

自组装法制备 pH 响应性马来酰化壳聚糖纳米粒子的研究

姜 雪, 王晓青, 陈怀俊, 贺继东*

(青岛科技大学, 橡塑材料与工程教育部重点实验室/山东省橡塑材料与工程重点实验室, 青岛 266042)

摘要:采用碳酸钠为催化剂, 室温下制备了水溶性的马来酰化壳聚糖, 研究了反应物投料比对酰化取代度以及产物水溶性的影响。红外光谱结果说明马来酸酐成功接枝到壳聚糖分子上; XRD 结果说明马来酸酐酰化破坏了壳聚糖分子内和分子间的氢键作用, 使水溶性大大提高。用 Nano-ZS90 Malvern 仪器对不同 pH 值下的粒子粒径和 Zeta 电位进行测定, 发现存在 1 个等电点: $\text{pH}=3.01$ 。文章首次采用自组装方法分别在醋酸、甲酸、乳酸溶液中制备得到三种不同的马来酰化壳聚糖纳米粒子并用 SEM 做了表征; DLS 测试表明, 当 pH 值增大后, 三种纳米粒子粒径均由几十纳米溶胀到几百纳米, 显示具有 pH 响应性。

关键词:壳聚糖; 自组装; 纳米粒子; pH 响应性; 药物释放

引言

自组装是分子自发组装成结构上稳定的非共价键连接的聚集体的过程。分子自组装涉及各种弱相互作用力, 如氢键、静电相互作用、螯合效应、范德华作用力等, 正是这种弱的、可逆的非共价键相互作用驱动自组装过程的发生, 从而保持自组装体系结构的完整性和稳定性。该方法在制备过程中不需要添加如表面活性剂、乳化剂等成份, 且工艺简单、成本低, 所以通常被用来制备各种纳米粒子药物载体^[1~4]。

纳米粒子具有许多独特的物理化学性质, 如量子尺寸效应、宏观量子隧道效应、表面效应、小尺寸效应等。纳米粒子凝胶化^[5,6]后就同时具备了以上两种特性, 又由于它还具有生物粘附、生物相容等特性, 因而被广泛应用于药物释放领域。

壳聚糖是一种资源丰富、价格低廉的天然高分子化合物, 由甲壳素 *N*-脱乙酰基得到, 化学名称为(1, 4)-2-氨基-2-脱氧- β -D-葡萄糖。它具有良好的生物可降解性^[7,8]、生物相容性^[9]、生物粘附性^[10]、成膜性^[11,12]及抗肿瘤免疫增强作用^[13,14]等诸多的性质, 在生物工程和医药^[15,16]领域得到了广泛研究和应用。但是壳聚糖的溶解性较差, 应用领域单一, 通常需要对其进行物理和化学改性^[17~19]以改善它的溶解性, 从而进一步扩大它的应用范围。

马来酰化壳聚糖(MCS)是通过壳聚糖与马来酸酐酰化反应得到的一种新型的水溶性壳聚糖衍生物。本文研究了水溶性马来酰化壳聚糖的制备及其溶液溶解性随溶液 pH 值的变化情况, 并首次采用自组装的方法分别在醋酸、甲酸、乳酸溶液中制备出不同的马来酰化壳聚糖纳米粒子, 研究了它们在酸碱条件下的溶胀行为, 为后续药物释放的应用研究奠定了基础。

1 实验部分

1.1 主要试剂和仪器

低分子量壳聚糖(CS, 脱乙酰度 91%) $M_n=20,000$, 青岛海汇生物工程有限公司; 顺丁烯二酸酐(MA), 分析纯, 中国上海埃彼化学试剂有限公司; 无水碳酸钠, 分析纯, 中国莱阳市双双化工有限公司; 氢氧化钠, 分析纯, 天津博迪化工股份有限公司; 冰乙酸, 分析纯, 天津博迪化工股份有限公司; 丙酮、盐

10.14028/j.cnki.1003-3726.2015.04.007

收稿: 2014-04-15; 修回: 2014-11-07;

作者简介: 姜雪(1988—), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为生物医用高分子材料;

* 通讯联系人, E-mail: hejidong@chemist.com.

