

研究简报

烷基壳聚糖纳米微球的制备及其紫杉醇负载研究

代 昭^{1*}, 孙多先², 黄文强¹

(1 功能高分子材料教育部重点实验室, 南开大学; 南开大学 高分子化学研究所, 天津 300071;

2 天津大学化工学院, 天津 300072)

摘要: 在碱性条件下通过卤代烃的 *N*-烷基取代反应制备得到烷基壳聚糖衍生物。X 射线光电子能谱计算结果表明烷基取代反应主要发生在壳聚糖的氨基上。动态光散射研究表明, 该衍生物在水中可自动形成粒径在 10~200nm 范围的纳米微粒, 负载紫杉醇后微球的粒径增大。在磷酸缓冲液(pH=7.4)中体外释放研究表明, 随着烷基链长的增加, 紫杉醇在磷酸缓冲液中达到平衡时的浓度降低。

关键词: 壳聚糖; 烷基壳聚糖; 紫杉醇; 纳米微球; 负载和释放

壳聚糖(chitosan, CS)[(1,4)-2-氨基-2-脱氧- β -D-葡聚糖]具有良好的生物相容性、降解性以及能够形成亲水凝胶等特点, 近年来逐渐成为生物医学工程和药物载体等领域研究得较多的材料之一, 尤其是在药物控释、缓释、靶向以及智能释药系统中的应用受到了广泛的关注^[1]。在药物控释系统中, 纳米微球由于拥有靶向定位给药, 降低药物毒副作用等特点, 成为目前药剂学研究的方向之一^[2]。目前壳聚糖纳米微球常用于蛋白质^[3,4]、基因^[5,6]、抗肿瘤药物^[7]等的药物负载体系, 尤其是用于水溶性药物, 如蛋白类药物的载体。紫杉醇是目前临床用量较大的一种抗癌药物, 由于紫杉醇在水中的溶解度极低, 现用于临床的紫杉醇制剂为聚氧乙烯基蓖麻油(Cremphor EL)与乙醇(1:1, 体积比)制成的溶液, 临床应用前需要预先稀释。这时因溶剂转换, 紫杉醇易析出沉淀, 而且聚氧乙烯基蓖麻油有可能引起严重的过敏反应, 因此如何改善紫杉醇临床应用的剂型, 制备能提高紫杉醇生物利用度的液体制剂是研究的重点之一。

本文采用将壳聚糖烷基取代改性的方法, 制备了具有不同烷基长度的两亲性结构的 *N*-烷基壳聚糖衍生物, 一方面利用长链烷基的疏水作用使烷基壳聚糖链在水中发生自凝聚形成纳米微球, 另一方面研究不同的长链烷基对紫杉醇产生的疏水吸附作用。

1 实验部分

1.1 原材料与仪器

壳聚糖(山东海得贝公司), 脱乙酰化度 90%, 平均分子量 8500; 透析袋(鼎国生物技术有限公司), D36mm, 截留分子量 6000~8000; 紫杉醇(天津大学提供); 氯代十六烷(上海医药公司)化学纯; 氯代十二烷(上海化学试剂三厂)化学纯; 溴代正辛烷(军事医学科学院药材供应站)化学纯; 溴代正丁烷(常州市光明生物化学研究所)分析纯; 其余试剂均为分析纯, 所有试剂未经提纯直接使用。

元素分析由 Elementar Vario EL 元素分析仪测定; 烷基壳聚糖的化学信息由 PHI 1600 型 X 射线光电子能谱仪进行测定; 微球的粒径及其分布使用 BI-9000AI 型光子相关光谱仪测定; 红外光谱图用 BIO-BAD EXALIBUR FTS3000 型红外光谱仪测定; 微球的表现形态使用 Philips EM400ST 透射电镜测定; 紫杉醇的浓度使用 UV-1100 紫外分光光度计进行测定。

