

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C08B 37/08 (2006.01)

A61K 31/722 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200510095442.X

[45] 授权公告日 2007 年 10 月 10 日

[11] 授权公告号 CN 100341900C

[22] 申请日 2005.11.16

[21] 申请号 200510095442.X

[73] 专利权人 中国药科大学

地址 210009 江苏省南京市童家巷 24 号

[72] 发明人 平其能 张 灿 丁 娅 朱 贤

[56] 参考文献

CN-1587281A 2005.3.2

CN-1266922A 2000.9.20

CN-1456576A 2003.11.19

US-4921949A 1990.5.1

New method for the quaternization of chitosan Domard A. et al, Int. J. Biol. Macromol, Vol.5 1986

审查员 孙丽芳

[74] 专利代理机构 南京苏科专利代理有限责任公司

代理人 孙立冰

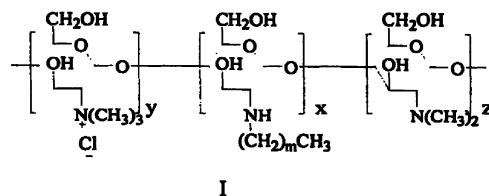
权利要求书 2 页 说明书 8 页

[54] 发明名称

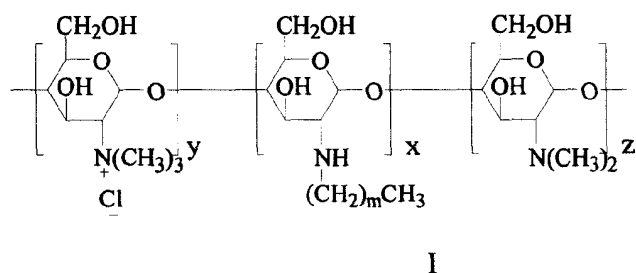
季铵化壳聚糖衍生物、其制备方法及其含其的药物制剂

[57] 摘要

本发明涉及高分子化学领域及药用辅料领域。具体涉及一类季铵化壳聚糖衍生物，尤其是能形成两亲性聚合物分子的季铵化壳聚糖衍生物 I，其能对难溶性药物具有增溶作用，并且载药后形成的胶束粒径小，约为 50nm。本发明还公开了这类衍生物的制备方法、其作为难溶性药物增溶剂的作用以及含其的药物组合物。



1、下列结构式 I 的季铵化壳聚糖衍生物:



粘均分子量为 5~200 万, 其中表示取代度的 y 、 x 、 z 分别是 20~55%、8~50%、5~30%;
脱乙酰度为 90~98%; $m=6\sim11$ 。

2、权利要求 1 的季铵化壳聚糖衍生物, 其中 $m=7$ 。

3、权利要求 1 的季铵化壳聚糖衍生物的制备方法, 包括:

a、取壳聚糖加入甲醇或乙醇中, 搅拌, 加入 7~12C 的长链烷基醛, 反应 2~48 小时后, 还原, 继续搅拌 8~24 小时, 生成 N-长链烷基壳聚糖;

b、取 N-长链烷基壳聚糖加入 *N*-甲基吡咯烷酮、KI、NaOH 水溶液和碘甲烷, 充分搅拌下升温至 45-80°C 反应, 冷却, 离心, 收集下层固体溶于蒸馏水中, 透析, 滤去不溶物后将滤液干燥, 得 N-长链烷基-N-季铵化壳聚糖 I。

4、权利要求 3 的制备方法, 包括:

a、取壳聚糖加入甲醇中室温搅拌, 加入 8~12C 的长链烷基醛, 反应 2~24 小时后, 加入 KBH_4 水溶液还原, 继续搅拌 10~11 小时, 生成 N-长链烷基壳聚糖;

b、取 N-长链烷基壳聚糖加入 *N*-甲基吡咯烷酮、KI、NaOH 水溶液和碘甲烷, 60°C 搅拌反应 1~2.5 h, 冷却至室温, 将反应混合物离心 30 min, 收集下层固体溶于 NaCl 溶液中, 搅拌置换碘离子, 用截流分子量为 10000 透析袋透析, 滤去不溶物后将滤液冷冻干燥, 制得 N-长链烷基-N-季铵化壳聚糖 I。

