

右旋糖酐基氧化还原响应性 胶束的制备与性能

董静文, 张永勤*, 刘银春, 刘建瑞, 刘芳

(青岛科技大学 化工学院, 山东 青岛 266042)

摘要: 右旋糖酐 (Dextran) 通过羧甲基化反应合成了羧甲基右旋糖酐 (CMD); 甘草次酸 (GA) 与胱胺二盐酸盐 (CYS) 经酰胺化反应合成了甘草次酸-胱胺 (GA-SS-NH₂); CMD 和 GA-SS-NH₂ 再经酰胺化反应合成了两性亲聚合物羧甲基右旋糖酐-胱胺-甘草次酸 (CMD-SS-GA)。CMD-SS-GA 通过自组制备了包封阿霉素 (DOX) 的右旋糖酐基氧化还原响应性载药胶束 CMD-SS-GA/DOX。采用 MS、FTIR、¹HNMR、DLS、TEM 对 CMD、GA-SS-NH₂、CMD-SS-GA、CMD-SS-GA/DOX 进行了表征, 采用返滴定法测定了 CMD 的羧甲基取代度、¹HNMR 法测定了 CMD-SS-GA 的疏水基取代度, 经药物释放实验测试了 CMD-SS-GA/DOX 的氧化还原敏感性释药性能。结果表明, CMD 的羧甲基取代度为 2.04; CMD-SS-GA 的疏水基取代度为 0.32~0.83; 由 CMD 0.50 g、GA-SS-NH₂ 1.00 g、EDC·HCl 0.30 g、NHS 0.19 g 制备的 CMD-SS-GA-2/DOX 为均匀球状, 平均粒径为 117.7 nm, 多分散系数为 0.139; 载药量和包封率分别为 11.6% 和 57.1%; CMD-SS-GA/DOX 在 10 mmol/L 的谷胱甘肽磷酸盐缓冲溶液中 (pH=6.5, 7.4) 24 h 的 DOX 累积释放率达 80% 以上, 具有氧化还原敏感性。

关键词: 右旋糖酐; 羧甲基; 甘草次酸; 胱胺; 胶束; 载药; 释药; 功能材料

中图分类号: TQ460.4 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214 (2025) 04-0780-08

Preparation and properties of dextran-based redox-responsive micelles

DONG Jingwen, ZHANG Yongqin*, LIU Yinchun, LIU Jianrui, LIU Fang

(College of Chemical Engineering, Qingdao University of Science and Technology, Qingdao 266042, Shandong, China)

Abstract: Amphiphilic polymer carboxymethyl dextrose (CMD)-cystamine-glycyrrhetic acid (GA) (CMD-SS-GA) was synthesized from amidation of CMD and GA-SS-NH₂, which were prepared from carboxymethylation of dextran, and amidation of GA and cystamine dihydrochloride (CYS), respectively. Dextran-based redox-responsive drug-loaded micelles (CMD-SS-GA/DOX) encapsulating doxorubicin (DOX) were then prepared *via* self-assembly of CMD-SS-GA and DOX. CMD, GA-SS-NH₂, CMD-SS-GA and CMD-SS-GA/DOX were characterized by MS, FTIR, ¹HNMR, DLS and TEM. Carboxymethyl substitution degree of CMD was determined by back titration method, while the hydrophobic group substitution degree of CMD-SS-GA was determined by ¹HNMR method. The redox sensitive drug release performance of CMD-SS-GA/DOX was evaluated by drug release experiment. The results showed that the carboxymethyl substitution degree of CMD was 2.04 and the hydrophobic group substitution degree of CMD-SS-GA was 0.32~0.83. The CMD-SS-GA-2/DOX prepared with CMD 0.50 g, GA-SS-NH₂ 1.00 g, EDC·HCl 0.30 g and NHS 0.19 g displayed a uniform spherical shape, with an average particle size of 117.7 nm, a polydispersity index of 0.139, loading capacity of 11.6% and encapsulation efficiency of 57.1%. The cumulative release rate of DOX from CMD-SS-GA/DOX in 10 mmol/L glutathione phosphate buffer solution (pH=6.5, 7.4) within 24 h reached more than 80%, indicating redox sensitivity.

Key words: dextran; carboxymethyl; glycyrrhetic acid; cystamine; micelles; drug loading; drug release; functional materials

收稿日期: 2024-02-07; 定用日期: 2024-03-27; DOI: 10.13550/j.jxhg.20240136

基金项目: 山东省重点研发计划项目 (2019GSF107081)

作者简介: 董静文 (1994—), 女, 硕士生, E-mail: 17862344486@163.com。联系人: 张永勤 (1965—), 女, 教授, E-mail: zyx0205@qust.edu.cn。

近年来, 全球癌症发病率、死亡率居高不下, 化学疗法是临床上最常用的治疗癌症方法之一^[1-2]。但化疗药物多呈疏水性, 不易溶解; 同时, 化学疗法为非特异性递送, 会累及正常细胞, 增加毒副作用, 从而限制药物的应用。所以, 增加药物的水溶性和提高药物的特异性递送至关重要。

聚合物胶束能解决药物水溶性差的问题, 已成为最有前景的抗肿瘤药物递送载体之一^[3]。虽然肿瘤的高渗透长滞留 (EPR) 效应能使具有 20~200 nm 的载药胶束更容易地进入肿瘤细胞周围的血管, 并滞留其中, 但是仅靠 EPR 效应^[4]难以实现药物的高效释放, 将刺激响应性官能团引入到胶束聚合物中可解决上述问题^[5]。目前, 已开发多种刺激响应性胶束^[6-7], 特别是氧化还原性聚合物胶束已用于抗肿瘤药物的释放^[5]。在正常组织中, 谷胱甘肽 (GSH) 在细胞内、外的浓度分别为 2~10 mmol/L、2~20 μmol/L, 相差近 1000 倍, 而肿瘤细胞内的 GSH 浓度更高, 是正常细胞内的 4 倍以上。利用该浓度差异将具有二硫键的胱胺引入到载药胶束聚合物中^[8], 二硫键在高 GSH 浓度下发生断裂, 从而实现药物的选择性释放^[9]。右旋糖酐及其衍生物具有水溶性、生物相容性、生物可降解性, 在生物医学领域应用广泛^[10], 特别是羧甲基化后的右旋糖酐水溶性更好, 其结构中的羧基更有利于两亲性胶束聚合物的合成。甘草次酸作为肝脏的受体结合靶点, 对肝脏有很高的亲和力^[11-12], 与同样具有肝靶向性的胆酸相比, 甘草次酸不会因淤积而导致肝损伤, 对肝脏具有保护作用^[13-14]。因此, 甘草次酸在肝癌的靶向递送研究中得到了广泛应用^[15-18]。

