

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.11.007

壳聚糖 - 有机累托石 / 海藻酸钠复合纳米粒的制备 *

白录军¹ 周 天¹ 冯旭阳² 郑鹏飞² 徐瑞芬^{3△}

(1 兰州军区临潼疗养院第二疗养区 陕西 临潼 710600; 2 第四军医大学西京医院心脏内科 陕西 西安 710032;

3 西安交通大学生命科学院技术学院 陕西 西安 710049)

摘要 目的:以 BSA 作为模型药物,制备壳聚糖季铵盐-OREC 复合物纳米微粒,建立一种安全有效的药物控释传递系统。**方法:**超声条件下,制备不同质量比的具有壳聚糖硅酸盐插层结构的复合物纳米微粒,观察其形态学特征、进行红外光谱分析。同时,测定 OREC 对 BSA 包封率和载药量的影响。**结果:**成功制备了不同质量比的 OREC-HTCC 纳米粒子。电镜结果显示纳米粒呈圆球形,均匀,平均粒径约为 30nm。红外图谱分析证实,HTCC 插入了 OREC 插层中,BSA 成功地包裹入 HTCC-ALG/OREC 混合材料制备的纳米微粒。加入 OREC 后,纳米粒子的包封率及载药量均明显提高,但随着加入量的增加,包封率及载药量逐渐减少。**结论:**OREC-HTCC 纳米粒子是良好的蛋白药物载体,具有粒径小、包封率高、缓释效果好等优点,为 CS-OREC 作为潜在的药物给药系统的进一步应用提供科学依据。

关键词:壳聚糖;纳米粒;有机累托石

中图分类号:Q819, R914.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)11-2029-03

Preparation of Quaternized Chitosan (QC)/alginate (ALG) Complex Nanoparticles*

BAI Lu-jun¹, ZHOU Tian¹, FENG Xu-yang², ZHENG Peng-fei², XU Rui-fen^{3△}

(1 Second Convalescent Area of Lintong Sanatorium Lanzhou Military Command, Lintong, Shaanxi, 710600, China;

2 Department of Cardiology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

3 School of Life Science and Technology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, 710049, China)

ABSTRACT Objective: To preparation of quaternized chitosan (QC)/alginate (ALG) complex nanoparticles with BSA. Therefore, it is necessary to establish an approach for fabricating an efficient controlled release drug delivery system. **Methods:** Under the condition of ultrasonic, preparation of different mass ratio with silicate chitosan intercalated structure complex nanoparticles. Morphology, infrared spectrum analysis, and the encapsulation efficiency and the loading capacity of nanoparticles were investigated. **Results:** OREC-HTCC nanoparticles were prepared successfully and universally spherical with a diameter of approximately 30 nm. FT-IR results confirmed that HTCC chains had intercalated into the interlayer of OREC and BSA was encapsulated by nanoparticles prepared by HTCC-ALG/OREC mixed material. After introduction of OREC, encapsulation efficiency and drug load of nanoparticles were significantly enhanced. However, encapsulation efficiency and drug load declined with the increase of OREC introduction. **Conclusion:** The nanoparticles prepared by HTCC-OREC have been used as drug carrier for protein, have the advantages of small size, high encapsulation efficiency and slow release. It provides scientific data for modulating the release of oral drug. It could be expected to be potential drug delivery system though there were few related reports.

Key words: Quaternized chitosan; Nanoparticles; Organic Rectorite

Chinese Library Classification(CLC): Q819, R914.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)11-2029-03

前言

蛋白质与多肽类药物的非注射给药系统的研究,即增加大分子药物吸收和生物利用度的研究,目前是一个世界性的难题,同时也是全球研究的热点之一。影响蛋白质变性的因素包括温度、pH、化学试剂(如盐类、有机溶剂和表面活性剂等)、机

械应力和超声波,甚至还有空气氧化、表面吸附和光照等^[1-3]。口服给药研究较多,但存在很多困难,主要表现在:多肽、蛋白类药物分子量大,且常以多聚物的形式存在,不易透过胃肠粘膜;蛋白质在胃肠道中容易被酶和胃酸降解以致破坏,导致生物利用率低下,一般都小于 2%^[4,5]。纳米技术可以提高蛋白质药物口服吸收,将药物包载在纳米粒子中,可以防护蛋白质在胃肠道

