

· 实验研究 ·

胆甾醇基-普鲁兰多糖疏水改性材料的制备及其自组装性质的研究

杨文智¹, 李学敏¹, 陈红丽¹, 陈名懋¹, 刘玲蓉¹, 张其清^{1,2}

(1 中国医学科学院 北京协和医学院生物医学工程研究所, 天津市生物医学材料重点实验室, 天津 300192; 2 厦门大学生物医学工程研究中心 厦门大学医学院, 厦门市生物医学工程技术研究中心, 厦门 361005)

[摘要] 目的: 经琥珀酸间隔臂将胆甾醇连接到普鲁兰分子链上, 对普鲁兰多糖进行疏水改性, 获得不同取代度的胆甾醇基-普鲁兰 (cholesterol-modified pullulan, CHSP) 改性材料, 并研究 CHSP 材料在水中的自组装性质。方法: 利用 1-乙基-(3-二甲氨基羧基) 碳酰二亚胺盐酸盐 (EDC) 和 4-二甲氨基吡啶 (DMAP) 催化琥珀酰胆甾醇 (cholesterol succinate, CHS) 与普鲁兰多糖反应, 将琥珀酰胆甾醇接枝在普鲁兰分子链的羟基上, 得到疏水改性的普鲁兰多糖衍生物。应用傅立叶红外光谱仪 (Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR), 核磁共振仪 (proton nuclear magnetic resonance, ¹H-NMR) 对产物进行表征。利用透析法制备自组装纳米球。通过透射电镜 (transmission electron microscopy, TEM), 动态激光粒度分析仪 (dynamic laser light scattering, DLS) 表征了纳米粒的形态和粒径。以芘为荧光探针, 通过荧光检测分析, 测定 CHSP 的临界胶束浓度 (critical micellar concentration, CMC)。结果: 通过 FT-IR, ¹H-NMR 确证, 合成了胆甾醇接枝普鲁兰多糖材料。制备材料在水溶液中能够自组装成纳米粒。结论: 利用 EDC 和 DMAP 催化能够有效合成胆甾醇基-普鲁兰多糖改性材料, 此制备方法简单且易于操作。改性材料在水中有效自组装成纳米粒, 制备球形 CHSP 纳米粒有望成为疏水性药物载体。

[关键词] 普鲁兰; 琥珀酰胆甾醇; 自聚集纳米粒**[中图分类号]** R943 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2009)01-0073-06

Preparation of self-assembled cholesterol modified pullulan nanoparticles

YANG Wen-zhi¹, LI Xue-min¹, CHEN Hong-li¹, CHEN Ming-mao¹, LIU Ling-rong¹, ZHANG Qi-qing^{1,2}

(1 Institute of Biomedical Engineering, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China; 2 Research Center of Biomedical Engineering Medical School, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

[Abstract] Objective: To synthesize cholesterol-modified pullulan (CHSP) conjugates and to prepare self-assembled nanoparticles. **Methods:** The cholesterol-modified pullulan (CHSP) was prepared by the reaction of pullulan and cholesterol succinate (CHS) in DMSO, using EDC and DMAP as catalysts. The polymer structure was confirmed by the Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) and proton nuclear magnetic resonance (¹H-NMR). The self-assembled nanoparticles were analyzed by transmission electron microscopy (TEM), dynamic laser light scattering (DLS) and fluorescence spectroscopy. CHSP conjugates were amphiphilic in nature; their self-

[基金项目] 国家重大科学研究计划项目 (2006CB933300); 博士点基金 (20060023050)**[作者简介]** 杨文智, 男, 博士研究生。联系电话: (022) 87894007-8609, E-mail: wenzhi_yang@sina.com。**[通讯作者]** 张其清, 男, 研究员, 博士生导师, 主要从事生物材料、组织工程和药物制剂方面研究。联系电话: (022) 87890868, E-mail: zhangqiq@xmu.edu.cn。

aggregation behavior in aqueous media was evaluated by the fluorescence probe technique **Results:** The polymer was confirmed by FT-R and ¹H-NMR. The self-aggregated nanoparticle was a hydrophobic drug structure carrier **Conclusion:** The cholesterol-modified pullulan (CHSP) conjugates with different degrees of substitution (DS) have been successfully synthesized with pullulan and cholesterol succinate catalyzed by EDC/DMAP. The method is simple and easy to operate. The nanoparticle may be an excellent hydrophobic drug carrier

