

# 生物素化果胶纳米粒作为药物载体的研究

赵 峰, 刘举慧, 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, 山西 太原 030051)

**摘要:**合成了生物素化果胶衍生物并通过乳化超声法制备了纳米粒子;以目标药物阿霉素为研究对象,考察了不同条件下纳米粒子包封率和载药量的变化情况。通过红外光谱仪和元素分析仪对生物素化果胶粒子的化学组成及结构进行了表征;用粒度分析仪和扫描电子显微镜分析了生物素化果胶粒子的形貌和尺寸;通过紫外分光光度计确定了生物素化果胶粒子的包封率和载药量。结果表明,合成的生物素化果胶纳米粒呈现较规则的球形结构,粒度分布较均一,平均粒径为(190.2±37.0) nm,生物素取代度为37%,包封率为(84.58±0.78)%,载药量为(12.69±0.37)%。

**关键词:**果胶;生物素;阿霉素;药物载体;纳米粒

**中图分类号:** O631

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0253-4320(2018)07-0128-04

**DOI:** 10.16606/j.cnki.issn.0253-4320.2018.07.029

## Study on biotinylated pectin nanoparticles as pharmaceutical carrier

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

(College of Chemical Engineering and Technical, North University of China, National Demonstration Center for Experimental Chemical Engineering Comprehensive, Taiyuan 030051, China)

**Abstract:** In this paper, biotinylated pectin derivatives were synthesized and nanoparticles were prepared by emulsification ultrasound method. The target drug doxorubicin was selected as the research object to investigate the change of encapsulation efficiency and drug loading of the nanoparticles under different conditions and provide a basis for further study of the drug as a carrier. The chemical composition and structure of biotinylated pectin particles were confirmed by infrared spectroscopy (FTIR) and elemental analysis. The morphology and size of biotinylated pectin particles were analyzed by particle size analyzer and scanning electron microscope (SEM). The encapsulation efficiency and drug loading of biotinylated pectin particles were determined by UV spectrophotometer. The results showed that the synthesized biotinylated pectin nanoparticles showed a more regular spherical structure and the particle size distribution was more uniform. The average particle size was (190.2±37.0) nm, the biotin substitution was 37%, the encapsulation efficiency was (84.58±0.78)% and the drug loading was (12.69±0.37) wt%.

**Key words:** pectin; biotin; adriamycin; pharmaceutical carrier; nanoparticles

靶向治疗是近年来肿瘤治疗的研究热点<sup>[1]</sup>。大量研究证实,将抗癌药物包载于纳米粒中可以改变药物体内分布、代谢等特点,为选择性治疗肿瘤提供一种新的思路和方法,构建具有细胞选择性的纳米载体是提高实体瘤治疗效果的可行途径<sup>[2-3]</sup>。目前,药物载体材料主要是高分子材料,包括天然高分子材料和合成的高分子材料。其中天然高分子材料因其自身的可降解性、良好的生物相容性以及可从体内安全消除等特性受到研究者的青睐,而多糖类作为药物载体的研究一直备受关注<sup>[4]</sup>。

果胶是一种天然多糖,由于其具有无毒、生物可降解、来源广泛及成本低等特点,广泛应用于医疗行业<sup>[5-7]</sup>。更重要的是,果胶结构中富含—COOH、—OH等基团,很容易连接上不同的基团使其性质和作用发生巨大变化,生成具有生物活性的衍生物,而将靶向配体接枝到自身结构中,则会具有组织靶

向性<sup>[8]</sup>。值得一提的是,由于肿瘤细胞表面具有过度表达多种维生素的受体,加上维生素具有非免疫原性、低分子量、多种化学接枝基团,且经济、廉价易得等原因使得维生素广泛应用于靶向基团的配体研究中<sup>[9]</sup>。生物素即维生素 H (biotin),是分子质量为 244 的小分子营养物质,人体几乎所有的细胞表面都具有表达这种小分子营养物的受体;而肿瘤细胞的快速生长,需要大量营养物质,其细胞表面往往会过度表达生物素的特异受体,与正常组织和细胞相比,具有较高的生物素结合能力<sup>[10]</sup>。因此,将生物素受体作为一种特异识别的靶点,对药物载体进行生物素修饰,使其达到靶向杀死肿瘤细胞的效果。

