

文章编号:2095-6134(2015)01-051-06

环糊精固载量不同的壳聚糖药物载体合成及性能*

秦 飞, 姚 鑫[†]

(中国科学院大学化学与化工学院, 北京 100049)

(2014 年 3 月 7 日收稿; 2014 年 3 月 25 日收修改稿)

Qin F, Yao X. Preparation and drug loading performance of glycol chitosan crosslinked-carboxymethyl-beta-cyclodextrin polymers[J]. Journal of University of Chinese Academy of Sciences, 2015, 32(1):51-56.

摘 要 以乙二醇壳聚糖(GCS)为母体,通过控制交联反应条件,合成固载不同数量羧甲基 β 环糊精(CM β -CD)的壳聚糖-环糊精结合物(GCS_n-CM β -CD).用核磁共振、浓硫酸-苯酚降解法等对结合物进行表征.以 5-氟尿嘧啶为模型药物,用表面等离子体激元共振仪在线检测不同结合物与药物的作用.结果表明,不同结合物对药物的运载能力随环糊精数量的增加而增强,对药物的吸附规律符合 Langmuir 等温方程.为 GCS_n-CM β -CD 作为药物载体的进一步应用提供了依据.

关键词 乙二醇壳聚糖固载羧甲基 β 环糊精; 药物载体; 5-氟尿嘧啶; 表面等离子体激元共振仪

中图分类号:O657 文献标志码:A doi:10.7523/j.issn.2095-6134.2015.01.009

Preparation and drug loading performance of glycol chitosan crosslinked-carboxymethyl-beta-cyclodextrin polymers

QIN Fei, YAO Xin

(School of Chemistry and Chemical Engineering, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract Carboxymethyl- β -cyclodextrin (CM β -CD) modified glycol chitosan (GCS) polymers (GCS_n-CM β -CD) were synthesized in the presence of CM β -CD and GCS. The degree of substitution of CM β -CD was controllable. The products were characterized by MALDI-TOF MS, ¹H nuclear magnetic resonance spectrum (¹H-NMR), Fourier transform infrared spectrum (FT-IR), and H₂SO₄-pheno degradation method. 5-fluorouracil was used as a model drug to explore the interaction with GCS_n-CM β -CD. The results indicate that different GCS_n-CM β -CD polymers showed different drug loading capacities and the adsorption equilibrium was fitted to Langmuir equation. This study provides the basis for usage of GCS_n-CM β -CD as drug carrier.

Key words glycol chitosan crosslinked-carboxymethyl-beta-cyclodextrin; drug carrier; 5-fluorouracil; surface plasmon resonan

*天然药物及仿生药物国家重点实验室开放基金(20120207)、国家自然科学基金(21271184)和 973 项目(2014CB93190, 2012CB932504)资助

[†]通信作者, E-mail: yaox@ucas.ac.cn

药物载体可以通过增加药物溶解性,增强药物靶向性^[1]及缓控释性^[2]等有效提高药效,降低药物不良反应,已成为当前医药学界的研究热点.壳聚糖因具有良好的生物活性,与细胞有很强的亲和力,在体内可被分解吸收,对人体无毒副作用,被当作一种理想的药物载体材料^[3-4].然而,壳聚糖在中碱性条件下难溶解并且对疏水性药物的运载能力有限^[5],导致它的应用受到限制.为解决这些问题,研究者对壳聚糖进行了各种改性^[5-8]以满足不同的运载要求.

环糊精是由 6~8 个葡萄糖单元以 $\alpha-1,4$ -糖苷键连结而成的环状低聚糖,其疏水空腔可以结合多肽、蛋白及各种疏水性药物,对药物起到保护与增溶作用,因此,用环糊精对壳聚糖进行修饰改性引起了人们的极大关注. Prabakaran 和 Mano^[2]研究羟丙基壳聚糖固载羧甲基 β 环糊精对酮洛芬的运载,与壳聚糖相比,聚合物中环糊精的存在使得其对酮洛芬有更好的包合性; Mannila 等^[9]用三甲铵乙内酯盐酸盐修饰的壳聚糖及 α 环糊精运载一种脂溶性小肽环孢素 A,使环孢素 A 的舌下生物利用度得到提高; Zhang 等^[10]研究壳聚糖与阳离子化的 β 环糊精聚合物对口服胰岛素的运载,环糊精的保护作用及壳聚糖层的存在大大降低了胰岛素在模拟胃肠条件下的水解;可以看出,通过不同方式结合壳聚糖与环糊精而得的各类衍生物,在药物运载方面表现出极大的优越性.