* 基金项目:国家自然科学基金项目(8100597;81070248)

作者简介:白录军(1968-),男,硕士研究生,副主任医师,研究方向:纳米材料的医学应用与临床心理学, Tel: 13359295319,

E-mail: bailujun@yeah.net

△通讯作者:徐瑞芬,副教授,博士, E-mail: xurufen@fimmu.edu.cn

(收稿日期:2013-11-28 接受日期:2013-12-24)

中的降解和破坏,同时可以提高药物的吸收利用^[69]。

从海洋资源中提取的天然产物在医药和生物学领域上得到了广泛的应用。壳聚糖和海藻酸钠是其中研究的较多的多糖,广泛应用于蛋白质等大分子给药系统^[10,11]。而利于有机累托石(OREC)复合材料作为蛋白质给药载体却很少研究报道。因此,我们利于 BSA 作为模型药物,超声条件下,制备了壳聚糖季铵盐-OREC 复合物纳米微粒,并进行了其形态学的研究、红外光谱分析。同时,还研究了 OREC 对 BSA 包封率和载药量的影响,为进一步的临床应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 有机累托石和壳聚糖/有机累托石插层复合材料的制备方法

首先将 Ca^{2+} -REC 均匀分散到纯水中,高速搅拌 30 分钟后,得到稳定的 REC 悬浮液,静置 24 小时。将一定量的十二烷基磺酸钠配成 2% 水溶液滴加至 90℃ 的 REC 悬浮液中,恒温 5h,抽滤,并用纯水多次洗涤,去除多余的磺酸根离子,于 90℃ 下干燥至恒重,得有机累托石(OREC)。

取一定量 HTCC 溶解在 0.002 mol/L 的醋酸溶液中,配制成质量分数为 2% 的 HTCC 溶液,搅拌 4 小时,滴加到 OREC 悬浮液中,搅拌并加热至 60℃,反应 24 小时后,再配制 HTCC 溶液,滴加到正在反应的溶液中,继续搅拌 1d。用 NaOH 沉淀反应物,蒸馏水洗至中性,50℃ 干燥。按照实验需求得不同的重量比 HTCC-OREC 复合材料。所有的产物均冷冻干燥,研磨至干粉,保存待用。HTCC-OREC 复合物用 HO 表示,HTCC:OREC 质量比 3:1、6:1 和 12:1 表示为 HO31、HO61 和 HO121。

1.2 纳米微粒的制备

取 0.5 mg/ml 的氯化钙溶液 2.0 ml,在 100 W 超声条件下,逐滴滴加到 6.0 ml 的海藻酸钠溶液中 (1.0 mg/ml),超声 30 s 后,在磁力搅拌器上慢速搅拌。加入 1ml 的 1.0 mg/ml 的 HTCC 溶液,搅拌 30min,形成的乳液 pH 值为 6.85 ± 0.1 。乳液静置过夜,形成均一的纳米粒子悬液。纳米粒子在 4℃ 下 15000 rpm 高速离心 30 min,分离后冷冻干燥。含 BSA 的纳米粒子同上述方法制备,将 CaCl_2 加入含 1.0 mg/ml BSA 的海藻酸钠中形成预胶体,然后加入 HTCC/OREC-HTCC 溶液,形成含药纳米粒子。BSA 的包封率通过计算游离的 BSA 的量得到,上层清液中 BSA 的含量用考马斯亮蓝法测定,UV 分光光度计测定 $\lambda=595$ nm 的吸收。

1.3 纳米粒子的结构表征测定

1.3.1 测定纳米粒子的表面形态学特征 样品经 2%(w/v)磷钨酸染色,置于铜网上,透射电镜(TEM)观察纳米微粒的形态学特征。

1.3.2 红外光谱测定 利用美国 Nicolet 公司 170SX FTIR 红外傅里叶光谱仪,纳米粒子冻干成粉末,KBr 压片法测定记录红外光谱。

1.3.3 BSA 包封率的检测 本实验利用日本岛津公司 UV-1800 紫外分光光度计对产物进行波长扫描分析,微球中 BSA 的载药量通过间接法测得,用 UV 分光光度计测定凝固液中 $\lambda=280$ nm 的吸收,计算游离 BSA 的量。

