

N-辛基-*N*'-(2-羧基环己甲酰基)-壳聚糖的制备、表征与 pH 敏感性

李红霞¹, 董晓燕¹, 陈清¹, 张业旺¹, 张灿² (1.江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013; 2.中国药科大学药学院, 南京 210009)

摘要: 目的 以 pH 敏感的酰胺键为连接臂, 制备两亲性壳聚糖衍生物。方法 通过在壳聚糖 2-NH₂ 上引入疏水辛基和 pH 敏感的酰胺键, 制备两亲性壳聚糖接枝共聚物, 用 FTIR、¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 对其结构进行表征, 使用 XRD、DSC 对其物理性质进行分析, 采用紫外-可见分光光度计和粒径仪评价其 pH 敏感性。结果 合成了 7 种取代度的 *N*-辛基-*N*'-(2-羧基环己甲酰基)-壳聚糖, 在 pH 5.0~6.0 内具有 pH 敏感性。结论 合成的 pH 敏感衍生物有望用于智能型药物释放系统, 在体内特定部位(肿瘤、梗塞)或细胞内(内涵体、细胞质)释放包载的难溶性药物。

关键词: 壳聚糖; 酰胺; pH 敏感; 聚合物胶束

中图分类号: O636.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2012)02-0137-05

Synthesis, Characterization and pH Sensitivity of *N*-octyl-*N*'-(2-carboxyl-cyclohexamethenyl) Chitosan

LI Hongxia¹, DONG Xiaoyan¹, CHEN Qing¹, ZHANG Yewang¹, ZHANG Can² (1.School of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China; 2.College of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To synthesize a series of amphiphilic chitosan derivatives using pH-sensitive amide as spacer. **METHODS** The pH-sensitive chitosan graft copolymers with octyl and carboxylbenzoyl groups as hydrophobic and hydrophilic moieties were synthesized. The chemical structure of galactosylated chitosan was characterized by FTIR, ¹H-NMR and ¹³C-NMR. The physical properties were measured by XRD and DSC. **RESULTS** Seven pH-sensitive *N*-octyl-*N*'-(2-carboxyl-cyclohexamethenyl) chitosan derivatives were synthesized. The micelles formed by *N*-octyl-*N*'-(2-carboxyl-cyclohexamethenyl) chitosan were found to be highly sensitive to mildly acidic pH and reasonably stable at physiologic pH by UV-visible spectrophotometer. **CONCLUSION** This pH-sensitive polymeric micelle with controlled pH sensitivity may applied in "smart" drug delivery systems for constructing pharmaceutical nanocarriers capable of specific release of their cargo at certain pathological sites in the body (tumors, infarcts) or intracellular compartments (endosomes, cytoplasm) demonstrating decreased pH.

KEY WORDS: chitosan; amide; pH-sensitive; polymeric micelles

聚合物胶束是两亲性接枝或嵌段聚合物在水环境中自组装形成的独特的核-壳结构, 能够增溶难溶性药物, 提高药物的生物利用度, 并且其纳米级粒径可避免被巨噬细胞识别和吞噬, 通过肿瘤组织 EPR 效应而增强被动靶向性, 减少药物不良反应^[1-4], 被认为是最有前景的抗癌药物传递系统之一^[5]。然而胶束在体循环中提前释药, 使靶组织达不到有效治疗浓度, 限制了其在临床中的使用。为了增加化疗药物在肿瘤组织中的浓度, 提高药物的治疗指数, 智能型胶束传递系统已经成为化疗药物制剂的研究热点^[6-8]。pH 敏感型聚合物胶束作为一种智能型胶束, 在正常生理环境中(pH 7.4)稳定, 而在体内响应某个特定的酸碱环境使载体的性能发生改变, 释药增加。利用这一特性可

以实现体内对病灶组织和亚细胞器的靶向给药^[9-11]。

本实验基于肿瘤细胞内涵体和溶酶体的 pH(pH 5~6)要明显低于细胞外 pH, 选择 pH 敏感的酰胺键作为连接臂, 设计与合成两亲性的 *N*-辛基-*N*'-(2-羧基环己甲酰基)-壳聚糖, 在水中自组装形成聚合物胶束, 在体循环中稳定, 到达肿瘤细胞的内涵体或溶酶体时响应其酸性环境, 载体材料中酰胺键连接的亲水外层水解, 胶束破坏从而达到细胞内靶向释药, 实现肿瘤治疗的有效性和安全性。本实验合成的目标化合物通过 FTIR、¹H-NMR、¹³C-NMR 对其结构进行表征, 用 XRD、DSC 分析其物理性质, 采用紫外-可见分光光度法评价其 pH 敏感性。

