

· 药剂与工艺 ·

N-脂肪酰-*N*-三甲基壳聚糖的合成及其对蛇床子素的增溶作用

胡小娟, 陈维良, 俞 洋, 张学农*

苏州大学药学院, 江苏 苏州 215123

摘要: **目的** 合成2类两亲性壳聚糖(chitosan, CS)衍生物, 自组装成聚合物胶束作为难溶性药物的新型递药载体。**方法** 先将CS与碘甲烷反应生成*N*-三甲基壳聚糖(trimethyl chitosan, TMC), 然后在TMC的氨基上引入长链脂肪酸(软脂酸和癸酸), 合成了两亲性的*N*-脂肪酰-*N*-三甲基壳聚糖(*N*-fatty acyl-*N*-Trimethyl chitosan, FA-TMC)衍生物。通过FT-IR、¹H-NMR和元素分析法, 对衍生物的分子结构和*N*-位取代度进行表征, 同时以疏水性药物蛇床子素(osthole, OST)为模型, 探讨其胶束增溶特性。**结果** 实验合成了2类6种不同的新型CS衍生物, 分析显示季胺化程度和脂肪酰基接枝率对FA-TMC的胶束性质有较大的影响; 对于超声法制备的OST载药胶束, 季胺化程度为62.00%、软脂酰基接枝率为13.37%的*N*-软脂酰-*N*-三甲基壳聚糖(*N*-palmitoyl-*N*-trimethyl chitosan, PA-TMC)和季胺化程度为43.06%、癸酰基接枝率为22.00%的*N*-癸酰-*N*-三甲基壳聚糖(*N*-caprinoyl-*N*-trimethyl chitosan, CA-TMC)的包封率分别为76.67%、79.11%, 载药量分别为19.01%、19.08%, 可使OST在水中的溶解度提高两个数量级。**结论** FA-TMC是一种具有潜在应用价值的增溶载体, 其在水中能自组装形成胶束, 并对OST有明显的增溶作用, 为OST制剂深入研究与应用奠定了基础。

关键词: *N*-软脂酰-*N*-三甲基壳聚糖; *N*-癸酰-*N*-三甲基壳聚糖; *N*-脂肪酰-*N*-三甲基壳聚糖; 胶束增溶; 蛇床子素

中图分类号: R283.6; R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)06-0674-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.06.008

Synthesis of *N*-fatty acyl-*N*-trimethyl chitosan and its solubilization on osthole

HU Xiao-juan, CHEN Wei-liang, YU Yang, ZHANG Xue-nong

School of Pharmacy, Suzhou University, Suzhou 215123, China

Abstract: Objective To synthesize two kinds of amphipathic chitosan (CS) derivatives, self-assembling to polymeric micelles as novel drug delivery system. **Methods** *N*-Trimethyl chitosan (TMC) was synthesized by the reaction between CS and CH₃I, and long-chain fatty acid was combined to amino group of TMC so as to synthesize the derivative of *N*-fatty acyl-*N*-TMC (FA-TMC). The polymer structure was confirmed by FT-IR, ¹H-NMR spectra, and element analysis. Then the hydrophobicity drug of osthole (OST) was used as model drug to evaluate the solubilizing ability on those polymeric micelles. **Results** Two kinds of six novel CS derivatives were synthesized, the results indicated that the different degrees of quaternisation (DQ) and degrees of substitution (DS) were important parameters to the micelles properties of FA-TMC. To the OST loaded micelles prepared by ultrasonic method, the best candidate materials of the *N*-palmitoyl-*N*-TMC (PA-TMC) was the polyer with DQ of 62.00% and DS of 13.37%, while the *N*-caprinoyl-*N*-TMC (CA-TMC) was the polyer with DQ of 43.06% and DS of 22.00%. The entrapment efficiency of PA-TMC and CA-TMC were 76.67% and 79.11%, and the drug-loading rates of PA-TMC and CA-TMC were 19.01% and 19.08%, respectively. The solubility of OST increased up to two orders of magnitude in the OST-loaded micelles. **Conclusion** FA-TMC is a potential solubilization carrier, self-assembling to polymeric micelles in water, with obvious solubilization on OST, and lays the foundation for the further research and application of OST preparation.

