

• 实验研究 •

## 乙酰普鲁兰纳米粒的制备

张慧珠<sup>1,2</sup>, 刘玲蓉<sup>2</sup>, 张其清<sup>2,3</sup>

(1 华北煤炭医学院药理教研室, 唐山 063000 2 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 300192 3 厦门大学生物医学工程研究中心, 厦门 361005)

**[摘要]** **目的:** 通过乙酰化反应将亲水性普鲁兰多糖进行疏水改性, 并制备乙酰普鲁兰纳米粒。**方法:** 利用傅立叶红外光谱 (Fourier transform infrared, FT-IR)、核磁共振氢谱 (proton nuclear magnetic resonance, <sup>1</sup>H NMR) 对乙酰普鲁兰结构进行表征并计算乙酰化取代度。采用溶剂扩散法制备乙酰化普鲁兰纳米粒, 并通过透射电镜及动态光散射仪表征了纳米粒的形态和粒径, 以考察各种因素对纳米粒形成的影响。**结果:** FT-IR 及 <sup>1</sup>H NMR 结果证明乙酰化产物的存在; 乙酰普鲁兰纳米粒为球形, 粒径随乙酰基取代度的增加而增加。**结论:** 可通过溶剂扩散法制备乙酰普鲁兰纳米粒, 该方法简单易行, 易于扩大生产。该纳米粒有望成为新型纳米药物载体。

**[关键词]** 普鲁兰多糖; 乙酰普鲁兰; 溶剂扩散法; 纳米粒

**[中图分类号]** R943.4 R318.08 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2009)15-1448-05

## Preparation of pullulan acetate nanoparticles

ZHANG Hui-zhu<sup>1,2</sup>, LIU Ling-rong<sup>2</sup>, ZHANG Qi-qing<sup>2,3</sup>

(1 Department of Pharmacology, North China Coal Medical College, Tangshan 063000 China; 2 Institute of Biomedical Engineering, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300192 China; 3 Research Center of Biomedical Engineering Medical School, Xiamen University, Xiamen 361005 China)

**[Abstract]** **Objective** To synthesize pullulan acetate (PA) by the reaction of pullulan with acetic anhydride and prepare its nanoparticles. **Methods** The chemical structure of product was characterized by Fourier transform infrared (FT-IR) and proton nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H NMR) spectroscopy. The degree of substitution was determined by <sup>1</sup>H NMR. The solvent diffusion method was used to prepare PA nanoparticles. The nanoparticles were analyzed by transmission electron microscopy (TEM), dynamic laser light scattering (DLS) to investigate influencing factors. **Results** The chemical structure of PA was confirmed by FT-IR and <sup>1</sup>H NMR. PA nanoparticles had spherical morphology and the size was increased with acetate degree of substitution. **Conclusion** PA nanoparticles could be prepared by solvent diffusion method. The preparation procedure was easy for industrial production. This novel nanoparticle system was promising to be a good drug carrier.

**[Key words]** pullulan; pullulan acetate; solvent diffusion method; nanoparticle

**[基金项目]** 国家重大科学研究计划项目 (2006CB933300), 博士点基金项目 (20060023050)

**[作者简介]** 张慧珠, 女, 博士, 副教授, 主要从事控缓释制剂及抗肿瘤药理研究。联系电话: (0315) 3725870, E-mail: huizhu1449@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的研究。联系电话: (022) 87894007-8601, E-mail: zhangqiq@xmu.edu.cn

纳米粒是适合于注射给药的胶体分散系统。作为药物载体, 纳米粒可增加药物的溶解性, 延长药物在肿瘤部位的滞留时间, 提高药物生物利用度和具有一定的靶向性, 从而提高抗肿瘤药物的疗效和减少化疗中的非特异性不良反应。

