

基于环糊精星形聚合物温度/pH 双敏感超分子胶束的制备及性能研究

周恒全 李桂英 陈心怡 何 娇 岳东琦

(鲁东大学 化学与材料科学学院,山东 烟台 264039)

摘要:通过原子转移自由基聚合方法制备了温度敏感性环糊精-聚N-异丙基丙烯酰胺星形聚合物(β -CD-(PNIPAM)₇);以苯并咪唑(BM)修饰聚乙二醇(PEG-OH)得到苯并咪唑-聚乙二醇(BM-PEG).利用环糊精与苯并咪唑之间的主-客体识别作用,在37℃条件下, β -CD-(PNIPAM)₇和BM-PEG在水溶液中自组装得到以PNIPAM为核、PEG为壳的温度/pH双敏感超分子胶束.以阿霉素(DOX)为模型药物,研究了超分子胶束的载药及释药性能.结果表明,超分子胶束呈现较为规则的空心结构,粒径在30~100nm,分散性较好,对药物具有较高的载药量和包封率,分别为41.70%和71.54%.药物释放速率随溶液的pH减小而增大,随温度的降低而增大,表现出良好的环境响应性.

关键词: β -环糊精;星形聚合物;环境响应性;超分子胶束

中图分类号:O631.3 文献标志码:A 文章编号:1673-8020(2020)03-0233-06

β -环糊精(β -CD)是由7个葡萄糖单元连接构成的一个具有中空结构、两端大小不一且不封闭的筒状分子,被应用于生物医药等多个领域^[1-2].空腔内的C—H键具有疏水性,较大的开口端由C₂和C₃的仲羟基构成,较小开口端由C₆的伯羟基构成,具有亲水性^[3-4].由于环糊精空腔内具有疏水性,可通过范德华力和疏水作用容纳各种小分子.同时,由于外表面具有亲水性,还可以通过表面的羟基与客体分子形成氢键作用^[5].聚(N-异丙基丙烯酰胺)(PNIPAM)是一种热响应性聚合物,当温度高于临界溶解温度(LCST)时,PNIPAM亲水链段会收缩,变为疏水.以 β -CD为核心,以PNIPAM为臂的星形聚合物具有良好的温度响应性^[6-7].星形聚合物具有独特的分子结构,广泛应用于生物、医药、催化剂载体等诸多领域.

β -CD和苯并咪唑(BM)在中性条件下可以通过主客体相互作用结合形成包合物^[8],而在酸性溶液中苯并咪唑发生质子化,脱离环糊精空腔,包合物解离,呈现pH值敏感性^[9-11].本文以 β -CD-(PNIPAM)₇为主体分子,苯并咪唑修饰聚

乙二醇(BM-PEG)作为客体分子,通过主客体包结作用形成温度/pH双重敏感的超分子载药胶束(β -CD-(PNIPAM)₇/BM-PEG).并以阿霉素(DOX)为模型药物,研究了超分子胶束的载药及释药性能.在37℃下,疏水的PNIPAM充当胶束核心,亲水的PEG充当胶束外壳,通过疏水作用负载小分子药物到胶束核心或环糊精空腔中.当温度低于LCST或者降低溶液pH为弱酸性时,胶束解离,药物得到迅速释放(图1).

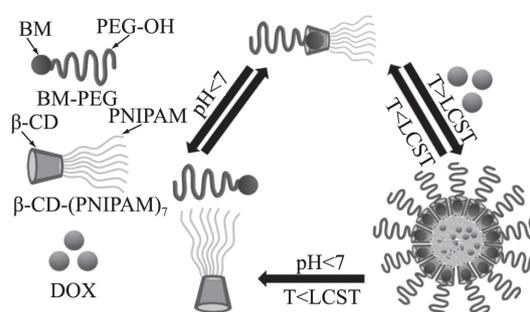


图1 β -CD-(PNIPAM)₇/BM-PEG超分子胶束的形成及载药与释放示意图

Fig. 1 Formation of β -CD-(PNIPAM)₇/BM-PEG supramolecular micelle for drug loading and release

收稿日期:2020-05-09;修回日期:2020-05-12

基金项目:国家自然科学基金(51403096)

