

载药磁性阳离子高聚物脂质体的制备及表征

梁晓飞, 王汉杰, 田 惠, 罗 浩, 成 靖, 郝丽娟, 常 津

(天津大学材料科学与工程学院纳米生物技术研究所, 天津 300072)

摘要 通过羧甲基壳聚糖接枝二甲基十八烷基环氧丙基氯化铵, 合成了水油两溶性的羧甲基壳聚糖十八烷基季铵盐(QACMC), 并用其代替合成磷脂与胆固醇反应, 制备阳离子高聚物脂质体(CPL). 利用阳离子高聚物脂质体包覆水溶性 Fe_3O_4 磁流体, 构建磁性阳离子高聚物(MCPL)体系. 用 TEM, DLS, VSM, FTIR 及 Zeta 电位仪等对所制样品进行表征. 结果表明, 磁性阳离子高聚物脂质体在水相中可稳定存在, 粒径可达到 15.3 nm, 分散性较好, Zeta 电位可达到 +38.22 mV, 比饱和磁化强度为 $27.9 \text{ A} \cdot \text{m}^2/\text{kg}$, 具有超顺磁性; MCPL 对药物长春新碱的包封率可达到 93.1%, 在 Tris-HCl (pH = 7.4) 缓冲溶液中具有优良的缓控释功能.

关键词 壳聚糖季铵盐; Fe_3O_4 磁流体; 高聚物脂质体; 磁性脂质体

中图分类号 O636.9 **文献标识码** A **文章编号** 0251-0790(2008)04-0858-04

脂质体是由磷脂悬浮于水中制得的, 在制药、生物技术、免疫调节、遗传工程及基因药物等各个领域均得到了很大的发展^[1~3]. 磁性脂质体是近年来国内外大力研究的一种新型靶向制剂, 这种制剂可使药物同时具有生物功能、磁靶向功能和治疗功能, 因此具有更大的应用前景. 但是目前的磁性脂质体大都存在着许多不可避免的缺点, 例如体内循环时间短, 物理和化学稳定性不足, 囊泡表面缺少靶向位点^[4, 5]及磁性脂质体水溶液中分散性不好^[6]等, 因此研究开发一种具有优良性能的磁性脂质体势在必行.

本文使用十八烷基三甲基氯化铵对羧甲基壳聚糖^[7]进行接枝改性, 制备羧甲基壳聚糖十八烷基季铵盐^[8], 并用其代替合成磷脂来制备低成本高稳定性的高聚物脂质体; 然后使用薄膜分散法制备含有 Fe_3O_4 磁流体的磁性阳离子高聚物脂质体. 该磁性阳离子高聚物脂质体可作为一种优良的基因和药物载体系统, 同时表面可连接多种生物活性物质, 如跨膜肽 Tat 和叶酸等, 构建成兼具跨膜、磁性和受体介导的多功能聚合物脂质体系统. 目前, 国内外未见到此种磁性阳离子脂质体的报道.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

壳聚糖($M_w = 50000$, 脱乙酰度 99%, 青岛海普生物技术有限公司); 胆固醇(生化级); 其余试剂均为分析纯.

透射电子显微镜, JEOL-100CXII, 日本电子光学公司; 激光粒度仪及 Zeta 电位仪, BI-90plus, Brookhaven Instruments Corporation; VSM 磁性能测试仪, LDJ9600-1, 美国数字仪器公司; X 射线衍射仪, Rigaku D/max 2500 v/pc, 日本理学公司; 红外光谱仪, Bio-Rad FTS3000, 美国 Bio-Rad 公司.

1.2 实验过程

1.2.1 羧甲基壳聚糖十八烷基季铵盐的制备 将 12 g 十八叔胺与 5.5 g 环氧氯丙烷混合后溶于异丙醇中, 在 55 °C 下恒温回流数小时, 减压蒸馏, 得到二甲基十八烷基环氧丙基氯化铵(A). 取水溶性羧甲基壳聚糖 3.0 g 溶于 NaOH 溶液中, 加入异丙醇和化合物 A, 在 55 °C 下反应 48 h; 调 pH = 7, 用无

收稿日期: 2007-09-17.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 50373033)、天津市应用基础研究重点基金(批准号: 05YFJZJC01001)和天津市国际合作基金(批准号: 05YFGHHZ20070)资助.

