

## 半乳糖化季铵壳聚糖衍生物的设计、合成和表征

张灿,丁娅,平其能\* (中国药科大学药学院,江苏 南京 210009)

**摘要:**目的 合成和表征半乳糖化季铵壳聚糖衍生物作为潜在的肝靶向基因载体。方法 以天然聚合物壳聚糖为原料,首先制备季铵化壳聚糖,然后在其 2-NH<sub>2</sub>上和乳糖酸反应,或与乳糖反应,用 KBH<sub>4</sub>还原,制备得到未见文献报道的半乳糖化季铵壳聚糖衍生物。分别用 FTIR, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR和元素分析对其进行了表征。结果与结论 半乳糖化季铵壳聚糖衍生物有望作为潜在的肝靶向基因载体。

**关键词:**壳聚糖;季铵;半乳糖基;肝靶向;基因载体

中图分类号:R916.1 文献标识码:A 文章编号:1007-7693(2005)05-0386-03

### Design, synthesis and characterization of N-trimethyl chitosan derivatives having pendant galactose residues

ZHANG Can, DING Ya, PING Qi-neng (College of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To synthesize and characterize N-trimethyl chitosan derivatives having pendant galactose residues for potential gene delivery carriers for hepatocyte-targeting. **METHOD** Firstly, a water-soluble N-trimethyl chitosan derivatives (TMCS) was prepared. To give galactosylated N-trimethyl chitosan (Gal-TMCS), lactobionic acid was added and galactose group was introduced into the amino groups of TMCS. Lactosaminated N-trimethyl chitosan (Lac-TMCS) was prepared by reaction of TMCS and  $\alpha$ -lactose, followed by reaction with KBH<sub>4</sub>. **RESULTS** FTIR, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR and elemental analysis characterized the chemical structures of N-trimethyl chitosan derivatives having pendant galactose residues. **CONCLUSION** may be used as potential gene delivery carriers for hepatocyte-targeting.

**KEY WORDS:** chitosan; galactose group; hepatocyte-targeting; gene carrier

高转染率的非病毒载体研究成为目前基因治疗中的一个热点。阳离子聚合物是一种重要的非病毒载体,它的多样性适合于基因治疗中不同的治疗应用与不同的治疗部位<sup>[1~4]</sup>。壳聚糖为天然的可生物降解和生物相容的阳离子聚合物,具备聚集阴离子性的(脱氧)核糖核酸的能力。被认为是潜在有用的基因载体<sup>[5,6]</sup>。

为了克服壳聚糖在生理 pH 值不溶的缺点,人们合成了三甲基壳聚糖<sup>[7,8]</sup>,水溶性的质子化壳聚糖可以使细胞膜短暂开放,促进基因的跨膜转运。由于壳聚糖-DNA 系统缺乏基因与受体间的相互作用,靶向基因不能选择性进入特定细胞,因此可以将壳聚糖改性并引入生物特异性配体。存在于哺乳动物的肝细胞表面的去唾液酸糖蛋白受体(asialoglycoprotein receptor, ASGR)能特异性识别末端带有半乳糖基残基或乙酰半乳糖胺残基的寡糖或寡糖蛋白<sup>[9]</sup>。笔者设计先将壳聚糖制备成壳聚糖甲基季铵盐,然后在其剩余的 2-NH<sub>2</sub>和乳糖酸反应,或与乳糖反应,用 KBH<sub>4</sub>还原,从而引入半乳糖基。半乳糖化季铵壳聚糖衍生物可作为潜在的肝靶向基因载体。

### 1 实验

#### 1.1 试剂与仪器

壳聚糖(南通双林生物制品有限公司提供),脱乙酰度 > 90%,黏均相对分子质量 25 000。乳糖酸由 Fluka 公司进口,四甲基乙二胺(TEMED)购自 Acros 公司,其余试剂均为分析纯和化学纯,不用进一步提纯,可直接使用。

FTIR (Fourier transform infrared) Nicolet Impact410 型红外光谱仪, KBr 压片; Bruker (AVANCE) AV-300, AV-500 核磁共振仪; <sup>1</sup>H NMR 采用 zgpr 脉冲进行水峰抑制。元素分析仪为 Element Vario EL III analyzer。

