

pH 敏感性叶酸修饰羧甲基壳聚糖/ CaCO_3 混合纳米球作为药物载体的研究

刘举慧, 赵 峰, 郭建峰*

(中北大学化学工程与技术学院, 化工综合国家级实验教学示范中心(中北大学), 山西 太原 030051)

摘要:以叶酸为靶向基团, 将其连接到羧甲基壳聚糖(CMCS)上, 制得偶联叶酸的羧甲基壳聚糖(FCMC), 在 FCMC 溶液中碳酸钙自组装形成一种具有靶向性的 FCMC/ CaCO_3 混合纳米球。同时对纳米球结构进行表征, 并对比了修饰叶酸前后混合纳米球理化性能。在此基础上, 将亲水性药物二甲双胍作为模型药物, 对 2 种载体的包封率、载药量及释放行为进行了对比研究。结果表明, FCMC/ CaCO_3 混合纳米球大小均一, 分散性良好, 碳酸钙的引入使得纳米球对亲水性药物包封率较高, 该纳米球对药物的释放具有较好的 pH 敏感性和缓控释能力, 是潜在的智能药物给药系统基质材料。

关键词:羧甲基壳聚糖; 叶酸; 碳酸钙; 二甲双胍; pH 敏感性

中图分类号: O631

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2018)04-0135-04

DOI: 10.16606/j.cnki.issn.0253-4320.2018.04.031

Study on pH-sensitive folate-modified carboxymethyl chitosan/calcium carbonate hybrid nanosphere for drug supporter

LIU Ju-hui, ZHAO Feng, GUO Jian-feng*

(National Demonstration Center for Experimental Chemical Engineering Comprehensive Education, School of Chemical Engineering and Technology, North University of China, Taiyuan 030051, China)

Abstract: Folate as a target group is attached onto carboxymethyl chitosan (CMCS) to obtain folate coupled carboxymethyl chitosan (FCMC). Then a kind of targeted FCMC/ CaCO_3 hybrid nanospheres is formed by self-assembly of calcium carbonate in FCMC solution. The structure of as-prepared nanospheres is characterized and the physicochemical properties of the hybrid nanospheres before and after modification by folate are compared. Besides, the influences of folate modification on the drug loading amount, the encapsulation efficiency and the release behavior of the hybrid nanospheres are also analyzed with hydrophilic metformin as a model drug. The results show that FCMC/ CaCO_3 hybrid nanospheres have uniform size and good dispersion performance and the addition of calcium carbonate can help to increase entrapment efficiency for hydrophilic drug. The prepared nanospheres have a good pH-sensitivity and high controlled release ability for the release of drug, which are potential substrate material for smart drug delivery system.

Key words: carboxymethyl chitosan; folic acid; calcium carbonate; metformin; pH-sensitivity

药物智能给药系统(SDDS)由于能够改变体内药物动力学和体内药物生物分布, 从而显著增强药物治疗效果, 同时能够减少药物全身副作用, 近年来成为药物制剂学广泛研究的热点^[1]。聚合物/无机物混合粒子在制备过程中不会涉及有机溶剂和表面活性剂的使用, 因此, 将其应用到 SDDS 的研究受到人们的重视^[2-3]。在众多无机材料中, 碳酸钙具有很好的生物相容性和生物降解性, 同时具有 pH 敏感性, 从而引起人们极大的兴趣^[4]。羧甲基壳聚糖(CMCS)是一种水溶性的壳聚糖衍生物, 具有良好的生物相容性和生物可降解性, 适用于生物医药领域^[5-7]。使用多糖聚合物调控 CaCO_3 结晶, 并将其

应用到 SDDS 得到广泛的应用。

由于叶酸(FA)与叶酸受体(FR)具有很高的亲和性, FR 在许多肿瘤细胞的表面高度表达, 如肺、乳腺、胰腺等肿瘤细胞, 而在人体正常组织和细胞中低表达^[8-10]。在药物载体中叶酸分子的低水溶性也可用作疏水部分和靶向基团发挥作用^[11]。

笔者采用简易的自组装方法在水溶液中制备出一种具有靶向性的 FCMC/ CaCO_3 混合纳米球。同时利用 FT-IR、XRD、SEM、BET 等测试手段对微粒进行表征, 研究了微球的结晶性, 并以亲水性药物 MET 为模型药物, 考察了药物的载药量、包封率及不同 pH 条件下 MET 的释放机制。