本文拟制备羧甲基右旋糖酐 (CMD)-胱胺-甘草次酸 (GA) 聚合物 (CMD-SS-GA), 以抗肿瘤药物阿霉素 (DOX) 为模型药物, 构建氧化还原响应性胶束。通过 MS、FTIR、¹HNMR、DLS、TEM 对聚合物和胶束进行结构表征, 测定取代度, 并考察投料量对取代度的影响, 进而考察取代度对载药性能的影响。以期为提高化学疗法药物的水溶性和药物特异性递送研究提供参考。

1 实验部分

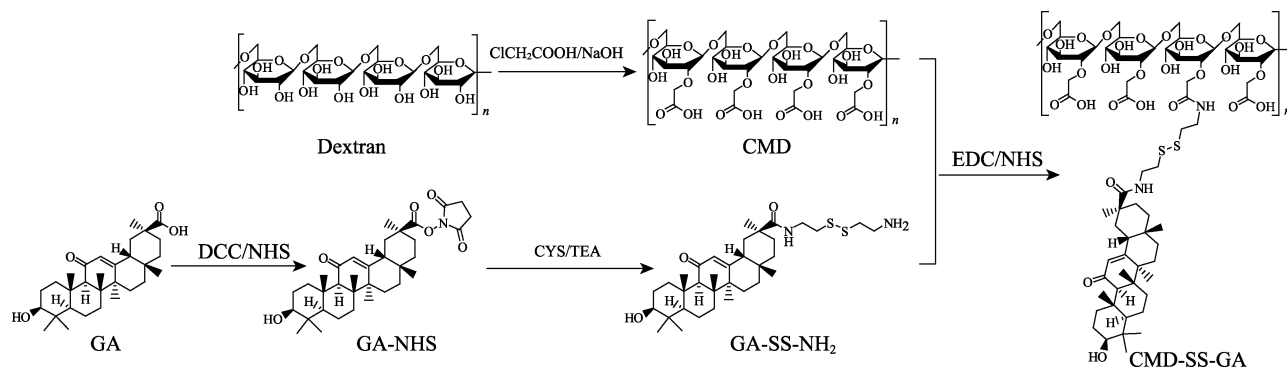
1.1 试剂与仪器

右旋糖酐 [Dextran, 相对分子质量 (M_w) 为 8 kDa], 自制; 超纯水, 自制; GA (β 型, AR)、二环己基碳二亚胺 (DCC, AR)、胱胺二盐酸盐 (CYS, AR)、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐 (EDC·HCl, AR)、盐酸阿霉素 (AR)、溴化钾 (光谱纯), 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; *N*-羧基琥珀酰亚胺 (NHS, AR)、GSH (还原性, 生物技术级), 上海麦克林生化科技股份有限公司; 氘代二甲基亚砜 (DMSO- d_6 , 质量分数 99.9%), 安诺伦(北京)生物科技有限公司; 酚酞, AR, 天津市广成化学试剂有限公司; 重水 (D_2O , 质量分数 99.9%), 阿达玛斯试剂有限公司; NaOH、冰醋酸、异丙醇、浓盐酸 (质量分数 36%~38%)、氯乙酸、四氢呋喃、正己烷、甲酰胺、三乙胺 (TEA)、*N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF)、二甲基亚砜 (DMSO)、乙醇、茛三酮、732 强酸性阳离子交换树脂、十二水合磷酸氢二钠、二水合磷酸二氢钠、甲醇、丙酮、磷钨酸, AR, 国药集团化学试剂有限公司; 透析袋 ($M_w=1000$ Da)、透析袋 ($M_w=3500$ Da), 美国联合碳化物公司。

YK-RO-B 型超纯水机, 舒活泉 (厦门) 智能科技有限公司; FE20 型实验室 pH 计, 美国 Mettler Toledo 公司; Finnpiptette F3 型移液器, 赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; TFDS0.25 型真空冷冻干燥机, 烟台中孚冷链设备有限公司; Nicolet iS10 型傅里叶变换红外光谱仪 (FTIR), 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; JNM-ECP600 型核磁共振波谱仪 (NMR), 日本电子株式会社; Agilent 1290 Infinity II UHPLC/6460 QqQ 三重四级杆液质联用仪, 美国 Agilent 公司; UV-2600 型紫外-可见分光光度计, 日本 Shimadzu 公司; JEM-1200EX 型透射电子显微镜 (TEM), 捷欧路 (北京) 科贸有限公司; Nano-ZS90 型动态光散射仪 (DLS), 英国马尔文仪器有限公司。

1.2 合成方法

化合物的合成路线如下所示:



1.2.1 CMD 的合成

参照 HUYNH 等^[9]的方法,并稍加改进。将 5.00 g Dextran 与 62.5 mL 异丙醇制成的浆状混合物转移到 500 mL 三口烧瓶中,缓慢加入 18.75 mL NaOH 水溶液 (8.0 mol/L),室温下连续搅拌、碱化 1 h,制备碱化混合物;将 7.50 g 氯乙酸溶解于 43.75 mL 异丙醇中,并置于分液漏斗中,于 60 °C 冷凝回流条件下将其缓慢滴加至碱化混合物中,反应 1.5 h 后,用冰醋酸调至 pH=7,过滤,得到羧甲基化粗品。重复以上碱化、羧甲基化步骤 4 次,收集羧甲基化粗品,减压浓缩,以透析袋 ($M_w=1000$ Da) 于室温下用超纯水透析 3 d,于 -55~-60 °C 下冻干 3 d,得到 8.30 g CMD,白色固体,产率为 71.2%。(以羧甲基化取代度 2.04 计算,产率为 87.1%)。

1.2.2 甘草次酸-脬胺 (GA-SS-NH₂) 的合成

首先,将 2.50 g (5.31 mmol) GA 溶于 160 mL 四氢呋喃中,加入 1.42 g (6.88 mmol) DCC 和 0.80 g (6.95 mmol) NHS,将混合物在 N₂ 氛围下搅拌反应 12 h;然后,通过 0.8 μm 微孔过滤,除去沉淀,用 600 mL 正己烷沉淀滤液,抽滤后,在真空干燥箱中室温干燥 1 d,得到 2.89 g 甘草次酸活化酯 (GA-NHS),白色固体,产率 98.8%。

