浙江理工大学学报(自然科学版),第33卷,第6期,2015年11月
Journal of Zhejiang Sci-Tech University (Natural Sciences)
Vol. 33, No. 6, Nov. 2015

文章编号:1673-3851 (2015) 06-0800-05

RAFT一步聚合制备壳交联药物载体及其控释研究

江国华[a],周慧婕[b],江腾腾[a],杜祥祥[a]
(浙江理工大学, a. 材料与纺织学院;b. 启新学院,杭州 310018)

摘　要:通过可逆加成-断裂链转移(RAFT)一步聚合制备聚甲基丙烯酸二甲胺乙酯-b-聚苯乙烯(PDMAEMA-b-PS)壳交联纳米粒子(SCL-NPs),引入还原敏感性交联剂双(丙烯酰)胱胺(BAC)使得制备得到的药物载体能在还原剂的作用下发生解聚;在制备SCL-NPs的过程中加入吲哚美辛(IND)来制备负载吲哚美辛的SCL-NPs(SCL-NPs-IND)。用傅里叶变换红外分光光度计、核磁共振波谱仪、透射电子显微镜、动态光散射纳米粒度分析仪对SCL-NPs的结构形貌和性能进行表征,发现SCL-NPs具有明确的核壳结构并且粒径均一;并采用紫外-可见分光光度计对SCL-NPs-IND药物释放性能进行研究,结果表明二硫苏糖醇(DTT)能加速SCL-NPs-IND的药物释放,并且在碱性条件下的释放速度大于酸性条件下的药物释放速度。

关键词:RAFT;壳交联;药物载体;还原敏感性;可控释放
中图分类号:O631.3　　文献标志码:A

0 引　言

20世纪60年代至今,越来越多的学者开始关注药物控制释放体系的研究。相对于传统的给药方式,药物的控释不仅可以提高药物治疗的有效性、安全性和准确性,同时还能减少药物对人体的毒副作用。目前,尽管有关药物控释的研究已有很多,但仍没达到理想的要求,仅有少数被应用到临床上,因此研发理想的药物控释体系成为了研究热点。由于药物载体是药物控释体系的重要组成部分,也是影响药效的主要因素,所以,制备性能良好的药物载体也就成为了药物控释技术的核心内容[1]。

完善已有的药物载体合成方法和研发疗效更好、选择性更强的新型药物载体材料从而达到理想的药物控释效果的药物载体是目前的研究重点[1]。随着药物学、生物材料科学、临床医学等学科的发展与交叉,以及人类不断的提高在药物方面的要求,有关高分子药物载体的研究越来越被重视。当高分子作为药物的载体时,药物的作用时间将增加、选择性会有所提高、毒性也会降低,并且药物还能够被运送到体内确定的部位(靶位)。在药物释放之后,高分子载体能够排出或者在水解后被吸收,并不会在体内长时间积累[2]。另外,可逆加成-断裂链转移聚合(reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization,RAFT)具有反应要求低和反应条件温和的显著优点。当反应体系中加入链转移常数较大的链转移剂,不可逆的自由基聚合反应将变为可逆,从而使得聚合反应可控[3]。目前已报道的往往都是不具有环境敏感性的交联剂[4-10],这样制得的壳交联药物载体在药物传递后不能进行解聚,将会影响细胞的代谢。本文采用RAFT聚合技术,在不提前合成大分子链转移剂PDMAEMA的情况下,以S-1-十二烷基-S′-(α,α′-二甲基-α″-乙酸)三硫代碳酸酯(DMP)、偶氮二异丁腈(AIBN)为引发剂,引入还原敏感性交联剂双(丙烯酰)胱胺(BAC),采用RAFT一步聚合的方法制备粒径均一且能在还原剂的作用下发生解聚的壳交联药物载体,并对其进行药物控释研究。

收稿日期:2014-11-14
基金项目:国家自然科学基金项目(51373155);国家大学生创新创业训练计划项目(201410338004)
作者简介:江国华(1975-),男,浙江建德人,教授,主要从事功能高分子材料方面的研究。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

1　试验

1.1　实验材料与仪器

甲基丙烯酸二甲氨乙酯(DMAEMA, 99%,购自比利时 Acros Organics 公司);苯乙烯(St,CP,购自上海凌峰化学试剂有限公司);偶氮二异丁腈(AIBN,AR,天津市科密欧化学试剂有限公司);环己烷(AR,杭州高晶精细化工有限公司);S-1-十二烷基-S′-(α, α′-二甲基-α″-乙酸)三硫代碳酸酯(DMP,合成方案如文献[11]中报道)、双(丙烯酰)胱胺(BAC,合成方案如文献[12]中报道)和去离子水,实验室自制。