[**Key words**] pullulan; cholesterol succinate; self-assembled nanoparticles

普鲁兰多糖 (pullulan),中文亦译为茁霉多糖或短梗霉多糖,是出芽短梗霉发酵产生的胞外多糖。其基本结构为 -1,4糖苷键连接成的麦芽三糖重复单元再以 -1,6糖苷键聚合而成的直链状右旋葡聚糖^[1],结构式见图 1。它是无色、无味无臭的高分子物质,具有无毒、安全、耐热、耐盐、耐酸碱、黏度低、可塑性强、成膜性好等特点。在农产品、海产品保鲜、食品加工、环保、包装及医药等诸多领域上应用前景广阔^[2-3]。

糖^[1],结构式见图 1。它是无色、无味无臭的高分子物质,具有无毒、安全、耐热、耐盐、耐酸碱、黏度低、可塑性强、成膜性好等特点。在农产品、海产品保鲜、食品加工、环保、包装及医药等诸多领域上应用前景广阔^[2-3]。

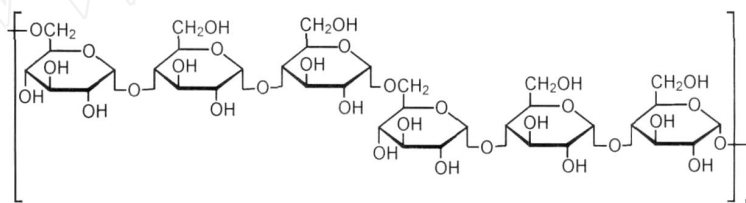


图 1 普鲁兰多糖分子结构单元

近年来,许多国家先后批准普鲁兰多糖用作食品添加剂或药用辅料。因此,对于它的相关研究论文日益增多,对普鲁兰多糖的化学改性是研究热点之一,而将普鲁兰多糖改性为两亲性高分子材料,将其应用于生物医药领域是普鲁兰化学改性的研究重点方向。小分子接枝疏水改性普鲁兰多糖是通过化学反应,键合疏水小分子基团而完成。文献报道,常用 2 类小分子基团对普鲁兰多糖疏水改性,即脂肪长链和胆甾类化合物。例如,通过乙酰化疏水改性的普鲁兰多糖材料,在水中形成稳定的纳米颗粒并能有效包载氯硝西洋,达到缓慢释放的目的^[4]。这与我们报道系列疏水改性多糖载药性质是一致的^[5-6]。而通过己二异氰酸酯将胆甾醇基连接到普鲁兰分子链上,可获得自组装凝胶纳米粒,相关文献对其物化性质做出深入研究^[7-9]。但己二异氰酸酯本身易燃、有毒且属于身体外源性物质,因此用其作为普鲁兰材料改性的间隔臂并非是最好的选择。而琥珀酸是人体三羧酸循环的一个重要物质,选用其作为疏水改性材料的间隔臂,合成胆甾醇基普鲁兰多糖改性材料,要优于己二异氰酸酯间隔臂。基于此,本研究报道用琥珀酸作间隔臂,在 EDC/DMAP 催化下,将胆甾醇接枝到普鲁

兰多糖上,获得不同取代度的琥珀酰胆甾醇改性的普鲁兰多糖 (CHSP) 材料。实验表明,合适取代度的 CHSP 材料,在水溶液中能有效形成自聚集纳米胶束。而且胶束性质表明,其可能成为疏水性药物的载体。

