

# 纳米金修饰羧甲基壳聚糖封堵介孔二氧化硅载药系统的研究

单晓庆, 周璐, 张亚杰, 刘建玲, 马勇\*

(中国医科大学公共基础学院, 辽宁沈阳110122)

**摘要:**利用纳米金的光热性能及与羧甲基壳聚糖的静电吸附作用,制备了以介孔二氧化硅为载体、纳米金修饰的羧甲基壳聚糖为封堵材料的具有pH及激光响应的药物传递系统。并对激光输出功率、溶液pH、纳米金用量等条件进行优化。通过傅里叶红外光谱法、紫外-可见光谱法、透射电子显微镜等方法对合成的样品进行表征,在最优条件下检测荧光强度并确定药物释放情况。结果表明,该载药系统对药物释放有较好的pH敏感性和激光响应,在智能给药方面有良好的应用前景。

**关键词:**羧甲基壳聚糖;介孔二氧化硅;盐酸阿霉素;pH敏感性

中图分类号:O636.1+1;R979.1+4

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2020)09-0106-05

DOI:10.16606/j.cnki.issn.0253-4320.2020.09.022

## Gold nanoparticles modified carboxymethyl chitosan for blocking mesoporous silica drug delivery system

SHAN Xiao-qing, ZHOU Lu, ZHANG Ya-jie, LIU Jian-ling, MA Yong\*

(School of Fundamental Sciences, China Medical University, Shenyang 110122, China)

**Abstract:** By means of the photo-thermal properties of gold nanoparticles and the electrostatic adsorption ability of carboxymethyl chitosan, a drug delivery system, which can response to pH and laser is prepared with mesoporous silica as the carrier and gold nanoparticles-modified carboxymethyl chitosan as the blocking material. The laser output power, pH value of solution, dosage of gold nanoparticles and other conditions are optimized. Fourier infrared spectroscopy, UV-Vis spectroscopy, transmission electron microscopy and other measurements are used to characterize the samples. Under the optimal conditions, the fluorescence intensity of the samples are detected and the release of drugs by the samples is also determined. The results show that this drug delivery system has a good sensitivity to pH and a good response to laser during drug release, and has a good application prospect in intelligent drug delivery.

**Key words:** carboxymethyl chitosan; mesoporous silica; adriamycin hydrochloride; pH sensibility

癌症的治疗是目前人类健康生活亟需解决的重要难题。化疗虽是治愈癌症的重要方法之一,但其具有特异性差、多药耐药性和毒副作用大等缺陷<sup>[1]</sup>。为减少这种伤害,具有纳米级、特异性、生物相容性好、载药量大、副作用小等优点的载药系统应运而生<sup>[2]</sup>。目前这些纳米载药系统也面临着结构、工艺复杂等难题,难以同时满足“安全、有效和质量可控”的三原则,实现纳米递释系统从实验室研究向临床转化<sup>[3]</sup>。

介孔二氧化硅具有比表面积大、孔径可调、生物相容性好等优点常用作新型药物载体<sup>[4-5]</sup>,但其表面封堵也成为要解决的难题。羧甲基壳聚糖是一种有良好的降解性、水溶性的壳聚糖衍生物<sup>[6-7]</sup>,可通过静电吸附作用结合高光热转换率的光热探针纳米

金球<sup>[8-9]</sup>。又因其分子链上含有阳离子( $-\text{NH}_3^+$ )和阴离子( $-\text{COO}^-$ )基团的两性聚电解质的特点,可对外界的pH刺激作出响应。用纳米金修饰的羧甲基壳聚糖为封堵材料,可使载药系统拥有pH及激光双重响应,形成效率可控的理想的治疗体系,同时避免了由于肿瘤异质性及单一疗法造成的多药耐药性<sup>[10]</sup>。笔者以盐酸阿霉素为模型药物,对载药系统的载药率及药物释放条件进行研究分析。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与设备