BSA 的包封率(EE, %) = (总 BSA 量 - 游离 BSA 量) / 总 BSA 量 $\times 100\%$

纳米粒子的载药量(LC, %) = (总 BSA 量 - 游离 BSA 量) / 纳米粒子的量 $\times 100\%$

所有包封率测试都取三个平行样同时进行,图中报道为平均值及其方差。

1.4 统计学分析

实验结果用均数 $\pm$ 标准差表示,n 表示实验的次数。反复测量数据采用单因素方差分析(ANOVA),组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为有显著统计学意义。

2 结果

2.1 形态学观察

图 1 为我们所制备的纳米粒子的 TEM 照片,显示呈圆球形,表面有绒毛状突起;大小均匀,分散性好,平均粒径约为 30 nm。复合纳米粒子吸附于 OREC 的表面。由于 OREC 的层间高度几个纳米(3-4 nm 之间),层状硅酸盐厚度在几个纳米到几十纳米之间,宽度在几十纳米到两百纳米之间,所以纳米微粒可能吸附于其表面,或是吸附于 OREC 之间的夹层。

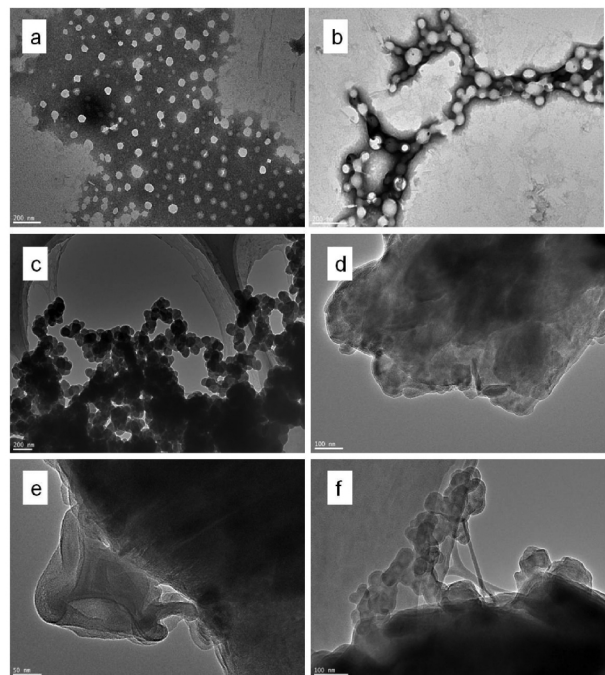


图 1 纳米粒子的电镜图

a:HTCC, 负染; b:未分散的 HTCC, 负染; c:HTCC-OREC, 未负染; d: OREC 的层状结构; e:OREC 侧面的层状结构; f: OREC 与纳米粒子结合的部位

Fig. 1 TEM morphology of HTCC/ALG nanoparticles (a, b) and HTCC-ALG/OREC nanoparticles (c, d, e, f)

2.2 FTIR 图谱

图 2 为 OREC、BSA、海藻酸钠、壳聚糖季铵盐和纳米粒子的红外图谱分析。OREC 伸缩振动峰是在 467 和 546 cm^{-1} 处, 910 和 3643 cm^{-1} 波长处代表 -OH 的伸缩振动峰, 1025 和 1050 cm^{-1} 代表 Si-O 伸缩振动峰, 1650 cm^{-1} 波长是 H_2O 的伸缩振动。在纳米粒子的光谱带中(a,b), OREC 3643 cm^{-1} 处伸缩振动峰消失了,这表明 OREC 的 -OH 与 HTCC 发生了静电或氢键作用。而 467 和 546 cm^{-1} 伸缩振动峰出现在图 4-2 b,表明 OREC 存在

