

胆固醇疏水改性壳聚糖自聚集纳米微粒的制备 及其动物体内分布研究

原续波^{1,3}, 顾鸣岐¹, 原艳波², 李 弘³, 王来好², 盛 京¹

(1. 天津大学材料科学与工程学院, 天津 300072; 2. 山西长治医学院附属医院, 长治 046000;

3. 南开大学吸附分离功能高分子材料国家重点实验室, 天津 300071)

摘要:以 EDC 为偶联剂, 将胆固醇接枝到壳聚糖主链的氨基上, 得到疏水改性的双亲性壳聚糖 (CS-Chol), 利用 FT-IR, ¹H-NMR 对其结构进行表征。CS-Chol 在水相自组装形成自聚集体, 通过荧光探针技术研究其自聚集行为, 结果显示制得的自聚集体具有较低的 CAC (10⁻² mg/mL)。TEM 和 DLS 测试显示制得的自聚集体为纳米级颗粒, 粒径随胆固醇取代度的减小 (4.7~1.1) 而增大 (180~380 nm)。用 ^{99m}Tc 对纳米颗粒进行放射性标记, 并利用 SPECT 对其在头部和腹腔分布进行分析。耳静脉注射后纳米粒子在粘膜富集区域有一定滞留性, 主要是由于壳聚糖具有粘膜特征吸附的性质。

关键词:胆固醇疏水改性壳聚糖 (CS-Chol); 自聚集; 纳米微粒; 放射性标记; 体内分布

引 言

可生物降解聚合物纳米微粒由于其良好的生物相容性、可生物降解性、特殊的表面活性和组织渗透性而被广泛应用于药物控制释放研究^[1,2]。壳聚糖是天然大分子甲壳素的脱乙酰化产物, 在体内无毒并可被酶解, 由其制备的超微粒子是药物和基因的良好载体。一般而言, 壳聚糖超微粒的制备方法包括: 共价交联法, 离子交联法和去溶剂法^[3]。近年来, 由疏水性改性双亲性壳聚糖自聚集制备超微粒受到人们的关注, 这些疏水改性剂包括聚乙二醇^[4]、棕榈酸^[5]、脱氧胆酸^[6]等, 由这些疏水改性剂和壳聚糖组成的双亲性大分子可在磷酸缓冲溶剂中自组装形成纳米粒子, 其制备方法简便, 粒径和结构易于通过结构参数控制, 已被应用于药物^[7,8]和基因^[6]载体研究。本文以胆固醇 3-半琥珀酸酯为疏水改性剂, 以水溶性碳二亚胺为催化剂, 制备了胆固醇疏水改性的双亲性壳聚糖, 以红外光谱和核磁共振研究了双亲性聚合物结构, 以荧光光谱、透射电子显微镜和光子相关光谱对自聚集纳米微粒结构进行表征, 并以单光子发射型计算机断层显像技术测定了壳聚糖双亲性自聚集纳米微粒在头部与腹腔的相对分布。

1 结果与讨论

1.1 CS-Chol 结构表征

图 1 为合成 CS-Chol 的合成路线, 胆固醇在吡啶催化下与琥珀酸酐反应形成胆固醇 3-半琥珀酸酯 (Chol-Su), Chol-Su 的羧基被 EDC 活化后在 DMF 与稀盐酸混合溶液中与壳聚糖氨基反应, 形成胆固醇疏水改性壳聚糖 (CS-Chol), 产物结构以红外光谱和核磁共振确定, 反应条件对产物取代度的影响如表 1。

图 2a、b 和 c 分别是反应原料 Chol-Su、壳聚糖和产物 CS-Chol 的红外光谱, 其中产物 CS-Chol 的取代度为 4.7。由图可见胆固醇与琥珀酸酐反应后形成的 3-半琥珀酸酯, 形成产物同时含有酯基和端羧基, 这一结构在 Chol-Su 的红外光谱中得到了很好的验证。图 2a 中 1735 和 1711 cm⁻¹ 处的双峰分别对应于酯基和羧基中羰基基团的对称伸缩振动, 说明半琥珀酸酯的形成。壳聚糖的红外光谱中最特征的谱带位于 1650 cm⁻¹ 和 1599 cm⁻¹, 分别对应于酰胺 I 带羰基的伸缩振动和氨基的弯曲振动。研究表明^[12], 当氨基的取代度高于 70% 时, 氨基的弯曲振动才显现出来。图 2c 产物 CS-Chol 的红外光谱中 1599 cm⁻¹ 处氨基的弯曲