酸,分析纯,烟台三和化学试剂有限公司;乳酸、甲酸,分析纯,天津市富宇精细化工有限公司。高速离心机(HC-3018),安徽中科中佳科学仪器有限公司;pH 计(pHS-3C),上海精科雷磁有限公司;Zeta 电位(Nano-ZS90),Malvern Zetasizer Nano ZS90;傅里叶红外光谱仪(TENSOR-27),德国 BRUKER;元素分析(Vario EL Ⅲ),德国 ELEMENTAR 元素分析系统公司;XRD(XRD-7000S/L),日本岛津公司;扫描电子显微镜(JSM-7500F),日本电子。

1.2 马来酰化壳聚糖的制备

称取 3.0g 壳聚糖加入到盛有 300mL 去离子水的单口烧瓶中,室温下磁力搅拌使混合均匀,10min 后加入一定量的 Na_2CO_3 ,30min 后加入一定量的 $\text{C}_4\text{H}_2\text{O}_3$ (马来酸酐),物料加完后反应 6h 后停止反应。用 1mol/L 的 NaOH 溶液调节反应液至 $\text{pH}=10$,离心分离除去不溶的未反应的壳聚糖。取离心后的上清液,用冰乙酸调节至 $\text{pH}=3$ 得到白色絮状沉淀物,再次离心处理,得到白色产物,干燥后即得到马来酰化壳聚糖。

1.3 马来酰化壳聚糖 C/N 测定及其溶解性测试

利用元素分析仪(Vario EL Ⅲ,德国 ELEMENTAR 元素分析系统公司)测定马来酰化壳聚糖的 C、N 含量及 C/N 质量比。

取上述干燥好的马来酰化壳聚糖用研钵研磨成粉末状,取 20mg 溶于 20mL 去离子水中,加入磁子充分搅拌,一段时间后观察产物的溶解情况。

1.4 自组装法制备马来酰化壳聚糖纳米粒子

取上述制备得到的马来酰化壳聚糖适量溶于 50mL 去离子水中,常温下搅拌使充分溶解。用注射器分别取溶解好的马来酰化壳聚糖溶液约 0.5mL 缓慢滴入 0.5mL 的冰乙酸、乳酸、甲酸溶液中,观察溶液均逐渐呈现蓝色乳光液即分别得到自组装的马来酰化壳聚糖纳米粒子。

1.5 马来酰化壳聚糖纳米粒子 SEM 表征

用毛细管移取 1 滴上述制备得到的纳米粒子溶液滴到铝箔上,红外灯照射蒸干溶剂,然后镀金处理制得 SEM 测试样品。采用扫描电子显微镜(JSM-7500,日本电子)对样品的尺寸形貌进行分析。

2 结果与讨论

2.1 反应条件对马来酰化壳聚糖酰化取代度及其溶解性能的影响

2.1.1 马来酸酐与壳聚糖的投料摩尔比的影响 从表 1 可以看出,当投料比小于 1.5 时,随着马来酸酐加入量的增加,C/N 质量比逐渐增加。但当投料比达到 1.5 时,壳聚糖上的氨基基本已完全反应,而此时羟基的反应活性低,再加大马来酸酐的投料量则基本不发生反应,所以 C/N 质量比没有很大的变化,甚至有所降低。综合考虑,马来酸酐与壳聚糖的摩尔比为 1.2 时得到的马来酰化壳聚糖酰化度较高且溶解性较好。

表 1 马来酸酐的用量对酰化取代度的影响
Table 1 Effect of the amount of maleic anhydride on acylated degree of substitution

马来酸酐:壳聚糖(摩尔比)	C%	N%	C/N 质量比	溶解性
单纯壳聚糖	38.32	6.996	5.479	不溶
0.8	39.50	5.108	7.733	微溶
1.0	39.92	5.210	7.662	微溶
1.2	40.19	5.039	7.975	溶解
1.5	40.51	5.030	8.055	微溶
1.8	40.57	5.128	7.911	微溶

