

人血清白蛋白对氨基化普鲁兰多糖纳米制剂的作用研究及其对纳米制剂功能的影响

房海涛¹ 井金荣² 杨列清³ 高娟⁴
山东泰邦生物制品有限公司 山东泰安 271000

摘要: **目的:** 分析在氨基化普鲁兰多糖纳米粒子制备过程中人血清白蛋白(HSA)的作用以及对纳米制剂功能产生的影响。**方法:** 通过不同氨基取代度改性普鲁兰多糖纳米粒子制备与表征实验以及不同电荷疏水改性普鲁兰多糖纳米粒子制备与HSA相互作用实验,利用红外谱表征、核磁共振氢谱、CHAP纳米粒子粒径与Zeta电位分析等,掌握HSA的具体影响情况。**结果:** 经过研究分析,CHAP纳米粒子的粒径大小维持在200nm到300nm之间具有良好的分散性指数,并且电位为正电荷,随着氨基取代度的不断增加,电荷量也会出现增长趋势。聚合物中的氨基和羧基可以确保纳米粒子能够带上不同的表面电荷,改变表面性质。将三种纳米粒子与HSA进行混合后,HSA荧光光谱保持稳定状态,但是强度出现了一定程度的减弱情况。**结论:** 在纳米药物制备的过程中,需要选择特定的纳米材料,确保纳米药剂在人体内充分发挥效力。

关键词: 人血清白蛋白;氨基化;普鲁兰多糖纳米;作用分析

Study on the effect of human serum albumin on amination Pullulan Nano preparation and its effect on the function of Nano preparation

Haitao Fang¹, Jinrong Jing², Leqing Yang³, Juan Gao⁴
Shandong Taibang Biological Products Co., Ltd. Shandong Tai'an City 271000

Abstract: **Objective:** To analyze the effect of human serum albumin (HSA) on the preparation of aminosylated Pullulan polysaccharide nanoparticles. **Methods:** The preparation and characterization experiments of pullulan polysaccharide nanoparticles modified by different degrees of amino substitution and the interaction experiments of pullulan polysaccharide nanoparticles modified by different charges with HSA were conducted. The specific effects of HSA were investigated by infrared spectroscopy, hydrogen NMR, CHAP particle size and Zeta potential analysis. **Results:** According to the analysis, the SIZE of CHAP nanoparticles maintained between 200nm and 300nm has a good dispersion index, and the potential is positive charge. With the increasing of amino substitution degree, the charge quantity will also increase. The amino and carboxyl groups in the polymer ensure that the nanoparticles can take on different surface charges, changing the surface properties. The fluorescence spectra of HSA remained stable after mixing the three nanoparticles with HSA, but the intensity of HSA decreased to a certain extent. **Conclusion:** During the preparation of nanomaterials, it is necessary to select specific nanomaterials to ensure the full effect of nanomaterials in human body.

Keywords: human serum albumin; amination; Pullulan Nano; effect analysis

通讯作者简介: 房海涛, 出生年月: 1984年2月, 籍贯: 山东省青岛市, 职称: 工程师, 学历: 本科, 邮箱: fanghaitao@chinabiologic.com, 研究方向: 血液制品分离、纯化。

前言:

在纳米制剂领域,普鲁兰多糖作为比较常用的药物载体,是出芽短梗霉发酵产生的 α -1,4-糖苷键以及 α -1,6-糖苷键水溶性粘质多糖。普鲁兰多糖作为直链多糖,聚合度在100~5000左右,分子量的大小受出芽短梗霉菌发酵的条件影响相对较大。普鲁兰多糖的溶解度相对良好,可以在体内降解。并且多糖上的羟基比较多,能够作为化学修饰位点应用。因此,在纳米药物制剂研究过程中对普鲁兰多糖作为药物载体的研究相对较多。在此次研究过程中,需要设计氨基化疏水改性普鲁兰多糖完成纳米粒子尺寸、定位和形态表征,同时要在疏水改性的普鲁兰多糖上对羧基以及氨基进行修饰^[1]。从而制备成不同电荷的纳米粒子,分析HSA以及不同电荷纳米粒子之间的相互作用,同时研究载药纳米粒子药物释放与HSA对载药前后纳米粒子功能产生的具体影响。具体研究过程如下。

