

双醛淀粉纳米颗粒制备及作为药物载体的应用

俞丹密 肖苏尧 童春义 陈霖 刘选明*

(湖南大学生命科学与技术研究院, 生物能源与材料研究中心, 化学生物传感与计量学国家重点实验室, 长沙 410082.)

* 联系人, E-mail: sw_xml@hnu.cn

摘要 利用反相微乳液法和交联法, 用高碘酸钠(NaIO_4)氧化可溶性淀粉(St)成功制备了双醛淀粉纳米颗粒(DASNP). 红外光谱仪检测显示所得颗粒含有醛基, 并用“碱消耗法”测定醛基的含量为 $(50 \pm 5)\%$. 扫描电子显微镜(SEM)检测结果显示该颗粒的平均粒径约为 100 nm. 热分析(TGA-DTA)表明 DASNP 的热稳定性比淀粉纳米颗粒(StNP)、双醛淀粉(DAS)有明显提高. 紫外分光光度法检测纳米颗粒结合多柔比星(DOX)的最适宜质量比为 15:1, 并对药物有明显的缓释效果, 细胞实验证明该颗粒的低毒性. 载药颗粒(DOX-DASNP)与人乳腺癌 MCF-7 细胞共培养, 发现 DOX-DASNP 能长时间释放药物作用肿瘤细胞, 增强了药效. 结果显示, 所制备的 DASNP 热稳定性好, 颗粒小, 生物毒性低, 对药物具有缓释作用并提高药效, 是一种很有潜力的抗肿瘤药物载体.

关键词 双醛淀粉 纳米颗粒 乳腺癌细胞 药物载体 多柔比星

淀粉作为一种天然生物材料, 长期以来就是医药领域中最为常用的药物填充剂 [1-3]. 近年来发现淀粉经过物理或化学变性还可以获得更多的特性, 可以作为药物载体材料广泛应用于医药领域 [4,5]. 双醛淀粉是淀粉衍生物的一种, 通过高碘酸及其盐氧化淀粉得到. 淀粉中的葡萄糖单元在高碘酸作用下, C2, C3 处的相邻羟基氧化开环形成二醛. 双醛淀粉不仅具有与淀粉相似的生物相容性和可生物降解等特点, 还具有较强的化学活性, 可以与醇类、胺类、酸类、胺类、亚胺类等物质进行反应, 所以在医药领域的应用更为广泛 [6-9]. 但是将双醛淀粉大分子制备到纳米尺度且用于药物载体的研究尚未见报道.

多柔比星是常用的抗代谢抗肿瘤药物, 被广泛应用于各种恶性肿瘤的治疗 [10], 但是毒副作用很大, 限制了其在肿瘤治疗中的应用. 为了提高多柔比星的疗效, 同时降低其毒副作用, 可以将其结合到各种天然或合成的高分子聚合物上, 制成各种聚合物载药微粒, 以达到靶向传输和持续缓慢释放的目的 [11,12].

本文用反相微乳法和交联法, 用高碘酸钠氧化淀粉, 研究制备了双醛淀粉纳米颗粒, 并对其化学结构特征、颗粒特性、稳定性及生物毒性进行了探讨. 在此基础上, 以抗肿瘤药物多柔比星为模式药物结合到颗粒上, 制备了稳定的载药纳米颗粒, 并对载药

颗粒进行了药物释放和体外抗乳腺癌细胞活性的检测, 结果显示双醛淀粉纳米颗粒对多柔比星具有明显的缓释效果, 并明显增强了药物的抗肿瘤活性的效果.

1 材料与方法

() 试剂与仪器. 可溶性淀粉(Starch, St), 高碘酸钠(NaIO_4)均购自中国医药(集团)上海化学试剂公司, 盐酸多柔比星(Doxorubicin-HCl, DOX)购自 Sigma 公司, 甲苯等其他试剂均为国产分析纯. 乳腺癌细胞 MCF-7, 本实验室提供.

JSM-5600LV 型扫描电子显微镜(日本 JEOL 公司), Spectrum 2000 型红外光谱仪(美国 Perkin-Elmer 公司), UV-1600 型紫外可见分光光度计(北京瑞利公司), Bio-Rad680 酶标仪(美国 Bio-Rad 公司), SDT2960 Simultaneous DSC-TGA 型同步热重及差热分析仪(美国 TA Instruments 公司), 19HW-1 型恒温磁力搅拌器(中国江苏).