改性多糖作为纳米药物载体已成为近年新型药物载体开发的热点<sup>[1]</sup>。其中普鲁兰多糖 (pullulan, Pul) 为出芽孢梗霉菌产生的胞外多糖, 由于该物质无毒、无免疫原性、无致突变作用及无致癌性<sup>[2]</sup>, 且具有良好的生物相容性, 能够被体内淀粉酶降解, 使其在食品、医药、制造业和电子学方面有广泛的用途。但普鲁兰多糖的水溶性极强, 不能通过自组装方法形成纳米粒, 制备纳米粒过程较复杂, 且对疏水性药物的包载有一定限制, 已有文献报道通过化学衍生来改变它的水溶性, 如与疏水基团胆甾醇<sup>[3]</sup>、聚乳酸/羟基乙酸共聚物 (PLGA)<sup>[4]</sup> 或乙酰基<sup>[5]</sup> 连接, 可通过自组装形成纳米粒用于包载药物、蛋白等。

目前制备改性普鲁兰纳米粒的方法多为透析法, 其缺点为制备周期长, 需用较多的有机溶剂, 不能大量制备且不适用于脂溶性较强的材料。本研究合成了乙酰取代度较高的乙酰普鲁兰 (pullulan acetate, PA), 采用易于操作的溶剂扩散法制备纳米粒, 克服了以上缺点; 该制备方法可在成球的瞬间包载药物, 减少了药物的泄漏, 对疏水性较强的药物包封率高, 可改善亲脂性药物的水溶性。本研究主要对影响纳米粒形成的因素进行了考察, 以期制备粒径可控的纳米载体。

## 材料与方 法

### 1 仪器与试剂

普鲁兰多糖, Hayashibara 产品, 购于北京梅而森医药技术开发有限公司, 相对分子质量为 200 000; 聚乙烯醇 [Poly(vinyl alcohol), PVA], Sigma 公司产品; 其余药品、试剂均为国产分析纯。

红外光谱仪 (FTS 300Q Bi-Rad 美国); 超导傅立叶变换液体核磁共振谱仪 (500 MHz VARIAN NOVA, 美国); 透射电镜 (JEM-100CX ⑥, JEOL, 日本); 恒温磁力搅拌器 (HPB22Q 江苏东台县安丰电

器厂); 电子天平 (AB135-S METTLER TOLEDO, 瑞典); 粒度分析仪 (BE90Plus Brookhaven 美国)。

### 2 普鲁兰多糖乙酰化反应

按文献 [6] 方法, 称取普鲁兰多糖 2 g 加入 20 mL 甲酰胺, 54 °C 搅拌下使其溶解。然后加入 6 mL 吡啶及不同剂量的醋酐 (分别为 1.5、1.0、0.75 或 0.5 mL), 在 54 °C 反应 48 h 使生成不同取代度的产物 (分别称为 PA1、PA2、PA3 及 PA4)。将反应混合物倒入 500 mL 水中, 则生成黑棕色沉淀。用水、无水甲醇反复洗至沉淀呈白色, 真空干燥得白色粉末。将产物进行 FT-IR 和 <sup>1</sup>H NMR 分析, 并根据 <sup>1</sup>H NMR 计算乙酰基取代度。

### 3 溶解性实验

称取 PA 各 10 mg 分别加入水、乙醇 (或甲醇)、二甲基亚砜、二甲基甲酰胺、二氯甲烷、丙酮、氯仿、吡啶、四氢呋喃及乙醚各 1.0 mL, 振荡 24 h, 观察溶解情况。

### 4 PA 纳米粒的制备及表征

称取一定量 PA 溶解于有机溶剂中, 电磁搅拌下用注射器注入 PVA 溶液。考察不同有机溶剂、不同浓度 PVA 溶液、不同浓度 PA 溶液及不同有机溶剂/PVA 溶液比例等条件对纳米粒形成的影响。采用透射电镜及动态光散射粒度分析仪对纳米粒形态及粒径进行表征。其中透射电镜的制样方法为: 将纳米悬液滴在碳支持膜上, 自然干燥后用 2% 磷钨酸负染, 干燥后置于透射电镜下观察纳米粒形态。