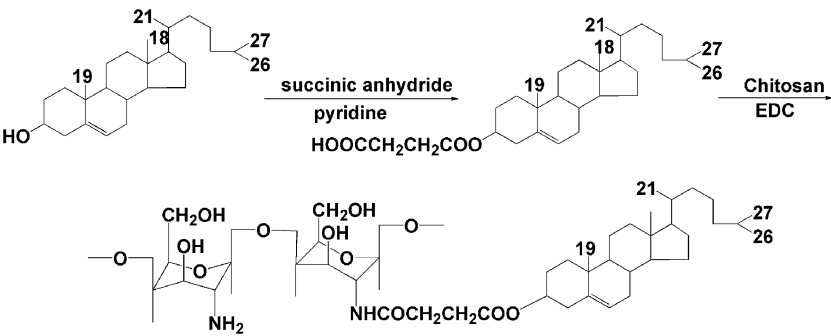


图 1 胆固醇疏水改性壳聚糖反应示意图

Figure 1 Synthesis of Cholesterol Hydrophobic-modified Chitosan

振动消失,而在 1528cm^{-1} 出现酰胺 II 带的特征吸收,表明在氨基上发生了酰化反应,且具有较高的取代度。

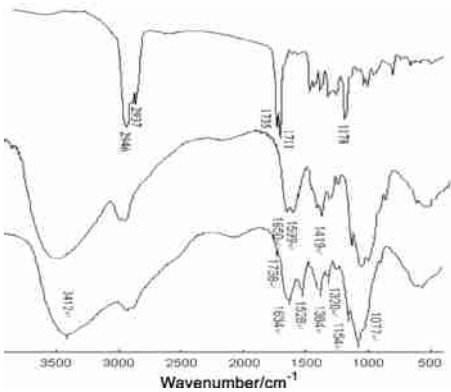


图 2 胆固醇 3-半琥珀酸酯(a),壳聚糖(b)和胆固醇疏水改性壳聚糖(c, DS=4.7)的红外光谱

Figure 2 FT-IR spectrum of cholesterol-3-semi-succinic acid ester(a), chitosan(b) and cholesterol hydrophobic-modified chitosan(c, DS=4.7)

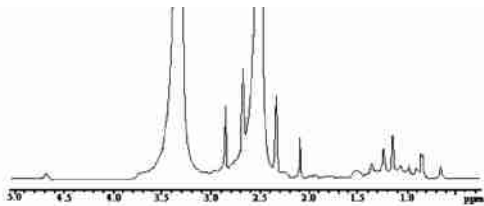


图 3 胆固醇疏水改性壳聚糖核磁共振¹H 谱 (DS=4.7, 氘代 DMSO 溶剂)

Figure 3 ¹H-NMR spectrum of cholesterol hydrophobic-modified chitosan (DS=4.7, DMSO-*d*₆)

胆固醇疏水改性壳聚糖的化学结构进一步以核磁共振¹H 谱(¹H NMR)测定,图 3 中 0.65、0.83 和 0.85ppm 的多重峰对应于胆固醇结构中 18 和 19 位角甲基和 21、26 和 27 位的甲基的化学位移,是胆固醇非常特征的核磁共振峰^[13]。壳聚糖的主要特征共振峰被氘代 DMSO 溶剂强烈的共振峰覆盖,因此难以¹H NMR 计算产物 CS-Chol 的取代度。

以不同相对分子质量壳聚糖与 Chol-Su 反应,产物 CS-Chol 的取代度以元素分析测定,结果如表 1。在相同溶剂和反应温度条件下,控制壳聚糖糖单元与 Chol-Su 的相同投料比为 100/38,产物的取代度(DS)随壳聚糖相对分子质量的提高而降低,这与壳聚糖在混合溶剂中的溶解性有关,当壳聚糖相对分子质量达到 70 KD 时,在反应后期会出现沉淀,因此产物难以达到较高的取代度。

