



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113521304 B

(45) 授权公告日 2023. 12. 12

(21) 申请号 202110778777.0

(22) 申请日 2021.07.09

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113521304 A

(43) 申请公布日 2021.10.22

(73) 专利权人 华南理工大学
地址 510640 广东省广州市天河区五山路
381号
专利权人 安徽粤智微源生物科技有限公司

(72) 发明人 陶劲松 田彦 刘浩 崔萌
付俊俊

(74) 专利代理机构 广州市华学知识产权代理有
限公司 44245
专利代理师 桂婷

(51) Int. Cl.
A61K 47/69 (2017.01)
A61K 47/61 (2017.01)
A61K 41/00 (2020.01)
A61K 31/12 (2006.01)
A61K 31/192 (2006.01)
A61K 31/337 (2006.01)

A61K 31/352 (2006.01)
A61K 31/353 (2006.01)
A61K 31/4745 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
B82Y 5/00 (2011.01)

(56) 对比文件

US 2018008552 A1, 2018.01.11
CN 111803629 A, 2020.10.23
US 2012244357 A1, 2012.09.27
CN 112059204 A, 2020.12.11
CN 106074451 A, 2016.11.09
US 2010233245 A1, 2010.09.16
Gautier M.A. Ndong Ntoutoume等.

“Development of curcumin-cyclodextrin/cellulose nanocrystals complexes: New anticancer drug delivery systems”. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2016, 第26卷 (第3期), 摘要、正文第1页右栏第1段、第3页左栏第4段至第4页右栏第3段以及图1. (续)

审查员 钟远林

权利要求书1页 说明书12页 附图9页

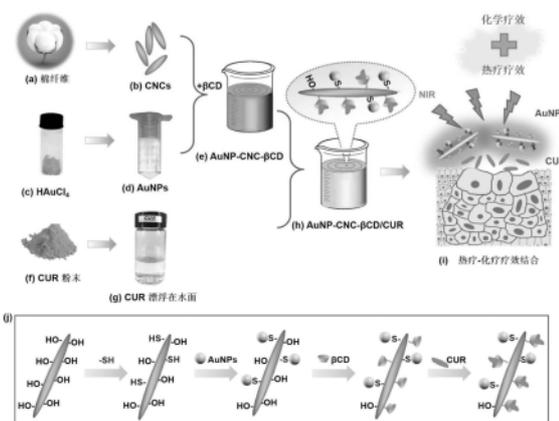
(54) 发明名称

一种基于纳米纤维素负载的双重疗效抗肿瘤药物及其制备方法

(57) 摘要

本发明属于抗肿瘤药物领域,公开了一种基于纳米纤维素负载纳米金和姜黄素的双重疗效抗肿瘤药物的制备及应用。本发明的药物载体选用纳米纤维素,经过适当处理,在载体上负载纳米金颗粒和环糊精,并以环糊精容纳抗肿瘤药物。现有的天然抗肿瘤药物难溶的问题被解决。负载在纳米颗粒上的AuNP在近红外辐照下实现热疗效果,并且热效应会促进姜黄素热释放,从而增强化学疗法的功效。抗肿瘤药物姜黄素的耐热性和稳定性显著提高,既有利于预处理,也有助于提高姜黄素的生物利用度。姜黄素的水溶性

得到了显著的提高,相比于其自然溶解度提高了近150倍,达到131.7 μg/mL。我们预计这种双重疗效抗肿瘤药物将成为肿瘤治疗的强大候选药物。



CN 113521304 B

[接上页]

(56) 对比文件

Surya Prakash Singh等.“NIR triggered liposome gold nanoparticles entrapping curcumin as in situ adjuvant for

photothermal treatment of skin cancer”.International Journal of Biological Macromolecules.2018,第110卷摘要、第376页左栏第1段.

1. 一种基于纳米纤维素载体的双重疗效姜黄素抗肿瘤药物的制备方法,其特征包括以下步骤:

(1) CNC载体的制备:用粉碎研磨机粉碎棉纤维浆板,使其成为蓬松的棉纤维,将配好的2mol/L过硫酸铵溶液取500mL加热至60℃并持续搅拌,向其中加入5g蓬松的棉纤维,反应16小时后,反应结束后,将所得反应液纯化,所得上清液即为CNC,保存备用;

(2) AuNP的制备:在搅拌条件下,将150 μ L 1 M氯金酸溶液与50 mL 4.8 mM谷胱甘肽溶液混合,混合物在95℃加热反应35分钟,反应结束后将所得反应液纯化,所得到的沉淀就是AuNP;

(3) AuNP的负载:将步骤(1)制得的CNC取500mL装入1L的锥形瓶中,放在磁力搅拌器上,调节pH至7.5,提前测得CNC浓度为固含量0.3%,电导滴定法测得羧基含量为526.67mmol/kg CNC;常温下向其中加入0.075g的NHS和0.5g的EDC,搅拌半小时活化羧基,然后再加入0.2gL-半胱氨酸;继续常温搅拌24小时,瓶口不密封,以便过程中产生的气体排出;透析纯化;透析完成后,超声使纳米颗粒分散;保存在4℃的冰箱里备用,记作CNC-SH;将步骤(2)制得的AuNP取0.16g分散在50mL水中与全部的CNC-SH混合,搅拌30分钟即可完成纳米金颗粒的接枝,得到AuNP-CNC,测得AuNP-CNC的固含量为0.25%;

(4) BCD的接枝:向步骤(3)中得到的全部AuNP-CNC溶液中溶解5g β -环糊精,加热至45℃,剧烈搅拌下滴加10 mL环氧氯丙烷,持续反应2小时,反应终止后,将反应液纯化即得接枝 β -环糊精的AuNP-CNC-BCD,保存备用;

(5) 姜黄素的负载:向AuNP-CNC-BCD中逐滴滴入姜黄素的丙酮溶液,直至出现不溶的姜黄素颗粒,然后搅拌使丙酮挥发,再旋蒸进一步除去丙酮,将所得混合物6000 rpm离心30分钟,除去未包埋的姜黄素,收集上层澄清透明的黄色液体,所得即为基于纳米纤维素载体的双重疗效姜黄素抗肿瘤药物。

2. 根据权利要求1所述的基于纳米纤维素载体的双重疗效姜黄素抗肿瘤药物的制备方法,其特征包括:

所述的透析所用的透析袋的截留分子量为12~14kDa。

3. 根据权利要求1或2所述的方法制备的基于纳米纤维素载体的双重疗效姜黄素抗肿瘤药物。

一种基于纳米纤维素负载的双重疗效抗肿瘤药物及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于抗肿瘤药物领域,特别涉及一种基于纳米纤维素载体的双重疗效抗肿瘤药物及其制备方法。

背景技术

[0002] 肿瘤是危害人类健康的主要疾病之一。随着对治疗效果、治疗程序、副作用等的更高要求,多重疗效的药物和天然抗肿瘤药物越来越受到患者和研究人员的青睐。然而天然抗肿瘤药物很多都是难溶于水的,极大限制了这类药物的应用。以姜黄素为例,姜黄素对肿瘤细胞的形成、增殖和转移具有良好的抑制作用。姜黄素价格低廉、来源广泛且具有多种医学特性,因此越来越受到研究人员的关注。但是,由于姜黄素溶解性差、负载能力低和释放能力弱,导致化学治疗效果差,也很难同时具有多种疗效。目前基于姜黄素开发的药物仍然不够有效。改善姜黄素药物的疗效对于治愈肿瘤非常重要。

[0003] 为解决难溶性药物在应用中存在的问题,国内外已开发了一些纳米药物递送系统,主要包括脂质体、纳米粒、胶束、凝胶、悬浮液、纳米乳剂、磷脂复合体、环糊精包埋、聚合物系统等。这些递送系统主要通过两个方面提高药物的利用率:提高药物水溶性,或是提高药物在体内药物递送时的血药浓度。当前的研究侧重于提高药物的利用率,虽然对某些肿瘤表现出了良好的疗效,但都仅仅局限于对肿瘤实施化疗,对于多手段结合的疗法方面比较欠缺。开发具备多重疗效的抗肿瘤药物仍然值得进一步研究。

[0004] 近年来,新型光相关纳米药物的开发正在逐渐受到重视。利用纳米颗粒的光热效应,已经有一些具有热疗和化疗双重治疗作用的制剂被开发了出来。但是,这些制剂通常结构复杂,不利于生产和运输。例如微胶囊、脂质体和多层核壳结构,渗漏的药物可能会掩盖住纳米金颗粒,在光照下不能顺利升温释放出包裹在内部的药物,从而失去双重疗效。

[0005] 因此,目前仍然存在改善抗肿瘤药物的水溶性和释放能力以提高化疗效果的需求,而且在使抗肿瘤药物具有化学疗法和物理疗法双重疗效方面仍然存在挑战。

发明内容

[0006] 为了克服上述现有技术的缺点与不足,本发明的首要目的在于提供一种基于纳米纤维素载体的双重疗效抗肿瘤药物的制备方法。

[0007] 本发明另一目的在于提供上述方法制备的基于纳米纤维素载体的双重疗效抗肿瘤药物。

[0008] 本发明再一目的在于提供上述基于纳米纤维素载体的双重疗效抗肿瘤药物在难溶药物姜黄素上的应用。

[0009] 本发明的目的通过下述方案实现:

[0010] 一种基于纳米纤维素载体的双重疗效抗肿瘤药物的制备方法,包括以下步骤:

[0011] (1) CNC(纤维素纳米晶)载体的制备:用粉碎研磨机粉碎棉纤维浆板,使其成为蓬

松的棉纤维,然后加入到过硫酸铵溶液中加热反应,反应结束后,将所得反应液纯化,所得上清液即为CNC,保存备用;

[0012] (2) AuNP(纳米金颗粒)的制备:在搅拌条件下,将氯金酸溶液与谷胱甘肽溶液混合并加热反应,反应结束后将所得反应液纯化,所得到的沉淀就是AuNP;

[0013] (3) AuNP的负载:取步骤(1)制得的CNC装入敞口容器中,调节pH至6~8,在搅拌条件下向其中加入NHS和EDC,搅拌均匀后再加入L-半胱氨酸,继续搅拌12小时以上,然后透析提纯,得到CNC-SH;将步骤(2)制得的AuNP分散在水中再与CNC-SH混合,搅拌20min以上,即可完成纳米金颗粒的接枝,得到AuNP-CNC;

[0014] (4) β CD(β -环糊精)的接枝:将 β -环糊精溶于AuNP-CNC,搅拌下加入环氧氯丙烷进行反应,反应终止后,将反应液纯化即得接枝 β -环糊精的AuNP-CNC- β CD,保存备用;

[0015] (5) 抗肿瘤药物的负载:用挥发性溶剂溶解药物,向AuNP-CNC- β CD中逐滴滴入药物溶液,直至出现不溶的药物颗粒,然后除去挥发性溶剂,再将所得混合物离心除去未包埋的药物,收集上层澄清透明的液体,所得即为基于纳米纤维素载体的双重疗效抗肿瘤药物。