材料与方法

1 仪器与试剂

透射电镜 (JEM-100CX, 日本); 探头超声 (UH-500A, AUTOMATIC SCIENCE INSTRUMENT CO. LTD); 冷冻干燥机 (LABCONCO, 美国); 核磁共振仪 (VARNA NOVA 500MHz, 美国); 傅立叶变换红外光谱仪 (FTS 3000, B D-RAD, 美国); 荧光分光光度计 (F-4500, 日本); 动态激光粒度分析仪 (BI-90US, 日本)。

普鲁兰 (北京梅尔森医药技术开发有限公司, Mw = 180 × 10³); 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐 (1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride, 简写“EDC”, 上海共价化学科技有限公司); 4-二甲氨基吡啶 (4-Dimethylaminopyridine, 简写“DMAP”, Aldrich 公司); 胆甾醇

(分析纯,北京鼎国生物技术有限责任公司);琥珀酸酐(分析纯,天津市福晨化学试剂厂);透析袋(Mw 8000-12000,美国),其余试剂均为分析纯,由

天津大学科威公司提供。

2 胆甾醇基-普鲁兰(CHSP)的合成

2.1 合成路线 CHSP的合成路线见图 2。

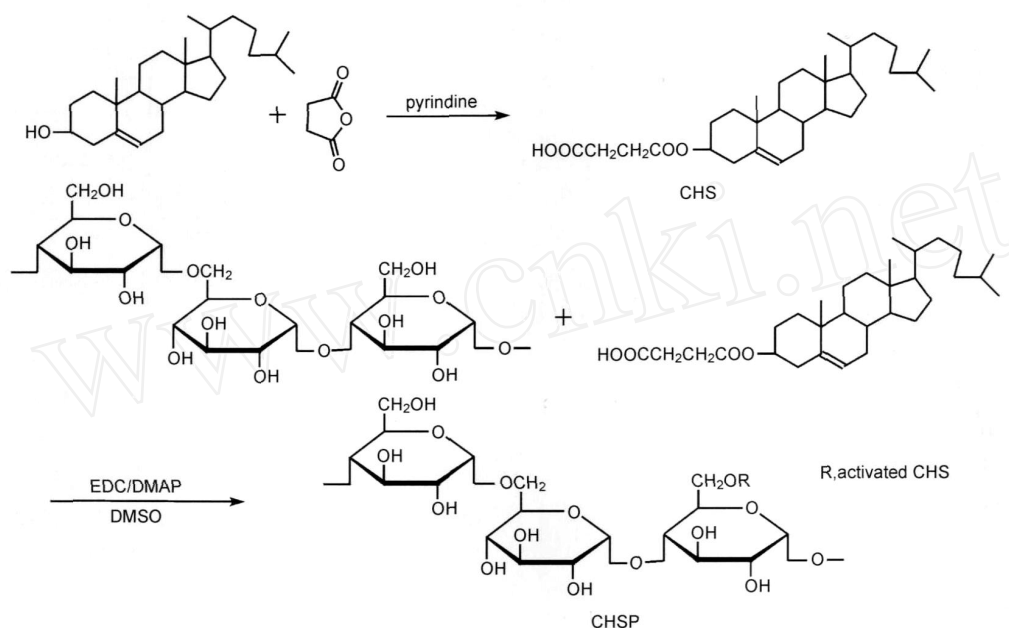


图 2 合成 CHSP 的方法

2.2 合成方法 胆甾醇 2.5 g (6.5 mmol) 和琥珀酸酐 2.0 g (20 mmol) 溶解于 20 mL 除水吡啶中, 室温反应 48 h 后停止反应, 反应液滴入 pH = 1 ~ 2 的冰盐酸溶液中, 析出白色絮状沉淀。冷藏过夜, 抽滤, 收集沉淀。沉淀用蒸馏水洗至 pH > 5, 于乙酸乙酯/乙醇中重结晶, 80 °C 下干燥, 得白色针状琥珀酰胆甾醇 (CHS) 纯品 2.0 g。