于纳米粒子中。图 2-4 b 出现了 BSA 的 1397 cm^{-1} 特征吸收峰, 表示 BSA 成功地包裹入微球中。

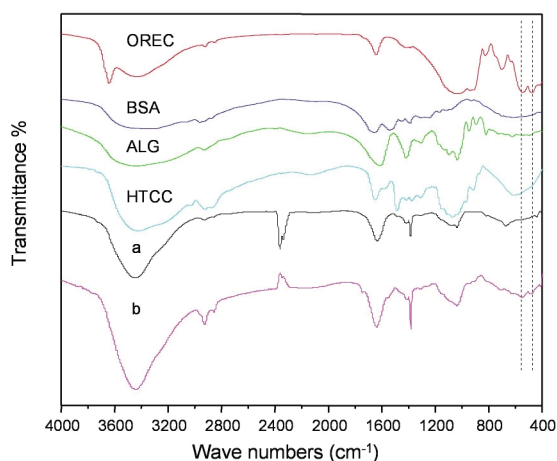


图 2 红外图谱

Fig. 2 FT-IR spectra of HTCC, ALG, OREC, BSA and nanoparticle: (a) ALG/HTCC nanoparticle (b) BSA- loaded ALG/HTCC/OREC

2.3 BSA 的包封率及载药量

BSA 的等电点为 4.80, 制备纳米的 pH 为 6.85, 带负电荷的 BSA 可以与 HTCC 静电相互作用而被包载于纳米粒中。BSA 的包封率及载药量实验结果如图 3 所示, a: HTCC; b: HTCC; OREC=12:1; c: HTCC; OREC=6:1; d: HTCC; OREC=3:1。实验结果显示, 与单纯 HTCC 组相比较, 加入 OREC 后, 包封率及载药量均明显提高 ($P<0.05$, 或 $P<0.01$)。单纯 HTCC 纳米粒子的包封率为 21.3%, 载药量为 13.8%; 而加入 OREC 后, 包封率最高可达 45.1%, 载药量最高可达 25.1%, 最低包封率仍可达 26.7%, 载药量为 16.2%。REC 比面积大, 具有较强的吸附能力, 能吸附并固定 BSA。

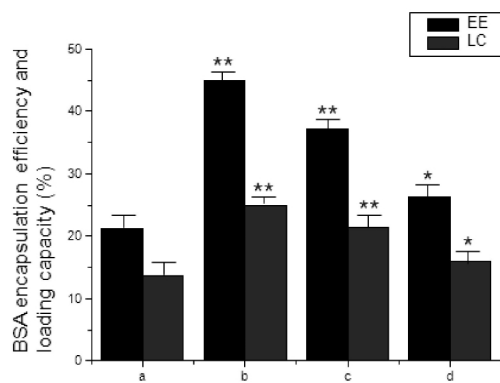


图 3 BSA 包裹率及载药量

Fig. 3 The encapsulation efficiency (EE) and loading capacity (LC) of nanoparticles: (a) NP0, (b) NP121, (c) NP61 and (d) NP31

3 讨论

纳米粒子具有体表面积大、表面反应反应活性高、吸附力强、催化效能高、易于进行表面修饰等特点。纳米载体作为药物控释和缓释的系统, 在药物运输方面具有非常突出的优越性^[12-14]。纳米载体可以延长药物的作用时间, 提高药物的靶向性, 还可

以减轻或避免药物的毒副作用; 此外, 纳米载体系统还可以提高药物的稳定性, 促进药物在体内的分布, 提高药物的疗效。研究表明, 相对于微米级的微球, 粒径为数百纳米的微粒可明显提高穿透上皮细胞的能力^[15,16]。

REC 经过十二烷基磺酸钠改性后得到 OREC, 改性后的 OREC 仍带有负电荷。但经过 HTCC 插层后, HTCC-OREC 带有比 HTCC 更强的正电荷^[17,18]。即 REC 首先与表面活性剂十二烷基磺酸钠作用改性, 接着与 CS 发生插层作用, 从而成为带有正电荷的疏水性高的 HTCC-OREC。正电荷有助于通过静电作用吸附 BSA^[19,20]。我们推测部分 HTCC 插入到了 OREC 层间, 部分附载于 OREC 的表层, 使得复合粒子的电荷增加。

因此, OREC 的引入增强了纳米粒子对 BSA 的包封率及载药量, 可能机制主要包含: (1) HTCC-OREC 表面疏水性和表面正电荷的增加, 使得其对 BSA 的吸附和固定能力增强, HTCC 能最大限度的包裹 BSA; (2) OREC 插层的存在, 使纳米粒子的比表面积增大, 使其能够更有效地接触到 BSA; (3) 纳米粒子吸附于 OREC 表面, 或吸附于 OREC 之间的夹层, OREC 能够吸附更多的 BSA。然而, 我们同时观察到, 随着 OREC 含量的增加, BSA 的包封率及载药量逐渐减小, 可能是由于 OREC 与 BSA 存在空间上的竞争。