[0016] 步骤(1)中所述的棉纤维浆板和过硫酸铵溶液的用量满足:每1g的棉纤维浆板对应使用不少于0.1mol的过硫酸铵。

[0017] 步骤(1)中所述的加热反应是指在45~80℃反应4~20h。

[0018] 步骤(1)中所述的纯化具体包括以下步骤:反应结束后,将所得反应液离心,并用水洗涤沉淀,直到上清液出现淡蓝色为止,保留所有沉淀和最后一次离心得到的淡蓝色上清液,稀释后超声分散使沉淀物分散开,再装入透析袋,用水透析直至透析液不显示出酸性为止,将透析袋内的胶状物取出,超声分散后离心,抛弃沉淀,保留上清液,上清液即为CNC,保存在4℃冰箱备用;

[0019] 优选的,步骤(1)的纯化过程中,所述的离心转速约在5000~10000转,单次离心时长10~15分钟;所述的将透析袋内的胶状物取出,超声分散后离心是指超声至成为溶液状,团聚形成的胶状物全部重新分散开,离心后抛弃的沉淀为未反应完全的大纤维和杂质。

[0020] 步骤(2)中所述的加热反应是指在90~100℃加热反应30~40min,优选为在95℃反应35min。

[0021] 步骤(2)中所述的氯金酸溶液与谷胱甘肽溶液的用量满足:氯金酸溶液的浓度为0.5~2mol/L,谷胱甘肽溶液的浓度为3~6mmol/L,氯金酸溶液和谷胱甘肽溶液的体积比为100~200 μ L:10~150mL;优选的,步骤(2)中所述的氯金酸溶液与谷胱甘肽溶液的用量满足:氯金酸溶液的浓度为1mol/L,谷胱甘肽溶液的浓度为4.8mmol/L,氯金酸溶液和谷胱甘肽溶液的体积比为150 μ L:50mL。

[0022] 步骤(2)中所述的分离纯化是指将所得反应液冷却至室温,离心(11000~15000g离心力下离心4~20min)除去大的聚集体,将溶液的pH值调节至3~4,并向溶液中加入乙醇,离心(在3500~5000g离心力下离心4~10min)以进一步纯化上清液,得到的沉淀就是AuNP;加入乙醇的用量满足乙醇的用量为溶液中水体积的0.5倍以上。

[0023] 步骤(3)中所述CNC、NHS、EDC、以及L-半胱氨酸的用量满足摩尔比:EDC/CNC中的-COOH \geq 1.5;EDC/NHS=3~5,优选为4;L-半胱氨酸/CNC中的-COOH \geq 1.2;需要提前测量CNC的羧基含量,例如可以由酸碱滴定法或电导滴定法测量。

[0024] 步骤(3)中所述的AuNP和CNC-SH的用量满足: AuNP的摩尔量不低于接巯基前的CNC

(即步骤(3)中作为原料的CNC)的羧基含量。

[0025] 步骤(4)中所述的环氧氯丙烷用量为步骤(4)的反应体系总体积的1%~2%; β -环糊精和AuNP-CNC的用量关系满足: $n(\beta\text{-环糊精})/n(\text{AuNP-CNC的原料CNC中羧基}) \geq 3$;

[0026] 步骤(4)中所述的反应是指在室温~60℃之间反应半个小时以上;

[0027] 步骤(4)中所述的纯化是指将反应液冷却至室温,离心(5000~10000转,10~15min)除去过量的环糊精和环氧氯丙烷,取沉淀透析纯化,将得到的AuNP-CNC- β CD超声分散,保存在4℃的冰箱里备用;

[0028] 步骤(1)~(4)中所述的透析所用的透析袋的截留分子量为12~14kDa;

[0029] 步骤(5)中所述的挥发性溶剂应当根据药物的溶解能力以及溶剂与水的相容性选择,例如可以选择丙酮、甲醇等;

[0030] 步骤(5)中所述的除去挥发性溶剂可以选择剧烈搅拌以使溶剂快速挥发,然后再旋蒸除去挥发性溶剂。

[0031] 步骤(5)中所述的离心除去未包埋的药物是指在3000~10000rpm多次离心,根据操作条件选取转速;

[0032] 步骤(5)中所述的药物是指姜黄素、槲皮素,儿茶素,没食子酸、紫杉醇、喜树碱中的至少一种,优选为姜黄素。

[0033] 步骤(1)-(5)中未指明温度的均指在室温下进行,本发明中的室温指20℃ \pm 5℃。

[0034] 步骤(1)-(5)中所述的搅拌是为了使原料之间充分的接触,本领域常规的搅拌速度都可以实现本发明的技术效果,因此不用限定搅拌速度;

[0035] 一种由上述方法制备得到的基于纳米纤维素载体的双重疗效抗肿瘤药物,尤其是由上述方法制备得到的基于纳米纤维素负载纳米金及姜黄素的双重疗效抗肿瘤药物。

[0036] 上述的基于纳米纤维素载体的双重疗效抗肿瘤药物在难溶药物姜黄素上的应用。

[0037] 一种基于纳米纤维素载体的双重疗效姜黄素抗肿瘤药物,其由上述的基于纳米纤维素载体的双重疗效抗肿瘤药物的制备方法得到,具体包括以下步骤:

[0038] (1)依据前述的一种基于纳米纤维素载体的双重疗效抗肿瘤药物的制备方法步骤(1)~(4)进行;

[0039] (2)CUR(姜黄素)的负载:向AuNP-CNC- β CD中逐滴滴入姜黄素的丙酮溶液(浓度优选为1.4mg/mL),直至出现不溶的CUR颗粒,然后搅拌使丙酮挥发,再旋蒸(温度优选为45℃)进一步除去丙酮,将所得混合物6000rpm离心30分钟,除去未包埋的CUR,收集上层澄清透明的黄色液体,所得即为基于纳米纤维素载体的双重疗效姜黄素抗肿瘤药物。

[0040] 本发明的机理为:

[0041] 当前的难溶性抗肿瘤药物递送体系难以同时具有化学疗效和热疗疗效。本发明利用纳米纤维素(CNC)作为载体,通过席夫碱反应将巯基接枝到CNC的表面,再让CNC纳米颗粒负载金纳米颗粒(AuNP)和 β -环糊精(β CD),难溶药物可以嵌入 β CD的疏水空腔中,增加难溶药物的水溶性。制备过程中,随着挥发性溶剂的逐渐减少,难溶药物逐渐从溶剂中析出,而液相中环糊精的空腔是疏水性的,根据相似相溶原理,疏水性的药物从液相里转移进入环糊精,实现了环糊精对难溶药物的包埋。当体系中开始出现不溶的药物颗粒时,表明AuNP-CNC- β CD的容纳能力达到上限。在应用中,利用AuNP的光热效应达到热疗效果,同时光热效应也可以增强包埋的药物分子的热运动,从而提高药物的释放能力提高化疗疗效。

[0042] 本发明相对于现有技术,具有如下的优点及有益效果:

[0043] (1) 本发明制备的基于纳米纤维素载体的双效抗肿瘤药物结构简单,同时具有化疗和热疗效果,并且热效应会促进药物的释放提高化疗疗效。载体结构简单,比其他双效药物复杂的多层构造简单许多,更加便于生产运输和使用。

[0044] (2) 本发明制备的基于纳米纤维素载体的双效抗肿瘤药物具有较好的耐热性,常用的121℃灭菌过程不会对产物纳米药物的热稳定性产生影响。负载姜黄素的药物在230℃才开始热分解,显著提高了姜黄素的耐热性。

[0045] (3) 本发明制备的基于纳米纤维素载体的双效抗肿瘤药物具有较高的药物负载能力,显著提高了药物的水溶性。在姜黄素药物的产品中测得CUR的负载量为31.4 $\mu\text{g}/\text{mg}$,CUR溶解能力达到了131.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$,溶解度提高了近150倍,高于其他载体类姜黄素递送体系。

附图说明

[0046] 图1为从原料制得基于纳米纤维素载体的双效抗肿瘤药物并发挥疗效的过程图。

[0047] 图2为本发明中基于纳米纤维素载体的双效姜黄素抗肿瘤药物的具体反应程序图。

[0048] 图3为本发明实施例1中制得的几种纳米颗粒的微观形貌图。

[0049] 图4为本发明实施例1制备过程中不同阶段产物的红外分析曲线。

[0050] 图5为本发明实施例1制备过程中不同阶段产物的DSC曲线。

[0051] 图6为本发明实施例1主要产物的热重分析曲线及其一阶微分曲线。

[0052] 图7为本发明实施1中姜黄素、纳米金及最终产物的紫外吸收光谱(a)和荧光发射光谱(b)。

[0053] 图8为本发明实施例1的产物的XPS图谱,其中(a)为全谱,(b)为Au的精细谱。

[0054] 图9为本发明实施例1产物在激光共聚焦显微镜下拍摄的荧光照片。

[0055] 图10为本发明实施例1原料、主要中间产物及最终产物的实物照片。

[0056] 图11为本发明实施例1产物在水和PBS缓冲液中的稳定性曲线,以及与文献报道结果的稳定性对比图。

[0057] 图12为本发明实施例1产物的药物在不同条件下的释放对比曲线以及释放前后对比图,其中(a)为37℃下不同pH的释放,(b)为pH=6.8下不同温度的释放,(c)为与其他文献报道结果的释放率对比,(d)为释放前后的实物照片对比。

[0058] 图13为本发明实施例1的热效应图,(a)为热效应测试示意图,(b)为AuNP-CNC- β CD/CUR在0.8W/cm²激光照射下的红外热成像照片,(c)为AuNP-CNC-BCD/CUR在0.8W/cm²和0.5W/cm²以及CNC在0.8W/cm²激光照射下的升温曲线。

具体实施方式

[0059] 下面结合实施例和附图对本发明作进一步详细的描述,但本发明的实施方式不限于此。

[0060] 实施例中所用试剂如无特殊说明均可从市场常规购得。L-谷胱甘肽(纯度99%,生物技术级,上海麦克林);L-半胱氨酸(纯度98%,上海伯奥生物);氯金酸(纯度99.9%,美国Fisher Scientific);NHS(N-羟基琥珀酰亚胺,纯度98%,上海麦克林);EDC(1-乙基-(3-二

甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐,纯度98.5%,上海麦克林)

[0061] 本实施例中采用德国Bruker公司Multimode 8原子力显微镜(AFM)观察纳米粒子的微观形貌;日本Jeol公司2100透射电子显微镜(TEM)观察纳米金颗粒;德国Zeiss公司EV018扫描电子显微镜(SEM)观察CNC粒子的微观形貌;德国Bruker公司Tensor27/Hyperion傅里叶变换红外光谱(FTIR)仪测试分析物质官能团;美国TA Instrument公司Q200差示量热扫描仪(DSC)测试吸热峰的变化;德国Netzsch公司TG209F3热重分析仪(TG)测试热分解温度;日本Shimadzu公司UV-1900紫外可见分光光度计测试光谱及姜黄素吸收强度;美国Horiba公司FluoroMax-4荧光光谱仪测试荧光发射光谱;使用英国KratOs公司Axis Ultra DLD X射线光电子能谱仪(XPS)测试光电子能谱;德国Leica公司TCS-SP5激光共聚焦显微镜(CLSM)测试样品的荧光;美国Fluke公司Ti400红外热成像相机记录温度并拍摄热效应照片。