注:实验中壳聚糖为 3.00g,无水碳酸钠为 1.00g,反应时间 6h。

2.1.2 碳酸钠与马来酸酐的投料摩尔比的影响 由表 2 可以看出,随着反应投料比的增加,反应产物的酰化取代度大体呈现先减小后增加再减小的趋势。随碳酸钠加入量增加,促进了酰化反应的进行;但当碳酸钠加入量太多时,碳酸钠与马来酸酐水解得到的酸发生反应,使得参与反应的马来酸酐量越来越少,

而壳聚糖只能溶解在稀酸中,当碳酸钠加入量使得溶液体系呈碱性时,壳聚糖大量析出,反应不能进行。因此,只有当碳酸钠的量适当,才能得到酰化产物。综合考虑,无水碳酸钠与马来酸酐的投料摩尔比为 0.6 时为最优配比。

表 2 碳酸钠的用量对酰化取代度的影响

Table 2 Effect of the amount of sodium carbonate on acylated degree of substitution

碳酸钠:马来酸酐(摩尔比)	C%	N%	C/N 质量比	溶解性
单纯壳聚糖	38.32	6.996	5.479	不溶
0.20	37.57	4.325	8.686	难溶
0.25	38.03	4.800	7.922	难溶
0.30	38.12	5.258	7.25	难溶
0.35	38.49	5.013	7.678	难溶
0.40	38.77	5.099	7.603	微溶
0.60	36.45	4.502	8.097	溶解
0.80	37.01	4.693	7.886	微溶
1.00	35.80	4.391	8.153	难溶

注:实验中壳聚糖为 3.00g,马来酸酐为 2.00g,反应时间 6h。

2.2 FT-IR 分析

由图 1 对比分析可知:3400cm⁻¹左右的宽峰是 O—H 伸缩振动与 N—H 伸缩振动重叠而成的多重吸收峰。3500~2500cm⁻¹处的峰与 CS 相比峰宽而散,一方面说明—COOH 的存在,另一方面也说明分子内的氢键相互作用得到增强。3030~3330cm⁻¹是一NH 的伸缩振动峰,在壳聚糖分子中虽有一定的乙酰基团,但由于分子内和分子间的氢键作用,在该区域没有吸收峰,而发生酰化反应后,在 3070~3100cm⁻¹处有吸收峰,说明壳聚糖分子中—NH₂ 发生了酰化反应,出现了一NHCO—的结构,且—OH 基本没发生变化,也几乎没有—COO—的出现。1570cm⁻¹处吸收峰增强,是 C=C 伸缩振动峰与酰胺 I 谱带振动叠加的结果,由此证明—COOH 存在,说明 CS 与马来酸酐接枝成功。1070cm⁻¹左右是一OH 的振动吸收峰,反应前后变化较小,1420cm⁻¹左右是一OH 的变形振动峰,酰化前后变化不大,说明壳聚糖的一OH 几乎没有发生反应。853 cm⁻¹处的峰为双键 C—H 的面外弯曲振动峰,而在壳聚糖谱图中没有这个峰。

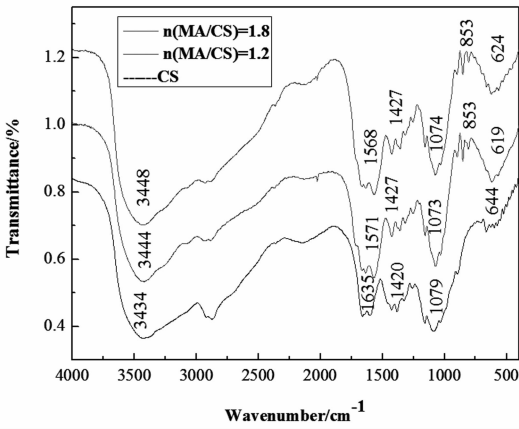


图 1 壳聚糖与马来酰化壳聚糖的红外谱图对比

Figure 1 Comparison between FT-IR spectra of chitosan and maleoyl chitosan

2.3 XRD 分析

图 2 为马来酰化壳聚糖与单纯壳聚糖衍射图的对比,由图可知壳聚糖在 2θ=11°和 2θ=20°处有两个强衍射峰,这是壳聚糖分子结晶化程度的体现,是壳聚糖的特征衍射峰。马来酸酐与壳聚糖发生酰化反