#### 1.2 方法

**1.2.1 N-季铵化壳聚糖的制备 (TMC)<sup>[10]</sup>** 壳聚糖 (2 g, 6.2 mmol), NaI (4.5 g, 27 mmol) 溶解在 80 mL 的甲基吡咯烷酮中,在 60℃ 搅拌下加入 11 mL 15% 的 NaOH 溶液, 11.5 mL 的 CH<sub>3</sub>I (26.2 g, 18.5 mmol) 反应 1 h。离心 30 min (3000 r/min),收集下层固体,加入 80 mL 的甲基吡咯烷酮,在快速搅拌下加入 NaI (4.5 g, 27 mmol), 11 mL 15% 的 NaOH 溶液, 11.5 mL 的 CH<sub>3</sub>I (26.2 g, 18.5 mmol),加热至 60℃ 反应 30 min,加入 2 mL CH<sub>3</sub>I (4.6 g, 3.2 mmol) 和 0.6 g NaOH,继续搅拌 1 h。冷却至室温后,离心 30 min (3000 r/min),下层固

基金项目:国家自然科学基金项目 (30271554);教育部科技研究重点项目基金 (03090)资助

体溶解在 40 mL 10% 的 NaCl 溶液中搅拌, 加入 70 mL 乙醇, 过滤, 用乙醇和乙醚洗涤滤饼后, 真空干燥, 得到 1.2 g 浅黄色粉末状固体。

**1.2.2 *N* 季铵化 *N*-乳糖酰化壳聚糖的制备 (GaFIMC)** 将 TMC (0.5 g 2.1 mmol), 乳糖酸 (1.15 g 3.2 mmol) 加至 30 mL 蒸馏水中, 搅拌使其溶解, 将 DCC (0.5 g 2.52 mmol) 溶解在 0.5 mL TEMED 后滴加入反应液, 室温搅拌 6 d 过滤, 滤液置于透析袋中用蒸馏水透析 (MWCO = 10 000) 24 h 滤去水不溶物, 滤液冷冻干燥, 得近白色粉末状固体 GaFIMC 0.3 g。