Key words: *N*-palmitoyl-*N*-trimethyl chitosan; *N*-caprinoyl-*N*-trimethyl chitosan; *N*-fatty acyl-*N*-trimethyl chitosan; micelles solubilization; osthole

收稿日期: 2012-09-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81273463); 江苏省科技支撑计划(BE2011670); 国家大学生创新性试验计划课题资助(111028533, 微机编号5731503311)

作者简介: 胡小娟(1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为靶向药物输送系统。Tel: (0512)88965550 E-mail: hxj2010@126.com

*通信作者 张学农 Tel: (0512)65882087 E-mail: zhangxuenong@163.com

网络出版时间: 2013-01-09 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20130109.1529.008.html>

蛇床子素 (osthole, OST) 为伞形科植物蛇床 *Cnidium monnieri* (L.) Cusson 的干燥成熟果实中提取的一种香豆素类化合物。近年来 OST 的抗肿瘤活性研究不断增多, 报道显示, OST 具有广谱抗肿瘤活性, 与阿霉素合用, 不但能逆转耐药性, 还能减副增效^[1-3]。然而 OST 在水中难溶, 口服生物利用度差, 已经成为其应用于临床所面临的难题之一^[4]。

近几十年来, 聚合物胶束作为药物载体, 取得了良好效果。对于难溶性药物而言, 胶束独特的核壳结构既可将难溶性药物包裹在胶束的疏水内核中, 增加药物溶解性; 又可通过主被动靶向, 提高疗效, 减少药物的毒副作用^[5-6]。壳聚糖 (chitosan, CS) 是自然界中唯一的碱性氨基多糖, 生物相容性好、可生物降解、抗菌、无毒, 被广泛应用于生物医药等行业^[7-10]。虽然 CS 因不能在中性和碱性水环境中溶解而应用受限, 但 CS 中所含有的大量游离的氨基与羟基, 为化学改性提供了良好的结构基础^[11]。在大量的 CS 衍生物中, *N*-三甲基壳聚糖 (trimethyl chitosan, TMC) 是一种被证实具有良好细胞相容性的水溶性 CS 衍生物, 同时还是口服难溶药物吸收促进剂^[12-13]。本课题组前期合成了 TMC, 且以此为载体制备的乳糖化去甲斑蝥素三甲基壳聚糖纳米粒显著提高了药物的抗肿瘤活性^[14]。虽然 TMC 对 OST 也有微量的增溶作用, 但对于 OST 的抗肿瘤活性研究, 还需要更有利的增溶方法。本实验将过量的碘甲烷与 CS 反应制得 TMC, 再将软脂酰基和癸酰基引入到 TMC 分子中, 获得两种新型的两亲性 CS 衍生物, 合称 *N*-脂肪酰-*N*-三甲基壳聚糖 (*N*-fatty acyl-*N*-trimethyl chitosan, FA-TMC)。实验结果表明, FA-TMC 能溶于水, 并通过自组装形成结构稳定的纳米聚集体, 将 OST 在水中的溶解度提高两个数量级。

1 仪器与材料

DF-101S 集热式磁力加热搅拌器 (金坛市金南仪器厂); JY92-II 超声波细胞粉碎机 (宁波新芝生物科技股份有限公司); ALPHA 1-4/LSC 冷冻干燥机 (德国 Christ 公司); Spectrum 透析袋 (截留相对分子质量为 10 000, 上海新睿生物科技有限公司); ProStar LC240 红外分光光度计、UNITY INOVA 400 MHz 超导核磁共振谱仪 (美国瓦里安公司); Vario ELIII 元素分析仪 (德国 Elementar 公司); Nicomp-380ZLS 型动态激光散射粒度仪 (美国 PSS 公司); Agilent 高效液相色谱仪 (美国安捷

伦公司)。

CS (南通兴成生物制品厂, 脱乙酰度 93.2%, 批号 12-01-10); 碘甲烷 (国药集团化学试剂有限公司, AR); 碘化钠、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐和 *N*-羟基琥珀酰亚胺 (阿拉丁试剂, AR); 癸酸、软脂酸 (Sigma 公司, AR); 其他试剂也均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 新型 CS 衍生物的合成

2.1.1 TMC 的合成^[15] 将 2.0 g CS、4.8 g NaI、11.5 mL CH₃I、11 mL 15% NaOH 水溶液和 80 mL *N*-甲基吡咯烷酮 (NMP) 于 60 °C 磁力搅拌下反应 45 min, 用过量无水乙醇终止反应, 充分沉淀后离心, 弃去上清液; 沉淀用乙醇和乙醚各离心洗涤 2~3 次得到碘化三甲基壳聚糖, 即碘化 TMC1。

将碘化 TMC1 加入 80 mL NMP 中, 60 °C 搅拌挥发掉乙醚, 再加入 4.8 g NaI、11.5 mL CH₃I、11 mL 15% NaOH 水溶液反应 45 min。用过量无水乙醇终止反应, 充分沉淀后离心, 弃去上清液; 沉淀用乙醇和乙醚各洗涤 2~3 次得碘化 TMC2。将碘化 TMC2 加入 80 mL NMP 中, 60 °C 搅拌挥发掉乙醚, 再加入 4.8 g NaI、11.5 mL CH₃I、11 mL 15% NaOH 水溶液反应 60 min。用过量无水乙醇终止反应, 充分沉淀后离心, 弃去上清液; 沉淀用乙醇和乙醚各洗涤 2~3 次得碘化 TMC3。