应, $2\theta=11^\circ$ 处衍射峰消失, $2\theta=20^\circ$ 处衍射峰变宽, 结晶性降低。当马来酸酐与壳聚糖的摩尔比发生变化时, 在 $2\theta=20^\circ$ 处的衍射峰向右偏移, 且衍射峰的宽度变宽, 说明酰化产物中形成了新的不同于壳聚糖的结晶性结构, 这种结晶结构的形成很可能与酰化产物的侧链结构— $\text{HNCCH}=\text{CHCOOH}$ 的规整排列有关。马来酸酐与壳聚糖摩尔比为 1.0 的马来酰化壳聚糖的峰形角度略有移动, 无定型特征明显加强; 摩尔比为 1.2 和 1.5 的马来酰化壳聚糖的峰形角度没有明显的移动, 但强度有所减弱; 而摩尔比为 1.8 的马来酰化壳聚糖在 $2\theta=20^\circ$ 处的衍射峰强度大大减弱, 结晶性能大大降低。

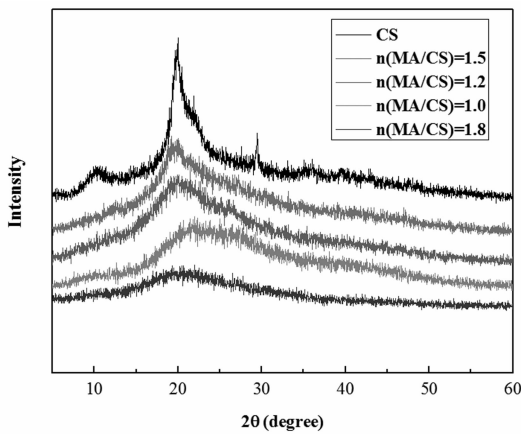


图 2 壳聚糖和马来酰化壳聚糖的 X 衍射图

Figure 2 X-ray diffraction patterns of chitosan and maleoyl chitosan

2.4 Zeta 电位及粒径分布分析

取一定量的浓盐酸溶于 250mL 去离子水中, 并用 pH 计标定初始 pH 值, 然后加入适量去离子水配制了以下八个不同 pH 值的稀盐酸溶液: 2.52、2.99、3.50、4.00、4.50、5.28、5.70、6.20。分别取适量的马来酰化壳聚糖溶入这八个标定的稀盐酸溶液中, 加入小磁子搅拌使加速溶解得到马来酰化壳聚糖溶液。采用 Nano-ZS90 Malvern 仪器测定样品的 Zeta 电位和粒径大小。

从图 3 可以看出, 存在一个等电点 $\text{pH}=3.01$ 。当 $\text{pH}<3.01$ 时, 酸性较强, 此时马来酰化壳聚糖是溶解的, 因此粒径较小; 当 pH 值达到 3.01 时, 溶液中的正负电荷达到平衡, 静电作用消失, 马来酰化壳聚糖开始析出且当 pH 值为 3.01 时粒子聚集程度最大。当 pH 值继续增大时, 马来酰化壳聚糖侧基羧基去离子化为 COO^- 带负电, 且开始程度较快, 后来较为缓慢, 粒径随着 pH 值的变化先减小后又增大再减小。以上结果表明马来酰化壳聚糖粒径具有随 pH 变化而变化的特性。