本文中,我们合成了羧甲基 β 环糊精,通过碳化二亚胺缩合剂将其与乙二醇壳聚糖的氨基交联,将羧甲基 β 环糊精固载于乙二醇壳聚糖的长链上,并通过调节反应条件,得到多种羧甲基 β 环糊精固载量不同的 GCS_n-CM β -CD. 进而用表面等离子体激元共振 (SPR) 法,研究比较固载不同数量羧甲基环糊精的结合物对抗癌药物 5-氟尿嘧啶的运载性能. 为其在药物运载领域的应用打下了基础.

1 实验部分

1.1 试剂及仪器

β -环糊精 (β -CD), 乙二醇壳聚糖 (GCS, 聚合度 ≥ 400), 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基) 碳酰二亚胺盐酸盐 (EDC·HCl), 猪胃粘蛋白 (PGM), Sigma-Aldrich; 1-辛硫醇 (1-OT), Across Organics; 5-氟尿嘧啶 (5-Fu), 中国药品生物制品鉴定所; 无

水乙醇, 氯乙酸, 氢氧化钠, 盐酸, 丙酮, 氯化钠, 磷酸氢二钾, 磷酸二氢钾, 三羟甲基氨基甲烷 (Tris), 分析纯, 北京化学试剂公司; 超纯水 (18.25 M Ω ·cm). 1-OT 配成 10 mmol/L, PGM 溶于含有 0.15 mol/L NaCl 的 10 mmol/L Tris-HCl (pH3.0), 5-Fu 溶于 10 mmol/L PBS (pH6.0).

紫外可见分光光度计 (UV-vis): Shimadzu UV-2550; 红外光谱仪 (FT-IR): VERTEX 70; MALDI-TOF 质谱: Autoflex III, α -氰基-4-羟基肉桂酸 (CHCA) 作为基质, 含 Na₂SiO₃, Bruker; 核磁共振 (¹H-NMR): JEOL JNM ECA 600, 溶剂为 D₂O; 表面等离子体激元共振仪: SPR Navi 200.

1.2 CM β -CD 及 GCS_n-CM β -CD 的合成

1.2.1 CM β -CD 的合成

CM β -CD 的合成方法^[11]: 氯乙酸与环糊精 (摩尔比: 8:1) 在碱性条件下恒温 55℃ 反应 12 h. 所得混合物溶液用截留分子量 1 000 的透析袋透析, 除去未反应的物质, 剩余液体用丙酮分散得到沉淀物, 即为 CM β -CD, 产物真空干燥 4 h. 用 MALDI-TOF 及 FT-IR 进行表征.

1.2.2 GCS_n-CM β -CD 的合成

分别以不同浓度 (如表 1 所示) 的 NaCl 水溶液为反应介质, 进行 CM β -CD 与 GCS 的交联反应. CM β -CD 与 GCS 分别溶于 10 mL NaCl 溶液中, 交联剂 EDC 加入 CM β -CD 溶液中室温搅拌 0.5 h 以活化 CM β -CD 上的 -COOH. 然后将 GCS 加入活化好的溶液中, 反应 24 h, 使 -COOH 与 GCS 骨架上的 -NH₂ 交联. 所得产物用截留分子量为 10 000 的透析袋依次在不同浓度的 NaCl 溶液及 H₂O 中透析, 透析后的溶液冻干后得棉花状产物. 用 ¹H-NMR 及 UV-vis 对其进行表征.