H-7650透射电子显微镜,日本Hitachi公司生产;F-280型荧光分光光度计,中国天津港东科技公

收稿日期:2019-11-15;修回日期:2020-07-04

基金项目:国家自然科学基金(21372262)

作者简介:单晓庆(1995-),女,硕士研究生,研究方向为生物功能材料的合成,1445687917@qq.com;马勇(1964-),男,博士,教授,研究方向为生物功能材料的合成,通讯联系人,yma10@cmu.edu.cn。

公司生产;UV-4802型紫外分光光度计,美国UNICO公司生产;S-One红外光谱仪,美国Perkin Elmer公司生产;MDL-H-808型固体激光发射器,中国长春新产业光电技术公司生产;Zetasizer Nano仪器,马尔文仪器有限公司生产。

## 1.2 试剂与材料

羧甲基壳聚糖(CMCS)、(3-氨基丙基)三乙氧基硅烷(APTES)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)、*N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS),沈阳莱博科贸有限公司生产;MCM-41型介孔二氧化硅,南京先丰纳米公司生产;盐酸阿霉素(DOX),上海阿拉丁公司生产;四氯金酸与柠檬酸钠,北京百灵威科技公司生产。其余试剂均为分析纯,实验用水均为超纯水(电阻率为 $18.5 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ )。

## 2 实验方法

### 2.1 载药体系的构建

采用接枝后的方法对介孔二氧化硅(简记为MS)进行少量改性合成氨基功能化介孔二氧化硅( $\text{MS-NH}_2$ )<sup>[11]</sup>。称取1 g MCM-41溶于50 mL无水甲苯中,并震荡滴加1 mL(3-氨基丙基)三乙氧基硅烷(APTES),在室温下连续搅拌反应6 h后,41℃下减压旋转蒸发至液面保持不变且不再有液体蒸出。产物分别经醇洗和水洗3次,离心后干燥过夜,即得 $\text{MS-NH}_2$ 。

### 2.2 盐酸阿霉素(DOX)的封装

#### 2.2.1 $\text{MS-NH}_2$ 装载 DOX

取30 mg  $\text{MS-NH}_2$ 溶于0.5 mg/mL(10 mL)的DOX水溶液中,避光震荡反应24 h。

#### 2.2.2 活化羧甲基壳聚糖(CMCS)中的羧基

精密称量10 mg CMCS溶于10 mL水中,并称取25 mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)和15 mg *N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS)添加至羧甲基壳聚糖溶液中,连续搅拌6 h活化羧基。

#### 2.2.3 纳米金(AuNPs)的制备

采用经典的柠檬酸钠还原法制备纳米金<sup>[12]</sup>。将0.1 g/L氯金酸溶液32 mL在磁力搅拌下加热至沸腾,加入10 g/L柠檬酸钠溶液0.64 mL继续加热直到溶液颜色变为稳定的橙红色,停止加热,继续搅拌缓冷至室温。

#### 2.2.4 羧甲基壳聚糖封堵介孔二氧化硅(MCM-CMCS)

将活化羧基的CMCS与 $\text{MS-NH}_2$ 溶液充分混合,连续震荡反应24 h,离心去除上清液,并洗涤后干燥6 h,得到合成固体样品 $\text{MS-CMCS}$ 。通过荧光分光光度计检测上清液及洗液中盐酸阿霉素的质量为 $M_1$ ,干燥后固体样品质量为 $M$ 。通过载药量公式:载药率= $[(M_{\text{DOX}}-M_1)/M] \times 100\%$ 即可计算固体样品的载药率。

#### 2.2.5 纳米金修饰的羧甲基壳聚糖封堵介孔二氧化硅(MCM-CMCS-Au)

将活化羧基的CMCS与 $\text{MS-NH}_2$ 溶液充分混合,连续震荡反应4 h后,加入10 mL AuNPs溶液,继续震荡反应20 h,离心去除上清液,洗涤后干燥6 h,得到合成固体样品 $\text{MS-CMCS-Au}$ 。检测上清液及洗液中盐酸阿霉素的质量,计算DOX的载药率。

