conjugate was dissolved in water, and the content of rebamipide in the conjugate was determined by UV spectrophotometry. **Results** Hyaluronic acid-rebamipide conjugate with different rebamipide content could be obtained by adjusting rebamipide feeding ratios. When the content of rebamipide was $(5.73\pm0.10)\%$, its particle size was (159.68 ± 1.20) nm, and the Zeta potential was (-18.82 ± 0.37) mV. When the content of rebamipide was $(6.02\pm0.05)\%$, its particle size was (210.86 ± 3.50) nm, and the Zeta potential was (-22.59 ± 0.22) mV. As the content of rebamipide increasing, the particle size of the nanoparticles also increased. After the formation of the conjugate, the highest solubility of rebamipide in water was (0.60 ± 0.07) mg/mL. **Conclusion** The hyaluronic acid-rebamipide conjugate prepared in this experiment can effectively improve the solubility of rebamipide in water. Conjugates with high degree of substitution can form uniformly sized nanoparticles, further expanding the application of rebamipide in ophthalmic formulations.

【Keywords】 Hyaluronic acid-rebamipide conjugate; Rebamipide; Nanoparticles

瑞巴派特 (rebamipide, Reb) 是由日本大冢制药公司合成并开发的一种新型喹诺酮类衍生物^[1]。1990 年,大冢制药公司开发的 Reb 片 (商品名: Mucosta[®]) 在日本上市,用于治疗胃溃疡和急慢性胃炎^[2]。在对 Reb 作用机制的进一步研究中发现,Reb 还能促进角膜黏蛋白样糖蛋白的表达^[3]。基于这些研究结果,大冢制药公司将 Reb 开发成混悬滴眼液 (商品名: Mucosta[®]) 于 2012 年 1 月在日本上市用于干眼症的治疗。但由于该制剂属于混悬型滴眼液,使用过程中会导致患者的视力模糊,此外高浓度的药物含量还会刺激眼表,导致泪液分泌过多,因此在使用过程中患者的用药依从性较低^[4-5]。Reb 的结构式见图 1。

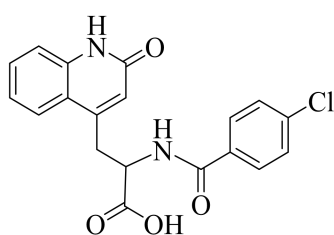


图1 Reb的结构式

Figure 1. The structural formula of Reb

透明质酸 (hyaluronic acid, HA), 是一种生物相容性优异的酸性黏多糖 (结构式见图 2)。由于其特殊的理化性质和生理功能, HA 被广泛应用于眼科、骨科、化妆品等多个领域^[6]。HA 特有的流变学性质和极佳的生物相容性,使得 HA 在滴眼液中既可以延长药物的作用时间还能提高药物的生物利用度^[7-10]。本试验所制备的 HA-Reb 偶联物 (HA-Reb) 创新性地结合了两种药物各自的特点。利用 HA 溶液所具有的假塑性,使

得 HA-Reb 在眼表滴注时,患者可以通过其生理性的眨眼反应将药物均匀涂布在眼表,在停止眨眼时,HA 的黏度又会恢复,进而延长药物在眼部的作用时间^[11-12]。另外 HA 能够减少眼表水分的蒸发^[13]。本试验所制备的 HA-Reb 通过酯键将 Reb 偶联在 HA 大分子上,提高了 Reb 的水溶性,同时结合 HA 对于眼症的治疗作用共同发挥两者在干眼症治疗中的作用,以期实现 HA 和 Reb 对于干眼症的协同治疗。