基金项目: 江苏省高校自然科学基金(09KJB530001); 江苏大学高级专业人才科研启动基金(11JDG056); 江苏大学学生科研立项(10A248)

作者简介: 李红霞, 女, 博士, 讲师

Tel:(0511)85038201

E-mail: lihongxia@ujs.edu.cn

1 试剂与仪器

壳聚糖(CS, 南通双林生物制品有限公司, 脱乙酰度>90%, 粘均分子量 70, 29 和 5 kDa); 辛醛(化学纯, 国药集团化学试剂有限公司), 六氢苯酐(分析纯, 阿拉丁)。

FTIR 410 型红外光谱仪(美国 Nicolet 公司), KBr 压片; AV-300, AV-500 核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司); XD-3AX-Ray diffraction meter 粉末 X 射线衍射仪(日本岛津公司), 扫描角度为 $5^{\circ}\sim 40^{\circ}$; DSC204 差热扫描分析仪(德国 NETZSCH 公司), 升温速率为 $20^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$; 752N 紫外-可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 *N*-辛基壳聚糖(OC)的制备^[11]

CS(70 kDa, 4.0 g, 24 mmol)溶于无水甲醇(120 mL)中, 30°C 水浴中机械搅拌, 缓慢滴加辛醛(11.3 mL, 72 mmol), 保温反应 8 h, 分批加入 KBH_4 (3 g, 56 mmol), 室温还原反应 24 h, 用 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 调反应液 pH 至 7, 抽滤, 用水洗涤($10\text{ mL}\times 2$), 甲醇洗($8\text{ mL}\times 4$), 烘干, 得淡黄色粉末 OC 33.8 g。

根据反应时间不同可制得不同取代度的 OC: OC-1, OC-2, OC-4 和 OC-5。

同法分别使用分子量 29, 5 kDa 的壳聚糖制备 OC: OC-6 (淡黄色粉末)和 OC-7 (白色粉末)。

2.2 *N*-辛基-*N'*-(2-羧基环己甲酰基)-壳聚糖(OCCC-3)的制备^[12]

OC(OC-3, 0.5 g, 0.68 mmol)溶于 DMSO 中(25 mL), 溶胀 2 h。室温搅拌下, 向三颈瓶中加入六氢苯酐(0.6 g, 2 mmol)。升温至 80°C 反应 24 h。反应液倒入 55 mL 水中, 然后冰水浴中用 20% NaOH 调反应液 pH 至 10, 抽滤, 滤液用半透膜(截流分子量为 10 000)透析 5 d, 冻干得到白色絮状固体 OCCC 30.45 g。

以不同取代度的 OC 作原料制备得到一系列 *N*-辛基-*N'*-(2-羧基环己甲酰基)-壳聚糖: OCCC-1(淡黄色絮状固体); OCCC-2(白色絮状固体); OCCC-4(白色絮状固体); OCCC-5(淡黄色絮状固体); OCCC-6(黄色固体)和 OCCC-7(白色絮状固体)。

2.3 pH 敏感性实验

配制浓度为 $10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 *N*-辛基-*N'*-(2-羧基环己甲酰基)-壳聚糖衍生物溶液, 取 1 mL 分别滴加入 8 mL pH=7.4, 7.0, 6.5, 6.0, 5.5, 5.0, 4.5

的磷酸盐缓冲溶液中, 用紫外-可见分光光度计测定 500 nm 处的透光率, 用 Zetasizer 3 000 HS_A 粒径电位仪测定空白胶束的粒径。

3 结果与讨论

3.1 OC 的制备

利用 Vario EL III 元素分析仪测定 CS 和 OC 的 C、N、H 元素质量百分数。通过比较 CS 和 OC 的 C、N 摩尔比(C/N), 可以确定辛基的取代度, 具体计算公式为: 辛基的取代度 $= (\text{C}/\text{N}_{\text{OC}} - \text{C}/\text{N}_{\text{CS}})/8$ 。