B-260 恒温水浴锅(上海亚荣生化仪器厂);FD-1A-50 冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司);SHZ-B 水浴恒温振荡器(金坛市宏凯仪器厂);AL204 电子天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司);AVANCE AV 400 超导核磁共振波谱仪(德国 Bruker 公司);Nicolet 5700 傅里叶变换红外分光光度计(美国 Nicolet 公司);LB-550V 动态光散射纳米粒度分析仪(日本 HORIBA 公司);JSM-2100 透射电子显微镜(日本 JEOL 公司);U-3010 紫外-可见分光光度计(日本 Hitachi 公司)。

1.2　试验方法

1.2.1　SCL-NPs 的制备

取 1 mL 环己烷(0.009 mol)加入 0.05 g DMP(0.14 mmol)、0.008 g AIBN(0.05 mmol)、0.7 mL DMAEMA(3.9 mmol)、0.13ml St(1.1 mol)、10 mL H_2O 及 0.0035 g BAC(0.01 mmol)的混合溶液中,搅拌若干分钟使上述物质溶解,之后将其转移入长颈瓶中。然后置于液氮中冷冻,抽真空、通氮气 3 次。对长颈瓶进行真空封管,将其移入 75℃的油浴中反应 24 h。反应产物冷却至室温后将其置于透析袋中透析 24h,得到液态的 SCL-NPs;另外,取一部分产物进行冷冻干燥得到粉末状的 SCL-NPs。

1.2.2　SCL-NPs-IND 的制备

SCL-NPs-IND 的制备和 1.2.1 中 SCL-NPs 的制备过程相似,只需将 0.10 mg IND 溶于环己烷后加入其它试剂的混合溶液中。反应结束后,得到负载 IND 的聚合物粉末(SCL-NPs-IND)。

1.2.3　SCL-NPs-IND 的药物释放

将 0.03 g SCL-NPs-IND 加入 3 mL 一定 pH 值的磷酸缓冲溶液(PBS)中,接着移入透析袋,将此透析袋放入蓝口瓶并加入 27 mL 上述 PBS。然后将蓝口瓶置于水浴恒温振荡器中振荡,温度维持在 37℃。PBS 的 pH 分别为 5.9、6.8 和 7.6,各 pH 值下加入的二硫苏糖醇(DTT)的量分别为 0 mM 和 10 mM。每组实验进行 3 次,取平均值。

1.3　表征方法

1.3.1　傅里叶变换红外分光光度计(FT-IR)

取部分粉末状的 SCL-NPs 和适量 KBr 于玛瑙研钵中混合研磨均匀后,压片,制样。用傅里叶变换红外分光光度计测其红外谱图。

1.3.2　核磁共振波谱仪(^{1}H NMR)

先取适量样品加入核磁管中,然后加入 0.5 mL $CDCl_3$,超声使其溶解。在核磁共振波谱仪的工作频率为 400 MHz 的情况下进行测定。

1.3.3　动态光散射纳米粒度分析仪(DLS)

取适量的样品用水稀释后,即可用动态光散射纳米粒度分析仪进行测定。每个样品测试 3 次,数据取平均值。

1.3.4　透射电子显微镜(TEM)

取少量样品液体用水进行稀释,接着超声波分散 1h,然后用毛细管吸取少量分散液,滴在涂有碳膜的铜网(200 目)上,室温干燥后在加速电压为 200 kV 的条件下进行观察。

2　结果与讨论

2.1　SCL-NPs 的合成讨论

RAFT 一步聚合制备具有核壳结构并且粒径均一的药物载体。此制备过程中,略去合成大分子链转移剂 PDMAEMA 的步骤,直接在合成 SCL-NPs 的乳液体系中通过链转移剂 DMP 引发 DMAEMA 均聚合成 PDMAEMA 稳定剂;其中 AIBN 作为引发剂,引发 St 和 BAEDS 发生共聚,最终制得 SCL-NPs。合成路线如图 1 所示。

