

脱氧胆酸改性普鲁兰多糖纳米粒子制备与表征*

史艳萍¹,李学敏²,陈宝泉¹,黄玉平¹,张其清^{2,3}

(1. 天津理工大学 化学化工学院,天津 300384,2. 中国医学科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;3. 厦门大学 医学院生物医学工程研究中心,福建 厦门 361005)

摘要: 通过酯化反应将脱氧胆酸偶联于普鲁兰多糖骨架形成具有两亲性的普鲁兰多糖衍生物(DP),采用纳米沉淀法制备纳米粒子(DPNs),考察制备条件对纳米粒子性质影响,为进一步将其作为药物载体的研究提供基础。衍生物 DP 结构通过 FT-IR 和 ¹H NMR 表征,DPNs 经透射电镜、动态光散射仪和 zeta 电位仪表征检测。获得不同取代度脱氧胆酸改性普鲁兰多糖衍生物,制备得到的纳米粒子呈球形,表面光滑规整,平均粒径 100~300nm,zeta 电位在 -20mV 左右。脱氧胆酸改性普鲁兰多糖衍生物通过纳米沉淀法能制备出纳米粒子,颗粒性质受制备条件影响。

关键词: 脱氧胆酸;普鲁兰多糖;纳米粒子;纳米沉淀法;自组装

中图分类号: TQ050.4⁺25

文献标识码:A

文章编号:1001-9731(2012)02-0181-04

1 引言

普鲁兰多糖是由 α -1,4 糖苷键连接的麦芽三糖重复单位经 α -1,6 糖苷键聚合而成的一种天然高分子多糖,合成示意图如图 1 所示。易溶于水,具有良好的生物相容性,已广泛应用于医药行业^[1,2]。近年来,其作为药物载体的研究越来越受到重视。通过疏水改性的普鲁兰多糖具有两亲性,能够自组装为可负载药物的纳米粒子,成为纳米药物载体研究的热点^[3-7]。

脱氧胆酸是人体内存在的一种游离胆汁酸,分子结构中具有亲水基团羟基、羧基和疏水基团甾环,所以具有乳化作用,在体内发挥促进脂类物质消化吸收的生理作用。脱氧胆酸中的羧基可与多糖骨架上的羟基形成酯键,使其偶联于多糖,使疏水基团甾环游离从而达到对多糖疏水改性的目的^[8]。

本文选用生物相容性好的普鲁兰多糖和脱氧胆酸为原料,通过酯化反应,合成脱氧胆酸改性的普鲁兰多糖衍生物,使其能在水中通过分子间作用力自聚集成纳米粒子。通过对衍生物及其制备的纳米粒子理化性能进行表征,为进一步将其作为肿瘤靶向药物载体的研究提供依据。

2 材料与仪器

普鲁兰多糖(Pullulan, M_w 200000 Hayashibara

Tokyo, Japan);脱氧胆酸(Deoxycholic acid Sigma Co., St. Louis, MO, USA)1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCl, 上海共价化学品公司);4-二甲基氨基吡啶(DMAP, Sigma Co., St. Louis, MO, USA);二甲基亚砜(DMSO),二氯甲烷(天津大学科威公司);其它试剂均为分析纯。

INOVA 500 液体核磁共振波谱仪;BIO-RAD Merlin 红外光谱仪;WCJ803 型自动控温式加热磁力搅拌器;PHILIPS TECNAI-20 场发射透射电子显微镜;BI-90Plus 激光粒度仪;Labcocon 冷冻干燥机;SpectraMax 384 Plus 酶标仪;透析袋:截留分子量 8000~14000;Centricon YM-100 超滤管:截留分子量 100000。

3 实验方法

3.1 DP 的合成与表征

在 100mL 锥形瓶中加入 16mL 无水 DMSO、脱氧胆酸(1699.2mg)、EDC·HCl(331.3mg)和 DMAP 少许,室温反应 0.5h,然后加入不同量的普鲁兰多糖,在室温下反应数天。将反应液放入透析袋(截留分子量 8000~14000)中在 3L 去离子水中透析 6d,每 0.5h 换透析液一次。透析结束后,将透析袋中白色沉淀进行抽滤,在滤纸上得到白色固体,分别用大量二氯甲烷和去离子水洗涤,干燥后得到白色粉末产物。