阿霉素 (Doxorubicin, DOX) 是一种用于治疗实体肿瘤的高效广谱抗肿瘤药物<sup>[11]</sup>,但在临床应用中存在很大的副作用,如对消化道、心脏的不良反应以及骨髓抑制等。因此,研究制备具有可靶向运输、缓

收稿日期:2017-12-07;修回日期:2018-05-13

基金项目:山西省重点研发计划项目(201603D121022)

作者简介:赵峰(1994-),男,硕士研究生,研究方向为功能高分子材料,1462531784@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。

释药物和减少毒副作用的载药纳米粒子具有重要意义。

笔者以果胶和生物素为原料,通过酯化反应,合成了生物素化果胶衍生物(BIO-PEC),如图1所示。通过乳化超声法制备出了生物素化果胶纳米球(BIO-PEC-NP),利用FTIR、SEM、Zeta电位与激光粒度仪、倒置金相显微镜等测试手段对纳米粒进行了表征,并以DOX为模型药物,考察了药物的载药量、包封率及不同pH条件下DOX的释放机制。

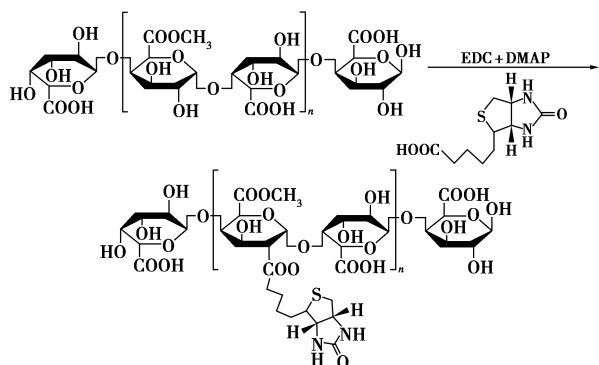


图1 生物素化果胶多糖衍生物的合成路线图

## 1 实验部分

### 1.1 实验原料

果胶,梯希爱(上海)化成工业发展有限公司生产;生物素,上海思域化工科技有限公司生产;阿霉素,上海思域化工科技有限公司生产;1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCl),分析纯,北京百灵威科技有限公司生产;4-二甲氨基吡啶(DMAP),分析纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司生产;二甲基亚砜(DMSO),分析醇,天津市光复精细化工研究所生产;其余试剂均为国产分析纯。

### 1.2 生物素化果胶衍生物(BIO-PEC)的制备

在150 mL单口烧瓶中加入50 mL无水DMSO、生物素(1 mmol)、EDC·HCl(1.2 mmol)和DMAP(0.1 mmol),室温反应2 h,然后加入不同量的果胶,继续在室温下反应数天。将反应液放入透析袋(截留分子质量为8 000~14 000)中,在2 L去离子水中透析3 d,前6 h每1 h更换1次去离子水,然后每12 h更换1次,直到透析结束。将透析袋中的溶液进行冷冻干燥,得到白色粉末状固体BIO-PEC。

### 1.3 生物素化果胶纳米粒(BIO-PEC-NP)的制备

采用乳化超声法制备BIO-PEC-NP<sup>[12]</sup>,取100 mg BIO-PEC,溶于10 mL去离子水中,配成1%的果胶溶液,备用。将2 mg双(2-乙己基)磺基丁二酸钠(AOT)溶解于4 mL油酸中,充分溶解后,在高速搅

拌下,将配制好的果胶溶液缓慢滴加300 μL,探头超声形成微乳体系,备用。取300 μL氯化钙正丙醇溶液(0.01 g/mL)分散于4 mL油酸中制成固化液,将微乳液缓慢滴加到固化液中,超声固化,离心分离。沉淀分别用50%乙醇与无水乙醇清洗、离心后,真空干燥得BIO-PEC-NP。

### 1.4 阿霉素/生物素化果胶载药纳米粒(DOX/BIO-PEC-NP)的制备及载药量、包封率测定

配制阿霉素水溶液(100 μg/mL),取10 mL,向药物溶液中加入6 mg BIO-PEC,室温振荡搅拌2 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,溶液中的药物含量即为药物损失量。以空白BIO-PEC-NP扣除背景,药物的浓度由紫外-可见分光光度计测定。测定载药量(LC)和包封率(EE),每个样品进行3个平行样测量并取平均值,用平均值±标准偏差(SD)表示。LC和EE的计算公式为:

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

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

式中: $M_1$ 为药物的投入量; $M_2$ 为药物损失量; $M_0$ 为载药微粒的总质量。

### 1.5 药物体外释放行为

将2 mg的载药纳米粒分别分散在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 $1.4 \times 10^4$  g/cm<sup>3</sup>)中并分别浸入20 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480 nm处测定吸光度,以相应的PBS溶液扣除背景,并根据相应pH的PBS溶液的标准曲线得出DOX浓度,计算DOX的累积释放量。

## 2 分析与讨论

### 2.1 BIO-PEC-NP的表征

#### 2.1.1 SEM表征结果

BIO-PEC-NP的扫描电镜图如图2所示。

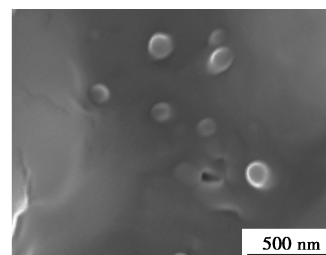
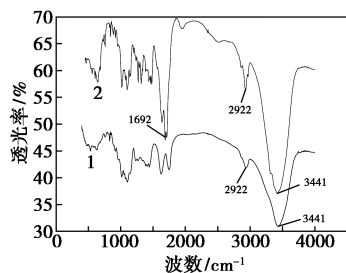


图2 BIO-PEC-NP扫描电镜图

从图 2 中可以看出,制备的纳米粒子的粒径在 200 nm 左右,形态近似球形,大小较均一。

### 2.1.2 FTIR 的表征结果

生物素化果胶多糖衍生物的合成是通过酯化反应进行合成,如图 1 所示。以 EDC 作脱水剂和耦合剂,DMAP 为催化剂,将生物素连接到果胶多糖上合成生物素化果胶多糖衍生物。以果胶多糖为对照,衍生物的红外光谱图如图 3 所示。



1—PEC;2—BIO-PEC

图 3 果胶多糖及生物素化果胶多糖衍生物的 FT-IR 图谱

从图 3 中可以看出,果胶多糖由于有较多的羟基,在  $3441\text{ cm}^{-1}$  左右处有较强的伸缩振动吸收峰, N—H 伸缩振动峰在此处也有较强的吸收,故将生物素接枝到果胶多糖后,所得到的衍生物在此处呈现出 O—H 及 N—H 伸缩振动峰的叠加而使其明显增强。且随着取代度的增加即羟基的酯化, O—H 处的宽峰变窄,  $2922\text{ cm}^{-1}$  左右处的 —CH 伸缩振动峰和  $1692\text{ cm}^{-1}$  处的 C=O 伸缩振动峰经酯化反应后得到加强,说明有酯键形成,即生物素与果胶多糖已发生酯化反应。

### 2.1.3 元素分析表征结果

元素分析仪可对有机物中的 C、H、N、S 元素的质量分数进行定量分析。由于果胶分子中不含有硫,而生物素分子中含有硫元素,所以可通过测定 BIO-PEC-NP 中 S 的质量分数,间接测定产物中生物素的质量分数。

生物素化果胶多糖衍生物中生物素的取代度 (degree of substitution) 定义为:每 100 个无水葡萄糖残基 (anhydroglucose) 上偶联生物素的个数<sup>[13]</sup>。因为只有生物素中含有硫元素,所以通过元素分析仪测定出产物中含有硫元素的质量分数,以此测定生物素的取代度,具体计算式为:

$$DS = (\text{S 物质的量} / \text{A 物质的量}) \times 100\%$$

测试结果如表 1 所示。经计算,BIO-PEC 粒子中生物素的取代度为 37%。

表 1 果胶和生物素化果胶多糖衍生物中硫元素质量分数

名称	果胶(原料)	生物素化果胶多糖(产物)
称重/mg	2.39/2.35	2.23/2.33
w(C)元素/%	38.04/40.08	43.17/42.84
w(H)元素/%	5.49/5.84	6.70/6.66
w(N)元素/%	0.62/0.62	6.19/6.45
w(S)元素/%	0.84/0.88	4.72/4.78