## 结果与讨论

### 1 PA 的结构及表征

普鲁兰多糖为葡萄糖按  $\alpha$ -1, 4-糖苷键结合成麦芽三糖, 两端再以  $\alpha$ -1, 6-糖苷键同另外的麦芽三糖结合, 如此反复连接而成的水溶性、直链、中性高分子多糖。通过乙酰化反应, 在普鲁兰多糖结构中引入乙酰基以增加其疏水性, 如图 1 所示。乙酰基取代度随着醋酐加入量的增加而增加。醋酐加入量为 5 mL (2 g 普鲁兰) 时, 产物 PA4 在水中为粘胶状, 干燥后呈干硬固体, 无法进行下一步实验。其余产物干燥后均为疏松的白色粉末。

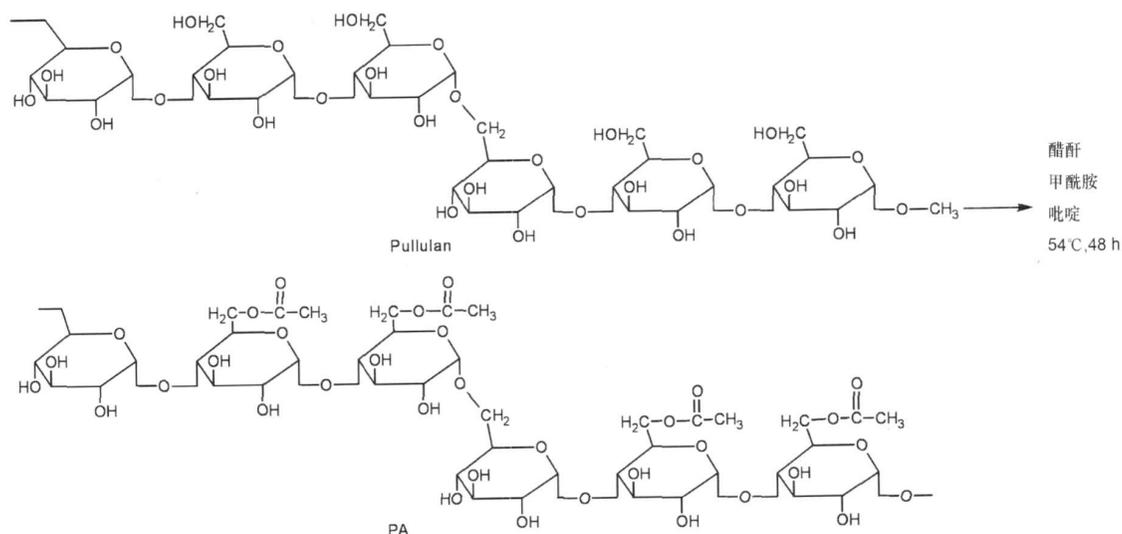


图 1 乙酰普鲁兰的合成方法

图 2 为普鲁兰多糖和不同乙酰取代度 PA 的 FT-IR 谱。图 2(d) 中普鲁兰多糖的特征谱带  $3400 \sim 3200 \text{ cm}^{-1}$  为羟基的伸缩振动峰,  $1200 \sim 1030 \text{ cm}^{-1}$  为 C-O 的伸缩振动峰, 两者均为糖类的特征峰。而 PA 中出现了新的谱带:  $1754 \text{ cm}^{-1}$  为 C=O 的伸缩振动峰;  $1372 \text{ cm}^{-1}$  为 -CH<sub>3</sub> 的变形峰;  $602 \text{ cm}^{-1}$  为 O-C=O 振动峰, 证明乙酰基的存在。从 IR 谱可知, 随着乙酰基取代度增加, 羟基振动峰逐渐变窄, 说明有更多的羟基被乙酰基取代, 其中 PA1 中的羟基完全被乙酰基取代, 但在  $3400 \sim 3200 \text{ cm}^{-1}$  处仍有峰出现, 可能是存在微量羟基或样品中残存水分的影响。