我们利用 BSA 作为模型药物, 制备了壳聚糖季铵盐-OREC 复合物纳米微粒。壳聚糖/海藻酸盐/有机聚托石插层结构的复合材料, 具有良好的生物相容性, 可生物降解, 降解速率可调节, 无毒、无免疫原性, 材料来源广, 成本低, 与药物之间无相互影响。可以制备成微球、纳米纤维膜以及纳米粒子, 应用于蛋白模拟控释药物、口服药物、大脑给药等方面的研究, 具有广阔的应用前景。在本实验的基础上, 下一步, 我们将利用此载药系统, 制备胃肠道靶向药物系统, 通过进行动物体内实验, 评价其治疗效果, 为进一步的临床应用提供新的治疗途径和药物。

参考文献 (References)

- [1] Cai Q, Gu Z, Chen Y, et al. Degradation of chitosan by an electrochemical process[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 79: 783-785
- [2] Gan Q, Wang T. Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier-Systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2007, 59: 24-34
- [3] Dash M, Chiellini F, Ottenbrite RM, et al. Chitosan-A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications [J]. Progress in Polymer Science, 2011, 36: 981-1014
- [4] Han J, Li X. Chemoenzymatic syntheses of sialyl Lewis X chitosan conjugate as potential anti-inflammatory agent [J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 83: 137-143
- [5] E G. Heterogeneous catalysis on chitosan-based materials: a review [J]. Progress in Polymer Science, 2005, 30: 71-109
- [6] Fan M, Hu Q, Shen K. Preparation and structure of chitosan soluble in wide pH range [J]. Carbohydrate Polymers, 2009, 78: 66-71
- [7] I.M ES. Synthesis, characterization and metal uptake capacity of a new carboxymethyl chitosan derivative [J]. European Polymer Journal, 2009, 45: 199-210

(下转第 2036 页)

- tumors [J]. International Journal of Biomedical Engineering. 2012, 35 (4):224-229
- [2] Cucullo L, Dini G, Hallene K L, et al. Very low intensity alternating current decreases cell proliferation [J]. *Glia*, 2005, 51(1):65-72
- [3] Koreckij T D, Hill C, Azure L, et al. Low dose, alternating electric current inhibits growth of prostate cancer [J]. *The Prostate*, 2010, 70 (5):529-539
- [4] 杜松怀. 国家专利电子消痛贴 -- 高压静电场和微电流的独特治疗方法 [J]. *求医问药*, 2005, 3:32
- Du Song-huai. National patent of relieve pain adhesive plaster-high voltage electrostatic field and micro-current treatment methods [J]. *Journal for Beneficial Readings Drug Information & Medical Advices*, 2005, 3: 32
- [5] 杨启辉, 吴效明. 经颅微电流刺激对脑电波的增强效应 [J]. *中国医学物理学杂志*, 2011, 28(6):3025-3027
- Yang Qi-hui, Wu Xiao-ming. Cranial Electrotherapy Stimulation's Enhancement Effect on Brain Wave [J]. *Chinese Journal of Medical Physics*, 2011, 28(6):3025-3027
- [6] 王前, 钟世镇. 微电流刺激成骨细胞 DNA 和钙代谢特性研究 [J]. *中华实验外科杂志*, 1996, 13(2):123-124
- Wang Qian, Zhong Shi-zhen. Study of micro-current stimulation for osteoblast DNA and calcium metabolism [J]. *Chinese Journal of Experimental Surgery*, 1996, 13(2):123-124
- [7] Kirson ED, Gurvich Z, Schneiderman R, et al. Disruption of Cancer Cell Replication by Alternating Electric Fields [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(9):3288-3295
- [8] 方玉. 用于增生性疾病的低频微电场 / 电流治疗技术研发 [D]. 北京: 清华大学, 2010
- Fang Yu. The Development of Intermediate Frequency Micro-Electric Fields/Current Therapy Technique for Proliferative Diseases [D]. Beijing: Tsinghua University, 2010
- [9] Chen H, Liu R, Liu J, et al. Growth inhibition of malignant melanoma by intermediate frequency alternating electric fields, and the underlying mechanisms [J]. *J Int Med Res*, 2012, 40(1): 85-94
- [10] Tong J Q, Liu R T, Zhao L Y, et al. Inhibiting Human Breast Cancer Cells (MCF-7) with Alternating Micro-current at Intermediate Frequency (ACIF) in Vitro and in Vivo [C]. *World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering*. Beijing, China: Springer Berlin Heidelberg, 2013: 1596-1599
- [11] 刘骥, 高佩琦, 施永德, 等. 医用生物物理学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 70-71
- Liu Ji, Gao Pei-qi, Shi Yong-de, et al. *Medical Biophysics*, 4th ed [M]. Beijing: People's Health Publishing House, 2000:70-71
- [12] Kirson E D, Dbalý V, Tovarýš F, et al. Alternating electric fields arrest cell proliferation in animal tumor models and human brain tumors [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, 104(24):10152-10157.
- [13] 宋之乙, 辛育龄. 直流电治疗恶性肿瘤的进展 [J]. *国外医学 (肿瘤学分册)*, 1990, 5:257-260
- Song Zhi-yi, Xin Yu-ling. Advances in treatment of malignant tumors DC [J]. *Journal of International Oncology*, 1990, 5:257-260
- [14] Titushkin I, Cho M. Regulation of Cell Cytoskeleton and Membrane Mechanics by Electric Field: Role of Linker Proteins [J]. *Biophys J*, 2009, 96(2): 717-728