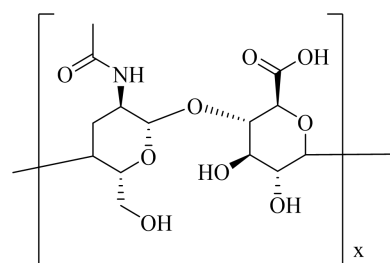


图2 HA的结构式

Figure 2. The structural formula of HA

1 材料与方法

1.1 主要仪器

XA105DU 型电子天平和 MS204TS/02 电子天平购自瑞士梅特勒-托利多公司; HBM CLASSIC 单磁力加热搅拌器 (上海小聪科技有限公司); Agilent 8454 紫外分光光度计 (美国安捷伦公司); AV500M 核磁共振仪 (德国布鲁克); NicoletIS-50 型傅里叶变换红外光谱仪 (赛默飞世尔科技有限公司); BeNano 90 Zeta 纳米粒度及 Zeta 电位分析仪 (丹东百特); JEM-1200EX 透射电子显微镜 (日本电子公司)。

1.2 主要药品与试剂

Reb (批号: YWN5H-HH, 纯度 98.0%)、羰基二咪唑 (批号: RVNYL-EM) 和 4-二甲氨基吡啶 (批号: HTDCI-OX) 均购自梯希爱上海化成工业发展有限公司; HA (山东焦点福瑞达生物股份有限公司, 批号: 24061802, 纯度 98.0%); 无水二甲基亚砜 (北京百灵威科技有限公司, 批号: LO60V66); 氢氧化钠 (批号: 20241125)、溴化钾 (批号: 20231117) 和无水乙醇 (批号: 20241009) 均购自国药集团化学试剂有限公司; 磷钨酸染液 (北京中镜科技技术有限公司, 批号: 23012607); 水为纯化水。

1.3 方法

1.3.1 HA-Reb的合成

称取 1 112.4 mg 的 Reb 置于圆底烧瓶中, 加入

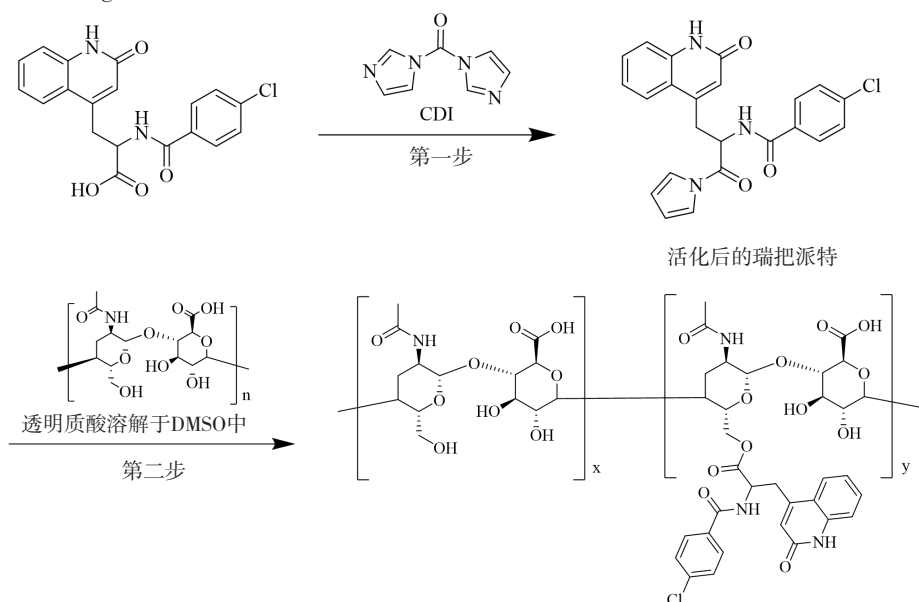


图3 HA-Reb的合成路线

Figure 3. The synthetic route of HA-Reb

1.3.3 Reb标准曲线的制备

Reb 易溶于 NaOH 溶液中, 因此以 1 mg/mL 的 NaOH 溶液为介质, 配制 Reb 标准曲线。精密称取约 10.0 mg 的 Reb, 置于 200 mL 量瓶中, 加入 1 mg/mL 的 NaOH 溶液进行溶解、定容, 即得对照品贮备液。分别精密量取对照品贮备液 1、2、4、6、8、10 mL, 置 10 mL 量瓶中, 用 1 mg/mL 的 NaOH 溶液稀释并定容。在 330 nm 处测定吸光度, 以浓度为横坐标 (X , $\mu\text{g/mL}$)、吸光度为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线, 并计算线性回归方程。