### 2.3 载体与载药体系理化表征

利用傅里叶红外分光光谱法(FI-TR)在 $400 \sim 4000 \text{ cm}^{-1}$ 波数范围内检测MS、CMCS、 $\text{MS-NH}_2$ 、 $\text{MS-CMCS}$ 红外谱图;在 $300 \sim 700 \text{ nm}$ 范围内利用紫外-可见分光光度计(UV-Vis)检测合成的AuNPs、CMCS及纳米金修饰的羧甲基壳聚糖(CMCS-Au)的吸收光谱。测量AuNPs、CMCS及 $\text{MS-CMCS-Au}$ 的表面电位。利用透射电子显微镜(TEM)观察MS、 $\text{MS-CMCS}$ 的形态及介孔结构,加速电压为80 kV。

### 2.4 体外释放试验

#### 2.4.1 pH及激光响应释放实验

在pH分别为7.4、6.5、5的磷酸盐缓冲液(PBS)中考察 $\text{MS-DOX}$ 、 $\text{MS-CMCS-Au}$ 的释放行为。通过计算取约0.5 mg DOX的固体样品溶解在1 mL的不同pH(7.4、6.5、5)的PBS缓冲溶液中,并在808 nm近红外激光照射下分别进行连续搅拌和静置释放2组实验<sup>[13-14]</sup>。通过荧光分光光度计检测上清液中DOX的质量,直至上清液中DOX的荧光强度无明显变化。

#### 2.4.2 DOX标准曲线的制定及条件优化

通过倍比稀释法制DOX在超纯水、pH(5、6.5、7.4)PBS溶液中的标准曲线。

为确定合成载药系统时AuNPs用量对药物释放的影响,分别以5、10、15 mL AuNPs修饰的CMCS合成含不同体积AuNPs的目标载药系统,固定激光

输出功率为 4 W, 比较在激光及搅拌条件下, pH 为 5 的 PBS 缓冲溶液中药物的释放情况。选取最适用量的 AuNPs 合成目标载药系统, 分别固定激光的输出功率为 4、3、2、1 W, 在连续搅拌及激光照射下, 探究最适的输出功率。

### 3 结果与讨论

#### 3.1 样品表征

MS-CMCS-Au 载药系统制备过程的示意图如图 1 所示。

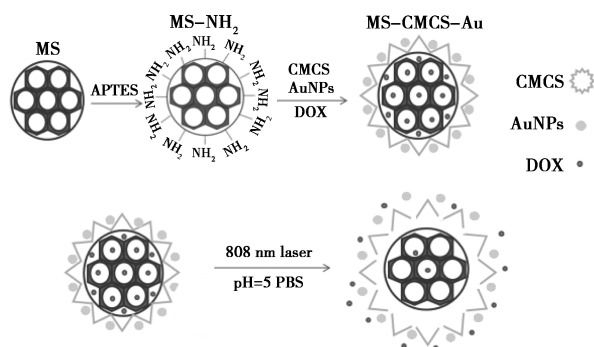
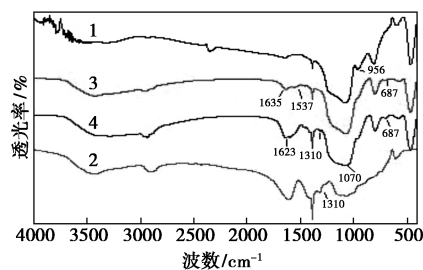


