文章编号: 1673-0062(2010)01-0059-05

聚阴离子电解质纳米粒子的制备及其表征

喻翠云^{1,2},程巳雪²,卓仁禧²

(1. 南华大学 药学与生命科学学院,湖南 衡阳 421001 2 武汉大学 生物医用高分子教育部重点实验室,湖北 武汉 430072)

摘 要:探索了一种新的聚阴离子电解质基 (海藻酸钠、果胶和羧甲基壳聚糖)的纳 米粒子的制备方法.该方法不涉及任何有机溶剂和表面活性剂,并且能够很好的控制 聚阴离子电解质基纳米粒子的形貌及粒径.应用扫描电镜(SEM)和透射电镜(TEM) 观测了干态纳米粒子的形貌;采用扫描电镜在低真空下以环境扫描模式(ESEM)表 征了湿态纳米粒子的形貌,利用纳米粒度仪测定了纳米粒子的粒径及其分布.结果表 明,在含有 Ca²⁺和 CO₃²⁻ 的水溶液中,聚阴离子电解质可以自 组装成形状规整且分散 性好的纳米粒子. 关键词:海藻酸钠;果胶;羧甲基壳聚糖;聚阴离子电解质:纳米粒子

中图分类号: R 318 08 文献标识码: A

Fabrication and Characterization of Nanospheres Based on Polyanionic Electrolyte

YU Cui-yun¹², CHENG Si-xue¹, ZHUO REN-xi²

(1. School of Pham acy and Life Science, University of South China, Hengyang Hunan 421001, China
2 Key Laboratory of Bim edical Polymers of Ministry of Education, Department of Chemistry,
W uhan University, W uhan, Hubei 430072, China)

Abstract A new method was developed to fabricate nanospheres based on a ginate pectin and carboxymethy l- chitosan The preparation method did not involve any organic solvent and surfactant and could offer good control over the morphology and the size of self- assemblies The morphologies of the nanospheres were observed by transmission electron microscopy (TEM) and environment scanning electron microscope The dried samples were sputter coated with gold and then observed by SEM mode, and the water- soaked samples were directly observed by ESEM mode The size and size distribution of nanospheres were measured by using a Zetasizer N ano ZS. The results demonstrated that polyanionic electrolytes can self- assembled into nanospheres in aqueous media containing Ca^{2+} and CO_3^{2-} ions.

Keywords Alginate, Pectin, Carboxymethyl- chitosan, Polyanionic electrolyte, Nanospheres

作者简介:喻翠云(1978-),湖北恩施人,南华大学药学与生命科学学院讲师,博士.主要研究方向:药物材料学和 药物分析及药物化学.

收稿日期: 2009-12-25

基金项目:国家 973基金资助项目(2005CB623903);国家自然科学基金资助项目(20774070)

生物医用高分子纳米材料,如胶束和囊泡,通 常都是通过两亲性共聚物在选择性溶剂中自组装 来制备的^[1-3].然而,该制备方法通常会涉及到有 机溶剂,而有机溶剂的存在会降低一些药物的生 物活性,加之许多有机溶剂都是有毒性的,即便是 残留的微量有机溶剂都可能导致持续的毒副作 用^[4-6].因此,本研究旨在探讨一种绿色无毒,不 涉及任何有机溶剂的制备纳米粒子的方法.

聚阴离子电解质如海藻酸钠、果胶和羧甲基 壳聚糖等,具有良好的生物相容性、生物可降解 性、pH敏感性和粘膜粘附性等诸多优点.海藻酸 钠、果胶和羧甲基壳聚糖等聚阴离子电解质均能 够结合 CaCl 中的如 Ca²⁺,形成本体凝胶^[7-8].利 用链上有大量羧基的聚阴离子电解质在低 pH 下 收缩,在高 pH 下先发生 溶胀随后溶解的特 性^[9-10],本研究以 Ca(OH)₂ 来替代凝胶化过程 中常用的 CaCl 众所周知, Ca(OH)₂ 微溶于水, 体系中存在的少量钙离子一方面可以发挥凝胶化 作用,适当的碱性环境也有助于提高聚阴离子多 糖的水溶性^[9-10].