() 双醛淀粉纳米颗粒的制备. 称取 1 g 可溶性淀粉配成 10% 的水溶液, 沸水浴中加热水解, 直到溶液澄清, 室温放置冷却. 量取甲苯和氯仿以 3:1 的体积比混合, 加入占总体积 2% 的表面活性剂 Span80, 以 1000 r/min 的速度搅拌混匀, 形成油相. 取淀粉水解液加入油相中($V_{\text{油}}/V_{\text{水}} = 20/1$), 继续搅拌一定时间

至形成微小的乳液. 加入占淀粉质量 70% 的高碘酸钠的水溶液, 继续搅拌反应 1.5 h, 加入占淀粉质量 0.05% 的交联剂 POCl_3 , 继续搅拌反应 40 min. 用乙醇破乳, 离心, 再用稀盐酸溶液洗涤, 离心去上清液, 然后用丙酮与水交替洗涤离心, 用 AgNO_3 溶液检验无白色沉淀即可, 沉淀冷冻干燥, 得白色粉末状固体.

() 双醛淀粉纳米颗粒(DASNP)的醛基含量分析. 采用文献 [14] 的“碱消耗法”并略做修改, 检测氧化反应产物中双醛的含量. 准确称取上述制备的颗粒 30~35 mg, 置于 150 mL 锥形瓶中, 精确移入 0.1 mol/L 的 NaOH 标准溶液 10 mL, 用水浴加热至 70~73

使样品反应完全, 冷却至室温, 再准确移入 0.1 mol/L H_2SO_4 溶液 5 mL, 以酚酞为指示剂, 用 NaOH 标准溶液滴定, 双醛含量按下式计算:

$$\text{氧化度} = (C_1V_1 - 2C_2V_2) / (m/161) \times 100\%, \quad (1)$$

其中 C_1 为 NaOH 浓度(mol/L), V_1 为使用 NaOH 的体积(L); C_2 为 H_2SO_4 浓度(mol/L), V_2 为使用 H_2SO_4 的体积(L), m 为被测双醛淀粉的质量(g), 161 为双醛淀粉单体的分子量.

() DASNP 的红外光谱检测. 将冷冻干燥的颗粒用 KBr 压片, 红外光谱检测其化学结构.

() DASNP 的扫描电子显微镜检测. DASNP 悬浮在丙酮中, 超声分散, 滴于自制小玻片上, 白炽灯照射干燥, 扫描电子显微镜检测颗粒形态、大小和分布.

() DASNP 的热分析. 将制备的双醛淀粉纳米颗粒及对照淀粉做差热分析, 检测热稳定性. 其中, 对照淀粉分别为同条件下制备的淀粉纳米颗粒 [13] 和水溶液中制备的双醛淀粉 [14].

() MTT 法检测 DASNP 的生物毒性. 将制备的颗粒溶于双蒸水中, 过滤灭菌. 选对数生长期的乳腺癌细胞, 用 0.25% 胰蛋白酶消化, 以 1×10^4 个细胞/孔的密度接种于细胞 96 孔板内, 加入 90 μL 的完全培养基, 在 37 $^\circ\text{C}$, 5% CO_2 , 饱和湿度的培养箱中培养 24 h. 加入 DASNP, 使终浓度分别为 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 mg/mL, 在培养箱中继续培养 24 h, 用 MTT 法检测细胞的致死率, 以淀粉为对照.

() DASNP 装载抗癌药物多柔比星(DOX). 配制 DOX 母液的浓度为 1.0 mg/mL, 各取 1 mL DOX 母液, 分别加入 5.0, 10.0, 15.0, 30.0 mg DASNP, 加盖密封, 置于振荡培养箱中, 25 $^\circ\text{C}$ 下以 100 r/min 的速

度振荡反应 4 h, 4000 r/min 离心取上清液, 保存待测. 沉淀用无水乙醇洗涤数次, 至上清液无色澄清, 将得到的产物冷冻干燥, 保存待检.

