

技术方法

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000380

超顺磁性 Fe_3O_4 壳聚糖纳米粒制备影响因素的初步研究谢鸿蒙¹, 罗 聪², 贾运涛³, 黄 华¹

(1. 重庆医科大学药学院药剂学实验室, 重庆 400016; 2. 重庆医科大学附属儿童医院骨科, 重庆 400014;

3. 重庆医科大学附属儿童医院药剂科, 重庆 400014)

【摘要】目的: 制备超顺磁性 Fe_3O_4 壳聚糖纳米粒, 探究不同表面活性剂及交联剂等因素对纳米粒形成及其理化性质的影响。方法: 化学共沉淀法制备纳米粒, 激光粒度仪检测其粒径大小、聚合物分散指数 (polydispersity index, PDI)、zeta 电位, 振动样品磁强计检测其磁化强度。结果: 制备的纳米粒粒径大小在 15~60 nm 之间, 平均粒径 29.39 nm, PDI 为 0.185, zeta 电位绝对值约 20, 磁感应性良好。结论: 亲水亲油平衡值 (hydrophile lipophilic balance, HLB) 较小的表面活性剂能减小纳米粒粒径, 交联剂戊二醛用量需控制在 1.5~2.0 ml, NaOH 溶液浓度需控制在 3.0~4.0 mol/L。

【关键词】表面活性剂; 超顺磁性; 壳聚糖纳米粒; 粒径

【中图分类号】R944.1+6; R445.2

【文献标志码】A

【收稿时间】2014-03-24

Influencing factors for preparation of superparamagnetic Fe_3O_4 chitosan nanoparticleXie Hongmeng¹, Luo Cong², Jia Yuntao³, Huang Hua¹

(1. Pharmacy Laboratory, College of Pharmacy, Chongqing Medical University; 2. Department of Orthopaedics, the Children's Hospital, Chongqing Medical University; 3. Department of Pharmacy, the Children's Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To prepare superparamagnetic Fe_3O_4 chitosan nanoparticle and to explore the effects of different surfactants and crosslinkers on prepared nanoparticles. Methods: The nanoparticle was prepared by chemical co-precipitation method. The size, polydispersity index and zeta potential was detected by Zetasizer Nano. The magnetization intensity was detected by vibration sample magnetometer. Results: The size of the nanoparticle ranged from 15 nm to 60 nm, with an average size of 29.39 nm. Polydispersity index was 0.185 and the absolute value of zeta potential of the nanoparticle was approximately 20. Magnetic induction was very well. Conclusion: The surfactants with low hydrophile lipophilic balance value can reduce the size of nanoparticle. Glutaraldehyde dosage should be controlled between 1.5 ml and 2.0 ml. Concentration of NaOH solution should be controlled between 3.0 mol/L and 4.0 mol/L.

【Key words】surfactant; superparamagnetic; chitosan nanoparticle; size

纳米药物载体是靶向药物输送和药物可控释放给药系统中的一种, 主要包括纳米粒、脂质体、高分子聚合胶束等, 其中超顺磁性四氧化三铁 (Fe_3O_4) 纳米粒能在外加磁场作用下定向、高效的靶向滞留, 被认为是一种理想的药物载体^[1-2], 广泛用于基因传递、肿瘤靶向治疗、MRI 造影剂应用等领域^[3-4]。但目

前应用的纳米粒中, 油酸钠纳米粒毒性较大, SiO_2 纳米粒易造成矽肺纤维化^[5], 葡聚糖磁性纳米粒易被 RES 吞噬, 难于实现其组织的靶向给药^[6]。壳聚糖是一种生物相容性良好的直链多糖, 安全有效, 同时对生物膜有很强黏附作用, 应用广泛, 纳米化的壳聚糖甚至具有增加药物靶向性、缓释作用, 提高药物生物学功能等新的物理化学特性^[7]。已有研究报道, 超顺磁性 Fe_3O_4 壳聚糖纳米粒 (superparamagnetic Fe_3O_4 chitosan nanoparticle, SPFCN) 可以延长粒子血液循环时间, 尤其是吸附到肿瘤细胞的表面, 但其制备条件尚需深入研究^[8], 粒径小于 30 nm, 聚合物分散指数 (polydispersity index, PDI) 小于 0.2 的 SPFCN