1.3 SPR 膜的制备

将 SPR Navi 200 配备的金膜进行修饰, 用于 SPR 原位在线测定结合物与 5-Fu 的相互作用. 首先将洁净的金膜置于 1-OT 的乙醇溶液中, 浸泡过夜, 通过 Au-S 键将 1-OT 固定于金膜上, 用乙醇及蒸馏水冲洗并用 N₂ 吹干后, 在金膜表面滴加 50 μ L 100 mg/mL 的 PGM 溶液, 静置 1 h, 再用 Tris-HCl 及蒸馏水冲洗并吹干, 最后在仪器通道 2 (对应样品窗口) 所对应的金膜位置, 滴加 30 μ L 1 mg/mL 的聚合物溶液, 仪器通道 1 (对应参比窗口) 对应位置滴加 30 μ L 1 mg/mL 的 GCS 溶液, 作用 30 min 后再次将金膜冲洗吹干, 即可进

行实验.

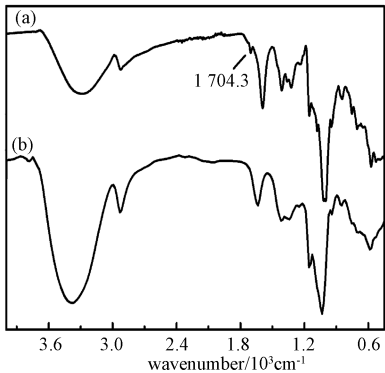
2 结果与讨论

2.1 CMβ-CD 的表征结果

图 1 为 β-CD 及合成的 CMβ-CD 的红外光谱, 从图中可看到, 与 β-CD 的红外吸收 (曲线 (b)) 相比, 在 CMβ-CD 的谱图 (曲线 (a)) 中, 1 704.3 cm⁻¹ 处出现了羰基的特征吸收峰^[12-13], 证明了 β-CD 羧甲基化的成功.

图 2 为 CMβ-CD 的 MALDI-TOF MS 谱, 从图中各离子峰的质荷比 (*m/z*) 可计算得出产物

CMβ-CD 是由羧甲基的取代数量从 1 (β-CD-CH₂COOH) 至 7 (β-CD-(CH₂COOH)₇) 的取代物组成的混合物. 其中 *m/z* = 1 216. 006、1 273. 928、1 332. 020、1 390. 086、1 448. 106、1 506. 687、1 564. 216 分别是 β-CD 空腔加 1、2、3、4、5、6、7 个羧甲基后的加钠峰. 而图中其他相对丰度较小的离子峰是羧甲基中的 H 被基质中的 Na 所取代而得, 例如 *m/z* = 1 237. 423, 表示 [β-CDNa-CH₂COONa]⁺ 的离子峰. 结合 FT-IR 与 MALDI-TOF MS 的结果可知, 我们合成了羧甲基取代数量不同的 CMβ-CD.



(a) CMβ-CD; (b) β-CD.

图 1 CMβ-CD 与 β-CD 的红外吸收光谱

Fig. 1 FT-IR spectra of CMβ-CD (a) and β-CD (b)

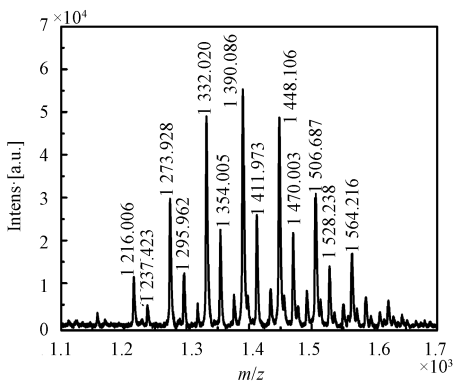


图 2 CMβ-CD 的 MALDI-TOF 质谱

Fig. 2 MALDI-TOF MS spectra of CMβ-CD

2.2 结合物 GCS_n-CMβ-CD 的表征结果

对所得结合物 GCS_n-CMβ-CD 进行了 ¹H NMR 分析, 图 3 所示为 GCS 及 GCS_n-CMβ-CD 的 ¹H NMR 谱. 图 3(a) 中 GCS 上不同 H 的化学位移分别为^[14] (ppm): 1.9 (CH₃CO-), 2.6 (糖环 H2, C2 连接未被乙酰化的氨基), 3.4 ~ 3.8 (糖环 H3-H6;