2.2　样品的核磁表征

图 2 为 SCL-NPs 的^{1}H NMR 谱图。如图所示:$-S-CH_2-C-CH_3$ 基团上的亚甲基和甲基的质子峰在 δ=1.42 ppm 和 0.91 ppm 处;$-S-CH-CH_2-$ 基团上亚甲基的质子峰在 δ=1.6 ppm 处;在 δ=2.0 ppm 和 2.3 ppm 处各有一个单峰,分别对应于$(CH_3)_2-C-COOH$ 基团和$-CH_2-N-(CH_3)_2$ 基团上甲基的质子峰;δ=3.68 ppm 和 2.54 ppm 处各有一个单峰,对应于$-CH_2-CH_2-N-$基团上亚甲基的质子峰[13-14]。相比于 PDMAEMA-b-PS 的^{1}H NMR 谱图[11],SCL-NPs 的^{1}H NMR 谱图上 δ=6～8 ppm处无特征峰,表明已成功制备 SCL-NPs。原因在于:St 和 BAC 可以

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

通过共聚键连接在 PDMAEMA 稳定剂上，则 PDMAEMA-b-PS 纳米粒子的壳层将会发生交联，从而阻碍 PS 链段的运动，这样其链锻上质子氢的信息就无法被核磁检测。由于 $CDCl_3$ 是 PS 的良溶剂，所以当 PS 壳层未进行交联时，核磁谱图上就会出现 PS 的质子氢的信息[14]。

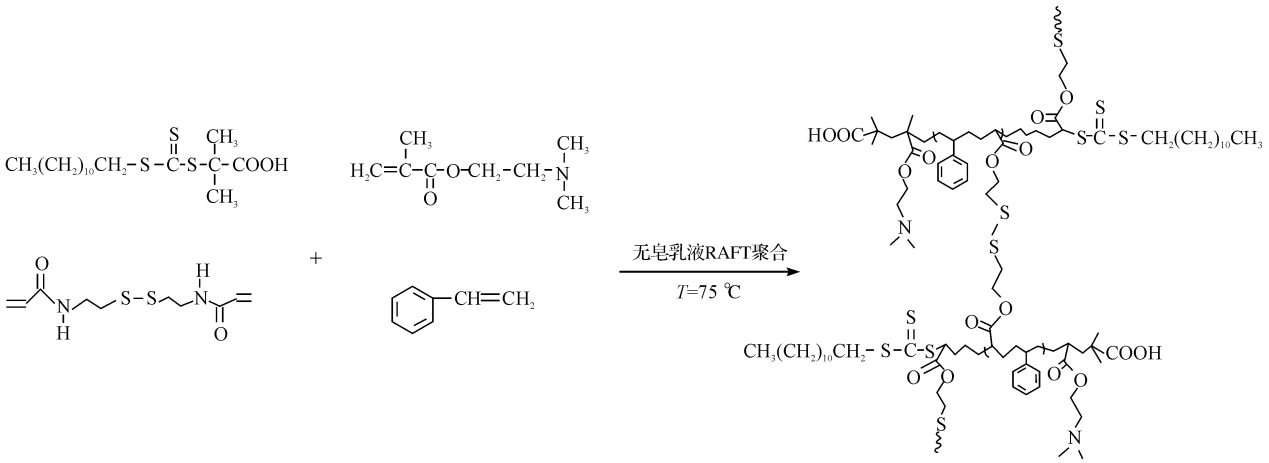


图 1 壳交联纳米粒子的合成路线

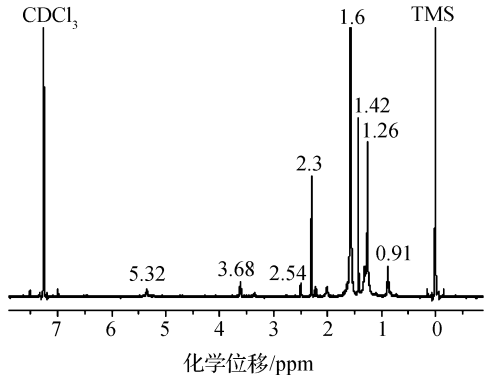


图 2 SCL-NPs 的氢核磁共振谱图

2.3 样品的红外表征

图 3 为 SCL-NPs 的红外谱图。从图中可以看出：3400 cm^{-1} 处的吸收峰归属于羧酸中-OH 的伸缩振动，1125 cm^{-1} 处的特征吸收峰对应于 C—N 的伸缩振动，1749 cm^{-1} 处的吸收峰属于 C=O 的伸缩振动，波数位于 1508 和 1486 cm^{-1} 处的特征吸收峰为苯环的伸缩振动，750 和 708 cm^{-1} 处的吸收峰为苯环的单取代的面外 C—H 的弯曲振动[13-15]，表明 SCL-NPs 已被成功制备。