图 1 MS-CMCS-Au 载药系统的实验原理

##### 3.1.1 FT-IR 的表征结果

MS、CMCS、MS-NH<sub>2</sub>、MS-CMCS 的红外光谱图如图 2 所示。由图 2 中可以看出, MS 在 956 cm<sup>-1</sup> 处有明显的硅羟基特征峰, 表明 MS 表面富含硅羟基。采用 APTES 硅烷化修饰后得到 MS-NH<sub>2</sub> 在 1 635 cm<sup>-1</sup> 和 1 537 cm<sup>-1</sup> 处存在氨基的拉伸振动峰和弯曲振动峰<sup>[6]</sup>, 在 687 cm<sup>-1</sup> 出现 N-H 摇摆振动峰, 同时硅羟基特征峰消失, 表明-NH<sub>2</sub> 成功地接枝在 MS 的表面。经 CMCS 修饰后, CMCS 在 1 310 cm<sup>-1</sup> 处的特征峰出现在 MS-CMCS 中, 并在 1 623 cm<sup>-1</sup> 处出现明显的酰胺键特征峰, 表明 MS-NH<sub>2</sub> 的氨基与 CMCS 的羧基已成功反应形成酰胺键, MS-CMCS 载药系统已成功制备。



1—MS; 2—CMCS; 3—MS-NH<sub>2</sub>; 4—MS-CMCS

图 2 MS、CMCS、MS-NH<sub>2</sub>、MS-CMCS 的红外光谱图

##### 3.1.2 Zeta 电位表征结果

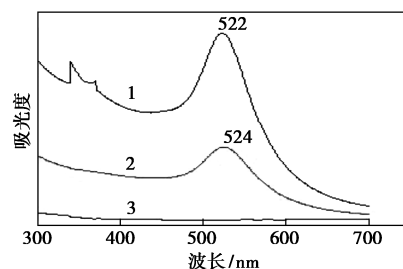
为确定纳米金能通过静电吸附作用成功修饰在羧甲基壳聚糖表面, 进行了 Zeta 电位检测。CMCS、AuNPs、MS-CMCS-Au 的 Zeta 电位测量结果如表 1 所示。由表 1 可看出, 羧甲基壳聚糖由于质子化 (CMCS(NH<sub>3</sub><sup>+</sup>)) 带正电, 而纳米金胶粒带负电, 二者通过静电作用结合后, 使载药系统表面电位发生变化, 接近于零。

表 1 CMCS、AuNPs、MS-CMCS-Au Zeta 电位测量结果

样品	Zeta 电位/mV
CMCS	-31.78±0.9, 78.36±2.1
AuNPs	-40.58±1.7
MS-CMCS-Au	-4.651±0.2

##### 3.1.3 UV-Vis 的表征结果

AuNPs、CMCS 及 CMCS-Au 的 UV-Vis 光谱图如图 3 所示。由图 3 中可以看出, AuNPs 的最大吸收峰在 522 nm 处, CMCS 在该波长范围无明显特征峰, 而 CMCS-Au 在 524 nm 处出现明显的吸收峰, 相较于 AuNPs 的最大吸收峰发生了红移<sup>[8]</sup>, 进一步表明, 纳米金成功修饰在羧甲基壳聚糖表面。