碘化 TMC1、碘化 TMC2、碘化 TMC3 分别溶于 5% NaCl 水溶液中, 置换 I⁻, 滤过除去不溶杂质, 滤液于去离子水中透析 3 d, 除去少量残留小分子物质, 冻干, 得纯化的 TMC1、TMC2、TMC3 氯化物。

2.1.2 FA-TMC 的合成 软脂酸 (palmitinic acid, PA) 0.256 g 或者癸酸 (capric acid, CA) 0.172 g, 加入干燥的二氯甲烷 20 mL 中, 磁力搅拌溶解, 缓慢加入 0.384 g 的 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐 (EDC·HCl) 和 0.115 g 的 *N*-羟基琥珀酰亚胺 (NHS), 40 °C 继续反应 2 h。旋转蒸发除去溶剂得到白色固体 PA-NHS。加入 50 mL 无水甲醇, 搅拌溶解, 70 °C 恒温磁力搅拌下缓慢滴加 TMC 水溶液 (PA-NHS 与 TMC 自由氨基摩尔质量比为 1:1), 继续反应 24 h。反应结束, 旋转蒸发除去有机溶剂, 依次于 30% 乙醇溶液和去离子水中透析 3 d。透析液滤过, 滤液冷冻干燥得白色棉花状固体。

目标产物 PA-TMC 及中间产物 TMC 的合成步

骤见图 1。CA-TMC 用相同的合成方法。

2.2 CS 及其衍生物表征

2.2.1 红外分析 用 KBr 压片法制备样品, 用 Pro-

Star LC240 红外分光光度计测定, 所得 CS 及其衍生物的 FT-IR 图谱见图 2。CS 在 1595 cm^{-1} 有氨基的 N-H 变形振动峰, 而在 TMC 中分别在 2933 cm^{-1}

