

# pH 敏感 *O*-羧甲基壳聚糖自组装纳米粒的制备及表征

覃志忠<sup>1</sup>, 张凤宝<sup>1</sup>, 张国亮<sup>1</sup>, 宋秀娟<sup>2</sup>

(1. 天津大学化工学院, 天津 300072; 2. 沧州师范专科学校, 河北 沧州 061600)

**摘要:**用 5 $\beta$ -胆烷酸(5 $\beta$ -CHA)对 *O*-羧甲基壳聚糖(OCMC)进行疏水改性,接枝磺胺地托辛(SDM)以增强其 pH 敏感性,在 pH = 9 的磷酸盐缓冲溶液中制备了对肿瘤组织具有靶向潜力的自组装纳米粒子。所得纳米粒粒径在 100nm 左右,且随 5 $\beta$ -CHA 接枝量的增加 5 $\beta$ -CHA/OCMC 纳米粒的粒径减小。自组装纳米粒有较低的临界聚集浓度( $10^{-2}$  mg/mL),在 pH = 7.4(人体正常 pH)的水溶液中表现出高度稳定性。而当溶液的 pH < 6.8(肿瘤组织 pH)时,接枝 SDM 的纳米粒子会迅速聚集,粒径剧增,且随 SDM 接枝量的增加 pH 敏感性增强。

**关键词:**自组装纳米粒; *O*-羧甲基壳聚糖; pH 敏感性; 5 $\beta$ -胆烷酸; 磺胺地托辛

中图分类号: R914

文献标识码: A

文章编号: 0253-4320(2009)04-0053-04

## Preparation and characterization of self-assembled pH-sensitive *O*-carbohydrate chitosan nanoparticles

QIN Zhi-zhong<sup>1</sup>, ZHANG Feng-bao<sup>1</sup>, ZHANG Guo-liang<sup>1</sup>, SONG Xiu-juan<sup>2</sup>

(1. School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China;

2. Cangzhou Normal College, Cangzhou 061600, China)

**Abstract:** A novel cancer-targeting drug delivery system is synthesized by self-aggregating of *O*-carbohydrate chitosan (OCMC) which is hydrophobically modified by 5 $\beta$ -cholanolic acid (5 $\beta$ -CHA) and grafted with sulfonamide (SDM) to enhance its pH sensitivity. The self-aggregates are successfully obtained in phosphate buffer solution (PBS) at pH 9.0. The average diameter of the particles is approximately and uniformly 100nm, and the particle size of 5 $\beta$ -CHA/OCMC decreases with increasing the degree of substitution of 5 $\beta$ -CHA due to the forming of a tighter hydrophobic core. With low critical aggregate concentration (CAC) of about  $10^{-2}$  mg/mL, the self-aggregated particles show great stability at pH 7.4, which equals the normal pH value of human body fluid. But below pH 6.8, which is close to the tumor's pH value, the particles bearing SDM show good pH sensitivity by shrinking and aggregating. The pH sensitivity can be enhanced with the increase of substitution degree of SDM.

**Key words:** self-assembled nanoparticles; *O*-carbohydrate chitosan; pH sensitivity; 5 $\beta$ -cholanolic acid; sulfonamide

*O*-羧甲基壳聚糖(OCMC)是壳聚糖的一种水溶性衍生物,在药物控制释放方面具有良好应用前景<sup>[1]</sup>,但 OCMC 亲水性太强,直接用作药物载体难以实现药物的缓释<sup>[2-5]</sup>。用含有疏水结构的材料对其进行疏水改性可以得到两亲性的聚合物,在水溶液中可自组装形成具有疏水性内核和亲水性外壳结构的纳米粒子<sup>[6]</sup>。一般肿瘤组织的 pH 略低于正常细胞,呈弱酸性(pH  $\approx$  6.8),如用 pH 敏感性基团修饰药物载体基质,使制得的纳米载体在正常体液情况下(pH = 7.4)保持纳米级粒度并降低释放能力,而在肿瘤细胞液中大量聚集并强烈释放,便可达到良好靶向性和控制释放的效果。笔者采用 5 $\beta$ -胆烷酸(5 $\beta$ -CHA)<sup>[6-9]</sup>对 OCMC 进行疏水改性,然后偶联磺