作者简介: 代昭(1975—), 男, 南开大学在站博士后, 师从黄文强教授从事功能高分子材料研究。E-mail: dai-zhao@hotmail.com

1.2 烷基壳聚糖(alkyl chitosan)的制备

参考文献^[8]的制备方法,将 1 g 壳聚糖,2 g KOH 和 12 mL 异丙醇置于 100 mL 三口烧瓶中,匀速搅拌并升温至 40℃后恒温 1 h 以使壳聚糖碱化,之后升温至 60℃并滴加 3 mL 卤代烷,根据卤代烷反应活性的不同控制反应时间(4~10 h)以制备取代度基本接近的烷基壳聚糖,反应结束后将产物用甲醇洗出,并用稀盐酸中和至中性。产物在丙酮中充分沉淀后过滤,并用丙酮、乙醚依次洗涤三次后烘干,得到烷基化壳聚糖的粗制品。将烘干后的烷基壳聚糖放入透析袋中密封并在 200 mL 去离子水中动态透析 24 h。透析期间使用 1%AgNO₃ 溶液检查透析液中无浑浊产生为止。将透析后的烷基壳聚糖冷冻干燥,得到精制的烷基壳聚糖。

1.3 烷基壳聚糖纳米微球的制备以及紫杉醇的负载

紫杉醇浓度—吸光度标准曲线的确定参见文献^[9],经线性回归后,所得方程为:

$$A = 0.00308 + 0.03285 \times 106C \tag{1}$$

式中, A 为吸光度值, C 为浓度(mol/L)。取 20 mg 烷基壳聚糖放入 20 mL 去离子水中,维持超声 30 min 后得到 0.1%的微球水分散液,然后将 4.3 mg 紫杉醇溶于 2 mL 无水甲醇,并在超声下缓慢滴加至微球的水分散液中,继续超声 30 min 后,得到负载紫杉醇的微球水分散液。取 4 mL 此分散液于透析袋中密封,在 37℃恒温条件下,置于 96 mL pH=7.4 的磷酸缓冲溶液中测量紫杉醇的释放情况。另取该微球水分散液 10 mL 于 12 000 转下高速离心 30 min,取上层清液测量其游离药物含量,以确定烷基壳聚糖微球对紫杉醇的载药量和包封率。

$$\text{载药量}(\%) = \frac{\text{紫杉醇的总投入量} - \text{游离在溶液中的紫杉醇量}}{\text{微球总量}} \times 100\% \tag{2}$$

$$\text{包封率}(\%) = \frac{\text{紫杉醇的总投入量} - \text{游离在溶液中的紫杉醇量}}{\text{紫杉醇的总投入量}} \times 100\% \tag{3}$$

2 结果与讨论

2.1 烷基壳聚糖的结构特点

各种烷基壳聚糖的取代度通过元素分析测量氮含量后计算得到,结果列于表 1。

表 1 烷基壳聚糖元素分析及其取代度
Table 1 Element analysis and degree of substitution of alkyl-chitosan derivatives

样品编号	取代基	反应时间/h	N 含量/%	取代度
butyl-CS	丁基	4	7.39	0.43
octyl-CS	辛基	8	6.59	0.42
dodecyl-CS	十二烷基	10	5.97	0.41
cetyl-CS	十六烷基	10	5.85	0.33

图 1 是壳聚糖及其烷基化衍生物的红外光谱图。经烷基取代后,有三个区域的吸收峰的变化比较明显。第一个区域是 2853 cm⁻¹和 2923 cm⁻¹的 C—H 的伸缩振动峰增强,说明在壳聚糖分子中引入烷基取代基—CH₂ 和 —CH₃^[10];另一个是由壳聚糖的酰胺 I (C=O)、酰胺 II (N—H)以及 —NH₂(1590 cm⁻¹)的变形振动峰所构成的一个较宽的混合吸收谱带(1531 cm⁻¹~1637 cm⁻¹),取代反应后这个混合谱带出现了明显的分峰,处于中间的—NH₂ (1590 cm⁻¹)的吸收峰消失,这表明在壳聚糖环上—NH₂ 的参与了取代反应;此外位于 1030 cm⁻¹~1080 cm⁻¹范围内的伯、仲醇吸收峰的有变窄的趋势,这表明在 C₆ 和 C₃ 位上的羟