1.3.4 HA-Reb中Reb含量及溶解度的测定

精密称取约 10.0 mg 的 HA-Reb, 置于

无水二甲基亚砜溶解, 向其中加入 437.8 mg 羰基二咪唑, 室温避光反应 30 min。称取 370.8 mg 的 HA 溶于 30 mL 无水二甲基亚砜中, 加入上述烧瓶中, 最后加入 36.35 mg 的 4-二甲氨基吡啶于 40℃ 避光反应 24 h。反应结束后, 用乙醇沉淀, 6 010 $\times$ g 离心 10 min 后收集沉淀, 用纯化水溶解产物再次使用乙醇沉淀离心, 将沉淀物进行真空干燥即得 HA-Reb。取偶联物 10 mg 左右溶解于 1 mL 的纯化水中, 观察偶联物的溶解状态, 并使用粒度仪检测溶液中微粒的粒径。HA-Reb 的合成路线见图 3。

1.3.2 Reb与HA-Reb最大紫外吸收波长的扫描

分别称取适量的 Reb 和 HA-Reb, 用 1 mg/mL 的 NaOH 溶液溶解后, 进行最大吸收波长扫描, 确定 Reb 与 HA-Reb 的最大吸收波长。

10 mL 量瓶中, 用 1 mg/mL 的 NaOH 溶液溶解并稀释至刻度, 即为供试品溶液。将供试品溶液于 328 nm 波长处测定吸光度, 代入标准曲线计算供试品溶液中 Reb 的含量 (W) 及偶联物中 Reb 的含量 (C):

$$W(\%) = \frac{A-0.001}{1.55M} \times 100\%$$

$$C(\%) = \frac{(A-0.001) \times 10}{0.0155M} \times 100\%$$

式中 A 为吸光度; M 为 HA-Reb 的质量 (mg)。

1.3.5 HA-Reb红外光谱的测定

称取 5.0 mg 左右的 HA-Reb, 与 15 mg 左右

的溴化钾置于玛瑙研钵中共同研磨，将研磨后的粉末干燥后压片并使用红外光谱仪采集样品的红外吸收光谱。

1.3.6 HA-Reb核磁共振氢谱的测定

称取 10.0 mg 左右的 HA-Reb 溶解于 400 L 的氘代二甲基亚砜与 200 μ L 氘代水混合溶剂中，于 25℃采集 HA-Reb 的核磁共振氢谱。

1.3.7 HA-Reb的表征

称取 100.0 mg 左右的 HA-Reb 溶解于 2 mL 的纯化水中，取 1 mL 置于纳米粒度及 Zeta 电位分析仪中进行粒径以及 Zeta 电位的测定。将 50 μ L 的 HA-Reb 溶液滴于电镜铜网上，静置 20 min 后滴 50 μ L 磷钨酸染液进行负染，使用滤纸从铜网背面吸取液体，将铜网置于红外烤灯下干燥 5 min，采用透射电镜观察 HA-Reb 的形态。

表1 不同投料比制得HA-Reb的溶解性及粒度表征 (n=3)

Reb : HA	Reb含量 (%)	溶解状态	粒径 (nm)	PDI	Zeta电位 (mV)
0.2 : 1	1.12 $\pm$ 0.06	溶解	N/A	N/A	N/A
0.5 : 1	2.05 $\pm$ 0.02	溶解	N/A	N/A	N/A
1 : 1	5.73 $\pm$ 0.10	乳光	159.68 $\pm$ 1.20	0.197 $\pm$ 0.012	-18.82 $\pm$ 0.37
2 : 1	6.02 $\pm$ 0.05	乳光	210.86 $\pm$ 3.50	0.162 $\pm$ 0.018	-22.59 $\pm$ 0.22

