

## 科研与开发

# 壳聚糖烷基化改性及其纳米微球负载扑热息痛的研究

代 昭 孙多先 郭 瑶

(天津大学化工学院, 天津 300072)

**摘要:**将低分子量壳聚糖经长链烷基在碱性条件下改性制得烷基化壳聚糖衍生物, 红外光谱研究表明取代反应主要发生在壳聚糖的氨基上, 透射电镜研究表明该衍生物在水中可自动形成粒径分布在 100 nm 左右的纳米微粒。以扑热息痛为模型药物, 对烷基壳聚糖纳米微球在磷酸缓冲液(pH = 7.4)中体外释放的研究表明, 在取代度接近的情况下, 随着烷基链的增长, 扑热息痛在磷酸缓冲液中的缓释作用得到改善, 累积达到平衡时的浓度降低。

**关键词:**壳聚糖; 纳米微球; 扑热息痛; 给药体系

中图分类号: TQ460.6

文献标识码: A

## Study on preparation of cetyl chitosan nanoparticles as paracetamol carrier

DAI Zhao, SUN Duo-xian, GUO Yao

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

**Abstract:** Alkyl-chitosan was prepared from chitosan (CS) and alkyl halide under alkaline condition. The infrared (IR) spectra reveal that there is a substitution reaction mainly on the amine groups in CS. TEM shows that this alkyl-chitosan is water-soluble and spontaneously forms nanoparticles with diameter of about 100 nm. The release of paracetamol (used as model drug carried by alkyl-chitosan) was studied in phosphoric acid buffer solution at pH 7.4, and results show that release rate is adjustable by changing the carbon chain length of substitution on CS; the longer the carbon chain is, the slower the release rate is.

**Key words:** chitosan; nanoparticles; paracetamol; drug delivery system

壳聚糖, 即(1,4)-2-氨基-2-脱氧- $\beta$ -D-葡聚糖, 具有良好的生物相容性以及可降解性, 因此近年来逐渐成为生物医学工程以及药物载体等领域研究较多的材料之一, 尤其是在药物的控释、缓释、靶向以及智能释药系统中的应用受到了广泛的关注<sup>[1]</sup>。纳米微球由于其具有靶向给药以及降低药物的毒副作用等优点, 成为目前药剂学研究的热点之一<sup>[2]</sup>。目前壳聚糖纳米微球可用于某些水溶性药物给药体系(如核酸<sup>[3]</sup>、蛋白质<sup>[4]</sup>等), 所采用的方法基本上是限于 PEG 改性或者共混壳聚糖的报道, PEG 的添加使壳聚糖微球具有所谓半互穿网络结构(semi-interpenetration networks), 但很难用作油溶性药物载体。

为了解决上述问题, 笔者采用将壳聚糖长链烷基取代改性的方法, 制备了拥有两亲结构的壳聚糖

烷基衍生物, 期待长链烷基的疏水作用能促使烷基壳聚糖链在水中能发生自凝聚形成纳米微球, 并同时提高体系对于油溶性药物的负载性能。

## 1 实验部分

### 1.1 原料与仪器

壳聚糖, 脱乙酰化度 90%,  $\overline{M}_n = 8\ 500$ , 山东海得贝公司; 透析袋 LS6227, D27 mm, 截留分子量 6 000 ~ 8 000, TBD 生物发展有限公司; 扑热息痛, 纯度 99%, 天津大学精细化工教研室合成; 氯代十六烷, 化学纯, 上海医药公司; 氯代十二烷, 化学纯, 上海化学试剂三厂; 溴代正辛烷, 化学纯, 军事医学科学院药材供应站; 溴代正丁烷, 分析纯, 常州市光明生物化学研究所; 其余试剂均为分析纯。

Elementar Vario EL 元素分析仪; BIO-BAD EXAL-IBUR FTS3000 型红外光谱仪; JOEL 100CX-II 透射电镜; UV-1100 紫外分光光度计; LG10-2.4A 型高速离心机。

## 1.2 烷基壳聚糖的制备

精确称量壳聚糖 1 g, KOH 2g, 异丙醇 12 ml 置于 100 ml 三口瓶中, 搅拌并升温至 40℃ 下恒温 1 h 以使壳聚糖碱化, 碱化结束后于 60℃ 滴加 3 ml 卤代烷, 并根据不同的碳链长度控制恒温反应一定时间 (4~10 h) 以取得取代度接近的烷基壳聚糖, 将所得产物用甲醇洗出, 并用稀盐酸中和至中性, 再添加 10 ml 丙酮将产品充分沉淀后过滤, 然后用丙酮、乙醚反复洗涤产品后烘干, 得到烷基化壳聚糖的粗制品。