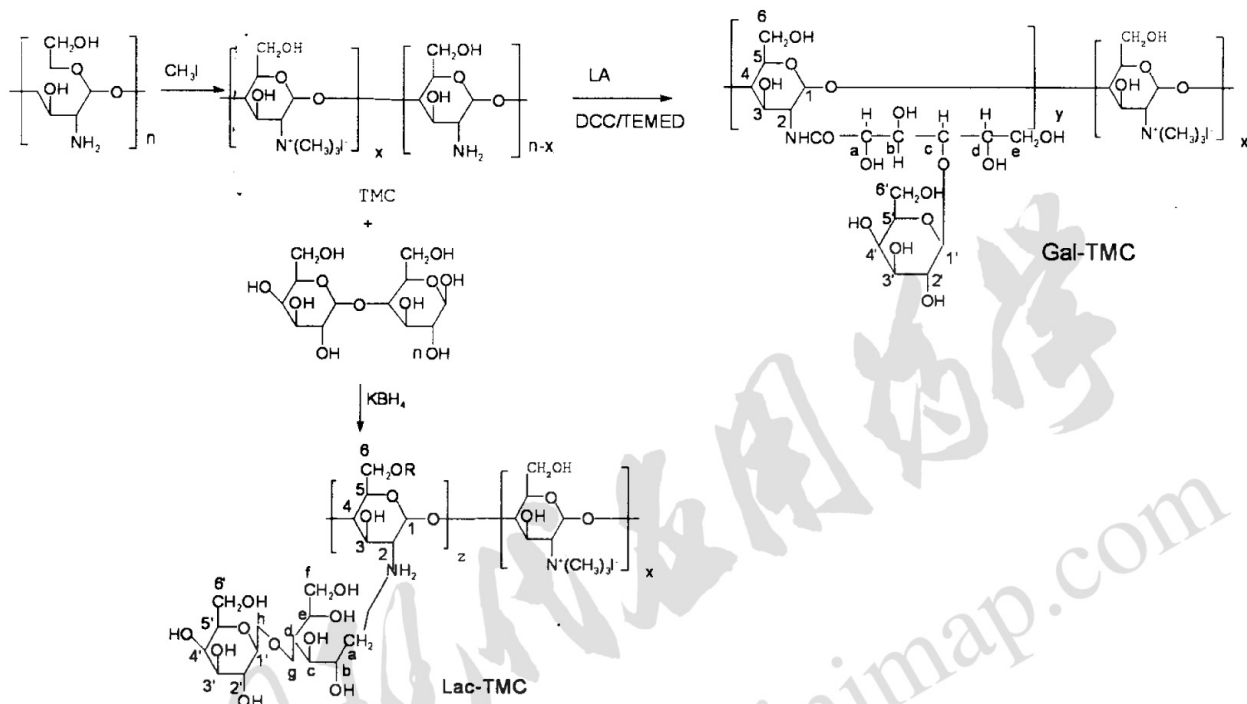


图 1 季铵化壳聚糖、半乳糖化季铵壳聚糖的合成路线

Fig 1 Synthesis of *N*-trimethyl chitosan, GaFIMC and Lac-TMC

在季铵盐的制备过程中, 可采用分步反应来提高季铵化的取代度, 采用一步合成季铵盐的取代度仅有 35%, 采用两步季铵化中由于分步加入碘甲烷, 可以提高季铵化的取代度, 为 50% 左右。但是提高碘甲烷的量、延长反应时间或分三步反应, 虽然可以提高季铵化至 85% 左右, 但是它同时也导致 C<sub>3</sub>-OH, C<sub>6</sub>-OH 的醚化反应, 使产物水溶性大大降低。

壳聚糖季铵盐及其衍生物的 FT-IR 见图 2。壳聚糖季铵盐的 FT-IR 谱中, -NH<sub>2</sub> 中 N-H 的弯曲振动峰 1595 cm<sup>-1</sup> 已减弱, 表明壳聚糖分子的亲核中心氨基已经发生取代。2927 和 2889 cm<sup>-1</sup> 为 -CH<sub>3</sub> 的反对伸缩振动峰, 1485 cm<sup>-1</sup> 为 -CH<sub>3</sub> 的不对称弯曲振动峰, 1384 cm<sup>-1</sup> 为 -CH<sub>3</sub> 的对称弯曲振动峰。1160 和 1030 cm<sup>-1</sup> 处伯羟基和仲羟基的 C-O 伸缩振动峰没有变化。

GaFIMC 的 FT-IR 3400 和 1070 cm<sup>-1</sup> 的吸收峰由于羟基的增多而大大增强, 1739 cm<sup>-1</sup> 处出现了新的酰胺吸收峰。1602 cm<sup>-1</sup> 归属于未反应的氨基。

Lac-TMC 的 FT-IR 显示 3424 cm<sup>-1</sup> 和 2933 cm<sup>-1</sup> 处吸收峰的强度增大, 而 1596 cm<sup>-1</sup> 处的吸收峰几乎消失。

壳聚糖及其衍生物的 <sup>1</sup>H NMR 和 <sup>13</sup>C NMR 分别见图 3 和图 4。

**1.2.3 *N*-三甲基氯化物-*N*-乳糖胺化壳聚糖的制备 (Lac-TMC)** TMC (0.5 g 2.1 mmol), α-乳糖 (1.2 g 3.2 mmol) 加至 25 mL 蒸馏水中, 搅拌使其溶解, 加入 25 mL 甲醇, 室温搅拌 24 h 后, 滴加 KBH<sub>4</sub> (0.2 g/2 mL) 水溶液, 室温搅拌 6 d。反应液过滤, 滤液减压蒸去一部分甲醇后, 置于透析袋中对蒸馏水透析 (MWCO = 10000) 24 h 滤去水不溶物, 滤液冷冻干燥, 得近白色粉末状固体 Lac-TMC 0.1 g。

## 2 结果与讨论

合成路线见图 1。



图 2 季铵化壳聚糖、半乳糖化季铵壳聚糖的红外图谱

Fig 2 FT-IR spectra of (a) chitosan (b) TMC, (c) GaFIMC and (d) Lac-TMC

与壳聚糖相比, TMC 的 <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O) 谱显示在 δ = 3.24-2.40 处出现了新的质子信号分别归属于季铵三甲基上的氢 [-N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>] 和叔胺甲基上的氢 [-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]。