表 1 胆固醇疏水改性葡聚糖自聚集性质

Table 1 Properties of cholesterol hydrophobic-modified chitosan

样品 ^a	<i>M_n</i> KD	糖单元/Chol-Su(mol·mol ⁻¹)	DS ^b	CAC ^c ×10 ⁻² (mg·mL ⁻¹)	Mean diameter ^d (nm)	Variance ^d
CS40-Chol 4.7	40	100/38	4.7	1.35	185.2	0.153
CS100-Chol 4.1	100	100/38	4.1	2.04	233.6	0.120
CS200-Chol 3.9	200	100/38	3.9	5.82	325.8	0.128
CS700-Chol 1.1	700	100/38	1.1	7.65	380.9	0.215

注:a—样品中 CS 后标号指壳聚糖的相对分子质量,Chol 后标号为产物的取代度;b—取代度(DS),定义为每 100 个糖单元所含的 Chol-Su 的数目;c—临界聚集浓度(CAC)由荧光光谱测定;d—平均粒径与粒径分布由粒径测试仪测定

1.2 CS-Chol 的自聚集行为

以透射电子显微镜、粒径测试仪和荧光光谱研究 CS-Chol 的自聚集结构与自聚集行为。图 4 是 CS 100-Chol 4.1 和 CS 700-Chol 1.1 的透射电子显微镜照片及其粒径及粒径分布图,不同相对分子质量壳聚糖产物的粒径及粒径分布见表 1。

由图 4 可见,CS-Chol 在生理盐水中可以形成粒径在 50~150 nm 的球形纳米粒子,且具有明显的单核或多核结构。粒径分布测试表明纳米粒子呈现明显的双峰分布,平均粒径大于相应的透射电子显微镜测试结果,这是因为以透射电子显微镜测得的为高真空干态粒子粒径,而粒径测试仪测定介质为溶液,粒子在其中具有溶胀性,因此测得的粒径较大,但这一粒径更接近于体内环境条件下粒子的真实状况。

以疏水性基团改性多糖形成的双亲性大分子在溶液中会因为分子内和分子间疏水基团的相互作用形成具有核-壳结构的纳米粒子。在亲水性多糖基体中,疏水性基团通过相互作用形成疏水性的微区,这些微区的存在是包载疏水性药物的必要条件。同时这些双亲性聚合物在溶液中的自聚集结构和自聚集行为受到多种因素的影响,包括:多糖链的柔顺性、溶解性,疏水基团的分子结构和尺寸大小以及亲水链与疏水基团之间联接臂(spacer)的种类、特性与长短等。为验证疏水性微区的存在及研究 CS-Chol 在溶液中的自聚集形为,以芘为荧光探针,对 CS-Chol 进行了荧光光谱研究。