取普鲁兰样品 0.5 g 溶解于 15 mL 除水的二甲基亚砜中, 备用; 取一定量的琥珀酰胆甾醇 (CHS)、4-二甲氨基吡啶 (DMAP/CHS = 1, mmol/mmol)、(EDC/CHS = 1.2, mmol/mmol), 溶解于 10 mL 的 DMSO 中, 室温搅拌, 反应活化 1 h, 将活化反应液滴入普鲁兰溶液中, 反应 48 h, 停止反应。将反应液滴入 200 mL 无水乙醇中, 析出白色沉淀, 抽滤, 分别用适量的乙醇、四氢呋喃和乙醚洗涤产物, 80 °C 下干燥, 备用。

3 红外光谱分析

样品与 KBr 粉末混研压片后, 在 500 ~ 4000 cm^{-1} 范围进行扫描。

4 核磁共振分析

采用 VARNA NOVA 500 MHz 型核磁共振仪测定接枝产物的核磁共振图谱, 以 $\text{DMSO-}d_6$ 为溶剂。

5 自组装纳米球的制备

透析法制备 CHSP 自聚集凝胶纳米粒: 取接枝材料 CHSP 20 mg, 加入 1 mL 的 DMSO 溶剂溶解。溶液转入透析袋, 放入 3 L 蒸馏水中, 每隔 8 h 换水, 透析 48 h, 将 DMSO 透析干净。透析完毕, 定容, 100 W 功率超声 10 s, 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤。铜网制样, 2% 磷钨酸染色, TEM 观察形态。DLS 测定样品粒径大小。

6 临界胶束浓度 (CMC) 的测定

超声分散法制备 CHSP 自聚集凝胶纳米粒: 精密称取 CHSP 材料加入适量蒸馏水, 于 37 °C, 500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的空气震荡器中震荡 24 ~ 48 h。将溶胀的 CHSP 溶液进行超声处理 (输出功率为 100 W, 为防止样品溶液生热采用间歇脉冲工作方式: 脉冲宽度为 2.0 s, 间歇时间为 2.0 s), 重复操作至获得均一分散液, 在容量瓶中定容, 测其临界胶束 (CMC) 浓度。

取 10 mL 量瓶, 加入适当浓度的花的甲醇溶液,

氮气吹干。分别加入一定浓度的 CHSP 溶液,使芫最终浓度定为 $3 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。超声 40 min 后转移至 37 水浴振荡 1 h。取样测定,在激发波长 334 nm 处,350 ~ 450 nm 范围扫描,得到荧光发射光谱。记录 372 和 383 nm 处的荧光吸收强度 I_{372} 和 I_{383} ,以 I_{372} / I_{383} 对浓度 $C (\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$ 的对数值 $\lg C$ 作图,求出 CMC。

结果与讨论

1 红外光谱

普鲁兰、CHSP、胆甾醇和 CHS 的红外图谱见图 3。

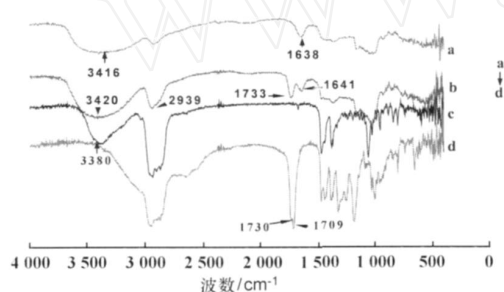


图 3 普鲁兰 (a)、CHSP (b)、胆甾醇 (c) 和 CHS (d) 的红外图谱

从图 3 可以看出,胆甾醇琥珀酰化后,在 3380 cm^{-1} 附近 -OH 伸缩振动吸收峰完全消失,这说明胆甾醇上的 3-OH 琥珀酰酯化完全。与胆甾醇相比,琥珀酰胆甾醇在 1730 和 1709 cm^{-1} 出现 2 个新的吸收峰,它分别为酯羰基峰和另一游离羧基的羰基振动吸收峰。红外图谱表明单琥珀酰胆甾醇 (CHS) 已合成。