用红外光谱仪(KBr 片)、¹H NMR(DMSO-d₆)和¹³C NMR(DMSO-d₆)进行表征。取代度 DS = 每 100 个糖基上的脱氧胆酸残基数。

3.2 DPNs 的制备及纯化

取不同取代度 DP 溶解于 DMSO 中,将 DMSO 溶液持续缓慢加入到低速搅拌的去离子水中,随着 DMSO 的加入,去离子水由无色透明逐渐变成具有蓝色乳光的均一纳米悬液。将纳米悬液放入透析袋中,使用去离子水进行透析 6h,每隔 30min 更换一次去离子水。透析结束后,将透析液放入超滤管,在转速 1500r/min 下,离心 15min 进行超滤浓缩。超滤液冷冻干燥后得到的白色粉末为最终固体纳米粒子。

3.3 DPNs 的表征

DPNs 形态以透射电子显微镜观察,粒径大小、粒径分布用 Brookhaven BI-90 Plus 粒径测定仪测定。

* 基金项目:国家重大科学研究计划资助项目(2006CB933300);国家教育部博士点基金资助项目(20101106110042)

收到初稿日期:2011-06-22

收到修改稿日期:2011-11-28

通讯作者:张其清

作者简介:史艳萍(1978-),女,山西晋中人,博士,主要从事生物材料和纳米药物载体研究。

zeta 电位仪测定表面电位。

4 结果与讨论

4.1 DP 合成和表征

该衍生物的化学合成过程是一个酯化反应(见图

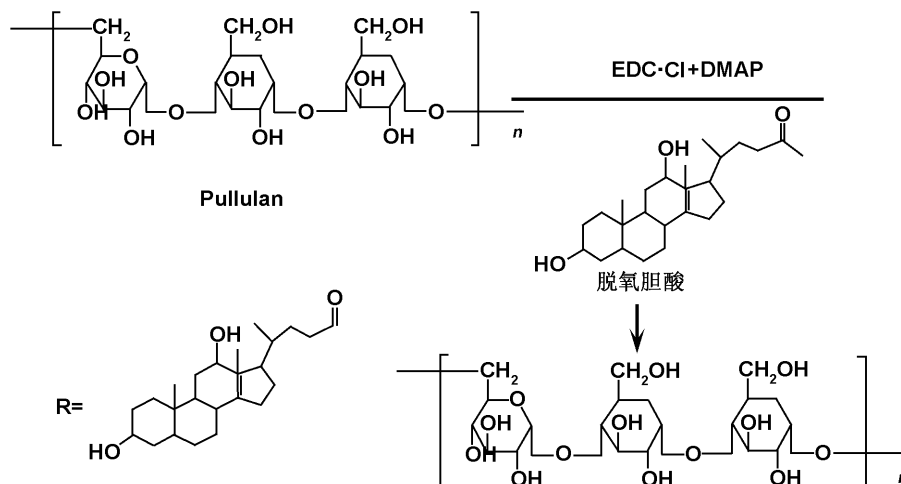


图1 脱氧胆酸改性普鲁兰多糖衍生物合成示意图

Fig 1 Schematic representation of the synthesis of deoxycholic acid-modified pullulan