[0062] 实施例中从原料制得双效抗肿瘤药物并发挥疗效的过程如图1所示。首先制得CNC和AuNP(图1中的a~c)。然后通过席夫碱反应将巯基接枝到CNC的表面,将AuNP和CNC-SH混合搅拌,使得AuNP负载在CNC上。随后通过环氧氯丙烷(ECH)将BCD与AuNP-CNC连接,制得AuNP-CNC-BCD(图1中的d)。先接AuNP再用ECH连接BCD,是为了避免巯基被ECH破坏,因此先将AuNP负载上去保护巯基基团。在此之后负载姜黄素,从而获得双效抗肿瘤药物(图1中的g)。在近红外光照射下同时获得热疗效果和化疗疗效(图1中的h)。图1中的i展示了制备过程示意图,CNC作为载体同时负载AuNP和BCD,再由BCD容纳CUR,得到双效抗肿瘤药物AuNP-CNC-BCD/CUR。具体地,图2中显示了制备过程中的详细反应程序。

[0063] 实施例1:基于纳米纤维素载体的双效姜黄素抗肿瘤药物的制备

[0064] (1) CNC(纤维素纳米晶)载体的制备:首先,用粉碎研磨机粉碎棉纤维浆板,使其成为蓬松的棉纤维。将配好的2mol/L过硫酸铵溶液取500mL加热至60℃并持续搅拌,向其中加入5g棉纤维,反应16小时后,将反应液取出离心,并用超纯水洗涤沉淀。转速为每分钟10000转,每次离心15分钟,直到上清液出现淡蓝色为止。保留所有沉淀和最后一次离心得到的淡蓝色上清液,适当稀释后超声分散,使大块的沉淀物分散开。装入透析袋(截留分子量14kDa),用超纯水透析3~4天,每4小时换一次透析用水。最后透析液应当不显示出酸性。将透析袋内的胶状物取出,超声分散3次,每次10分钟,每次间隔5分钟冷却。再次在10000转下离心10分钟,抛弃沉淀,保留上清液。沉淀为未反应完全的大纤维和杂质,上清液即为CNC,保存在4℃冰箱备用。

[0065] (2) AuNP(纳米金颗粒)的制备:将所有玻璃器皿用王水(盐酸:硝酸=3:1,体积比)浸泡至少12小时,然后用乙醇和超纯水反复洗涤。在剧烈搅拌下,将150μL 1M氯金酸溶液与50mL 4.8mM谷胱甘肽溶液混合。混合物在95℃加热反应35分钟。将所得反应液冷却至室温,并在12840g离心力下离心15分钟以除去大的聚集体。将溶液的pH值调节至3~4,并向溶液中加入乙醇(水:乙醇=2:1,体积比),进一步纯化上清液。最后将溶液在4000g离心力下离心5分钟,得到的沉淀就是AuNP,重复多次制备0.2g的AuNP备用。

[0066] (3) AuNP的负载:将步骤(1)制得的CNC取500mL装入1L的锥形瓶中,放在磁力搅拌器上,调节pH至7.5左右。提前测得CNC浓度为固含量0.3%,电导滴定法测得羧基含量为526.67mmol/(kgCNC)。常温下向其中加入0.075g的NHS和0.5g的EDC,搅拌半小时活化羧基,然后再加入0.2gL-半胱氨酸。继续常温搅拌24小时,瓶口不密封,以便过程中产生的气体排

出。透析纯化。透析完成后,超声使纳米颗粒分散。保存在4℃的冰箱里备用,记作CNC-SH。将步骤(2)制得的AuNP取0.16g分散在50mL水中与全部的CNC-SH混合,搅拌30分钟即可完成纳米金颗粒的接枝,得到AuNP-CNC。测得AuNP-CNC的固含量为0.25%,总体积为670mL。

[0067] (4) β CD (β -环糊精)的接枝:向步骤(3)中得到的全部AuNP-CNC溶液中溶解5g β -环糊精,加热至45℃,剧烈搅拌下滴加约10mL环氧氯丙烷,持续反应2小时。反应终止后,将反应液冷却至室温,10000rpm离心10分钟,除去过量的环糊精和环氧氯丙烷。取沉淀透析3~4天进一步纯化。将得到的AuNP-CNC- β CD超声分散,保存在4℃的冰箱里备用。

[0068] (5) 抗肿瘤药物CUR(姜黄素)的负载:取一定量姜黄素粉末溶解在丙酮中,配成浓度大约为1.4mg/mL的溶液。向250mL AuNP-CNC- β CD中逐滴滴入姜黄素的丙酮溶液,直至出现不溶的姜黄素颗粒。在此过程中保持剧烈搅拌,使丙酮挥发。45℃旋蒸,进一步除去丙酮。旋蒸在负压条件下进行,以确保丙酮除尽。将所得混合物6000rpm离心30分钟,除去未包埋的姜黄素,收集上层澄清透明的黄色液体,记为AuNP-CNC- β CD/CUR。所得即为基于纳米纤维素载体的双重疗效姜黄素抗肿瘤药物。

[0069] 性能测试:

[0070] 为了避免纳米金对性能检测与表征造成影响,额外制备了一批没有接枝纳米金的纳米药物,即将实施例1中步骤(2)和(3)去掉,将步骤(4)中的AuNP-CNC用步骤(1)的CNC代替,所得产物记作CNC- β CD/CUR。为了便于探究纳米纤维素的负载和环糊精包埋的作用,又制备了一批环糊精包埋的姜黄素,即将实施例1的步骤(1)-(4)删除,将步骤(5)中的AuNP-CNC- β CD替换为 β CD,所得产物记作 β CD/CUR。

[0071] (1) 微观形貌分析

[0072] 载体以及载体表面上的基团对药物的负载有很大的影响。通过多种电镜手段观察了纳米颗粒的微观形貌。实施例1中制备得到的多种纳米颗粒的微观形貌如图3所示。图3中a为姜黄素粉末的AFM图,粉末难以很好的分散,并团聚在一起成为絮状。从TEM图中可以看出,AuNP是球形的颗粒,直径大约5~8nm(图3中的b)。图3中c(SEM图)和d(AFM图)都可以看出制备的CNC具有针状的形貌。所制备的CNC的长度约为150~300nm,宽度约为10~20nm。这样的直径足以负载制得的纳米金颗粒。经过一系列处理,AuNP-CNC- β CD/CUR的颗粒变成短棒状。根据图3中e、f和g,CNC的结构似乎因接枝改性而略有变化。长度略微减小至约150~200nm,而直径增大至约40nm。长度的减少可能是由于巯基化过程中CNC被部分降解,又或是在纯化的过程中损失了一部分过短的纤维。改性得到的AuNP-CNC- β CD/CUR直径比CNC大,这可能是由多种因素引起的。一方面,席夫碱和环氧氯丙烷分别增加了巯基和 β CD所在支链的链长;另一方面,姜黄素除嵌进 β CD的空腔外,还可能会有一部分被吸附在CNC的表面上。此外,在整个接枝改性的过程中,CNC也可能发生了润涨。在这些因素的共同作用下,AuNP-CNC- β CD/CUR颗粒的直径明显增加,长径比(L/D)从15降低至大约4~5。图3的g中的短杆状纤维上的黑点是CNC负载的AuNP。在透射电镜测试中,电子可以比较容易的穿透质地相对较软的纤维,但却难以穿透质地更硬的金纳米颗粒。所以纳米金会在几乎半透明的纤维图像上非常明显的显现出来。从图中可以看出,金的接枝率并不是很高,单根纤维上大概仅接枝了不到10个纳米金颗粒,有些纤维上只负载了一两个纳米金颗粒,甚至有少量的纤维并没有成功地负载AuNP。从原理上分析,只需大部分纤维上负载了纳米金,就可以在近红外照射下表现出纳米金颗粒的光热效应,达到预期目的。因此,AuNP的接枝达到了负载纳米金的

目的。

[0073] (2) 红外光谱分析

[0074] 通过红外光谱确定所用原料通过化学接枝连接在了载体上,而非物理吸附。实施例1制备得到的纳米颗粒的FTIR光谱如图4所示。

[0075] CUR和 β CD/CUR中,在 1630cm^{-1} 、 1603cm^{-1} 和 1515cm^{-1} 处的峰值对应于姜黄素的苯环震动。除了 β CD和CNC这两个不含姜黄素的样品,其余都在 1515cm^{-1} 位置观察到了一个尖锐的峰,这说明最后的成品AuNP-CNC- β CD/CUR确实含有姜黄素。在 β CD与CUR简单混合的样品中, 1630cm^{-1} 和 1603cm^{-1} 这两个苯环骨架的振动峰被 β CD位于 1635cm^{-1} 的峰的掩盖了。而在 β CD/CUR中,不仅可以看到苯环的振动峰,而且在 1718cm^{-1} 处出现了新的峰,同时 1630cm^{-1} 与 1603cm^{-1} 两处的峰形也略微发生了变化, 1718cm^{-1} 处的峰也在最后的成品中检测到。说明环糊精包封姜黄素不仅仅是物理上的装载,还伴随着化学变化, 1718cm^{-1} 处的新峰极可能是两者相互作用导致的。同时也证明了姜黄素成功地与CNC- β CD结合。在CNC-SH的曲线上可以看到 $1650\sim 1610\text{cm}^{-1}$ 有一个宽峰,这对应着C=O伸缩振动和席夫碱的C=N,两者共轭,所以峰形变宽。接枝 β -环糊精时使用的环氧氯丙烷使C=N双键打开成为单键,破坏了共轭,C=O的峰形随之变窄并偏移到了 1632cm^{-1} 。这说明巯基的接枝是成功的,且后续步骤不会使含有巯基的支链断开。

[0076] (3) 热性能测试

[0077] 热性能测试是为了进一步确认CUR与CNC、环糊精的结合方式。

[0078] 通过DSC测量在升温过程中的吸热和放热行为,可以探究各个组分之间的热力学相互作用,从而确定姜黄素是否成功的嵌入进 β -环糊精的空腔。实施例1中制备得到的各种粒子的DSC曲线如图5所示。 β CD和CUR分别在 148°C 和 179°C 出现单一的吸热峰, 179°C 应当为所用姜黄素的熔点。两者混合物的吸热峰也在这两个温度,说明简单的混合仅仅是两者的简单叠加,不能达到包埋的目的。包合物 β CD/CUR的曲线形状与上述三者都不同,在 130°C 出现一个较宽的吸热峰,在 220°C 还有一个尖锐的吸热峰。这两个吸热峰表明环糊精与姜黄素分子之间存在热力学相互作用,改变了吸热温度,证实姜黄素被包封在 β CD的空腔内。CNC在 130°C 和 200°C 出现两个吸热峰,CNC与 β CD/CUR的混合物也在同样的温度出现吸热峰,只不过峰形变宽。而CNC- β CD/CUR仅有一个 124°C 的吸热峰,表明接枝后的产物热力学性质发生了改变; 200°C 左右的峰消失应当是热稳定性变强,分解吸热产生的吸热峰转移到了 300°C 以上,超出了仪器的检测能力。

