

N-辛基-O, N-羧甲基壳聚糖自组装纳米粒的制备、理化性质及安全性评价

霍美蓉, 周建平*, 张 勇, 吕 霖, 刘 欢, 刘芳洁

(中国药科大学药剂学教研室, 南京 210009)

摘要 目的: 制备两性壳聚糖衍生物 N-辛基-O, N-羧甲基壳聚糖(OCC)自组装纳米粒, 并对其理化性质及安全性进行评价。方法: 以透析法制备 OCC 自组装纳米粒; 利用动态光散射(DLS)、Zeta 电位仪、透射电镜对其形态、结构进行表征; 通过体外溶血实验及小鼠尾静脉注射急性毒性实验评价其安全性。结果: OCC 自组装纳米粒粒径为 165.6 nm, 多分散指数为 0.191。由于纳米粒表面羧甲基基团的存在, 纳米粒表面带负电荷, 其表面电势为 -30.2 mV。透射电镜结果显示该自组装聚合体为规则球形结构, 粒径分布均匀。溶血实验和急性毒性实验结果表明, OCC 溶血性远远小于 Tween 80, 与 Cre-mophor EL 相当; OCC 小鼠尾静脉注射的 LD₅₀ 及 95% 可信限为 560.2(523.0~600.0)mg/kg。结论: OCC 自组装纳米粒可初步推断为安全可靠的静脉注射用纳米药物载体。

关键词 壳聚糖; 两性性; 自组装纳米粒; 形态; 安全性评价

中图分类号 R944 文献标识码 A 文章编号 1000-5048(2007)06-0512-04

Preparation, physicochemical properties and safety evaluation of self-assembled nanoparticles based on N-octyl-O, N-carboxymethyl chitosan

HUO Mei-rong, ZHOU Jian-ping*, ZHANG Yong, L Lin, LIU Huan, LIU Fang-jie

Department of Pharmaceutics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract Aim: To prepare the self-assembled nanoparticles based on carboxymethyl chitosan bearing long alkyl chains (N-octyl-O, N-carboxymethyl chitosan, OCC), characterize the physicochemical properties of OCC self-assembled nanoparticles and meanwhile evaluate the safety profile. **Methods:** OCC self-assembled nanoparticles were prepared by dialysis and characterized using dynamic light scattering, Zeta potential and transmission electron microscopy (TEM). The safety of OCC self-assembled nanoparticles was evaluated by *in vitro* hemolysis tests and acute toxicity in mice. **Results:** The mean size of self-assembled nanoparticles was 165.6 nm with polydisperse index of 0.191; The Zeta potential was -30.2 mV, which were attributed to the carboxymethyl groups on the surface of OCC self-assembled nanoparticles. The TEM images showed a spherical shape. The result of *in vitro* hemolysis tests showed that OCC self-assembled nanoparticles were safe carriers in terms of the induction of the membrane damage. The LD₅₀ and its 95% confidence interval of OCC self-assembled nanoparticles in mice were 560.2 (523.0~600.0) mg/kg. **Conclusion:** The present OCC self-assembled nanoparticles could be potentially useful as safety carriers for the intravenous drug delivery.

Key words chitosan; amphiphilic; self-assembled nanoparticles; morphology; safety evaluation

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30472105) and the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK2007173)

* 收稿日期 2007-09-19 * 通讯作者 Tel: 025-83271272 E-mail: zhoujianp60@163.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 30472105); 江苏省自然科学基金资助项目(No. BK2007173); 中国药科大学人才引进资金资助项目(No. 211073)