作者介绍: 谢鸿蒙, Email: ydytwy@126.com,

研究方向: 药剂学。

通信作者: 黄 华, Email: huangh6001@163.com。

基金项目: 重庆市科委自然科学基金计划资助项目 (编号: cstc2011ggB1004); 重庆市卫生局面上项目 (渝卫科教[2012]33 号-2012-2-113)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000380.html>

符合超小型超顺磁氧化铁粒子标准,不易被吞噬细胞摄取,在血管中停留时间更长^[9]。

本实验通过制备 SPFCN,以 SPFCN 粒径为主要考察指标,同时考察 PDI、zeta 电位、磁感应性、纳米粒形态等指标,对影响 SPFCN 形成及理化性质的因素(壳聚糖的比例、表面活性剂的种类和用量、交联剂的用量、NaOH 溶液浓度和搅拌速率)进行初步探究,为后续进一步研究超顺磁性纳米药物及其在肿瘤靶向治疗和造影剂的应用奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

壳聚糖(青岛市桓台县金湖甲壳制品公司)(食品级-1万单位),F68(sigma),NaOH 溶液、硫酸铁铵、硫酸亚铁铵、吐温 80、司盘 80、SiO₂、戊二醛等均为国产分析纯。Scientz-III 超声波细胞粉碎仪(成都市生科仪器有限责任公司),AR1140 电子天平(美国奥豪斯),恒速搅拌机,hh-2k1 智能水浴(巩义市予华仪器有限责任公司),2KA RW20 Digital 数显型实验搅拌机(广东仪科实验室技术有限公司),Zetasizer Nano ZS90 激光粒度仪(英国马尔文公司),Hitachi-7500 透射电镜(日本日立公司),HH-15 振动样品磁强计(南京大学仪器厂)。

1.2 实验方法

1.2.1 SPFCN 的制备 共沉淀法制备 SPFCN:将 18.8 g 硫酸亚铁铵与 38.8 g 硫酸铁铵混合,溶于 200 ml 壳聚糖溶液中(硫酸亚铁铵与硫酸铁铵摩尔比为 1:2),加入 2~18 ml 表面活性剂,配制成 A 液;将 A 液移入 500 ml 三颈烧瓶中,通入氮气保护,快速搅拌(转速 500~1 200 r/min)A 液并加热至 45℃。配制 150~200 ml 一定浓度 NaOH 溶液成 B 液;将 B 液缓慢滴入 A 液,滴毕后继续加热混合液至 85℃水浴保持 30~40 min,加入适量戊二醛,再搅拌 30 min 即得 SPFCN 混悬液,装入烧杯中。用自制 3000 GS 外磁场置于烧杯下方,一定时间后弃去上层澄清液,得黑色胶状沉淀,再用蒸馏水洗涤,重复洗涤数次至溶液 pH 为 7~8,取中层混悬液密闭保存。

1.2.2 单因素考察 以粒径为主要考察指标,同时考察 PDI、zeta 电位、磁感应性、纳米粒形态等指标,对影响 SPFCN 形成的因素[壳聚糖的比例、不同亲水亲油平衡值(hydrophilic lipophilic balance,HLB)的表面活性剂及其用量、交联剂的用量、NaOH 溶液浓度和搅拌速率]进行研究。

1.2.3 SPFCN 的形态观察 取适量 SPFCN 混悬液,用超声细胞粉碎仪超声 60 s,于 Hitachi-7500 透射电镜 120 000 倍镜下观察。

1.2.4 SPFCN 的粒径、PDI 与 zeta 测定 取适量 SPFCN 混悬液加三蒸水稀释,超声 60 s,Zetasizer Nano ZS90 激光粒度仪中测定 SPFCN 粒径、PDI 及 Zeta 电位值。

1.2.5 SPFCN 的磁感应性测定 取适量 SPFCN 混悬液,冻干得干粉。于 HH-15 振动样品磁场计中,磁场计从零逐渐加大磁场强度至 1 T,检测 SPFCN 饱和磁化强度和剩余磁化强度等相关磁感应指标。

2 结果

2.1 单因素考察

2.1.1 壳聚糖比例对 SPFCN 粒径及 PDI 的影响 配制壳聚糖比例为 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、1%、2%的溶液,分别与表面活性剂、硫酸亚铁铵与硫酸铁铵混合,配制成 A 液,按 1.2.1 的方法制备 7 份 SPFCN,重复 3 次,以考察壳聚糖比例对 SPFCN 粒径及 PDI 的影响。由图 1 可见,随着 SPFCN 中壳聚糖比例增加,PDI 增大;粒径在一定范围内减小后迅速增大,故应控制壳聚糖比例在 0.2%~0.5%。