联系人简介: 常 津, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事纳米生物材料及特异性医学诊断试剂的研究.

E-mail: jinchang@tju.edu.cn

水丙酮洗涤, 经真空烘干后得 QACMC^[8].

1.2.2 磁性阳离子脂质体的制备 将三氯化铁溶于去离子水中, 降温到 4 °C, 通入氮气后, 加入二氯化铁溶液, 搅拌下滴加氨水; 反应 30 min; 透析后, 进行磁分离, 得到水溶性 Fe₃O₄ 磁流体^[9].

采用薄膜分散法制备磁性脂质体^[10]. 精确称取 10 mg 羧甲基壳聚糖十八烷基季铵盐和 8 mg 胆固醇, 加入到 100 mL 茄形瓶中, 用 4 mL 氯仿溶解, 在旋转蒸发仪上减压旋蒸成膜后, 减压除去有机溶剂; 然后, 取 2 mg 长春新碱溶于 5 mL 去离子水溶液中, 待药物完全溶解后加入水溶性磁流体, 超声; 将上述水溶液加入到含脂质薄膜的茄形瓶中, 超声混匀; 最后进行磁分离, 用水洗涤 3 次, 将 MCPL 分散于去离子水溶液中.

1.2.3 长春新碱磁性高聚物脂质体的体外药物释放实验 采取透析袋扩散法进行体外释放动力学实验. 称取 5 mg 载药高聚物脂质体装入透析袋($M_w = 12000$)置于 100 mL 离心管中, 补充 6 ~ 10 mL Tris-HCl(pH = 7.4)缓冲溶液, 避光于恒温振荡器中^[11], 定时全部取出透析袋外的 Tris-HCl 缓冲溶液, 然后用紫外分光光度计在 298 nm 处测定吸光度 A , 每次取样后补充等量的释放介质.

2 结果与讨论

2.1 红外光谱分析

图 1 为所制得的 Fe₃O₄ 磁流体、羧甲基壳聚糖十八烷基季铵盐及磁性阳离子脂质体的 FTIR 谱图.

谱线 a 中 590 cm⁻¹ 处的吸收峰为 Fe₃O₄ 磁流体的特征吸收峰, 同样在磁性阳离子脂质体的谱线中也观察到了此峰. 与文献[12]中的壳聚糖的红外谱图相比, 谱线 b 中 2922 和 2852 cm⁻¹ 处为十八烷基三甲基氯化铵中链亚甲基的伸缩振动吸收峰, 1465 cm⁻¹ 处增强的 CH₂ 振动吸收峰都说明了壳聚糖分子结构中引入了长链烷基; 而 1591 和 1417 cm⁻¹ 处的振动吸收峰则代表羧酸盐基团; 证明生成了羧甲基壳聚糖十八烷基季铵盐. 谱线 c 中除可观察到羧甲基壳聚糖季铵盐的特征吸收峰外, 1467, 1376, 1061 cm⁻¹ 处的吸收峰还证明了胆固醇的存在.

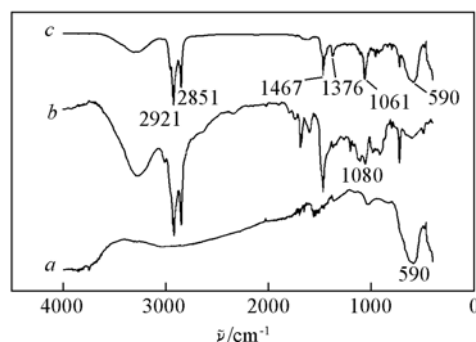


Fig. 1 FTIR spectra of Fe₃O₄ ferrofluid (a), QACMC (b) and MCPL (c)