2.5 SEM 分析

图 4 有 a、b、c 三幅扫描电镜图(各图左上角为相应的放大倍数), 为最优配比下得到的溶解性较好的马来酰化壳聚糖分别在冰醋酸溶液、甲酸溶液和乳酸溶液中自组装形成的纳米粒子 SEM 图, 样品制备条件均相同, 三幅图中纳米粒子均为球形粒子。由 a 图可以看到纳米粒子分布均一无团聚, 且由于马来酰化壳聚糖分子链侧链上含有乙烯基碳碳双键的 $\pi-\pi$ 相互作用结合分子间的氢键相互作用使得纳米粒子又进行了二次自组装, 形成如图所示的正六边形结构, 这为某些特殊分子结构的药物负载提供了空间和可能。由 b 图可以看到纳米粒子粒径大小均一, 有些地方分布均匀且密集, 有些地方分布稀疏且形成一条直线。由 c 图可以看到纳米粒子颗粒界限明显, 有些粒子形成一条直线。

2.6 DLS 分析

图 5 分别为在醋酸、甲酸和乳酸三种酸性溶液中自组装得到的马来酰化壳聚糖纳米粒子的统计直方图, 前者是原样的酸性条件下的纳米粒子粒径测试, 后者是在原样的基础上分别加入适量 0.5mol/L NaOH 溶液使溶液体系 pH 值增大为 7~8 后纳米粒子的粒径测试。

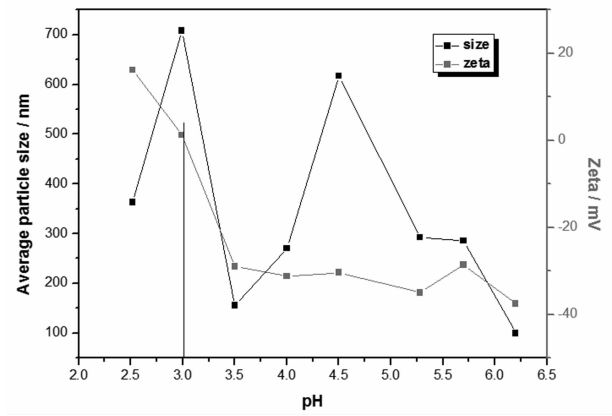


图 3 马来酰化壳聚糖的平均粒度与 Zeta 电位随溶液的 pH 值的变化

Figure 3 Changes of average particle size and Zeta potential of maleoyl chitosan with pH value of solution

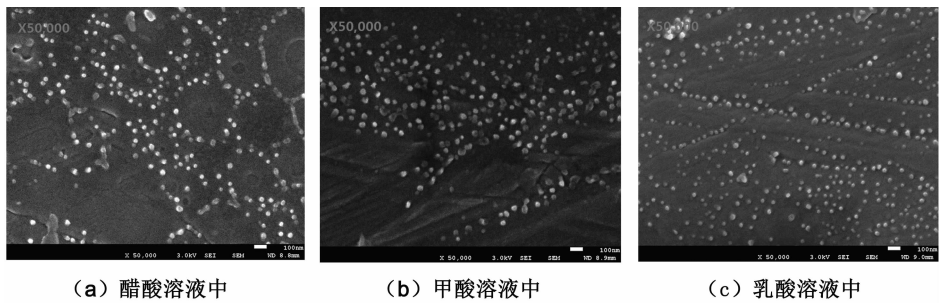
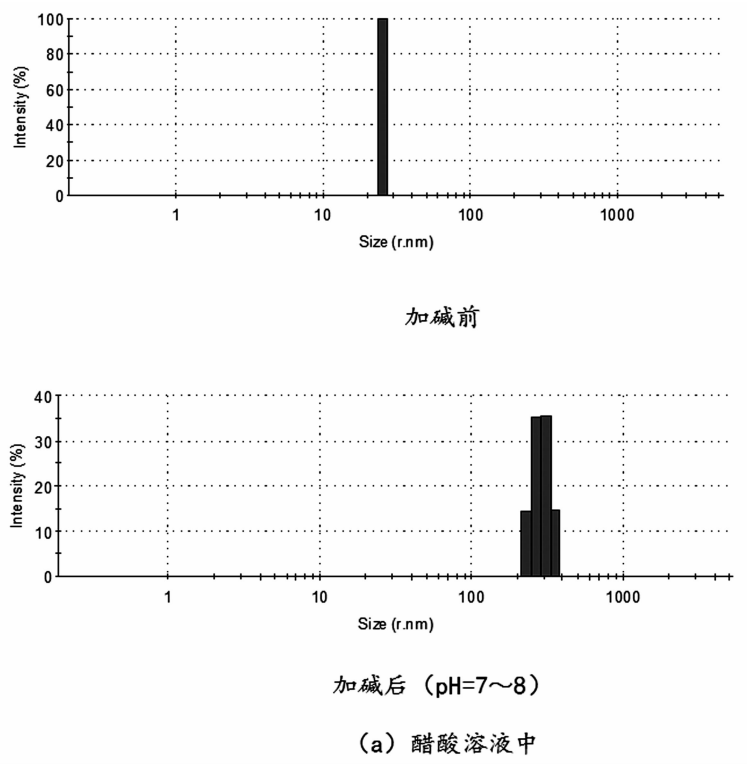