两亲性高分子材料的自组装聚集体目前研究较为广泛,其作为药物纳米载体具有体内长循环及对肿瘤组织的靶向特性,是当前药物递送系统的研究热点^[1,2]。但作为药物载体,高分子材料不仅要求能够在水介质中自组装,还需满足生物相容性、生物可降解性等要求,才能达到安全递药的目的^[3],因此大大限制了自组装聚集体材料的选择及在药物递送系统中的应用。目前应用为药物载体材料的亲水部分一般仅局限于聚乙二醇(PEG)和聚氧乙烯(PEO),疏水部分则局限于聚内酯[如聚丙交酯(PLA)、聚乙交酯(PGA)、聚(丙交酯-乙交酯)(PLGA)]或聚氨基酸(如聚天冬氨酸、聚谷氨酸)等,其中,后者作为疏水段可能导致免疫反应,且肽键很容易被体内的酶断裂,释药速率的控制不是很理想。

壳聚糖(Chitosan)是甲壳质脱乙酰基的产物,具有性质稳定、良好的生物相容性和生物可降解性、低免疫原性等优点。若在壳聚糖分子链分别引入亲水基团和疏水基团,形成两亲性壳聚糖衍生物对难溶性药物有优良的增溶作用^[4,5],但该类衍生物作为药物载体的安全性评价国内外尚未见文献报道。

本课题组曾报道于壳聚糖 6 位羟基、2 位氨基引入羧甲基(6 位羟基为主),2 位氨基引入疏水烷基链,制得两亲性壳聚糖衍生物 N-辛基- O, N-羧甲基壳聚糖(N-octyl- O, N-carboxymethyl chitosan, OCC)(图 1)^[6]。本论文将对其自组装纳米粒的理化性质及安全性进行评价,为其作为静脉注射用药物递送载体提供理论依据。

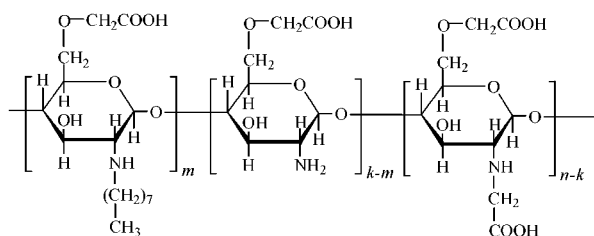


Fig.1 Structure of N-octyl- O, N-carboxymethyl chitosan (OCC)

1 材料

1.1 仪器

JY92-2D 超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司);Zetasizer 3000 HS 激光粒径测定仪(英国马尔文公司);H-7000 透射电镜(日本日立

公司);TU-1800 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)。

1.2 药品与试剂

壳聚糖(玉环县海洋生物化学有限公司,黏均相对分子质量 8.71 万,脱乙酰度 89.3%);氯乙酸(广州化学试剂厂);正辛醛(南京开元嘉禾香料有限公司);硼氢化钠(国药集团化学试剂有限公司)。其他试剂均为市售分析纯。

1.3 细胞和动物

人血细胞(南京红十字血液中心);一级昆明种小鼠,雌性,体重 18~22 g,中国药科大学实验动物部提供[合格证号:SCXK(苏-2002-0011)]。

2 实验方法

2.1 N-辛基- O, N-羧甲基壳聚糖的合成

2.1.1 O, N-羧甲基壳聚糖的合成 称取壳聚糖 2 g 混悬于异丙醇中,加入 NaOH, 40 ℃ 搅拌碱化,氯乙酸 12 g 溶于异丙醇,滴加入反应液,反应体系于 40 ℃ 反应 5 h,倾去上清液,加入水 40 mL,使之成为澄清透明的黄色溶液。用醋酸调节溶液 pH 至中性,加甲醇沉淀,过滤,滤饼用甲醇-水(90:10)多次洗涤,水 20 mL 溶解,滤过,冻干即可得 O, N-羧甲基壳聚糖 1.8 g。

2.1.2 N-辛基- O, N-羧甲基壳聚糖的合成 取 O, N-羧甲基壳聚糖 1 g,混悬于甲醇中,滴加辛醛 1.02 g,搅拌反应一段时间,滴加 10% NaBH₄ 水溶液 3.2 mL,继续搅拌 12 h,5 mol/L 盐酸液调节 pH 至中性,甲醇分散沉淀,3 号垂熔漏斗过滤,滤饼依次用甲醇-水(90:10)、甲醇、正己烷和丙酮洗涤,真空干燥,即得白色粉末——N-辛基- O, N-羧甲基壳聚糖(OCC)0.6 g。元素分析结果^[6]表明其羧甲基取代度为 119.0%,辛基取代度为 61.6%。