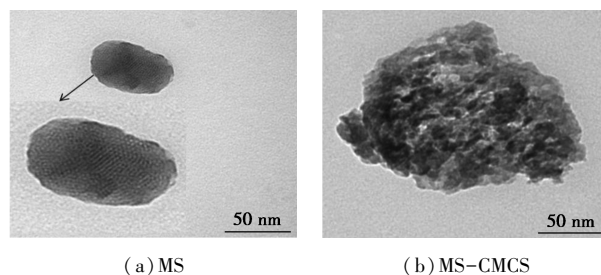


1—AuNPs; 2—CMCS-Au; 3—CMCS

图 3 AuNPs、CMCS-Au、CMCS 的 UV-Vis 光谱

##### 3.1.4 TEM 表征结果

介孔二氧化硅封堵前后的形态及结构如图 4 所示。从图 4 中可以看出, MS-CMCS 的表面有明显的絮状物存在, 有序介孔被覆盖。



(a) MS

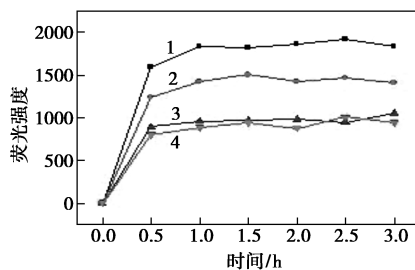
(b) MS-CMCS

图 4 MS、MS-CMCS 的透射电镜图

### 3.2 载药与体外释放率

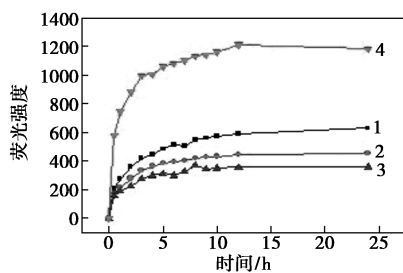
经荧光分光光度计测定和载药量公式计算 MS-CMCS-Au 的载药率为  $(19.89 \pm 0.748)\%$  [15]。

在不同 pH (5、6.5、7.4) 的 PBS 缓冲溶液中进行体外静置释放实验,结果如图 5 所示。由图 5(c) 中可以看出,MS 直接用于载药,表面没有封堵时,pH 对药物释放无明显影响。由图 5(b) 可以看出,合成的目标载药系统的药物释放缓慢,可明显观察到载药系统具有 pH 敏感性,且药物释放率随 pH 的降低而提高。在 pH = 5 时,药物释放率最高,12 h 后药物累计释放量达到最高。这是由于在酸性条件下,溶液中存在大量质子,CMCS 表面的  $\text{NH}_3^+$  静电相



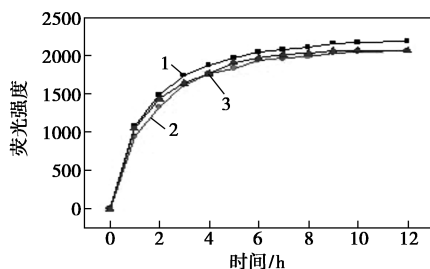
1—pH=5、激光照射下释放药物;2—pH=5、无激光照射下释放药物;3—pH=6.5、无激光照射下释放药物;  
4—pH=7.4、无激光照射下释放药物

(a) MS-CMCS-Au 在不同 pH 的 PBS 缓冲溶液中连续搅拌释放实验



1—pH=5、激光照射下释放药物;2—pH=5、无激光照射下释放药物;3—pH=6.5、无激光照射下释放药物;  
4—pH=7.4、无激光照射下释放药物

(b) MS-CMCS-Au 在不同 pH 的 PBS 缓冲溶液中静置释放实验



1—pH=5;2—pH=6.5;3—pH=7.4

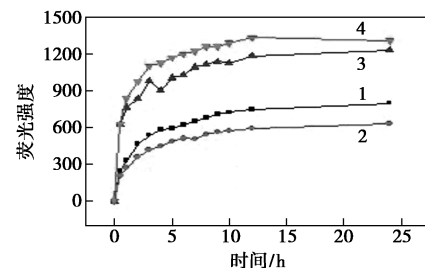
(c) MS-DOX 在不同 pH 的 PBS 缓冲溶液中静置释放实验

图 5 载药系统中药物的体外释放效果图

斥,聚合物链伸长,以致部分酰胺键断裂,加速药物释放。在此环境下,同时用近红外 808 nm 激光、固定输出功率为 4 W 照射时,由于体系内局部温度迅速升高,药物释放速率及累计释放量均有明显提高 [16]。由图 5(a) 可以看出,当在不同 pH 的 PBS 缓冲溶液连续搅拌释放时,载药系统药物释放时间明显缩短,可知搅拌能明显提高药物释放速率。