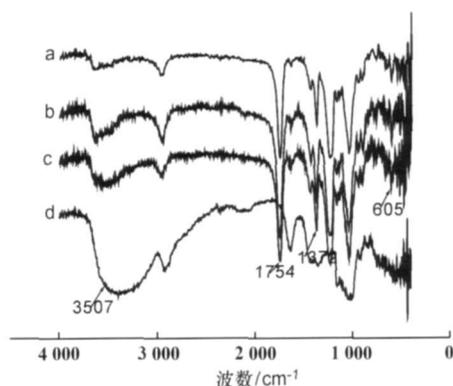


图 2 普鲁兰多糖 (d) 及乙酰普鲁兰 (a PA1; b PA2; c PA3) 红外图谱

图 3(a) 为普鲁兰多糖的 <sup>1</sup>H NMR 谱, 各峰归属为 (DMF SO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  3.00~3.90 ppm (6H, H<sub>2,3,4,5,6,6'</sub>), 4.68 ppm (1H, H<sub>1 $\alpha$ -1, 6</sub>), 5.001 ppm (1H, H<sub>1 $\alpha$ -1, 6</sub>),

4), 4.51~5.70 ppm (3H, OH)。PA 的 <sup>1</sup>H NMR (DMF SO-d<sub>6</sub>), 与普鲁兰多糖相比, PA 的羟基质子峰变弱 (图 3b, c, d), 在 1.8~2.2 ppm 出现甲基的质子信号, 表明乙酰基的存在。由于乙酰化作用, 普鲁兰多糖亚甲基的质子峰向低磁场移动, 且由于信号变宽和复杂化, 不能确切定位每个质子峰。乙酰化取代度 (degree of substitution, DS) 用 <sup>1</sup>H NMR 法确定, 方法为利用乙酰基在 1.8~2.2 ppm 的质子峰面积 (A) 和 <sup>1</sup>H NMR 上化学位移大于 3.5 ppm 的羟基质子及普鲁兰糖环上 H-1 到 H-6 质子峰面积 (B) 计算。则取代度可用下面的等式计算:  $DS = 10A / (3B + A)$ , 它来源于等式  $A/3x = B / \{7 + (3-x)\}$  (相当于糖环上一个氢质子的峰面积), x 即 DS<sup>[7]</sup>。PA1, PA2 及 PA3 的取代度依次为 100%, 94.7% 和 90.3%。

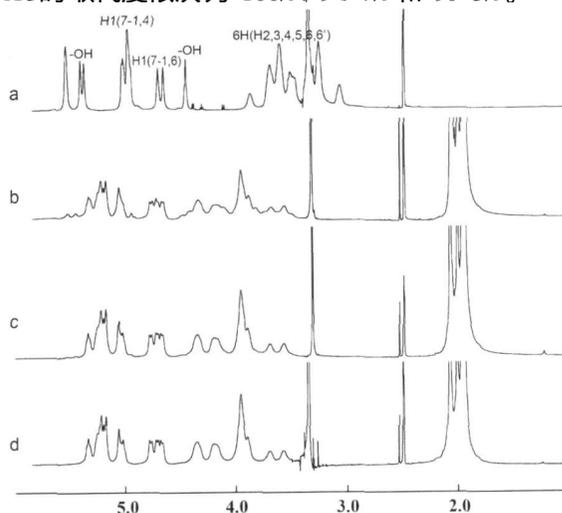


图 3 普鲁兰多糖 (a) 及乙酰普鲁兰 (b PA3; c PA2; d PA1) 核磁图谱 (DMF SO-d<sub>6</sub>)