普鲁兰多糖含有多个羟基,所以其在 3400 cm^{-1} 附近有较强的 -OH 伸缩振动吸收峰。由于 CHS 投料量为普鲁兰 6 羟基总量的 0.1 ~ 0.2 (物质的量比),CHSP 依旧有大量羟基存在,故其 3400 cm^{-1} 附近依旧显示较强的 -OH 伸缩振动吸收峰。CHSP 在 1733 cm^{-1} 附近处出现一个明显的酯羰基吸收峰^[10],而 1709 cm^{-1} 附近的羧基峰消失。而 2939 cm^{-1} 附近的甲基和亚甲基的吸收峰明显增强,这些说明 CHS 接枝到普鲁兰多糖上。

2 核磁共振分析

2.1 核磁共振图谱 普鲁兰和 CHSP 的核磁共振图谱见图 4。

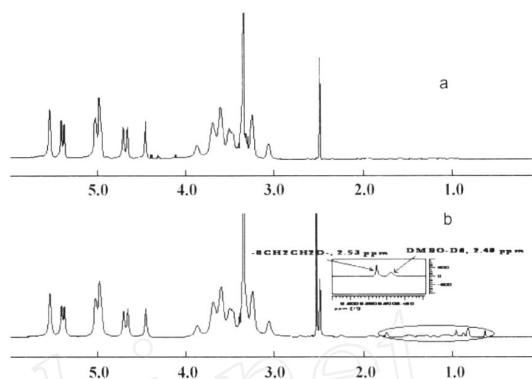


图 4 普鲁兰 (a) 和 CHSP (b) 的核磁共振图谱

2.2 琥珀酰胆甾醇 (CHS) 合成 白色针晶, mp: 179 ~ 180, $^1\text{H NMR}$ (加 TMS 的 CDCl_3 做核磁溶剂, ppm): 0.67 (3H, s, 18- H_3), 0.8 ~ 2.4 (28H, 1- H_2 , 2- H_2 , 4- H_2 , 7- H_2 , 8- H_1 , 9- H_1 , 11- H_2 , 12- H_2 , 14- H_1 , 15- H_2 , 16- H_2 , 17- H_1 , 20- H_1 , 22- H_2 , 23- H_2 , 24- H_2 , 25- H_1), 0.86 (6H, d, $J = 9 \text{ Hz}$, 26- H_3 , 27- H_3), 0.91 (3H, d, $J = 7 \text{ Hz}$, 21- H_3), 1.02 (3H, s, 19- H_3), 2.60 (2H, m, COCH_2), 2.68 (2H, m, CH_2CO), 4.63 (1H, m, 3- H_1), 5.37 (1H, m, 6- H_1)。

2.3 琥珀酰胆甾醇接枝普鲁兰 (CHSP) 合成 普鲁兰的 $^1\text{H NMR}$ (加 TMS 的 $\text{DMSO}-d_6$ 做核磁溶剂, ppm): 0.60 ~ 2.40 (胆甾醇骨架上的氢), 糖单元上氢依次为: 2.60 ~ 4.60 (2H, 3H, 4H, 5H, 6H), 4.60 (1H₍₁₋₆₎), 5.05 (1H₍₁₋₄₎), 4.60 ~ 5.40 (-OH); 而 CHSP 的 $^1\text{H NMR}$ (加 TMS 的 $\text{DMSO}-d_6$ 做核磁溶剂, ppm): 与普鲁兰相比,出现新的核磁峰 0.40 ~ 2.40 (胆甾醇骨架上的氢), 2.53 (2 个亚甲基, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$) ppm。从图 4 中可以看出,普鲁兰多糖的图谱中, 4.60 (1H₍₁₋₆₎) 与 5.05 (1H₍₁₋₄₎) 易于分辨^[10]。CHSP 图谱中 2.53 (4H, $\text{CHS}-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$) 易于分辨,可用峰面积比值来计算得到胆甾醇在普鲁兰多糖上的取代度 (DS%)。 $\text{DS} / \% = (A_{2.53} / 4) / (A_{4.60} + A_{5.05}) \times 100\%$ 。根据公式最终计算得出 2 批样品的取代度分别约为 5.37% 和 5.70%, 结果见表 1。