糖环 H₂, C₂ 连接被乙酰化的氨基; CH₂, 乙二醇侧链), 4.3 (糖环 H1). 与 GCS 相比, 图 3(b) 中 GCS_n-CMβ-CD ¹H NMR 因 CMβ-CD 的引入使 3.4 ~ 4.4 ppm 处 GCS 及 CMβ-CD 糖环上各 H 的峰交叠, 并且在 4.9 ~ 5.2 ppm 增加了 CM β-CD 的 H1 峰^[15]. 由此初步判断 CM β-CD 连接在了 GCS 骨架上.

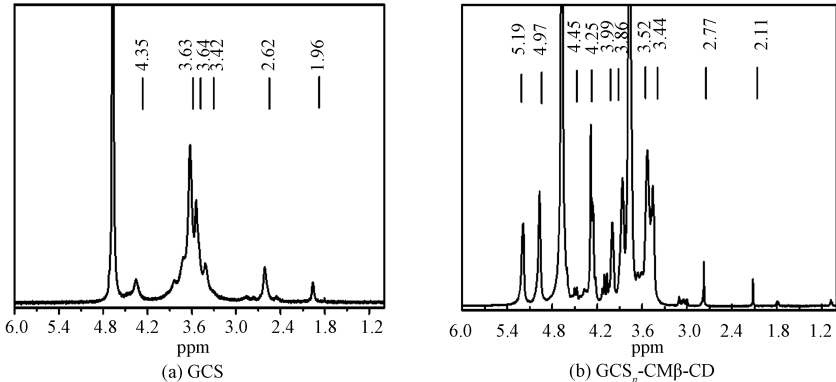


图 3 GCS 与 GCS_n-CMβ-CD 的 ¹H NMR 谱

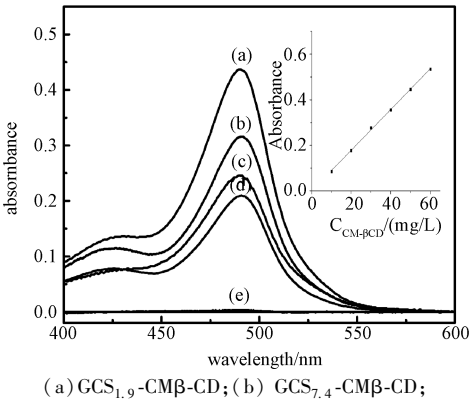
Fig. 3 ¹H NMR spectra of GCS and GCS_n-CMβ-CD

为了进一步证明 CMβ-CD 的固载成功,通过浓硫酸-苯酚降解法^[16]结合 UV-vis 进行表征,同时得到 GCS 骨架上 CMβ-CD 的固载量.浓硫酸可使 CMβ-CD 脱水生成糠醛或羟甲基糠醛,进而与苯酚缩合形成一种橙黄色化合物,在 489 nm 波长下有最大吸收峰,且在一定浓度范围内其颜色深浅与 CMβ-CD 的含量成正比(图 4 插图为工作曲线: $y=0.0357x+0.0004$, $R=0.9995$),而 GCS 与浓硫酸苯酚作用没有这样的变化.如图 4 所示,图中曲线分别为所得 4 种结合物((a)—(d))及 GCS(e)经浓硫酸苯酚处理后的紫外-可见吸收光谱.

结合物中 CMβ-CD 的固载量 $Q^{[11]}$:

$$Q = (C \times V) / (M_w \times m),$$

其中, C :由各结合物水解产物的吸光度代入工作曲线而得; V :显色反应所用结合物溶液体积; M_w :CMβ-CD 平均分子量(1 447.81 g/mol); m :显色反应所用结合物质量.