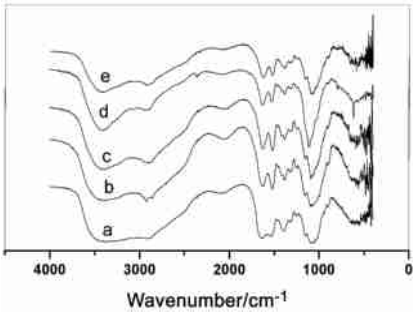


图 1 壳聚糖及烷基壳聚糖红外光谱图

Figure 1 FTIR spectra of chitosan and alkyl-chitosan

a: CS, b: cetyl CS, c: dodecyl-CS
d: octyl-CS e: butyl CS

基虽然参与取代反应但反应程度较低,而氨基则是发生取代反应的主要基团^[11];第三个区域在 1387 cm⁻¹ 的 C—H 变形振动峰增强,再次表明反应后烷基的引入。

为了更进一步了解烷基取代基在壳聚糖单元环上分布,作者利用 X 射线光电子能谱(XPS)对壳聚糖以及烷基壳聚糖上氮的化学态信息进行分析。本文采用饱和烷烃污染物为内标的方法对所有样品的 XPS 谱图进行电荷校正^[12],然后用科学计算软件 Origin 7.0 Pro 对所有样品进行 Gaussian 拟合分峰分析,得到氮元素的化学态信息。

图 2 是壳聚糖和十六烷基壳聚糖的 N1s XPS 谱图以及分峰结果,图中各个分峰的峰面积代表不同化学态的氮元素含量,所得到的结果列于表 2。

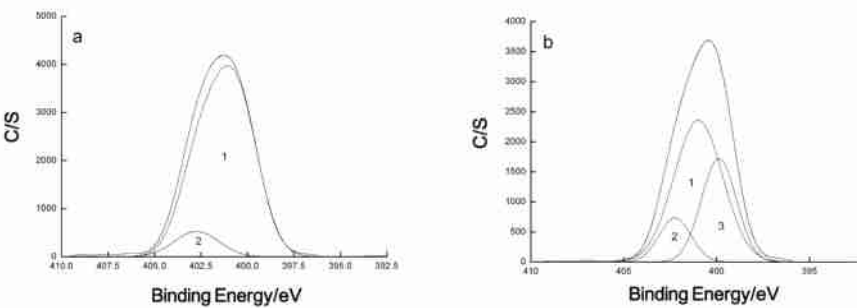


图 2 壳聚糖(a)以及十六烷基壳聚糖(b)的 N1s XPS 分析
Figure 2 N1s XPS spectra analysis of polymer CS (a) and cetyl CS (b)

表 2 壳聚糖与十六烷基壳聚糖的 N1s XPS 分峰结果
Table 2 N1s XPS spectroscopy fitting result of chitosan and cetyl-CS

		1	2	3
		C—N *H ₂	CH ₃ CO—N *H	C—N *—C
CS	Binding energy /eV	401.03	402.74	—
	Atom fraction /%	89.8	10.2	—
cetyl-CS	Binding energy /eV	400.98	402.24	399.88
	Atom fraction /%	58.7	9.4	31.9

从表 2 可以看出,壳聚糖乙酰氨基的氮元素占总氮元素含量的 10.2%,而 NH₂ 中的 N 元素占总 N 元素含量的 89.8%。这与壳聚糖的脱乙酰化度为 90%是基本一致的。而十六烷基壳聚糖中 NH₂ 的 N 元素与乙酰氨基中的 N 元素分别占总量的 58.7%以及 9.4%,新增的 C—N—C 占 N 元素总量的 31.9%。与元素分析得到的十六烷基壳聚糖总取代度为 33%结果相近。

2.2 烷基壳聚糖纳米微球的粒径及粒径分布

微球的粒径是利用动态激光光散射法(DLS)进行测量的,结果列于表 3。

表 3 烷基壳聚糖纳米微球的粒径及粒径分布
Table 3 Particle sizes and size distributions of nanoparticles

Polymer	butyl-CS	octyl-CS	dodecyl-CS	cetyl-CS
Particle size /nm	11.1	46.8	229.9	155.7
Polydispersity	0.373	0.361	0.646	0.562