2.4 样品的 DLS 表征

图 4 为标准样品 SCL-NPs 和 SCL-NPs-IND 的粒径大小和粒径分布曲线。在 25℃ 的温度下测试出该 SCL-NPs 的平均粒径为 90.44 nm，其分布系数 PDI 为 26.3%；而负载 IND 后的 SCL-NPs 的平均粒径为 198.2 nm，其分布系数 PDI 为 30.21%。从以上数据可看出 SCL-NPs-IND 的粒径有所增加，约为 SCL-NPs 粒径的两倍。

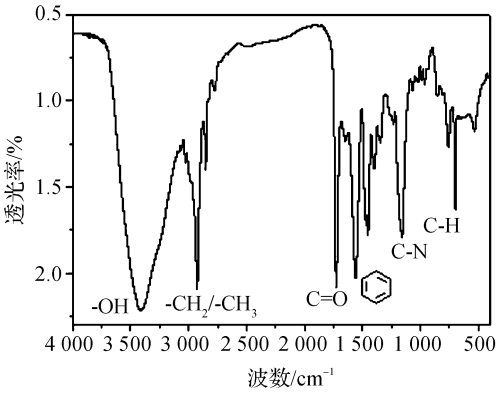


图 3 SCL-NPs 的红外谱图

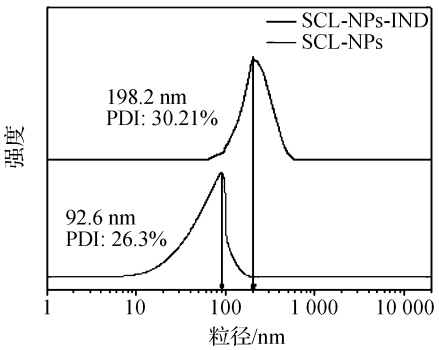


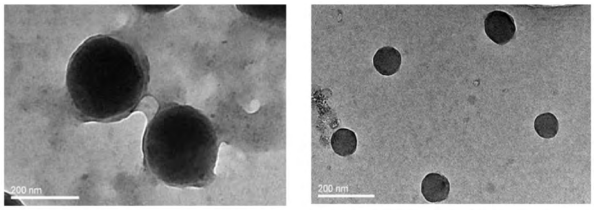
图 4 SCL-NPs 和 SCL-NPs-IND 在环己烷中分散的水动力直径分布图

注：测试温度为 25℃，样品的浓度为 1 mg/mL。

2.5 样品形貌

图 5 为 SCL-NPs-IND(a)和 SCL-NPs(b)的透射电子显微镜图。由图 5 可知：所有的样品均为椭球形并且都具有明显的核-壳结构，且 SCL-NPs 的粒径约为 90 nm；负载 IND 之后，其粒径增加至 195 nm左右。与图 4 中 DLS 表征结果基本吻合。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



(a) SCL-NPs-IND　　(b) SCL-NPs

图 5　SCL-NPs-IND 和 SCL-NPs 的透射电子显微镜图

注：比例尺皆为 200 μm。

2.6　SCL-NPs-IND 的药物释放

SCL-NPs-IND 的药物释放机理如图 6 所示。DTT 作为还原剂可以打开 SCL-NPs 的双硫键，其交联壳层发生解聚，从而促进药物的释放。当 pH < 7 时，PDMAEMA 链段被质子化从而带正电，由于同种电荷相互排斥，PDMAEMA 链段将会处于舒展状态，IND 需要经过较长路程才能从 SCL-NPs 的核层迁移出来，即 SCL-NPs 在酸性条件下具有较小的药物释放速度。当 pH ≥ 7 时，在去质子化的作用下 PDMAEMA 链段将塌缩在 PS 的交联核层上并在一定程度上挤压核层，则 IND 经过相对较短的路程从 SCL-NPs 的核层迁移出来，即碱性条件下 SCL-NPs 具有较大的药物释放速度[16-18]。此外，IND 在碱性条件下具有较强的溶解性，易于从 SCL-NPs 的核层迁移出来[19]。