表 1 CHSP 样品的粒径及其 CMC

样品	投料比 ^a	取代度 ^b	粒径 / nm	分散系数	CMC / $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$
CHSP1	1/10	5.37	68.7 ± 2.0	158 ± 0.92	0.038
CHSP2	1/5	5.70	51.8 ± 1.5	209 ± 0.91	0.0076

a: (CHS/普鲁兰)普鲁兰物质的量是通过 6-OH 物质的量计算获得; b: 每 100 个糖单元所接枝的胆甾醇数

2.4 CHSP的取代度 (DS%) 从表 1 中可以看出,随着投料比例的增加,普鲁兰多糖链上的胆甾醇取代度略有增大。但实际取代度低于投料时两者的质量比。可能普鲁兰多糖链在溶剂中以卷曲的柔性链存在,而接入一定量胆固醇后,接枝的胆固醇显示较大的分子空间位阻,直接影响琥珀酰胆甾醇进一步与普鲁兰多糖链上羟基的酯化反应,反应难度明显加大,故取代度变化较小。

3 透射电镜以及粒径分析

两亲性接枝高分子材料 (CHSP) 在水溶液中以胶束存在,所形成的纳米球呈圆形或椭圆形,结果见图 5。透射电镜表明,胶束平均粒径在 60 nm 左右。粒径分析图表明,胶束平均粒径在 50 ~ 70 nm 左右。CHSP 自聚集水凝胶纳米粒具有核壳结构,胆固醇疏水基相互作用产生非共价键交联点从外水相分离而形成内核,内核被亲水分子链形成的壳包裹。

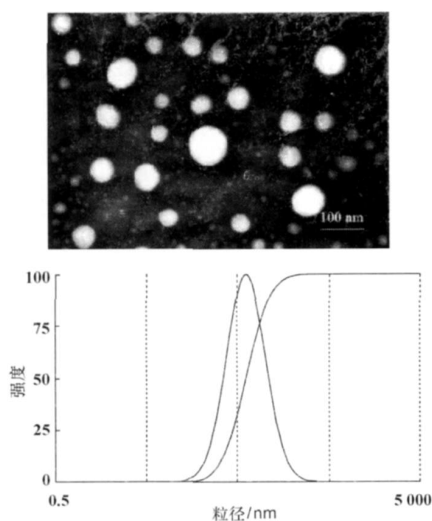


图 5 CHSP₁ 透射电镜照片及粒径分布

4 CMC 测定结果

芘为一种脂溶性荧光探针,由于溶解度的原因,加之自猝灭作用,其在极性环境中的荧光极弱,而在非极性环境中的荧光很强。因此,当极性溶剂中有胶束或疏水结构域生成时,芘分子自发由极性环境向非极性环境转移,造成溶液中荧光强度的显著增加。此外,当溶液中芘的浓度小于 $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,其精细结构单体的激发态荧光依次在 372, 379, 383, 390, 397 nm 附近出现 5 重发射峰,一般通过 I_{372} / I_{383} 的比值变化来定性或定量衡量胶束溶液中胶束浓度的变化。本实验选用芘作为荧光探针,采用稳态荧光探针法考察 CHSP 的两亲性,并检测其在

水溶液中的临界聚集浓度 (CMC)^[11-12]。由图 6 荧光扫描曲线可以看出,随着 CHSP₁ 浓度增大,在 383 nm 处的荧光吸收峰逐渐增强,说明随着胶束浓度的增大,芘由水中转移到自聚集的纳米粒疏水核心中。