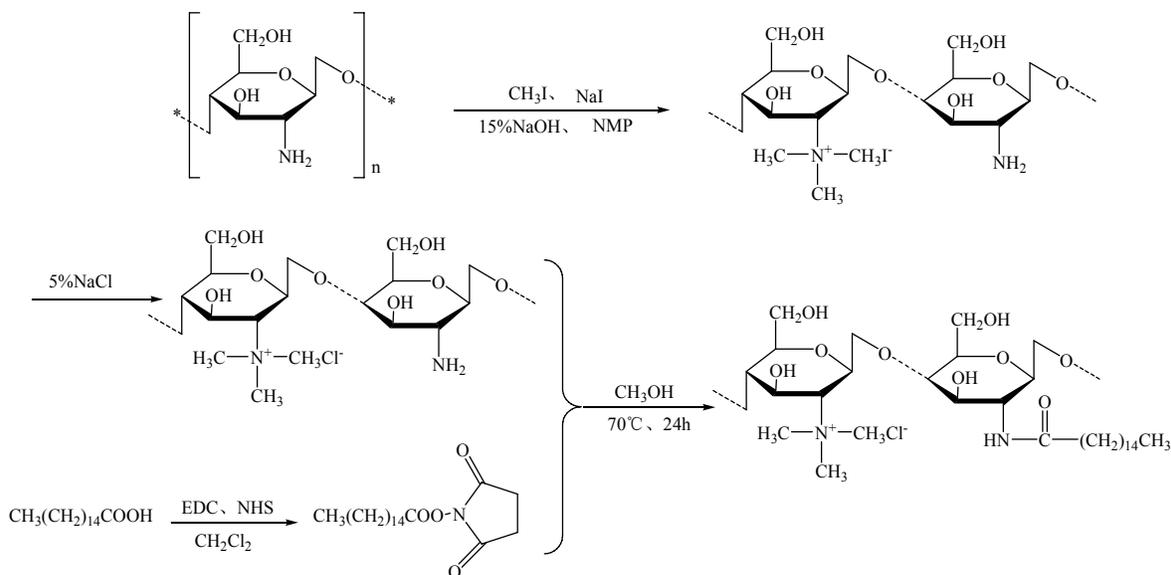


图 1 TMC 和 PA-TMC 的合成路线

Fig. 1 Synthesis route of TMC and PA-TMC

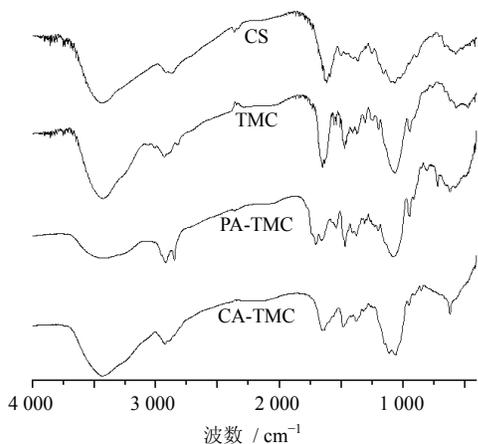


图 2 CS 及其衍生物的 FT-IR 图谱

Fig. 2 FT-IR spectra of CS and its derivatives

和 1473 cm^{-1} 出现了新的吸收峰, 分别是 CH_3 伸缩振动峰和 N-CH_3 的变形振动峰, 这就表明 CS 分子中氨基上的氢已部分被甲基所取代。PA-TMC 的 IR 谱图既保留了 TMC 特征吸收峰, 在 2921 cm^{-1} 和 2850 cm^{-1} 处脂肪酰基的 $-\text{CH}_2-$ 的伸缩振动带, 饱和 CH_3 和 CH_2 伸缩振动峰强度变强, 其强度受取代度的影响; 同时 1650 cm^{-1} 出现了非常明显的酰胺基特征吸收峰信号, 显示 PA 成功接枝至 TMC 分子中, 且软脂酰基反应的位点大部分集中于 NH_2 位点上。在 CA-TMC 的 IR 谱图中, 同样在 1650 cm^{-1}

出现了非常明显的酰胺基特征吸收峰信号, 同时在 620 cm^{-1} 处还伴随长链癸酰基的相关吸收, 证明癸酰基绝大多数是发生的酰化反应, 成功地连接在 TMC 上。

2.2.2 核磁分析

将 CS 溶于 $\text{D}_2\text{O}/\text{F}_3\text{CCOOD}$, TMC、PA-TMC、CA-TMC 溶于 D_2O 于 400 MHz 全数字化超导核磁共振谱仪测定 (室温, 扫描次数: 32), 所得 $^1\text{H-NMR}$ 谱见图 3。CS 的 $^1\text{H-NMR}$ 谱可归属为 δ : 4.59 (H1), 2.91 (H2), 3.32~3.89 (H3, H4, H5, H6), 1.92 (NHCOCH_3); 而 TMC 的核磁共振图谱中, δ 5.2~5.7 处出现的峰对应 CS 吡喃糖环 H1 峰, δ 3.4 和 δ 3.0 附近新增的峰为 $\text{N}(\text{CH}_3)_3$ 和 $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ^[16]; PA 和 CA 为同系物, 故 PA-TMC、CA-TMC 的核磁共振图谱也具有相似性, δ 5.2 处出现的峰, 依然对应为 CS 吡喃糖环 H1 峰, 而 δ 3.4~4.4 出现的峰对应 CS 吡喃糖环 H3、H4、H5、H6 峰, δ 3.1~3.3 附近出现的峰对应 C6 和 C3 位上 CH_3 的峰, δ 3.3 左右出现的峰为 $\text{N}(\text{CH}_3)_3$ 对应的质子峰, 而 $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 质子峰则迁移至 δ 2.5, δ 1.2 附近出现的峰为 CH_2 对应的质子峰, δ 0.8 附近出现的峰为长链脂肪酰基尾端 CH_3 对应的质子峰。从 PA-TMC、CA-TMC 的图谱中可以发现, 长链脂肪酰基中 CH_2 尾端 CH_3 的峰较弱, 产生这种现象可能与其在 D_2O 自聚集使得疏