收稿日期: 2017-09-07

基金项目: 山西省重点研发计划项目(201603D121022)资助

作者简介: 刘举慧(1993-), 男, 硕士研究生, 研究方向为功能高分子材料, 827271187@qq.com; 郭建峰(1975-), 男, 博士, 副教授, 研究方向为功能高分子材料, 通讯联系人, jianfengguo@nuc.edu.cn。

1 实验部分

1.1 实验原料

羧甲基壳聚糖 (CMCS, $M_w = 1.0 \times 10^5$, 脱乙酰度 $\geq 90\%$, 羧化程度 $\geq 80\%$), 上海源叶生物科技有限公司生产; 叶酸 (FA)、无水氯化钙 (CaCl_2) 和无水碳酸钠 (Na_2CO_3), 分析纯, 上海麦克林生化科技有限公司生产; 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC·HCl)、N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS), 分析纯, 上海阿拉丁试剂生产; 其余试剂都是国产分析纯。

Lambda 35 紫外可见分光光度计, 美国 Perkin-Elmer 公司生产; TGL-16 高速台式离心机, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司生产; 1700 傅里叶红外光谱仪, 美国 Perkin-Elmer 公司生产; PW 1710 广角 X 射线衍射光谱仪、Zeta 电位粒度分析仪, 美国 Brookhaven 公司生产; JSM-7001F 扫描电子显微镜, 日本电子株式会社生产。

1.2 叶酸修饰的羧甲基壳聚糖 (FCMC) 的制备

将精确称取的 0.5 g FA (1.1 mmol) 溶于 15 mL 无水 DMSO 并磁力搅拌 1 h 充分溶解, 依次加入过量的 EDC·HCl 和 NHS [$n(\text{FA}) : n(\text{EDC}) : n(\text{NHS}) = 1 : 1.5 : 1.5$], 常温反应 5 h, 使叶酸活化。CMCS 400 mg 溶于 30 mL pH 5.0 的醋酸缓冲溶液中, 将活化的叶酸逐滴加入到 CMCS 溶液中, 避光常温反应 16 h。用 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液逐滴调节 pH 到 9.0, 用 PBS 缓冲溶液透析 3 d, 用去离子水透析 3 d, 冷冻干燥得到黄色粉末状固体 FCMC。

1.3 FCMC/ CaCO_3 混合纳米球的制备

将 10 mg 制备的 FCMC 溶于 4 mL 水中, 充分溶解后将定量 0.02 mol/L CaCl_2 溶液滴加到上述溶液中, 室温搅拌 2 h, 然后向溶液中滴加等量的 0.02 mol/L Na_2CO_3 溶液, 室温反应 24 h。将所得溶液离心收集沉淀, 在真空干燥箱中 40℃ 干燥过夜得产物。为了比较, 相同条件下制备了 CMCS/ CaCO_3 混合纳米球和纯碳酸钙。

1.4 二甲双胍药物载药量及包封率测定

取 5 mL 二甲双胍盐酸盐溶液 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 将 10 mg 的空白微球加入其中, 室温震荡搅拌 16 h。随后将混合溶液离心分离, 并用去离子水多次洗涤沉淀。收集所有水溶液, 溶液中的药物质量即为药物损失量。以水为背景去除水吸光度, 药物的浓度由紫外可见分光光度计测定。测量载药量 (LC) 和包封率 (EE), 每个样品做 3 个平行样测量取平均

值, 表示为平均值 \pm 标准偏差 (SD)。

LC 和 EE 的计算式如下:

$$LC = [(M_1 - M_2)/M_0] \times 100\% \quad (1)$$

$$EE = [(M_1 - M_2)/M_1] \times 100\% \quad (2)$$

式中: M_1 为药物的投料量; M_2 为药物损失量; M_0 为载药纳米粒的总质量。

1.5 药物体外释放行为

将 10 mg 载药纳米球 (CMCS/ CaCO_3 、FCMC/ CaCO_3) 分别分散在 PBS 缓冲液 (0.01 mol/L, pH 7.4 和 5.0) 中。将溶液装入透析袋 (截留分子质量为 $1.4 \times 10^4 \text{ g}/\text{cm}^3$) 中, 并分别浸入 25 mL pH 为 7.4 和 5.0 的 PBS 缓冲液的玻璃瓶中, 在恒温 37℃ 振荡箱中进行药物释放。在预定的时间间隔, 取出 3 mL 的透析液并补加相应 pH 的等量新鲜 PBS 溶液。通过紫外可见分光光度计在波长 233 nm 处测定吸光度, 以相应的 PBS 溶液扣背景, 并根据相应 pH PBS 溶液的标准曲线得出 MET 浓度, 计算得出 MET 的累积释放量。

