**一种酸响应的壳聚糖纳米胶束冻干粉及其制备方法和应用**

**技术领域**

本发明涉及胶束制备技术领域，具体涉及一种酸响应的壳聚糖纳米胶束冻干粉及其制备方法和应用。

**背景技术**

壳聚糖是一种天然分高分子多糖，其具有良好的天然抗菌效果，且安全无毒，被广泛应用于医药领域。羟乙基壳聚糖(HECTS)是壳聚糖经羟乙基化改性得到的壳聚糖衍生物，在抗菌、药物合成，高子材料合成等多个领域有广泛应用。

现有也有将壳聚糖与抗炎剂、抗菌剂等结合制备而成的水凝胶，从而使这些水凝胶具有良好的抗菌效果及组织修复能力，但均缺乏感染部位靶向性。类似于肿瘤微环境，在细菌感染过程中，其微环境也呈现出微酸环境，那是由于细菌分泌的一些相关活性因子会通过发酵产生酸性物质来降低周围环境PH值。因此，如果能够通过感染部位酸性环境来制备一种酸响应的壳聚糖纳米胶束用于抗菌，可能会产生更加优异的抗菌抑菌效果。

此外，光动力疗法（PDT）作为一种新兴的疾病治疗方法，在对抗细菌感染等方面有着广阔应用前景。光疗通常是利用某些药物在特定光照射下发生变化，如光敏剂可在光照射下发生光化学反应并产生活性氧，从而破坏菌膜中活性物质。它不易使细菌产生耐药性，对机体本身的危害较小，因而在抗菌领域受到了广泛关注。

本发明旨在对酸响应壳聚糖纳米胶束联合光动力疗法进行初步探索研究。

**发明内容**

有鉴于此，本发明提供了一种酸响应的壳聚糖纳米胶束冻干粉及其制备方法和应用，此纳米胶束利用壳聚糖良好的水溶性、生物相容性等优点，与胺通过酸酐连接，由于分别含有亲水性壳聚糖部分和疏水胺部分，故在水中可自组装形成纳米胶束。

该胶束可作为药物载体，可封装光敏剂在其疏水核心。进而该胶束可以开发成光动力治疗载体，广泛应用到治疗领域。

本发明所提供的技术方案为：

第一方面，本发明提供一种酸响应的壳聚糖纳米胶束冻干粉的制备方法，包括：将胺化合物和酸酐化合物反应，反应产物在催化剂作用下与壳聚糖进一步反应成壳聚糖纳米胶束，之后冻干。

进一步地，所述制备方法包括以下步骤：

步骤1，将十八胺溶解在溶剂一中，将顺乌头酸酐溶解在溶剂二中，然后在无氧条件下将顺乌头酸酐溶液加入到十八胺溶液中混合反应，反应结束后除去溶剂得到顺乌头酰十八胺(ASA)粗品；

步骤2，将ASA粗品溶于溶剂三中，加入催化剂1-（3-二甲氨基丙基）-3-乙基碳二亚胺盐酸盐）（EDC）和N-羟基琥珀酰亚胺（NSH）活化，加入羟乙基脱乙酰壳聚糖溶于溶剂三的溶液，反应完全后透析并离心，取上清液冻干得到所述壳聚糖纳米胶束冻干粉。

进一步地，所述溶剂一选自三氯甲烷、二氯甲烷、异丙醇、甲醇中的至少一种，优选为三氯甲烷。

进一步地，所述溶剂二为甲醇、乙腈、二甲基亚砜或四氢呋喃，优选为乙腈。

进一步地，所述步骤1中十八胺与顺乌头酸酐的摩尔比为0.1～1：1，优选为0.52：1。

优选地，所述步骤1中混合反应温度为-10~0℃，时间为2h±10min。

进一步地，所述溶剂三为DMSO。

进一步地，所述步骤2中ASA粗品在溶剂三中的终浓度为20 mg/mL。

进一步地，所述步骤2中催化剂EDC、NSH与ASA粗品的摩尔比为1~2：1~2：1，优选为1.5：1.5：1。

进一步地，所述步骤2中ASA的活化时间为20±1min。

进一步地，所述步骤2中羟乙基脱乙酰壳聚糖与ASA粗品的质量比为1~3：1。

第二方面，本发明提供一种酸响应的壳聚糖纳米胶束冻干粉，是采用上述制备方法制得。

第三方面，本发明还提供上述酸响应的壳聚糖纳米胶束冻干粉在制备抗菌药物中的应用。

第四方面，本发明还提供一种抗菌纳米制剂的制备方法，包括以上述酸响应的壳聚糖纳米胶束冻干粉为载体，包载光敏剂形成纳米制剂。

进一步地，所述纳米制剂的制备方法具体包括：将光敏剂和壳聚糖纳米胶束冻干粉分别溶于DMSO中，然后将两种溶液室温混合搅拌2~6h，再于-10~0℃超声10~60 min，透析后冷冻干燥，即得。