图 4 马来酰化壳聚糖纳米粒子的扫描电镜图

Figure 4 Scanning electron micrographs of maleoyl chitosan nanoparticles



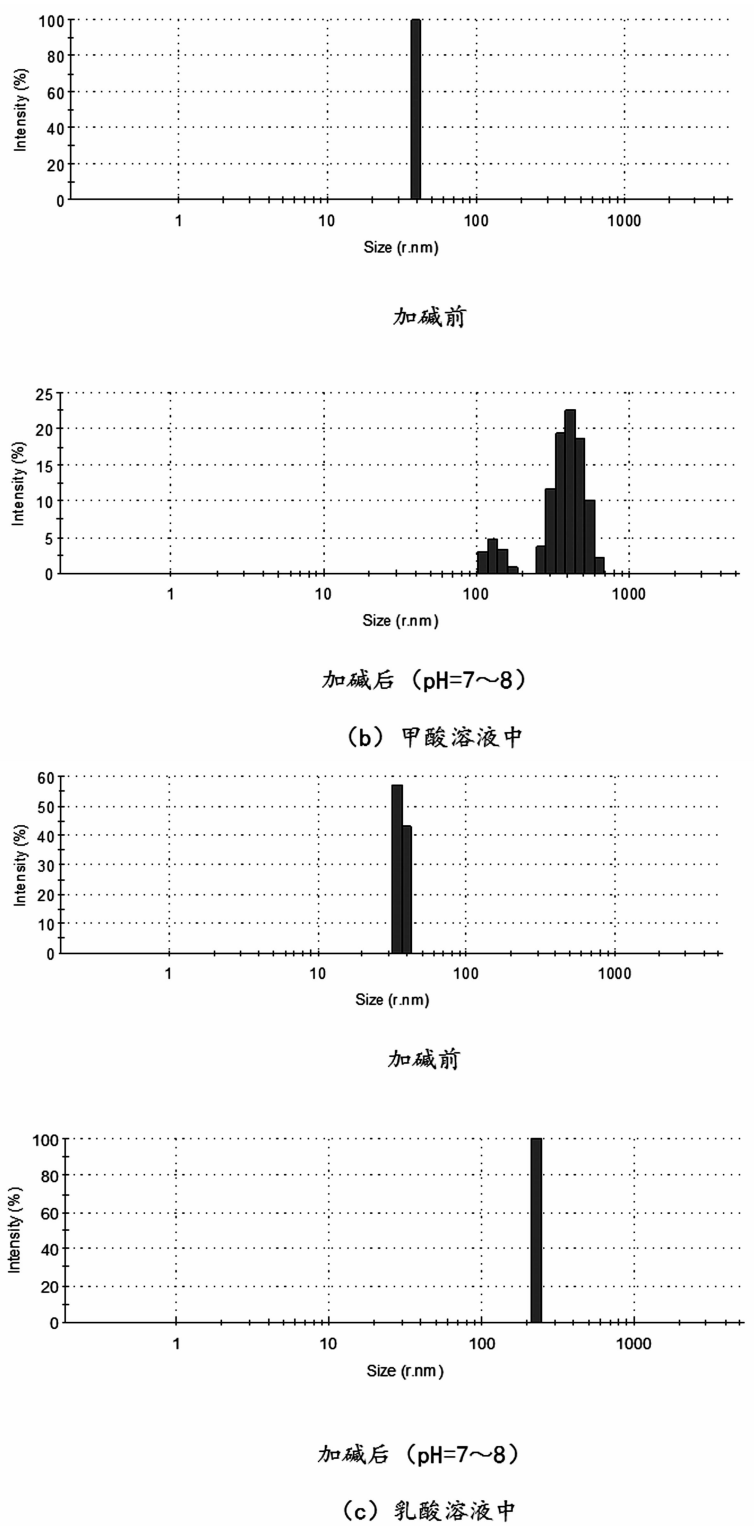


图 5 马来酰化壳聚糖纳米粒子在不同酸性溶液中的粒径分布图

Figure 5 The DLS photographs of maleoyl chitosan nanoparticles in different acidic solution

由 a 图可见纳米粒子平均粒径为 27nm,加碱后纳米粒子粒径有所增大,其中平均粒径为 220nm 和 360nm 的粒子分别占了约 15%,而平均粒径为 270nm 和 310nm 的粒子分别占了约 35%。由 b 图可知纳

米粒子平均粒径为 40nm,加碱后纳米粒子的粒径有所增大,其中有平均粒径为 100~200nm 之间的小粒子,还有平均粒径为 250~700nm 之间的大粒子。