2.2 N-辛基- O, N-羧甲基壳聚糖的自组装

称取 OCC 适量分散于水介质中,50 ℃ 搅拌 0.5 h,冰浴下探头超声(100 W, 10 min),0.45 μm 滤膜过滤,即得 OCC 自组装纳米粒水溶液。

2.3 OCC 自组装纳米粒粒径、表面电荷、TEM 测定

OCC 自组装纳米粒粒径及表面电荷采用激光粒径测定仪测定,测试时 OCC 质量浓度为 1 mg/mL。

取 OCC 自组装纳米粒溶液(5 mg/mL),磷钨酸负染法染色,取 1 滴滴于点滴反应瓷板的凹槽内,

并将喷碳铜网放于试液上,1~2 min 后取出铜网,用滤纸小片从铜网边缘吸去残余液体;将该铜网放在染液滴(4%磷钨酸溶液,pH 7.0)上约 30 s,吸干多余染液、干燥,透射电镜观察形态。

2.4 OCC 自组装纳米粒的安全性评价

2.4.1 体外溶血实验 取人血 4 mL,2 500 r min 离心 10 min,生理盐水洗涤至上清液无色。移取血细胞混悬液 2 mL 到 100 mL 量瓶,生理盐水定容至 100 mL,得 2% 血细胞混悬液。分别配制 10 mg mL 的 Tween 80、OCC、Cromophor EL,按表 1 配制终浓度分别为 0.2,0.4,0.6,0.8,1.0,1.5,2,4 mg mL 的 OCC 纳米粒溶液,摇匀。9 号管和 10 号管分别为 0% 溶血和 100% 溶血,置 37 ℃ 恒温水浴,孵育 1 h 后,3 000 r min 离心 10 min,取上清液,于 416 nm 紫外分光光度计测定其吸收度。由于样品溶液本身可能在 416 nm 处有吸收,因此将样品母液直接以生理盐水稀释相同的倍数,37 ℃ 恒温水浴孵育 1 h,3 000 r min 离心 10 min,取上清液测定制剂本身的吸收度,以上两者吸收度之差即为 A_{sample} ,按公式(1)计算溶血百分数。

$$\text{Hemolysis}(\%) = \frac{A_{\text{sample}} - A_{0\%}}{A_{100\%} - A_{0\%}} \times 100 \quad (1)$$

Tab.1 Design of hemolysis test

Tube	Sample (mL)	Saline (mL)	2% RBC ^a	Tube	Sample (mL)	Saline (mL)	2% RBC
1	0.1	2.4	2.5	6	0.75	1.75	2.5
2	0.2	2.3	2.5	7	1.0	1.5	2.5
3	0.3	2.2	2.5	8	2.0	0.5	2.5
4	0.4	2.1	2.5	9	0	2.5	2.5
5	0.5	2.0	2.5	10	0	2.5(H ₂ O)	2.5

^aRed blood cells

2.4.2 小鼠尾静脉注射急性毒性实验 以 5% 葡萄糖溶液为溶剂,配制浓度为 50.00 mg mL 的 OCC 自组装纳米粒溶液,并以 1:0.85 的比例做递减稀释,配制浓度分别为 42.50, 36.13, 30.71, 26.10 mg mL 的自组装纳米粒溶液。

小鼠随机分为 6 组,每组 10 只,受试前禁食 12 h。根据预试,OCC 最高剂量设置为 800.00 mg kg,并以 1:0.85 的剂距依次递减为 680.00, 578.00, 491.30, 417.61 mg kg 共 5 个剂量组,分别设为 A, B, C, D, E 组,最后一组为阴性对照组。小鼠单次尾静脉给药,注射速度约为 0.5 mL min,阴性对照组给相同重量体积的 5% 葡萄糖溶液。给药后立