将 11.10 g (49.29 mmol) CYS 溶于 180 mL 甲酰胺,缓慢滴加 42.5 mL 三乙胺,在常温下搅拌反应 1 h,制备脬胺溶液;接着,将 2.80 g (4.93 mmol) 活化酯 GA-NHS 溶于 175 mL DMF 中,将此溶液缓慢滴加到上述脬胺溶液中;然后,反应混合物在室温下搅拌反应 6 h,加入 1900 mL 超纯水沉淀 30 min,抽滤后将滤饼分散在 800 mL 超纯水中搅拌 30 min,再次抽滤后于真空干燥箱中室温下干燥滤饼 2 d,以 $V(\text{乙酸乙酯}):V(\text{甲醇})=4:1$ 为展开剂经硅胶柱层析分离纯化,得到 2.10 g GA-SS-NH₂,白色固体,产率 70.5%。

1.2.3 CMD-SS-GA 的合成

采用表 1 所示物料配比,以 CMD-SS-GA-2 的合成为例:将 0.50 g CMD (2.97 mmol 羧甲基糖单元) 溶于 50 mL 超纯水中,再依次加入溶于 20 mL 超纯水的 0.30 g (1.57 mmol) EDC·HCl、溶于 20 mL DMSO 的 0.19 g (1.65 mmol) NHS 和溶于 30 mL DMSO 的 1.00 g (1.65 mmol) GA-SS-NH₂;然后,用 NaOH 水溶液 (8.0 mol/L) 将反应液调节 pH=6.8,室温下搅拌反应 1 d。反应完成后,将得到的反应液以透析袋 ($M_w=3500$ Da) 于室温下,用体积分数 60% 乙醇水溶液透析 1~2 d 至澄清透明,再用超纯水透析 2 d,于 -55~-60 °C 下冻干 3 d,得到 0.53 g CMD-SS-GA,白色固体,产率为 54.4%。(以 GA-SS-NH₂ 的取代度 0.35 计算,产率为 94.7%)。

表 1 合成 CMD-SS-GA 的物料配比

Table 1 Synthesis of CMD-SS-GA in different feed ratios

| CMD-SS-GA | CMD/g | GA-SS-NH ₂ /g | EDC·HCl/g | NHS/g |
|-------------|-------|--------------------------|-----------|-------|
| CMD-SS-GA-1 | 0.50 | 0.66 | 0.21 | 0.13 |
| CMD-SS-GA-2 | 0.50 | 1.00 | 0.30 | 0.19 |
| CMD-SS-GA-3 | 0.50 | 1.28 | 0.42 | 0.25 |
| CMD-SS-GA-4 | 0.50 | 1.80 | 0.58 | 0.35 |

1.2.4 空白胶束的制备

将 50 mg CMD-SS-GA 溶于 25 mL 甲酰胺中,加入 12.5 mL DMF,室温下搅拌 4 h,再补加 37.5 mL 超纯水搅拌 24 h,然后将混合溶液以透析袋 ($M_w=3500$ Da) 于室温下用超纯水透析 24 h,经 0.45 μm 水系膜过滤,于 -55~-60 °C 下冻干 3 d,得到空白胶束 CMD-SS-GA。

1.2.5 载药胶束的制备

首先,将 60 mg 盐酸阿霉素溶于 60 mL 甲醇中,加入 1.2 mL 三乙胺后,室温下避光搅拌 12 h;接着,减压旋蒸除去有机溶剂,加入 60 mL DMF 复溶得到质量浓度为 1 g/L 的脱盐阿霉素溶液;然后,将 50 mg CMD-SS-GA 溶于 25 mL 甲酰胺中,逐滴加入到 12.5 mL 脱盐阿霉素溶液中,室温下搅拌 4 h,再补加 37.5 mL 超纯水搅拌 24 h 后;最后,将混合溶液以透析袋 ($M_w=3500$ Da) 于室温下用超纯水透析 24 h,经 0.45 μm 水系膜过滤,于 -55~-60 °C 下冻干 3 d,得到载药胶束 CMD-SS-GA/DOX。

1.3 表征方法与性能测试

1.3.1 CMD 羧甲基化取代度的测定

用盐酸将 732 强酸性阳离子交换树脂转化为氢型,将 CMD 通过阳离子交换树脂进行质子化转化成羧酸形式,于 -55~-60 °C 下冻干 3 d,备用。将 0.10 g 质子化 CMD 溶解在 30 mL 超纯水中,加入 5.5 mL 标定过的 NaOH 溶液 (0.2 mol/L) 于锥形瓶中混匀,滴加 2 滴酚酞指示剂,用标定过的盐酸 (0.02 mol/L) 滴定,同时以相同的方法滴定空白。重复滴定 3 次,取盐酸消耗体积算数平均值。根据式 (1) 和 (2) 计算 CMD 中羧甲基化取代度 (DS):

$$A = (V_{\text{NaOH}} \times c_{\text{NaOH}} - V_{\text{HCl}} \times c_{\text{HCl}}) / m \quad (1)$$

$$\text{DS} = M \times A / (1 - \Delta M \times A) \quad (2)$$

式中: A 为单位质量质子化 CMD 中羧基的物质的量, mol/g; V_{NaOH} 为滴定时加入 NaOH 标准溶液的体积, L; c_{NaOH} 为 NaOH 标准溶液的浓度, 0.2 mol/L; V_{HCl} 为消耗盐酸标准溶液的体积, L; c_{HCl} 为盐酸标准溶液的浓度, 0.02 mol/L; m 为质子化 CMD 的质量, g; M 为葡萄糖单元的相对分子质量, 180.16; ΔM 为引入取代基 (-CH₂COOH) 的相对分子质量增加量, 58。

1.3.2 CMD-SS-GA 取代度的测定

将 10 mg 干燥后的 CMD-SS-GA 加入到 800 μL DMSO- d_6 和 200 μL D $_2$ O 混合溶剂中溶解, 转移至核磁管内, 经 ^1H NMR 进行测定。根据 ^1H NMR 和式 (3) 计算 CMD-SS-GA 取代度 ($\text{MS}_{\text{SS-GA}}$, %), 代表单位物质的量糖单元中羧基被疏水基取代百分数:

$$\text{MS}_{\text{SS-GA}}/\% = (I_{23} + I_{28}) / (6\text{DS} \times I_{\text{H1}}) \times 100 \quad (3)$$

式中: I_{23} 、 I_{28} 分别为 CMD-SS-GA 中与 GA-SS-NH $_2$ 对应的 C $_{23}$ 、C $_{28}$ 位 (甲基质子吸收峰) 的积分峰面积; I_{H1} 为 CMD-SS-GA 中糖环的 C $_1$ 位质子吸收峰的积分峰面积。