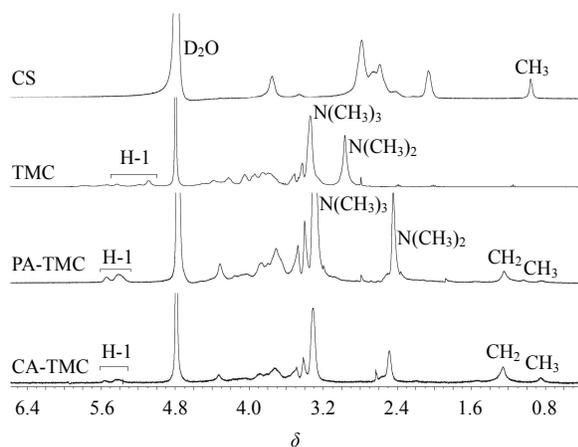


图3 CS及其衍生物的¹H-NMR图谱
Fig. 3 ¹H-NMR spectra of CS and its derivatives

水酰基聚集在胶束粒子的内部，从而核磁共振信号减弱有关，也从侧面证明了PA-TMC、CA-TMC可能在水中具有较强的自聚集行为。

在有机溶剂中，可以避免自聚集现象，故将PA-TMC和PA分别溶于DMSO-d₆中检测，其¹H-NMR图谱见图4。长链棕榈酰基化学位移归属如下： δ 0.85为末端3~15号碳原子的CH₃峰， δ 1.25为长链CH₂峰， δ 2.2为2-H (CH₂CO)吸收峰， δ 2.2为3-H (CH₂CH₂CO)吸收峰，N(CH₃)₃和N(CH₃)₂质子峰则可能与 δ 3.3和2.5处的溶剂峰重叠，另外在 δ 8.5附近还有一个NHCO的酰胺基小峰。图谱再次证明NHS-PA已经与TMC反应生成PA-TMC，且主要为酰基化反应。

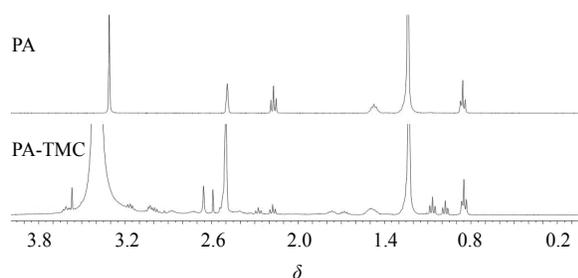


图4 PA和PA-TMC在DMSO-d₆中的¹H-NMR图谱
Fig. 4 ¹H-NMR spectra of PA and PA-TMC in DMSO-d₆

2.2.3 元素分析 假定反应前后CS没有明显的降解，用Vario ELIII元素分析仪测定CS、TMC、FA-TMC中元素C、N的质量分数，N-三甲基取代度 (degree of quaternisation, DQ) 和脂肪酰基的取代度 (degree of substitution, DS) 的计算见公式(1)、(2)和(3)。

$$DQ = (R_{TMC} - R_{CS}) / 3 \quad (1)$$

$$\text{软脂酰基 DS} = (R_{PA-TMC} - R_{TMC}) / 16 \quad (2)$$

$$\text{癸酰基 DS} = (R_{CA-TMC} - R_{TMC}) / 10 \quad (3)$$

R为n(C)/n(N)即各物质碳氮原子物质的量比；3、16、10分别为三甲基、软脂酰基和癸酰基中碳原子数

CS及其衍生物元素分析结果见表1。本实验合成了季胺化程度分别为27.00%、43.06%、62.00%的TMC，不同TMC季胺化程度对脂肪酰基的接枝率亦有一定的影响。随着季胺化程度的上升，脂肪酰基的接枝率降低；相同季胺化程度TMC，脂肪链较短的癸酰基接枝率相对较高，这可能与空间位阻有关。此外，TMC的季胺化程度，还常利用¹H-NMR谱图中三甲基在 δ 3.4的积分，和¹H峰在 δ 4.8~5.7的积分计算^[15-16]。

表1 CS及其衍生物元素分析结果及季胺化程度与脂肪酸接枝率

Table 1 Elemental analysis results and DQ and DS of CS and its derivatives

样品	质量分数 / %		n(C) / n(N)	DQ / %	DS / %
	C	N			
CS	40.73	7.38	5.52	—	—
TMC1	30.90	4.83	6.33	27.00	—
TMC2	33.04	4.85	6.81	43.06	—
TMC3	37.25	5.05	7.38	62.00	—
PA-TMC1	48.72	5.00	9.74	—	21.32
PA-TMC2	47.43	5.07	9.36	—	15.94
PA-TMC3	44.61	4.32	10.33	—	13.37
CA-TMC1	46.40	4.92	9.43	—	30.98
CA-TMC2	41.89	4.65	9.01	—	22.00
CA-TMC3	44.57	4.89	9.11	—	17.34

2.3 临界胶束质量浓度的测定

将20 mg FA-TMC溶解在10 mL双蒸水中，超声波细胞粉碎仪200 W，超声5 min，配制成2 g/L的母液。配制浓度为0.06 mmol/L的芘丙酮溶液，每次取100 μ L溶液于试管中，氮气吹干。将母液按直接稀释法配成0.2~500 μ g/mL 12个不同质量浓度的样品，用刻度吸管取10 mL加入到备用的含芘试管中，超声30 min，避光放置12 h后测定荧光光谱，计算临界胶束质量浓度 (critical micelle concentration, CMC)。荧光条件^[17]：激发光波长332 nm，扫描范围360.0~500.0 nm，激发光狭缝宽度5.0 nm，发射光狭缝宽度3.0 nm，扫描速度为400 nm/s，读取 λ_{372} 、 λ_{383} 处的荧光强度I₃₇₂、I₃₈₃。