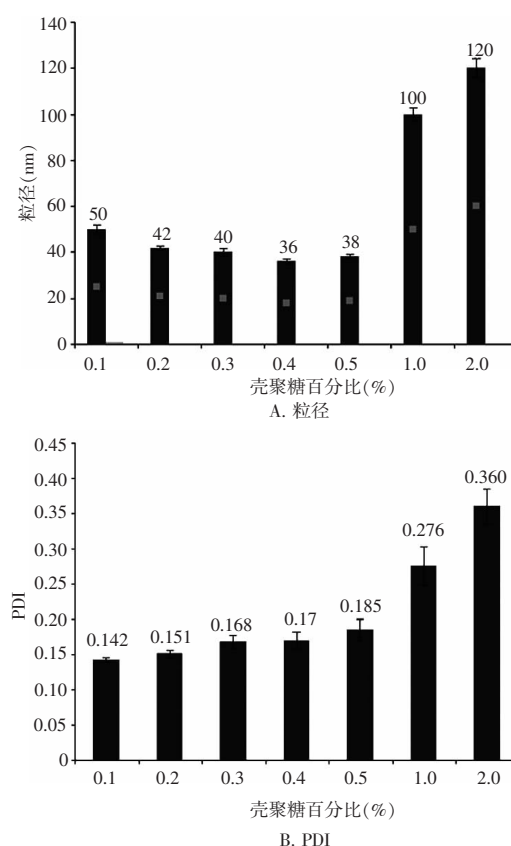


图 1 壳聚糖比例对粒径及 PDI 值的影响

Fig.1 Effect of SPFCN proportion on particle size and PDI

2.1.2 表面活性剂的种类对 SPFCN 粒径及 PDI 的影响 按 1.2.1 的方法制备 5 份 SPFCN,其中各份 A 液加入的表面活性剂分别为司盘 85(HLB 值 1.8)、司盘 80(HLB 值 4.3)、司盘 80 与吐温 80 的混合液(1:1,V/V,HLB 值 10)、吐温 80(HLB 值 15)和 F68(HLB 值 29),用量均为 3 ml,重复 3 次,以考察表面活性剂的种类对 SPFCN 粒径及 PDI 的影响。由图 2 可见,随着表面活性剂 HLB 值的增大,SPFCN 粒径增大,PDI 有增大趋势,故表面活性剂初步选择司盘 80 和司盘 85。

2.1.3 表面活性剂的用量对 SPFCN 粒径及 PDI 的影响 按 1.2.1 的方法制备 12 份 SPFCN,其中各份的 A 液中分别加入 1%、3%、5%、7%、9%、11%的司盘 80 或司盘 85,重复 3 次,以考察表面活性剂用量对 SPFCN 粒径及 PDI 的影响。由图 3 可见,司盘 80 和司盘 85 的用量在一定范围内增大,SPFCN