() 载药率和包封率的检测. 取()节中的上清液稀释, 用紫外可见分光光度仪于 480 nm 处检测 DOX 的吸光度, 经计算得到 DOX-DASNP 的载药量和包封率. 在常温下, 将纯 DOX 溶于双蒸馏水中并稀释成梯度浓度测其吸光度, 得到标准曲线 $C = (A - 0.012) / 19.832 (r = 0.9996)$.

$$\text{载药率} = \text{药物结合量} / \text{加入载体量} \times 100\%,$$

$$\text{包封率} = \text{载药颗粒上的药物量} / \text{实际投药量} \times 100\%.$$

() 药物释放. 30 mg 载药 DOX-DASNP 复合物溶于 PBS(pH 7.4) 中, 装于透析袋内, 25 mL PBS (pH 7.4) 为透析液, 于 37 $^\circ\text{C}$ 下透析释放, 100 r/min 振荡, 每隔一段时间取 3 mL 并加入相同体积的 PBS 以维持透析液体积. 用紫外可见分光光度仪检测透析液中 DOX 的量, 检测波长为 480 nm, 以纯 DOX 的 PBS 溶液做标准曲线. 以纯 DOX 及普通淀粉载药颗粒(DOX/St)为对照.

() 载药颗粒对乳腺癌细胞的作用. 选对数生长期的乳腺癌细胞, 用 0.25% 胰蛋白酶消化, 以 1×10^4 个细胞/孔的密度接种于细胞 96 孔板内, 加入 90 μL 的完全培养基, 在 37 $^\circ\text{C}$, 5% CO_2 饱和湿度的培养箱中培养 24 h. 在培养基中加入总体积为 10 μL (无菌水溶解)、终浓度为 0.06 mg/mL 的载药颗粒, MTT 法测 4, 8, 24 h 的细胞致死率. 以载药颗粒中相同量的 DOX 作为对照.

2 结果与讨论

2.1 双醛淀粉反应原理

天然淀粉在 pH 3~5 的 W/O 微乳体系中先被高碘酸钠氧化成双醛淀粉, 然后经 POCl_3 交联得到双醛淀粉纳米颗粒, 反应原理如图 1(a) 所示.

2.2 醛基含量分析结果

用“碱消耗法”检测制备得到的产物, 由(1)式计算得到该产品的氧化度为 $(50 \pm 5)\%$. 由文献 [15] 知, 氧化度越高, 颗粒硬度越大, 溶解性越差, 而氧化度太低则无法为反应提供足够的醛基基团. 本文产物氧化度适中, 具有药物载体所需的理想的醛基含量.

2.3 DASNP 的红外光谱检测

由图 2 可见, DASNP 的红外图上出现了醛基的特征峰: $-\text{CHO}$ 中 $\nu(\text{C}=\text{O})$: 1732 cm^{-1} 及 2931, 2890 cm^{-1}

处的双峰; C—CHO 中的 C—C 单键: 1323 cm^{-1} ; —CHO 中的 C—H 单键: 779 cm^{-1} , 说明实验氧化得到了双醛淀粉. 以本实验室制备的淀粉纳米颗粒 [13] 为对照.

2.4 DASNP 的扫描电子显微镜检测结果

图 3 是 DASNP 的扫描电子显微镜图. 由图 3 可知, 制备的颗粒大小均匀, 形状圆润, 平均粒径约为 100 nm, 分散性好.