5、权利要求 3 或 4 的制备方法, 还包括:

将 b 步骤制得的 N-长链烷基-N-季铵化壳聚糖加入 *N*-甲基吡咯烷酮、KI、NaOH 水溶液和碘甲烷, 反应, 再加入 NaOH、碘甲烷继续反应, 将反应混合物离心, 收集下层固体溶于 NaCl 溶液中, 搅拌置换碘离子后, 透析, 滤去不溶物后将滤液干燥即得 I。

6、权利要求 5 的制备方法, 包括:

将 b 步骤制得的 N-长链烷基-N-季铵化壳聚糖加入 *N*-甲基吡咯烷酮、KI、NaOH 水溶液和碘甲烷, 60°C 搅拌反应 1~2.5 h, 再加入 NaOH, 碘甲烷继续反应 1 h, 冷却至室温, 将反应混合物离心 30 min, 收集下层固体溶于 NaCl 溶液中, 搅拌置换碘离子, 用截流分子量为 10000 透析袋透析, 滤去不溶物后将滤液冷冻干燥, 即得 I。

- 7、一种药物组合物，含有治疗有效量的难溶性药物及权利要求 1 的季铵化壳聚糖衍生物 I。
- 8、权利要求 7 的药物组合物，其中难溶性药物是喜树碱、紫杉醇或多烯紫杉醇。
- 9、权利要求 7 的药物组合物，其中难溶性药物与季铵化壳聚糖衍生物 I 的重量比为 1：1~20。

季铵化壳聚糖衍生物、其制备方法及其含其的药物制剂

技术领域

本发明涉及高分子化学领域及药用辅料领域。具体涉及一类季铵化壳聚糖衍生物，尤其是能形成两亲性聚合物分子的季铵化壳聚糖衍生物及其制备方法，还涉及其作为难溶性药物增溶剂的作用以及含其的药物组合物。

背景技术

表面活性剂胶束增溶是药物制剂中常用的提高难溶性药物溶解度的手段，例如，紫杉醇、多烯紫杉醇均为难溶性的抗肿瘤药物，临床上分别使用聚氧乙烯蓖麻油和吐温-80 增溶，临用时稀释供静脉注射。但出于这些表面活性剂的特性，这类含有大量表面活性剂的注射剂可以引起一些患者的严重过敏反应。

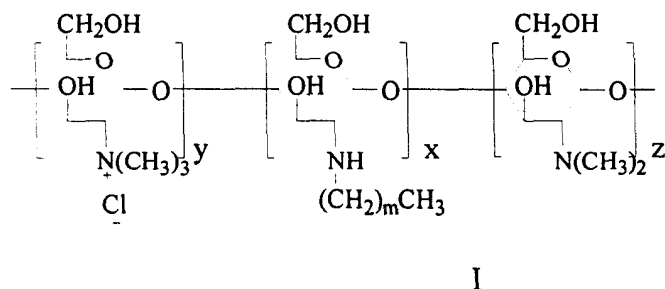
聚合物胶束作为药物载体能够提供一系列无可比拟的优点：增溶难溶性药物，提高药物的生物利用度；药物包裹在胶束的内核中，避免了在生物环境作用下可能产生的失活和变性，减少了药物的副作用。在足够长的时间内，在体内需要的部位和血液中逐渐累积；通过在外表面附加特殊的配体获得靶向的性质；能够大量的制备和工业化生产。

壳聚糖是可生物降解的天然来源的聚合物，具有良好的生物相容性，且来源广泛，价格便宜。壳聚糖的结构中存在 2-NH₂、3-OH、6-OH，可进行两亲性结构改造，从而在水中可自发形成聚合物胶束。发明人在先期的申请号为 CN 03112981.1 的专利申请中公开了一类 N-长链烷基-0-磺酸基壳聚糖，其可形成胶束对难溶性药物具有增溶作用。CN200410019959.6 公开了一类水油两溶性的 0-壳聚糖衍生物，主要是在壳聚糖的 6-OH 上引入乙胺羟乙基和 2'-羟丙基-N,N-二甲基十八烷基氯化铵基团，所得的衍生物主要用于肥胖症的治疗和预防。