本实验以疏水性物质芘作为测定聚合物 CMC 的表征物质。芘的稳态荧光光谱有 5 个峰, 峰 1 和峰 3 的荧光强度之比强烈地依赖于溶剂的极性, 故可用芘增溶于胶束后, 引起 I_1/I_3 值的突变来测定聚合物的 CMC。如图 5, I_1/I_3 突变的拐点即为 PA-TMC1 的 CMC, 此时的胶束质量浓度为 1.6 $\mu\text{g/mL}$ 。同理测得 PA-TMC2、PA-TMC3、CA-TMC1、CA-TMC2、CA-TMC3 的 CMC 为 4.4、8.1、47.0、55.0、64.0 $\mu\text{g/mL}$ 。实验结果表明相同季胺化程度的 FA-TMC, 脂肪链较长衍生物 CMC 较小; 相同脂肪酰基长度的 FA-TMC, 脂肪酰基接枝率较高的衍生物, CMC 相对值较低。

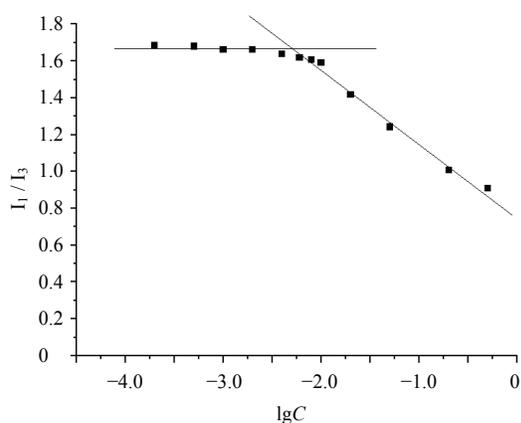


图 5 PA-TMC1 胶束溶液 I_1/I_3 与 $\lg C$ 坐标图

Fig. 5 Coordinate of I_1/I_3 and $\lg C$ of PA-TMC1 micelle solution

2.4 OST 定量测定方法的建立

2.4.1 色谱条件 色谱柱为 ODS-2 Hypersil C_{18} 柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水 (60 : 40), 体积流量 1 mL/min, 柱温 25 $^{\circ}\text{C}$, 检测波长 322 nm, 进样量 20 μL ^[4]。

2.4.2 线性关系考察 精密称取 OST 对照品 10 mg, 甲醇定容到 10 mL, 作为储备液, 使用时用甲醇稀释 10 倍。分别制得质量浓度为 1.0、5.0、10.0、25.0、50.0、100.0 $\mu\text{g/mL}$ 的 OST 对照品溶液, 高效液相色谱测定峰面积。以质量浓度为横坐标 (X), 峰面积积分为纵坐标 (Y) 进行线性回归, 得回归方程为 $Y=0.012 X-0.015$, $r=0.999 9$, 线性范围 1~100 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.4.3 精密度与回收率试验 取质量浓度为 100.0、25.0、1.0 $\mu\text{g/mL}$ 的 OST 对照品溶液分别考察日间和日内精密度, 结果 RSD 均 $<1.5\%$ ($n=5$)。精密称取 10 mg 载体 (PA-TMC2 和 CA-TMC2), 分别

加入 10、500、1 000 μL OST 储备液, 用甲醇定容至 10 mL, 超声溶解后, 置于超声波细胞粉碎机中, 200 W 超声 5 min, 10 000 r/min 离心 30 min, 取上清液 20 μL 进样测定。结果回收率都在 96%~99%, RSD 均 $<1.5\%$ ($n=5$), 结果表明 OST 质量浓度在 1~100 $\mu\text{g/mL}$ 满足分析要求。

2.5 FA-TMC 对 OST 的增溶作用

2.5.1 OST/FA-TMC 载药胶束的制备 称取 20 mg FA-TMC 置于 20 mL 去离子水中, 超声溶解, 加入 300 μL 20 mg/mL 的 OST 无水乙醇溶液, 超声波细胞粉碎机 200 W 超声 5 min, 用 0.45 μm 滤膜滤过, 备用。

2.5.2 OST/FA-TMC 载药胶束的表征 取各载药胶束 1 mL, 用去离子水稀释至所需倍数, 用 Nicomp—380ZLS 型动态激光散射粒度仪检测粒径和 Zeta 电位。检测结果见表 2。6 种化合物中 PA-TMC1 的水溶性相对较差, 在滤过时相对困难, 平均粒径在 400 nm 左右, 其余载药胶束的粒径都在 170~240 nm; PA-TMC2 Zeta 电位最高为 56.23 mV。将滤过后的载药胶束室温放置, 每隔 2 h 观察 1 次。6 h 后 PA-TMC2 最先有结晶和沉淀析出, 其余 5 种载体 48 h 内未见明显晶体或沉淀析出。这可能与 Zeta 电位过大有关, 提示电位过大反而不利于胶束的稳定。