1 不同氨基取代度改性普鲁兰多糖纳米粒子制备与表征实验

1.1 研究资料

在实验之前,需要完成实验药剂与实验仪器准备工作。在对普鲁兰多糖纳米粒子制备与表征的过程中,需要使用的实验药剂包括:500g分析纯胆固醇;100g分析纯丁二酸酐、4-(二普鲁兰多糖氨基)吡啶与N,N-羰基二咪唑;500ml分析纯乙二胺、无水乙醇、吡啶、二氟乙酸、四氢呋喃、二普鲁兰多糖亚砷、乙酸乙酯;90g分析纯普鲁兰多糖与自制双蒸水。需要的实验仪器包括恒温磁力搅拌器、电热恒温水浴锅、电热鼓风干燥箱、真空冷冻干燥剂、傅里叶红外光谱仪、超导核磁共振仪以及电子天平。

1.2 研究方法

1.2.1 制备实验

在实验过程中,需要取三个直径的圆底烧瓶,分别加入0.1克、0.2克、0.3克乙二胺,之后在每一个烧瓶中加入1克胆固醇疏水改性普鲁兰多糖(CHP),同时加入20毫升无水二普鲁兰多糖亚砷(DMSO)进行溶解,放置在50摄氏度的油浴锅内进行搅拌;反应48小时后,倒入烧杯,烧杯中要加入200毫升乙醇;析出白色结晶后进行抽滤,获取白色偏硬的固体之后,将这一固体放入到烧杯后,加入20毫升蒸馏水进行搅拌溶解;过滤后将溶液放置在透析袋内,利用双氧水溶液透析24小时一直到DMSO味道消失,将表面皿放置在冰箱内,全部凝固后,放置在冻干机中进行冷冻干燥处理,可以获取三种白色泡沫样的固体,达标不同取代度的氨基化疏水改性

普鲁兰多糖制备完成。完成不同取代度氨基化疏水改性普鲁兰多糖制备作业后,需要根据三种纳米粒子进行实验操作,分别取三种不同取代度的氨基化疏水改性普鲁兰多糖0.3克,利用DMSO进行溶解,完全溶解后转入到透析袋内,在烧杯中装加入1000毫升双蒸馏水后,开展透析作业,每隔一小时换一次水,透析48小时后,无水二普鲁兰多糖亚砷味道完全消失,可以获取氨基化疏水改性普鲁兰多糖纳米粒子。

1.2.2 表征实验

在表征研究过程中,需要从以下角度出发:①红外光谱表征。主要取少量固体琥珀酸酐胆甾醇酯(CHS)、胆甾醇疏水改性普鲁兰多糖(CHP)与氨基化胆甾醇疏水改性普鲁兰多糖(CHAP)。三种样品与干燥的溴化钾粉末进行混合研细后,将其压成透明的样品溴化钾片。利用红外光谱仪在500~4000 cm^{-1} 的范围内完成扫描,获取红外图谱。②核磁共振氢谱表征。在研究中需要将制备的CHS、CHP、CHAP放置在氘代DMSO中进行溶解,完全溶解后,检测核磁共振氢谱。同时要以 α -1,4-糖苷键以及 α -1,6-糖苷键、亚普鲁兰多糖基峰面积为基础对疏水基和氨基的取代度进行计算。

1.3 研究结果

1.3.1 红外光谱分析

完成红外光谱分析后,可以获得以下结论:①对CHS的红外光谱图进行分析,发现在1710 cm^{-1} 、1740 cm^{-1} 、2960 cm^{-1} 、3400 cm^{-1} 位置分别出现游离羧基伸缩振动吸收峰、酯羰基伸缩振动吸收峰、 $-\text{CH}_3$ 伸缩振动吸收峰以及 $-\text{OH}$ 伸缩振动吸收峰。②对CHP的红外光谱图进行分析,发现在1710 cm^{-1} 位置的羧基伸缩振动吸收峰小时,1740 cm^{-1} 、2960 cm^{-1} 、3400 cm^{-1} 位置分别出现酯羰基伸缩振动吸收峰、 $-\text{CH}_2-$ 伸缩振动吸收峰以及 $-\text{OH}$ 伸缩振动吸收峰。③对CHAP的红外光谱图进行分析,发现在1420 cm^{-1} 、1640 cm^{-1} 、1740 cm^{-1} 、2960 cm^{-1} 、3400 cm^{-1} 位置分别出现 $-\text{CN}-$ 伸缩振动吸收峰、 $-\text{NH}-$ 伸缩振动吸收峰、酯羰基伸缩振动吸收峰、 $-\text{CH}_3$ 伸缩振动吸收峰以及 $-\text{OH}$ 伸缩振动吸收峰。这些结论验证了CHAP合成制备。

1.3.2 核磁共振氢谱分析

在开展核磁共振氢谱分析的过程中可以获取以下结论:①CHS的核磁共振氢谱图中0~22ppm存在胆固醇特征峰,在2ppm前后位置出现普鲁兰多糖基特征峰。②CHP的核磁共振氢谱图中0~22ppm存在胆固醇特征峰,在2.5ppm前后位置出现亚普鲁兰多糖基特征峰,这是胆固醇成功在普鲁兰多糖上接枝的标志。③CHAP的