进一步地，所述制备方法中，光敏剂与壳聚糖纳米胶束冻干粉质量比为0.05~0.5：1，优选为0.1～0.3:1。

进一步地，所述光敏剂为二氢卟吩 e6（Ce6）。

优选地，所述制备方法中，室温混合搅拌时间为3~5h。

优选地，所述制备方法中，-10~0℃超声20~40min。

第五方面，本发明提供一种抗菌纳米制剂，是采用上述制备方法获得。

本发明的有益效果为：

1. 本发明的壳聚糖纳米胶束冻干粉，材料易得，且具有高安全性、无毒环保、可生物降解，并有很好的安全性和生物相容性。
2. 本发明的壳聚糖纳米胶束冻干粉是通过十八胺、顺乌头酸酐和壳聚糖制备而成，具有很好的pH响应性，因此可以在细菌感染酸性微环境中释药，有效提高药物在感染部位的蓄积。
3. 本发明的酸响应壳聚糖纳米胶束冻干粉，可以通过疏水作用装载光敏剂，极大提高了对光敏剂的包封效率，所获得的纳米制剂体外试验证明其具有良好的大肠杆菌抑菌效果。

**附图说明**

图1为本发明实验例1 获得的ASA粗品的核磁共振图谱。

图2为本发明实施例1获得的壳聚糖纳米胶束冻干粉的核磁共振图谱。

图3为本发明实施例7中抗菌纳米制剂ASA-CC在pH为6.0和7.4时Ce6累积释放率。

图4为本发明实施例8中PBS和ASA-CC的体外抗菌效果图，其中，图（a）为PBS组，图（b）为ASA-CC组。

**具体实施方式**

在本发明的描述中，需要说明的是，实施例中未注明具体条件者，按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市售购买获得的常规产品。

下面结合具体的实施例对本发明做进一步详细说明，所述是对本发明的解释而不是限定。

**实施例1**

本实施例提供一种酸响应的壳聚糖纳米胶束冻干粉的制备方法，包括如下步骤：

（1）称取0.14 g（0.52 mmol）十八胺置于干燥的50 mL 三口瓶中，加入 6 mL 三氯甲烷使其完全溶解，将该溶液在氮气保护下放置于0℃冰浴。称取0.16 g（1.03mmol）顺乌头酸酐，溶于3 mL 乙腈溶液中，将该溶液加入到恒压滴液漏斗中，缓慢滴加到十八胺的三氯甲烷溶液中，于0℃保温搅拌2h。旋转蒸发除去反应溶剂，得ASA粗品。

（2）称取10 mg步骤（1）得到的ASA溶于DMSO成20 mg/ml溶液，投入催化剂EDC和NHS混合溶于DMSO的溶液（摩尔比EDC:NHS:ASA=1.5:1.5:1），活化20min后加入羟乙基脱乙酰壳聚糖（CTS）（CTS脱乙酰度60%）溶DMSO成10 mg/mL的溶液（质量比ASA:CTS=2:1），反应24h后，于透析袋中，先用50%乙醇透析24h，再在去离子水中透析24h，透析完产物离心，取上清液，冷冻干燥，得到壳聚糖纳米胶束。

在本实施例中，步骤（1）中的三氯甲烷可以替换成二氯甲烷、异丙醇、或者甲醇；乙腈可以替换成甲醇、二甲基亚砜或四氢呋喃。

在本实施例中，十八胺与顺乌头酸酐的摩尔比控制在0.1～1：1均可以获得ASA，但是摩尔比为0.52：1的核磁杂峰相对少。此外，十八胺和顺乌头酸酐的反应温度控制在-10~0℃，时间为2h左右较好。