即观察动物行为、状态及死亡时间,并观察饲养 14 d,记录各组动物症状及死亡情况,采用 Bliss 法计算 LD₅₀ 及其 95% 可信限。

3 结果与讨论

3.1 自组装纳米粒的理化性质

由超声分散法制备的自组装纳米粒为具有明显淡蓝色乳光的胶体溶液,动态光散射测得其粒径为 165.6 nm,多分散指数为 0.191,粒径分布均匀,符合静脉注射药物载体的要求。

OCC 自组装纳米粒表面 Zeta 电位为 -30.2 mV,表明其表面带有大量的负电荷,这可能是由于两亲性壳聚糖衍生物发生自组装时,疏水烷基链相互聚集形成疏水性的内核,而亲水的羧甲基壳聚糖骨架形成亲水的外壳。较大的 Zeta 电位绝对值预示着该纳米分散体系具有较好的稳定性。

图 2 为 OCC 自组装形成纳米粒的透射电镜照片。由图可知,OCC 自组装纳米粒为规则球形结构,粒径分布均匀,其粒径约为 50 nm,远小于动态光散射实验测得的纳米粒在溶液中的粒径(165.6 nm)。这可能是 TEM 样品制备过程中的干燥过程引起纳米粒表面的塌陷所致。

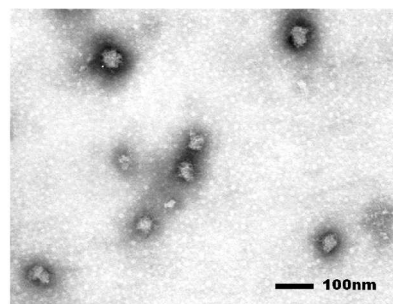


Fig.2 TEM image of OCC self-assembled nanoparticles in water

3.2 自组装纳米粒的安全性评价

3.2.1 体外溶血试验 两亲性聚合物化学结构和低分子表面活性剂相似,而低分子表面活性剂对血细胞膜有一定的伤害作用^[7]。Tween 80 和 Cremophor EL 是常用的两种可静脉注射的低分子表面活性剂,因此,本文以 Tween 80 和 Cremophor EL 为对照,研究壳聚糖两亲性衍生物 OCC 自组装纳米粒对血细胞膜的伤害情况。以样品在试管中的终浓度为横坐标,以溶血百分数为纵坐标,即可得到溶血曲线。

图 3 可看出,OCC 自组装纳米粒的溶血性远远低于 Tween 80,在浓度为 2 mg mL 时,OCC 自组装纳米粒组仅溶血 2.3%,而 Tween 80 组溶血为 47.4%;在浓度为 4 mg mL 时,Tween 80 组溶血高达 68.5%,而 OCC 自组装纳米粒组溶血仅 5.1%。可见 OCC 自组装纳米粒溶血性远远优于 Tween 80。Cremophor EL 的溶血性略优于 OCC 自组装纳米粒,但差异并不明显。

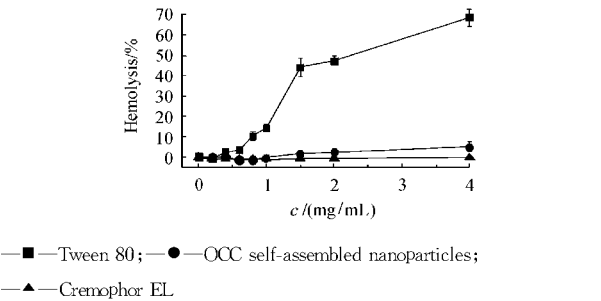


Fig.3 Hemolytic profiles of Tween 80, OCC self-assembled nanoparticles and Cremophor EL ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab.2 Survival state of mice after iv administration of OCC self-assembled nanoparticles($n=10$)