粒径减小,而 PDI 值变化不大。由于司盘 85 组 SPFCN 的 PDI 值普遍大于司盘 80 组,故选择司盘 80,用量为 9%。

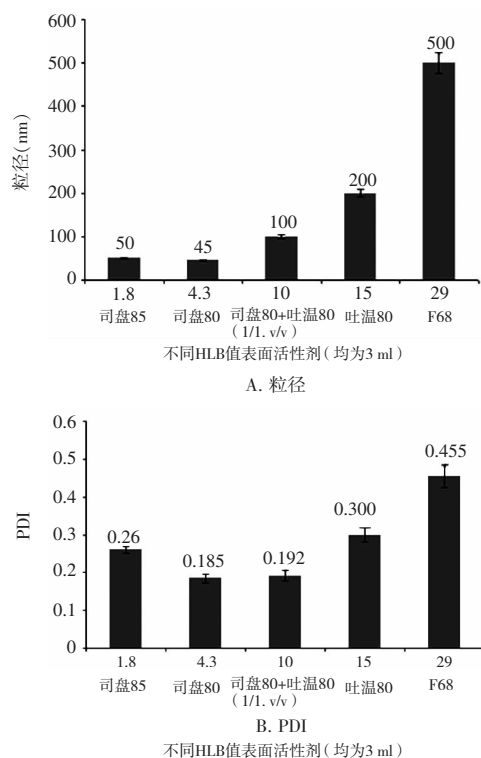


图2 表面活性剂的种类对 SPFCN 粒径及 PDI 的影响

Fig.2 Effect of different surfactants on particle size and PDI of

SPFCN

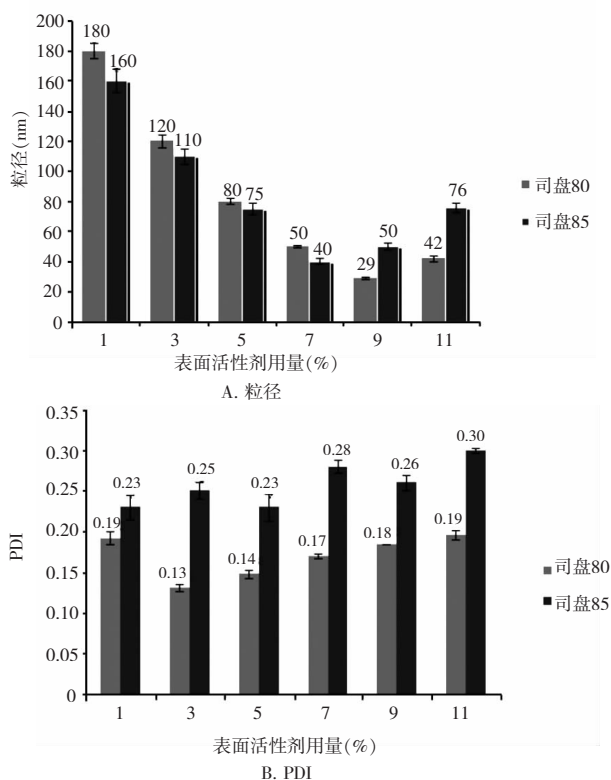


图3 司盘 80 和司盘 85 的用量对粒径及 PDI 的影响

Fig.3 Effect of dosage of Span 80 and Span 85 on particle size and PDI

2.1.4 交联剂戊二醛的用量对 SPFCN 粒径的影响 按 1.2.1 的方法制备 6 份 SPFCN, 各份加入交联剂戊二醛的用量分别为 0、0.5、1、1.5、2、2.5 ml, 重复 3 次。由图 4 可见, 随着戊二醛用量的增加, SPFCN 粒径在一定范围内减小, 故戊二醛用量需控制在 1.5~2.0 ml 之间。

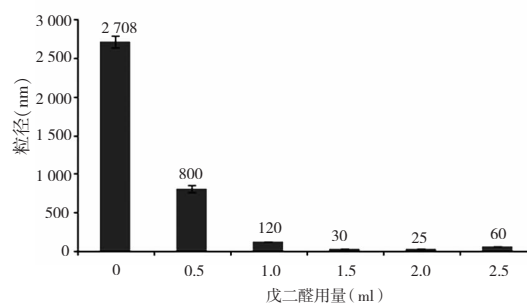


图4 戊二醛的用量对 SPFCN 粒径的影响

Fig.4 Effect of glutaraldehyde dosage on particle size

2.1.5 NaOH 溶液浓度对 SPFCN 粒径及磁感应性的影响 按 1.2.1 的方法制备 5 份 SPFCN, 其中各份 B 液中的 NaOH 溶液浓度分别为 2、3、4、5、6 mol/L, 重复 3 次。由图 5 可见, NaOH 溶液浓度过低时 SPFCN 磁感应性很低; NaOH 溶液浓度过高, SPFCN 粒径过大。故 NaOH 溶液浓度范围应在 3.0~4.0 mol/L 之间。

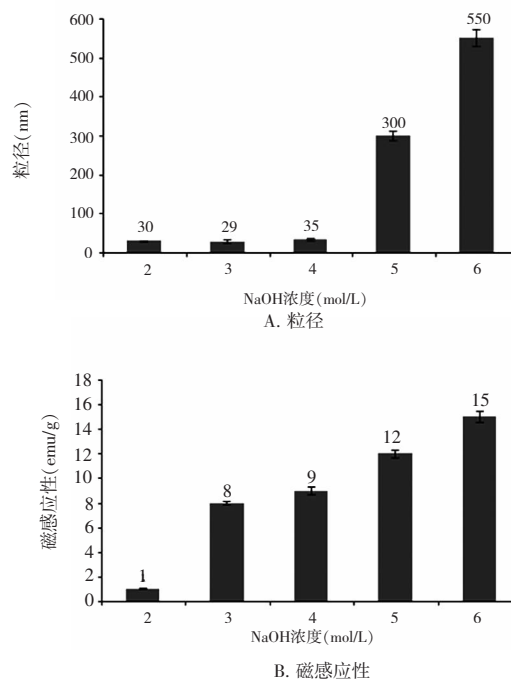


图5 NaOH 溶液的浓度对粒径及其磁感应性的影响

Fig.5 Effect of NaOH solution concentration on particle size and magnetic induction