2 分析与讨论

2.1 FCMC/ CaCO_3 混合纳米球的表征

2.1.1 SEM 表征结果

叶酸偶联前后混合纳米球的形态如图 1 所示。由图 1(a) 可以看出, 试样呈方形叠块状。由图 1(b)、图 1(c) 可以看出, FCMC/ CaCO_3 试样分散性较好, 大小均一, 平均粒径为 207 nm。

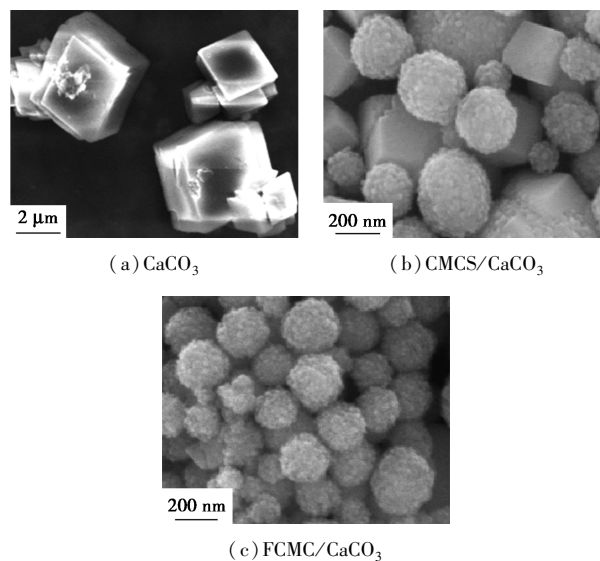
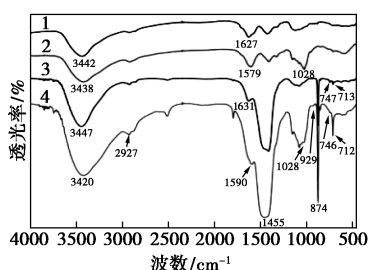


图 1 CaCO_3 、CMCS/ CaCO_3 和 FCMC/ CaCO_3 的扫描电镜图

2.1.2 FT-IR 的表征结果

CMCS、FCMC、CMCS/ CaCO_3 、FCMC/ CaCO_3 的

FT-IR 谱图如图 2 所示。由图 2 中谱线 1 可以看出,3 442 cm⁻¹处的特征峰为羟基伸缩振动和氨基伸缩振动重叠形成的吸收峰,1 627 cm⁻¹和 1 327 cm⁻¹处分别为伯胺 N—H 弯曲振动和 C—O 伸缩振动。由图 2 中谱线 2 可以看出,FA-CMCS 在 1 579 cm⁻¹处出现仲胺振动吸收峰,说明有酰胺键(—CONH—)生成,证明 FA 与 CMCS 成功偶联到一起。由于氢键的减少,在 1 028 cm⁻¹处可以明显看出有 1 个尖锐的吸收带^[12]。在图 2 谱线 3 中,出现 CMCS 部分和碳酸钙的信号峰。2 927 cm⁻¹处为羧甲基壳聚糖 C—H 伸缩振动,713 cm⁻¹和 874 cm⁻¹处为方解石的伸缩振动,747 cm⁻¹处为球霏石的特征吸收峰。在图 2 谱线 4 中,2 927 cm⁻¹处吸收峰较强,说明有机物的含量相对较高,除含有方解石和球霏石的吸收峰外,在 1 590 cm⁻¹处出现酰胺键(—CONH—)特征吸收峰,1 028 cm⁻¹处的峰也同时出现,929 cm⁻¹处为叶酸 O—H 振动吸收峰,表明 FCMC/CaCO₃ 是由方解石、球霏石和 FCMC 组成。