2.2 TEM 及粒径分析

图 2 为阳离子高聚物脂质体、水溶性磁流体及相应的磁性阳离子高聚物脂质体的透射电镜照片. 由图 2 可见, 阳离子高聚物脂质体呈球形, 分散性较好, 粒径多在 50 nm 以下; 而粒度分析仪测出的平均有效粒径为 74.1 nm, 多分散指数较小(0.224). 水溶性 Fe₃O₄ 磁流体的粒径大约为 10 nm, 但是粒子容易发生团聚, 且无法分开; 而磁性高聚物脂质体的粒径大约在 15 nm, 粒子呈球形, 分布比较均匀, 分散性较好, 几乎没有发生团聚. 好的分散性主要是由于磁性高聚物脂质体表面含有大量的季铵基团, 呈正电性, 各个粒子之间由于带同种电荷而产生相互排斥作用.

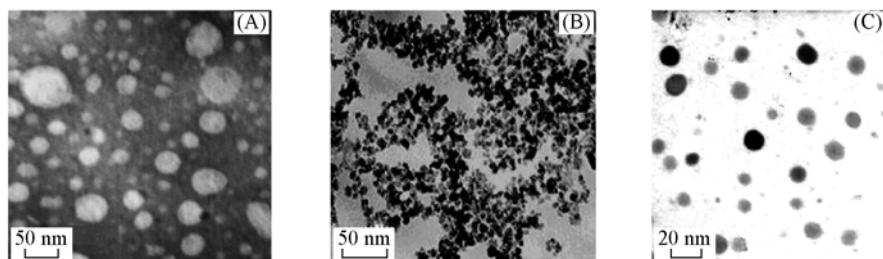


Fig. 2 TEM images of CPL (A), Fe₃O₄ ferrofluid (B) and MCPL (Fe₃O₄/liposomes) (C)

另外, 磁性高聚物脂质体具有比较明显的核-壳结构, 水溶性磁流体被包裹在高聚物脂质体的水相内核当中, 外面的脂质双分子层壳的厚度大概有 2 nm. 这主要是因为采用薄膜分散法制备磁性脂质体

时,由于高聚物脂质体的双分子层膜呈正电性,比较稳定,不容易断裂,因此当水合过程发生时,水溶液中的 Fe_3O_4 磁流体的小晶粒将自动形成一个中心,高聚物薄膜便可非常自然的缠绕上去,形成一种稳定的核-壳结构.所制得的高聚物脂质体和磁性高聚物脂质体在水溶液中可以长期稳定存在,60 d 内只有比较少的沉淀产生.

2.3 磁性高聚物脂质体的性能分析

图 3(A)为磁性高聚物脂质体的 XRD 谱图.可以看出, Fe_3O_4 磁性粒子衍射谱峰(2θ)出现在 30.1° , 35.5° , 43.1° , 53.7° , 57.2° 和 62.7° 处,分别对应立方相 Fe_3O_4 的 (220), (311), (400), (422), (511) 和 (440) 晶面^[13].由此可以判断,所制备的磁性粒子具备 Fe_3O_4 的晶型结构,可以证实磁性粒子为 Fe_3O_4 粒子.同时在 $2\theta = 14.3^\circ$ 处出现了高聚物脂质体的特征峰,可从侧面证实制备了磁性高聚物脂质体.另外由 Scherrer 方程 $D = k\lambda/\beta\cos\theta$ ^[14] (式中 $k = 0.89$, $\lambda = 1.542$, β 为半峰宽, $2\theta = 35.5^\circ$),计算出样品的晶粒尺寸为 15.5 nm ,与透射电镜照片统计的平均粒径相符.