[0079] 实施例1中制备得到的粒子的TG和DTG曲线如图6所示。在 100°C 时,CNC、 β CD/CUR与CNC- β CD/CUR的失水量分别为 2.57% 、 5.27% 、 3.15% 。包合物 β CD/CUR含水量最高,表明包合物整体高度亲水,姜黄素的亲水性得到巨大改善。相比于CNC,CNC- β CD/CUR表面拥有更多的亲水基团,因此接枝 β CD后的产物比未接枝的CNC更加亲水。对比TG的曲线可以发现,CNC和 β CD/CUR的初始分解温度分别为 167°C 和 196°C ,接枝后的产物升高到了 230°C 。 β CD/CUR的热分解只有一个阶段,表明环糊精与姜黄素在包合后两者分子间存在热力学相互作用, β CD与CUR两者并没有单独发生热分解。CNC和CNC- β CD/CUR的热分解都有两个阶段,对应于DTG曲线上的两个峰。CNC的最大降解速率出现在 204.7°C 和 258.6°C ,CNC- β CD/CUR出现在 314.8°C 和 330.8°C 。显然接枝后的产物的耐热性得到了明显提高。温度较低的第一个热分解阶段对应着纤维的缺陷部位和无定形区的分解,温度较高的第二阶段对应其余部分的分解。相

较而言缺陷部位纤维排列没那么规整,更容易断开,也更容易在这些位置上进行接枝。改性后该区域的无序度下降,耐热性得到提高。此外,314.8℃也是BCD/CUR的最大分解速率所对应的温度,这表明,CNC-βCD/CUR第一阶段的分解以BCD/CUR的分解为主。考虑到接枝后纳米纤维的分解温度大幅提高,接枝应当主要发生在CNC的缺陷部位和无定形区,这些区域的纤维素链断开,并在这些位置接枝了环糊精。

[0080] 综合热分析的结果可知,常用的121℃灭菌过程不会对产物纳米药物的热稳定性产生影响。

[0081] (4)姜黄素的光学性能

[0082] 在合成过程中保持姜黄素的光学特性是保证姜黄素疗效的重要前提。姜黄素作为一种稳定性并不良好的药物,保持它的结构不发生变化是姜黄素药物利用中必须要注意的事情。当其结构发生变化时,光学特性会随之改变。反之,光学性能不发生改变则意味着姜黄素结构没有发生改变。通过紫外可见光谱和荧光光谱对比了CUR、AuNP、AuNP-CNC-βCD/CUR的光学特性。

[0083] 实施例1中制备得到的产物的光学特性如图7所示,图7的a为紫外可见吸收光谱的结果,图7的b为荧光发射光谱。结果非常明显,姜黄素的紫外吸收特性和荧光特性均没有明显改变,在整个制备过程中很好的保留了姜黄素的有效性。姜黄素在水中和乙醇中的紫外吸收峰值都是425nm,在425nm的激发波长照射下荧光发射光谱的峰值位于533nm。在紫外吸收光谱和荧光发射光谱中,姜黄素的峰位置都没有发生变化,这意味着药物制备过程保留了姜黄素的光学特性,姜黄素的结构没有发生变化,AuNP-CNC-βCD/CUR上负载的姜黄素具有和游离姜黄素一样的生化功能和药用价值。

[0084] 另外,由图7的a可知,AuNP在283nm处有一个平缓的吸收峰,接枝到CNC上后,除了283nm有吸收峰外,在804nm出现了一个新的吸收峰。可能存在一部分AuNP在与CNC接枝的过程中发生了聚集,团聚与分散的AuNP具有不同的光学特性,导致了这一变化。804nm处于近红外区,此处的吸收为光热疗法的应用提供了条件。283nm附近的紫外吸收表明所制得的AuNP粒径大约为5nm,与TEM的结果相一致。

[0085] (5)XPS分析

[0086] 为了探究纳米纤维与纳米金粒子之间的相互作用,对AuNP-CNC-βCD/CUR进行了X射线光电子能谱分析。0~1100eV范围内的全谱结果如图8的a所示,出现了O、C、S、Au元素的谱峰。图8的b显示了Au的精细能谱。由于Au 4f能级的自旋轨道分裂,83.7eV和87.5eV分别对应于Au 4f_{7/2}和Au 4f_{5/2}。0价金属Au的特征峰值在84.0eV和87.7eV,实际测得的值与之相比发生了负偏移,这是由电子从纤维向转移AuNP引起的,表明样品中的Au是-1价,样品中存在Au-S键。

[0087] (6)荧光照片

[0088] 为了使AuNP-CNC-βCD/CUR纳米复合药物的荧光效应更加直观,用激光共聚焦显微镜拍摄了AuNP-CNC-βCD/CUR纳米粒子发出的荧光,结果由图9展示。在微弱自然光的明场环境中检测不到荧光,在暗场中以408nm激光照射AuNP-CNC-βCD/CUR纳米复合药物可以看到非常明亮的绿色荧光。将样品充分稀释之后,视野中只能观察到很弱的荧光,仅能看到几个绿色的亮点。这些亮点是少量团聚的纳米颗粒发出的荧光。照片清晰的展现了纳米药物本身所具有的明亮荧光,这为后续的细胞实验提供了便利,不必额外引入荧光物质即可成像。

[0089] (7)姜黄素水溶性的增强及姜黄素负载量分析

[0090] 实施例1中制备过程中关键步骤结果的实物照片由图10的a~e展示。从图中可以看出,姜黄素粉末几乎完全不溶于水,震荡后静置多日也仅能以颗粒状态分散在水中,溶解度极低。包埋姜黄素后, β CD/CUR表现出良好的水溶性。这是由于构成 β -环糊精的葡萄糖分子的C6位羟基都排列在外壁,使得环糊精高度亲水,表现出较强的极性;包埋之后极性的环糊精包裹住了非极性的姜黄素,使得姜黄素的非极性特征被掩盖,这在某种程度上改变了姜黄素的非极性状态。环糊精包埋姜黄素的验证性实验制得的 β CD/CUR证实了包埋可以显著提高姜黄素的水溶性,水溶液澄清透明。CNC先后接上AuNP和 β CD之后,外观没有发生明显变化,仍为淡蓝色的液体。最后负载了姜黄素后成为黄色液体,虽然不如 β CD/CUR清澈,但仍然有较高的透明度。

[0091] 实施例1中制备得到的产物的姜黄素负载量如下表1所示。为了测量姜黄素的负载量,分别用甲醇和乙醇稀释AuNP-CNC- β CD/CUR,使姜黄素全部溶出,离心除去纳米粒子后,用紫外分光光度计测算姜黄素的含量。用甲醇或乙醇稀释之后,需要离心或用针筒注射器过膜将纳米粒子除去,避免将纳米粒子吸收的紫外线错误地算作姜黄素的紫外吸收。用两种溶剂充分稀释后测得的姜黄素的含量基本一致,为43.9 μ g/mL。样品的浓度为1.4mg/mL(固含量约为0.14% (w/w)),可以算得姜黄素的负载量为31.4 μ g/mg。

[0092] 表1姜黄素水溶性的增强

稀释溶剂	标准方程 (0.01~5 M)	稀释倍数	425 nm 紫外吸光度	AuNP-CNC- β CD/CUR 中 CUR 的浓度 (μ g/ml)
[0093] 甲醇	$y=0.1648x+0.00803$ $r^2=0.99996$	16	0.460	43.881
乙醇	$y=0.17736x+0.00851$ $r^2=0.99996$	30	0.286	43.892

[0094] 实施例1中制备得到的产物的姜黄素最终浓度及与其他载体类体系的对比如下表2所示。将部分样品在常温下旋蒸,当AuNP-CNC- β CD/CUR液体的总体积减少三分之二时仍没有固体析出,AuNP-CNC- β CD对CUR的负载是比较稳固的。浓缩后体系中姜黄素的浓度为131.7 μ g/mL,高于其他载体类体系。

[0095] 表2姜黄素溶解度与文献报道结果的比较

	配方	载体	姜黄素浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	参考文献
[0096]	1 微球	海藻酸盐和氯化钙	20.0	1
	2 蛋白质负载 CUR	豌豆蛋白或乳清蛋白	75.0	2
	3 CUR/ β CD/CNC 复合物	功能化的 β -CD 和 CNC	101.3	3
	4 聚合物-CUR 结合	海藻酸钠形成的聚合物	109.0	4
	5 CNC 负载 AuNPs/ β CD, β CD 再包埋 CUR	纤维素纳米晶	131.7	本发明

[0097] 其中,参考文献1、2、3、4分别如下:

[0098] 【1】Liandong Hu,Kong Dongqian,Hu Qiaofeng,et al.Preparation and optimization of a novel microbead formulation to improve solubility and stability of curcumin[J].Particulate Science and Technology,2017,35(4):448-454.

[0099] 【2】Umesh Kannamangalam Vijayan,Shah Nirali-Nitin,Muley Abhijeet-Bhimrao,et al.Complexation of curcumin using proteins to enhance aqueous solubility and bioaccessibility:Pea protein vis-à-vis whey protein[J].Journal of Food Engineering,2021,292110258.

[0100] 【3】Gautier-M-A-Ndong Ntoutoume,Granet Robert,Mbakidi Jean-Pierre,et al.Development of curcumin-cyclodextrin/cellulose nanocrystals complexes:New anticancer drug delivery systems[J].Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters, 2016,26(3):941-945.

[0101] 【4】SDey,Sreenivasan K.Conjugation of curcumin onto alginate enhances aqueous solubility and stability of curcumin[J].Carbohydr Polym,2014,99499-507.

[0102] (8) 制剂的稳定性及姜黄素的释放

[0103] 实施例1中制备得到的产物的姜黄素在水和PBS中的稳定性曲线以及与其它文献(文献5(Ngwabebhoh-F Asabuwa,Ilkar Erdagi-S,Yildiz U.Pickering emulsions stabilized nanocellulosic-based nanoparticles for coumarin and curcumin nanoencapsulations:In vitro release,anticancer and antimicrobial activities [J].Carbohydr Polym,2018,201317-328.)、文献6(Rohan-V Tikekar,Pan Yuanjie,Nitin N.Fate of curcumin encapsulated in silica nanoparticle stabilized Pickering emulsion during storage and simulated digestion[J].Food Research International,2013,51(1):370-377.)、文献7(Bakht-Ramin Shah,Li Yan,Jin Weiping, et al.Preparation and optimization of Pickering emulsion stabilized by chitosan-tripolyphosphate nanoparticles for curcumin encapsulation[J].Food Hydrocolloids,2016,52369-377.)、文献8(Surya-Prakash Singh,Alvi Syed-Baseeruddin,Pemmaraju Deepak-Bharadwaj,et al.NIR triggered liposome gold

nanoparticles entrapping curcumin as in situ adjuvant for photothermal treatment of skin cancer[J].*International Journal of Biological Macromolecules*,2018,110375-382.)的对比由图11展示。将AuNP-CNC- β CD/CUR用水和pH 6.8的0.1M PBS缓冲液稀释10倍,在避光常温条件下的稳定性较好。PBS缓冲液中的姜黄素含量略有下降,但48小时后仍剩余约96%,这说明在弱酸性的PBS缓冲液中有少量姜黄素析出或分解变性了。与其他报道(文献5、文献6、文献7、文献8)相比,本发明的稳定性更好。同时这也证明了在一定范围内稀释并不会降低纳米颗粒负载姜黄素的稳定性。