在本研究中,利用海藻酸钠、果胶和羧甲基壳 聚糖在含有 $Ca(OH)_2$ 和 $NaHCO_3$ 的水溶液中自 组装制备聚阴离子基纳米粒子.为了考察 Ca^{2+} 在 自组装过程中的作用,特别设计了用 NaOH代替 体系中的 $Ca(OH)_2$ 的对比试验.

1 实验部分

1.1 原料及试剂

羧甲基壳聚糖 (实验室自制), 果胶 (Sign a公 司, P9135, Mw = 1. 18×10^5 g/mol 多角度激光散 射测定), 海藻酸钠 (上海国药, Mw = 2 85×10^5 g/mol 多角度激光散射测定), 碳酸氢钠 (上海国 药), 氢氧化钙 (天津科密欧有限公司). 其余试剂 均为分析纯.

1.2 纳米粒子的制备方法

方法一 (对比试验): 海藻酸钠 (0 10 g)和 5 0mL蒸馏水加入 40 mL 烧杯中, 室温下搅拌 0 5 h 55 °C 继续搅拌 0 5 h NaOH 溶液 (0 030 mol/L, 1 0mL)缓慢滴加进上述体系中,在 55 °C 继续搅拌 1 h 然后, NaHCO₃ 溶液 (0 03 mol/L, 3 0mL)缓慢滴加进上述体系中,在 55 °C 继续搅 拌 24 h 最后将上述混合物转入透析袋中, 20°C 下在 1 500 mL的蒸馏水中透析 24 h,除去多余的 无机离子, 即得样品 1; 1. 0mL)代替方法一中的 N aOH 溶液 (0. 030 m ol/L,

1.0mL),其余同上处理,即得样品2,

方法三:以果胶 (0 10 g)代替方法二中的海 藻酸钠,其余同上处理,即得样品 3,

方法四:以羧甲基壳聚糖(0 10g)代替方法 二中的海藻酸钠,其余同上处理,即得样品 4

1.3 纳米粒子的表征

将样品溶液滴在 200目超薄碳支持膜上, 然后由磷钨酸负染, 自然晾干. 通过透射电子显微镜 (JEM – 100CX II JEOL)观测聚阴离子基纳米粒子 的形貌.

通过纳米粒度仪 (Zetas izer Nano ZS M alvem Instruments)测定海藻酸钠基纳米粒子的粒径及 其分布. 在测试前, 用蒸馏水稀释样品, 以获得合适的浓度进行粒径测定.

以场发射环境扫描电子显微镜(FEIQuanta 200)分别观测干态(SEM)和湿态(ESEM)海藻酸钠纳米粒子的形貌.待溶液样品在载玻片上流延成膜得到干样后,然后喷金,最后在高真空模式下以扫描电镜(SEM)模式观测;溶液样品直接滴在铜台上在低真空模式以环境扫描模式下(ESEM)观测.

2 结果与讨论

2 1 海藻酸钠基纳米粒子的制备及表征

为了考察 Ca^{2+} 在自组装过程中的作用,设计 了对比试验 (方法一),即用 NaOH 代替体系中的 Ca(OH)₂ 由图 1(A)可知,海藻酸钠在 NaOH 溶 液和 NaH CO₃ 溶液中通过 pH 值的改变,聚集体 可以形成,但无法制备形状规整且分散效果好的 纳米粒子.这可以作如下解释:一方面,在制备过 程中,随着在蒸馏水透析的进行,体系的 pH 值从 碱性到中性,海藻酸钠分子链由伸展状态逐渐转 变为收缩状态,从而具有形成纳米粒子的趋势; Na⁺不能很好的与海藻酸钠结合,不能削弱其分 子内氢键和分子间氢键,从而导致形成的纳米粒 子分散不均匀.这说明 Ca²⁺在聚阴离子自组装过 程中发挥了不可或缺的重要作用.