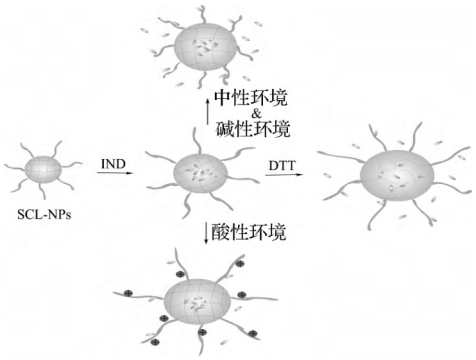


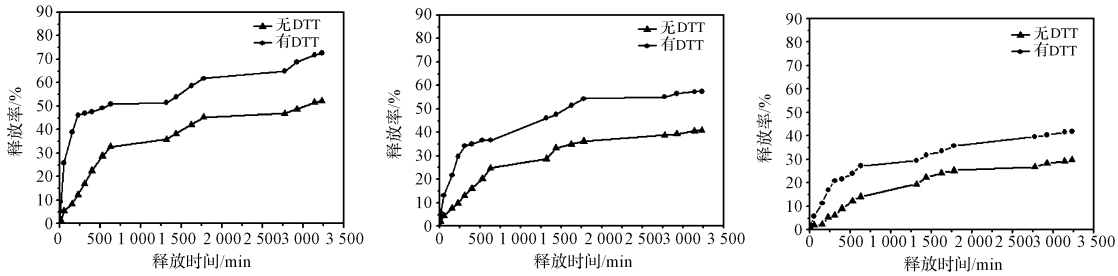
图 6　SCL-NPs-IND 的药物释放机制示意图

在 SCL-NPs-IND 的降解过程中，用紫外-可见分光光度计测试溶液在 $\lambda=320$ nm 处的吸光度，然后通过标准曲线计算出 IND 的释放量。根据文献报道[20]，IND 的浓度-吸光度标准方程为：

$$A=18.2C+0.001.$$

其中：A 为紫外分光光度计在 320 nm 处测得的吸光度；C 为溶液中 IND 的浓度(mg/mL)。

图 7 为 SCL-NPs-IND 在不同缓释条件下的药物释放曲线。从 A、B、C 图中可以看出，药物的释放具有 pH 敏感性并且 DTT 可以促进其释放。经过 55 h 的药物释放，在缓释介质中无 DTT 存在的情况下，SCL-NPs-IND 在不同 pH 值时的药物释放率分别为：37%（pH=5.9）、42%（pH=6.8）、51%（pH=7.6）；向缓释介质中加入 10 mM DTT 后，SCL-NPs-IND 随 pH 值的增大不仅缓释速度显著加快，而且药物释放率也有所增加，分别为：55%（pH=5.9）、63%（pH=6.8）、72%（pH=7.6）。其中，在 pH=7.6 且缓释介质中含 DTT 的条件下的 SCL-NPs-IND 具有最快的药物释放速度和最大的药物释放率。从以上数据可以看出，DTT 能够促进药物的释放，并且碱性条件下的药物释放速度大于酸性条件下的释放速度。



(a) pH=7.6　　(b) pH=6.8　　(c) pH=5.9

图 7　SCL-NPs-IND 的药物累积释放曲线

注：测试温度为 37℃。

3　结　论

本实验通过无皂乳液 RAFT 一步聚合制备得到粒径均一、具有明确核壳结构并且能可控释放药物的 SCL-NPs，其中引入还原敏感性交联剂 BAC 使所制 SCL-NPs 可发生解聚，并采用一步聚合的方法来简化实验流程。还考察了 SCL-NPs-IND 在不同缓释条件下的药物释放性能，结果显示 DTT 可以促进药物的释放，并且碱性条件下的释放速度明显大于酸性条件下的释放速度。因此，SCL-NPs 作为药物载体可以进行细胞内药物可控释放。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

参考文献：

[1] 李乐道. 药物控释制剂载体的研究进展[J]. 西北药学杂志,2011,26(3):229-232.

[2] 张 玥，赵弘韬，张丽芳. 高分子载体药物[J]. 黑龙江科技信息,2007(20):231-218.

[3] 胡芳林. RAFT 法制备具有温度响应性的聚合物及其在药物缓释中的应用[D]. 内蒙古：内蒙古大学,2014.

[4] Read E S, Armes S P. Recent advances in shell cross-linked micelles [J]. Chem Commun, 2007,43(29):3021-3035.

[5] 邱 玲，蒲万芬，张 晶. 改进型酚醛树脂交联剂的合成与成胶性能[J]. 精细石油化工进展,2011,12(8):15-18.

[6] Jiang X Z, Zhang G Y, Narain R, et al. Covalently stabilized temperature and pH responsive four-layer nanoparticles fabricated from surface clickable shell cross-linked micelles [J]. Soft Matter, 2009, 5 (7): 1530-1538.