Group	Dose (mg kg)	Number of mouse died								
		1st	2nd	3rd	4th	5th	6th	7th	8th	9th~14th d
Control		0	0	0	0	0	0	0	0	0
A	800.00	3	2	1	2	2	0	0	0	0
B	680.00	1	3	1	2	1	1	0	0	0
C	578.00	1	0	1	1	1	2	0	0	0
D	491.30	0	1	0	0	0	0	0	0	0
E	417.61	0	0	0	0	0	0	0	0	0

综上所述,以天然可生物降解的壳聚糖为原料所制备的 OCC 两亲性衍生物,在水溶液中可以自组装为纳米尺寸、大小均一、表面带负电荷的圆球状聚集体;根据体外溶血实验和小鼠尾静脉注射急性毒性实验结果可以初步推断,OCC 自组装纳米粒为安全可靠的可静脉注射的纳米药物载体,为其在药物递送系统中的应用奠定了基础。

参 考 文 献

[1] Cabral H, Nishiyama N, Kataoka K. Optimization of (1,2-diaminocyclohexane) platinum (II)-loaded polymeric micelles directed to improved tumor targeting and enhanced antitumor activity [J]. *J Control Release*, 2007, **121**(3):146 - 155.

[2] Greish K. Enhanced permeability and retention of macromolecular drugs in solid tumors: a royal gate for targeted anticancer nanomedicines [J]. *J Drug Target*, 2007, **15**(7-8):457 - 464.

3.2.2 小鼠尾静脉注射急性毒性实验 小鼠尾静脉注射 OCC 自组装纳米粒剂量为 800.00 和 680.00 mg kg 时,分别有 4 只和 3 只小鼠在注射后出现抽搐、卧倒,约 5~10 min 后恢复正常,其余未见异常。给药 1 d 后,A、B 高剂量组小鼠食欲降低、自主活动减少,且随着剂量的降低其程度减轻,D、E 低剂量组无显著症状。动物开始死亡的时间都在 12 h 以上,最长的死亡时间是给药后第 6 天。小鼠死亡时身体瘦弱,解剖肉眼观察,肝脏和脾脏颜色偏浅,并表面出现白斑病变,其余脏器(心、肺、肾等)均未见明显异常。溶剂对照组小鼠均未见上述毒性反应和其他异常。各组动物死亡情况见表 2。Bliss 法计算 OCC 自组装纳米粒小鼠尾静脉注射的 LD₅₀ 及 95% 可信限为 560.2(523.0~600.0)mg kg。

[3] 郑俊民(Zheng JM). 药用辅料手册[M]. 第 4 版. 北京:化学工业出版社, 2005: 1 - 5.

[4] 霍美蓉(Huo MR), 周建平(Zhou JP), 张 勇(Zhang Y), 等. 紫杉醇阳离子壳聚糖胶束的制备及其在小鼠体内的组织分布[J]. 中国药科大学学报(*J China Pharm Univ*), 2006, **37**(2):132 - 136.

[5] 刘 蕾(Liu L), 平其能(Ping QN), 张 灿(Zhang C), 等. 环孢素 A 壳聚糖衍生物胶束的制备及其大鼠口服生物利用度[J]. 中国药科大学学报(*J China Pharm Univ*), 2007, **38**(3): 208 - 212.

[6] 霍美蓉(Huo MR), 周建平(Zhou JP), 张 勇(Zhang Y), 等. 新型两亲性壳聚糖衍生物的合成、表征及对难溶性药物的增溶[J]. 高等学校化学学报(*Chem J Chin Univ*), 2007, **28**(10): 1 995 - 1 999.

[7] Cheon Lee S, Kim C, Chan Kwon I, et al. Polymeric micelles of poly(2-ethyl-2-oxazoline)-block-poly(epsilon-caprolactone) copolymer as a carrier for paclitaxel[J]. *J Control Release*, 2003, **89**(3): 437 - 446.