海藻酸钠是由 1, 4-聚 - β - D- 甘露糖醛酸 (M 单元)和 α -L-古罗糖醛酸 (G 单元)组成的 共聚物.作为一种阴离子性多糖,海藻酸钠能够结 合 Ca²⁺.二价离子能与共聚物链上的 G 单元结 合,形成一种公认的蛋格模型^[7-8].本研究为了避 免海藻酸钠完全凝胶化而形成大块的本体凝胶,

方法二: 以 Ca(OH)₂ 溶液 (0 015 mol/L, Ca²⁺的浓度相对非常低. 众所周知, Ca(OH)₂ 微 ◎ 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House, All rights reserved. http://www.cnki.r 溶于水, 正好能够确保 Ca^{2+} 的浓度维持在 0 02M 以下. 在制备过程中, 随着 $Ca(OH)_2$ 溶液加入到 海藻酸钠溶液中, Ca^{2+} 就开始与海藻酸钠中的 G 单元配位. 而当 NaHCO3溶液加入到上述混合液 中, 游离的 CO_3^{2-} 有这样一种趋势: 通过静电作 用, 试图从海藻酸钙配合物中争夺已经配位的 Ca^{2+} , 形成 $CaCO_3$ 沉淀. 然而, 非常有趣的是, $CaCO_3$ 沉淀没有生成. 这可能有两方面的原因: (1)当 Ca^{2+} 和 CO_3^{2-} 的浓度较低的情况下不会生 成; (2)海藻酸钠是一个有效的稳定剂, 可以阻止 $CaCO_3$ 的聚集^[11]不致生成沉淀. 在碱性溶液中, 海藻酸盐链上去质子化羧基通过与 Ca^{2+} 配位, 能

够降低 – COO^{-} 基团间的静电斥力. 透析前后, 体系的 pH 值会从碱性 (高 pH 值)降低到中性 (低 pH 值). 海藻酸盐链上 Ca²⁺的富集区变得更加紧密, 随后自组装成海藻酸盐基纳米粒子的疏水内核^[9]. 根据文献, 无机成核剂, 如磷酸钙的成核现象被用来制备矿化交联的聚乳酸 – 接枝 – 聚异戊二烯胶束^[12]. 与磷酸钙发挥相同的稳定胶束的作用相似,本研究中 Ca²⁺和 CO₃²⁻的存在亦发挥着稳定海藻酸盐基自组装体的结构的作用. 因此, 在 含有 Ca(OH)₂ 和 N HCO_3 的溶液中, 由图 1(B)可以看出, 海藻酸盐可以制备出形状规则且分散性好的纳米粒子, 其粒径约为 50 nm(方法二).



图 1 利用(A)0 030M NaOH 溶液(样品 1)和 (B) 0 015 M Ca(OH)₂溶液(样品 2)制备的海藻酸盐基 纳米粒子的透射电镜照片

Fig 1 TEM images of alginate based nanospheres fabricated by (A) 0 030M NaOH (sample 1) and (B) 0 015M Ca(OH)₂ (sample 2)

通过场发射环境扫描电镜在高真空下以扫描 模式观测海藻酸盐基纳米粒子在干态的形貌;通 过场发射环境扫描电镜在低真空下以 ESEM 模式 海藻酸盐基纳米粒子在湿态的形貌;并用纳米粒 径仪分析测定海藻酸盐基纳米粒子在水溶液中的 粒径及其分布.图 2中 SEM 和 ESEM 照片分别给 出了干态纳米粒子和含水纳米粒子的图像.干态 纳米粒子和含水纳米粒子均呈现规则的球形;干 态纳米粒子(约 50 m)与含水纳米粒子(约 700 m)相比,粒径要小很多(图 2(B)中 ESEM 图像 的标尺是 20 lm,而图 2(A)中 SEM 图像的标尺 是 500 m).从 ESEM 图中得出的含水纳米粒子 的粒径(约,700,m)与从粒径分析仪中得到的结 果 (平均粒径约 700 m) (图 3)一致. 显然, 所制 备的纳米粒子有非常强的吸水性. 一旦水被除去 之后, 纳米粒子的体积会迅速收缩. 图 1(B)的 TEM 观测结果表明, 干态纳米粒子的粒径约 50 m, 这与 SEM 所得结果是一致的.