表 1 OC 的元素分析和取代度数据

Tab 1 Elemental analysis and the DS of *N*-octyl chitosan

化合物	反应时间/h	N/%	C/%	H/%	C/N	辛基取代度/%
CS (70 KDa)		7.15	39.31	8.00	6.36	
		7.27	39.32	8.03		
OC-1	2	6.90	43.42	6.91	7.43	13.4
		6.81	43.87	7.09		
OC-2	5	6.39	47.80	8.63	8.66	28.8
		6.44	47.59	8.62		
OC-3	8	6.10	48.71	8.57	9.27	36.4
		6.11	48.31	8.82		
OC-4	36	6.17	51.40	9.58	9.80	43.0
		6.06	51.42	9.62		
OC-5	60	5.90	52.56	9.97	10.59	52.9
		5.70	52.69	10.26		
CS (29 KDa)		6.94	38.37	8.14	6.53	
		6.88	38.31	8.31		
OC-6	8	5.13	43.61	9.53	9.81	41.0
		5.08	43.51	9.48		
CS (5 KDa)		6.20	34.66	7.42	6.47	
		6.22	34.24	7.04		
OC-7	8	5.27	45.21	8.35	9.86	42.3
		5.38	44.85	8.63		

各相关化合物的元素分析数据及根据公式计算得到 7 个 OC 的辛基取代度见表 1。可看出随着时间的延长, 辛基的取代度随之增大。由于辛基取代度的大小决定了 pH 敏感亲水基的取代度, 影响材料的水溶性与 pH 敏感性, 因此, 制备不同辛基取代度的 OC, 以便制备不同亲水基和疏水基比例的材料, 从而选出水溶性与 pH 敏感性最适合的亲水基和疏水基比例。

3.2 *N*-辛基-*N'*-(2-羧基环己甲酰基)-壳聚糖衍生物的制备与表征

合成路线如图 1。目的物通过 IR、 ^1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 进行表征。

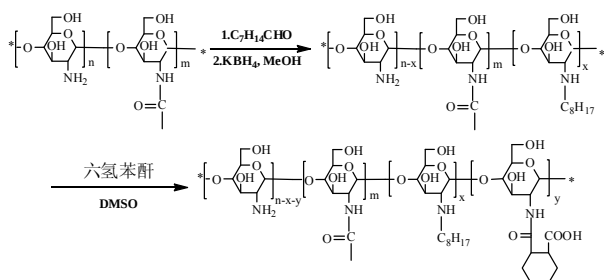


图1 *N*-辛基-*N'*-(2-羧基环己甲酰基)-壳聚糖的合成路线
Fig 1 Synthesis route of the *N*-octyl-*N'*-(2-carboxyl-cyclohexamethenyl) chitosan derivatives

在OCCC的红外图谱中, 1 648 cm^{-1} 为仲酰胺的C=O伸缩振动, 1 305 cm^{-1} 为仲酰胺的C-N伸缩振动峰, 3 300~3 400 cm^{-1} 宽峰为羧酸的OH伸缩振动峰, 2 932和2 860 cm^{-1} 分别为-CH₂-和-CH-的伸缩振动峰, 且吸收度增加。不同分子量的OCCC红外图谱相似。结果见图2。

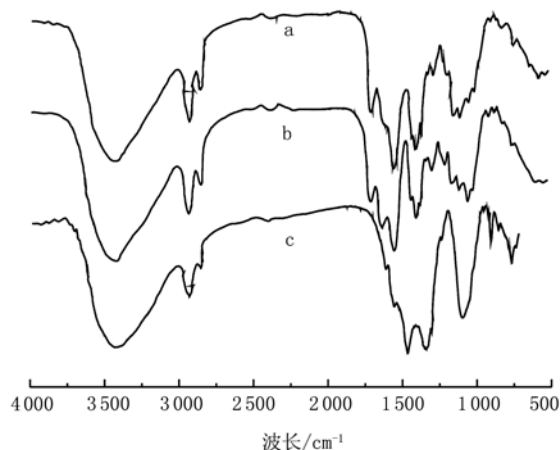


图2 *N*-辛基-*N'*-(2-羧基环己甲酰基)-壳聚糖的红外图谱
a-OCCC-8; b-OCCC-3; c-OCCC-7
Fig 2 IR spectra of OCCC
a-OCCC-8; b-OCCC-3; c-OCCC-7