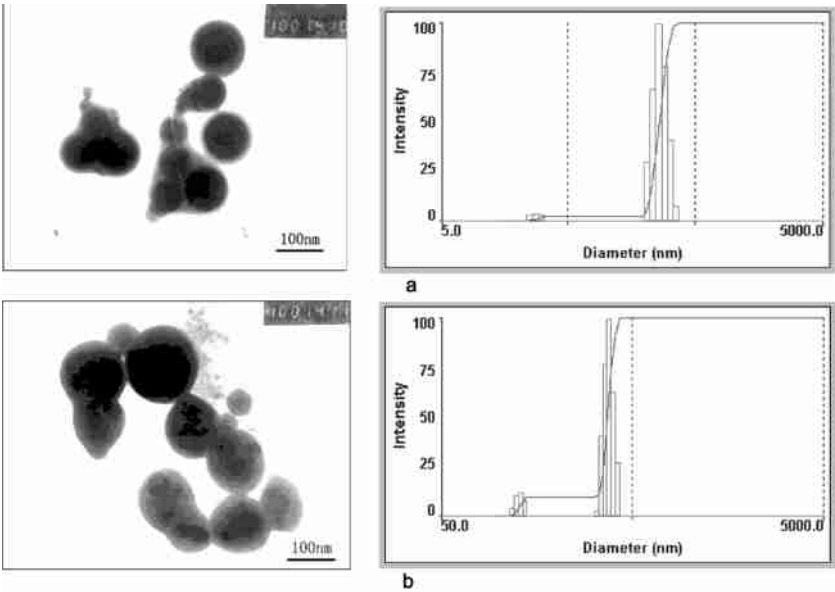


图 4 CS-Chol 的透射电子显微镜照片及粒径测试结果

a· CS100-Chol 4.1 b· CS 700-Chol 1.1

Figure 4 Transmission Electron Micrographs and Particle Size Analysis of CS-Chol

a· CS 100-Chol 4.1 b· CS 700-Chol 1.1

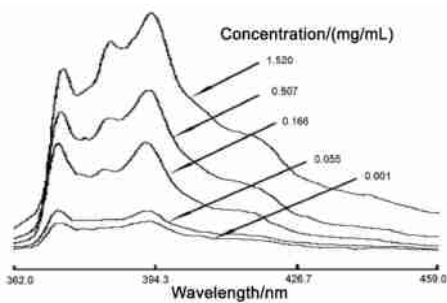


图 5 CS-Chol 在生理盐水溶液中的荧光发射光谱
Figure 5 Fluorescence probe spectrum of CS-Chol
in physiological brine

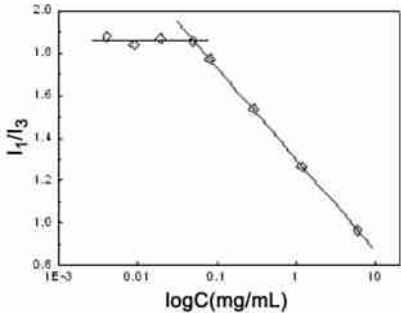


图 6 CS-Chol 荧光发射光谱 I_1/I_3 与对数浓度关系图
Figure 6 Relationship of I_1/I_3 in fluorescence probe
spectrum via logarithm of concentration of CS-Chol

图 5 是 CS-Chol 在溶液中的发射光谱,由图可以看出随着 CS-Chol 浓度的提高,芘的发射光谱强度增大。一般认为,双亲性聚合物具有疏水微区,且在组装过程中去除芘的溶剂时,芘会渗透到双亲性聚合物组成的纳米粒子的疏水性微区中,从而使发射光谱强度大大提高^[14]。一个精确测定疏水性微区形成的方法为发射光谱中第一个峰强度与第三个峰强度的比值,即 I_1/I_3 。随溶剂极性的不同,振动带 I 与 III 的强度发生变化。在极性溶剂水中 I_1/I_3 为 1.8~1.9,在乙醇和甲苯中分别为 1.23 和 1.11,而在非极性溶剂环己烷中 I_1/I_3 仅为 0.60。当水溶液中一旦有疏水微区形成时,由于芘对疏水微区的选择性溶解,会不断从水相转移至其更易溶解的疏水微区内, I_1/I_3 下降,表明芘所处环境极性的降低。因此通过对发射光谱的分析,能有效的反映芘分子所处的环境。这样,可以从 I_1/I_3 随浓度的变化趋势图中得到微区开始形成的浓度,也即临界聚集浓度(CAC)。 I_1/I_3 随浓度的变化趋势如图 6。

由图 6 可见在 CS-Chol 低浓度时 I_1/I_3 基本稳定于 1.83,表明此时芘处于极性水溶液中,当浓度超过一临界浓度时, I_1/I_3 急剧下降。对曲线的两段进行线性拟合,水平线与斜线的交点对应的浓度被认为是疏水微区开始形成的浓度,即临界聚集浓度(CAC)。不同相对分子质量壳聚糖产物的 CAC 值列于表 1,可见 CS-Chol 的 CAC 小于一般小分子表面活性剂两个数量级以上,这种低 CAC 浓度说明由双亲性大分子形成的自聚集胶束在生理液态环境中将具有良好的稳定性,对双亲性大分子自聚集体作为药物或基因载体具有重要的意义。从表 1 中还可以看出,随着壳聚糖相对分子质量的增大,CS-Chol 的 CAC 值增大,这主要与取代度减小有关,另一方面也与高相对分子质量壳聚糖溶解性下降有关。