胺地托辛(SDM)<sup>[10]</sup>增强 pH 敏感性,在磷酸盐缓冲溶液中制备了对肿瘤组织具有靶向潜力的自组装水凝胶纳米粒,并对自组装纳米粒的理化性能进行了表征。

## 1 实验部分

### 1.1 主要原料与仪器

壳聚糖(CS),  $M_w = 1.5 \times 10^5$ , 脱乙酰化度 88.51%; 5 $\beta$ -胆烷酸(5 $\beta$ -CHA)、磺胺地托辛(SDM)、碳二亚胺(EDC), Sigma 公司; *N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS), Aldrich 公司; 其余药品、试剂均为国产分析纯。

Thermo Nicolet 傅里叶红外光谱仪; Varian <sup>1</sup>H核磁

收稿日期: 2009-01-03

作者简介:覃志忠(1970-),男,博士生;张凤宝(1963-),男,博士,教授,博士生导师,主要从事化工传质与分离过程及生物材料领域的研究,通讯联系人,022-27408778, fbzhang@tju.edu.cn。

共振仪;UV-2802H 紫外分光光度计;JEOL 场发射扫描式电子显微镜(FE-SEM);Brookhaven 动态光散射仪;Shimadzu RF-4500 荧光分光光度计。

## 1.2 OCMC 的制备

OCMC 的制备参考文献[11]并略有改动:1 000 mL 三口瓶中加入 5 g 壳聚糖和 50% NaOH 溶液,强烈搅拌碱化 2 h,然后在冰水浴中冷却至 2℃ 恒温。将一定质量的氯乙酸与 20 mL 去离子水混合配成溶液(3.83 g 溶于 10 mL H<sub>2</sub>O),冷却至室温后,逐滴滴加至三口瓶中,使温度变化控制在 ± 0.5℃ 以内。48 h 后,用浓盐酸调节反应体系 pH = 1.0,停止反应。将反应混合物在无水乙醇中沉淀、抽滤,所得滤饼用无水乙醇洗涤 3 次,于蒸馏水中透析 3 d,用 AgNO<sub>3</sub> 溶液检测无 Cl<sup>-</sup> 后,冷冻干燥得 OCMC。

## 1.3 5β-CHA 接枝 OCMC

称取 0.2 g OCMC 溶解于 34 mL 蒸馏水中,加入 102 mL 甲醇,将不同量的 5β-CHA 加入上述混合液中,强烈搅拌至溶液光学透明,再加入一定量 EDC 和 NHS,室温下反应 24 h 后,将得到的溶液于甲醇与水的混合溶液(体积比 4:1)中透析(截留相对分子质量 14 k)3 d,以除去未反应的 5β-CHA 及反应副产物,冷冻干燥得产物 5β-CHA/OCMC。

## 1.4 SDM 接枝 5β-CHA/OCMC

由于该反应与 5β-CHA 的接枝反应类型相同,故可采用相同的催化剂。将 0.5 g 5β-CHA/OCMC 溶解于甲醇与水的混合溶液中(体积比 1:1),完全溶解后加入不同量的 SDM,溶解后加入 EDC 和 NHS,反应 24 h,将所得滤液经截留相对分子质量 12 k 的透析袋透析 3 d,冻干。此透析-冻干过程反复 3 次得纯化的产物 5β-CHA/OCMC/SDM。

用傅里叶红外光谱仪(FT-IR)和核磁共振仪(<sup>1</sup>H-NMR)确认 5β-CHA 和 SDM 接枝成功。二者连接到 OCMC 的量即取代度(DS)按 Nichifor 等<sup>[12-13]</sup>的方法用紫外分光光度计测定。