在 TMC 的 <sup>13</sup>C NMR 谱中, 位于 δ = 53.8 的碳信号归属为

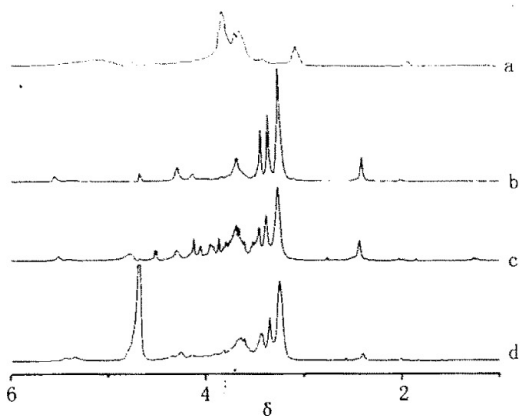


图3 季铵化壳聚糖、半乳糖化季铵壳聚糖的氢谱

Fig 3  $^1\text{H}$  NMR spectra of (a) chitosan (b) TMC, (c) GaTMC and (d) Lac-TMC

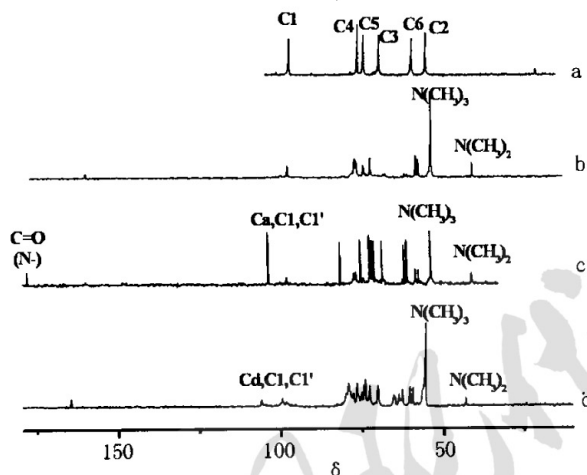


图4 季铵化壳聚糖、半乳糖化季铵壳聚糖的碳谱

Fig 4  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of (a) chitosan (b) TMC, (c) GaTMC and (d) Lac-TMC

季铵三甲基上的碳  $[\text{N}(\text{CH}_3)_3]$ ,  $\delta = 41.2$  处归属为叔胺的甲基碳  $[\text{N}(\text{CH}_3)_2]$ 。

由 TMC 的  $^1\text{H}$  NMR 和  $^{13}\text{C}$  NMR 说明壳聚糖的氨基除了发生季铵化外,还有一部分氨基发生了叔胺化。

GaTMC 的  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ ) 谱显示了位于  $\delta = 4.52 \sim 4.51$  新的质子信号分别归属于  $\text{H}_1, \text{H}_1'$  和  $\text{H}_c$  其他的质子信号为  $\delta = 4.31 \sim 3.39$  ( $\text{H}_3, \text{H}_4, \text{H}_5, \text{H}_6, \text{H}_7, \text{H}_2', \text{H}_3', \text{H}_4', \text{H}_5', \text{H}_6', \text{H}_a, \text{H}_b, \text{H}_d, \text{H}_e$ ),  $\delta = 3.27$  [ $\text{N}(\text{CH}_3)_3$ ],  $\delta = 2.44$  [ $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ],  $\delta = 2.00$  ( $\text{NHCOCH}_3$ )。

GaTMC 的  $^{13}\text{C}$  NMR 谱 ( $\text{D}_2\text{O}$ ) 中,  $\delta = 178.2$  为酰胺中的羰基碳信号。其余的碳信号归属为:  $\delta = 103.3 \sim 97.8$  ( $\text{C}_a, \text{C}_1, \text{C}_1'$ ),  $\delta = 81.4 \sim 68.5$  ( $\text{C}_4, \text{C}_4', \text{C}_5, \text{C}_5', \text{C}_3, \text{C}_3', \text{C}_2', \text{C}_b, \text{C}_c, \text{C}_d$ ),  $\delta = 62.3 \sim 57.4$  ( $\text{C}_6, \text{C}_6', \text{C}_e$ ),  $\delta = 57.4$  ( $\text{C}_2$ ),  $\delta = 53.6$  [ $\text{N}(\text{CH}_3)_3$ ],  $\delta = 41.1$  [ $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ]。

GaTMC 的  $^1\text{H}$  NMR 和  $^{13}\text{C}$  NMR 谱证实了酰化反应发生在 TMC 剩余的氨基上。

Lac-TMC 的  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ ) 显示了新的质子信号大约在  $\delta = 2.55 \sim 2.52$  归属于  $\text{H}_a$  其余的质子信号为  $\delta = 4.79 \sim 4.66$