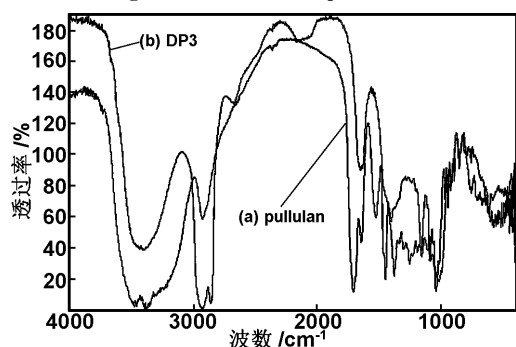


图2 普鲁兰多糖及脱氧胆酸改性普鲁兰多糖衍生物 FT-IR 图谱

Fig 2 FT-IR spectra of pullulan and DP

3400~3200 cm^{-1} 处宽而强的吸收峰是 $\nu_{\text{O-H}}$,1200~1030 cm^{-1} 处宽大峰是 $\nu_{\text{C-O}}$,这些宽大的钝峰是糖类特征峰。随着羟基的酰化, $\nu_{\text{O-H}}$ 处的宽峰有所减小。3000~2850 cm^{-1} 处出现很强的吸收峰,这是甾环C—H伸缩振动的特点;更具特征的是在1700 cm^{-1} 处出现一强峰,为羰基伸缩振动峰,说明有酯键形成,即脱氧胆酸与普鲁兰多糖已发生酯化反应^[9]。为进一步确定衍生物结构,如图3所示,¹H NMR(DMSO- d_6)图谱,普鲁兰多糖:¹H NMR δ : 2.60~4.20(6H, $\text{H}_{2,3,4,5,6,6'}$), 4.545(¹H, $\text{H}_{1a1,6}$), 5.048(¹H, $\text{H}_{1a1,4}$), 4.20~5.8(12H, OH); DP的¹H NMR δ : 3.0~3.90(6H, $\text{H}_{2,3,4,5,6,6'}$),在0.5~2.1处出现多重峰是脱氧胆酸残基中甾环特征峰,1.0(C_{10} 和 C_{13} 上角甲基)^[10]。研究结果表明脱氧胆酸改性普鲁兰多糖衍生物已合成。

4.2 DPNs 制备与表征

图4(a)粒径分布图显示本文制备的纳米粒子呈单相分布,粒径在100~300nm左右,随取代度增加粒

径减少。脱氧胆酸取代度的增加,使聚合物上游离的脱氧胆酸疏水链段增多。聚合物在水相中形成纳米粒子时,疏水链段相互的疏水作用增强,形成的纳米粒子粒径就较小。zeta 电位测定显示 DPNs 在去离子水中的 zeta 电位为-20mV 左右(图4(b)),制备过程中加入聚乙烯醇(PVA)则 DPNs 的 zeta 电位增加为-7mV。分析原因可能为 PVA 吸附在颗粒表面,使表面电位趋向中性。

以普鲁兰多糖为对照,脱氧胆酸改性普鲁兰多糖衍生物的红外光谱如图2所示。

径减少。脱氧胆酸取代度的增加,使聚合物上游离的脱氧胆酸疏水链段增多。聚合物在水相中形成纳米粒子时,疏水链段相互的疏水作用增强,形成的纳米粒子粒径就较小。zeta 电位测定显示 DPNs 在去离子水中的 zeta 电位为-20mV 左右(图4(b)),制备过程中加入聚乙烯醇(PVA)则 DPNs 的 zeta 电位增加为-7mV。分析原因可能为 PVA 吸附在颗粒表面,使表面电位趋向中性。