1.3.3 载药量 (DL) 和包封率 (EE) 的测定

将 5 mg 盐酸阿霉素溶于 V (甲酰胺): V (超纯水)=1:1 的混合溶剂中, 配制成质量浓度为 100 mg/L 的盐酸阿霉素溶液, 将盐酸阿霉素溶液稀释至不同质量浓度, 测定 480 nm 下的吸光度并绘制阿霉素 (DOX) 的吸光度 (y)-质量浓度 (x , mg/L) 标准曲线, 得到的拟合方程为 $y=0.0202x+0.0041$ ($R^2=0.9999$)。将 5 mg CMD-SS-GA/DOX 用 V (甲酰胺): V (超纯水)=1:1 的混合溶剂溶解定容至 10 mL, 测定其在 480 nm 下的吸光度, 并根据上述标准曲线拟合方程计算其中 DOX 的质量浓度。根据式 (4) 和 (5) 计算胶束 DL (%) 和 EE (%):

$$\text{DL}/\% = m_0/m_1 \times 100 \quad (4)$$

$$\text{EE}/\% = m_0/m_2 \times 100 \quad (5)$$

式中: m_0 为 CMD-SS-GA/DOX 中 DOX 的质量, μg ; m_1 为 CMD-SS-GA/DOX 的质量, μg ; m_2 为加入 DOX 的质量, μg 。

1.3.4 胶束的表征

将 10 mg 胶束溶于 PBS (pH=7.4 的 0.01 mol/L 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠溶液) 中, 配制成质量浓度 1 g/L 的胶束分散液。采用动态光散射仪在 25 $^\circ\text{C}$ 下测定胶束的粒径、多分散系数 (PDI) 和 Zeta 电位。

取少量上述胶束分散液于铜网, 采用质量浓度为 20 g/L 磷钨酸染色 5 min 后充分干燥, 用 TEM 观察胶束的结构及形貌。

1.3.5 胶束氧化还原敏感性释药测试

由于拟将载药胶束应用于注射给药, 所以利用氧化还原进行 S-S 键的切割降解载药胶束, 达到药物释放的目的。针对正常细胞 (pH=7.4) 和肿瘤细胞 (pH=6.5~6.9) pH 的差异^[20], 同时模拟肿瘤细胞 pH=6.5 和正常细胞 pH=7.4, 考察在这两个 pH 下 CMD-SS-GA/DOX 在 GSH 的 PBS 溶液中的药物释放性能, 验证胶束的氧化还原敏感性。

将 10 mg CMD-SS-GA/DOX 溶于 PBS (pH=7.4 的 0.01 mol/L 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠溶液) 中, 配制成质量浓度 1 g/L 的 CMD-SS-GA/DOX 胶束分散

液。取两份 4 mL 胶束分散液分别装入透析袋 ($M_w=3500$ Da) 中, 然后将透析袋分别置于含有 0、10 mmol/L GSH 的 60 mL 的 PBS 溶液 (pH=7.4 的 0.01 mol/L 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠溶液) 中, 在 37 $^\circ\text{C}$ 、100 r/min 水浴摇床中进行释药, 同时进行 3 组平行实验, 每隔一段时间取透析液 2 mL (同时补加 2 mL 相应的 0、10 mmol/L 的 GSH 的 PBS 溶液) 在 480 nm 波长下测定 DOX 的吸光度, 并通过 480 nm 下的 DOX 的标准曲线方程计算其质量浓度, 采用式 (6) 计算 CMD-SS-GA/DOX 的累积药物释放率:

$$E_r/\% = [V_1\rho_n + V_2(\rho_1 + \rho_2 + \dots + \rho_{n-1})] / m_{\text{DOX}} \times 100 \quad (6)$$

式中: E_r 为 CMD-SS-GA/DOX 的累积药物释放率, %; $\rho_1 \sim \rho_n$ 为第 1~ n 次所取 PBS 溶液中 DOX 的质量浓度, mg/L; V_1 为释放介质的初体积, 60 mL; V_2 为每次取样的体积, 2 mL; m_{DOX} 为 CMD-SS-GA/DOX 中 DOX 的总质量, μg 。

2 结果与讨论

2.1 样品的表征分析

2.1.1 CMD 的表征

图 1 为 Dextran、CMD、质子化 CMD 的 FTIR 谱图。

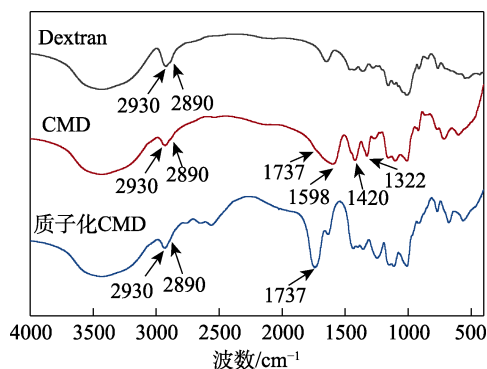


图 1 Dextran、CMD 和质子化 CMD 的 FTIR 谱图
Fig. 1 FTIR spectra of Dextran, CMD and protonated CMD

从图 1 可以看出, 在 Dextran、CMD、质子化 CMD 的 FTIR 谱图中, 2930 cm^{-1} 处为亚甲基中 C-H 键的不对称伸缩振动吸收峰, 2890 cm^{-1} 处为次甲基中 C-H 的伸缩振动吸收峰, 相比于 Dextran, CMD 新出现的 1737 cm^{-1} 处吸收峰为羧酸中 C=O 键的伸缩振动, 1598、1420 cm^{-1} 处为羧酸盐中 C=O 键的不对称、对称伸缩振动吸收峰, 1322 cm^{-1} 处为羧酸盐中 C-O 键的伸缩振动吸收峰, 羧酸和羧酸盐相关吸收峰的出现说明了 CMD 的合成成功。在质子化 CMD 的 FTIR 谱图中, 1737 cm^{-1} 处吸收峰透过率的增大与 1598 cm^{-1} 处吸收峰的消失说明 CMD 已质子化。