在本实施例中，催化剂EDC、NSH与ASA粗品的摩尔比为1~2：1~2：1都可以，优选为1.5：1.5：1。

**实施例2**

本实施例提供一种酸响应的壳聚糖纳米胶束冻干粉的制备方法，包括如下步骤：

（1）称取0.14 g（0.52mmol） 十八胺置于干燥的50 mL 三口瓶中，加入 6 mL 三氯甲烷使其完全溶解，将该溶液在氮气保护下放置于0℃冰浴。称取0.08 g（0.52mmol）顺乌头酸酐，溶于3 mL 乙腈溶液中，将该溶液加入到恒压滴液漏斗中，缓慢滴加到十八胺的三氯甲烷溶液中，于0℃保温搅拌2h。旋转蒸发除去反应溶剂，得ASA粗品。

（2）称取10 mg步骤（1）得到的ASA溶于DMSO成20 mg/ml溶液，投入催化剂EDC和NHS混合溶于DMSO的溶液（摩尔比EDC:NHS:ASA=1:1:1），活化20min后加入CTS（脱乙酰度80%）溶DMSO成10 mg/mL的溶液（质量比ASA:CTS=3:1），反应24h后，于透析袋中，先用50%乙醇透析24h，再在去离子水中透析24h，透析完产物离心，取上清液，冷冻干燥，得到壳聚糖纳米胶束。

**实施例3**

本实施例提供一种酸响应的壳聚糖纳米胶束冻干粉的制备方法，包括如下步骤：

（1）称取0.14 g（0.52mmol） 十八胺置于干燥的50 mL 三口瓶中，加入 6 mL 三氯甲烷使其完全溶解，将该溶液在氮气保护下放置于0℃冰浴。称取0.81 g（5.2mmol）顺乌头酸酐，溶于3 mL 乙腈溶液中，将该溶液加入到恒压滴液漏斗中，缓慢滴加到十八胺的三氯甲烷溶液中，于0℃保温搅拌2h。旋转蒸发除去反应溶剂，得ASA粗品。

（2）称取10 mg步骤（1）得到的ASA溶于DMSO成20 mg/ml溶液，投入催化剂EDC和NHS混合溶于DMSO的溶液（摩尔比EDC:NHS:ASA=2:2:1），活化20min后加入CTS（脱乙酰度95%）溶DMSO成10 mg/mL的溶液（投料比ASA:CTS=1:1），反应24h后，于透析袋中，先用50%乙醇透析24h，再在去离子水中透析24h，透析完产物离心，取上清液，冷冻干燥，得到壳聚糖纳米胶束。

**实施例4**

本实施例提供一种抗菌纳米制剂，是以实施例1制备的酸响应的壳聚糖纳米胶束冻干粉为载体，包载光敏剂的纳米制剂，具体制备过程如下：

取7 mg实施例1制备的壳聚糖纳米胶束冻干粉溶解于2.33 mL DMSO。称取0.77 mg二氢卟吩 e6（Ce6），溶于0.194 mL DMSO中，避光缓慢逐滴加入至壳聚糖纳米胶束溶液中，在室温下磁力搅拌反应4 h后，冰浴超声30 min，随后将溶液转移到透析袋中，用50％乙醇透析24 h后，更换去离子水透析24 h，冷冻干燥，得到纳米制剂ASA-CC。

**实验例5**

本实施例使用核磁共振氢谱进行ASA、壳聚糖纳米胶束冻干粉（ASA-壳）的结构确认，具体如下：

将实施例1制备的ASA粗品、ASA-壳溶于氘代DMSO进行核磁共振分析，参见图1和图2。

图1为ASA的氢谱结果。可以看出，十八胺的特征峰出现在了0.86ppm（CH3-），0.86ppm（-CH2-）。而顺乌头酸酐在6.72ppm出现了特征峰(=CH-)，表明顺乌头酸酐耦合到了十八胺上，从而成功制备了ASA。

图2为ASA-壳的氢谱结果。可以看出，在ASA的核磁结果基础上，羟乙基脱乙酰壳聚糖（CTS）的特征峰出现在了4.37-4.84ppm，表明CTS耦合到了ASA上，从而成功制备了ASA-壳。

**实验例6**

本实施例表征ASA、ASA-壳、ASA-CC的理化性质，具体如下：

采用实施例1的方法制备ASA粗品，取4 mg，加入去离子水2 mL配制成浓度为2 mg/mL的溶液，进行超声使其完全溶解，将溶液依次用0.45 μm和0.22 μm微孔滤膜过滤，样品池中加入过滤后的溶液1mL后放入激光粒度仪进行粒径测量。

采用实施例1的方法制备ASA-壳，精密称取4 mg，加入去离子水2 mL配制成浓度为2 mg/mL的溶液，进行超声使其完全溶解，将溶液依次用0.45 μm和0.22 μm微孔滤膜过滤，样品池中加入过滤后的溶液1mL后放入激光粒度仪进行粒径测量。