[0104] 实施例1中制备得到的产物的姜黄素在不同条件下的释放对比曲线以及释放前后对比图如图12,其中(a)为37℃下不同pH的释放,(b)为pH=6.8下不同温度的释放,(c)为与其他文献报道(文献3(Gautier-M-A-Ndong Ntoutoume,Granet Robert,Mbakidi Jean-Pierre,et al.Development of curcumin-cyclodextrin/cellulose nanocrystals complexes:New anticancer drug delivery systems[J].*Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters*,2016,26(3):941-945.)、文献9(Xingyi Li,Nan Kaihui,Li Lingli,et al.In vivo evaluation of curcumin nanoformulation loaded methoxy poly(ethylene glycol)-graft-chitosan composite film for wound healing application[J].*Carbohydrate Polymers*,2012,88(1):84-90.)、文献10(Xingyi Li,Chen Shuo,Zhang Binjun,et al.In situ injectable nano-composite hydrogel composed of curcumin, N,O-carboxymethyl chitosan and oxidized alginate for wound healing application[J].*Int J Pharm*,2012,437(1-2):110-119.)、文献11(Sevil-Vaghefi Moghaddam,Abedi Fatemeh,Alizadeh Effat,et al.Lysine-embedded cellulose-based nanosystem for efficient dual-delivery of chemotherapeutics in combination cancer therapy[J].*Carbohydrate Polymers*,2020,250116861.)、文献12(Bin Li, Konecke Stephanie,Wegiel Lindsay-A,et al.Both solubility and chemical stability of curcumin are enhanced by solid dispersion in cellulose derivative matrices[J].*Carbohydrate Polymers*,2013,98(1):1108-1116.)、文献13(ChJ Pan,Tang J-J,Weng Y-J,et al.Preparation,characterization and anticoagulation of curcumin-eluting controlled biodegradable coating stents[J].*J Control Release*,2006,116(1):42-49.))结果的释放率对比,(d)为释放前后的实物照片对比。在含有15%乙醇的磷酸缓冲盐溶液中研究了姜黄素的释放。PBS中加入一些乙醇是为了满足漏槽条件。在体外释放实验中,较高的温度和较低的pH有利于姜黄素释放。在较高的温度下,分子热运动得到加强,促进了姜黄素的释放。在37℃下,pH 5.5时的最高点超过了80%;在pH 6.8进行实验时,44℃时的最高点也接近了77%,释放率比较高,姜黄素的释放比较完全。从图中可以看到释放曲线在约10小时内达到最高点后反而逐渐下降,相比最大释放量降低约3.2%~4.5%,与稳定性实验中48小时降低约4%在大致相同的范围内。因此,释放曲线后半段的下降可以归因于PBS缓冲液对溶解在其中的姜黄素的影响。从图12的d中可以比较直观的看出释放前后载药纳米颗粒AuNP-CNC- β CD/CUR的颜色变化。释放后姜黄素分散在溶出介质中成为浓度很低的稀溶液,很难看出姜黄素所具有的黄色。透析袋内的纳米纤维黄色消退,仅有很浅的淡黄色残留,也比较直观的说明姜黄素释放比较完全。与其他报道相比,本发明的释放率更高。

[0105] (9) 光热效应

[0106] 为了评估光热转换效率,用 $0.5\text{W}/\text{cm}^2$ 和 $0.8\text{W}/\text{cm}^2$ 两种功率密度的808nm近红外激光照射AuNP-CNC- β CD/CUR液滴。测试示意图由图13的a展示。从图13的b中可以非常直观的看到,液滴被 $0.8\text{W}/\text{cm}^2$ 的激光照射后表现出了比较明显的热效应。从图13的c中的曲线对比可以发现,固含量相同的CNC被 $0.8\text{W}/\text{cm}^2$ 的激光照射10分钟后温度仅从 17.4°C 上升到了 26.7°C ,远低于AuNP-CNC- β CD/CUR的光热效应。表明负载的纳米金表现出了较高的光热转换效率。结合姜黄素的释放行为,可以确认近红外热疗可以促进CUR的释放。显然,随着激光照射持续时间的延长,AuNP-CNC- β CD/CUR的姜黄素释放率也会进一步提高。这表明AuNP-CNC- β CD/CUR上负载的CUR的释放在一定程度上具有可控性,这有利于增加局部药物浓度和改善姜黄素的生物利用度。这是一种可以同时具备热疗和化疗双重疗效的纳米药物。