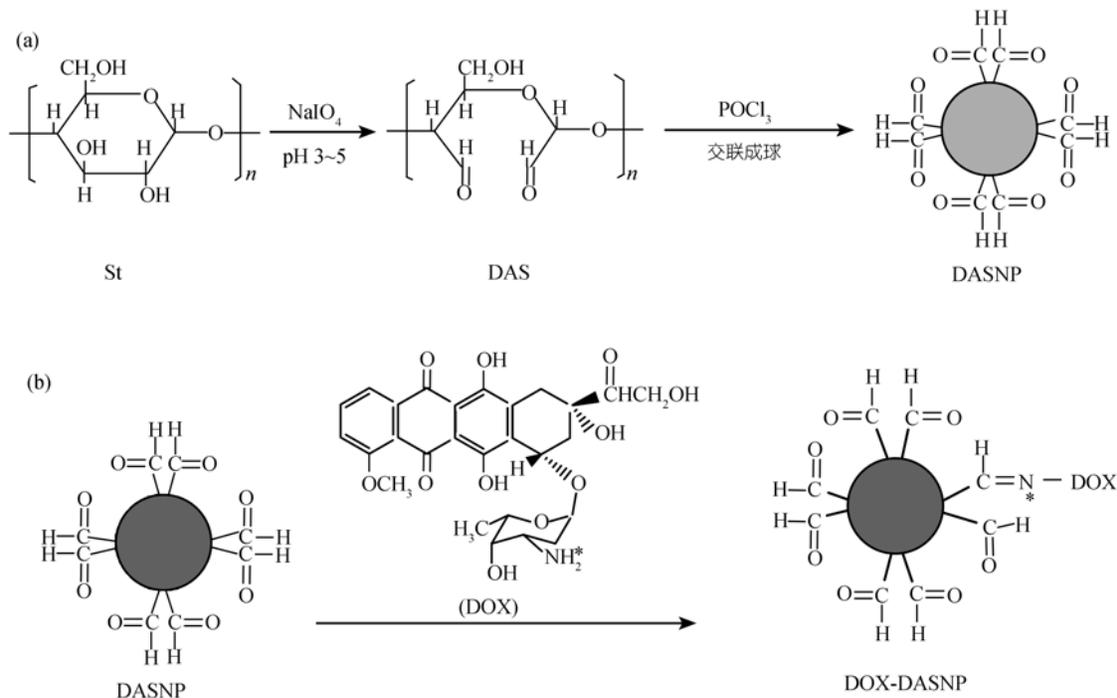


图 1 双醛淀粉纳米颗粒及其装载多柔比星的反应原理图

(a) 双醛淀粉纳米颗粒(DASNP); (b) 载药颗粒 DOX-DASNP

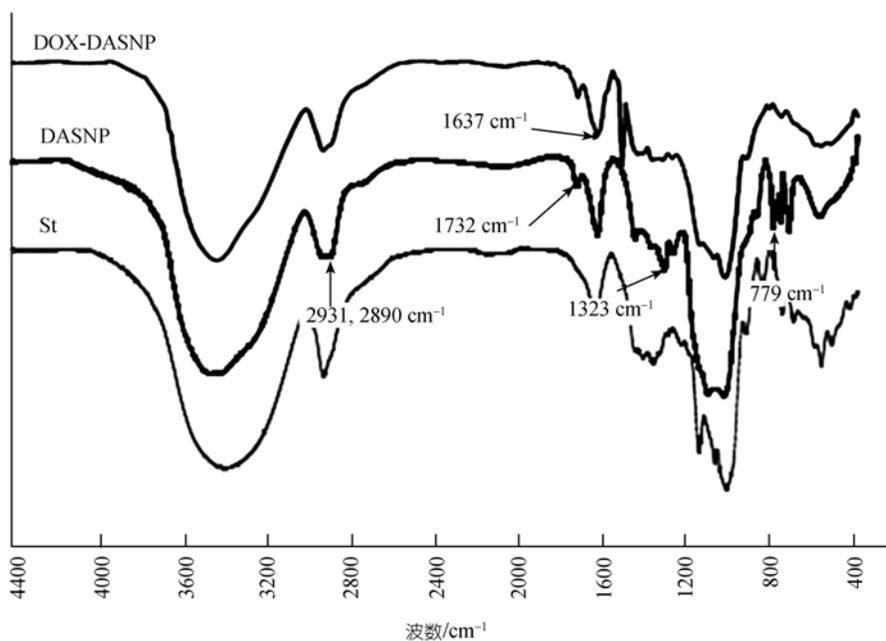


图 2 红外光谱检测图

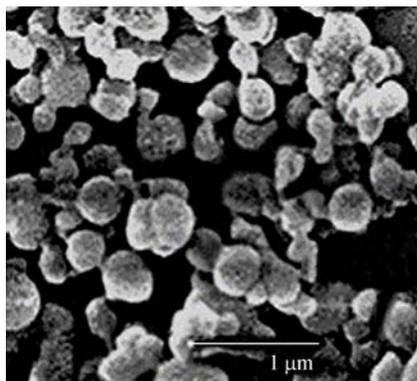


图3 DASNP的扫描电子显微镜图

2.5 DASNP的热分析结果

如图4(a)所示, StNP, DAS 分别在 75.13, 71.46 时出现第一次失重平台, 失重率为 13.56%和 13.8%; 第二次失重平台分别在 238.10 和 255.38 , 总失重率为 59.85%和 72.09%, 而 DASNP 的两次失重平台和失重率分别为 93.98 , 7.24%; 241.89 , 67.83%. 在图4(b)的差热分析曲线(DTA)中也可以在相应位置找到典型的吸热峰. 由此可知, DASNP 在一定温度范围内物质分解温度延后, 热稳定性有很大提高.