发明内容

本发明公开了一组新的壳聚糖衍生物。与发明人先期的专利 CN03112981.1 不同的是，先期专利中的壳聚糖衍生物的亲水与疏水基分别位于 6, 3-OH 和 2-NH₂，胶束粒径约 100-300nm，而本发明的壳聚糖衍生物中的亲水与疏水基均位于同一基团(2-NH₂)，本发明制备得到的胶束粒径较小，约为 50nm，较小粒径的胶束更易在体内血管渗漏区域产生累积，使药物发挥更好的疗效，并且，本发明的壳聚糖衍生物对难溶性药物喜树碱类（如 10-羟基喜树碱和 9-硝基喜树碱）的增溶效果更好。

本发明的壳聚糖衍生物结构如下：



粘均分子量为 5~200 万，其中表示取代度的 y 、 x 、 z 分别是 20~80%、5~65%、0~32%；
脱乙酰度为 80~100%； $m=6\sim11$ 。

上述季铵化壳聚糖衍生物 I 优选的取代度是： y 、 x 、 z 分别是 20~55%、8~50%、5~30%；
优选的脱乙酰度为 90~98%。

m 优选 7。

本发明以壳聚糖为原料， m 、 x 、 y 、 z 分别表示 $-\text{NH}_2$ 、长链烷基、季铵、叔胺的取代度。
在壳聚糖的 2- NH_2 接入疏水长链烷基（链长为 8~12C）后，继续在其未完全取代的 2- NH_2 进行季胺化，制得 N-长链烷基-N-季铵化壳聚糖，元素分析测得其脱乙酰度为 80~100%；N-辛基取代度为 5~65%；季胺和叔胺取代度分别为 20~80%、0~32%；较好的乙酰度为 90~98%；N-辛基取代度为 8~50%；季胺和叔胺取代度分别为 20~55%、5~30%。

本说明书中所述的 N-长链烷基-N-季铵化壳聚糖即是壳聚糖衍生物 I。

本发明的季铵化壳聚糖衍生物 I 的制备方法，包括如下步骤：

a、取壳聚糖加入甲醇或乙醇中，搅拌，加入 7~12C 的长链烷基醛，反应 2~48 小时后，还原，继续搅拌 8~24 小时，生成 N-长链烷基壳聚糖；

b、取 N-长链烷基壳聚糖加入 N-甲基吡咯烷酮、KI、NaOH 水溶液和碘甲烷，充分搅拌下升温至 45-80°C 反应，冷却，离心，收集下层固体溶于蒸馏水中，透析，滤去不溶物后将滤液干燥，得 I。

上述较为优选的方法包括：

a、取壳聚糖加入甲醇中室温搅拌，加入 8~12C 的长链烷基醛，反应 2~24 小时后，加入 KBH_4 水溶液，继续搅拌 10~11 小时，生成 N-长链烷基壳聚糖；

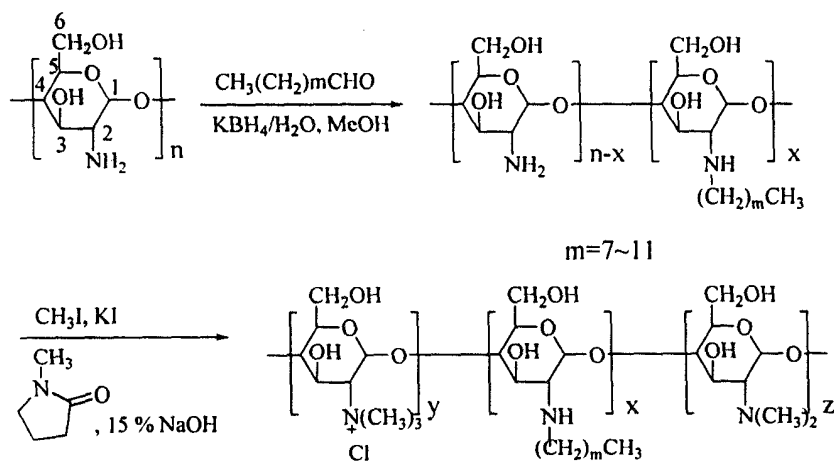
b、取 N-长链烷基壳聚糖加入 N-甲基吡咯烷酮、KI、NaOH 水溶液和碘甲烷，60°C 搅拌反应 1~2.5 h，冷却至室温，将反应混合物离心 30 min，收集下层固体溶于 NaCl 溶液中，搅拌置换碘离子，用截流分子量为 10000 透析袋透析，滤去不溶物后将滤液冷冻干燥，制得 N-长链烷基-N-季铵化壳聚糖 I。