按照式 (1)、(2) 计算 CMD 的 DS 为 2.04。

2.1.2 GA-SS-NH₂ 的表征

图 2 为 GA-SS-NH₂ 的 LC-MS 谱图。

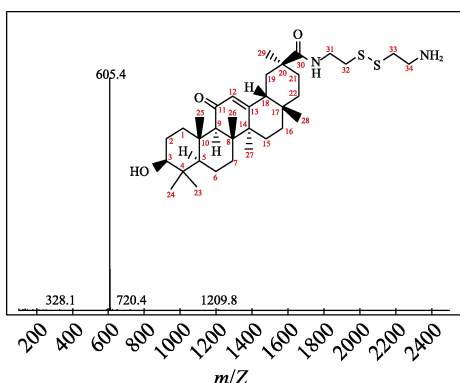


图 2 GA-SS-NH₂ 的 LC-MS 谱图
Fig. 2 LC-MS spectrum of GA-SS-NH₂

从图 2 可以看出, 根据 GA-SS-NH₂ 的理论相对分子质量 (604.96), 可以推测 $m/Z = 605.4$ 的质谱峰应是 GA-SS-NH₂ 的分子离子峰。

图 3 为 GA 和 GA-SS-NH₂ 的 FTIR 谱图。

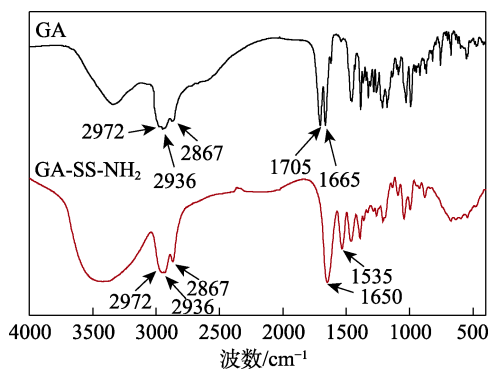


图 3 GA 和 GA-SS-NH₂ 的 FTIR 谱图
Fig. 3 FTIR spectra of GA and GA-SS-NH₂

从图 3 可以看出, 在 GA 的 FTIR 谱图中, 2972、2867 cm^{-1} 处为甲基中 C—H 的不对称、对称伸缩振动吸收峰, 2936 cm^{-1} 处为亚甲基中 C—H 的不对称伸缩振动吸收峰; 1705 cm^{-1} 处为羧酸中 C=O 键的伸缩振动吸收峰, 1665 cm^{-1} 处为与 C=C 键共轭的酮的 C=O 键的伸缩振动吸收峰。在 GA-SS-NH₂ 的 FTIR 谱图中, 2936、2867 cm^{-1} 的亚甲基的 C—H 不对称、对称伸缩振动吸收峰透过率明显增大, 这是由于胱胺的引入使结构中增加了亚甲基; 新出现的 1650、1535 cm^{-1} 处吸收峰分别为酰胺 I 带和酰胺 II 带, 同时 1705 cm^{-1} 处吸收峰消失, 说明 GA 的羧酸基团转化为酰胺键。

图 4 为 GA 和 GA-SS-NH₂ 的 ¹HNMR 谱图。

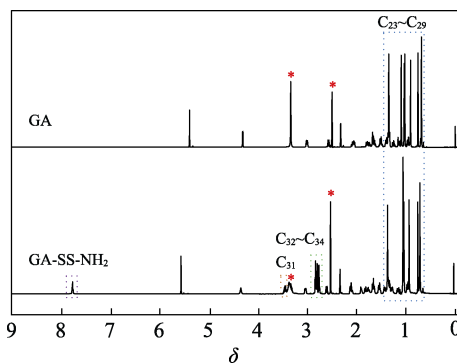


图 4 GA 和 GA-SS-NH₂ 的 ¹HNMR 谱图
Fig. 4 ¹HNMR spectra of GA and GA-SS-NH₂

从图 4 可以看出, GA-SS-NH₂ 在 δ 0.69、0.73、0.91、1.01、1.03、1.34 为 C₂₃~C₂₉ 的甲基质子信号峰, 与 GA 中的 7 个甲基质子信号峰对应; 新出现的 δ 2.72~2.82 为 C₃₂、C₃₃、C₃₄ 亚甲基质子信号峰; δ 2.50、3.34 分别为 DMSO-d₆、D₂O 的溶剂峰; δ 3.42 为 C₃₁ 处亚甲基质子信号峰; δ 7.74 为酰胺键中质子信号峰。与 GA 的 ¹HNMR 谱图对比, GA 甲基质子信号峰的存在、CYS 亚甲基质子信号峰的出现以及酰胺键的形成, 表明 GA-SS-NH₂ 的成功合成。

2.1.3 CMD-SS-GA 的表征

图 5 为 CMD-SS-GA 的 FTIR 谱图。

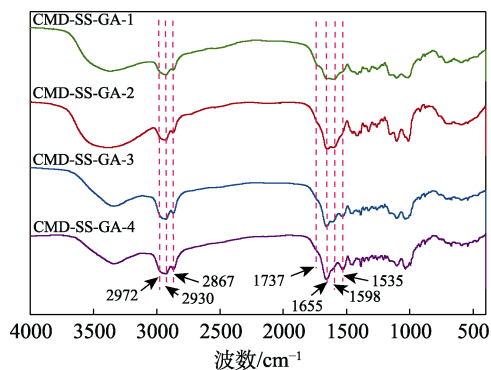


图 5 CMD-SS-GA 的 FTIR 谱图
Fig. 5 FTIR spectra of CMD-SS-GA

从图 5 可以看出, 2972、2930 cm^{-1} 处分别为甲基、亚甲基 C—H 的不对称伸缩振动吸收峰, 2867 cm^{-1} 处为甲基、亚甲基的 C—H 对称伸缩振动吸收峰, 其与 GA-SS-NH₂ 基本一致; 1737 cm^{-1} 处为羧酸的 C=O 键的伸缩振动吸收峰, 1598 cm^{-1} 处为羧酸盐的伸缩振动吸收峰, 这与 CMD 中羧基的谱带对应; 1655、1535 cm^{-1} 处分别为酰胺 I 带和酰胺 II 带, 这与 GA-SS-NH₂ 中酰胺键的谱带 (1650、1535 cm^{-1} 处) 基本一致。

图 6 为 CMD、GA-SS-NH₂ 和 CMD-SS-GA 的 ¹HNMR 谱图。

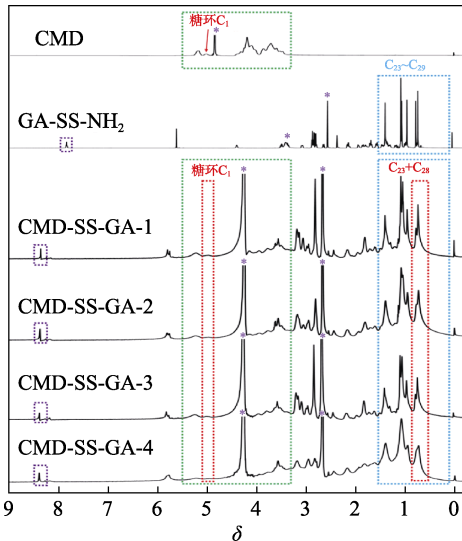


图 6 CMD、GA-SS-NH₂ 和 CMD-SS-GA 的 ¹H NMR 谱图
Fig. 6 ¹H NMR spectra of CMD, GA-SS-NH₂ and CMD-SS-GA