其¹H-NMR中 δ 1.4~1.9出现了新的信号峰, 归属于环己烷上的氢, 随着辛基取代度的增加(OCCC-1辛基取代度13.4%, OCCC-3辛基取代度36.4%, OCCC-4辛基取代度43.0%), 环己烷上氢的信号强度减弱。3种分子量的OCCC氢谱中, 只是壳聚糖的骨架峰稍有区别。结果见图3。

目标物OCCC-1的¹³C-NMR, δ 57(C2), 62(C6), 72(C3), 77(C5), 79(C4)和99(C1)是壳聚糖的碳信号, 新出现的 δ 180和163归属于羰基碳信号, δ 44, 28和25出现的强信号峰归属于环己烷和长链烷烃的碳。结果见图4。

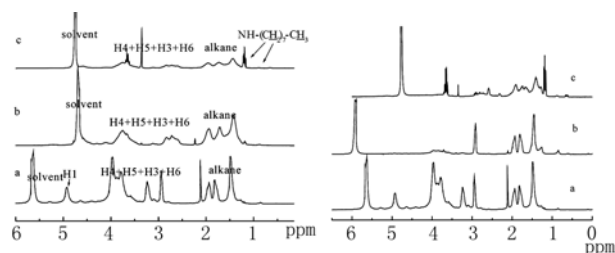


图3 *N*-辛基-*N'*-(2-羧基环己甲酰基)-壳聚糖的核磁共振氢谱
a-OCCC-8; b-OCCC-3; c-OCCC-7
Fig 3 ¹H-NMR (D₂O) spectra of OCCC
a-OCCC-3; b-OCCC-7; c-OCCC-8
a-OCCC-8; b-OCCC-3; c-OCCC-7

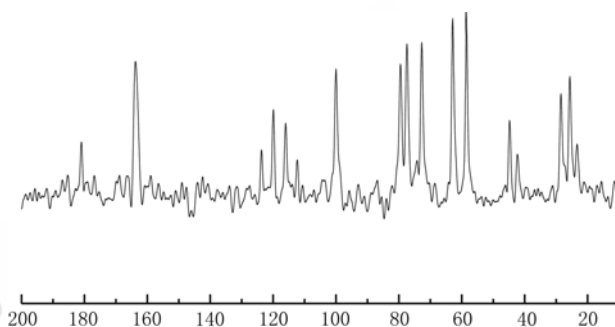


图4 *N*-辛基-*N'*-(2-羧基环己甲酰基)-壳聚糖的核磁共振碳谱
Fig 4 ¹³C-NMR (D₂O) spectra of OCCC-1

3.3 物理性质研究

3.3.1 溶解性 通过测定各目的物在水中的溶解度可知, 酰胺化壳聚糖衍生物具有一定的水溶性, 从分子结构来看, 辛基和亲水基的引入在一定程度上破坏了壳聚糖分子内和分子间的氢键作用力, 减弱了结晶度, 而且亲水基中的羧基也增强了其在水中的溶解性。但随着辛基取代度的增加, 亲水基取代度相应减少, 影响了壳聚糖衍生物的水溶性。结果见表2。所以选择水溶性最好的OCCC-3材料作进一步的研究。

表2 *N*-辛基-*N'*-(2-羧基环己甲酰基)-壳聚糖衍生物在水中的溶解度

Tab 2 Water-solubility of *N*-octyl-*N'*-(2-carboxyl-cyclohexamethenyl) chitosan derivatives

样品	溶解性
OCCC-1	难溶(≤ 0.01 g)
OCCC-2	难溶
OCCC-3	微溶(0.01~1 g)
OCCC-4	难溶
OCCC-5	难溶
OCCC-6	微溶
OCCC-7	微溶

3.3.2 XRD 和 DSC 从 OC-3 和 OCCC-3 的粉末 X 衍射图中看出, OC 在 2θ 为 12° 和 20° 处各出现一个较尖锐的衍射峰, 分别属于 I 和 II 结晶带。改性后的目标物 OCCC-3 位于 $2\theta=12^\circ$ 的结晶衍射峰消失, 位于 $2\theta=22^\circ$ 处的衍射峰也明显变弱, 变为较宽的峰。说明引入亲水性取代基后形成氢键的能力下降, 一部分结晶型转变成了无定形。结果见图 5。