2.1.6 搅拌速度对 SPFCN 粒径及 PDI 的影响 按 1.2.1 的方法制备 4 份 SPFCN, 搅拌转速分别为 500、800、1 000、1200 r/min, 重复 3 次。由图 6 可见, 随着转速的增大, SPFCN 粒径

和 PDI 值减小;转速 1 000 r/min 以上,粒径和 PDI 结果改变不大,因此转速初步选择 1 000 r/min。

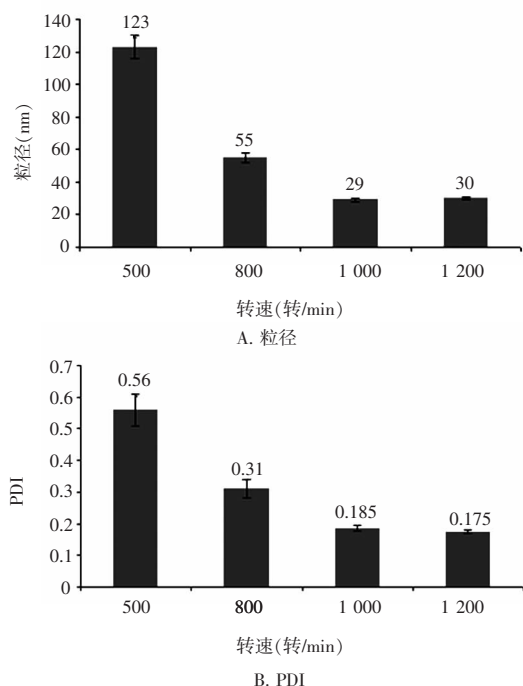


图 6 搅拌速度对粒径及 PDI 的影响

Fig.6 Effect of stirring speed on particle size and PDI

2.2 优化处方的确定

由 2.1.1~2.1.6 的单因素考察初步确定的 SPFCN 较优处方和制备工艺参数(表 1)。

表 1 单因素考察确定的较优处方和制备工艺参数

Tab.1 Better prescription and technical parameter determined by single factor investigation

因素	水平
1万单位壳聚糖	0.50%
司盘 80	9%
戊二醛	1.5~2.0 ml
NaOH 溶液浓度	3.0~4.0 mol/L
搅拌速率	1 000 r/min

2.3 SPFCN 形态、初步结构表征及磁相应

2.3.1 按 2.2 中表 1 的较优处方和制备工艺参数制备 SPFCN 3 份,对其进行形态、粒径大小、PDI、zeta 电位及磁感应性检测,并对较优处方和制备工艺参数进行验证,结果见表 2。

表 2 检测及验证结果

Tab.2 Testing and verification results

批次	粒径 (nm)	PDI	zeta 电位	饱和磁化强度 (emu/g)
1	29.39	0.185	20	8.223
2	30.01	0.152	18	7.875
3	29.15	0.192	18	8.046

2.3.2 SPFCN 的形态观察 由图 7 可见,Hitachi-7500 透射电镜 120 000 倍镜下,SPFCN 呈圆形或椭圆形,形态大小均匀,分散性良好。

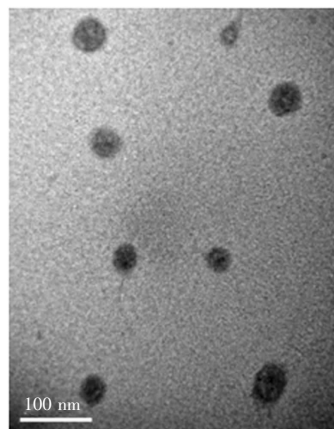


图 7 透射电镜下的 SPFCN (120 000 ×)

Fig.7 SPFCN under transmission electron microscope (120 000 ×)