采用实施例1的方法制备ASA-CC，精密称取4 mg，加入去离子水2 mL配制成浓度为2 mg/mL的溶液，进行超声使其完全溶解，将溶液依次用0.45 μm和0.22 μm微孔滤膜过滤，样品池中加入过滤后的溶液1mL后放入激光粒度仪进行粒径测量。

精密称取实施例4获得的ASA-CC 4 mg，加入去离子水配成浓度为 2 mg/mL 的溶液，30℃下搅拌30 min，过0.22 μm微孔滤膜过滤，用流动相稀释至适宜浓度，HPLC测定Ce6 的含量。

结果如表1所示。ASA、ASA-壳、ASA-CC的粒径分别为171.2 nm、234.7 nm、238.3 nm，说明壳聚糖的成功连接，并且Ce6的包载不影响胶束的平均粒径；Ce6的载药量为13.3%。

表1.胶束的理化表征

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **纳米粒** | **尺寸(nm)** | **药物装载量** |
| ASA | 171.2 nm | --- |
| ASA-壳 | 234.7 nm | --- |
| ASA-CC | 238.3 nm | 13.3% |

**实验例7**

本实施例使用透析法来研究药物从胶束中的释放行为，考察对象是采用实施例4方法获得的ASA-CC，进行体外释放试验，具体如下：

称取实施例4获得的纳米制剂ASA-CC，制备终浓度为1 mg/mL的纳米粒溶液，取1.0 mL至截留分子量为3500 Da的透析袋中。以50 mL磷酸盐缓冲液（pH分别为 7.4、6.5，含有0.2%吐温80）为释放介质，置于37℃，振荡速度为100 rpm的恒温振荡摇床中。每隔一定时间取样2 mL，并立即补以相同体积的释放介质。测定Ce6的累积释放量。释放的药物含量通过HPLC法进行测定，按照公式计算药物的累积释放率，结果如图3所示。在pH为6.0的条件下，Ce6的24h累积释放率为80%左右，远高于pH7.4组，证明ASA-CC具有酸响应效应。

**实施例8**

体外抗菌试验

取10 mg采用实施例4方法获得的 ASA-CC溶解在5 mL的PBS中，得到2 mg/mL的ASA-CC溶液，然后用0.22 μm的无菌滤膜过滤，在96孔板加入100 μL的ASA-CC溶液（n=3），随后将大肠杆菌浓度配置为1×106 CFU的菌液，每孔加入100 μL的菌液，混合均匀后，将每个孔用660 nm波长的激光器以0.5 W/cm2照射5 min，放入细菌培养箱，培养12 h。对照组中将ASA-CC溶液替换为等体积的PBS溶液（n=3）。12h后每孔吸取20 μL进行平板涂布，观察菌落生长情况。图4给出ASA-CC组和对照组的其中一个平板菌落生长结果，表明，与对照组（PBS组）相比，ASA-CC纳米制剂有良好的大肠杆菌抑菌效果。

以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式，其描述较为具体和详细，但并不能因此而理解为对本发明专利范围的限制。应当指出的是，对于本领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明构思的前提下，还可以做出若干变形和改进，这些都属于本发明的保护范围。因此，本发明专利的保护范围应以所附权利要求为准。