从表 3 可以看出,随着取代烷基长度的增长,烷基壳聚糖的憎水性增强,微球的粒径基本呈增大的趋势。而 cetyl CS 微球粒径比 dodecyl CS 要小,可能是 cetyl CS 的取代度比 dodecyl CS 低引起的。

图 3 是烷基壳聚糖微球负载紫杉醇后的透射电镜照片。丁基壳聚糖基本无法得到成球粒子。其余烷基壳聚糖纳米微球负载紫杉醇后,核/壳结构较为明显,微球基本成椭球型。

2.3 负载紫杉醇的烷基壳聚糖纳米微球的体外释放

由于烷基取代基的不同,改性后取代基对壳聚糖在水中的聚集状态的影响也有所不同,这将影响体

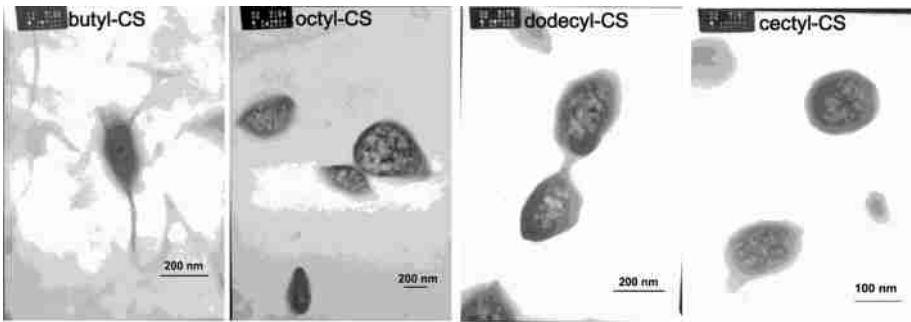


图 3 烷基壳聚糖负载紫杉醇后的透射电镜照片

Figure 3 TEM photography of paclitaxel-loaded alkyl-CS nanoparticles

Alkyl-CS :paclitaxel= 20mg :4.3mg

系对于紫杉醇的包埋和负载性能。表 4 是 20mg 烷基壳聚糖负载 4.3mg 紫杉醇后所得到的载药量和包封率结果。可以看出取代基的烷基链长度对烷基壳聚糖吸附紫杉醇能力的影响较大。

表 4 烷基壳聚糖纳米微球负载紫杉醇的载药量与包封率

Table 4 Loading capacity and association efficiency of paclitaxel-loaded alkyl-chitosan nanoparticles

	butyl-CS	octyl-CS	dodecyl-CS	cetyl-CS
载药量/%	11.6	12.7	14.7	15.6
包封率/%	55.9	65.4	72.3	73.0

图 4 是不同取代基的烷基壳聚糖纳米微球负载紫杉醇后的体外释放曲线。从图中可以看出,在取代度接近的情况下,烷基碳链的长短决定了它们的药物负载性能和体外释放性能。其中,取代基从丁基变化到辛基,其释放曲线的变化较大,虽然二者在突释阶段的药物释放量与突释时间都差不多,但是在缓释阶段,辛基壳聚糖明显表现出较好的缓释性能;而当烷基的碳链增加到十二烷基以后,十二烷基与十六烷基壳聚糖负载紫杉醇后的体外释放曲线已经接近。这表明,当烷基的取代度是 0.4 左右时,十二烷基这个碳链长度是一个临界点,此时再增加烷基长度,并不能明显增加体系对紫杉醇的负载能力。但是当碳链长度低于十二个碳时,体系对紫杉醇的负载能力出现明显的下降,半释放时间明显缩短,药物的突释量亦随之增加。因此,烷基的碳链长度是影响体系负载能力的最主要因素,它不但影响着体系微球的形成和结构,也影响着体系对紫杉醇的增溶、吸附和负载能力。