表 2 OST/FA-TMC 胶束溶液的表征与评价

Table 2 Characterization and evaluation of OST/FA-TMC micelles solution

样品	粒径 / nm	Zeta 电位 / mV	包封率 / %	载药量 / %
PA-TMC1	396.3 \pm 57.1	32.89	56.47	16.14
PA-TMC2	237.3 \pm 30.9	56.23	68.38	17.32
PA-TMC3	176.7 \pm 19.7	48.62	76.67	19.01
CA-TMC1	212.7 \pm 26.1	35.11	73.16	17.81
CA-TMC2	192.0 \pm 25.4	41.65	79.11	19.08
CA-TMC3	184.7 \pm 20.9	35.31	64.34	16.07

2.5.3 OST 的定量测定 按“2.5.1”项方法制备载药胶束于冷冻干燥机中冻干 (-60°C , 48 h)。精密称取 5 mg 冻干固体, 加入 15 mL 甲醇超声 30 min, 取 1 mL 液体, 10 000 r/min 离心 30 min, 取上清 20 μL 进样, 按“2.4.1”项色谱条件检测。计算包封率和载药量。

包封率 = 胶束中 OST 的量 / OST 投药量

载药量 = 胶束中 OST 的量 / 载药胶束总量

6种载药胶束的包封率和载药量测定结果见表2。包封率大小依次为 CA-TMC2>PA-TMC3>CA-TMC1>PA-TMC2>CA-TMC3>PA-TMC1;载药量也是 CA-TMC2 和 PA-TMC3 相对较高。新型载体 PA-TMC 中接枝率最高的 PA-TMC1 在水中的溶解性较差,包封率最低。综合粒径、包封率和载药量3因素,PA-TMC 中季胺化程度为 62.00%,软脂酰基接枝率为 13.37%的 PA-TMC3 对 OST 的增溶最好;CA-TMC 中季胺化程度为 43.06%,癸酰基接枝率为 22.00%的 CA-TMC2 最好。这可能与癸酸的脂肪链较脂肪酸短,疏水作用也相对较弱有关。提示季胺化程度、脂肪酸长度与脂肪酰接枝率都对载体包载 OST,增加其溶解性有一定的影响。

3 讨论

本实验自制的 TMC,采用过量的碘甲烷与 CS 反应,通过控制反应的步骤,得到3种季胺化程度的 TMC。TMC 不溶于甲醇,FA-TMC 的合成以与水互溶的甲醇为溶剂,此反应为异相反应。反应温度为 70 °C,时间为 24 h,反应温度过高,可能导致 CS 主链大量降解;反应温度过低,相应的反应时间延长,O-酰副产物增多。FA-TMC 的透析纯化需先在 20%~30%乙醇中进行,单纯的去离子水透析,不能得到较为纯净的产品。

聚合物的 CMC 是指聚合物分子在特定溶液中形成胶束时所需的最低聚合物质量浓度。测定方法有多种,本实验采用最常用的荧光法。结果表明,CMC 随接枝率的升高而降低。PA-TMC 和 CA-TMC 的 CMC 分别在 1.6~8.1 μg/mL 和 47.0~64.0 μg/mL,远低于常用的表面活性剂如十二烷基磺酸钠(CMC 在 2 mg/mL 左右),提示载药胶束即使进入体内也不会因为环境的瞬间改变而使药物析出^[18],这也是聚合物胶束的特性之一。

已有文献报道可通过在 TMC 分子中引入强疏水链获得结构稳定的聚合物纳米胶束^[5]。目前利用长链脂肪酸修饰 TMC 在国内外尚未见报道。本实验首次将软脂酸和癸酸成功地交联到 TMC 上,制得新型的 CS 衍生物 PA-TMC 和 CA-TMC,其在水中能够自组装形成胶束,包载药物后粒径大多在 160~240 nm,具有被动靶向作用。在胶束的外层是带正电的三甲基,可通过与肿瘤部位带负电磷脂极性头相互吸引,而具有主动肿瘤靶向的可能^[14]。此外从元素分析可知,各化合物中仍存在游离的氨基,如继续引入叶酸、乳糖等基团,亦可实现主动