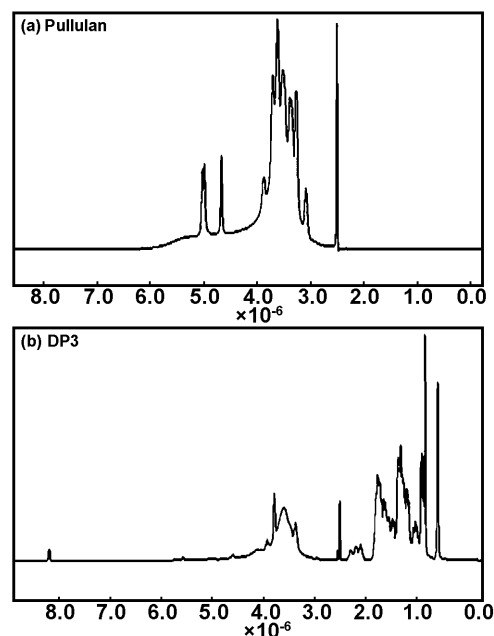


图3 普鲁兰多糖及脱氧胆酸改性普鲁兰多糖衍生物¹H NMR 谱

Fig 3 ¹H NMR spectra of pullulan and DP

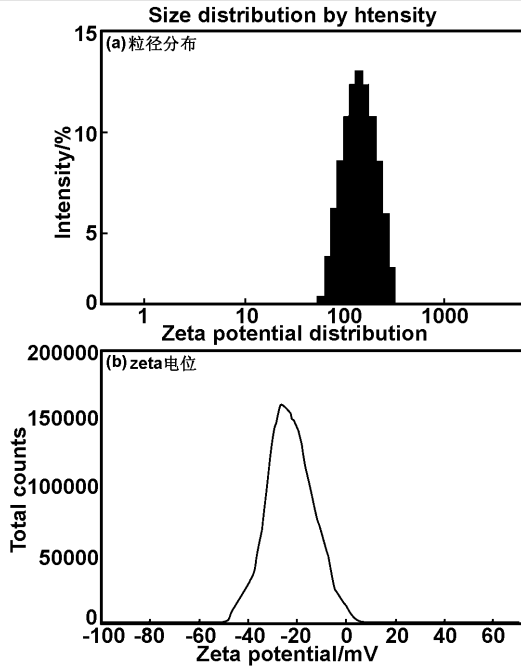


图4 脱氧胆酸改性普鲁兰多糖衍生物纳米粒子粒径分布及 zeta 电位

Fig 4 Typical size distribution and zeta potential of nanoparticles

图5透射电镜照片显示纳米粒子为圆形,表面光滑规整,分布均一,粒径小于粒径分析仪测定的结果。原因在于透射电镜是干态的情况,而粒径分析仪进行粒径分析的介质是溶液,反映为水合粒径。纳米粒子在液体环境中会有一些溶胀现象,颗粒外周和其周围水分子形成一个水合层,粒径较大。

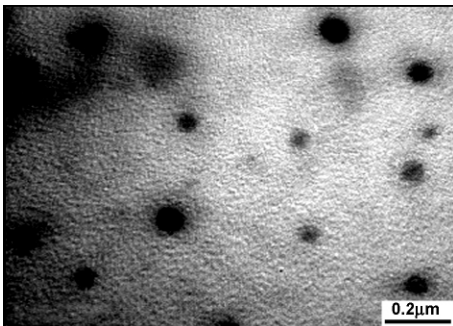


图5 脱氧胆酸改性普鲁兰多糖衍生物纳米粒子粒径透射电子显微镜照片

Fig 5 TEM images of DPNs

4.3 制备条件对纳米粒子形成的影响

本文选用纳米沉淀法制备纳米粒子,由于借助的是有机相-水相体系内部相变时转换的能量来克服界面能,所以无需强烈的机械作用^[11]。

选择不同取代度的聚合物(DP1、DP2、DP3 取代度分别为 75.81、86.91、88)浓度分别是 10、20、30 和 50mg/mL,有机相为 DMSO,水相为去离子水,V(有机相):V(水相)=1:5、1:10、1:15、1:20、1:25 等条件进行纳米粒子制备。能够制备形成纳米粒子条件及粒径大小如表1所示,其它条件下则在制备或透析时出现不同程度絮状沉淀。

表1 制备纳米粒子条件及粒径(nm)

Table 1 The preparation condition and size of nanoparticles (nm)

DP	聚合物浓度 (mg/mL)	V(有机相):V(水相)	平均粒径 (nm)
DP1	20	1:20	269.7
DP1	20	1:25	263.0
DP2	10	1:5	275.1
DP2	10	1:10	351.1
DP2	10	1:15	264.1
DP2	10	1:20	294.0
DP2	10	1:25	292.0
DP3	20	1:5	119.5
DP3	20	1:10	155.4
DP3	20	1:15	122.3
DP3	20	1:20	126.6
DP3	20	1:25	120.5
DP3	30	1:10	140.3
DP3	30	1:15	130.0
DP3	30	1:20	128.8
DP3	30	1:25	138.6

本文中,脱氧胆酸改性的普鲁兰多糖衍生物在采用纳米沉淀法制备纳米粒子过程的重要影响因素是取代度,高取代度衍生物制备的纳米粒子粒径在 100~150nm 之间。这一结果与我们以前生物素改性普鲁兰多糖衍生物实验结果一致,取代度增加会使纳米粒子粒径降低。而研究表明,直径<200nm 的运载系统可避免机体单核细胞和网状内皮系统的非特异性清除(RES)。

对于 DP3 来说,聚合物浓度太大(50mg/mL)时在 DMSO 加入水中时就会立即出现沉淀形成,分析原因:(1) 浓度增加,聚合物在扩散过程中相互作用机会增大,形成颗粒粒径较大;(2) 浓度增加导致有机相黏度增加,扩散速度降低,增加了聚合物之间作用时间,形成的颗粒粒径较大^[12]。

而聚合物浓度太小(10mg/mL)时,则在透析时容易出现沉淀。分析可能原因,进入水相的聚合物浓度过低,导致形成的纳米粒子粒径会很小,聚集的趋势就很大,透析时,分散体系改变,由于颗粒的表面效应而相互聚集,沉淀。

实验结果还表明表面活性剂 PVA 对本文中纳米粒子的稳定作用不明显,甚至增加纳米粒子粒径,可能原因是 PVA 吸附于颗粒表面使 zeta 电位由 -20mV 变为 -7mV,颗粒之间的电荷排斥作用降低。