2 2 果胶基纳米粒子的制备和表征

图 4(A)给出了方法三制备果胶基纳米粒子的 TEM 照片. 作为一种聚阴离子多糖, 果胶有结合二 价阳离子 (Ca^{2+} 或 Sr^{2+})的能力. 二价阳离子能诱 导其内部链的交联, 导致联接区的形成^[13]. 为了避 免果胶完全凝胶化而形成大块凝胶, $Ca^{2+}浓度相对$ $较低. 制备过程中, 随着 <math>Ca(OH)_2$ 溶液加入到果胶

的粒径(42.700 rm)与从粒径分析仪中得到的结 $_{Pub}$ 溶液 $_{Ca}^{24}$ 将与果胶链中氧原子的配位。在碱性溶ki

液中, 果胶链上去质子化羧基通过与 Ca^{2+} 配位, 能 够降低 – COO^{-} 基团间的静电斥力. 在本研究中, 体 系的 pH 值从碱性 (高 pH 值)随着透析的进行降低 到中性 (低 pH 值); 与此相对应, 果胶链上 Ca^{2+} 的 富集区变得更加紧密, 进而自组装形成纳米粒子的 疏水内核.因此,果胶链中钙富集区域和钙缺乏区域的亲水性会大不相同,从而导致果胶基纳米粒子的形成.由图 4(A)可以看出,在含有 Ca(OH)2和 N aHCO3的溶液中,果胶自组装成形状规则且分散性好的果胶基纳米粒子.



图 2 利用 0.015M Ca(OH)₂溶液中(样品 2)制备的海藻酸钠基纳米粒子的 SEM 和 ESEM 照片 Fig 2 SEM (A) and ESEM (B) in ages of alginate based nanospheres fabricated by 0.015M Ca(OH)₂(sample 2)



- 图 3 利用 0 015M Ca(OH)₂ 溶液中(样品 2)制备的 海藻酸钠基纳米粒子的粒径分布
- Fig 3 Size distributions of alginate based nanospheres fabricated by 0. 015 M Ca(OH)₂ (sample 2)

2 3 羧甲基壳聚糖基纳米粒子的制备和表征 羧甲基壳聚糖是一种改性的聚阴离子多糖, 方法四就是利用羧甲基壳聚糖在在 Ca(OH)2 溶 液和 NaHCO3 溶液中制备纳米粒子, 见图 4(B). 在本研究中,为了避免羧甲基壳聚糖完全凝胶化 而形成大块凝胶, Ca²⁺浓度相对较低, 制备过程 中,随着 $Ca(OH)_2$ 溶液加入到果胶溶液, Ca^{2+} 将 与羧甲基壳聚糖链中氧原子的配位. 在碱性溶液 中,羧甲基壳聚糖链上去质子化羧基通过与 Ca^{2+} 配位,能够降低 – COO^{-} 基团间的静电斥力. 随着 体系透析 (在蒸馏水中)的进行,体系中 pH 值会 从碱性 (高 pH 值)降低到中性(低 pH 值);相应 地,羧甲基壳聚糖链上 Ca^{2+} 的富集区变得更加紧 密,进而自组装形成纳米粒子的疏水内核. 因此, 羧甲基壳聚糖链中钙富集区域和钙缺乏区域的亲 水性会大不相同, 从而导致自组装体羧甲基壳聚 糖纳米粒子形成. 因此, 在含有 $Ca(OH)_2$ 和 NaH- CO_3 的溶液中,由图 4(A)可以看出,羧甲基壳聚 糖能够自组装成形状规则且分散性好的羧甲基壳 聚糖基纳米粒子.