注：PDI为多分散系数 (polydispersity index)；N/A表示未检测。

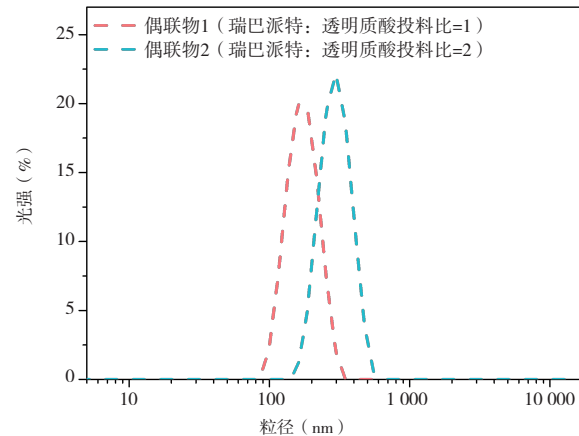


图4 HA-Reb的粒径分布

Figure 4. The size distribution of HA-Reb

通过透射电镜图观察到偶联物形成规则的球形纳米颗粒，随着投料比的增加，偶联物纳米颗粒的粒径逐渐增大 (图 6)。

2.2 HA-Reb的结构表征

从偶联物的核磁共振氢谱中可以看到 Reb 的特征吸收峰 (图 7)，证明 Reb 成功地被偶联在了 HA 上，通过比较 Reb 特征峰 b 与 HA 的特征峰 a 之间的积分面积可知 Reb 的取代度，由

2 结果

2.1 HA-Reb的合成

Reb 用羰基二咪唑活化后与 HA 反应，采用 4-二甲氨基吡啶作为催化剂，使 Reb 与 HA 之间形成酯键，从而得到 HA-Reb。通过改变 Reb 与 HA 之间的比例可以获得不同 Reb 含量的 HA-Reb (表 1)，当 Reb : HA 上升至 2 : 1 时，偶联物中的 Reb 含量变化较小，且随着 Reb 比例增加，HA-Reb 的水溶性变小，Reb : HA 为 1 : 1 时，得到的偶联物溶于水后呈现乳光，检测粒度时发现形成了组装纳米颗粒，其粒径为 (159.68 $\pm$ 1.20) nm，PDI 为 0.197 $\pm$ 0.012，Zeta 电位为 (-18.82 $\pm$ 0.37) mV，粒径均匀，呈负电荷。随着 Reb 比例增加，偶联物纳米粒子的粒径也随之变大 (图 4)，Zeta 电位也随之升高 (图 5)。

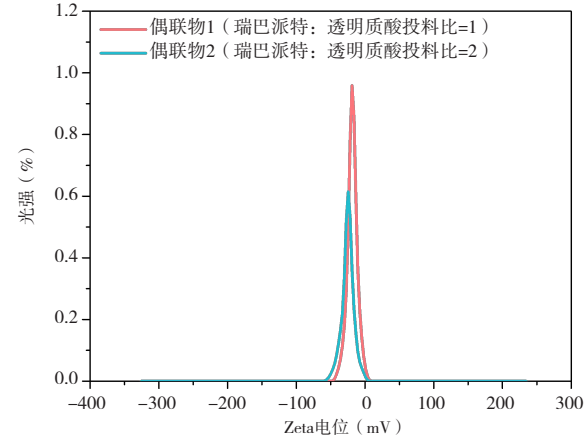


图5 HA-Reb的Zeta电位

Figure 5. The Zeta potential of HA-Reb

于 Reb 的取代度在 5% 左右，其特征峰信号与基线噪音信号接近，无法准确计算出 Reb 的取代度，需使用紫外分光光度计对 Reb 的含量进行准确定量。HA 与 Reb 结构中不存在酯键，通过对偶联物的红外光谱分析可以观察到偶联物在 1 744.3 cm^{-1} 处有强烈的酯键伸缩振动吸收峰 (图8)，也证明了 Reb 与 HA 以酯键的形式进行了偶联，且偶联物在 328 nm 处出现了 Reb 的