## 1.5 接枝聚合物的自组装

将 50 mg 干燥的 5β-CHA/OCMC 及 5β-CHA/OCMC/SDM 分别溶于甲醇与水的混合溶液(体积比 1:1)中,用透析袋(截留相对分子质量 5 k)封装溶液,在 500 mL PBS(pH = 9.0)中于室温下透析 24 h。前 3 h 内,每隔 1 h 更换一次缓冲液,后 21 h 内,每 6 h 换一次缓冲液。透析后,将所得溶液用探针式超声均化仪均化,然后通过 0.45 μm 过滤膜过滤掉沉淀物质,将所得样品进行冻干,反复透析-冻干纯化后,得到较为纯净的纳米粒。纳米粒粒径大小及分布用动态光散射仪(DLS)进行测定。

## 1.6 自组装纳米粒的荧光光谱测定

将一定浓度的芘的丙酮溶液加入一系列试管中,于通风橱中静置挥发除去丙酮后,每管加入不同浓度的自组装纳米粒溶液,使芘的最终浓度为 6.0 × 10<sup>-7</sup> mol/L,水浴超声平衡 2 h,用荧光分光光度计测定不同浓度下芘的发射光谱。激发波长为 336 nm,激发和发射狭缝分别为 5 nm 和 1 nm。将芘的荧光强度 I<sub>1</sub>/I<sub>3</sub> 与浓度的对数作图,求出临界聚集浓度(CAC)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 5β-CHA/OCMC/SDM 的合成及表征

在低温碱性介质中,壳聚糖与氯乙酸反应,可以将羧甲基引入壳聚糖的 O-位,得到 O-羧甲基壳聚糖(OCMC),本实验制得的 OCMC 的羧甲基取代度(DC) = 91.1%。5β-胆烷酸是胆汁酸的一种,在人体内具有重要的生理作用,如对胆固醇、脂肪和脂溶性维生素的乳化、增溶和吸收等,用其作为疏水基团通过酰胺键连接到 OCMC 分子链的氨基上以得到两亲性聚合物。SDM 是一种磺胺类药物,其分子结构中的磺酰亚胺基具有弱酸性,通过酰胺键将其连接到 OCMC 的羧基上,以实现弱酸性环境下的 pH 敏感性。合成路线如图 1。

(上接第 52 页)

[3] 范伟莉,张彪,何萍. 脂肪酸甲酯磺酸钠在洗涤剂中的应用性能研究[J]. 应用化工,2008,37(7):830-833.  
 [4] 徐培鸿. α-磺基脂肪酸甲酯的物理化学性能综述[J]. 山东化工,2002,31(6):25-29.  
 [5] Diaconu G, Paulis M, Leiza J R. Towards the synthesis of high solids content waterborne poly(methyl methacrylate-co-butyl acrylate)/montmorillonite nanocomposites[J]. Polymer,2008,49(10):2444-2454.  
 [6] Li Zhongxiao, Feng Yuguang, Li Luhai, et al. Preparation and properties of a thermo-sensitive latex film[J]. European Polymer Journal,2008,44(6):1899-1906.

[7] Hu Jing, Ma Jianzhong, Deng Weijun. Synthesis of alkali-soluble copolymer (butyl acrylate/acrylic acid) and its application in leather finishing agent[J]. European Polymer Journal,2008,44(8):2695-2701.  
 [8] Moayed S H, Fatemi S, Pourmahdian Sd. Synthesis of a latex with bimodal particle size distribution for coating applications using acrylic monomers[J]. Progress in Organic Coatings,2007,60(4):312-319.  
 [9] 曹同玉,刘庆普,胡金生. 聚合物乳液合成原理性能及应用[M]. 2版. 北京:化学工业出版社,2007.  
 [10] Davies J T. A quantitative kinetic theory of emulsion type: I. Physical chemistry of the emulsifying agent[C]//Proc Int Congr Surface Activity. 2nd Vol. London: Butterworths,1957. ■