上述制备方法进一步可包括：

c、将上述 b 所得的壳聚糖衍生物依次加入 *N*-甲基吡咯烷酮, KI, NaOH 水溶液和碘甲烷, 反应, 再加入 NaOH、碘甲烷继续反应, 将反应混合物离心, 收集下层固体溶于 NaCl 溶液中, 搅拌置换碘离子后, 透析, 滤去不溶物后将滤液干燥, 得季铵化程度较高的 *N*-长链烷基-*N*-季铵化壳聚糖 I ($y > 55$)。优选的方法是: 将 b 步骤制得的 *N*-长链烷基-*N*-季铵化壳聚糖加入 *N*-甲基吡咯烷酮, KI, NaOH 水溶液和碘甲烷, 60°C 搅拌反应 1~2.5 h, 再加入 NaOH、碘甲烷继续反应 1h, 冷却至室温, 将反应混合物离心 30 min, 收集下层固体溶于 NaCl 溶液中, 搅拌置换碘离子, 用截流分子量为 10000 透析袋透析, 滤去不溶物后将滤液冷冻干燥, 即得 I。

上述 c 制备得到的壳聚糖衍生物 I 和 b 步骤所得产物均是本发明的季铵化壳聚糖衍生物 I, 只是季铵化的取代度不同, 如果只是 a 和 b, 则制得的季铵化壳聚糖 I 含有部分叔胺, 季铵取代度为 20~55%, 如果进一步包含 c 步骤, 则制得的季铵化壳聚糖 I 中叔胺很少, 季铵取代度为 55~80%。

简单的合成路线为:



本发明的 *N*-长链烷基-*N*-季铵化壳聚糖即季铵化壳聚糖 I 为淡黄色粉末, 易溶于水, 可以在每 ml 水中溶解 8~18mg, 制备成粒径为 50nm 左右的 *N*-长链烷基-*N*-季铵化壳聚糖胶束。

本发明的 *N*-长链烷基-*N*-季铵化壳聚糖比发明人先期研究的 *N*-长链烷基-*O*-磺酸基壳聚糖增溶效果更好, 具体增溶比较数据见实施例 5。

本发明的壳聚糖衍生物对难溶性药物具有增溶作用, 例如对于羟基喜树碱, 不仅具有增溶作用, 而且还具有增加药物稳定性等作用, 使药物开环副产物小于 2%, 大大提高药物的抗肿瘤有效性并且减少毒副作用。因此, 本发明的壳聚糖衍生物可以作为增溶剂用作药用辅料。本发明还公开了一种药物组合物, 其含有治疗有效量的难溶性药物和本发明的壳聚糖衍生物。所述的难溶性药物可以是: 喜树碱类 (如喜树碱、10-羟基喜树碱、9-硝基喜树碱、

SN-38 等)、紫杉醇、多烯紫杉醇、环孢素 A、足叶乙苷、替尼泊甙、依托泊甙、长春酰胺、尼莫地平、阿霉素、柔红霉素、丝裂霉素、氨甲喋呤、冬凌草素、藤黄酸、三尖杉酯碱、高三尖杉酯碱、灯盏花素、银杏内酯、水飞蓟素、靛玉红、藤黄酸、依托泊甙、尼莫地平、硝苯地平、尼群地平、阿霉素, 本发明的壳聚糖衍生物对上述药物均有很好的增溶作用。特别是对难溶性药物喜树碱类、紫杉醇、多烯紫杉醇具有较好增溶作用, 可提高 10-羟基喜树碱、SN-38、9-硝基喜树碱在胶束溶液中的溶解度达 2~2.5mg/ml, 且药物稳定, 几乎不开环(开环产物为<2%)。