靶向肿瘤。在合成的6种化合物中,不同的季胺化程度、脂肪链长、接枝率的载体对 OST 的包封率和载药量都有一定的影响,其中季胺化程度为 62.00%,软脂酰基接枝率为 13.37%的 PA-TMC3 和季胺化程度为 43.06%,癸酰基接枝率为 22.00%的 CA-TMC2 包封率和载药量较好。以 PA-TMC3 和 CA-TMC2 为载体按照“2.5.1”项方法配制备载药胶束,冻干后检测,溶液中 OST 的质量浓度分别为 223、235 μg/mL,是其中在水中溶解度的一百多倍。

本实验成功制备了两类新型的两亲性 CS 衍生物,该药物载体具有良好的应用前景。本课题组将进一步考察 FA-TMC 的安全性及载药胶束的抗肿瘤活性与靶向性。

参考文献

- [1] 胡小娟,张学农.蛇床子素的抗肿瘤活性研究进展[J].抗感染药学,2012,9(4):241-244.
- [2] 胡晓,陈月江,李文.蛇床子素对耐阿霉素人乳腺癌细胞耐药的逆转作用[J].中国医院药学杂志,2011,31(12):990-993.
- [3] 张晓丹,余迎梅,范春兰,等.蛇床子素对阿霉素心脏毒性的保护作用及机制研究[J].中医药学报,2010,38(4):34-37.
- [4] 胡晓波,刘扬,贝永燕,等.蛇床子素-pH 敏感性纳米粒的制备及其在大鼠体内的药代动力学[J].中国新药杂志,2012,21(5):490-497.
- [5] Zhu H Y, Liu F, Guo J, et al. Folate-modified chitosan micelles with enhanced tumor targeting evaluated by near infrared imaging system [J]. *Carbohydr Polym*, 2011, 86(3): 1118-1129.
- [6] Danhier F, Magotteaux N, Ucakar B, et al. Novel self-assembling PEG-p-(CL-co-TMC) polymeric micelles as safe and effective delivery system for paclitaxel [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2009, 73(2): 230-238.
- [7] 赵静,曾建国,邹剑锋,等.黄芩苷-血根碱离子对壳聚糖纳米粒的制备及表征[J].中草药,2012,43(4):676-682.
- [8] 仲博,张岭,张莉,等.麻黄碱壳聚糖修饰脂质体凝胶剂的制备及体外透皮研究[J].中草药,2012,43(1):70-73.
- [9] 周闻舞,顾海铮.壳聚糖微/纳米粒在定向给药系统中的应用研究[J].药物评价研究,2010,33(4):290-295.
- [10] 倪天庆,胡思源.甲壳素及其衍生物壳聚糖的药理作用和临床应用研究进展[J].现代药物与临床,2012,27(3):313-316.
- [11] Chopra S, Mahdi S, Kaur J, et al. Advances and potential applications of chitosan derivatives as mucoadhesive

- biomaterials in modern drug delivery [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2006, 58(8): 1021-1032.
- [12] Kotzé A F, Thanou M M, Luebetaen H L, *et al.* Enhancement of paracellular drug transport with highly quaternized *N*-trimethyl chitosan chloride in neutral environments: *In vitro* evaluation in intestinal epithelial cells (Caco-2) [J]. *J Pharm Sci*, 1999, 88(2): 253-257.
- [13] Thanou M, Verhoef J C, Marbach P, *et al.* Intestinal absorption of octreotide: *N*-Trimethyl chitosan chloride (TMC) ameliorates the permeability and absorption properties of the somatostatin analogue *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Pharm Sci*, 2000, 89(7): 951-957.
- [14] Guan M, Zhou Y, Zhu Q L, *et al.* *N*-Trimethyl chitosan nanoparticle-encapsulated lactosyl-norcantharidin for liver cancer therapy with high targeting efficacy [J]. *Nanomedicine*, 2012, 8(7): 1172-1181.
- [15] Snyman D, hammam J H, Kotze J S, *et al.* The relationship between the absolute molecular weight and the degree of quaternisation of *N*-trimethyl chitosan chloride [J]. *Carbohydr Polym*, 2002, 50(2): 145-150.
- [16] Sieval A B, Thanou M, Kotzé A F, *et al.* Preparation and NMR characterization of highly substituted *N*-trimethyl chitosan chloride [J]. *Carbohydr Polym*, 1998, 36(2/3): 157-165.
- [17] 杨 涛, 李文娟, 周从山. 芑荧光探针光谱法测定 CTAB 临界胶束浓度 [J]. 石化技术与应用, 2007, 25(1): 48-50.
- [18] 韩晓燕, 张 毅, 赵培莉, 等. 甘草次酸修饰的壳寡糖-硬脂酸药物载体的合成及其胶束性质研究 [J]. 中草药, 2011, 42(3): 505-510.