2.3.3 SPFCN 的粒径、PDI 与 zeta 电位 由图 8 可见,SPFCN 平均粒径 29.39 nm,PDI 为 0.185。由图 9 可见,SPFCN 的 zeta 电位值绝对值约 20。

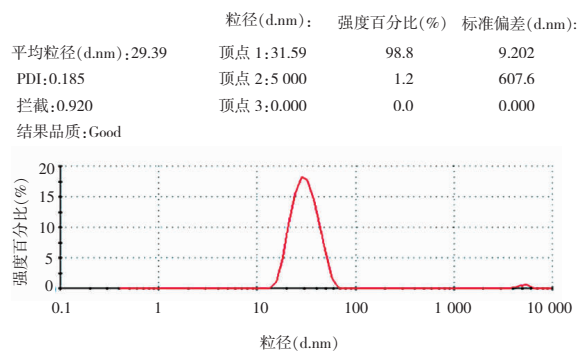


图 8 SPFCN 平均粒径与 PDI 值

Fig.8 Size and PDI of SPFCN

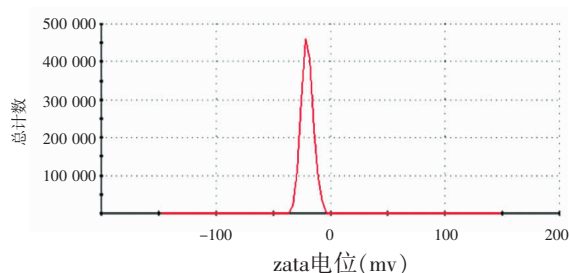


图 9 SPFCN zeta 电位

Fig.9 zeta potential of SPFCN

2.3.4 SPFCN 的磁响应 由图 10 可见,SPFCN 磁化曲线呈“S”型,当 $H \geq 1.9 \times 10^4$ Oe 后,样品达到饱和,饱和磁化强度为 8.223 emu/g;剩余磁化强度为 0.019 9 emu/g,矫顽 HC 等于 1.7 Oe。

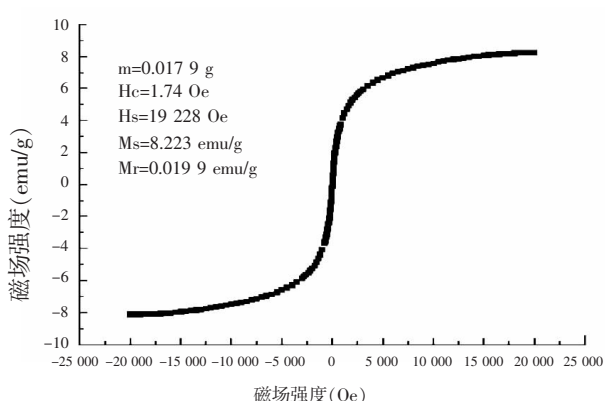


图 10 SPFCN 的磁化曲线

Fig.10 Magnetization curve of SPFCN

3 讨论

本实验成功制备 SPFCN, SPFCN 属于亲水性纳米级磁性液体, 所用材料壳聚糖安全、副作用低。通过表面活性剂将 SPFCN 均匀分散于水相中, SPFCN 既有磁性材料的磁性, 又有液体材料的流动性。SPFCN 的 zeta 电位绝对值约 20, 粒径大小在 15~60 nm 之间, 平均粒径 29.39 nm, 小于 30 nm, PDI 值 0.185。饱和磁化强度为 8.223 emu/g, 剩余磁化强度为 0.0199 emu/g, 矫顽 HC 等于 1.7 Oe, 样品剩余磁化强度和矫顽力小, 因此认为该样品具有超顺磁性, 且符合超小型超顺磁氧化铁粒子标准, 当被外磁场磁化后会具有超高饱和场, 而撤离外磁场, 纳米粒的磁性会迅速消失, 不会对人体造成伤害^[9-11]。