第一作者简介:周恒全(1996—),男,山东淄博人,硕士研究生,研究方向为聚合物合成与改性. E-mail: 634087635@qq.com

通信作者简介:李桂英(1973—),女,山东潍坊人,教授,硕士研究生导师,博士,研究方向为功能与智能高分子. E-mail: guiyingli@

126.com

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

β -环糊精(β -CD)(天津博迪化工股份有限公司); 苯并咪唑(BM); 2-溴异丁酰溴(BriBB); N-甲基吡咯烷酮(NMP)(上海麦克林生化有限公司); N-异丙基丙烯酰胺(NIPAM); 聚乙二醇单甲醚 2000(PEG-OH)(上海萨恩化学技术有限公司); 五甲基二乙基三胺(PMDETA)(成都艾科达化学试剂有限公司); 三乙胺(TEA); 氯化亚铜(CuCl)(天津市瑞金特化学品有限公司); 盐酸阿霉素(DOX)(上海思域化工科技有限公司); 透析袋(截留分子量 3.5 kDa, 上海绿鸟科技发展有限公司).

Bruker AV 300NMR 核磁共振波谱仪(德国布鲁克公司); JEM-1230 透射电子显微镜(日本电子公司) 加速电压 200 kV; Nano ZS90 激光粒度仪(英国马尔文公司); UV-2550 紫外-可见分光光度计(日本岛津公司); UV-1100D 紫外-可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司).

1.2 星形聚合物 β -CD-(PNIPAM)₇ 的制备

通过原子转移自由基聚合(ATRP)制备星形聚合物 β -CD-(PNIPAM)₇^[13]. 在 0 °C 的 NMP (7 ml) 溶剂体系中放入 β -CD (1.135 g) 溶解, 然后缓慢加入 BriBB (1.85 ml) 与 NMP (1.5 ml) 的混合溶液, 在 0 °C 下反应 4 h, 然后转移到 25 °C 下反应 44 h. 用 CH_2Cl_2 萃取, 加入无水硫酸镁 (MgSO_4) 干燥 24 h 后过滤. 将滤液倒入冷的正己烷中, 抽滤得到白色沉淀, 真空干燥 24 h, 得到白色粉末状的 β -CD-Br. 将 CuCl (0.0126 g) 和 PMDETA (0.082 g) 溶于 4.0 mL 超纯水和丙酮混合溶液(体积比为 1:1). 在 N_2 保护下脱气 30 min, 然后在 35 °C 下将 β -CD-Br (0.25 g) 和 NIPAM (2.0 g) 加入上述反应体系, 反应 24 h 后产物透析 72 h. 真空冷冻干燥得到 β -CD-(PNIPAM)₇.

1.3 BM-PEG 的制备

将 PEG-OH (4.0 g, 2.0 mmol) 溶于无水甲苯 (80.0 ml) 中, 蒸馏除水, 待体系冷却至室温, 加

入四氢呋喃(THF) (30.0 ml) 和 TEA (1.0 ml), 冷却至 16 °C 时, 加入 BriBB (0.742 mL, 6.0 mmol) 和 THF 混合溶液 (10 ml), 然后在 25 °C 反应 48 h, 体系呈现乳白色. 将反应混合物过滤, 旋蒸除去甲苯和 THF, 得粗产品. 用 CH_2Cl_2 (25 ml) 溶解, 萃取, 依次用饱和 NaHCO_3 溶液和蒸馏水洗涤, 旋蒸后将产品加入冷乙醚中进行沉淀, 析出白色粉末, 真空干燥得产物 PEG-Br, 产率为 44.53%.

将 PEG-Br (3.0 g, 0.495 mmol) 与 BM (0.6 g, 4.95 mmol) 溶于 DMF (30 mL) 中, 然后加入 DIEA (0.87 mL, 4.95 mmol), 在 N_2 保护下 70 °C 搅拌反应 24 h. 旋蒸得到的粗产品用 CHCl_3 溶解, 蒸馏水洗涤, 无水 MgSO_4 干燥, 过量的冷乙醚沉淀, 将沉淀物置于 30 °C 真空干燥箱中 24 h, 得到产品 BM-PEG.