紫外特征吸收峰(图9),进一步证明成功合成了偶联物。

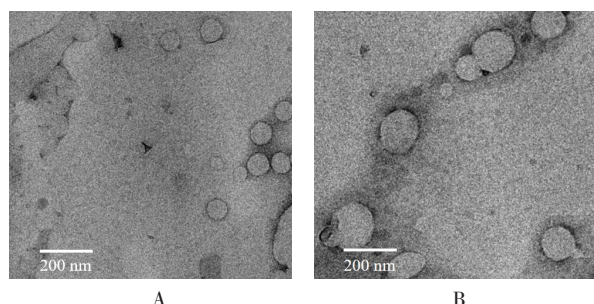


图6 HA-Reb的透射电镜图

Figure 6. The transmission electron microscopy image of HA-Reb

注: A. 投料比1:1; B. 投料比2:1。

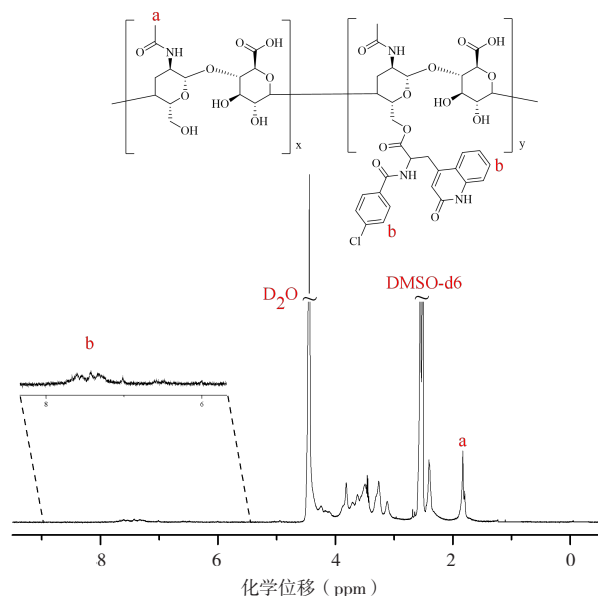


图7 HA-Reb的核磁共振氢谱图

Figure 7. The ^1H NMR spectrum of HA-Reb

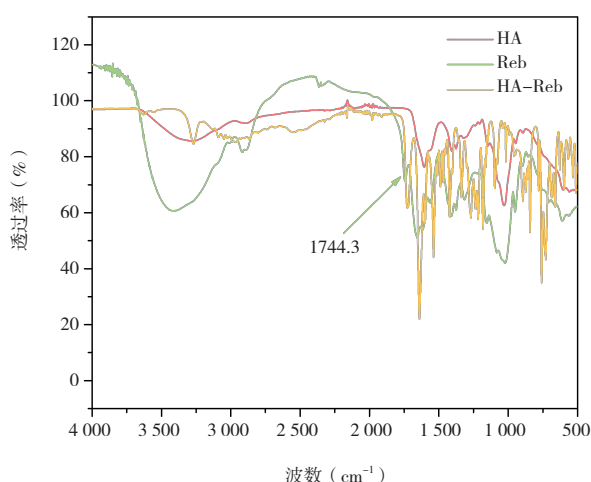


图8 HA-Reb、HA与Reb的红外吸收光谱图

Figure 8. The FT-IR spectrum of HA-Reb, HA and Reb

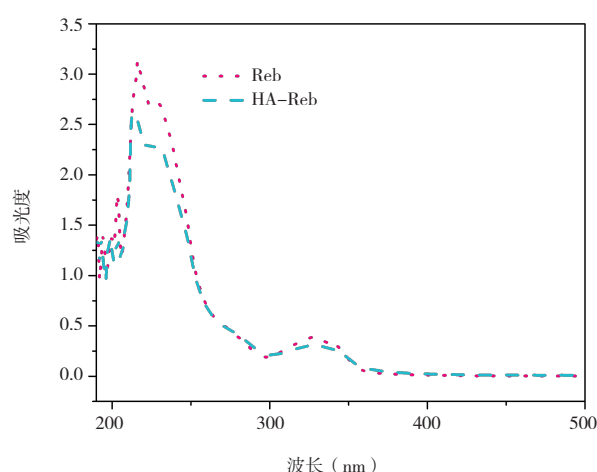


图9 Reb与HA-Reb的紫外吸收图谱

Figure 9. The UV absorption spectrum of Reb and HA-Reb

2.3 HA-Reb的含量及溶解度的测定

Reb、HA-Reb在1 mg/mL的NaOH溶液中的紫外吸收扫描图谱见图7。结果表明,HA-Reb的紫外吸收峰位置并无变化,与Reb一致,均在229 nm和328 nm处有最大吸收峰,以328 nm处的最大吸收峰来计算Reb含量。Reb的线性回归方程为: $Y=0.015\ 5X+0.01$ ($r=1.000\ 0$),Reb在10.0~50.0 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内线性关系良好。