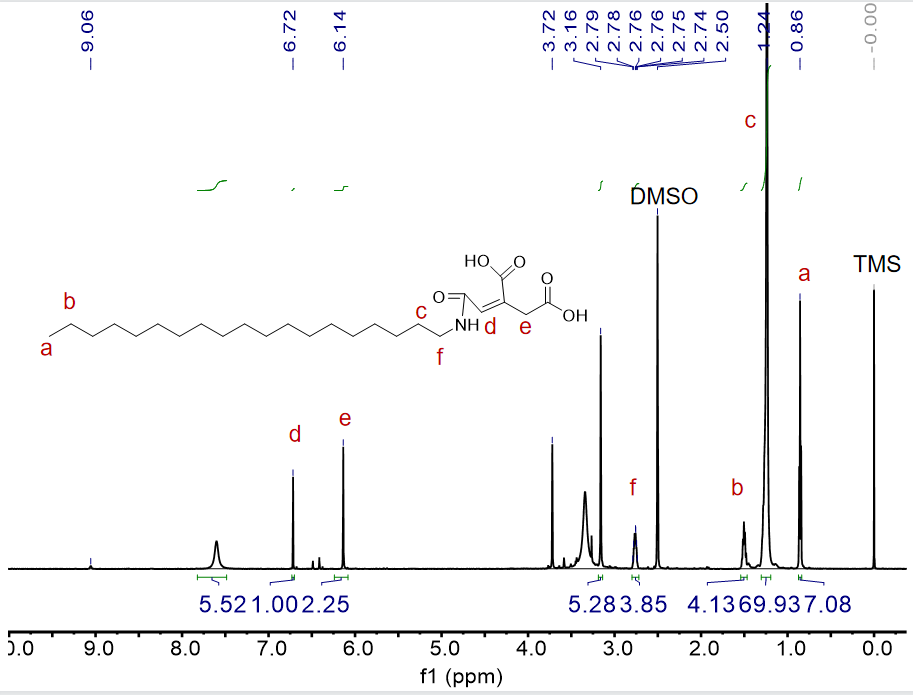


图1

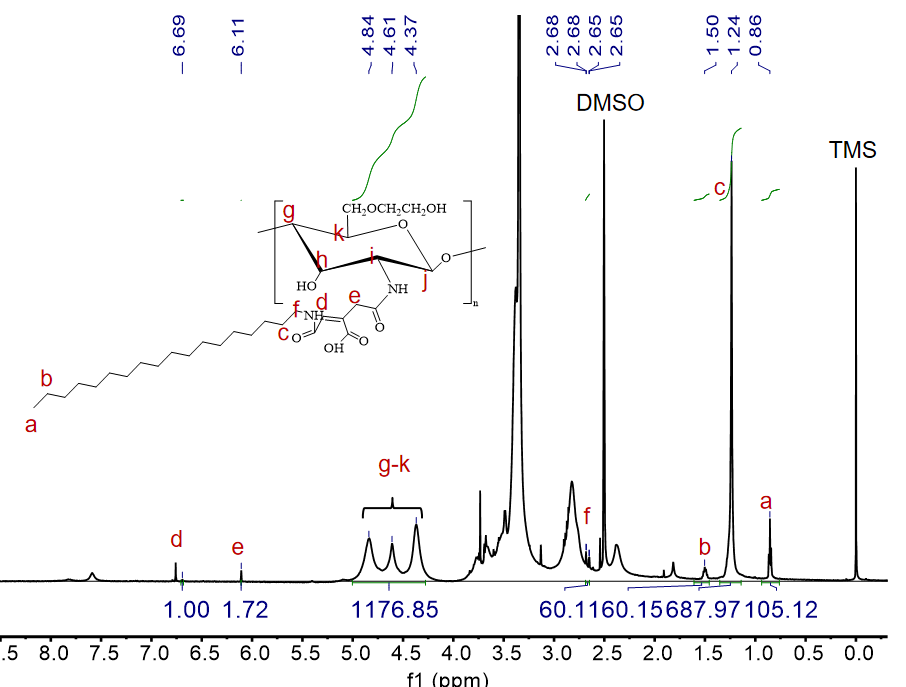


图2

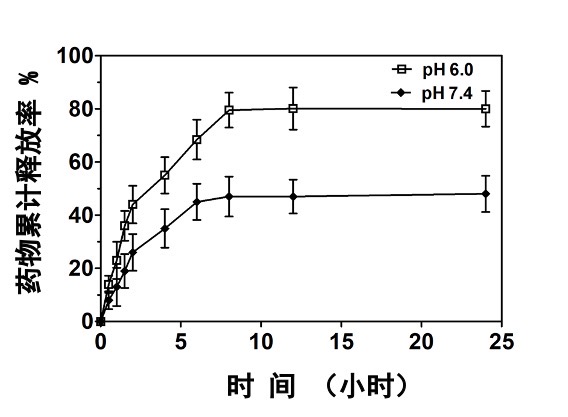


图3

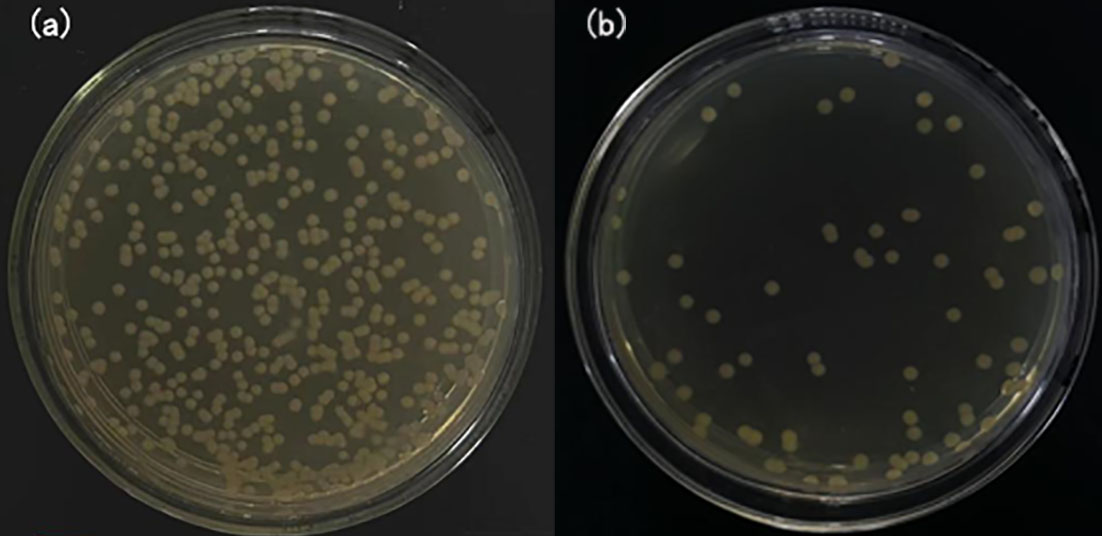


图4

1. 一种酸响应的壳聚糖纳米胶束冻干粉的制备方法，其特征在于：包括：将胺化合物和酸酐化合物反应，反应产物在催化剂作用下与壳聚糖进一步反应成壳聚糖纳米胶束，之后冻干。
2. 根据权利要求1所述的一种酸响应的壳聚糖纳米胶束冻干粉的制备方法，其特征在于：所述制备方法包括以下步骤：

步骤1，将十八胺溶解在溶剂一中，将顺乌头酸酐溶解在溶剂二中，然后在无氧条件下将顺乌头酸酐溶液加入到十八胺溶液中混合反应，反应结束后除去溶剂得到顺乌头酰十八胺粗品；

步骤2，将顺乌头酰十八胺粗品溶于溶剂三中，加入催化剂1-（3-二甲氨基丙基）-3-乙基碳二亚胺盐酸盐）和N-羟基琥珀酰亚胺活化，加入羟乙基脱乙酰壳聚糖溶于溶剂三的溶液，反应完全后透析并离心，取上清液冻干得到所述壳聚糖纳米胶束冻干粉。

1. 根据权利要求2所述的一种酸响应的壳聚糖纳米胶束冻干粉的制备方法，其特征在于：所述步骤1中十八胺与顺乌头酸酐的摩尔比为0.1～1：1。