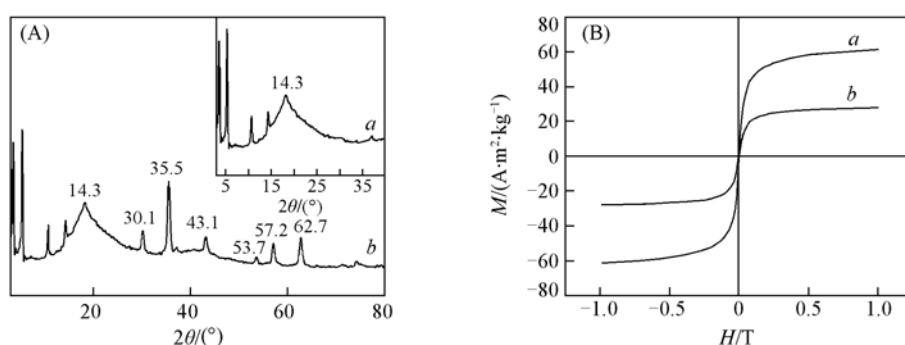


Fig. 3 XRD spectra (A) of CPL (a) and MCPL (b); and magnetic hysteresis loop (B) of Fe_3O_4 ferrofluid (a) and MCPL (b)

图 3(B)为水溶性 Fe_3O_4 磁流体和磁性高聚物脂质体的磁滞回线.可以看出,两条曲线都没有出现磁滞现象,具有闭合的磁滞曲线,且剩磁力和矫顽力在仪器精度允许的范围内均接近于零,显示出比较好的超顺磁特性; Fe_3O_4 磁流体的最大比饱和磁化强度为 $61.3 \text{ A} \cdot \text{m}^2/\text{kg}$,而磁性高聚物脂质体的最大比饱和磁化强度为 $27.9 \text{ A} \cdot \text{m}^2/\text{kg}$,仅为纯磁流体的 46%.因此,高聚物脂质体对于 Fe_3O_4 磁流体的包覆在一定程度上降低了磁性能.磁性高聚物脂质体的 Zeta 电位可达到 38.22 mV ,具有较高的正电性,可以完全满足作为基因载体的要求.QACMC 在形成类脂质体前后,Zeta 电位变化不大,说明磁性脂质体纳米微球的表面存在大量亲水性的季铵基团;两亲性高聚物形成一种稳定的双层膜结构,小分子胆固醇镶嵌在双层膜内起稳定的作用.

2.4 长春新碱磁性高聚物脂质体体外释药性能

在长春新碱磁性脂质体的体外释药实验中,将载药磁性高聚物脂质体与载药高聚物脂质体进行对比,其体外释药曲线如图 4 所示.可见长春新碱磁性高聚物脂质体的释药曲线与长春新碱高聚物脂质体的释药曲线基本一致,释放过程分为突释和缓慢释放两个阶段,二者释药时间都在 17 d 以上,突释现象并不明显,后期释放基本上呈匀速释放^[15,16],达到了控制释放的要求;而药物在没有使用高分子包裹和药物与磁流体单独物理共混的情况下,均无法达到控制释放的要求,突释现象也较明显.磁性高聚物脂质体对药物长春新碱的包封率可达到 93.1%.而且,磁性阳离子高聚物脂质体表面含有季铵基团,具有较高的正电性;羧甲基壳聚糖十八烷基季铵盐本身含有多种官能团,如氨基和羧酸盐基团,因此可以连接多种靶向试剂.因此壳聚糖季

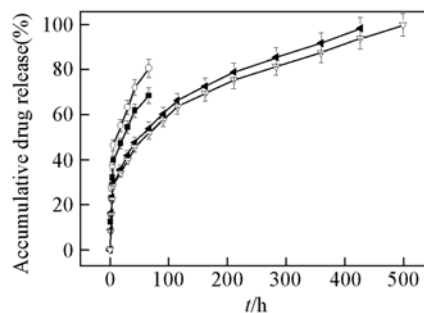


Fig. 4 *In vitro* release of vincristine in Tris-HCl (pH = 7.4) at $(37 \pm 0.5)^\circ\text{C}$

■ Drug only; ○ drug/ferrofluid physical mixture; ▲ cationic polymeric liposomes; ▼ magnetic cationic polymeric liposomes.

铵盐磁性高聚物脂质体可作为一种潜在的理想的药物和基因载体系统.