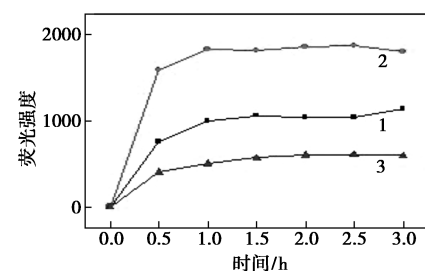
### 3.3 控释条件优化

为确定 AuNPs 存在的作用及检测条件,在 pH = 5 的 PBS 缓冲溶液中进行体外释放的平行对照实验检测,结果如图 6 所示。由图 6(a) 中可以看出,在没有激光照射下静置释放时,MS-CMCS 的药物释放率及药物累计释放量明显高于 MS-CMCS-Au,说明在没有激光照射时 AuNPs 的存在会阻碍药物释



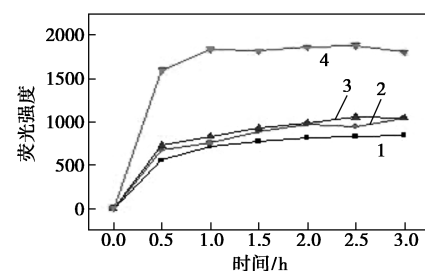
1—MS-CMCS、无激光照射;2—MS-CMCS-Au、无激光照射;  
3—MS-CMCS、激光照射;4—MS-CMCS-Au、激光照射

(a) AuNPs 存在对载药系统静置释放药物的影响



1—5 mL、激光照射、搅拌释放;2—10 mL、激光照射、搅拌释放;  
3—15 mL、激光照射、搅拌释放

(b) AuNPs 用量对载药系统搅拌释放药物的影响



1—1 W、激光照射、搅拌释放;2—2 W、激光照射、搅拌释放;  
3—3 W、激光照射、搅拌释放;4—4 W、激光照射、搅拌释放

(c) 激光输出功率对载药系统药物释放的影响

图 6 优化条件对载药系统的影响

放。固定激光输出功率为 4 W, 并进行体外照射释放实验时, MS-CMCS-Au 的药物释放率及药物累计释放量明显高于 MS-CMCS。表明 AuNPs 的存在对载药系统的近红外激光响应及药物释放有明显优势, 可帮助载药系统达到响应释放。为考察 AuNPs 的用量对载药系统造成的影响, 合成了含不同用量 AuNPs 的目标载药系统, 并在 pH=5 的 PBS 缓冲溶液中连续搅拌, 在输出功率为 4 W 的激光照射下进行体外释放实验。由图 6(b) 中可知, 当 AuNPs 的用量为 10 mL 时, 药物累计释放量及释放速率最高, 制得的目标载药系统效果最好。为探究最适的激光照射功率, 选取 AuNPs 用量为 10 mL 的载药系统, 在 pH 为 5 的 PBS 缓冲溶液中, 设置不同的激光输出功率进行药物释放实验。由图 6(c) 中可以看出, 增大激光功率能提高药物释放率。

#### 4 结论

利用 MCM-41 型介孔二氧化硅和 CMCS-Au 设计了化疗与光热联合治疗的载药系统。CMCS-Au 作为封堵材料有 pH 及激光响应效果, 可有效控制药物的释放速率及释放环境, 可减少药物在非目标场所释放造成不必要的损伤。不同 pH 的 PBS 缓冲溶液体外释放实验表明, 在中性 pH 条件下, 释放相对缓慢且有限, 随着 pH 的降低, 释放速率快速增加且累计释放量也明显增加, 表明 pH 触发的 DOX 释放是成功的。在近红外 808 nm 激光照射下, AuNPs 的存在使载药系统获得良好的光热响应, 可明显加速药物释放, 提高累计释放量。与其他载药系统相比, 该方法设计的载药系统合成过程操作简单, 有良好的 pH 敏感性, 可以有效的将化疗与光热治疗结合起来, 具有良好的应用前景。