本实验以 SPFCN 粒径为主要考察指标, 同时考察 PDI、zeta 电位、磁感应性、纳米粒形态等指标, 对影响 SPFCN 形成及理化性质的因素(壳聚糖的比例、表面活性剂的种类和用量、交联剂的用量、NaOH 溶液浓度和搅拌速率)进行初步探究, 结果如下: (1) 随着壳聚糖比例增高, SPFCN 的 PDI 增大, 而粒径在一定范围内减小后迅速增大, 原因可能是壳聚糖在中性或碱性条件下为阳离子多糖, 一定范围内比例增大时, 与 NaOH 溶液反应而粒径减小; 但壳聚糖比例过大时, 在强碱溶液下, 易于析出, 纳米粒聚集而呈增大趋势^[12]。(2) 随着表面活性剂 HLB 值的增大, SPFCN 粒径增大, PDI 有增大趋势, 原因可能是所用 1 万单位壳聚糖水溶性较强, 而运用 HLB 值较低的司盘 80 则可增强 SPFCN 的表面活性, 从而降低了其粒径和 PDI 值; PDI 是聚合物分散指数, PDI 值越小, SPFCN 粒径分布越集中, 故选择司盘 80, 且一定范围内, SPFCN 粒径随着司盘 80 用量的增大而减小。(3) 不加入交联剂, SPFCN 易于蓄积, 结饼形

成沉淀。实验组考察了戊二醛、SiO₂ 和硬脂酸镁等交联剂, 结果表明, 硬脂酸镁对本实验影响不大, 而 SiO₂ 易造成矽肺纤维化, 故选择 1.5~2.0 ml 的戊二醛, 交联剂用量过大粒径增大的结果与文献报道^[13]一致。(4) NaOH 溶液浓度过低, 共沉淀反应不完全, 磁感应性差; 浓度过高, 纳米表面游离氨基质子化程度降低; 且局部碱性过高, 粒子稳定性下降, 粒径增大, 故 NaOH 溶液浓度宜控制在 3.0~4.0 mol/L。

实验组初步细胞毒理实验结果显示, SPFCN 较油酸钠纳米粒有较低的细胞毒性, 生物相容性更好。后续将对 SPFCN 制备的处方和工艺参数进行进一步优化, 并采用优化后的处方和工艺参数制备的样品进行动物实验, 考察 SPFCN 的毒理性质, 为进一步研究纳米粒包裹药物靶向作用于肿瘤实验及造影剂应用实验奠定基础。

参 考 文 献

- [1] Peer D, Karp JM, Hong S, et al. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy[J]. Nature Nanotechnol, 2007, 2(12): 751-760.
- [2] 张 博, 吕晓蓉, 吴树仙, 等. 国际纳米药物领域专利态势分析[J]. 科学观察, 2013, 8(3): 58-63.
- [3] 王 芳, 陆菁菁, 金征宇. 新型磁共振对比剂 USPIO 及应用研究现状[J]. 国际医学放射学杂志, 2008, 31(5): 372-375.
- [4] 谭显政, 伍 兵. USPIO 增强 MRI 应用于结直肠癌淋巴结转移的研究进展[J]. 国际医学放射学杂志, 2012, 35(5): 450-452.
- [5] 宋利海, 曹福源, 李 健. 纳米 SiO₂ 对大鼠肺氧化损伤的研究[J]. 实用临床医学杂志, 2011, 15(24): 4-6.
- [6] 徐士钊, 孙 进, 何仲贵. 抗肿瘤药物纳米粒载体材料研究进展[J]. 中国药剂学杂志, 2007, 5(3): 119-125.
- [7] Bravo-Osuna I, Ponchel G, Vauthier C. Tuning of shell and core characteristics of chitosan-decorated acrylic nanoparticles[J]. Eur J Pharm Sci, 2007, 30(2): 143-154.
- [8] 郝英魁, 杨学东. 载药壳聚糖纳米粒的研究进展[J]. 中国药杂志, 2005, 40(17): 1292-1295.
- [9] 张霖倩, 吴秋芳, 陈雪梅, 等. 超顺磁性纳米氧化铁的制备、表面修饰及其在磁共振成像造影剂方面的应用[J]. 材料导报, 2011, 25(17): 35-40.
- [10] 吴 灿, 刘传康, 罗 聪, 等. 超顺磁性硫酸链霉素 PLA-PEG 微球的制备和体外特征研究[J]. 重庆医科大学学报, 2009, 34(10): 1321-1325.
- [11] Hofmann-Amtenbrink M, Von RB, Hofmann H. Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications[M]. in: M.C. Tan. Nanos-structured Materials for Biomedical Applications (ISBH). India: ISBH, 2009: 119-143.
- [12] 林爱华, 刘奕明, 平其能. 壳聚糖纳米粒表面游离氨基与纳米粒特性研究[J]. 药学报, 2007, 42(3): 323-328.
- [13] 林爱华, 平其能. 壳聚糖载药纳米粒研究进展[J]. 中国药业, 2006, 15(21): 25-27.

(责任编辑: 唐宗顺)