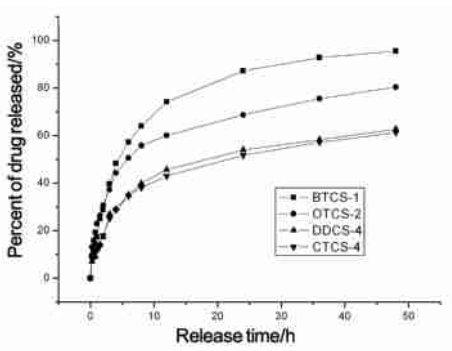


图 4 烷基壳聚糖纳米微球负载紫杉醇后的体外释放曲线

Figure 4 Comparison of paclitaxel release kinetics

Alkyl-chitosan :paclitaxel= 20mg :4.3mg

参考文献:

[1] Majeti N V, Kumar R. React Funct Polym. 2000, 46(1): 1~ 27

[2] Soppimath K S, Aminabhavi T M, Kulkarni A R, et al. J Control Rel. 2001, 70(1-2): 1~ 20

[3] Calvo P, Remuñan-López C, Vila-Jato J L, et al. Pharm Res. 1997, 14(10): 1431~ 1436

[4] Calvo P, Remuñan-López C, Vila-Jato J L, et al. J Appl Polym Sci. 1997, 63:125~ 132

[5] Erbacher P, Zou S M, Bettinger T, et al. Pharm Res. 1998, 15(9): 1332~ 1339

[6] Mao H Q, Roy K, Troung-Le Vu L, et al. J Control Rel. 2001, 70(3): 399~ 421.

[7] Janes K A, Fresneau M P, Marazuela A, et al. J Control Rel. 2001, 73(2-3):255~ 267.

[8] Chun H K, Jang W C, Heung J C, et al. Polym Bull. 1997, 38(4): 387~ 393.

[9] 代昭, 孙多先, 郭瑶. 中草药, 2003, 34(2): 22~25.

(下转第 74 页)

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Influence of the Concentrations of Hyaluronic Acid on the Adhesion and Proliferation of Human Fibroblasts

LIU Hai feng, CHANG Jin, CHEN Yi ping, YAO Kang de

(School of Materials Science and Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: Hyaluronic acid, a component of the glycosaminoglycans in extracellular matrix, has a special physicochemical properties and influences several cellular functions such as adhesion, migration, and proliferation. The object of this study was to investigate the relationship between the concentrations of hyaluronic acid solutions and the adhesion and proliferation behaviors of human fibroblasts. Hyaluronic acid solutions with different concentrations were added to cell culture medium separately. Results demonstrated that it was only the concentration of hyaluronic acid solutions in a certain range ($0.01\% \sim 0.1\%$), that could promote the cell adhesion, DNA synthesizing, GAG secreting and cell proliferation, while the concentrations of hyaluronic acid solutions were above 0.1% it would either reduce or even inhibit these behaviors.

Key words: Hyaluronic acid; Concentration; Fibroblasts; Adhesion; Proliferation

(上接第 67 页)

[10] 董炎明, 王勉, 吴玉松, 等. 纤维素科学与技术, 2001, 9(2): 42~56

[11] 王爱勤, 俞贤达. 功能高分子学报, 1998, 11(1): 83~86

[12] 吴玉松, 李强, 黄剑莹, 等. 物理化学学报, 2001, 17(11): 1049~1052

Preparation of Alkyl chitosan Nanoparticles and its Application as a Carrier System for Paclitaxel

DAI Zhao, SUN Duo xian, HUANG Weng qiang

(1. Key Laboratory of Functional Polymer Materials, Ministry of Education, Nankai University, Tianjin 300071, China;

2. School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: Alkyl chitosan, modified chemically by alkyl halide under alkaline condition, is soluble and spontaneously forms nanoparticles about 10-200 nm in diameters by Dynamic light scattering (DLS). It was found by X ray photoelectron spectroscopy (XPS) that the alkyl substitution reaction was mainly on amine groups of chitosan. After carrying paclitaxel, the sizes of the particles of alkyl chitosan were larger than before. In phosphate buffer solution (PBS, pH=7.4), the vitro release rate of paclitaxel from this system was delayed, and the equilibration release concentration of paclitaxel was decreased by the increase of carbon chain length in alkyl substituted chitosan.

Key words: Chitosan; Alkyl chitosan; Nanoparticles; Paclitaxel; Paclitaxel drug delivery