将干燥的烷基壳聚糖粗制品装入透析袋中密封, 于蒸馏水中动态透析 24 h 以除去 KCl, 将所得产品干燥后, 即得到精制的烷基改性壳聚糖, 其烷基取代度根据其元素分析的 N 含量来确定 (反应前后 N 的原子个数没有发生变化)。

## 1.3 扑热息痛工作曲线的确定<sup>[5]</sup>

扑热息痛 (PCTM, 对乙酰氨基酚) 属于解热镇痛类药, 它易溶于热水或乙醇, 溶解于丙酮, 微溶于水<sup>[6]</sup>, 结构式如图 1 所示。

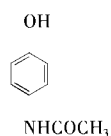


图 1 扑热息痛的结构式

准确量取 25 mg PCTM 以及 20 ml 去离子水置于 50 ml 烧杯中, 适当加热以使 PCTM 溶解, 然后将溶液转移到 100 ml 容量瓶中, 添加去离子水稀释至刻度, 然后分别取 1、2、3、4、5、6、7、8、9 ml 药物溶液稀释至 100 ml。以去离子水为参比用紫外可见分光光度计测定 PCTM 的最大吸收波长为 244 nm, 并在 244 nm 处测定上述不同溶液的吸光度值, 并绘制浓度对吸光度标准曲线。经线性回归后, 所得方程为:  $A = 61.21c$ ,  $A$  为吸光度值,  $c$  为扑热息痛的质量浓度 (mg/ml)。

## 1.4 烷基壳聚糖纳米载药微球的制备

分别取不同取代度的烷基壳聚糖 20 mg, 以及去离子水 20 ml 置于烧杯中, 维持超声 30 min 后得到 0.1% 的微球水分散液, 然后添加 5 mg 扑热息痛至微球的水分散液中, 继续维持超声分散 30 min 后得

到负载扑热息痛的微球的水分散液, 取 10 ml 载药微球水分散液于 12 000 r/min 下超速离心 60 min, 以使所有微球沉降, 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于扑热息痛的载药量和包封率。

$$\text{包封率} = \frac{m_0 - m_1}{m_0} \times 100\%$$

$$\text{载药量} = \frac{m_0 - m_1}{m_c} \times 100\%$$

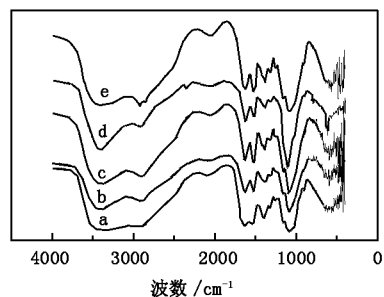
式中  $m_0$  为总投药量,  $m_1$  为游离药物量,  $m_c$  为投入的烷基壳聚糖量。

## 1.5 烷基壳聚糖纳米载药微球体外释放性能

移取 4 ml 载药微球的水分散液装入透析袋中密封, 置于 96 ml pH 值为 7.4 的酸缓冲溶液 (PBS) 中, 于 37℃ 恒温下动态透析 24 h, 每隔一定时间取出 5 ml 透析液测量其累积释放曲线, 弃去每次取出的溶液, 并向体系补充等量的 PBS。

## 2 结果与讨论

### 2.1 产物结构表征



a—壳聚糖; b—丁基壳聚糖; c—辛基壳聚糖; d—十二烷基壳聚糖; e—十六烷基壳聚糖

图 2 壳聚糖及烷基壳聚糖红外光谱图

图 2 为壳聚糖以及各种烷基壳聚糖的红外光谱图, 烷基壳聚糖与壳聚糖在图中有 3 个区域的吸收峰的变化比较明显。第一个区域是 2 853 和 2 923  $\text{cm}^{-1}$  的 C—H 的伸缩振动峰有较为明显的增强, 说明在壳聚糖分子中引入烷基取代基— $\text{CH}_2$  和— $\text{CH}_3$ <sup>[7]</sup>; 第 2 个区域是位于 1 531~1 637  $\text{cm}^{-1}$  的吸收峰, 该区域应该是由壳聚糖的酰胺 I (C=O)、酰胺 II (N—H) 以及— $\text{NH}_2$  (1 590  $\text{cm}^{-1}$ ) 的变形振动峰所构成的一个较宽的混合吸收谱带, 烷基化壳聚糖的这个混合谱带出现了明显的分峰, 处于中间的— $\text{NH}_2$  (1 590  $\text{cm}^{-1}$ ) 的吸收峰消失, 这表明在此反应体系下壳聚糖环上— $\text{NH}_2$  发生了取代反应; 而同时