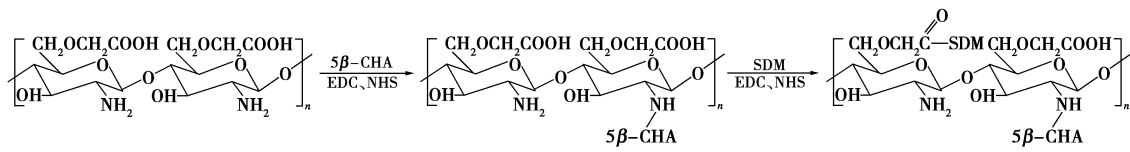


图1 5β-CHA/OCMC/SDM的合成

5β-CHA/OCMC 红外光谱图与 OCMC 相比 1 631  $\text{cm}^{-1}$  处的吸收峰明显增强,表明 5β-CHA 已通过酰胺键连接于 OCMC 上。5β-CHA/OCMC/SDM 的谱图中,1 249.61  $\text{cm}^{-1}$  (SDM 中甲氧基)、1 154.74  $\text{cm}^{-1}$  (SDM 中  $\text{SO}_2$  基团伸缩振动)表明成功地将 SDM 接枝到了 OCMC 上(图略)。

5β-CHA/OCMC 的核磁共振氢谱中,  $\delta = 0.6 \sim 2.6$  的多重峰是 5β-CHA 的特征峰,其中 0.70、1.16、1.19 处的单峰分别对应于 18、19、21 位甲基。5β-CHA/OCMC/SDM 的核磁共振氢谱中,  $\delta = 7.6$  (SDM 中苯环上 H)、6 (SDM 中嘧啶环上 H)、3.7 (SDM 中甲氧基上 H)和 2.05 (过量的羧基)表明 5β-CHA 和 SDM 已成功地接枝到 OCMC 上(图略)。

## 2.2 纳米粒的理化性质

笔者采用透析/超声法在 pH = 9 的 PBS 中制备了自组装水凝胶纳米粒。所制得的纳米粒具有疏水内核,可以加载疏水性药物;亲水外壳可以保持纳米粒的稳定性。表 1 列出了动态光散射仪(DLS)测得的不同 5β-CHA 和 SDM 取代度的纳米粒在 pH = 7.4、质量浓度 1  $\text{mg}/\text{mL}$  的水溶液中的平均粒径以及荧光光谱仪测得的临界聚集浓度。

表 1 5β-CHA/OCMC 及 5β-CHA/OCMC/SDM 纳米粒的性质

样品	DS <sub>5β-CHA</sub>	DS <sub>SDM</sub>	粒径/nm	CAC/ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$
5β-CHA/OCMC*	7		147.7 ± 28	0.038
5β-CHA/OCMC	12		128.6 ± 24	0.023
5β-CHA/OCMC/SDM1	12	19	96.2 ± 17	0.026
5β-CHA/OCMC/SDM2	12	35	103.8 ± 27	0.031

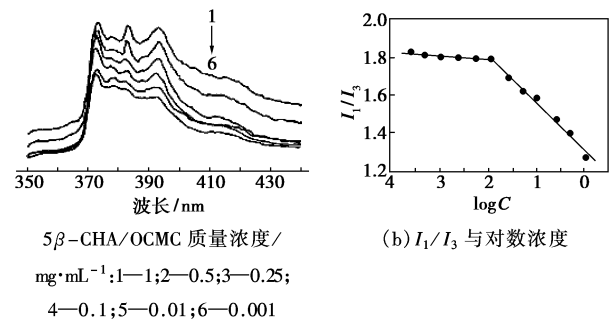
注:取代度(DS)定义为每 100 个糖单元所含的取代基团的数目。

可见随着 5β-CHA 取代度的增加,平均粒径减小,这是因为疏水支链的增加使分子内和分子间疏水相互作用增强,交联程度增大,形成了更紧密的疏水核心<sup>[6]</sup>。随着 SDM 取代度的增加,粒径有所增大,其原因可能是 SDM 接枝量的增加,增加了水凝胶纳米粒的溶胀性。5β-CHA/OCMC/SDM 的粒径在 100 nm 附近,这种粒径尺寸与一些病毒或脂蛋白的尺寸近似相等,并且小于网状内皮组织系统(RES)的最低尺寸识别要求,从而可以达到有效的