从图 6 可以看出, 在 CMD-SS-GA 的 ¹H NMR 谱图中, δ 0.69~1.34 的 7 个质子信号峰归属于 GA-SS-NH₂ 中的 C₂₃~C₂₉ 甲基; δ 3.23~5.17 为 CMD 中的相关质子信号峰; δ 2.55、4.08 分别为 DMSO-*d*₆、D₂O 的溶剂峰; δ 8.03 为酰胺键中质子信号峰, 相比于 GA-SS-NH₂ 中酰胺键的质子信号峰 (δ 7.74) 化学位移更大, 这主要是因为, CMD-SS-GA 合成后形成了新的酰胺键, 酰胺键的形成造成了电子云密度的降低, 化学位移向低场区移动。

上述 FTIR 和 ¹H NMR 结果表明, CMD-SS-GA 合成成功。

表 2 为根据式 (3) 计算的 CMD-SS-GA 取代度。

表 2 CMD-SS-GA 的取代度
Table 2 Degree of substitution of CMD-SS-GA

| 样品 | $I_{23+I_{28}}$ | I_{H1} | MS _{SS-GA} /% |
|-------------|-----------------|----------|------------------------|
| CMD-SS-GA-1 | 6 | 1.52 | 0.32 |
| CMD-SS-GA-2 | 6 | 1.41 | 0.35 |
| CMD-SS-GA-3 | 6 | 0.91 | 0.54 |
| CMD-SS-GA-4 | 6 | 0.59 | 0.83 |

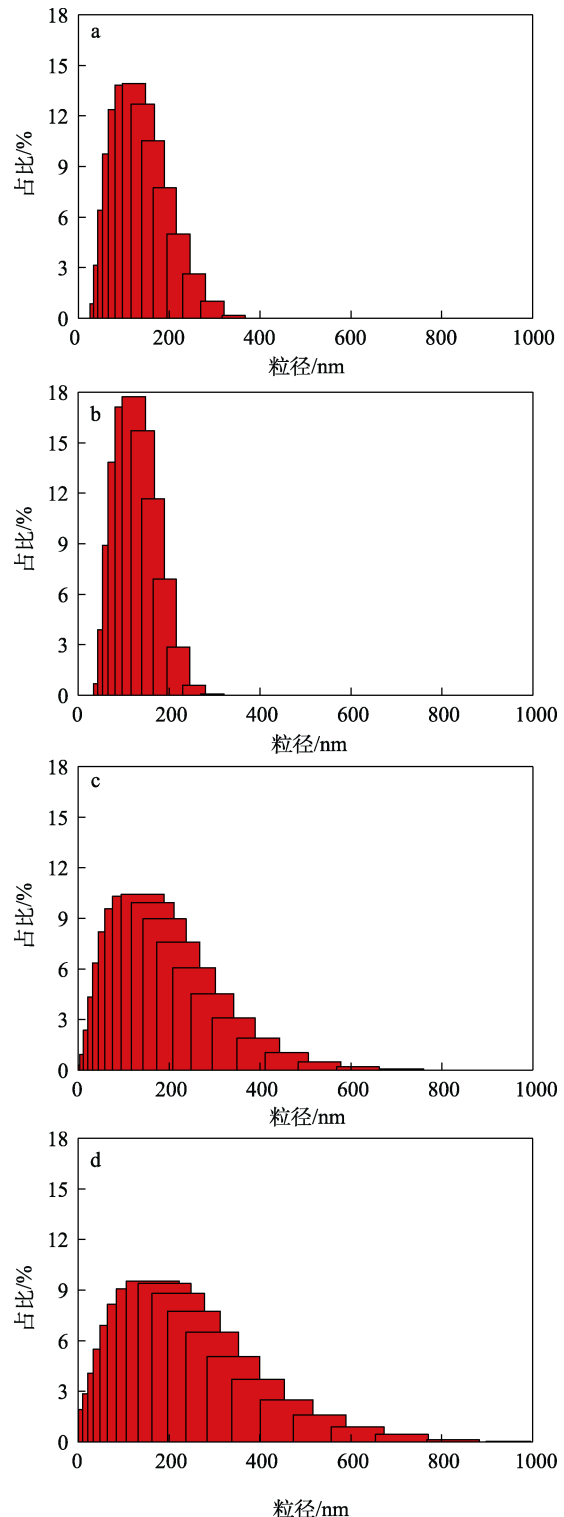
从表 2 可以看出, 随着 EDC·HCl、NHS 和 GA-SS-NH₂ 投料量的增加, CMD-SS-GA 取代度逐渐变大, 依次为 0.32、0.35、0.54、0.83。

2.1.4 CMD-SS-GA/DOX 粒径、Zeta 电位分析

图 7 为 CMD-SS-GA/DOX 的粒径分布曲线, 表 3 为 CMD-SS-GA/DOX 的平均粒径、PDI 和 Zeta 电位。

从图 7 和表 3 可以看出, CMD-SS-GA-1/DOX、CMD-SS-GA-2/DOX、CMD-SS-GA-3/DOX 和 CMD-SS-GA-4/DOX 的平均粒径分别为 112.7、117.7、136.9 和 146.6 nm; PDI 分别为 0.137、0.139、

0.243 和 0.306; Zeta 电位均为负值, 表明 4 种 CMD-SS-GA/DOX 样品表面均具有负电荷, 这主要是由于羧基的存在, 负电荷有助于胶束在体内通过静电斥力抵抗黏附蛋白结合, 从而将具备稳定性。



a—CMD-SS-GA-1/DOX; b—CMD-SS-GA-2/DOX; c—CMD-SS-GA-3/DOX; d—CMD-SS-GA-4/DOX

图 7 CMD-SS-GA/DOX 的粒径分布曲线

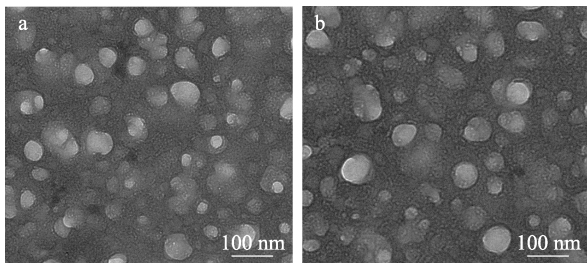
Fig. 7 Particle size distribution curves of CMD-SS-GA/DOX