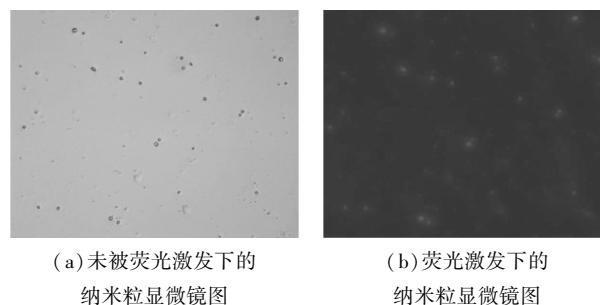
## 2.2 微球的载药性能评估

阿霉素在 480 nm 紫外检测下,以各阿霉素溶液质量浓度 (5 ~ 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 为 X 轴,对应吸光度为 Y 轴,进行线性回归,得标准曲线。求得线性回归方程为  $Y = 0.0195X + 0.0184$ , 相关系数  $R^2 = 0.9992$ 。由此测定纳米粒中阿霉素的包封率和载药量。以微球的包封率为优化标准,经过单因素实验发现,当加入 6 mg 纳米粒子,阿霉素药物质量浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,微球的包封率最大,其包封率为 84.58%,载药量为 12.69%,见表 2。

表 2 PEC-NP、BIO-PEC-NP 与 DOX-BIO-PEC-NP 的粒径、电位、包封率及载药量 ( $\bar{X} \pm SD, n=3$ )

样品	PEC-NP	BIO-PEC-NP	DOX-BIO-PEC-NP
粒径/nm	235 $\pm$ 3.35	284 $\pm$ 2.86	323 $\pm$ 3.58
PDI	0.11 $\pm$ 0.009	0.19 $\pm$ 0.016	0.23 $\pm$ 0.015
电位/mV	-30.74 $\pm$ 1.32	-22.13 $\pm$ 1.96	-17.45 $\pm$ 2.31
包封率/%	—	—	84.58 $\pm$ 0.78
载药量/%	—	—	12.69 $\pm$ 0.37

用荧光电镜观察载药粒子的载药情况,如图 4 所示。将干燥的粒子于蒸馏水中分散后在荧光电镜下观察,当绿光激发粒子后,粒子发出红色的荧光。证明了阿霉素很好地装载于生物素化果胶纳米粒中。



(a) 未被荧光激发下的  
纳米粒显微镜图

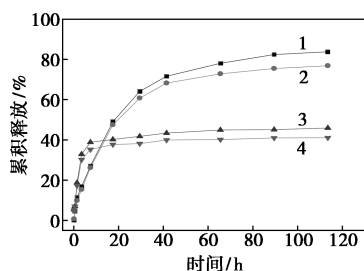
(b) 荧光激发下的  
纳米粒显微镜图

图 4 DOX-BIO-PEC-NP 的荧光显微镜图片

## 2.3 体外释放

在 pH 5.0 和 pH 7.4 下,载药微球释放阿霉素

的释药情况如图5所示。由图5可以看出,随着溶液pH的降低,药物的释放率减小。这是由于溶液酸性的增强,提高了果胶的凝胶性,这会降低水分子的渗入,从而降低了包裹在果胶层中药物的溶解速度,进而药物不易释放出来。所以,在近似中性条件下,更有利于药物的释放。从图5中还可以看出,在pH 7.4条件下,药物持续释放,在80 h内,药物释放了近80%,这对于药物的缓释、持续给药具有重大的意义。



1—PEC-NP pH 7.4;2—BIO-PEC-NP pH 7.4;  
3—PEC-NP pH 5.0;4—BIO-PEC-NP pH 5.0

图5 DOX在PEC-NP和BIO-PEC-NP中的  
释放曲线

### 3 结论

通过酯化反应合成了生物素化果胶衍生物,并通过乳化超声法成功制备了生物素化果胶纳米球,其大小均一,分散性良好。选取阿霉素为目标药物,通过静电相互作用对阿霉素进行有效装载,其包封率能达到约84%。通过对载药纳米球体外释放药物的研究发现,其具有优良的缓控释放能力和pH敏感性,期望能作为靶向药物载体应用于肿瘤的治疗中。