( $\text{H}_1, \text{H}_1'$ ),  $\delta = 4.34 \sim 3.33$  ( $\text{H}_3, \text{H}_4, \text{H}_5, \text{H}_6, \text{H}_7, \text{H}_2', \text{H}_3', \text{H}_4', \text{H}_5', \text{H}_6', \text{H}_b, \text{H}_c, \text{H}_d, \text{H}_e, \text{H}_f$ ),  $\delta = 3.22$  [ $\text{N}(\text{CH}_3)_3$ ],  $\delta = 2.38$  [ $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ],  $\delta = 1.98$  ( $\text{NHCOCH}_3$ )。

在 Lac-TMC 的  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ ) 谱中发现位于  $\delta = 24.0$  出现了新的碳信号归属于  $\text{C}_a$  其余碳的归属为:  $\delta = 164.7$  ( $\text{NHCOCH}_3$ ),  $\delta = 106.0 \sim 98.4$  ( $\text{C}_d, \text{C}_1, \text{C}_1'$ ),  $\delta = 79.2 \sim 70.3$  ( $\text{C}_4, \text{C}_4', \text{C}_5, \text{C}_5', \text{C}_3, \text{C}_3', \text{C}_2', \text{C}_b, \text{C}_c, \text{C}_e, \text{C}_f$ ),  $\delta = 65.4 \sim 58.1$  ( $\text{C}_6, \text{C}_6', \text{C}_f$ ),  $\delta = 58.1$  ( $\text{C}_2$ ),  $\delta = 55.6$  [ $\text{N}(\text{CH}_3)_3$ ],  $\delta = 42.9$  [ $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ]。

从 Lac-TMC 的 FT-IR,  $^1\text{H}$  NMR 和  $^{13}\text{C}$  NMR 确证了乳糖胺基被引入到 TMC 的残留氨基上。

从 TMC 的  $^1\text{H}$  NMR 可计算出季铵三甲基的取代度为 51.1%, 叔胺的取代度为 9.2%<sup>[20]</sup>。

GaTMC 和 Lac-TMC 的取代度从元素分析数据中 C/N 的比率计算出分别为 36% 和 18%, 见表 1。

表 1 半乳糖化壳聚糖的元素分析数据和取代度

Tab 1 Elemental analysis and degree of substitution (DS) of GaTMC and Lac-TMC

|         | C     | N    | C/N <sup>a</sup> | H    | DS   |
|---------|-------|------|------------------|------|------|
| TMC     | 42.47 | 4.69 | 9.01             | 8.72 | 0.51 |
| GaTMC   | 44.11 | 3.30 | 13.37            | 8.48 | 0.36 |
| Lac-TMC | 41.54 | 3.73 | 11.14            | 8.19 | 0.18 |

注: <sup>a</sup>表示 C/N 的摩尔比

Note <sup>a</sup>Carbon/nitrogen molar ratio

### 3 结论

本实验通过两步法制备了取代度为 51% 的壳聚糖甲基季铵盐, 在剩余的氨基上发生了乳糖酰化和乳糖胺化反应, 取代度分别为 36% 和 18%。所有衍生物的结构由 FT-IR,  $^1\text{H}$  NMR 和  $^{13}\text{C}$  NMR 得到了确证。半乳糖化季铵壳聚糖衍生物有望作为潜在的安全的基因载体。

### 参考文献

- [1] Ferrare G, Rossini S, Giavazzi R, *et al* [J]. Science 1991, 251: 1363-1366
- [2] Leong KW, Mao HQ, Truong-Le VL, *et al* [J]. Controlled Release 1998 53: 183
- [3] Smidt SC de, Demeester J, Hennink WE [J]. Pharm Res 2000 17: 113
- [4] Gamett MC [J]. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst 1999 16: 147
- [5] Minagawa K, Matsumura Y, Yoshikawa K, *et al* [J]. FEBS Lett 1991 295: 67
- [6] Danard A, Cartier N [J]. Int J Biol Macromol 1992 14: 100
- [7] Thanou MM, Kotze AF, Scharringhausen T, *et al* [J]. J Controlled Release 2000 64: 15
- [8] Thanou M, Florea BI, Gekhof M, *et al* [J]. Biomaterials 2002 23: 153
- [9] Wall DA, Wilson G, Hubbard AL [J]. Cell 1980 21: 79
- [10] Sieval AB, Thanou M, Kotze AF, *et al* [J]. Carbohydrate Polymers 1998 36: 157

收稿日期: 2004-09-15