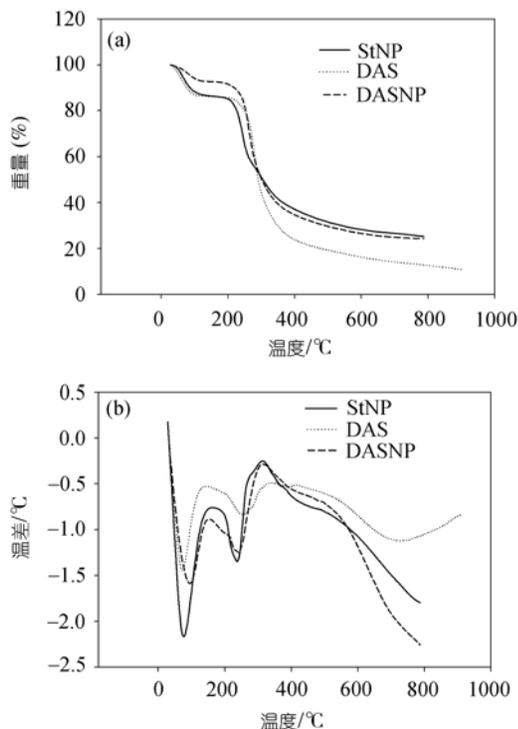


图4 DASNP的热重-差热分析图
(a) TGA 检测图; (b) DTA 检测图

2.6 DASNP 生物毒性检测结果

DASNP 的体外细胞毒性实验结果如图5所示, 当DASNP在培养基中的浓度为0.05 mg/mL时, 细胞致死率接近0, 可见DASNP在低浓度时几乎无生物毒性. 当浓度增加到0.1 mg/mL时, 细胞致死率为8%, 与作为对照的淀粉的致死率接近(6%), 而浓度为0.5 mg/mL时, 颗粒的致死率为15%, 淀粉的致死率也有上升(11%). 由此可见, 所制备的颗粒细胞毒性与天然淀粉的细胞毒性相当, 在一定浓度范围内其毒性低, 为一种低毒性的天然生物材料. DASNP的低毒性为其作为药物载体的广泛应用提供了有力的保障.

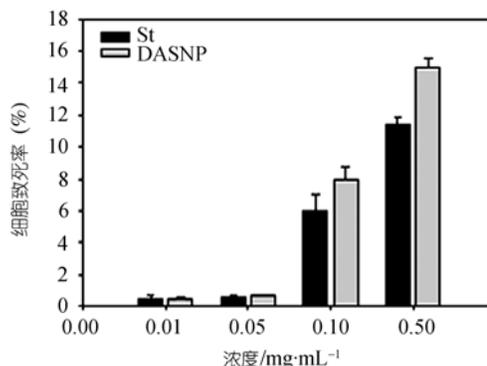


图5 DASNP的生物毒性检测结果
误差棒由标准误差S得到, 其中n=3

2.7 DASNP 装载抗癌药物多柔比星

DASNP 中的醛基与 DOX 中一级胺结构发生亲核加成反应生成 Schiff 碱结构原理图由图1(b)所示. 在图2的红外谱图中, 在 1637 cm⁻¹ 处出现较强的 C=N 伸缩振动带, 且峰尖而窄, 说明生成了 Schiff 碱, 药物成功地化学结合到载体上.

2.8 载药率和包封率的检测

利用标准曲线计算载药颗粒的载药率和包封率, 结果如表1所示. 可知, 反应物质量比w(DOX):w(DASNP)对载药率和包封率有很大的影响: 当药物量一定, 载体(DASNP)的量较低(1:5)时, 载药率较高(3.98 ± 0.19), 推测为反应物浓度较低且游离的药物量相对较大, 使药物与载体结合比较容易; 当DASNP量不断升高, 载药量呈先变小后变大后又变小的趋势, 推测为反应液中载体浓度和药物相对浓度及反应的空间位阻的变化协同影响所致. 载药率达到最

高时的最适反应物质量比为 1:15, 此时的包封率为 (31.7±1.2)%, 载药率达到(4.83±0.36)%, 显著高于普通淀粉纳米药物载体的载药率 [16], 表明双醛淀粉纳米颗粒具有更优良的载药特性. 以下实验均选用最适反应物质量比制备的载药颗粒.