位于 1 030 ~ 1 080  $\text{cm}^{-1}$  的伯、仲醇吸收峰的变化不大,这表明在  $\text{C}_6$  和  $\text{C}_3$  位上发生取代的反应较少,而氨基则是发生取代反应的主要基团<sup>[8]</sup>;第 3 个区域在 1 387  $\text{cm}^{-1}$  的 C—H 变形振动峰增强,再次表明反应后烷基的引入。

由元素分析的结果可进一步推算出产物的取代度(假定壳聚糖在反应前后没有发生明显降解),有关计算结果列于表 1。

表 1 烷基壳聚糖元素分析及其取代度

样品编号	取代基	反应时间/h	N 含量/%	取代度	溶解性
BTCS	丁基	4	7.39	0.43	完全溶解
OTCS	辛基	8	6.59	0.42	完全溶解
DDCS	十二烷基	10	5.97	0.41	完全溶解
CTCS	十六烷基	10	5.85	0.33	微量不溶

注:以上取代度是以 N 含量基准计算而得的。

## 2.2 微球形态及载药性能

### 2.2.1 透射电镜分析

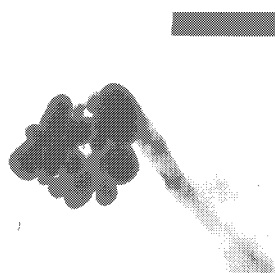


图 3 CTCS 纳米微球透射电镜照片

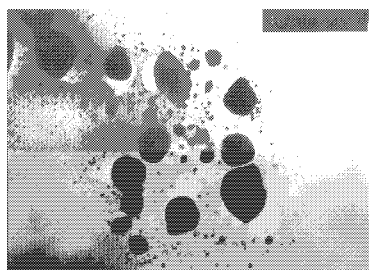


图 4 CTCS 纳米微球负载 PCTM 透射电镜照片

图 3 和图 4 分别为质量分数 0.1% CTCS 分散液空白以及负载扑热息痛以后的透射电镜照片。从以上两图可以看出,所得微粒的粒径大约在 100 nm 左右有聚集的现象,负载药物以后微球的粒径没有发生明显的变化,但是体系内出现了许多粒径小

于 1 nm 的粒子,这些粒子应该是游离的扑热息痛在体系内的结晶。

### 2.2.2 体外释放性能

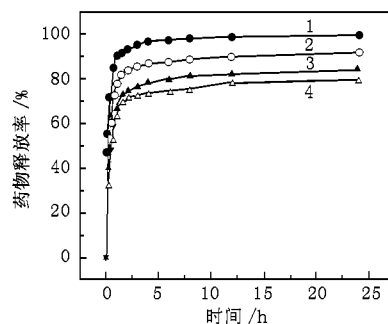
载药量与包封率是高分子材料负载药物性能的重要参数,烷基壳聚糖纳米微球负载扑热息痛的载药量和包封率的变化如表 2 所示。

表 2 烷基壳聚糖负载 PCTM 时的载药量和包封率

	BTCS	OTCS	DDCS	CTCS
载药量/%	15.7	19.5	24.0	24.1
包封率/%	59.8	77.8	78.2	79.5

注:  $m(\text{烷基壳聚糖}):m(\text{PCTM}) = 20:5$ 。

从表 2 中可以看出,随着烷基碳链长度的增加,烷基壳聚糖对扑热息痛负载的载药量和包封率有增加的趋势,碳链越长,增加的趋势越缓慢,当烷基链长增加到十六烷时,包封率基本上已经趋近于一个最大值。



$m(\text{烷基壳聚糖}):m(\text{PCTM}) = 20:5$

1—BTCS;2—OTCS;3—DDCS;4—CTCS

图 5 相同取代度下烷基壳聚糖负载 PCTM 体外释放比较

图 5 为不同碳链烷基壳聚糖纳米微球负载扑热息痛的体外释放实验所得的累积曲线,从图中可以看出扑热息痛的体外累积曲线可分为突释、缓释以及平衡释放 3 个阶段,初期突释阶段药物释放量约占总量的 40% ~ 70%,维持时间大约为 1 h,碳链长度越短,突释越明显,单位时间内释放的药物越多;在缓释阶段,药物释放量约占总量的 10% ~ 20%,维持时间约为 1 ~ 2 h,药物从微球内部释放出来,释放速率比较缓慢;平衡释放阶段,药物浓度的变化不大,释药平缓,基本达到平衡状态。从总体上看药物释放的突释以及平衡浓度与烷基壳聚糖的取代基的链长有很密切的关系,在取代度接近的情况下,烷基的碳链越长,亲油性也就越强,在水体系内的内聚力

越强,这种两亲的结构促使烷基壳聚糖分子之间相互聚集,形成一种壳聚糖亲水环在外,长链烷基亲油基在内的一种核壳结构,这种烷基内核的油性越强,对油性物质(扑热息痛)的吸附以及增溶能力也就越强,因此不但导致了包封率和载药量上升的趋势,也促使整个体系体外释放的突释作用减轻以及平衡浓度下降,因此就可以根据需要来控制体系扑热息痛的释放情况。