尺寸靶向效果。

## 2.3 自组装纳米粒的临界聚集浓度

以芘为荧光探针,对 5β-CHA/OCMC 与 5β-CHA/OCMC/SDM 进行了荧光光谱研究。图 2(a)是 5β-CHA/OCMC 在蒸馏水中的荧光发射光谱。随 5β-CHA/OCMC 浓度的增加,芘的荧光发射强度明显增大,表明芘所处的环境极性降低。图 2(b)说明了  $I_1/I_3$  值随 5β-CHA/OCMC 浓度变化的情况。低聚合物浓度时, $I_1/I_3$  值接近于芘在水中的值(1.87),随着两亲性聚合物浓度的增大,超过一临界浓度时, $I_1/I_3$  值线性降低,说明了疏水微区的生成,图 2(b)中水平线和斜线交点对应的浓度即为 CAC。



(a) 荧光发射光谱

图 2 5β-CHA/OCMC 的荧光发射光谱和  $I_1/I_3$  与对数浓度的关系

不同取代度的自组装纳米粒的 CAC 值见表 1。自组装纳米粒的 CAC 值远小于小分子表面活性剂的临界胶束浓度 CAC 值,在水相中较为稳定。随着 5β-CHA 取代度的增加,5β-CHA/OCMC 的 CAC 值减小,这是因为疏水支链的增加使分子内及分子间的疏水性相互作用增强,在较低的浓度条件下即开始聚集,且分子卷缩形成较小的粒子。反之则形成较大结构较为松散的粒子。5β-CHA/OCMC/SDM 中,SDM 对 CAC 值也有影响,连接 SDM 后,CAC 值有所增大,可见 SDM 的引入增加了自组装的阻力。

## 2.4 自组装纳米粒的稳定性分析

为检测所制得的纳米粒子的稳定性,分别考察了 pH = 7.4 时温度以及时间的变化对纳米粒子粒度的影响。结果显示当温度在人体温附近波动或常温放置 10 d,其粒径基本无变化。

## 2.5 自组装纳米粒的 pH 敏感性分析

为了检测自组装纳米粒的 pH 敏感性,考察了 pH 对纳米粒子粒径的影响。表 2 列出了在不同 pH 的 PBS 中纳米粒子的平均粒径,图 3 是  $5\beta$ -CHA/OCMC/SDM1 自组装纳米粒在 pH = 6.8 时的场发射扫描电镜照片。

表 2 自组装纳米粒在不同 pH 的 PBS 中的粒径

粒径/nm	pH		
	7.4	6.8	6.0
$5\beta$ -CHA/OCMC	96.2	117	178
$5\beta$ -CHA/OCMC/SDM1	103.8	996	3040
$5\beta$ -CHA/OCMC/SDM2	128.6	1253	3310

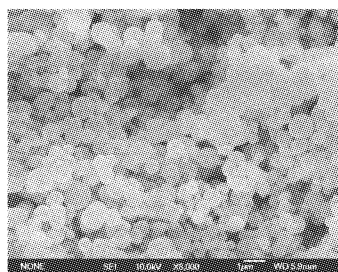


图 3 pH = 6.8 时  $5\beta$ -CHA/OCMC/SDM1 自组装纳米粒场发射扫描电镜照片

对于  $5\beta$ -CHA/OCMC/SDM 纳米粒,当 pH 从 7.4 降至 6.8 附近时粒径剧增,pH 敏感性非常好,且随接枝量的增加 pH 敏感性增强。这种粒径的剧增不是因为单个粒子粒径的增长,而是由于大量粒子聚集而造成的。因为 SDM 中的磺酰亚胺基具有弱酸性,在偏碱性环境中发生电离,而在偏酸性环境中则消电离,使纳米粒子表面所带的电荷减少,粒子之间原有的静电排斥力降低,另外由于 SDM 的消电离作用而使其由原来的偏亲水性而变为疏水性,因此纳米粒子发生大量团聚,纳米粒变形并形成新的疏水微区,且使粒径剧增。从图 3 看出, $5\beta$ -CHA/OCMC/SDM1 纳米粒子发生了强烈的聚集与交联,聚集后的粒径达到微米量级,可以预见,当接载药物的纳米粒子进入肿瘤部位后,纳米粒会发生强烈的聚集,从而实现定点释药。