CS-Chol 的取代度对 CAC 值和自聚集体的粒径大小有很大的影响,当取代度较大时,分子内及分子间疏水性相互作用增大,在较低的浓度条件下分子即开始发生聚集,且分子卷缩易形成较小的粒子。反之则形成较大的结构较为松散的粒子。

1.3 CS-Chol 的体内分布

迄今为止有关壳聚糖及其衍生物的生物应用研究很多,但其体内分布的报道较少,且各文献中壳聚糖及其衍生物由于相对分子质量及结构的不同,其体内分布的差异也非常大^[11,15~17]。本文以 SPECT 和放射性计数法测定了 CS-Chol 在兔体内的分布。不同时间^{99m}Tc 放射性标记 CS 40-Chol 4.7 的体内分布如图 7。CS-Chol 经耳缘静脉注射后,迅速通过血液循环系统到达头部、心脏及腹腔脏器,23 min 后 CS-Chol 在心脏和腹腔脏器中的放射强度迅速减少,表现出极快的体内清除速率,而在头颈部仍保留了较高的放射性浓度。各时间在头部和腹腔的分布如表 2。可见 CS-Chol 纳米微粒在体内具有较高的血液清除速率,这与文献报道相一致^[15],而在头部却有一定的滞留性。

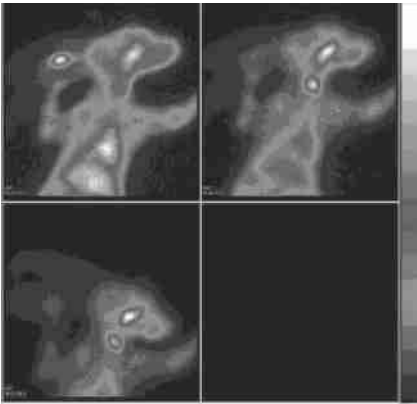


图 7 ^{99m}Tc 放射性标记 CS-Chol 纳米微粒在兔体内分布的 SPECT 图象 (为显像清楚,加入小剂量新鲜淋洗的 ^{99m}Tc 化合物以显标体征轮廓)

Figure 7 SPECT Image of CS-Chol nanoparticles radio-labeled by ^{99m}Tc

表 2 耳缘静脉注射后不同时间 CS-Chol 纳米微粒在兔头部和腹腔的的相对放射性(%)

Table 2 Relatively radiate activity of CS-Chol nanoparticles in rabbit's cephalosome and abdominal cavity at different time after parotid injection at Vein

时间/min	相对放射性活性/%	
	头部	腹腔
1	38.3 ± 3.4	61.7 ± 6.5
14	66.1 ± 5.8	33.9 ± 5.2
23	70.2 ± 6.3	29.8 ± 8.1
30	68.5 ± 4.5	31.5 ± 7.3

为了了解在头部的具体分布,在 30 min 时对头颈部进行了 SPECT 图象的专门采集(如图 7 左下图),CS-Chol 在头颈部的分布明显集中于如鼻咽等富粘膜器官,在颅内则明显缺乏放射活性,说明 CS-Chol 难以通过血脑屏障进入颅内。虽然血脑屏障表面为负电性,具有阳离子介导的跨膜传质特征,本实验制备的 CS-Chol 纳米微粒 ξ 电位可达 52 mV,但并不能通过静电吸附介导作用使壳聚糖微粒通过血脑屏障进入颅内。CS-Chol 在头部的高滞留性来源于其在鼻咽等富粘膜器官的聚集,这与壳聚糖的粘膜粘附特性有关^[3]。