5 结论

通过酯化反应脱氧胆酸与普鲁兰多糖生成脱氧胆酸改性普鲁兰多糖衍生物,采用简单的纳米沉淀法能够制备出纳米粒子。平均粒径在 100~300nm 左右,其中取代度衍生物制备出纳米粒子多在 100~150nm。

表面光滑规整, Zeta 电位为 -20mV 左右, 使用 PVA 引起表面电荷趋向中性。制备过程中的聚合物浓度、水相组成等因素对粒径有影响。通过选择制备条件, 可以对 DPNs 粒径达到控制。

参考文献:

- [1] Sharma C P. [J]. Trends Biomater Artif Organs, 2007, 20:123-125.
- [2] Shingel K I. [J]. Carbohydr Res, 2004, 339:447-450
- [3] Na K, Seong-Lee E, Bae Y H. [J]. J Cont Rel, 2003, 87:3-13.
- [4] Moreira J M, Almeida L M, Geraldies C F, et al. [J]. Int J Pharm, 1997, 147:153-164.
- [5] Zhang H Z, Gao F P, Liu L R, et al. [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2009, 71:19-26.
- [6] Tang H B, Li L, Chen H, et al. [J]. Drug Delivery, 2010, 17:552-558.
- [7] Zhang H Z, Li X M, Gao F P, et al. [J]. Drug Delivery, 2010, 17:48-57.
- [8] Yang W Z, Chen H L, Gao F P, et al. [J]. Current Nanoscience, 2010, 6:298-306.
- [9] 史艳萍, 李学敏, 陈宝泉, 等. [J]. 功能材料, 2009, 40:112-115.
- [10] 张慧珠, 高福平, 杨心督, 等. [J]. 功能材料, 2008, 3:465-468.
- [11] Choi S W, Kwon H Y, Kim W S, et al. [J]. Colloids Surf A, 2002, 201:283-289.
- [12] Thioune O, Fessi H, Devissaguet J P, et al. [J]. Int J Pharm, 1997, 146:233-238.

Preparation and characteristics of deoxycholic acid-modified pullulan nanoparticles

SHI Yan-ping¹, LI Xue-min², CHEN Bao-quan¹, HUANG Yu-ping¹, ZHANG Qi-qing^{2,3}

- (1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Tianjin University of Technology, Tianjin 300191, China;
2. Institute of Biomedical Engineering, Chinese Academy of Medical Science, Tianjin 300192, China;
3. Research Center of Biomedical Engineering Medical School, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: To synthesize deoxycholic acid-modified pullulan derivation (DP) by coupling deoxycholic acid to pullulan and prepare nanoparticles (DPNs) by nanoprecipitation. The effects of different parameters on the nanoparticles formation were investigated for further research of the DP as targeting anti-tumor drug carriers. FT-IR spectroscopy (Bio-Rad Merlin) and ¹H NMR (INOVA 500Hz) were used to confirm the synthesis of the DP. The physicochemical properties of the nanoparticles were characterized using transmission electron microscopy (TEM), dynamic light scattering (DLS) and zeta potential. DP with different degree of substitution were synthesized. The TEM demonstrated that the shape of nanoparticles was spherical with smooth surface. The mean diameter was in the range of 100-300 nm and zeta potential was -20mV . Deoxycholic acid-modified pullulan was formed nanoparticles by nanoprecipitation. Their physicochemical properties were affected by parameter of preparation.

Key words: deoxycholic acid; pullulan; nanoparticles; nanoprecipitation; self-assemble

(上接第 180 页)

Floating zone growth and characterization of single crystal REB₆ (LaB₆, CeB₆) cathode

ZHANG Ning, ZHANG Jiu-xing, BAO Li-hong, LI Xiao-na

(The Key Laboratory of Advanced Functional Materials, Ministry of Education,

College of Materials Science and Engineering, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China)

Abstract: The high quality, high purity and large size LaB₆, CeB₆ single crystals had been successfully grown by optical floating zone method. Each parameter which impact in the process of crystal growth was studied in this article. We determine the optimum crystal growth: (1) LaB₆: speed of 30r/min, the growth rate of 8-10mm/h, twice zone melting; (2) CeB₆: speed of 30r/min, the growth rate of 15-20mm/h, once zone melting. And then analysis the characterizations of single crystals. We use the main method, and they are single crystal diffraction, Raman diffraction, rocking curve, cross-section scanning. These show that floating zone growth is the best method in the produced single crystal REB₆ (LaB₆, CeB₆) cathode.

Key words: floating zone growth; single crystal LaB₆; single crystal CeB₆; characteriation