[0107] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

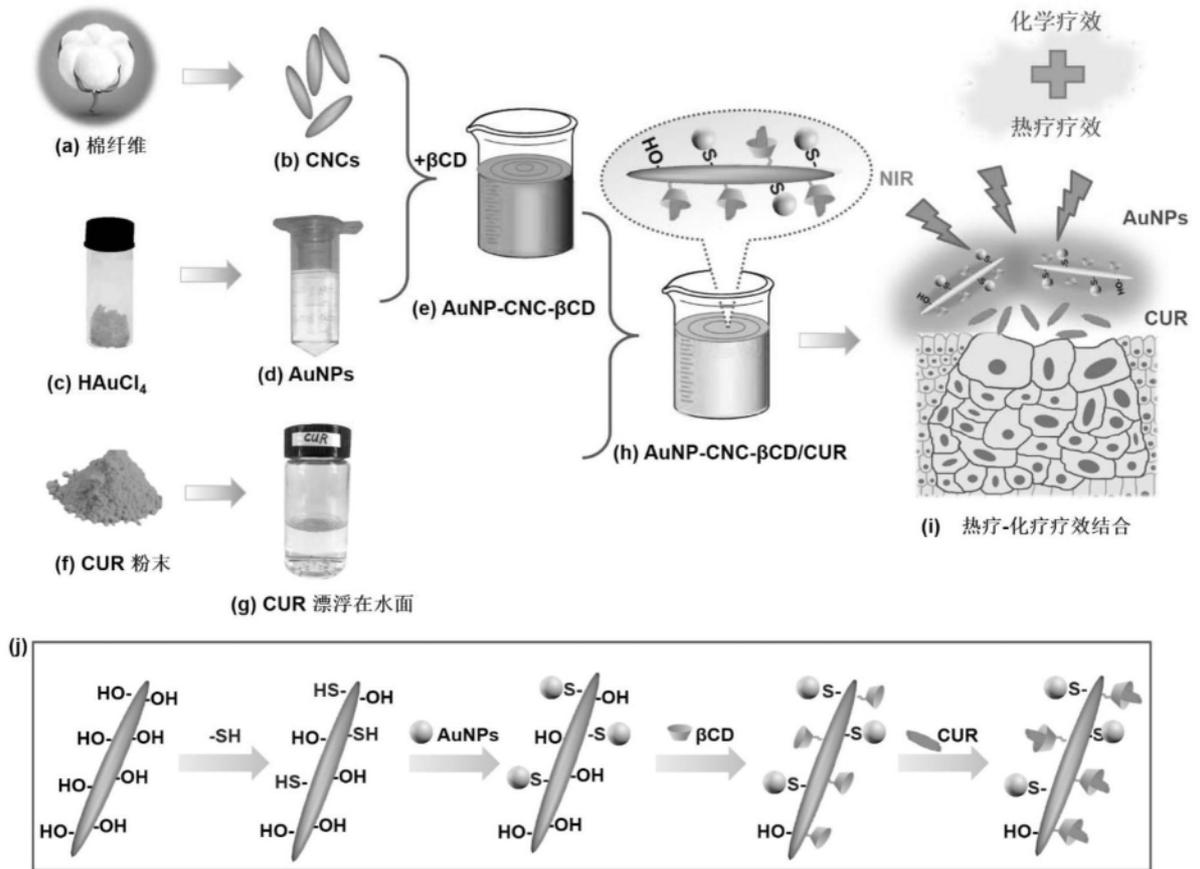


图1

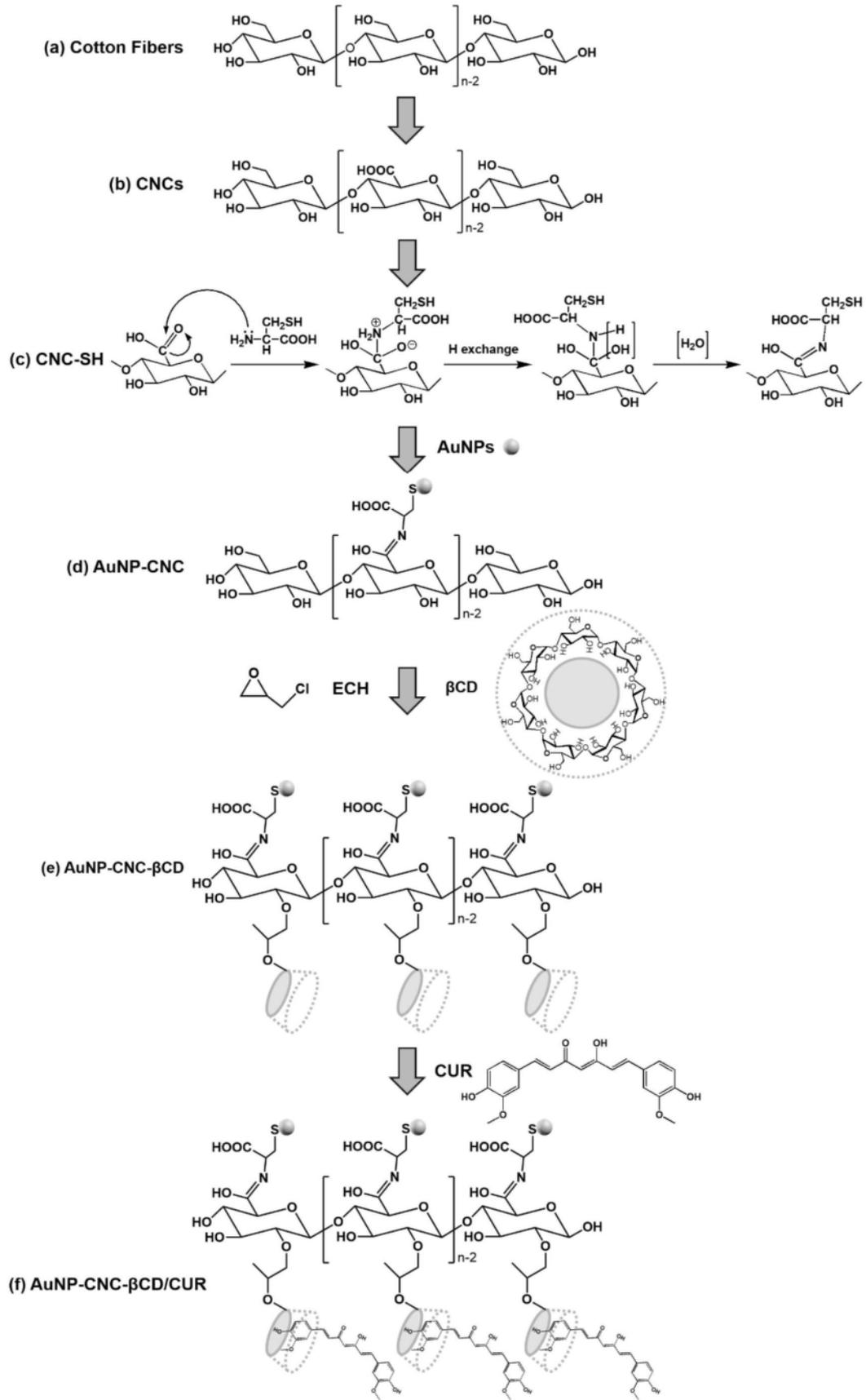


图2

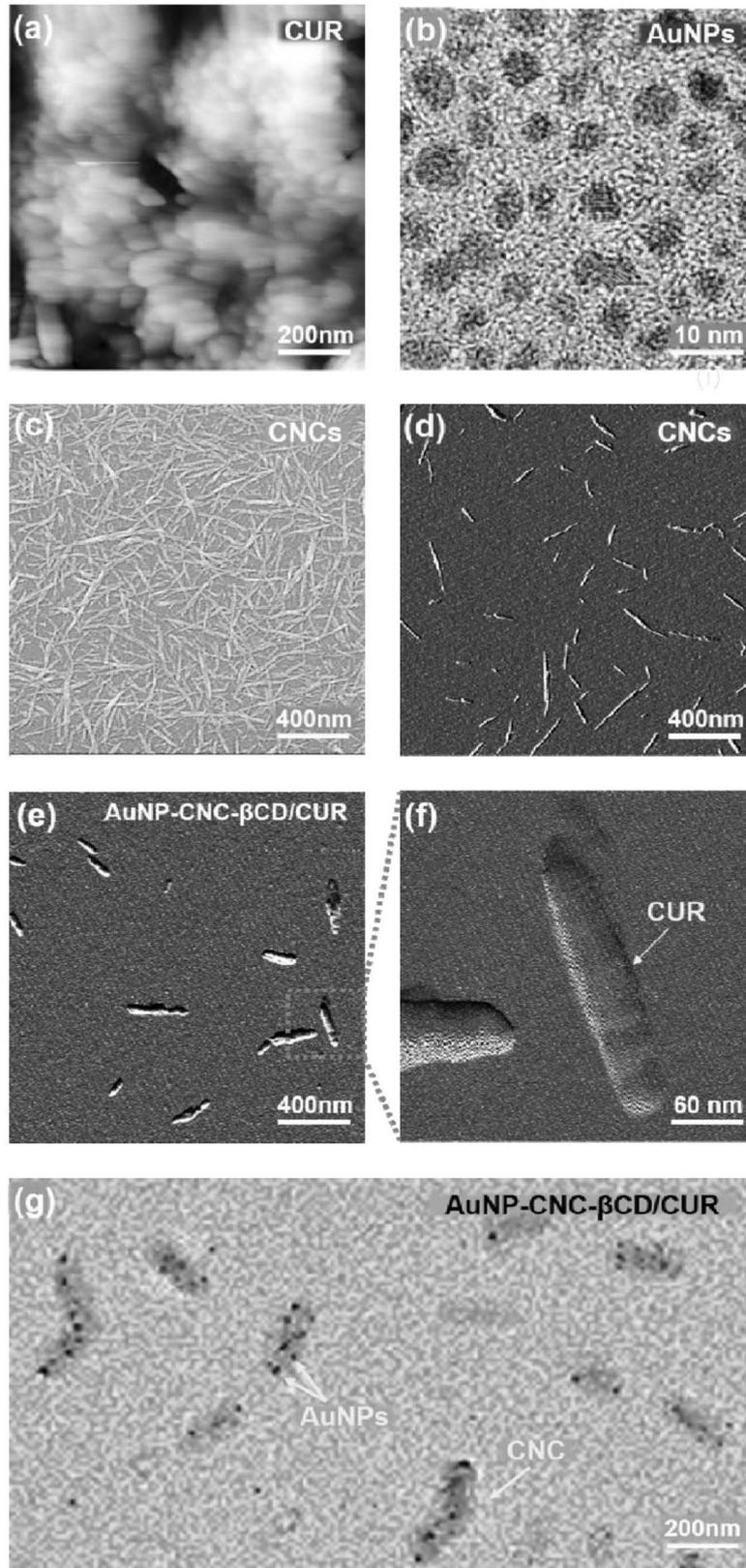


图3

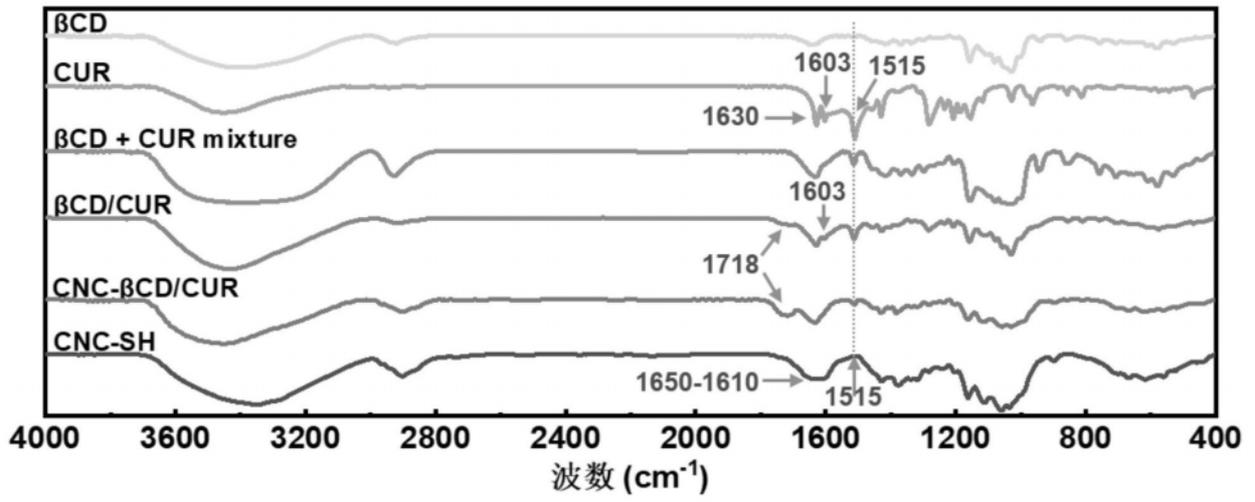


图4

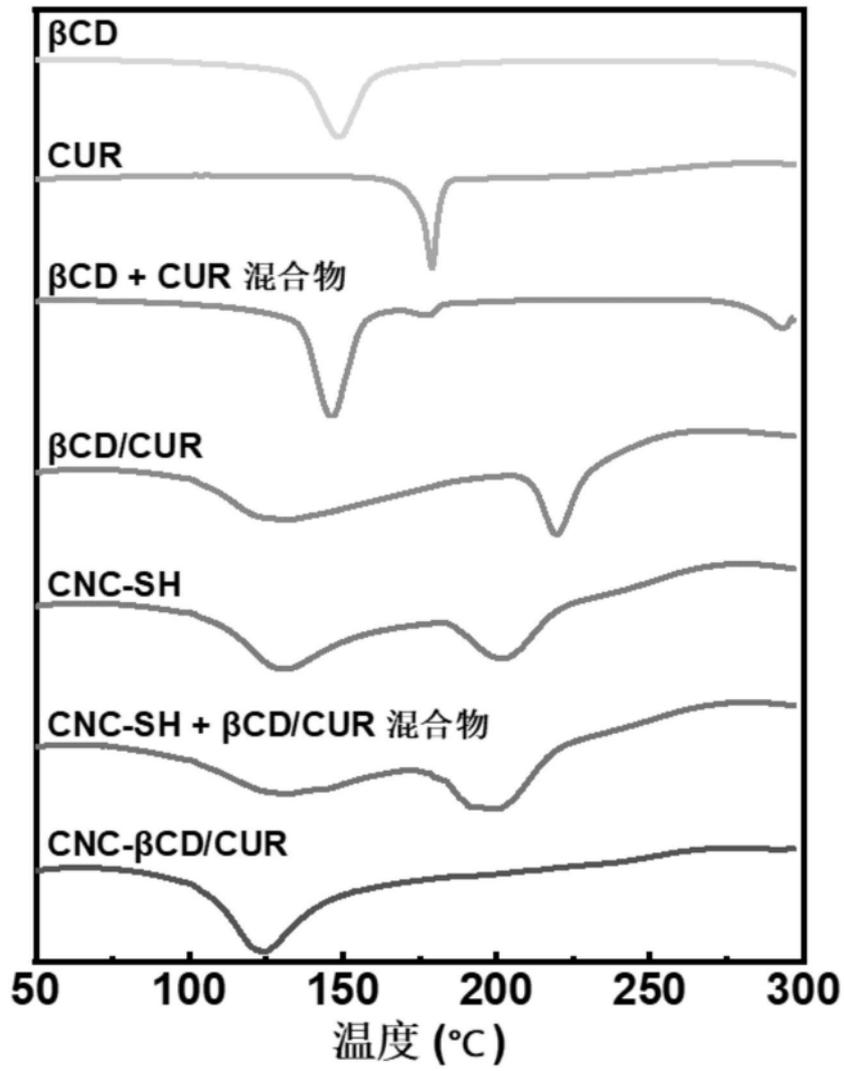


图5