上述难溶性药物与季铵化壳聚糖衍生物 I 的重量比为 1: 1~20 时, 增溶效果比较好, 也适合用于制备成各种药物制剂。

本发明用可生物降解的天然来源的壳聚糖作为原料, 进行化学结构修饰, 使其形成具有两亲性的聚合物分子, 以适合用于药物、与药物组配或作为药物载体, 尤其是可以用作静脉注射药物的优良载体。

本发明的两亲性质的壳聚糖衍生物, 不但可用于难溶药物的增溶和包裹, 控制药物释放, 而且可以在水中形成纳米级胶束, 胶束粒径小, 约 50nm。由亲水的壳和疏水的核组成的纳米高分子胶束, 可以延长体内循环、减少网状内皮细胞的吞噬, 最终提高治疗效果。

本发明的 N-长链烷基-N-季铵化壳聚糖作为载体较原料壳聚糖毒性低, 且溶血反应符合静脉注射药用辅料标准。小鼠静脉注射的急性毒性试验数据表明: N-辛基-N-季铵化壳聚糖急性毒性较原料壳聚糖有较低降低, LD₅₀ 为 257.5mg/kg。溶血实验表明: N-辛基-N-季铵化壳聚糖在用生理盐水稀释至适当浓度, 进行静脉注射给药, 不会引起机体的溶血反应。

具体实施方式:

壳聚糖脱乙酰度 90%以上, 粘均分子量 70KD; 试剂均为分析纯和化学纯; 透析袋的截流分子量为 10000 (MWCO 10000)。

实施例 1

1. N-辛基壳聚糖的制备(OCS)

12 g 壳聚糖和 34.0 ml 正辛醛加入到 250 ml 甲醇中, 30°C 搅拌 5 h 后, 分批加入 KBH₄ (共计 6 g/60 ml), 搅拌过夜后, 过滤, 用水和热甲醇反复洗涤滤饼, 50°C 下真空干燥, 得到 11.3 g 淡黄色粉末 OCS(辛基取代度为 10%)。

2. N-烷基-N-季铵化壳聚糖(OTMCS1)的制备

0.96 g *N*-辛基壳聚糖置于 100 ml 三颈瓶中, 依次加入 15 ml *N*-甲基吡咯烷酮, 2.4 g KI, 5 ml 15 % NaOH 水溶液和 5.2 ml CH₃I, 充分搅拌下升温至 60°C 反应 1 h, 冷却至室温, 离心 30 min(1000 rpm), 收集下层固体(I)溶于蒸馏水中, 透析 5 d, 滤去不溶物后将滤液冷冻干燥, 得淡黄色 *N*-辛基-*N*-季胺化壳聚糖(OTMCS1)0.34 g (季胺取代度为 53%)。

OTMCS1:

FT-IR: 2950、2850、1079、1032、800 cm⁻¹

¹H NMR(500MHz, D₂O): 5.4 (H₁), 4.30~3.4 (H₃, H₄, H₅, H₆), 3.3 (N(CH₃)₃), 3.0~3.2 (-NH-CH₂-(CH₂)₆-CH₃, H₂), 2.5 (N(CH₃)₂), 1.0~2.2 (-NH-CH₂-(CH₂)₆-CH₃), 0.8 (-NH-CH₂-(CH₂)₆-CH₃),

¹³C NMR (500MHz, D₂O): 99.6 (C₁), 77.5 (C₄), 77 (C₅), 68.4 (C₃), 61.1 (C₆), 58.6 (C₂), 53.7 (N(CH₃)₃), 48.0 (-NH-CH₂-(CH₂)₆-CH₃), 41.1 (N(CH₃)₂), 25.3~34.3 (-NH-CH₂-(CH₂)₆-CH₃), 23.9(-NH-CH₂-(CH₂)₆-CH₃)。