由 c 图可见纳米粒子平均粒径为 32~42nm,加碱后纳米粒子的粒径有所增大且平均粒径为 240nm。综上所述,三种酸性溶液中制备得到的纳米粒子在加碱后粒径均有所增大,即在酸性条件下是收缩的,而在碱性条件下是溶胀的,表明该纳米粒子具有 pH 响应性,可用于智能型药物缓释载体的制备。

3 结论

实验成功合成了马来酰化壳聚糖,红外光谱分析表明酰化反应发生在氨基上;当马来酸酐与壳聚糖的摩尔比为 1.2 且碳酸钠与马来酸酐的摩尔比为 0.6 时,酰化产物的 C/N 质量比较大,即在壳聚糖上接枝的马来酸酐量较多。壳聚糖的酰化反应破坏了壳聚糖分子内和分子间的氢键作用,结晶性明显减弱,水溶性大大增强;Zeta 电位分析发现存在一个等电点 $\text{pH}=3.01$ 。首次采用自组装的方法分别在醋酸、甲酸、乳酸溶液中制备得到大小均一的纳米球形粒子,DLS 测试显示三种酸性溶液中制备得到的纳米粒子在酸性条件下是收缩的,而在碱性条件下是溶胀的,表明该纳米粒子具有 pH 响应性,可以广泛应用于智能型药物载体的制备,为生物医学领域的药物释放奠定了基础。

参考文献:

- [1] Mu B, Liu P, Li X R, Du P C, Dong Y, Wang Y J. *Mol Pharmaceutics*, 2012, 9, 91~101.
- [2] Liu K H, Chen B R, Chen S Y, Liu D M. *J Phys Chem B*, 2009, 113, 11800~11807.
- [3] Giannotti M I, Esteban O, Oliva M, García-Parajo M F, Sanz F. *Biomacromolecules*, 2011, 12, 2524~2533.
- [4] You J, Hu F Q, Du Y Z, Yuan H. *Biomacromolecules*, 2007, 8, 2450~2456.
- [5] Ding X Z, Yao P. *Langmuir*, 2013, 29, 8636~8644.
- [6] Gu Z, Dang T T, Ma M L, Tang B C, Cheng H, Jiang S, Dong Y Z, Zhang Y L, Anderson D G. *Nano*, 2013, 7, 6758~6766.
- [7] Dong W, Han B Q, Feng Y L, Song F L, Chang J, Jiang H P, Tang Y Y, Liu W S. *Biomacromolecules*, 2010, 11, 1527~1533.
- [8] Zhu A P, Pan Y N, Dai S, Li F J, Shen J. *Biomacromolecules*, 2009, 10(7), 1997~2002.
- [9] Huang X L, Zhuang J, Chen D, Liu H Y, Tang F Q, Yan X Y, Meng X W, Zhang L, Ren J. *Langmuir*, 2009, 25, 11657~11663.
- [10] Ryu J H, Lee Y H, Kong W H, Kim T G, Park T G, Lee H. *Biomacromolecules*, 2011, 12, 2653~2659.
- [11] Cui F Y, He C B, Yin L C, Qian F, He M, Tang C, Yin C H. *Biomacromolecules*, 2007, 8, 2845~2850.
- [12] Manna U, Bharani S, Patil S. *Biomacromolecules*, 2009, 10, 2632~2639.
- [13] Amoozgar Z, Park J, Lin Q N, Yeo Y. *Mol Pharmaceutics*, 2012, 9, 1262~1270.
- [14] Duan C X, Gao J, Zhang D R, Jia L J, Liu Y, Zheng D D, Liu G P, Tian X N, Wang F S, Zhang Q. *Biomacromolecules*, 2011, 12, 4335~4343.
- [15] Chang C H, Lin Y H, Yeh C L, Chen Y C, Chiou S F, Hsu Y M, Chen S Y, Wang C C. *Biomacromolecules*, 2010, 11, 133~142.
- [16] Yu S Y, Hu J H, Pan X Y, Yao P, Jiang M. *Langmuir*, 2006, 22, 2754~2759.
- [17] Xu P S, Gaurav B, Tyler S, William G, Van A, Yoon Y. *Biomacromolecules*, 2010, 11, 2352~2358.
- [18] Badawy M E I, Rabea E I, Rogge T M, Stevens C V, Smagghe G, Steurbaut W, Hofte M. *Biomacromolecules*, 2004, 5, 589~595.
- [19] Yan L Y, Poon Y F, Chan-Park M B, Chen Y, Zhang Q. *J Phys Chem C*, 2008, 112, 7579~7587.

Preparation of Maleoyl Chitosan Nanoparticles by Self-Assembly and their pH Responsability

JIANG Xue, WANG Xiao-qing, CHEN Huai-jun, HE Ji-dong*

(Key Laboratory of Rubber-plastics of Ministry of Education/Shandong Provincial Key Laboratory of Rubber-plastics, Qingdao University of Science & Technology, Qingdao 266042, China)

Abstract: The maleoyl chitosan (MCS) was prepared at room temperature by using sodium carbonate as catalyst. The effect of reactant feed ratio on the degree of substitution and water-solubility of acylated product was studied. FT-IR show that the maleic anhydride is successfully grafted onto chitosan molecule, X-ray diffractometry(XRD) results indicate that maleic anhydride acylating destructed the hydrogen bonds within and between molecules of chitosan, which greatly improved water-solubility. The particle size and zeta potential at different pH values were determined by using Nano-ZS90 Malvern Instruments. The isoelectric point is $\text{pH} = 3.01$. Three different maleoyl Chitosan nanoparticles in acetic acid, formic acid, lactic acid solution were prepared by self-assembly approach for the first time, which were characterized by scanning electron microscopy(SEM). Dynamic light scattering(DLS) tests show that three kinds of nanoparticles swelled from tens of nanometers to hundreds of nanometers when the pH value increased, which displays the pH-responsive property.

Key words: Chitosan; Self-assembly; Nanoparticles; pH- Responsive; Drug delivery