2. 根据权利要求2所述的一种酸响应的壳聚糖纳米胶束冻干粉的制备方法，其特征在于：所述步骤1中混合反应温度为-10~0℃，时间为2h±10min。
3. 根据权利要求2所述的一种酸响应的壳聚糖纳米胶束冻干粉的制备方法，其特征在于：所述步骤2中催化剂EDC、NSH与ASA粗品的摩尔比为1~2：1~2：1。
4. 根据权利要求2所述的一种酸响应的壳聚糖纳米胶束冻干粉的制备方法，其特征在于：所述步骤2中羟乙基脱乙酰壳聚糖与ASA粗品的质量比为1~3：1。
5. 一种酸响应的壳聚糖纳米胶束冻干粉，其特征在于：是采用权利要求1~6任意一项所述的制备方法制得。
6. 权利要求7所述的壳聚糖纳米胶束冻干粉在制备抗菌药物中的应用。
7. 一种抗菌纳米制剂的制备方法，其特征在于：包括以权利要求7所述的壳聚糖纳米胶束冻干粉为载体，包载光敏剂形成纳米制剂。
8. 一种抗菌纳米制剂，是采用权利要求9所述的制备方法获得。

本发明提供一种酸响应的壳聚糖纳米胶束冻干粉及其制备方法和应用，该壳聚糖纳米胶束冻干粉的制备方法包括：将胺化合物和酸酐化合物反应，反应产物在催化剂作用下与壳聚糖进一步反应成壳聚糖纳米胶束，之后冻干。本发明的壳聚糖纳米胶束冻干粉具有很好的pH响应性，因此可以在细菌感染酸性微环境中释药，有效提高药物在感染部位的蓄积；还可以通过疏水作用装载光敏剂，极大提高了对光敏剂的包封效率，所获得的纳米制剂体外试验证明其具有良好的大肠杆菌抑菌效果。