根据 *N*-辛基壳聚糖的元素分析数据可计算出辛基的取代度为 10%; 根据 ¹H NMR 中 H 的积分面积可计算出叔胺和季胺的取代度分别为 27 和 53%(Hamman J.H. and Kotze A.F. Effect of the type of base and number of reaction steps on the degree of quaternisation and molecular weight of *N*-trimethyl chitosan chloride. Drug Development and Industrial Pharmacy. 2001,27(5), 367-374)。

3. *N*-烷基-*N*-季铵化壳聚糖(OTMCS2)的制备

将 OTMCS1 置于 100 ml 三颈瓶中, 依次加入 15 ml *N*-甲基吡咯烷酮, 2.4 g KI, 5 ml 15 % NaOH 水溶液和 3.2 ml CH₃I, 60°C 反应 30 min, 再加入 0.3 g NaOH, 1 ml CH₃I 继续反应 1 h, 冷却至室温, 将反应混合物离心 30 min(1000 rpm), 收集下层固体溶于 18 ml 10 % NaCl 溶液中, 搅拌置换碘离子后, 透析 5 d, 滤去不溶物后将滤液冷冻干燥, 得淡黄色 *N*-辛基-*N*-季铵化壳聚糖(OTMCS2)0.2 g (季胺取代度为 71%)。

OTMCS2:

FT-IR: 2955、2852、1080、1035、810 cm⁻¹

¹H NMR(500MHz, D₂O): 5.7 (H₁), 4.7~3.5 (H₃, H₄, H₅, H₆), 3.4 (N(CH₃)₃), 3.0~3.2 (-NH-CH₂-(CH₂)₆-CH₃, H₂), 2.6 (N(CH₃)₂), 1.9 (NOCOCH₃), 1.4 (-NH-CH₂-(CH₂)₆-CH₃), 1.0 (-NH-CH₂-(CH₂)₆-CH₃)。

¹³C NMR (500MHz, D₂O): 97.9 (C₁), 77.4 (C₄), 74.6 (C₅), 72.5 (C₃), 58.5 (C₆), 57.6 (C₂), 54.2 (N(CH₃)₃), 46.9 (-NH-CH₂-(CH₂)₆-CH₃), 41.1 (N(CH₃)₂), 25.2~28.1(-NH-CH₂-(CH₂)₆-CH₃), 22.1 (-NH-CH₂-(CH₂)₆-CH₃)。

根据 *N*-辛基壳聚糖的元素分析数据可计算出辛基的取代度为 10%;根据 ^1H NMR 中 H 的积分面积可计算出叔胺和季胺的取代度分别为 9 和 71%, 相对于季胺来说叔胺很少。

实施例 2

1、*N*-癸基壳聚糖(DCS)的制备

用癸醛和壳聚糖反应, 制备方法同实施例 1 中 *N*-辛基壳聚糖的制备方法。

2. *N*-癸基-*N*-季铵化壳聚糖(DTMCS1,)的制备

用 *N*-癸基壳聚糖和碘甲烷反应制备,制备方法同实施例 1 的 OTMCS1。

FT-IR: 2953, 2872, 1080、1035、810 cm^{-1}

^1H NMR(500MHz, D_2O): 5.4 (H_1), 4.3~3.4 (H_3 , H_4 , H_5 , H_6), 3.0~3.3 ($\text{N}(\text{CH}_3)_3$,-NH- $\underline{\text{CH}_2}$ -(CH_2)₈- CH_3 , H_2), 2.6 ($\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 1.3~2.3 (-NH- CH_2 -($\underline{\text{CH}_2}$)₈- CH_3), 0.82(-NH- CH_2 -(CH_2)₈- $\underline{\text{CH}_3}$)。

^{13}C NMR (500MHz, D_2O): 99.6 (C_1), 77.5 (C_4), 77 (C_5), 68.4 (C_3), 61.1 (C_6), 58.6 (C_2), 52.9 ($\text{N}(\text{CH}_3)_3$), 45.0 (-NH- $\underline{\text{CH}_2}$ -(CH_2)₈- CH_3), 40.9($\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 34.3(-NH- CH_2 -($\underline{\text{CH}_2}$)₈- CH_3), 20.1~23.9(-NH- CH_2 -(CH_2)₈- $\underline{\text{CH}_3}$)。