2 实验部分

2.1 实验原料

医用级壳聚糖由浙江玉环澳星甲壳素公司提供,相对分子质量分别为 40、100、200 和 700 KD,脱乙酰化度 86%,使用前经溶解-沉淀后冷冻干燥提纯。胆固醇和丁二酸酐均为分析纯,天津化学试剂有限公司产品。1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCl),吉尔生化(上海)有限公司,分析纯。芑,Acros 公司产品,分析纯。其它试剂均为分析纯。新西兰兔从军事医学科学院动物实验中心购买,体重 2~2.5 kg。

2.2 胆固醇 3-半琥珀酸酯(Chol-Su)合成^[9]

胆固醇和琥珀酸酐(重量比 1:1)溶解于吡啶中,70℃ 加热搅拌 3h 后减压蒸馏除去大部分吡啶,残留物加入水/乙醇(v/v=1/10)混合溶剂中产生白色沉淀。过滤,所得沉淀溶于乙醇中,再于水/甲醇(v/v=1:10)混合溶剂中沉淀,将沉淀过滤后于无水乙醇中重结晶,真空烘箱中 50℃ 干燥备用。

2.3 胆固醇疏水改性壳聚糖(CS-Chol)的合成

Chol-Su 的 *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)溶液加入到 1%壳聚糖的盐酸溶液(0.1 mol/L)中,Chol-Su 与壳聚糖单元摩尔比 1/5,DMF 与盐酸溶液体积比为 10/1。称取 EDC·HCl 使其与 Chol-Su 摩尔比为 1/2,配成水溶液逐滴加入到反应体系中,室温反应 24 h。将反应混合物加入到过量甲醇/氨水(v/v=7/3)混合溶液中,充分搅拌后静置使沉淀蓄集,过滤,沉淀反复以水和甲醇充分洗涤后得黄色凝胶。将凝胶冷冻干燥得产物。

产物结构以付立叶变换红外光谱(FT-IR, BIO-Rad FTS 135 型)和核磁共振氢谱(¹H NMR, Varian Unity Plus 400)测定。分别以四种不同相对分子质量壳聚糖与 Chol-Su 反应,反应物取代度定义为每 100 个壳聚糖结构单元所含 Chol-Su 结构的数目,由元素分析法测定。

2.4 胆固醇疏水改性壳聚糖自聚体的制备

精确称取 CS-Chol 溶解于 DMF/0.1 mol/L 盐酸溶液,加入截留分子量为 14000 g/mol 的透析袋中以生理盐水透析 72 h,透析后溶液于 10 mL 容量瓶中定容,然后于 25 mL 烧杯中以针式超声仪 40 W 超声 3 min 得到光学透明悬浮液。

CS-Chol 自聚集的形貌以透射电子显微镜(TEM, JEM-2000 FX II 型,日本)测定,自聚集体粒径大小、粒径分布及 ξ -电位以 Brookhaven 90Plus/BI-MAS 型粒径测定仪测定。

2.5 胆固醇-壳聚糖自聚集体的荧光光谱测定^[10]

一定量芑于 12mL 安培瓶中溶于丙酮,静置挥发大部分丙酮后,加入不同浓度的上述 CS-Chol 光学透明悬浮液,电磁搅拌下 65℃ 加热 3 h 使芑与 CS-Chol 平衡,室温过夜自然冷却,芑的最终浓度为 6.0×10^{-7} mol/L。以 970CRT 荧光分光光度计测定不同浓度条件下芑的激发光谱与发射光谱。激发波长为 336 nm,激发和发射狭缝分别为 2 和 10 nm。

2.6 胆固醇-壳聚糖自聚集体的放射性标记和体内分布

CS-Chol 的 ^{99m}Tc 放射性标记参照文献^[11]进行,标记后的 CS-Chol 配成生理盐水溶液。取 5 只新西兰兔耳缘静脉注射,以单光子发射型计算机断层显像仪(SPECT,美国通用电器(中国)有限公司医疗系统集团 VG5 型)分别于 1、14、23、30 min 对兔进行断层显像,并进行图像采集。将采集的信息输入高性能计算机,由 SPECT 专业图像软件进行自动处理并输出图像,并画出头部和腹腔区域,测定这些区域的相对放射性强度。