### 参考文献

- [1] Fischer S, Allmen U V, Ying W M, *et al.* The preservation of phenotype and functionality of dendritic cells upon phagocytosis of polyelectrolyte-coated PLGA microparticles [J]. *Biomaterials*, 2007, 28(6): 994-1004.
- [2] Tong D, Jia Y, Li H, *et al.* Synthesis and characterization of thermo and pH-sensitive block copolymers bearing a biotin group at the poly(ethylene oxide) chain end [J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 2010, 102(4): 3552-3558.
- [3] Gonçalves C, Pereira P, Gama M. Self-assembled hydrogel nanoparticles for drug delivery applications [J]. *Materials*, 2010, 3(2): 1420-1460.
- [4] 王苗苗. 生物素化胆甾醇基普鲁兰糖的合成设计及作为药物纳米载体初步安全性评价[D]. 保定: 河北大学, 2014.
- [5] Yu C Y, Cao H, Zhang X C, *et al.* Hybrid nanospheres and vesicles based on pectin as drug carriers [J]. *Langmuir the Acs Journal of Surfaces & Colloids*, 2009, 25(19): 11720-11726.
- [6] Bigucci F, Luppi B, Monaco L, *et al.* Pectin-based microspheres for colon-specific delivery of vancomycin [J]. *Journal of Pharmacy & Pharmacology*, 2009, 61(1): 41-46.
- [7] Paharia A, Yadav A K, Rai G, *et al.* Eudragit-coated pectin microspheres of 5-fluorouracil for colon targeting [J]. *Aaps Pharmscitech*, 2007, 8(1): E87-E93.
- [8] 陈红丽, 唐红波, 杨文智, 等. 生物素化壳聚糖修饰的PLGA纳米粒的制备及表征 [J]. *高等学校化学学报*, 2010, 31(8): 1682-1687.
- [9] Lee E S, Gao Z, Kim D, *et al.* Super pH-sensitive multifunctional polymeric micelle for tumor pH(e) specific TAT exposure and multidrug resistance [J]. *Journal of Controlled Release*, 2008, 129(3): 228-236.
- [10] Russell-Jones G, Mctavish K, Mcewan J, *et al.* Vitamin-mediated targeting as a potential mechanism to increase drug uptake by tumours [J]. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2004, 98(10): 1625-1633.
- [11] 刘晓, 邵方元, 陈宏远. 阿霉素抗肿瘤分子机制的研究进展 [J]. *中国医药生物技术*, 2012, 7(5): 373-375.
- [12] Nesamony J, Singh P R, Nada S E, *et al.* Calcium alginate nanoparticles synthesized through a novel interfacial cross-linking method as a potential protein drug delivery system [J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2012, 101(6): 2177-2184.
- [13] Kim J H, Li Y, Kim M S, *et al.* Synthesis and evaluation of biotin-conjugated pH-responsive polymeric micelles as drug carriers [J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2012, 427(2): 435-442.
- [14] Liu H F, Chang J, Zhang S N, *et al.* Preparation and release study of anticancer drug loaded PLA-Gelatin nanospheres [J]. *Chinese Journal of Biomedical Engineering*, 2003, 22(2): 178-183.
- [15] Vetricka D, Hruby M, Hovorka O, *et al.* Biological evaluation of polymeric micelles with covalently bound doxorubicin [J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2009, 20(11): 2090-2097.
- [16] Mocanu G, Nichifor M, Picton L, *et al.* Preparation and characterization of anionic pullulan thermoosociative nanoparticles for drug delivery [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 111(20): 892-900.
- [17] Yan H, Jin B, Gao S, *et al.* Equilibrium swelling and electrochemistry of polyampholytic pH-sensitive hydrogel [J]. *International Journal of Solids & Structures*, 2014, 51(23-24): 4149-4156.
- [18] Guo H, Liu Y, Wang Y, *et al.* pH-sensitive pullula-n-based nanoparticle carrier for adriamycin to overcome drug-resistance of cancer cells [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 111(20): 908-917.
- [19] Jeong Y I, Na H S, Oh J S, *et al.* Adriamycin release from self-assembling nanospheres of poly(DL-lactide-co-glycolide)-grafted pullulan [J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2006, 322(1-2): 154-160.
- [20] Steichen S D, Caldoreramoore M, Peppas N A. A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics [J]. *European Journal of Pharmaceutical Sciences Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 2013, 48(3): 416-427.
- [21] Chittasupho C, Jaturanpinyo M, Mangmool S. Pectin nanoparticle enhances cytotoxicity of methotrexate against HepG2 cells [J]. *Drug Delivery*, 2013, 20(1): 1-9. ■