核磁共振氢谱图中0-22ppm存在胆固醇特征峰,这是氨基成功接枝的标志。

2 不同电荷疏水改性普鲁兰多糖纳米粒子制备与HSA相互作用研究

2.1 研究资料

在实验之前,需要完成实验药剂与实验仪器准备工作。在分析不同电荷疏水改性普鲁兰多糖纳米粒子制备与HSA相互作用的过程中,需要使用的实验药剂包括:500g分析纯胆固醇;100g分析纯丁二酸酐;500ml分析纯乙二胺、乙醚、N,N-羰基二咪唑、四氢呋喃酯;5g人血清白蛋白。需要的实验仪器包括傅里叶红外光谱仪、超导核磁共振仪、荧光分光光度计、圆二色谱仪、激光粒度分析仪、等温滴定量热仪^[2]。

2.2 研究方法

2.2.1 氨基化疏水改性普鲁兰多糖(CHAP)合成

在CHAP合成的过程中,需要取1克疏水改性普鲁兰多糖、N,N-羰基二咪唑1g,加入到20毫升无水二普鲁兰多糖亚砷中进行溶解,在50摄氏度的油浴锅中进行搅拌,搅拌三小时之后加入2克乙二胺,持续进行加热反应,48小时后停止反应,等到反应液冷却到室温后,需要将反应液转移到透析袋里,利用双蒸水透析处理。48小时后确保没有DMSO味道后,可以将反应液转移到培养皿中,放置在冰箱中进行冷冻保存,在冷冻干燥的条件下可以获取CHAP固体。

2.2.2 羰基化疏水改性普鲁兰多糖(CHSP)合成

在对羰基发疏水改性普鲁兰多糖进行合成时,需要取2gCHS放置在20毫升无水二普鲁兰多糖亚砷中;取1克丁二酸酐以及0.5克4-二普鲁兰多糖氨基吡啶溶解在5毫升DMSO溶液内,同时在室温下进行活化反应,3小时左右将两组溶液混合,在50℃的热油浴中进行反应48小时,停止反应并将反应液冷却到室温,之后可以将反应液倒入加入200毫升无水乙醇,的500毫升烧杯内,析出白色固体沉淀并完成搅拌和处理。将获取的白色固体放置在500毫升烧杯内,分别利用乙醚、四氢呋喃进行浸泡10分钟,完成抽滤处理之后,在50℃的干燥箱中进

行烘干,可以获取最终的实验物品。

2.3 研究结果

具有两亲性的聚合物利用透析法能够自组装成亲水外壳、疏水内核壳-核结构的纳米粒子。这一纳米粒子能够装载抗癌药物,从而形成纳米药物制剂。纳米制剂在人体内能够发挥效力,主要是以纳米粒子的性质为主发挥作用的。在对三种纳米粒子的粒径分布和Zeta电位进行分析时,可以确定CHP纳米粒子平均粒径为73.1nm,CHAP平均粒径为116.9nm。

普鲁兰多糖纳米粒子的疏水基相同,CHAP与CHSP的尺寸比CHP大,说明带电荷基团会对纳米自组装行为产生干扰,在水溶液内可以形成松散结构、体积相对较大的纳米粒子,纳米粒子的粒径也相对较大。对三种纳米粒子的电位进行对比,CHAP、CHSP的相关电位分别为+12.9mV、-15.4mV。因此,聚合物中的氨基和羧基可以确保纳米粒子能够带上不同的表面电荷,改变表面性质^[3]。

3 讨论

总而言之,纳米粒子的自身性质包括疏水性、表面电荷等,这些性质都会对纳米粒子与HSA之间的相互作用产生影响,同时会对纳米药剂在体内的释放效力产生影响。在具体的设计过程中,需要利用特定材料以及特定的蛋白吸附充分发挥纳米药物的功能。因此,需要对之间的关系进行有效研究,才能够开发出新型纳米材料。

参考文献:

[1]李梦硕,张静,刘丹,等.芘与人血清白蛋白和牛血清白蛋白结合位点微环境极性的差异[J].高等学校化学学报,2021,42(3):731-735.

[2]胡晶静,童裳伦.光谱法研究碳量子点与人血清白蛋白的相互作用[J].光谱学与光谱分析,2021,41(4):1107-1113.

[3]丁鑫,师红东,刘扬中.以人血清白蛋白为载体的Ru(III)和全反式维甲酸共运输纳米药物的构建及抗肿瘤转移作用[J].高等学校化学学报,2021,42(10):3040-3046.