不同投料比下偶联物中Reb的含量见表1,根据偶联物的溶解度及偶联物中Reb的含量计算出Reb的溶解度为 (0.60 ± 0.07) mg/mL。

3 讨论

使用羰基二咪唑为活化剂、以4-二甲氨基吡啶为催化剂,可以将Reb偶联在HA上得到HA-Reb。当Reb投料比较低时,Reb偶联的数量较少,偶联物大分子整体的疏水性较弱,因此Reb可以借助HA的高水溶性溶解在水中。随着Reb投料比的升高,偶联物中的疏水部分逐渐增加,当偶联物溶于水时,偶联物中的疏水部分通过疏水作用相互聚集,形成纳米颗粒。由于疏水的Reb通过酯键与亲水的HA相互偶联在一起,因此当疏水性的Reb相互聚集时,HA作为纳米颗粒的外壳能够以静电作用以及空间位阻作用阻碍疏水性Reb的进一步聚集,从而形成Zeta电位为负电荷的稳定纳米颗粒,透射电镜图中可以清晰地看到偶联物纳米颗粒呈现完整的球形。

Reb作为治疗干眼症的药物,其水溶性较差,上市制剂为混悬滴眼液,滴眼后易产生不适感。

HA-Reb 可以提高 Reb 的水溶性, 并且 HA 本身也是玻璃体的组成成分, 其生物相容性优异。此外 HA 还具有剪切变稀的流变特性, 滴眼后不易产生因眨眼而导致的黏腻感。重要的是 HA 作为一种治疗干眼症的大分子保湿剂, 可以在滴眼后快速缓解眼睛干涩的不适感, Reb 从偶联物水解下来后可以在眼表发挥作用, 促进黏蛋白分泌黏液, 从而更加长久地缓解眼干眼涩症状。因此将两者以化学键结合在一起得到的 HA-Reb 在干眼症的治疗中具有良好的应用前景, 有望做到协同治疗干眼症的效果。