### 3 结论

(1)以氢氧化钾为催化剂,异丙醇为反应介质,卤代烷与壳聚糖发生反应的主要反应基团是氨基。

(2)长链烷基壳聚糖在水溶液中可自动形成粒径为 100 nm 左右的纳米微球。

(3)在取代度接近的情况下,取代基越长,所形成的纳米微球对扑热息痛的亲和作用越强,扑热息痛体外释放的突释作用越弱,体外累积释放平衡浓度越低。

### 参考文献

- [1] Calvo P, Remuñan-López C, Vila-Jato J L, et al. Chitosan and chitosan/propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines[J]. *Pharmaceutical Research*, 1997, 14(10): 1431 ~ 1436
- [2] Soppimath K S, Aminabhavi T M, Kulkarni A R, et al. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices[J]. *Journal of Controlled Release*, 2001, 70(1/2): 1 ~ 20
- [3] Erbacher P, Zou Shaomin, Bettinger T, et al. Chitosan-based vector/DNA complexes for gene delivery; biophysical characteristics and transfection ability[J]. *Pharmaceutical Research*, 1998, 15(9): 1332 ~ 1339
- [4] Calvo P, Remuñan-López C, Vila-Jato J L, et al. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers[J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 1997, 63: 125 ~ 132
- [5] 赵锦花. 新型药物载体-PEG 修饰聚氧基丙烯酸酯纳米微球的制备及性能研究[D]. 天津: 天津大学化工学院, 2001
- [6] 中华人民共和国药典(二部)[S]. 北京: 人民卫生出版社, 1995
- [7] 董炎明, 王勉, 吴玉松, 等. 壳聚糖衍生物的红外光谱分析[J]. *纤维素科学与技术*, 2001, 9(2): 42 ~ 56
- [8] 王爱勤, 俞贤达. 烷基化壳聚糖衍生物的制备与性能研究[J]. *功能高分子学报*, 1998, 11(1): 83 ~ 86
- [9] polyvinylamine onto polyethylene film by corona discharge-induced grafting[J]. *J Appl Polym Sci*, 1999, 72: 1583 ~ 1587
- [10] Mandeville W H III, Holmes-Farley S R. Process for removing bile salts from a patient and alkylated compositions therefore[P]. US, 6225355. 2001-05-01
- [11] Domb A J. Biocompatible polymeric coating[P]. EP, 0914835. 1999-05-12
- [12] Van Ness J, Tabone J C, Pethell C E. Solid supports for nucleic acid hybridization assays and methods for covalently immobilizing oligonucleotides[P]. EP, 0455905. 1990-09-04
- [13] Akashi Mitsuru, Nakano Shirou, Kishida Akio. Synthesis of poly(N-vinylisobutyramide) from poly(N-vinylacetamide) and its thermosensitive property[J]. *J Polym Sci, A: Polym Chem*, 1996, 34: 301 ~ 303
- [14] Seto Fusako, Muraoka Yoichiro, Akagi Takami, et al. Surface grafting of polyvinylamine onto polyethylene film by corona discharge-induced grafting[J]. *J Appl Polym Sci*, 1999, 72: 1583 ~ 1587
- [15] Lorecak P, Hughes D. Tailor-made chemistry at shotton paper[J]. *Pap Technol*, 2000, 41(8): 34 ~ 38
- [16] Wu Zonghua, Chen Shaoping. Functions of polyamines in resin sizing under neutral papermaking condition[J]. *Chin J Polym Sci*, 2001, 19(2): 217 ~ 221
- [17] Dubin P L. High molecular weight polyvinylamine hydrochloride as flocculant[P]. US, 4217214. 1980-08-12
- [18] Lai Tawang, Villayendran B R. Acidized fracturing fluids containing high molecular weight poly(vinylamine) for enhanced oil recovery[P]. EP, 0295614. 1988-06-13
- [19] 林莉. N-乙炔基乙酰胺[J]. *精细与专用化学品*, 1999(2): 20 ~ 21

(上接第 17 页)

## 《现代化工》网站介绍

《现代化工》网站网址为: <http://www.xdhg.com.cn>、<http://xdhg.periodicals.net.cn> 和 <http://xdhg.chinajournal.net.cn>, 欢迎广大读者访问。从网上, 您可以查到近年《现代化工》文章目录, 了解对稿件的要求及投稿注意事项, 也可以在网上了解我们的广告联系办法、期刊订阅方法, 以及近期授权的中国化工专利公告。另外, 如果您对我刊有什么建议和意见, 也可以在网上留言。