(上接第 2031 页)

- [8] Kadiyala I, Loo Y, Roy K, et al. Transport of chitosan-DNA nanoparticles in human intestinal M-cell model versus normal intestinal enterocytes [J]. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2010, 39:103-109
- [9] Lao SB, Zhang ZX, Xu HH, et al. Novel amphiphilic chitosan derivatives: Synthesis, characterization and micellar solubilization of rotenone [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2010, 82:1136-1142
- [10] Ma G, Yang D, Kennedy JF, et al. Synthesize and characterization of organic-soluble acylated chitosan [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2009, 75:390-394
- [11] Saber A, Strand SP, Ulfendahl M. Use of the biodegradable polymer chitosan as a vehicle for applying drugs to the inner ear [J]. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2010, 39:110-115
- [12] Chen Y, Liu YF, Tan HM, et al. Synthesis and characterization of a novel superabsorbent polymer of N,O-carboxymethyl chitosan graft copolymerized with vinyl monomers [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2009, 75:287-292
- [13] Xia W, Liu P, Zhang J, et al. Biological activities of chitosan and chito oligosaccharides [J]. *Food Hydrocolloids*, 2011, 25:170-179
- [14] Yalçınkaya S, Demetgül C, Timur M, et al. Electrochemical synthesis and characterization of polypyrrole/chitosan composite on platinum electrode: Its electrochemical and thermal behaviors [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2010, 79:908-913
- [15] Zhang Q, Deng S, Yu G, et al. Removal of perfluorooctane sulfonate from aqueous solution by crosslinked chitosan beads: Sorption kinetics and uptake mechanism [J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102: 2265-2271
- [16] Wan Ngah WS, Teong LC, Hanafiah MAKM. Adsorption of dyes and heavy metal ions by chitosan composites: A review [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2011, 83:1446-1456
- [17] Lord MS, Cheng B, McCarthy SJ, et al. The modulation of platelet adhesion and activation by chitosan through plasma and extracellular matrix proteins [J]. *Biomaterials*, 2011, 32: 6655-6662
- [18] Monier M, Ayad DM, Wei Y, et al. Adsorption of Cu(II), Co(II), and Ni(II) ions by modified magnetic chitosan chelating resin [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, 177:962-970
- [19] Shih CM, Shieh YT, Twu YK. Preparation of gold nanopowders and nanoparticles using chitosan suspensions [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2009, 78:309-315
- [20] Ziani K, Henrist C, Jérôme C, et al. Effect of nonionic surfactant and acidity on chitosan nanofibers with different molecular weights [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2011, 83:470-476