(a) GCS_{1.9}-CMβ-CD; (b) GCS_{7.4}-CMβ-CD; (c) GCS_{13.0}-CMβ-CD; (d) GCS_{23.3}-CMβ-CD; (e) GCS

图 4 GCS_n-CMβ-CD 及 GCS 的浓硫酸 - 苯酚水解产物的紫外吸收光谱

Fig.4 UV-vis spectra of GCS_n-CMβ-CD and GCS

合成条件及结果如表 1 所示.当反应介质相同时,CMβ-CD 用量越多(GCS 糖单元与 CMβ-CD 摩尔比为 1:1 时),CMβ-CD 的固载量越高,为平均每 1.9 个糖单元上接 1 个 CMβ-CD,考虑到

表 1 GCS_n-CMβ-CD 的合成条件及结果
Table 1 Synthesis conditions and results

聚合物	$C_{NaCl}/$ (mol·L ⁻¹)	摩尔比/ (GCS/CMβ-CD)	固载量/ (μmol·g ⁻¹)	壳聚糖单元与环糊精数量 比 $N_{GCS}/N_{CMβ-CD}$
GCS _{1.9} -CMβ-CD	0	1:1	545.41	1.9
GCS _{7.4} -CMβ-CD	0	3:1	338.05	7.4
GCS _{13.0} -CMβ-CD	0.02	3:1	244.15	13.0
GCS _{23.3} -CMβ-CD	0.03	3:1	161.65	23.3

CMβ-CD 连接在 GCS 长链上时的位阻等影响,这种高的固载量很可能是由于部分环糊精并未通过酰胺键连接于壳聚糖上,而是通过其自身大量羧基的负电荷与 GCS 正电荷的静电作用结合的.当减少 CMβ-CD 用量并在介质中加入 NaCl 时,由于小的带电粒子的干扰有可能削弱了 CMβ-CD 与 GCS 的静电作用,使得 CMβ-CD 主要通过氨基羧基交联固载于 GCS 长链.

2.3 SPR 检测 GCS_n-CMβ-CD 对药物的运载

2.3.1 SPR 原理

表面激元共振仪被广泛应用于在线研究分子之间的相互作用,具有简单、灵敏、免标记等优点,因此可以用它研究载体对药物分子的结合与释放作用.与传统的研究载体与药物结合的方法^[5,12-14]相比,SPR 从分子水平揭示二者的结合与分离情况,可作为宏观的药物载入及释放现象

的机理测定方法,其实验原理如下:1-OT 通过 Au-S 键自组装于金膜表面,PGM 通过暴露的疏水片段与 1-OT 延伸于金膜外的烃基通过疏水作用结合,聚合物及 GCS 中由于壳聚糖链上大量氨基的存在极易带正电,在 pH6.0 时与带负电的 PGM (pI≈3.0)通过静电作用结合而被固定于金膜表面.当流动注入药物溶液时,药物与金膜表面固定物在样品池中相互作用导致金膜表面折射率的变化,从而使 SPR 角发生变化,进而检测其信号变化.

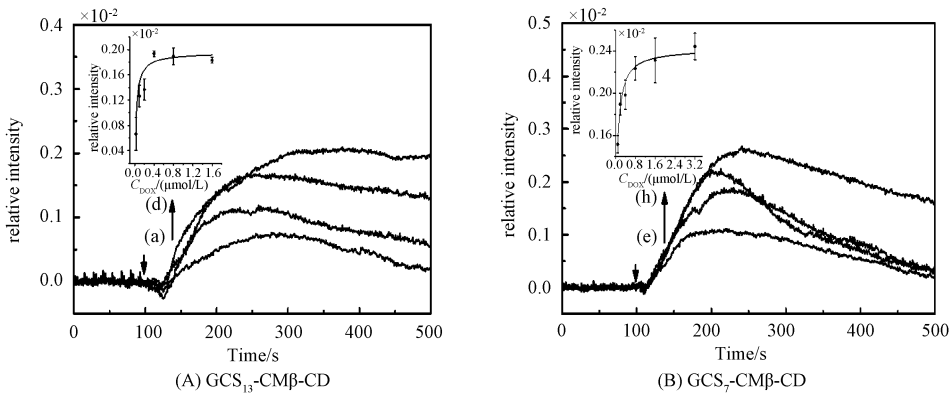
2.3.2 对 5-氟尿嘧啶的运载及运载性能评价

选择羧甲基 β 环糊精固载量适中的 2 种结合物,分别研究其对疏水性的抗癌药物 5-Fu 的运载.图 5 所示为 GCS_{7.4}-CMβ-CD(A)及 GCS_{13.0}-CMβ-CD(B)与 5-Fu 相作用的 SPR 结果.分别将不同浓度的 5-Fu 溶液流动注入流通池时,SPR 信号均产生变化.首先信号增加是由于药物与载体