根据 *N*-癸基壳聚糖的元素分析数据可计算出癸基的取代度为 8.5%; 根据 ^1H NMR 中 H 的积分面积可计算出叔胺和季胺的取代度分别为 27 和 53%。

3. *N*-烷基-*N*-季铵化壳聚糖(DTMCS2)的制备

用 DTMCS1 和碘甲烷反应制备,制备方法同实施例 1 的 OTMCS2。

FT-IR: 2953, 2872, 1080、1035、810 cm^{-1}

^1H NMR(500MHz, D_2O): 5.7 (H_1), 4.7~3.5 (H_3 , H_4 , H_5 , H_6), 3.4 ($\text{N}(\text{CH}_3)_3$), 3.0~3.3 ($\text{N}(\text{CH}_3)_3$,-NH- $\underline{\text{CH}_2}$ -(CH_2)₈- CH_3 , H_2), 2.5($\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 1.3~2.3 (-NH- CH_2 -($\underline{\text{CH}_2}$)₈- CH_3), 1.0 (-NH- CH_2 -(CH_2)₈- $\underline{\text{CH}_3}$)。

^{13}C NMR (500MHz, D_2O): 97.9 (C_1), 77.4 (C_4), 74.6 (C_5), 72.5 (C_3), 58.5 (C_6), 57.6 (C_2), 54.2 ($\text{N}(\text{CH}_3)_3$), 43.5 (-NH- $\underline{\text{CH}_2}$ -(CH_2)₈- CH_3), 41.1 ($\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 28.1~25.9(-NH- CH_2 -($\underline{\text{CH}_2}$)₈- CH_3), 22.1 (-NH- CH_2 -(CH_2)₈- $\underline{\text{CH}_3}$)。

根据 *N*-癸基壳聚糖的元素分析数据可计算出癸基的取代度为 10%;根据 ^1H NMR 中 H 的积分面积可计算出叔胺和季胺的取代度分别为 9 和 71%。

实施例 3

1、*N*-十二烷基-壳聚糖(LCS)的制备

用月桂醛和壳聚糖反应, 制备方法同实施例 1 的 N-辛基壳聚糖。

2、N-癸基-N-季铵化壳聚糖(LTMCS1)的制备

用 N-十二烷基壳聚糖和碘甲烷反应制备, 方法同实施例 1 的 OTMCS1。

FT-IR: 2950、2850、2950, 2860, 1462, 1385, 800 cm^{-1} 。

^1H NMR(500MHz, D_2O): 5.42 (H_1), 4.3~3.4 (H_3 , H_4 , H_5 , H_6), 3.0~3.3 ($-\text{NH}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_8-\text{CH}_3$, $\text{N}(\text{CH}_3)_3$, H_2), 2.5 ($\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 1.0~2.5 ($-\text{NH}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_8-\text{CH}_3$ NOCOCH_3), 0.8 ($-\text{NH}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_8-\text{CH}_3$)。

^{13}C NMR (500MHz, D_2O): 97.5 (C_1), 77.1 (C_4), 75.7 (C_5), 65.9(C_3), 62.1 (C_6), 55.3 (C_2), 53.7 ($\text{N}(\text{CH}_3)_3$), 48.0 ($-\text{NH}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_8-\text{CH}_3$), 41.1 ($\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 22.3~34.2; ($-\text{NH}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_8-\text{CH}_3$), 13.5~13.7($-\text{NH}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_8-\text{CH}_3$);

根据 N-十二烷基壳聚糖的元素分析数据可计算出十二烷基的取代度为 13%;根据 ^1H NMR 中 H 的积分面积可计算出叔胺和季胺的取代度分别为 25.7 和 51.3%。

3、N-烷基-N-季铵化壳聚糖(LTMCS2)的制备

用 LTMCS1 和碘甲烷反应制备,制备方法同实施例 1 的 OTMCS2。

FT-IR: 2950, 2850, 2950, 2860, 1462, 1385, 800 cm^{-1} 。

^1H NMR(500MHz, D_2O): 5.42 (H_1), 4.5~3.5 (H_3 , H_4 , H_5 , H_6), 3.4 ($\text{N}(\text{CH}_3)_3$), 3.0~3.3 ($-\text{NH}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_8-\text{CH}_3$, H_2), 2.6 ($\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 1.3~2.2 ($-\text{NH}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_8-\text{CH}_3$ NOCOCH_3), 0.8 ($-\text{NH}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_8-\text{CH}_3$)。