表 3 CMD-SS-GA/DOX 的平均粒径和 Zeta 电位
Table 3 Average particle size and Zeta potential of CMD-SS-GA/DOX

| 样品 | 平均粒径/nm | PDI | Zeta 电位/mV |
|-----------------|---------|-------|------------|
| CMD-SS-GA-1/DOX | 112.7 | 0.137 | -41.6 |
| CMD-SS-GA-2/DOX | 117.7 | 0.139 | -33.0 |
| CMD-SS-GA-3/DOX | 136.9 | 0.243 | -34.7 |
| CMD-SS-GA-4/DOX | 146.6 | 0.306 | -37.6 |

综合比较, CMD-SS-GA-1/DOX 和 CMD-SS-GA-2/DOX 的平均粒径较小(112.7、117.7 nm), PDI (0.137、0.139) 接近于 0.1, 分布更加集中。

图 8 为 CMD-SS-GA-2 和 CMD-SS-GA-2/DOX 的 TEM 图。



a—CMD-SS-GA-2; b—CMD-SS-GA-2/DOX

图 8 CMD-SS-GA-2 和 CMD-SS-GA-2/DOX 的 TEM 图
Fig. 8 TEM images of CMD-SS-GA-2 and CMD-SS-GA-2/DOX

从图 8 可以看出, 两种胶束都为大小均一的球形, CMD-SS-GA-2 粒径在 70 nm 左右; CMD-SS-GA-2/DOX 粒径在 90 nm 左右, 相比 DLS 测定结果(117.7 nm) 偏小, 这主要是由于胶束分散液在铜网上干燥时, 受热脱水发生皱缩。

2.2 胶束的载药性能分析

表 4 为根据式(4)和(5)计算得到的 CMD-SS-GA/DOX 的 DL 和 EE。

表 4 CMD-SS-GA/DOX 的 DL 和 EE
Table 4 DL and EE of CMD-SS-GA/DOX

| CMD-SS-GA/DOX | DL/% | EE/% |
|-----------------|------|------|
| CMD-SS-GA-1/DOX | 8.1 | 38.4 |
| CMD-SS-GA-2/DOX | 11.6 | 57.1 |
| CMD-SS-GA-3/DOX | 13.2 | 66.4 |
| CMD-SS-GA-4/DOX | 14.9 | 76.2 |

从表 4 可以看出, CMD-SS-GA-1/DOX、CMD-SS-GA-2/DOX、CMD-SS-GA-3/DOX 和 CMD-SS-GA-4/DOX 的 DL 分别为 8.1%、11.6%、13.2%和 14.9%, EE 分别为 38.4%、57.1%、66.4%和 76.2%, 说明 4 种 CMD-SS-GA 对疏水性药物 DOX 均具有良好的包载能力。另外, 随着 CMD-SS-GA 取代度的

增加, CMD-SS-GA/DOX 的 DL 和 EE 逐渐升高, 这主要是因为, 疏水基团的增加使 CMD-SS-GA 疏水内核的体积增大, 并形成了更多的疏水点, 从而增加了与疏水药物 DOX 的接触面积, 使更多药物进入其内部。

随着载药量的增大, 胶束粒径逐渐增加, 综合粒径和载药性能测定结果, CMD-SS-GA-2/DOX 为最佳载药胶束。

2.3 胶束氧化还原响应性释药分析

图 9 为 CMD-SS-GA-2/DOX 氧化还原敏感性释药测试结果。

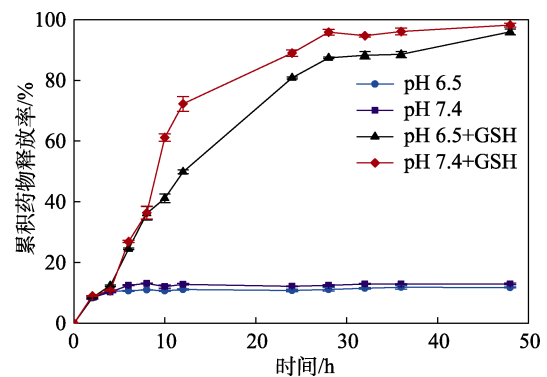


图 9 CMD-SS-GA-2/DOX 氧化还原敏感性释药性能
Fig. 9 Redox sensitive drug release performance of CMD-SS-GA-2/DOX

从图 9 可以看出, CMD-SS-GA-2/DOX 在浓度 10 mmol/L 的 GSH 的 PBS 溶液中药物累积释放率显著升高, 在 pH=6.5、7.4 的条件下, 24 h 的药物累积释放率均>80%, 在 48 h 药物累积释放率均接近 100%; 而在不含 GSH 的 PBS 溶液中, CMD-SS-GA-2/DOX 在 4 h 达到 10% 的药物累积释放率后便趋于稳定, 不会因肿瘤微环境酸碱性的改变而增加药物的释放, 表明 CMD-SS-GA-2/DOX 具有氧化还原敏感性。

3 结论

以 Dextran 和 GA 为原料, 经 Dextran 羧甲基化、GA 和 CYS 酰胺化反应、GA-SS-NH₂ 和 CMD 酰胺化反应, 制备了不同疏水基取代度的 CMD-SS-GA, 最后封装药物 DOX 制备了载药胶束 CMD-SS-GA/DOX。

(1) CMD 羧甲基取代度为 2.04; CMD-SS-GA 取代度为 0.32~0.83。

(2) CMD-SS-GA-2/DOX 为均匀球形, 粒径小且分布良好, 平均粒径 117.7 nm, PDI 为 0.139; 载药量和包封率分别为 11.6%、57.1%, 在 10 mmol/L GSH 的 PBS 溶液中 24 h 药物累积释放率>80%, 具

有良好的氧化还原敏感性。

CMD-SS-GA 胶束具有氧化还原响应性, 有望应用于靶向抗肿瘤药物的递送, 但 GA 的肝靶向性有待进一步研究。

参考文献:

- [1] JINDAL A, THADI A, SHAILUBHAI K. Hepatocellular carcinoma: Etiology and current and future drugs[J]. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, 2019, 9(2): 221-232.
- [2] ANWANWAN D, SINGH S K, SINGH S, *et al.* Challenges in liver cancer and possible treatment approaches[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 2020, 1873(1): 188314.
- [3] CABRAL H, MIYATA K, OSADA K, *et al.* Block copolymer micelles in nanomedicine applications[J]. *Chemical Reviews*, 2018, 118(14): 6844-6892.
- [4] ZHAO N, WU B Y, HU X L, *et al.* NIR-triggered high-efficient photodynamic and chemo-cascade therapy using caspase-3 responsive functionalized upconversion nanoparticles[J]. *Biomaterials*, 2017, 141: 40-49.
- [5] THAMBI T, YOU D G, HAN H S, *et al.* Bioreducible carboxymethyl dextran nanoparticles for tumor-targeted drug delivery[J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2014, 3(11): 1829-1838.
- [6] YUAN F (袁帆), LIAO X (廖曦), CHEN X H (陈献煌), *et al.* Preparation and properties of mucoadhesive and hypoxia-responsive chitosan micelles[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2022, 39(10): 1-14.
- [7] XU D Z (徐德忠), XIAO W C (肖旺钊), LIN W J (林伟杰), *et al.* Preparation and drug loading properties of thermally responsive perfluoropolyether acrylate copolymer[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2022, 39(7): 1434-1442.
- [8] LI J, HU Z E, YANG X L, *et al.* GSH/pH dual-responsive biodegradable camptothecin polymeric prodrugs combined with doxorubicin for synergistic anticancer efficiency[J]. *Biomaterials Science*, 2019, 7(8): 3277-3286.
- [9] LU Y, MO R, TAI W Y, *et al.* Self-folded redox/acid dual-responsive nanocarriers for anticancer drug delivery[J]. *Chemical Communications*, 2014, 50(95): 15105-15108.
- [10] BENNY S, VISHNU V, ANEESH T. Dextran-based engineering: A leap in novel drug delivery. Carboxymethylation of dextran in aqueous alcohol as the first step of the preparation of derivatized[J/OL]. *Natural Biopolymers in Drug Delivery and Tissue Engineering*, 2023. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-98827-8.00014-x>.
- [11] LALLEMAND B, GELBCKE M, DUBOIS J, *et al.* Structure-activity relationship analyses of glycyrrhetic acid derivatives as anticancer agents[J]. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 2011, 11(10): 881-887.
- [12] CAI Y, XU Y Q, CHAN H F, *et al.* Glycyrrhetic acid mediated drug delivery carriers for hepatocellular carcinoma therapy[J]. *Molecular Pharmaceutics*, 2016, 13(3): 699-709.
- [13] WANG O, SONG G C, WENG F Y, *et al.* Hepatoprotective effects of glycyrrhetic acid on lithocholic acid-induced cholestatic liver injury through choleretic and anti-inflammatory mechanisms[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 13: 881231.
- [14] PAN P H, WANG Y Y, LIN S Y, *et al.* 18 β -Glycyrrhetic acid protects against cholestatic liver injury in bile duct-ligated rats[J]. *Antioxidants*, 2022, 11(5): 961.
- [15] HUANG W, WANG W, WANG P, *et al.* Glycyrrhetic acid-modified poly(ethylene glycol)-*b*-poly(γ -benzyl L-glutamate) micelles for liver targeting therapy[J]. *Acta Biomaterialia*, 2010, 6(10): 3927-3935.
- [16] TIAN Q, ZHANG C N, WANG X H, *et al.* Glycyrrhetic acid-modified chitosan/poly(ethylene glycol) nanoparticles for liver-targeted delivery[J]. *Biomaterials*, 2010, 31(17): 4748-4756.
- [17] ZHANG C N, WANG W, LIU T, *et al.* Doxorubicin-loaded glycyrrhetic acid-modified alginate nanoparticles for liver tumor chemotherapy[J]. *Biomaterials*, 2012, 33(7): 2187-2196.
- [18] HUANG W, WANG W, WANG P, *et al.* Glycyrrhetic acid-functionalized degradable micelles as liver-targeted drug carrier[J]. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2011, 22: 853-863.
- [19] HUYNH R, CHAUBET F, JOZEFONVICZ J. Carboxymethylation of dextran in aqueous alcohol as the first step of the preparation of derivatized dextrans[J]. *Die Angewandte Makromolekulare Chemie*, 1998, 254(1): 61-65.
- [20] SAADAT M, MOSTAFAEI F, MAHDINLOO S, *et al.* Drug delivery of pH-sensitive nanoparticles into the liver cancer cells[J]. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2021, 63: 102557.

(上接第 731 页)

- [80] TANG X L, WEI J F, KONG Z Y, *et al.* Introduction of amino and rGO into PP nonwoven surface for removal of gaseous aromatic pollutants and particulate matter from air[J]. *Applied Surface Science*, 2020, 511: 145631.
- [81] WEN Y Y, HU Q, WANG X Y, *et al.* Electrospun poly(*m*-phenyleneisophthalamide)/TiO₂ nanofiber membranes for particulate matter removal under high-temperature conditions[J]. *ACS Applied Polymer Materials*, 2024, 6(3): 1633-1644.
- [82] CHEN Z, YU G W, WANG Y, *et al.* Fate of heavy metals during co-disposal of municipal solid waste incineration fly ash and sewage sludge by hydrothermal coupling pyrolysis process[J]. *Waste Management*, 2020, 109: 28-37.
- [83] CUI Y Y, YANG G H, XIAO G H, *et al.* Adsorption of dioxin by bag filter + powdered activated carbon[J]. *Water, Air & Soil Pollution*, 2017, 228: 1-8.
- [84] LUO G P, ZHANG K, PENG Y Q, *et al.* Pilot study on removal characteristics of multiple pollutants by the dual baghouse filter system[J]. *Energies*, 2022, 15(10): 3728.
- [85] KAWAMOTO K, MIYATA H. Dioxin formation and control in a gasification-melting plant[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2015, 22: 14621-14628.
- [86] HAO R L, WANG Z, TANG C, *et al.* Reaction behavior and cost-effectiveness of halogen radicals in Hg⁰ removal: Performance, kinetics, and mechanism[J]. *ACS ES & T Engineering*, 2020, 1(1): 66-75.
- [87] HRDLICKA J A, SEAMES W S, MANN M D, *et al.* Mercury oxidation in flue gas using gold and palladium catalysts on fabric filters[J]. *Environmental Science & Technology*, 2008, 42(17): 6677-6682.
- [88] SUNG J H, BACK S K, LEE E S, *et al.* Application of powdered activated carbon coating to fabrics in a hybrid filter to enhance mercury removal[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2019, 80: 58-65.