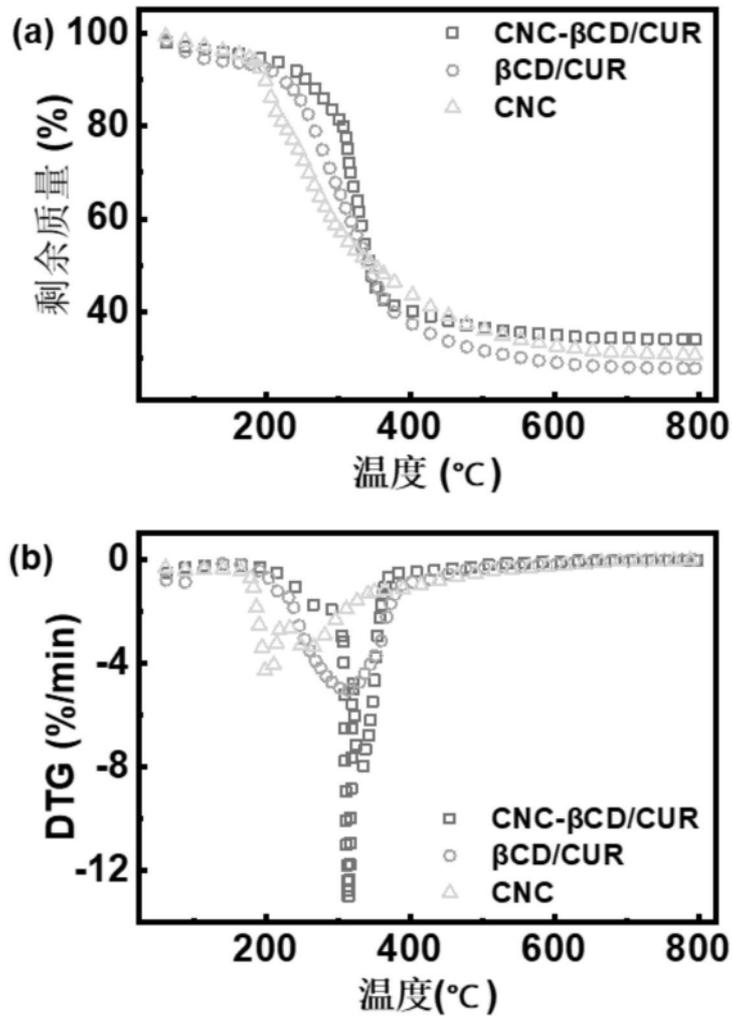


图6

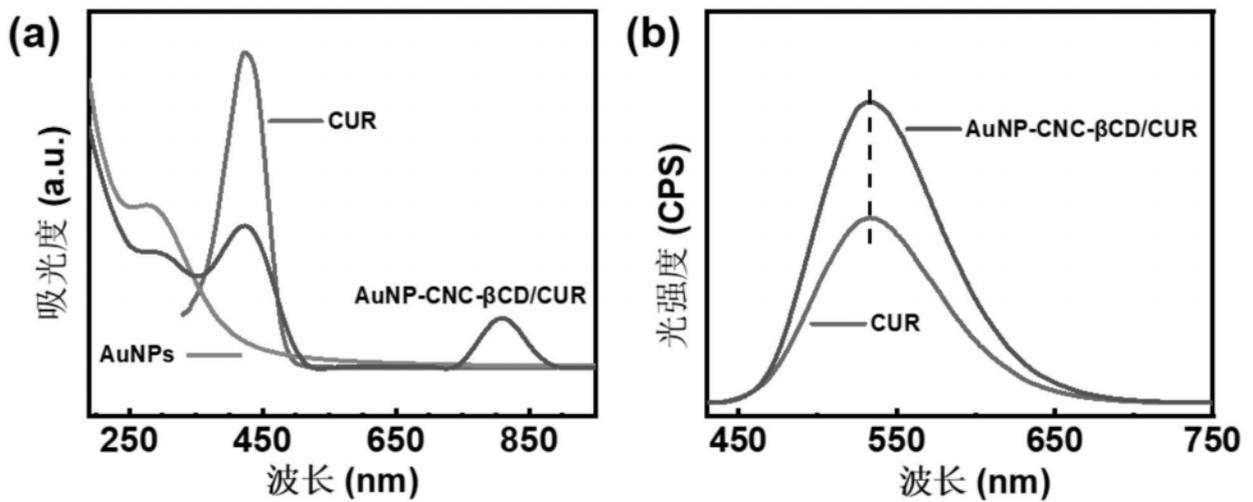


图7

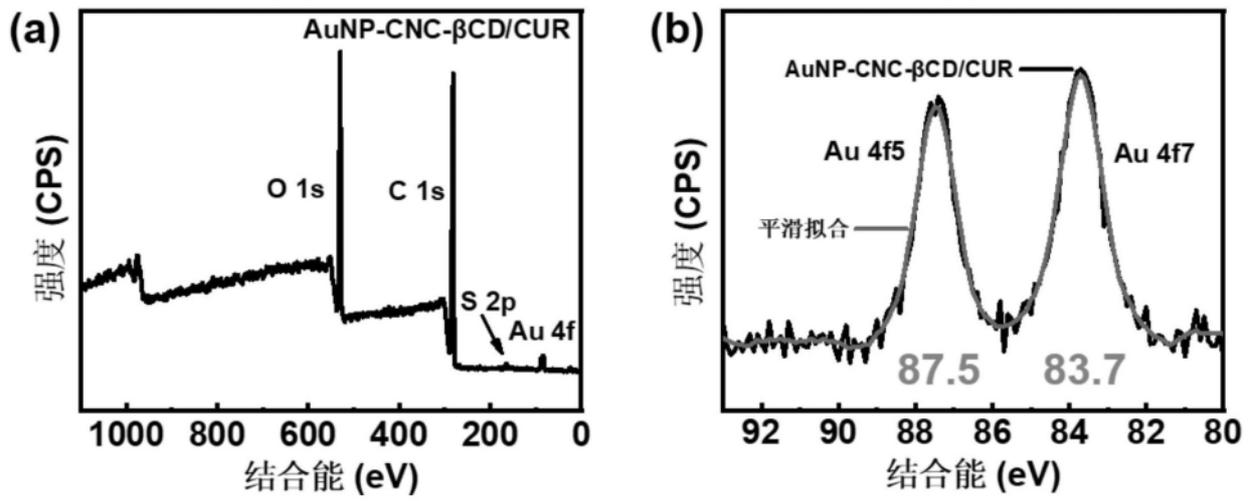


图8

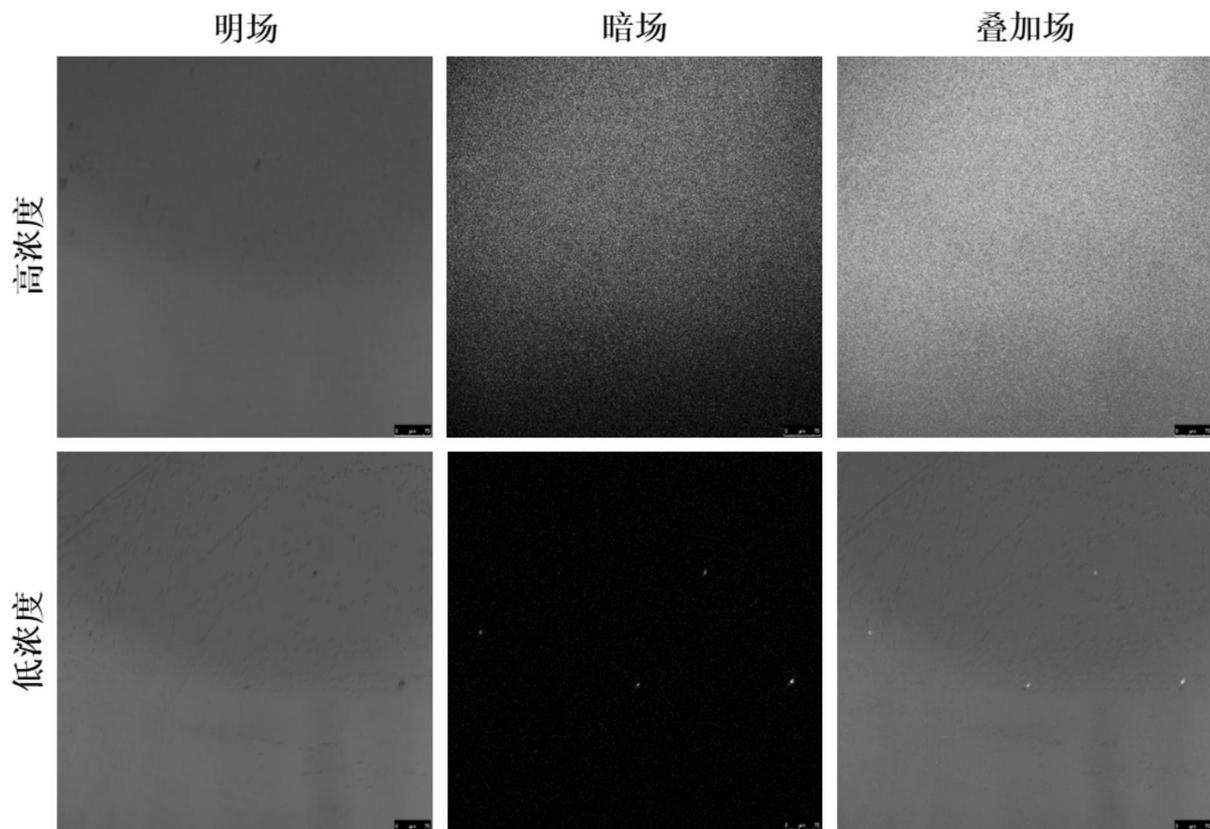


图9

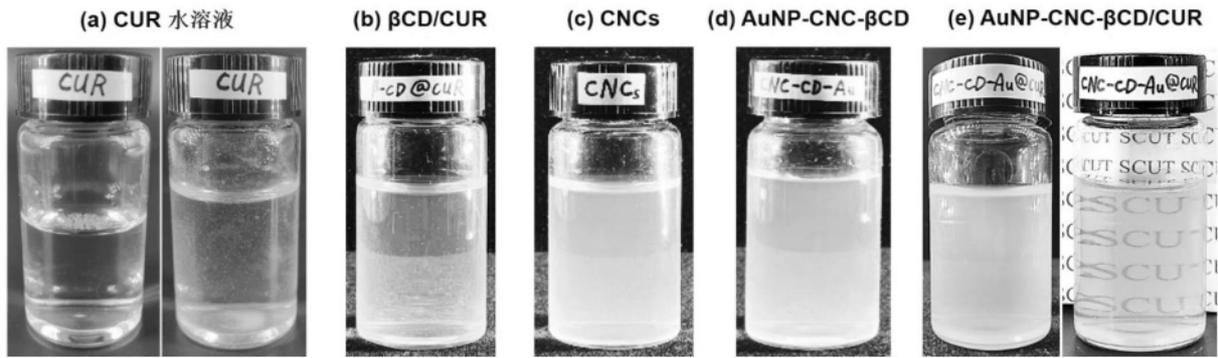


图10

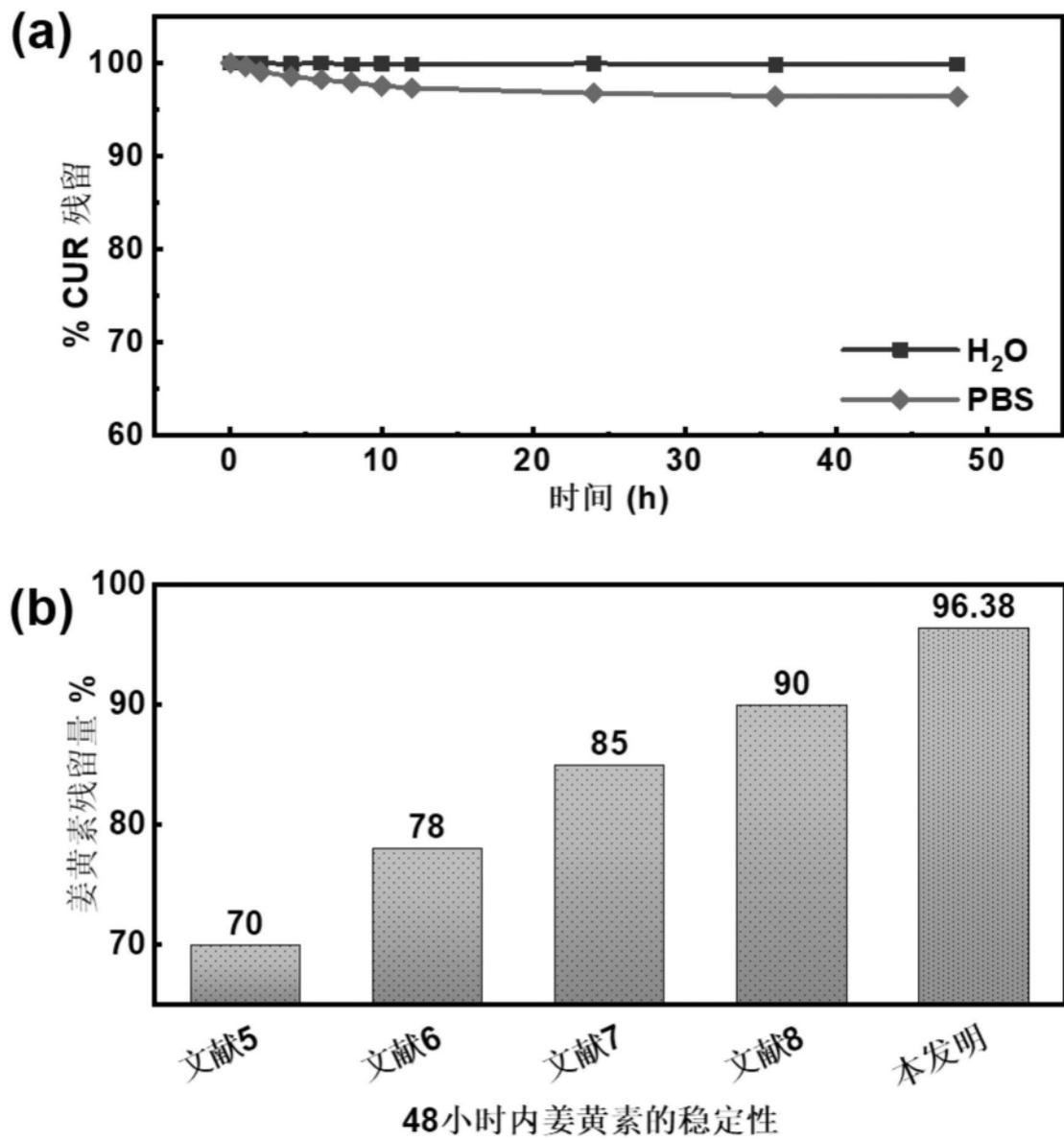
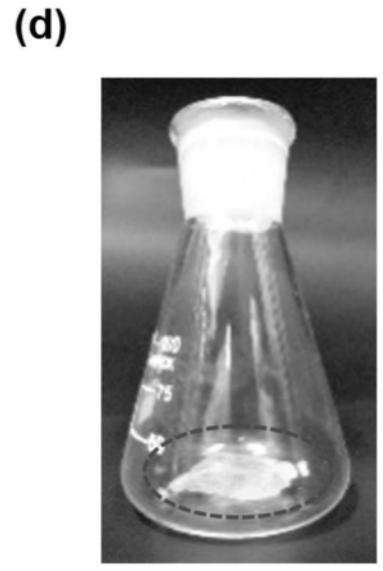