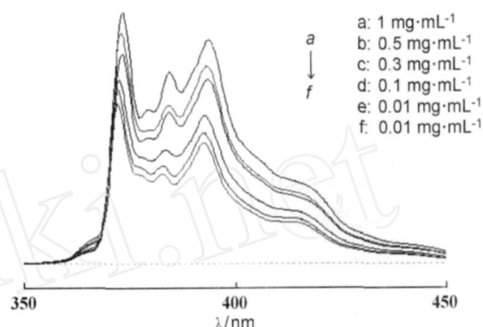


图 6 CHSP₁ 在生理氯化钠溶液中的荧光发射光谱

将 CHSP₁ 胶束溶液测定的 I_{372} / I_{383} 对 $\text{Log}C$ 作图,图 7 显示出 I_{372} / I_{383} 比值随着 CHSP₁ 浓度的变化趋势。在较小的胶束浓度时, I_{372} / I_{383} 值为 1.85,与芘在水中的值基本一致。当浓度达到临界胶束浓度 (CMC) 时,随着胶束浓度增大, I_{372} / I_{383} 值呈线性降低。对曲线两端进行线性拟合,其交点对应的浓度即为样品 CHSP₁ 的临界聚集浓度,结果见表 1。实验表明:胆甾醇通过间隔臂琥珀酸引入普鲁兰多糖分子,使它性质发生根本改变而具有两亲性,能在水溶液中自发形成由微疏水结构域组成的聚集体,即自聚集纳米粒。而胆甾醇基间的疏水作用力是形成这种自聚集纳米粒的根本原因。

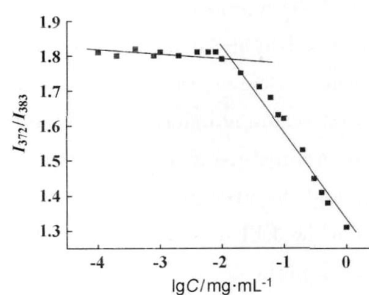


图 7 CHSP₁ 荧光发射光谱 I_{372} / I_{383} 与 $\text{lg}C$ 之间的关系

在 CHSP 中,当胆甾醇取代度达到 5% 以上时,多糖分子链上疏水的胆甾醇基团能够提供足够的疏水空间,亲水的普鲁兰多糖链分布在胶束的表面,使材料在水中自聚集成纳米粒。但是,随着 CHSP 取代

(下转第 83 页)

- [11] WATNASR ICHA IKUL S, DAV IES NM, RADES T, *et al* Preparation of biodegradable insulin nanocapsules from biocompatible microemulsions[J]. *Pham Res*, 2000, 17(6): 684 - 689.
- [12] SENATRA D. Comparative analysis of complex liquids based on a multi-experimental approach [J]. *Adv Colloid Interface Sci*, 2006, 128 - 130: 65 - 75.
- [13] SENATRA D. Dielectric analysis and differential scanning calorimetry of water-in-oil microemulsions[J]. *Adv Colloid Interface Sci*, 2006, 123 - 126: 415 - 424.
- [14] KANG BK, LEE JS, CHON SK, *et al* Development of self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS) for oral bioavailability enhancement of simvastatin in beagle dogs [J]. *Int J Pharm*, 2004, 274(1-2): 65 - 73.
- [15] MA JX, ZHU GK Guide Book of Scanning Electron Microscope [M]. Beijing: Science Press, 1985: 140 - 143.
- [16] CONSTANTIN DES PP, SCALART JP. Formulation and physical characterization of water-in-oil microemulsions containing long-versus medium-chain glycerides [J]. *Int J Pharm*, 1997, 158(1): 57 - 68.
- [17] PODLOGAR F, GASPERL N M, TOMSIC M, *et al* Structural characterisation of water-Tween 40/Inwitor 308-isopropyl myristate microemulsions using different experimental methods[J]. *Int J Pharm*, 2004, 276(1-2): 115 - 128.
- [18] DJORDJEVIĆ L, PR MORAC M, STUPAR M, *et al* Characterization of caprylocaproyl macroglyglycerides based microemulsion drug delivery vehicles for an amphiphilic drug[J]. *Int J Pharm*, 2004, 271(1-2): 11 - 19.