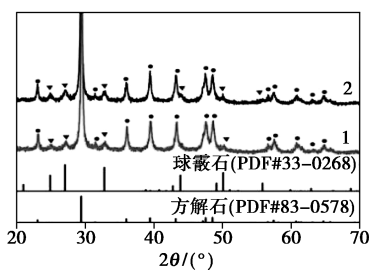


1—CMCS;2—FCMC;3—CMCS/CaCO₃;4—FCMC/CaCO₃

图 2 CMCS、FCMC、CMCS/CaCO₃、FCMC/CaCO₃ 的红外光谱图

2.1.3 XRD 的表征结果

FCMC/CaCO₃ 和 CMCS/CaCO₃ 的 XRD 图谱如图 3 所示。圆圈和倒三角分别代表方解石和球霏石的衍射峰。由图 3 可以看出,2 种纳米粒均具有方解石(PDF#83-0578)和球霏石(PDF#33-0268)2 种晶相,说明大分子羧甲基壳聚糖的存在可以调节产物的晶相形成,与 SEM 表征结果一致。



1—FCMC/CaCO₃;2—CMCS/CaCO₃

图 3 CMCS/CaCO₃、FCMC/CaCO₃ 的 XRD 谱图

2.1.4 BET 氮气吸附分析

叶酸修饰后 FCMC/CaCO₃ 混合纳米球仍具有高比表面积和较大孔隙和较小孔径,如表 1 所示。BET 分析结果如图 4 所示。由表 1 可以看出,FCMC/CaCO₃ 的比表面积为 27.06 m²/g。从孔径分布分析结果可知,试样存在介孔结构,2 种试样的孔直径为 3.44 nm 和 3.84 nm,表明在 FA 修饰前后孔径变化不明显,而这种介孔结构可以为抗癌药物提供潜在的负载空间。

表 1 FA 修饰前后混合纳米球结构参数

样品	CMCS/CaCO ₃	FCMC/CaCO ₃
孔径/nm	3.44	3.84
比表面积/(m ² ·g ⁻¹)	28.09	27.06
孔体积/(cm ³ ·g ⁻¹)	0.071	0.101

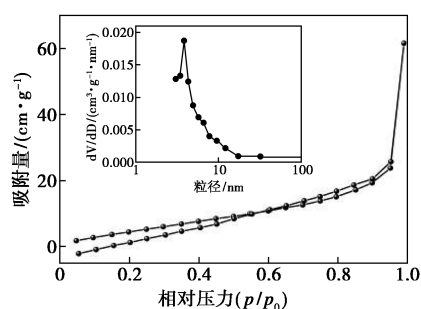
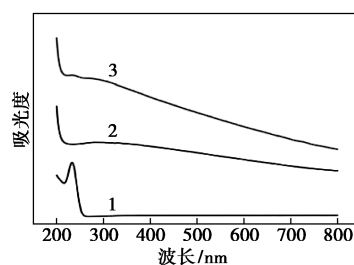


图 4 FCMC/CaCO₃ 的 N₂ 吸/脱附等温线

2.2 纳米球的载药性能评估

FCMC/CaCO₃ 装载 MET 前后试样的超声分散液稀释后,利用 UV-Vis 测得的紫外吸光度曲线如图 5 所示。由图 5 可以看出,MET 装载到 FCMC/CaCO₃ 后,溶液的紫外吸光度曲线在波长 233 nm 处有显著的药物吸收峰出现,而在空白载体上在波长 233 nm 处没有峰,表明小分子药物 MET 有效地载入到纳米粒中。



1—MET 溶液;2—FCMC/CaCO₃;3—MET@FCMC/CaCO₃

图 5 FCMC/CaCO₃ 担载 MET 前后溶液 UV-Vis 对比

MET 的包封率和载药量如表 2 所示。由表 2

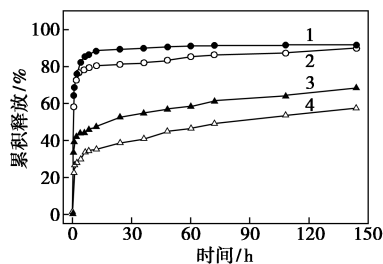
可以看出,混合纳米球的 zeta 电位均为负电位,这是由于羧甲基壳聚糖含有—COOH 基团。混合纳米球的包封率都不低于 80%,高效的 MET 加载归因于纳米球的介孔吸附性能和 CMCS 的—COO—与二甲双胍盐酸盐的—NH³⁺的静电相互作用,从而将药物载入混合纳米球。叶酸分子的疏水性在一定程度上也提高了 MET 的包封效率。

表 2 载药纳米球对 MET 的包封率和载药量

样品	Zeta 电位/mV	载药量/%	包封率/%
CMCS/CaCO ₃	-18.3±0.7	3.9±0.4	80.45±5.2
FCMC/CaCO ₃	-15.4±0.9	4.2±0.2	83.32±3.1