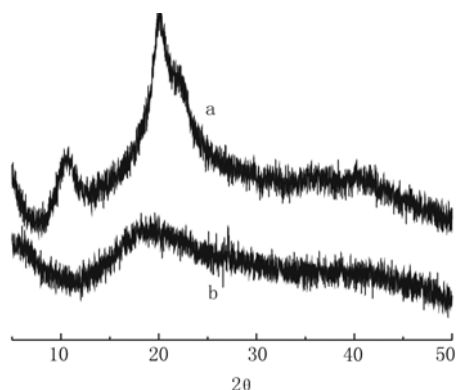


图 5 *N*-辛基-*N'*-(2-羧基环己甲酰基)-壳聚糖的粉末 X 衍射图

a-OC-3; b-OCCC-3

Fig 5 XRD patterns of OC

a-OC-3; b-OCCC-3

OC 及其衍生物 OCCC 的 DSC 图见图 6。OC 在 85°C 出现了一个吸热峰, 归属于 OC 中含有的水峰。 306°C 出现的放热峰, 属于 OC 的降解峰。目标物 OCCC 在 80°C 出现了宽的吸热峰, 是由于失去水和聚多糖结构中的一些小的残基。 301°C 处的放热峰归属于热降解峰。说明壳聚糖由于氨基上引入取代基后, 结晶能力下降使从有序变得无序。

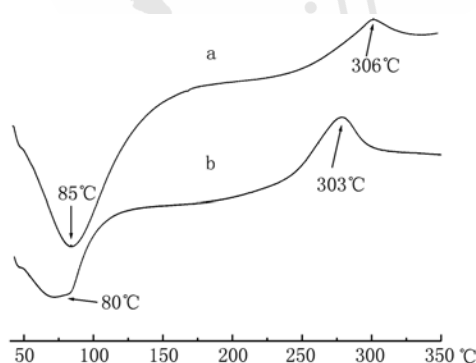


图 6 *N*-辛基-*N'*-(2-羧基环己甲酰基)-壳聚糖的差热扫描分析

a-OC-3; b-OCCC-3

Fig 6 DSC thermograms of OC

a-OC-3; b-OCCC-3

3.3.3 pH 敏感性 本实验期望 OCCC-3 形成的胶束在体循环中稳定, 到达肿瘤细胞的内涵体或溶酶体时酰胺键连接的亲水外层响应酸性环境 (pH 5.0) 水解而断裂, 从而快速释放包载的药物。但是肿瘤组织的 pH (pH 6.3~6.8) 也比正常组织 (pH 7.5) 低^[13], 有可能使酰胺键发生断裂, 因此本研究考察了比较宽范围的 pH 环境 (pH 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 和 7.4)。

不同 pH 缓冲液条件下, OCCC-3 在 pH 5.5 缓冲溶液中透光率就开始急剧下降, 溶液的粒径随着 pH 的降低而逐渐增大, 到 5.5 时明显增加, 与透光率法测定结果一致。结果见图 7。由此实验可知, OCCC-3 材料具有 pH 敏感性, pH 敏感值为 5.5。不同 pH 环境中 OCCC-3 溶液的外观变化见图 8。

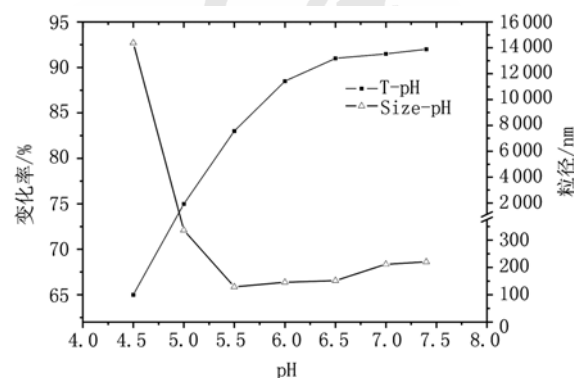


图 7 pH 环境中 OCCC-3 溶液的透光率与粒径变化 ($n=3$)