3 结论

本论文探索了聚阴离子电解质基 (海藻酸钠、果胶和羧甲基壳聚糖)在含有 Ca²⁺和 CO²⁻ 的 溶液中通过自组装制备聚阴离子电解质基纳米粒 子的新方法. 伴随体系的 _IH 值从碱性降低到中 性, 聚阴离子电解质链上 Ca²⁺ 的富集区变得更加 紧密, 随后自组装成聚阴离子基基纳米粒子的疏 水内核, 使得聚阴离子电解质链中钙富集区域和 钙缺乏区域的亲水性会大不相同,从而导致聚阴 离子电解质基纳米粒子形成.本方法不涉及任何 有机溶剂和表面活性剂,并且能够很好的控制聚 阴离子电解质基纳米粒子的形貌及粒径.通过本 方法制备出来的纳米粒子适用于药学、生物医学 工程、化学、食品保健、材料学、仿生学等各个领 域,具有广泛的应用前景和巨大的经济价值.



图 4 利用 0 015 M Ca(OH)₂溶液制备的(A)果胶(样品 3)和(B)羧甲基壳聚糖(样品 4)基纳米粒子的 TEM 照片 Fig 4 TEM inages of (A) pectin (sample 3) and (B) carboxym ethyl- chitosan(sample 4) based nanospheres fabricated by 0 015 M Ca(OH)₂

参考文献:

- D ischer D E, E isenberg A. Polymer vesicles [J]. Science 2002, 297, 967-973.
- [2] Kishimura A, Koide A, Osada K, et al Encapsulation of myoglobin in PEG ylated polyion complex vesicles made from a pair of oppositely charged block bnomers A physiologically available oxygen carrier [J]. Angew. Chem. Int Ed., 2007, 46: 6085-6088.
- [3] WeiH, YuCY, Chang C, et al Direct observation of time and temperature dependent transition from sphericalmicelles to vesicles[J]. Chem. Comm., 2008, 4598 - 4600
- [4] Yu C Y, Zhang X C, Zhou F Z, et al Sustained release of antineoplastic drugs from chitosan – reinforced alginate microparticle drug delivery systems [J]. Int J Pharm, 2008, 357: 15-21.
- [5] Yu C Y, Yin B C, Zhang W, et al Compositem icroparticle drug delivery systems based on chitosan, alginate and pectin with improved pH - sensitive drug release property[J]. Colbids Surf B: Biointerf, 2009, 68, 245 -249
- [6] Yu C Y, Jia L H, Y in B C, et al Fabrication of nanospheres and vesicles as drug carriers by self- A ssembly of alginate[J]. J Phys Chem. C, 2008, 112 16774 – 16778

- [7] Sikorski P, MoF, Skj/k-Br•kG, et al Evidence for egg - box - compatible interactions in calcium - alginate gels from fiber X - may diffraction [J]. Biomacromolecules 2007, & 2098-2103.
- [8] Li L, Fang Y, Vreeker R, et al Reexam in ing the eggbox model in calcim – alginate gels with X – ray diffraction [J]. Biomac run olecules 2007, 8 464–468.
- [9] Yu C Y, WeiH, Zhang Q, et al E ffect of Ions on the Aggregation Behavior of Natural Polymer A Iginate [J]. J Phys Chem. B, 2009, 113: 14839 - 14843.
- [10] Yu C Y, Cao H, Zhang X C, et al hybrid nanospheres and vesicles based on pectin as drug carriers[J]. Langmuir 2009, 25(19): 11720-11726
- [11] Quignard F, Cot D, Renzo F D, et al Core-shell copper hydroxide- polysaccharide composites with hierarchical macroporosity [J]. Prog. Solid State Chem, 2006 34 161-169.
- [12] Perk in K K, Tumer J L, Wooley K L, et al Fabrication of hybrid nanocapsules by calcium phosphatem ineralization of shell cross – linked polymermicelles and nanocages[J]. Nano Lett, 2005 5 1457–1461.
- [13] Isabelle B, Serge P. Molecular basis of Ca²⁺ induced gelation in alginates and pectins The egg-box model revisited [J]. Biomacromolecules 2001, 2 1089 -1096.