对于  $5\beta$ -CHA/OCMC 纳米粒,pH 降低时,其粒径有所增大,但变化不剧烈,这是因为  $5\beta$ -CHA/OCMC 分子链上由于大量羧基的存在而发生轻微的电离,但其电离作用较弱,因此表现出微弱的 pH 敏感性。

## 3 结语

用  $5\beta$ -胆烷酸对 *O*-羧甲基壳聚糖进行疏水改

性,接枝磺胺地托辛以增强 pH 敏感性,在水溶液中制备了自组装纳米粒子。所得纳米粒子的粒径在 100 nm 左右,粒径分布窄,且随着  $5\beta$ -胆烷酸接枝量的增加粒径减小,表明形成了更紧密的疏水核心。自组装纳米粒子具有较低的临界聚集浓度(CAC =  $10^{-2}$  mg/mL),在人体正常组织的 pH(pH = 7.4)时表现出高度的稳定性,但 pH < 6.8(肿瘤组织的 pH)时,接枝 SDM 的纳米粒子迅速聚集,粒径剧增,表现出强烈的 pH 敏感性,且随 SDM 接枝量的增加 pH 敏感性增强。

## 参考文献

- [1] 孙立苹,杜子民,陈凌云,等.羧甲基壳聚糖水凝胶的制备及其在药物释放中的应用[J].高分子学报,2004(2):191-195.
- [2] Shigehiro H, Ken-ichiro H, Kei H. Some *N*-acyl derivatives of *O*-carboxy-methylchitosan[J]. Carbohydrate Research, 1992, 225(1): 175-178.
- [3] 隋卫平,蒋晓杰,翟利民,等.两性羧甲基壳聚糖衍生物的表面活性研究[J].高等学校化学学报,2004(1):99-102.
- [4] Shin-I N, Yoshiaki M, Longdi R, et al. An efficient method for the syntheses of novel amphiphilic polysaccharides by regi *O*- and thermoselective modification of chitosan[J]. Chemistry Letter, 1993, 22(9): 1623-1626.
- [5] Shigehiro H, Takehiko M. Novel method for the preparation of *N*-acylchitosan fiber and *N*-acylchitosan-cellulose fiber [J]. Biomaterials, 1998, 19(1/2/3): 293-297.
- [6] Seunglee K, Jae H P, Hesson C, et al. Physicochemical characteristics of self-assembled nanoparticles based on glycol chitosan bearing  $5\beta$ -cholanolic acid[J]. Langmuir, 2003, 19: 10188-10193.
- [7] Lee K Y, Jolek W H, Kim Y-H, et al. Structural determination and interior polarity of self-aggregates prepared from deoxycholic acid-modified chitosan in water[J]. Macromolecules, 1998, 31(2): 378-383.
- [8] Lee K Y, Kim J-H, Kwon I C, et al. Self-aggregates of deoxycholic acid-modified chitosan as a novel carrier for Adriamycin[J]. Colloid Polym Sci, 2000, 278: 1216-1219.
- [9] Jae H P, Seunglee K, Ju-Ock N, et al. Self-assembled nanoparticles based on glycol chitosan bearing  $5\beta$ -cholanolic acid for RGD peptide delivery[J]. Journal of Controlled Release, 2004, 95(3): 579-588.
- [10] Liu L, Jin P, Cheng M, et al. 5-Fluorouracil-loaded self-assembled pH-sensitive nanoparticles as novel drug carrier for treatment of malignant tumors[J]. Chinese J Chem Eng, 2006, 14(3): 377-382.
- [11] 赵爱杰,原续波,常津. *O*-羧甲基壳聚糖的制备及应用研究[J]. 高分子通报, 2004(4): 59-63.
- [12] Nichifor M, Carpov A. Bile acids covalently bound to polysaccharides: 1. Esters of bile acids with dextran[J]. European Polymer Journal, 1999, 35(12): 2125-2129.
- [13] Yuan X B, Li H, Zhu X X, et al. Self-aggregated nanoparticles composed of periodate-oxidized dextran and cholic acid: preparation, stabilization and in-vitro drug release[J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2006, 81(5): 746-754. ■