表 1 DASNP 装载抗癌药物多柔比星结果^{a)}

w(DOX):w(DASNP)	载药率(%)	包封率(%)
1.0:5.0	3.98±0.19	11.2±1.0
1.0:10.0	3.52±0.23	19.3±1.1
1.0:15.0	4.83±0.36	31.7±1.2
1.0:30.0	4.48±0.20	56.5±2.3

a) $n = 3, \bar{x} \pm S$

2.9 载药颗粒 DOX-DASNP 中 DOX 的释放

上述制备的载药颗粒 DOX-DASNP 在 PBS(pH 7.4)中经透析释放, 紫外分光光度法测定不同时间取出的渗析液中 DOX 的含量, 结果如图 6 显示, 药物在开始 1 h 内释放的速度较快, 出现突释现象, 在后一段时间(2~27.5 h)药物呈缓慢的释放, 24 h 周期内药物总释放率近 40%; 而对照纯 DOX 在 4 h 内就释放 80% 以上, 以普通淀粉为载体形成的物理包附的 DOX/St 在 27.5 h 内释放近 80%, 比由化学结合为主的 DOX-DASNP 快近一倍, 可见, DOX-DASNP 对 DOX 具有显著的缓释药物的效果. 其中突释现象的出现可能为物理吸附在 DASNP 表面的 DOX 先行释放, 进行的是非特异性释放, 而其显著的缓释效果推测为 DOX-DASNP 中相对稳定的席夫碱结构, 通过载体 DASNP 在 PBS 中的自身降解, 从而以一定速率缓慢释放出 DOX 药物, 提高药物的生物利用度, 降低药物的毒副作用.

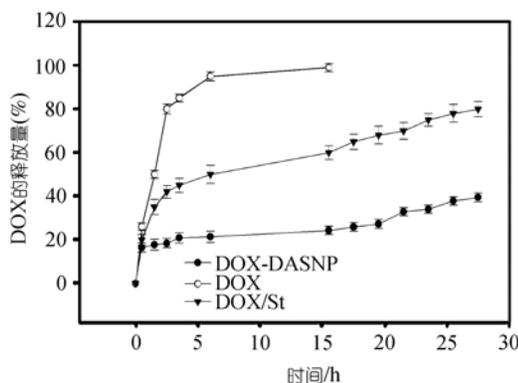


图 6 载药颗粒中 DOX 的释放曲线
误差棒由标准误差 S 得到, 其中 $n = 3$

2.10 载药颗粒 DOX-DASNP 对乳腺癌细胞的作用

将载药颗粒与细胞共培养, 检测不同时间段肿瘤细胞的致死情况, 结果如图 7 所示. 4 h 时, 载药颗粒释放药物少, 对细胞影响不大, 而纯药物对细胞有 4.7% 的致死率; 当 8 h 时载药颗粒与 DOX 差别不大, 细胞致死率都在 7%~10%; 但 24 h 时, 载药颗粒对细胞的影响超过单纯药物的影响, 细胞致死率分别为 20.0% 和 17.0%. 可知, DOX-DASNP 载体 DASNP 对药物 DOX 的缓释作用, 保持了 DOX 在细胞培养液中的浓度, 提高了药物与细胞的相互作用时间, 从而提高了药物对细胞的作用效果.

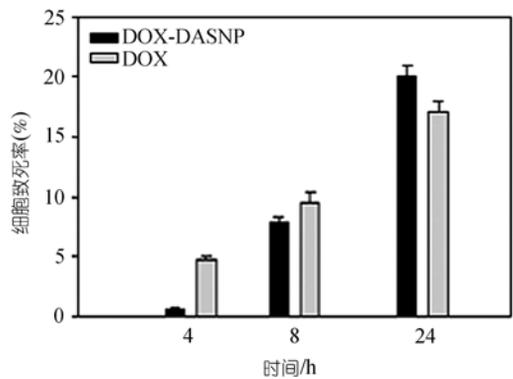


图 7 DOX-DASNP 和 DOX 对 MCF-7 细胞的抑制率关系图
误差棒由标准误差 S 得到, 其中 $n = 3$

3 结论

在我们建立的以淀粉纳米颗粒为药物载体的研究基础上, 对淀粉纳米颗粒进行了化学改性, 引入具有强化学活性的双醛基团, 成功制备了双醛淀粉纳米颗粒. 该纳米颗粒热稳定性好, 生物毒性低, 能通过与药物多柔比星的物理吸附和化学键结合作用, 解决普通淀粉纳米颗粒载药率低的难题; 并利用双醛淀粉纳米颗粒载体的降解释放药物, 延长了药物的释放时间, 最终显著提高了药物的缓释效果. 结果表明所制备的双醛淀粉纳米颗粒是一种有潜力的抗癌药物载体.