^{13}C NMR (500MHz, D_2O): 97.9 (C_1), 77.4 (C_4), 74.6 (C_5), 72.5 (C_3), 58.5 (C_6), 57.6 (C_2), 54.2 ($\text{N}(\text{CH}_3)_3$), 48.0 ($-\text{NH}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_8-\text{CH}_3$), 41.1 ($\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 28.1 (CH_2), 23.5~34.2; ($-\text{NH}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_8-\text{CH}_3$), 22.1($-\text{NH}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_8-\text{CH}_3$);

根据 N-十二烷基壳聚糖的元素分析数据可计算出癸基的取代度为 11.2%;根据 ^1H NMR 中 H 的积分面积可计算出叔胺和季胺的取代度分别为 8.8 和 70%。

实施例 4

N-辛基-N-季胺化壳聚糖(季胺取代度为 53%)(OTMCS1) 增溶 10-羟基喜树碱

将 12 mg N-辛基-N-季胺化壳聚糖(实施例 1 中所制备)溶解在 2 ml 蒸馏水中, 同时将 7 mg 10-羟基喜树碱(10-HCPT)溶解在 0.2 ml DMSO 中, 两者混合超声 30 min, 蒸馏水透析 24 h, 离心 30 min(3000 rpm), 取上清液, 过 0.22 μm 滤膜, 得到增溶 10-HCPT 的胶束溶液, 用 HPLC 法测定此胶束溶液中药物含量为 2.2 mg/ml。开环产物(10-羟基喜树碱的羧酸形式)为<2%。比目前临床所用的 10-羟基喜树碱钠盐注射剂(开环产物为 50%左右)稳定。

对照组：以 N-辛基-0-O-磺酸基壳聚糖（CN 03112981.1）为增溶剂，10-HCPT 的胶束制备方法同上，胶束溶液中药物含量为 1 mg/ml。

实施例 5

N-辛基-N-季胺化壳聚糖(OTMCS1，季胺取代度为 53%)增溶 9-硝基喜树碱

将 12 mg OTMCS1 溶解在 2 ml 蒸馏水和 0.2 ml DMSO 的混合溶剂中，同时将 7 mg 9-硝基喜树碱溶解在 0.2 ml DMSO 中，两者混合超声 30 min，蒸馏水透析 24 h，离心 30 min(3000 rpm)，取上清液，过 0.22 μm 滤膜，得到增溶 9-硝基喜树碱的胶束溶液。用 HPLC 法测定此胶束溶液中药物含量为 2.5 mg/ml。开环产物（9-硝基喜树碱的羧酸形式）为<2%。

对照组：以 N-辛基-0-O-磺酸基壳聚糖为增溶剂，9-硝基喜树碱的胶束制备方法同上，胶束溶液中药物含量为 1.2 mg/ml。

实施例 6

胶束粒径的测定

将不同辛基取代度的 OTMCS2 及其 10-HCPT 胶束冻干品和不同的壳聚糖衍生物(辛基取代度为 8%)的 10-HCPT 胶束冻干品 40 mg 分别溶解在 7 ml 水中,室温超声 30 min 后，稀释成各种浓度用 Zetasizer 3000 HS instrument (Malvern Instruments, Malvern, UK)在 633 nm, 25°C,He-Ne 激光测定胶束粒径为小于 50nm。结果见表 1 和 2。

表 1 不同辛基取代度的 OTMCS2 的粒径(nm)

取代度	8 %	20 %	48%
空白胶束粒径	50	26.0	28.7
载药胶束粒径	52.5	28.5	29.6

表 2 不同壳聚糖衍生物(辛基取代度为 8%)载药胶束的粒径(nm)

衍生物	OTMCS1	OTMCS2	DTMCS1	DTMCS2	LDMCS1	LDMCS2
载药胶束粒径	23.5	52.5	27.1	28.6	31.2	20.8