参 考 文 献

- [1] Takeuchi H. , Kojima H. , Yamamoto H. , *et al.* . Biol. Pharm. Bull. [J] , 2001 , **24**(7) : 795—799
- [2] Manconi M. , Valenti D. , Sinico C. , *et al.* . International Journal of Pharmaceutics[J] , 2003 , **260** : 261—272
- [3] Ruckmani K. , Jayakar B. , Ghosal S. K. . Drug Development and Industrial Pharmacy[J] , 2000 , **26** : 217—222
- [4] Bakker-Woudenberg I. A. , Storm G. , Woodle M. C. . J. Drug Target[J] , 1994 , **2** : 363—371
- [5] Alexandra G. , Mathias W. , Wolfgang M. . Langmuir[J] , 2001 , **17** : 919—923
- [6] Xu H. , Cui L. L. , Tong N. H. , *et al.* . J. Am. Chem. Soc. [J] , 2006 , **128** : 15582—15583
- [7] SUI Wei-Ping(隋卫平) , JIANG Xiao-Jie(蒋晓杰) , QU Li-Min(翟利民) , *et al.* . Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J] , 2004 , **25**(1) : 99—102
- [8] LIANG Xiao-Fei(梁晓飞) , WANG Han-Jie(王汉杰) , TIAN Hui(田惠) , *et al.* . Acta Phys. Chim. Sin. (物理化学学报)[J] , 2008 , **24** : 223—229
- [9] Zheng W. M. , Gao F. , Gu H. C. . Journal of Magnetism and Magnetic Materials[J] , 2005 , **293** : 199—205
- [10] Rezler E. M. , Khan D. R. , Lauer-Fields J. , *et al.* . J. Am. Chem. Soc. [J] , 2007 , **129** : 4961—4972
- [11] Cui F. D. , Shi K. , Zhang L. Q. , *et al.* . Journal of Controlled Release[J] , 2006 , **114** : 242—250
- [12] Sun L. P. , Du Y. M. , Fan L. H. , *et al.* . Polymer[J] , 2006 , **47** : 1796—1804
- [13] Manuel A. , Marta G. , Nuria N. , *et al.* . Chem. Mater. [J] , 2006 , **18** : 1911—1919
- [14] Vestal C. R. , Zhang Z. J. . J. Am. Chem. Soc. [J] , 2002 , **124** : 14312—14313
- [15] Bouillot P. , Ubrich N. , Sommer F. , *et al.* . Int. J. Pharm. [J] , 1999 , **181** : 159—172
- [16] Chen L. Y. , Tian Z. G. , Du Y. M. . Biomaterials[J] , 2004 , **25** : 3725—3732

Preparation and Characterization of Novel Magnetic Cationic Polymeric Liposomes

LIANG Xiao-Fei, WANG Han-Jie, TIAN Hui, LUO Hao, CHENG Jing,
HAO Li-Juan, CHANG Jin*

(*Institute of Nanobiotechnology, School of Materials Science and Engineering, Tianjin University,
Tianjin 300072, China*)

Abstract Octadecyl quaternized carboxymethyl chitosan(QACMC) was synthesized through carboxymethyl chitosan grafting with glycidyl octadecyl dimethylammonium chloride. Then, novel magnetic cationic polymeric liposomes(MCPL) formed from QACMC/cholesterol and Fe_3O_4 ferrofluid were prepared *via* Thin-Layer Evaporation. The structure and properties of all samples were characterized *via* TEM, DLS, VSM and FTIR. The results show that the superparamagnetic cationic polymeric liposomes were prepared successfully. It was stable in aqueous phase and had a high *zeta* potential of +38.22 mV. The average diameter of MCPL was about 15 nm and the saturation magnetization value of it was $28 \text{ A} \cdot \text{m}^2/\text{kg}$ at 300 K. Vincristine as a kind of hydrophilic components was entrapped into its aqueous core. Vincristine encapsulation efficiency of MCPL was 93.1% and it exhibited a slow steady release of vincristine over two weeks at 37 °C in Tris-HCl(pH = 7.4).

Keywords Quaternized chitosan; Fe_3O_4 ferrofluid; Polymeric liposomes; Magnetic liposomes

(Ed. : H, J, Z)