2.3 体外释放

不同 pH 条件下, MET 从 2 种载药纳米球中释放情况如图 6 所示。由图 6 可以看出,随释放介质 pH 的降低,药物的释放速率增加。在 FCMC/CaCO₃ 混合纳米球释放曲线中,酸性条件下 (pH 5.0) 药物释放明显加速,24 h 后超过约 81% 的药物得到释放,而在 pH 7.4 情况下仅有约 39% 的药物释放,说明酸性条件有利于纳米粒对药物进行释放,这是因为酸性条件下无机成分 CaCO₃ 的溶解度增加,有利于药物的释放,所以在低 pH 的癌细胞环境,这种载药系统更有利于实现加速癌细胞内药物交付。



1—CMCS/CaCO₃ pH 5.0; 2—FCMC/CaCO₃ pH 5.0;
3—CMCS/CaCO₃ pH 7.4; 4—FCMC/CaCO₃ pH 7.4

图 6 MET 在 CMCS/CaCO₃ 和 FCMC/CaCO₃ 中的释放曲线

3 结论

(1) 在水溶液中通过简易的方法成功制备出 FCMC/CaCO₃ 混合纳米球,平均粒径约 207 nm。

(2) FCMC/CaCO₃ 混合纳米球通过静电相互作用及介孔吸附作用对亲水性的 MET 能够有效加载,包封率达到约 83%。

(3) FCMC/CaCO₃ 混合纳米球作为亲水性药物二甲双胍的运输载体,对药物的释放具有优良的缓

控释放能力和 pH 敏感性,期望其能作为智能靶向给药系统应用于治疗和预防癌。

参考文献

- [1] Mura S, Nicolas J, Couvreur P. Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery[J]. Nature Materials, 2013, 12(11): 991-1003.
- [2] Guo Y, Zhang J, Jiang L, et al. Facile one-pot preparation of calcite mesoporous carrier for sustained and targeted drug release for cancer cells[J]. Chemical Communications, 2012, 48(86): 10636-10638.
- [3] Guo Y, Fang Q, Li H, et al. Hollow silica nanospheres coated with insoluble calcium salts for pH-responsive sustained release of anti-cancer drugs [J]. Chemical Communications, 2016, 52(70): 10652-10655.
- [4] Guo Y, Li H, Shi W, et al. Targeted delivery and pH-responsive release of doxorubicin to cancer cells using calcium carbonate/hyaluronate/glutamate mesoporous hollow spheres[J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2017, 502: 59-66.
- [5] Fonseca-Santos B, Chorilli M. An overview of carboxymethyl derivatives of chitosan: Their use as biomaterials and drug delivery systems[J]. Materials Science and Engineering: C, 2017, 77: 1349-1362.
- [6] Upadhyaya L, Singh J, Agarwal V, et al. Biomedical applications of carboxymethyl chitosans[J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 91(1): 452-466.
- [7] Vo D T, Sabrina S, Lee C K. Silver deposited carboxymethyl chitosan-grafted magnetic nanoparticles as dual action deliverable antimicrobial materials[J]. Materials Science and Engineering: C, 2017, 73: 544-551.
- [8] Zhou J, Wang J, Xu Q, et al. Folate-chitosan-gemcitabine core-shell nanoparticles targeted to pancreatic cancer[J]. Chinese Journal of Cancer Research, 2013, 25(5): 527-535.
- [9] Shen Z, Li Y, Kohama K, et al. Improved drug targeting of cancer cells by utilizing actively targetable folic acid-conjugated albumin nanospheres[J]. Pharmacological Research, 2011, 63(1): 51-58.
- [10] Yang S J, Lin F H, Tsai K C, et al. Folic acid-conjugated chitosan nanoparticles enhanced protoporphyrin IX accumulation in colorectal cancer cells[J]. Bioconjugate Chemistry, 2010, 21(4): 679-689.
- [11] Tan Y, Liu C G. Preparation and characterization of self-assembled nanoparticles based on folic acid modified carboxymethyl chitosan [J]. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2011, 22(5): 1213-1220.
- [12] Hu Z, Zheng H, Li D, et al. Self-assembled nanoparticles based on folic acid modified carboxymethyl chitosan conjugated with targeting antibody[J]. Journal of Wuhan University of Technology. Materials Science Edition, 2016, 31(2): 446-453. ■