#### 参考文献

- [1] 王亚婷, 张振华, 蒯萌, 等. 基于中空介孔硫化铜的多功能纳米递药系统的构建及初步研究[J]. 药学学报, 2019, 54(8): 1502-1508.
- [2] 王镀锌, 魏莉平, 汪宏良. 乳糖酸修饰的介孔二氧化硅纳米粒子靶向肝癌研究[J]. 现代肿瘤医学, 2019, 29(19): 3403-3409.
- [3] 于海军, 王当歌, 李亚平, 等. 纳米技术在抗肿瘤药物靶向递释系统中的应用研究进展[J]. 科技导报, 2018, 36(22): 108-117.
- [4] Zhou Yixian, *et al.* Mesoporous silica nanoparticles for drug and gene delivery[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2018, 8(2): 165-177.
- [5] Zhang Yang, Xu Juan. Mesoporous silica nanoparticle-based intelligent drug delivery system for bienzyme-responsive tumour targeting and controlled release[J]. *R Soc Open Sci*, 2018, 5(1): 170986.
- [6] Xu Chunli, Cao Lidong, Huang Qiliang, *et al.* Emulsion-based synchronous pesticide encapsulation and surface modification of mesoporous silica nanoparticles with carboxymethyl chitosan for controlled azoxystrobin release[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2018, 348: 244-254.
- [7] 刘举慧, 赵峰, 郭建峰. pH 敏感性叶酸修饰羧甲基壳聚糖/CaCO<sub>3</sub> 混合纳米球作为药物载体的研究[J]. 现代化工, 2018, 38(4): 135-138.
- [8] Huang Haizhen, Yang Xiurong, *et al.* Chitosan mediated assembly of gold nanoparticles multilayer[J]. *Colloids and Surfaces A: Physicochem Eng Aspects*, 2003, 226: 77-86.
- [9] 刘仕杰, 张瑞平. 无机近红外吸光纳米材料在肿瘤成像和治疗中的研究进展[J]. 中国药物与临床, 2019, 18(3): 393-396.
- [10] 李璟, 彭倩, 杨凡, 等. pH 和近红外光双响应的包裹二硫化钼纳米片和阿霉素的金属-有机框架 ZIF-8 用于肿瘤化学/光热协同治疗[J]. 激光生物学报, 2019, 28(5): 421-430.
- [11] Nahla Rahoui, Bo Jiang, Mohammad Hegazy, *et al.* Gold modified polydopamine coated mesoporous silica nano-structures for synergistic chemo-photothermal effect[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2018, 171: 176-185.
- [12] Xiong Zhijuan, Shen Mingwu, Shi Xiangyang. Dendrimer-based strategies for cancer therapy: Recent advances and future perspectives[J]. *Sci China Mater*, 2018, 61(11): 1387-1403.
- [13] Hikosaka R, Nagata F, Tomita M, *et al.* Adsorption and desorption characteristics of DNA onto the surface of amino functional mesoporous silica with various particle morphologies[J]. *Colloid Surface B*, 2016, 140: 262-268.
- [14] 蒋思文, 朱根松, 李剑锋, 等. 不同粒径、超均匀球形金纳米粒子合成及其表面增强拉曼散射效应研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2016, 36(1): 99-103.
- [15] Wang Yifeng, Yuan Yuan, Liu Changsheng, *et al.* Charge-reversal APTES-modified mesoporous silica nanoparticles with high drug loading and release controllability[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, 8: 17166-17175.
- [16] Hai Yang, Lu Gan, Yang Xiangliang, *et al.* Polyaspartic acid-anchored mesoporous silica nanoparticles for pH-responsive doxorubicin release[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2018, 13: 1029-1040. ■

欢迎订阅《现代化工》杂志, 邮发代号 82—67。