2 普鲁兰多糖乙酰化前后溶解性的比较  
普鲁兰多糖经乙酰化修饰,其疏水性大大增加。

从表 1 结果可知, PA 可溶解于大多数有机溶剂,这一结果为纳米粒制备奠定了基础。

表 1 普鲁兰及乙酰普鲁兰在各种有机溶剂中的溶解性

药品	溶解性									
	水	醇类	二甲基亚砷	二甲基甲酰胺	二氯甲烷	丙酮	氯仿	吡啶	四氢呋喃	乙醚
Pu1	△	×	△	△	×	×	×	△	×	×
PA	×	×	△	△	△	△	△	△	△	×

△ 溶解; × 不溶解

3 溶剂扩散法制备 PA 纳米粒

溶剂扩散法也称纳米沉淀法,适用于疏水性材料制备纳米粒。方法为将疏水材料溶解于能与水混溶的有机溶剂中,在电磁搅拌下将材料溶液注入水相中,由于有机相迅速扩散进入水相,以及界面的骚动,使水相及有机相间的界面张力明显降低,形成纳米或亚微球大小的乳滴。随着有机溶剂扩散出球而水扩散入内,引起疏水的聚合物在球内的沉积<sup>[8]</sup>,由此形成纳米粒。

3.1 有机溶剂及 PA 乙酰基取代度对纳米粒形成的影响 首先对制备 PA 纳米粒的方法进行研究,发现采用透析法有许多絮状沉淀产生,不能形成稳定的纳米悬液。其原因可能是本研究中 PA 的取代度较高,而使材料的疏水性增加。后改为溶剂扩散法,首先考察了有机溶剂对不同取代度 PA 纳米粒形成的影响。本研究选取了 5 种既能溶解 PA 又能与水混溶的有机溶剂,将不同取代度的 PA 分别溶解于这些有机溶剂,用注射器注入 0.5% PVA 水溶液中,结果见表 2。可见, PA3 的各种有机溶剂溶液注入 0.5% PVA 溶液中均可形成稳定的纳米悬液,而 PA1 及 PA2 只有二甲基亚砷及二甲基甲酰胺溶液分散于 0.5% PVA 能形成稳定的纳米悬液。出现这一结果的原因与有机溶剂的类型及材料的脂溶性不同有关。

首先,溶剂扩散法制备纳米粒时,不同有机溶剂

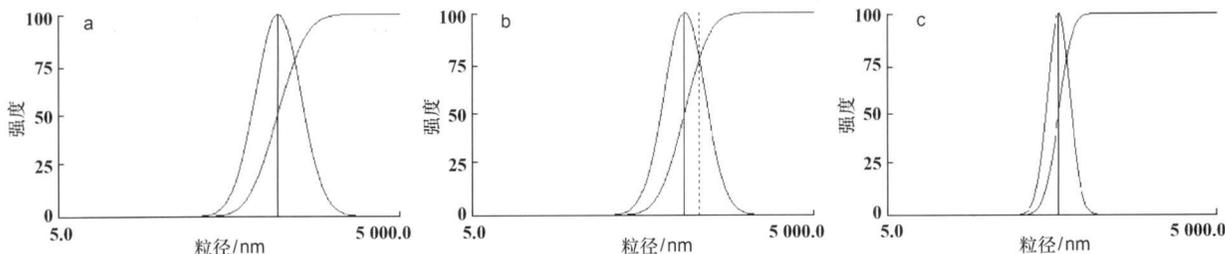
造成了聚合物-有机溶剂、水-有机溶剂相互作用的变化,则纳米粒形成过程中的扩散-沉积过程 (diffusion-sterling process) 发生改变,从而造成纳米粒粒径的变化。有机溶剂与水的亲和性增高除可易化有机溶剂向水相的分散,还可促进溶解于有机溶剂中的聚合物被携带输送到水相,使聚合物分子能更有效地分散到水相中形成纳米粒。所以,有机溶剂除了要能与水混溶,还要有适当的亲和性<sup>[9]</sup>,以使有机相易于向水相扩散。