以往的研究发现, 颗粒越大其载药量越大, 药物的释放则相应减慢. 为此, 我们正在对所制备的 DASNP 药物的释放控制体系以及提高其抗肿瘤效果等方面开展深入的研究.

参 考 文 献

1 Wikingsson L D, Sjöholm I. Polyacryl starch microparticles as adjuvant in oral immunisation, inducing mucosal and systemic im-

- mune responses in mice. *Vaccine*, 2002, 20: 3355—3363 [\[DOI\]](#)
- 2 Pohja S, Suihko E, Vidgren M, et al. Starch acetate as a tablet matrix for sustained drug release. *J Contr Rel*, 2004, 94: 293—302 [\[DOI\]](#)
 - 3 Tuovinen L, Ruhanen E, Kinnarinen T. Starch acetate microparticles for drug delivery into retinal pigment epithelium—*in vitro* study. *J Contr Rel*, 2004, 98: 407—413 [\[DOI\]](#)
 - 4 He X, Shen B, Liu X. Production and applications on dialdehyde starch. *Chin J Bioproc Eng*, 2004, 2(3): 1—4
 - 5 Wongsagona R, Shobsngobb S, Varavinita S. Preparation and physicochemical properties of dialdehyde tapioca starch. *Starch/Stärke*, 2005, 57: 166—172 [\[DOI\]](#)
 - 6 Para A, Karolczyk-Kostuch S. Metal complexes of starch dialdehyde dithiosemicarbazone. *Carbohydr Polym*, 2002, 50: 151—158 [\[DOI\]](#)
 - 7 Tang R, Du Y, Fan L. Dialdehyde starch-crosslinked chitosan films and their antimicrobial effects. *J Polym Sci Pol Phys*, 2003, 41: 993—997 [\[DOI\]](#)
 - 8 Wang H, Wei R, Shen H, et al. Study on flexible immobilized papain with dialdehyde starch. *Chin J Bioproc Eng*, 2004, 2(1): 25—29
 - 9 Onishi H, Nagai T. Characterization and evaluation of dialdehyde starch as an erodible medical polymer and a drug carrier. *J Pharm*, 1986, 30(2-3): 133—141
 - 10 Matthew B W, John W B. The anti-cancer drug, doxorubicin, causes oxidant stress-induced endothelial dysfunction. *BBA-Gen Subjects*, 2006, 1760(2): 267—271
 - 11 Hee D H, Byung C S, Ho S C, et al. Doxorubicin-encapsulated thermosensitive liposomes modified with poly(*N*-isopropylacrylamide-*co*-acrylamide): Drug release behavior and stability in the presence of serum. *Eur J Pharm Biophar*, 2006, 62(1): 110—116 [\[DOI\]](#)
 - 12 Azarmi S, Tao X, Chen H, et al. Formulation and cytotoxicity of doxorubicin nanoparticles carried by dry powder aerosol particles. *Int J Pharm*, 2006, 319(1-2): 155—161 [\[DOI\]](#)
 - 13 肖苏尧, 刘选明, 童春义, 等. 多聚赖氨酸淀粉纳米颗粒基因载体的研制及应用. *中国科学 B 辑: 化学*, 2004, 34(6): 473—477
 - 14 张继武, 朱友益, 张强, 等. 玉米淀粉制备双醛淀粉的试验. *农业工程学报*, 2002, 18(3): 135—138
 - 15 Fiedorowicz M, Para A. Structural and molecular properties of dialdehyde starch. *Carbohydr Polym*, 2006, 63(3): 360—366 [\[DOI\]](#)
 - 16 肖苏尧, 童春义, 刘选明, 等. 肿瘤靶向性药物载体叶酸-淀粉纳米颗粒的研制与应用. *科学通报*, 2006, 51(10): 1151—1155