的相互结合而导致的, 信号达到最大值后, 有缓慢下降回原位的趋势, 从图中可看出, 信号下降速率要远远小于升高的速率, 这说明, 药物可以与聚合物结合, 并且随着药物流过流通池后载液的冲洗, 药物可以被缓慢释放. 图中产生信号为扣除 GCS 对药物吸附作用后而得, 说明 CMβ-CD 的引入对药物结合起到很大作用, CMβ-CD 的疏水空腔可以通过疏水作用力结合药物从而提高药物运载量.

随着注入药物浓度增加, SPR 信号变化值也逐渐增加, 对于 GCS_{7.4}-CMβ-CD 当药物浓度达到 1.6 μmol/L 时, 信号基本不再增大, 说明此时结

合物对药物的结合达到饱和, 对载体与药物的结合方式进行拟合^[17-19], 结果如插图所示, GCS_{7.4}-CMβ-CD 与 5-Fu 的结合符合 Langmuir 模型, 结合常数 Kd_{7.4} 约为 3.08 × 10⁷ mol⁻¹, 同样的方法得到 GCS_{13.0}-CMβ-CD 与 5-Fu 的结合常数 Kd_{13.0} 约为 1.66 × 10⁷ mol⁻¹, 约为 Kd_{7.4} 的一半, 说明环糊精数量越多, 对药物的结合能力越强. 考虑到环糊精的疏水空腔不仅可以增溶小分子疏水药物, 而且对于含有疏水基团的大分子蛋白多肽等药物也有一定的结合能力^[20], 推测该结合物对含有疏水基团的药物均有运载能力, 有望用于含疏水基团的药物的运载.



(a) 0.1 μmol/L; (b) 0.2 μmol/L; (c) 0.4 μmol/L; (d) 1.6 μmol/L 5-Fu;
(e) 0.025 μmol/L; (f) 0.1 μmol/L; (g) 0.2 μmol/L; (h) 0.8 μmol/L 5-Fu.

图 5 GCS₁₃-CMβ-CD 及 GCS₇-CMβ-CD 与 5-Fu 相互作用的 SPR 结果

Fig. 5 SPR responses to the interaction of GCS₁₃-CMβ-CD and GCS₇-CMβ-CD with 5-Fu

3 结论

本文合成了固载不同数量羧甲基 β 环糊精的 GCS_n-CMβ-CD 结合物, 以 5-Fu 为药物模型, 通过简单、灵敏、免标记的 SPR 在线研究了 GCS_n-CMβ-CD 与药物的结合. 实验结果表明, 环糊精的引入可以增加载体的载药量, 随环糊精数量的增加, GCS_n-CMβ-CD 对 5-Fu 的结合能力相应增强; GCS_n-CMβ-CD 对药物的吸附符合 Langmuir 方程. 为 GCS_n-CMβ-CD 作为药物载体的进一步应用提供了良好的实验基础.

参考文献

[1] Wang X, Chen C J, Huo D, et al. Synthesis of β-cyclodextrin modified chitosan-poly (acrylic acid) nanoparticles and use as drug carriers [J]. Carbohydrate