[7] 李从妮. 有机锆复合交联剂的制备及其交联性能研究[D]. 西安：西安石油大学,2011.

[8] 张晓静，胡跃磊，李 翀，等. 以纳米笼形 POSS 为交联剂的 PHEMA 水凝胶的制备及其对诺氟沙星的缓释行为[J]. 功能高分子学报,2014,27(3):296-301.

[9] Li Y T, Du J Z, Armes S P. Shell cross-linked micelles as cationic templates for the preparation of silica-coated nanoparticles: strategies for controlling the mean particle diameter [J]. Macromol Rapid Commun, 2009, 30(6): 464-468.

[10] 张淑芳，马兴元，邱啸寒，等. 热反应型水性聚氨酯交联剂的合成与应用[J]. 中国皮革,2013,42(19):37-40+44.

[11] 王小红. 环境敏感性聚合物的设计合成及其在药物控释中的应用研究[D]. 杭州：浙江理工大学,2013.

[12] Yu H, Grainger D W. Amphiphilic thermosensitive N-Isopropylacrylamide terpolymer hydrogels prepared by micellar polymerization in aqueous media [J]. Macromolecule,1994,27(16):4554 - 4560.

[13] Atac A, Karaca C, Gunnaz S, et al. Vibrational (FT-IR), electronic (UV-Vis), NMR (^{1}H and ^{13}C) spectra and reactivity analyses of 4, 5-dimethyl-o-phenylenediamine [J]. Spectrochim Acta Part A,2014, 130:516-525.

[14] 王 寅. 还原敏感性壳交联药物载体的制备及其在药物控释上的应用研究[D]. 杭州：浙江理工大学,2012.

[15] Kumar A, Deval V, Tandon P, et al. Experimental and theoretical (FT-IR, FT-Raman, UV-Vis, NMR) spectroscopic analysis and first order hyperpolarizability studies of non-linear optical material: (2E)-3-[4-(methylsulfanyl) phenyl]-1-(4-nitrophenyl) prop-2-en-1-one using density functional theory [J]. Spectroschim Acta Part A: 2014,130:41-53.

[16] 潘 涛，刘大伟，任随周，等. DTT 对三苯基甲烷染料脱色的研究[J]. 环境科学, 2012(3):866-870.

[17] Li G Y, Guo L, Ma S M, et al. Complex micelles formed from two diblock copolymersfor applications in controlled drug release [J]. J Polym Sci Part A: Polym Chem, 2009,47(7):1804-1810.

[18] Lin J P, Zhu J Q, Chen T, et al. Drug releasing behavior of hybrid micelles containing polypeptide triblock copolymer [J]. Biomaterials,2009,30(1):108-117.

[19] Wu C L, Ma R J, He H, et al. Fabrication of complex micelles with tunable shell for application in controlled drug release [J]. Macromol Biosci, 2009,9(12):1185-1193.

[20] Jiang G H, Sun X K, Wang R J, et al. Synthesis of biomimetic hyperbranched zwitterionic polymers as targeting drug delivery carriers[J]. J Appl Polym Sci, 2013,128(5):3289-3294.

Preparation of Shell Cross-linked Drug Carriers by One-step RAFT Polymerization and Study on Controlled Release

JIANG Guo-hua[a], *ZHOU Hui-jie*[b], *JIANG Teng-teng*[a], *DU Xiang-xiang*[a]

(a. School of Material and Textiles; b. Qixin School, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: PDMAEMA-b-PS shell nano particles (SCL-NPs) were prepared by one-step RAFT polymerization using N,N'-bis(acryloyl) cystamine (BAC) as cross-linked agent. Indometacin-contained SCL-NPs (SCL-NPs-IND) was prepared by adding indometacin (IND) in SCL-NPs preparation process. The morphology, structure and properties of SCL-NPs were characterized by fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), nuclear magnetic resonance spectrometer (NMR), transmission electron microscope (TEM) and dynamic light scattering analyzer (DLS). It was found that SCL-NPs had explicit core-shell structure and their shapes are rand; The drug release property of SCL-NPs-IND was investigated by ultraviolet-visible spectrophotometer (UV). The results indicated that the drug release rate could be accelerated with assistant of dithiothreitol (DTT). Thus, release rate under alkaline condition was greater than that under acidic condition.

Key words: RAFT; shell cross-linked; drug carriers; reduction sensitivity; controlled release

(责任编辑：许惠儿)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net