参考文献

- 1 Otake H, Masuda S, Kadowaki R, et al. Detergents, surfactants, interface and colloid therapeutic effects of rebamipide nanocrystals as carbopol gel formulation containing gum arabic in a hamster model of oral mucositis[J]. *J Oleo Sci*, 2024, 73(12): 1479–1491. DOI: [10.5650/jos.ess24160](https://doi.org/10.5650/jos.ess24160).
- 2 Aziz F, Reddy K, Vega VF, et al. Rebamipide and derivatives are potent, selective inhibitors of histidine phosphatase activity of the suppressor of t cell receptor signaling proteins[J]. *J Med Chem*, 2024, 67(3): 1949–1960. DOI: [10.1021/acs.jmedchem.3c01763](https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.3c01763).
- 3 Takeji Y, Urashima H, Aoki A, et al. Rebamipide increases the mucin-like glycoprotein production in corneal epithelial cells[J]. *J Ocul Pharmacol Ther*, 2012, 28(3): 259–263. DOI: [10.1089/jop.2011.0142](https://doi.org/10.1089/jop.2011.0142).
- 4 Qiao H, Xu Z, Sun M, et al. Rebamipide liposome as an effective ocular delivery system for the management of dry eye disease[J]. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2022, 75: 103654. DOI: [10.1016/j.jddst.2022.103654](https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103654).
- 5 Yan YL, Chang JY, Ling XR, et al. Effects of rebamipide for dry eye on optical quality and efficacy: a systematic review and Meta-analysis[J]. *J Ocul Pharmacol Ther*, 2024, 40(10): 629–637. DOI: [10.1089/jop.2024.0098](https://doi.org/10.1089/jop.2024.0098).
- 6 凌沛学, 张青, 贺艳丽. 玻璃酸作为滴眼液媒介的机制及药效学研究[J]. *中国生化药物杂志*, 2004, 25(2): 118–120. [Ling PX, Zhang Q, He YL. Study on the mechanism and pharmacodynamics of hyaluronic acid as a vehicle for eye drops[J]. *Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics*, 2004, 25(2): 118–120.] DOI: [10.3969/j.issn.1005-1678.2004.02.022](https://doi.org/10.3969/j.issn.1005-1678.2004.02.022).
- 7 Hynnekleiv L, Magno M, Vernhardsdottir RR, et al. Hyaluronic acid in the treatment of dry eye disease[J]. *Acta ophthalmol*, 2022, 100(8): 844–860. DOI: [10.1111/aos.15159](https://doi.org/10.1111/aos.15159).
- 8 Brugnara M, Vicario-de-la-Torre M, González-Cela-Casamayor MA, et al. Disclosing long-term tolerance, efficacy and penetration properties of hyaluronic acid-coated latanoprost-loaded liposomes as chronic glaucoma therapy[J]. *J Control Release*, 2025, 379: 730–742. DOI: [10.1016/j.jconrel.2025.01.041](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2025.01.041).
- 9 Yang YJ, Lee WY, Kim YJ, et al. A Meta-analysis of the efficacy of hyaluronic acid eye drops for the treatment of dry eye syndrome[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2021, 18(5): 2383. DOI: [10.3390/ijerph18052383](https://doi.org/10.3390/ijerph18052383).
- 10 Zhang F, Tan M, Hu ZE, et al. A hyaluronic acid-modified cyclodextrin self-assembly system for the delivery of β -carotene in the treatment of dry eye disease[J]. *Int J Biol Macromol*, 2025, 287: 138428. DOI: [10.1016/j.ijbiomac.2024.138428](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.138428).
- 11 López-García JS, García-Lozano I, Rivas L, et al. Autologous serum eye drops diluted with sodium hyaluronate: clinical and experimental comparative study[J]. *Acta Ophthalmol*, 2014, 92(1): e22–29. DOI: [10.1111/aos.12167](https://doi.org/10.1111/aos.12167).
- 12 del Olmo JA, Martínez VS, de Cestafe NM, et al. Effectiveness evaluation of hyaluronic acid-based commercial eye drops to treat ophthalmic dry eye disease[J]. *Carbohydrate Polymer Tech*, 2024, 8: 100577. DOI: [10.1016/j.carpta.2024.100577](https://doi.org/10.1016/j.carpta.2024.100577).
- 13 Grego AL, Fankhauser AD, Behan EK, et al. Comparative fluorophotometric evaluation of the ocular surface retention time of cross-linked and linear hyaluronic acid ocular eye drops on healthy dogs[J]. *Vet Res Commun*, 2024, 48(6): 4191–4199. DOI: [10.1007/s11259-024-10559-x](https://doi.org/10.1007/s11259-024-10559-x).

收稿日期: 2025 年 02 月 11 日 修回日期: 2025 年 04 月 29 日
本文编辑: 钟巧妮 李 阳