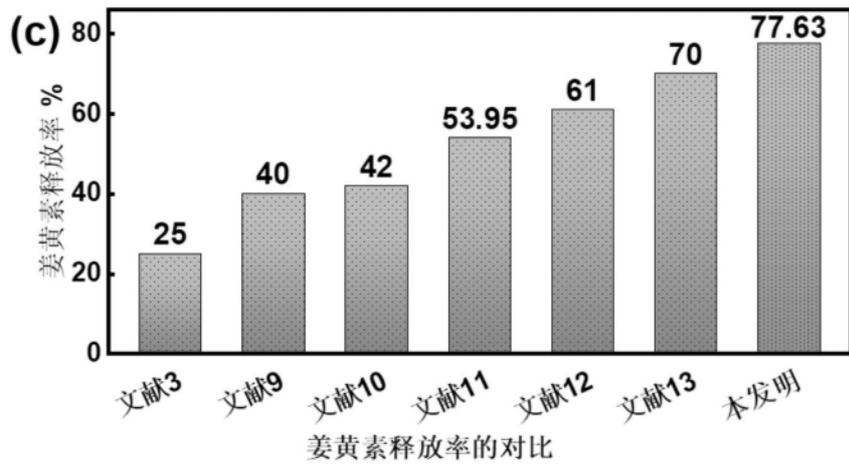
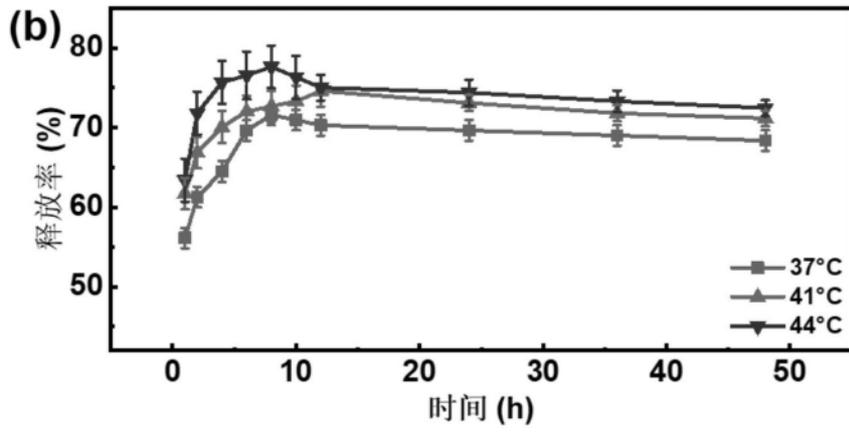
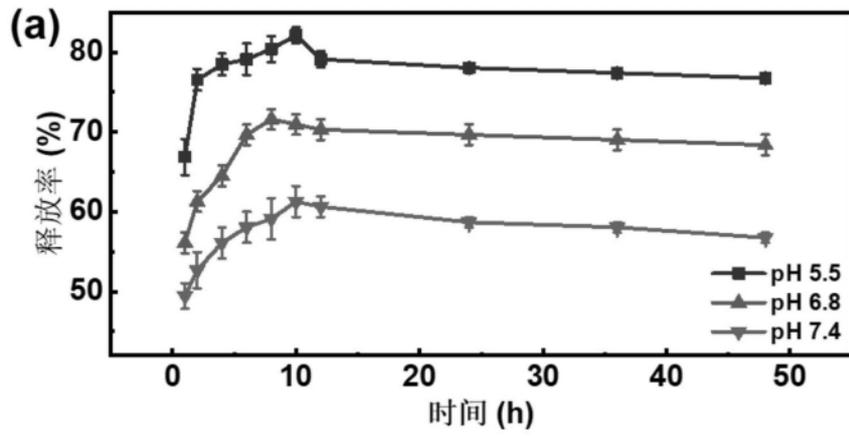


图11



20°C, pH6.8
释放前



44°C, pH6.8
释放后

图12

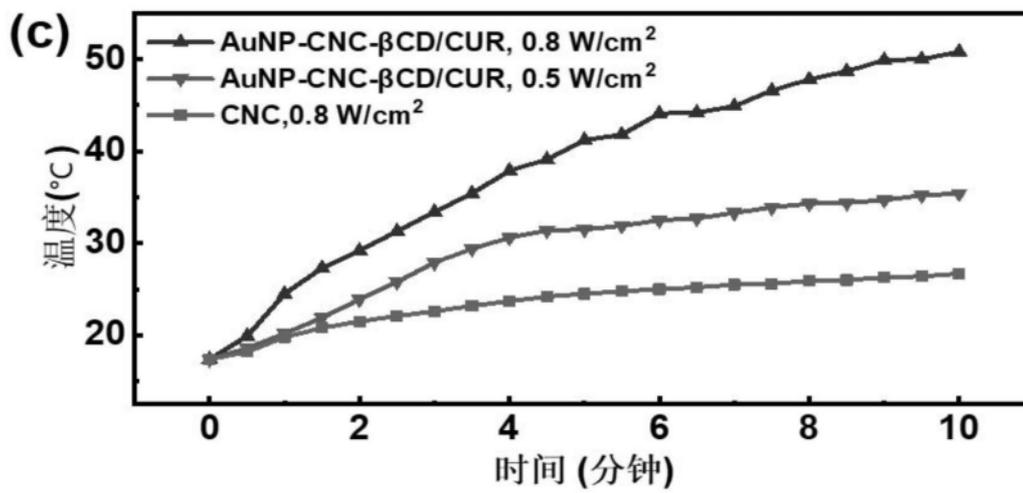
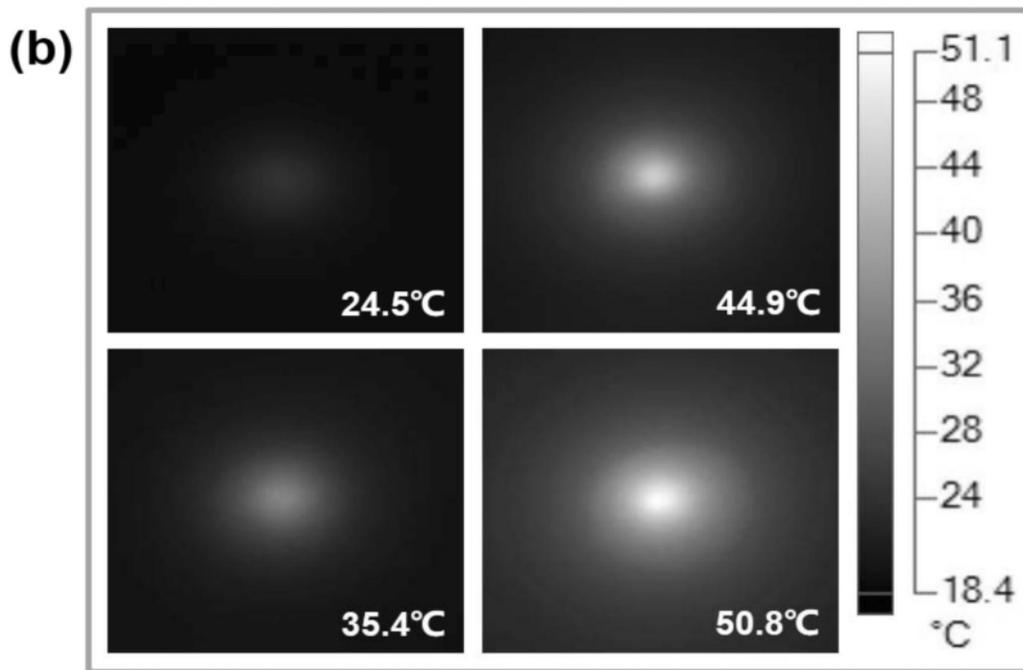
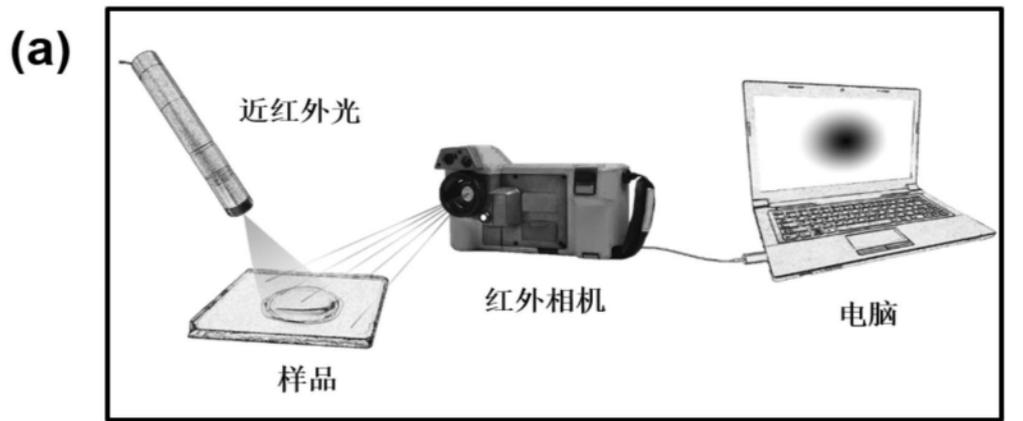


图13