表 2 各种有机溶剂对乙酰普鲁兰纳米粒形成的影响

纳米粒	二甲基亚砷	二甲基甲酰胺	吡啶	丙酮	四氢呋喃
PA1	+	+	±	-	-
PA2	+	+	±	-	-
PA3	+	+	+	+	+

+ 为纳米悬液; - 为聚合物沉淀; ± 为纳米悬液及聚合物沉淀混合物。  
聚合物浓度: 20 g L<sup>-1</sup>; 有机相/水相: 1/10 (v/v); 水相: 0.5% PVA

另一方面,材料的脂溶性对溶剂扩散法制备纳米粒也有影响,文献报道脂溶性越高,形成的纳米粒粒径越大<sup>[10]</sup>,本实验得到相同的结果,见图 4。其原因可能为:疏水性强的 PA 溶液粘度较大,向 PVA 溶液扩散过程受阻,聚合物分子间作用加强从而形成粒径较大的纳米粒<sup>[11]</sup>,乙酰取代度较高的 PA1 及 PA2 形成较大纳米颗粒,从而容易产生聚集形成沉淀。



聚合物浓度: 10 g L<sup>-1</sup>; 有机相: 二甲基甲酰胺; 水相: 0.5% PVA; 有机相/水相: 1/10 (v/v)

图 4 乙酰普鲁兰纳米粒径分布图 (a PA1; b PA2; c PA3)

**3.2 其他制备条件对纳米粒形成的影响** PVA 是一种非离子水溶性表面活性剂, 作为一种稳定剂及分散剂广泛应用于微球及纳米颗粒的制备中。本研究考察了不同浓度 PVA 溶液对 PA 纳米粒形成的影响, 发现 PVA 溶液浓度高于 1% 时, 浓度越大纳米悬液越容易产生沉淀; 浓度低于 0.5% 时, 浓度越低越容易产生沉淀。其原因可能是表面活性剂浓度增大后水相的粘度增加, 阻碍了有机相向水相的扩散, 进而影响聚合物成球。另一方面, PVA 浓度过低时在聚合物表面覆盖的 PVA 量不足, 作为表面活性剂的作用不太明显, 则产生聚集而影响纳米粒的形成<sup>[9]</sup>。

有机相中聚合物的浓度及有机相与水相的比值对纳米粒的形成也有影响。研究表明, 聚合物浓度越大, 形成的纳米悬液越不稳定。其原因有以下几点: ① 单位体积有机相中聚合物链的数量。当有机相中的聚合物浓度不断增加, 有机相向水相扩散时, 携带的聚合物在扩散过程中彼此相互作用的机会就越大, 聚合物就容易聚集, 形成粒径较大的颗粒。

④ 聚合物浓度对有机相粘度影响。聚合物浓度增加导致有机相粘度增加, 这种高粘度增加了聚合物-有机相向水相扩散的阻力, 扩散速度降低, 增加了聚合物间作用时间, 所形成的颗粒粒径较大, 在放置过程中容易聚集而产生沉淀。同样的道理, 有机相在水相中的比例越小, 所形成的纳米悬液越稳定。

根据以上考察结果, 确定制备 PA 纳米粒的最佳条件为: 有机相为二甲基甲酰胺或二甲基亚砜, PA 有机溶剂溶液浓度为  $10 \text{ g L}^{-1}$ , PVA 溶液浓度为 0.5%, 有机溶剂与 PVA 溶液比例为 1/10 在电磁搅拌下将有机相注入水相中, 3 种取代度 PA 均可制成有乳光的稳定纳米悬液, 其中 PA1 及 PA2 纳米悬液呈白色乳光, PA3 呈蓝色乳光。