Polymers, 2012, 90(1): 361-369.
[2] Prabakaran M, Mano J F. Hydroxypropyl chitosan bearing beta-cyclodextrin cavities: synthesis and slow release of its inclusion complex with a model hydrophobic drug [J]. Macromolecular bioscience, 2005, 5(10): 965-973.
[3] Amidi M, Mastrobattista E, Jiskoot W, et al. Chitosan-based delivery systems for protein therapeutics and antigens [J]. Advanced drug delivery reviews, 2010, 62(1): 59-82.
[4] Bowman K, Leong K W. Chitosan nanoparticles for oral drug and gene delivery [J]. International Journal of Nanomedicine, 2006, 1(2): 117-128.
[5] Chaleawler-Umporn S, Nuchuchua O, Saesoo S, et al. Effect of citrate spacer on mucoadhesive properties of a novel water-soluble cationic β-cyclodextrin-conjugated chitosan [J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 84(1): 186-194.
[6] Nam H Y, Kwon S M, Chung H, et al. Cellular uptake mechanism and intracellular fate of hydrophobically modified glycol chitosan nanoparticles [J]. Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society, 2009, 135(3): 259-267.

- [7] Shu S J, Zhang X G, Wu Z M, et al. Gradient cross-linked biodegradable polyelectrolyte nanocapsules for intracellular protein drug delivery [J]. *Biomaterials*, 2010, 31 (23) : 6 039-6 049.
- [8] Yu S H, Wu S J, Tang D W, et al. Stimuli-responsive materials prepared from carboxymethyl chitosan and poly (γ -glutamic acid) for protein delivery [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 87 (1) : 531-536.
- [9] Mannila J, Jarvinen K, Holappa J, et al. Cyclodextrins and chitosan derivatives in sublingual delivery of low solubility peptides: A study using cyclosporin A, alpha-cyclodextrin and quaternary chitosan N-betainate [J]. *International journal of pharmaceutics*, 2009, 381 (1) : 19-24.
- [10] Zhang N, Li J H, Jiang W F, et al. Effective protection and controlled release of insulin by cationic beta-cyclodextrin polymers from alginate/chitosan nanoparticles [J]. *International journal of pharmaceutics*, 2010, 393 (1/2) : 212-218.
- [11] Tan H N, Xue Y, Luan Q F, et al. Evaluation of glycol chitosan-graft-carboxymethyl β -cyclodextrin as potential pH-sensitive anticancer drug carrier by surface plasmon resonance [J]. *Analytical Methods*, 2012, 4 (9) : 2 784.
- [12] Ji J G, Hao S L, Liu W Q, et al. Preparation and evaluation of O-carboxymethyl chitosan/cyclodextrin nanoparticles as hydrophobic drug delivery carriers [J]. *Polymer Bulletin*, 2011, 67 (7) : 1 201-1 213.
- [13] Prabakaran M, Gong S Q. Novel thiolated carboxymethyl chitosan-g- β -cyclodextrin as mucoadhesive hydrophobic drug delivery carriers [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2008, 73 (1) : 117-125.
- [14] Yu J M, Li Y J, Qiu L Y, et al. Self-aggregated nanoparticles of cholesterol-modified glycol chitosan conjugate: preparation, characterization, and preliminary assessment as a new drug delivery carrier [J]. *European Polymer Journal*, 2008, 44 (3) : 555-565.
- [15] Zhang X G, Wu Z M, Gao X J, et al. Chitosan bearing pendant cyclodextrin as a carrier for controlled protein release [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2009, 77 (2) : 394-401.
- [16] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related Substances [J]. *Analytical Chemistry*, 1956, 28 (3) : 350-356.
- [17] Abe H, Kenmoku A, Yamaguchi N. Structural effects of oligosaccharide-branched cyclodextrins on the dual recognition toward lectin and drug [J]. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 2002, 44 (1-4) : 39-47.
- [18] Chiu S H, Chung T W, Giridhar R, et al. Immobilization of β -cyclodextrin in chitosan beads for separation of cholesterol from egg yolk [J]. *Food Research International*, 2004, 37 (3) : 217-223.
- [19] Oda Y, Yanagisawa H, Maruyama M, et al. Design, synthesis and evaluation of D-galactose-beta-cyclodextrin conjugates as drug-carrying molecules [J]. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 2008, 16 (19) : 8 830-8 840.
- [20] Zhang N, Li J H, Jiang W F, et al. Effective protection and controlled release of insulin by cationic beta-cyclodextrin polymers from alginate/chitosan nanoparticles [J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2010, 393 (1/2) : 212-218.