3 结论

壳聚糖相对分子质量及 CS-Chol 的取代度对 CAC 值和自聚集体的粒径大小有很大的影响,壳聚糖相对分子质量较大,CAC 值较高,而当取代度较大时,则易形成 CAC 较低、粒径较小的自聚集体;体内分布研究显示 CS-Chol 纳米微粒在体内具有较高的血液清除速率,而在头部却有一定的滞留性,但并不能通过静电吸附介导作用使壳聚糖微粒通过血脑屏障进入颅内,而仅局限于在鼻咽等富粘膜器官的聚集。

参考文献:

[1] 卢剑,赵硕,常津,原续波.化学通报.2003,66,w50.
[2] 赵硕,常津,原续波.化学通报.2002,65,w93.
[3] Janes K A, Calvo P, Alonso M J. Adv Drug Delive Rev, 2001,47, 83~97.
[4] Ohya Y, Cai R, Nishizawa H. et al. Proc Intl Symp Control Rel Bioact Mater, 1999, 26, 655~656.
[5] Uchegbu I F, Schatzlein A G, Tetley L. et al. J Pharn Pharmacol, 1998, 50,453~458.
[6] Lee K Y, Kwon I C, Kim Y H. et al. J Control Rel, 1998, 51,213~220.
[7] Dodane V, Vilivalam D. Pharn Sci and Technol Today, 1998, 1 (6):246~253.
[8] Paul W, Sharma C. STP Pharma Sci, 2000, 10,5~22.
[9] Kuhn R W, Schrader W T, Smith R G, O'Malley B W, et al. J Bio Chem, 1975,250,4220~4228.
[10] Vieira N A B, Moscardini M S, Tiera V A O, et al. Carbohydr Polym, 2003, 53,137~143.
[11] Banerjee T, Mitra S, Singh A K, et al. Int J Pharn, 2002,243,93~105.
[12] 董炎明,王勉,吴玉松,等.纤维素科学与技术,2001,9(2):42~56.
[13] Birgit Z, James J B, Rawle I. et al. Comp Biochem and Phys Part C, 1998, 120,269~282.
[14] Magny B, Iliopolous I, Zana R, Audebert R. Langmuir, 1994,10, 3180.
[15] Yoen J S, Jang J S, Yong W C. J. Control Rel, 2003, 91,135~145.
[16] Richardson S C W, Kolbe H V J, Duncan R. Int J Pharn, 1999, 178, 231~243.
[17] 高怀生,黄是是,张世达,等.中国海洋药物杂志,1997,4,9~11.

Paration of Self-aggregate Nanoparticles Composed of Cholesterol Hydrophobic-modified Chitosan and their Destribution in Cephalosome and Abodominal Cavity

YUAN Xu-bo^{1, 3}, GU Ming-qi¹, YUAN Yan-bo², LI Hong³, WAN Lai-hao², SHENG Jing¹

(1. School of materials science and engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China;
2. The Affiliated Hospital of Changzhi Medical College, Changzhi 046000, China;
3. State Key of Laboratory of Adsorption and Separation Functional Polymer, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract:Cholesterol hydrophobic-modified chitosan (CS-Chol) were synthesized by coupling cholesterol to the amino groups of chitosan with EDC as catalyzer. The structure of CS-Chol was characterized by FTIR and ¹H NMR. CS-Chol formed self-aggregates in water, and the self-aggregate behavior were studied by fluorescence probe technique, the results suggested that the self-aggregates had low critical aggregate concentration about 10⁻² mg/mL, which was critical to the stability *in vivo*. The measurements of transmission electron microscope(TEM) and dynamic light scattering(DLS) indicated that the self-aggregates were nanoparticles, and the diameters increased from 180 to 380 nm with the decrease of substitute degree from 4.7 to 1.1. The nanoparticles were radio-labeled with ^{99m}Tc, and their distribution in cephalosome and abdominal cavity was analyzized by SPECT. CS-Chol nanoparticles were eliminated from blood and abdominal cavity quickly. Some nanoparticles, however, retained in the mucous membrane rich area after otic vein injection, due to the feature adhesion of chitosan to the mucous membrane.

Key words:Chitosan; Cholesterol; Self-aggregate; Nanoparticles; Radio-label; Biodistribution