编辑:周卓 接受日期:2008-06-25

(上接第 77 页)

度达到 6%以上,材料表现出强疏水性,反而不利于 CHSP 材料在水中顺利形成自聚集凝胶纳米粒。CHSP 自聚集纳米粒的 CMC 随胆甾醇基取代度增大,CMC 浓度显著变小,说明当取代度达到一定程度后,接枝的胆甾醇基量稍有增加也会对材料性质发生显著影响。

结 论

使用 EDC 和 DMAP 联合催化琥珀酰胆甾醇与普鲁兰多糖的反应,能够有效获得疏水改性的胆甾醇基普鲁兰多糖材料。通过调节琥珀酰胆甾醇与普鲁兰多糖的投料比来控制接枝反应的取代度,从而筛选出合适取代度的 CHSP。该反应易操作、反应条件温和、后处理过程简单且易除去使用的有机溶剂。优选的接枝产物通过透析法能自组装成纳米球,并有望成为疏水性药物载体,而对于疏水性药物的载药评价正在进一步研究中。

[参 考 文 献]

- [1] WALLENFELS K, BENDER H. Procedure for the production of a dextran-like polysaccharide from Pullularia pullulans: German Patent, 1096850[P]. 1961 - 01 - 01.
- [2] KMOTO T, SHIBUYA T, SHIBARA S. Safety studies of a novel starch, pullulan: chronic toxicity in rats and bacterial mutagenicity[J]. *Food Chem Toxicol*, 1997, 35(3-4): 323 - 329.
- [3] LEATHERS TD. Biotechnological production and applications of pullulan[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, 62(5-6): 468 - 473.
- [4] JUNG SW, JEONG YI, KM SH. Characterization of hydrophobized pullulan with various hydrophobicities [J]. *Int J Pharm*, 2003, 254(2): 109 - 121.
- [5] WANG YS, LU LR, JANG Q, *et al* Self-aggregated nanoparticles of cholesterol-modified chitosan conjugate as a novel carrier of epirubicin[J]. *Eur Polym J*, 2007, 43(1): 43 - 51.
- [6] YANG XD, ZHANG QQ, WANG YS, *et al* Self-aggregated nanoparticles from methoxy poly(ethylene glycol)-modified chitosan: Synthesis, characterization, aggregation and methotrexate release *in vitro* [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2008, 61(2): 125 - 131.
- [7] AKIYOSHI K, DEGUCHI S, TAJMA H, *et al* Microscopic structure and thermoresponsiveness of a hydrogel nanoparticle by self-assembly of a hydrophobized polysaccharide [J]. *Macromolecules*, 1997, 30(4): 857 - 861.
- [8] DEGUCHI S, KURODA K, AKIYOSHI K, *et al* Gelation of cholesterol-bearing pullulan by surfactant and its rheology [J]. *Colloids Surf A Physicochemical and Engineering Aspects*, 1999, 147(1-2): 203 - 211.
- [9] LEE S, AKIYOSHI K. Single molecular mechanics of a cholesterol-bearing pullulan nanogel at the hydrophobic interfaces [J]. *Biomaterials*, 2004, 25(15): 2911 - 2918.
- [10] MOREIRA JN, ALMEIDA LM, GERALDES CF, *et al* Carboplatin liposomes coated with Octadecylpullulan: *in vitro* characterization [J]. *Int J Pharm*, 1997, 147(2): 153 - 164.
- [11] LEE KY, JO WH, KWON IC, *et al* Physicochemical characteristics of self-aggregates of hydrophobically modified chitosans [J]. *Langmuir*, 1998, 14(9): 2329 - 2332.
- [12] LIU WG, ZHANG X, SUN SG, *et al* Self-aggregation behavior of N-alkylated chitosan and its effect on the release of hydrophobic drug [J]. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2003, 14(8): 851 - 859.

编辑:周卓 接受日期:2008-07-18