纳米悬液透射电镜观察结果见图 5 经 2% 磷钨酸负染后可见白色球状纳米粒, 其干态粒径小于 100 nm, 且粒径较均匀。

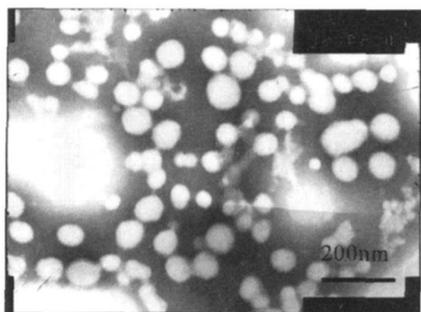


图 5 乙酰普鲁兰 (PA3) 透射电镜照片  
( $\times 7.2$  万, 磷钨酸负染)

## 4 结论

水溶性普鲁兰多糖经乙酰化改性, 生成脂溶性的 PA。PA 取代度分别为 100%, 94.7% 和 90.3%, 各取代度 PA 均可采用自动乳化溶剂扩散法制备纳米粒, 生成有乳光的稳定纳米悬液。纳米粒形态为球形, 粒径随乙酰基取代度的增加而增大。溶剂扩散法制备纳米粒方法简单, 重复性好, 容易扩大生产, 故 PA 纳米粒有望成为新型纳米药物载体。PA 纳米粒作为抗肿瘤药物载体及其生物效应的研究正在进行中。

## [ 参 考 文 献 ]

- [1] 刘晨光, 董学猛, 金晓明, 等. 基于疏水化修饰水溶性多糖的纳米粒制备及应用研究进展 [J]. 功能材料, 2007, 38(增刊): S1941- S1946.
- [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] KAZUNARIA, SEIICHIK, SHOZO S, et al. Self-assembled hydrogel nanoparticle of cholesterol-bearing pullulan as a carrier of protein drugs. Complexation and stabilization of insulin [J]. *J Control Release*, 1998, 54(3): 313- 320.
- [4] JEONG Y, NA HS, OH JS, et al. Adriamycin release from self-assembling nanospheres of poly (DL-lactide-co-glycolide)-grafted pullulan [J]. *Int J Pharm*, 2006 322(1-2): 154- 160.
- [5] NA K, LEE TB, PARK KH, et al. Adriamycin loaded pullulan acetate/sulfonamide conjugate nanoparticles responding to tumor pH-dependent cell interaction in internalization and cytotoxicity in vitro [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2003 18(2): 165- 173.
- [6] JUNG SW, JEONG YI, KM SH. Characterization of hydrophobized pullulan with various hydrophobicities [J]. *Int J Pharm*, 2003 254(1-2): 109- 121.
- [7] NAOZUMI T, MITSUHIRO S. Synthesis and properties of pullulan acetate. Thermal properties, biodegradability, and a semi-clear gel formation in organic solvents [J]. *Carbohydr Polym*, 2006 63(4): 476- 481.
- [8] HIDEKIM, MASAO K, HIROFUMI T, et al. Preparation of poly (DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles by modified spontaneous emulsification solvent diffusion method [J]. *Int J Pharm*, 1999 187(1-2): 143- 152.
- [9] GALINDO-RODRIGUEZ S, ALLEMAAN E, FESSIH, et al. Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out emulsification-diffusion and nanoprecipitation methods [J]. *Pharm Res* 2004 21(8): 1428- 1439.
- [10] BLATILU, ALLEMAAN E, DOELKER E. Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles [J]. *Eur J Pharm Sci* 2005, 24(1): 67- 75.
- [11] THIDUNE O, FESSIH, DEVISSAGUET JP, et al. Preparation of pseudolatex by nanoprecipitation. Influence of the solvent nature on intrinsic viscosity and interaction constant [J]. *Int J Pharm*, 1997 146(1-2): 233- 238.

编辑: 周卓 接受日期: 2008-12-17