Fig 7 Changes of the transmittance, particle size of OCCC-3 blank micelle as a function of pH ($n=3$)



图 8 pH 环境中 OCCC-3 溶液的外观

Fig 8 Blank micelle of OCCC-3 at different pHs

通过醋酸调节 OCCC-3 溶液的 pH 至 4, 分离得到水解小分子, 通过核磁确证为环己二甲酸 [^1H NMR (d_6 -DMSO): δ 12.10 (s, 2H, COOH), 2.66 (m, 2H), 1.89-1.83 (m, 2H), 1.68-1.64 (m, 2H), 1.35 (m, 4H)]。

4 结论

本实验成功合成了两亲性 pH 敏感的壳聚糖接枝共聚物 *N*-辛基-*N'*-(2-羧基环己甲酰基)-壳聚糖

糖, 并通过 IR、¹H-NMR、¹³C-NMR 对其结构进行了表征, 使用 XRD、DSC 对其物理性质进行了分析, 采用浊度法评价了其 pH 敏感性。合成的目的物有望作为新型的 pH 敏感性聚合物胶束材料增溶难溶性药物。

REFERENCES

- [1] OPANASOPIT P, NGAWHIRUNPAT T, ROJANARATA T. *N*-Phthaloyl chitosan-g-mPEG design for all-trans retinoic acid-loaded polymeric micelles [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2007, 30(5): 424-431.
- [2] ZHANG C, QU G W, SUN Y J. Pharmacokinetics, biodistribution, efficacy and safety of *N*-octyl-*O*-sulfate chitosan micelles loaded with paclitaxel [J]. *Biomaterials*, 2008, 29(9): 1233-1241.
- [3] YIN H Q, BAE Y H. Physicochemical aspects of doxorubicin-loaded pH-sensitive polymeric micelle formulations from a mixture of poly (*L*-histidine)-b-poly (*L*-lactide)-b-poly(ethylene glycol) [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2009, 71(2): 223-230.
- [4] RONG L, ZHANG Y T, HU Q H. Progress in the research of natural polymer micelle [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2010, 27(13): 1182-1187.
- [5] TORCHILIN V P. Micellar nanocarriers: pharmaceutical perspectives [J]. *Pharm Res*, 2007, 24(1): 1-16.
- [6] LIU R, LI D, HE B, et al. Anti-tumor drug delivery of pH-sensitive poly (ethylene glycol)-poly(*L*-histidine)-poly(*L*-lactide) nanoparticles [J]. *J Control Release*, 2011, 152(1): 49-56.
- [7] HAO T N, QIAO M X, LI Z, et al. Progress in the study of pH and temperature sensitive biodegradable block copolymers [J]. *Acta Pharm Sin*(药学学报), 2008, 43(2): 123-127.
- [8] LI P Z, YANG Z L, YANG K W, et al. Progress in multifunctional polymeric micelles [J]. *Chin J New Drugs*(中国新药杂志), 2008, 17(3): 199-202.
- [9] BAE Y, JANG W D, NISHIYAMA N, et al. Multifunctional polymeric micelles with folate-mediated cancer cell targeting and pH-triggered drug releasing properties for active intracellular drug delivery [J]. *Mol Biosyst*, 2005, 1(3): 242-250.
- [10] BAE Y, NISHIYAMA N, FUKUSHIMA S, et al. Preparation and biological characterization of polymeric micelle drug carriers with intracellular pH-triggered drug release property: tumor permeability, controlled subcellular drug distribution, and enhanced *in vivo* antitumor efficacy [J]. *Bioconjug Chem*, 2005, 16(1): 122-130.
- [11] OH K T, KIM D, YOU H H, et al. pH-Sensitive properties of surface charge-switched multifunctional polymeric micelle[J]. *Int J Pharm*, 2009, 376(1/2): 134-140.
- [12] ZHANG C, DING Y, YU L L, et al. Polymeric micelle systems of hydroxycamptothecin based on amphiphilic *N*-alkyl-*N*-trimethyl chitosan derivatives [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2007, 55(2):192-199.
- [13] XU P S, VAN K E, ZHAN Y, et al. Targeted charge-reversal nanoparticles for nuclear drug delivery [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2007, 46(26): 4999-5002.

收稿日期: 2011-05-30