1.4 超分子胶束的制备及对 DOX 的负载与释放

分别配置 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 β -CD-(PNIPAM)₇ 及 BM-PEG 的水溶液. 按不同比例滴加 BM-PEG 到 β -CD-(PNIPAM)₇ 溶液中, 在 37 °C 恒温水浴锅中震荡 24 h 以确保两者完全复合. 负载阿霉素(DOX)时, 按投药比例为 20% ~ 120% 加入到 BM-PEG 中, 在 37 °C 下复合 24 h, 透析除去未包封的药物, 用紫外-分光光度计测定 DOX 的载药量(DLC%) 和包封率(EE%). 透析完成后, 将载有药物的溶液置于透析膜中, 在不同温度(25 °C, 37 °C) 和 pH(2.0, 4.7, 7.5) 的磷酸盐缓冲溶液中透析, 在特定的时间间隔下, 从释放系统中取出 5.0 mL 磷酸盐缓冲溶液, 同时加入等量的新鲜缓冲溶液, 用紫外-分光光度计测定释放的 DOX 浓度, 并计算 DOX 累计释放量^[12-13].

2 结果与讨论

2.1 聚合物的结构表征

β -CD-(PNIPAM)₇ 的 ¹H NMR 光谱如图 2 所示. 可以看出, 在 1.01 ppm 处出现 PNIPAM 中甲基(-C(CH₃)₂) 质子峰, 1.45 ppm 处出现 PNIPAM 碳骨架上的亚甲基质子峰, 1.89 ppm 处出现 PNIPAM 碳骨架碳上的相邻次甲基质子峰. 与氮

基相邻的次甲基(—NH—CH—)质子峰出现在3.77 ppm处.4.68~5.52 ppm处为β-CD骨架上的羟基质子峰.3.54 ppm处为β-CD的次甲基(—CH—)的质子峰.位于4.97 ppm处的质子峰是与β-CD骨架上—CHO中氧元素相邻的甲基.通过比较PNIPAM臂中甲基质子峰在3.77 ppm的积分面积和β-CD核心中次甲基质子峰在4.97 ppm的积分区域,每条臂上PNIPAM的重复单元数约为22^[15].通过¹H NMR计算,星形聚合物的平均分子量(Mn)为19600 g·mol⁻¹.

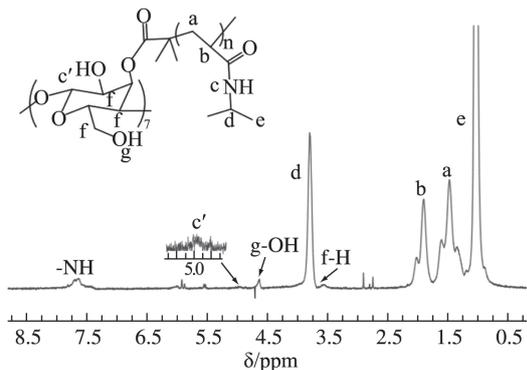


图2 β-CD-(PNIPAM)₇的核磁谱图

Fig.2 ¹H NMR spectrum of β-CD-(PNIPAM)₇

图3(a)为β-CD,β-CD-Br和β-CD-(PNIPAM)₇的红外光谱图.在β-CD的光谱中,

947 cm⁻¹处的吸收峰是β-CD中α-吡喃的特征吸收峰.1156 cm⁻¹处的吸收峰对应于C—O—C桥的对称拉伸,1080和1030 cm⁻¹的峰值是涉及C—O和C—O—C的骨架振动伸展.在β-CD-Br的红外谱图中,在1730 cm⁻¹处新增的峰是溴酰化羰基的伸缩振动峰.1460和1380 cm⁻¹是异丙基中—CH₃的不对称和对称弯曲振动吸收峰.1270和710 cm⁻¹是C—(C)O—O的不对称振动和C—Br的伸缩振动吸收峰.证明合成了大分子引发剂β-CD-Br.在β-CD-(PNIPAM)₇星形聚合物的谱图中,1530和1650 cm⁻¹处的新峰是酰胺基团弯曲振动和与酰胺基团结合的C—O伸缩振动吸收峰.

图3(b)为PEG-Br和BM-PEG的红外光谱图.在PEG-Br的谱图中,790 cm⁻¹处是C—Br键的特征吸收峰,1096 cm⁻¹处为C—O—C的特征吸收峰.1650 cm⁻¹处的峰为酯基的振动吸收峰.2880 cm⁻¹处则是—CH₃的伸缩振动吸收峰.在BM-PEG的谱图中,1730 cm⁻¹处的峰为酯基的振动吸收峰,2880 cm⁻¹处则是—CH₃的伸缩振动吸收峰,1105 cm⁻¹处为C—O—C的特征吸收峰,而1333 cm⁻¹处的峰为接入的苯并咪唑与PEG-Br反应生成的C—N单键的振动吸收峰.证明合成了PEG-Br和BM-PEG.

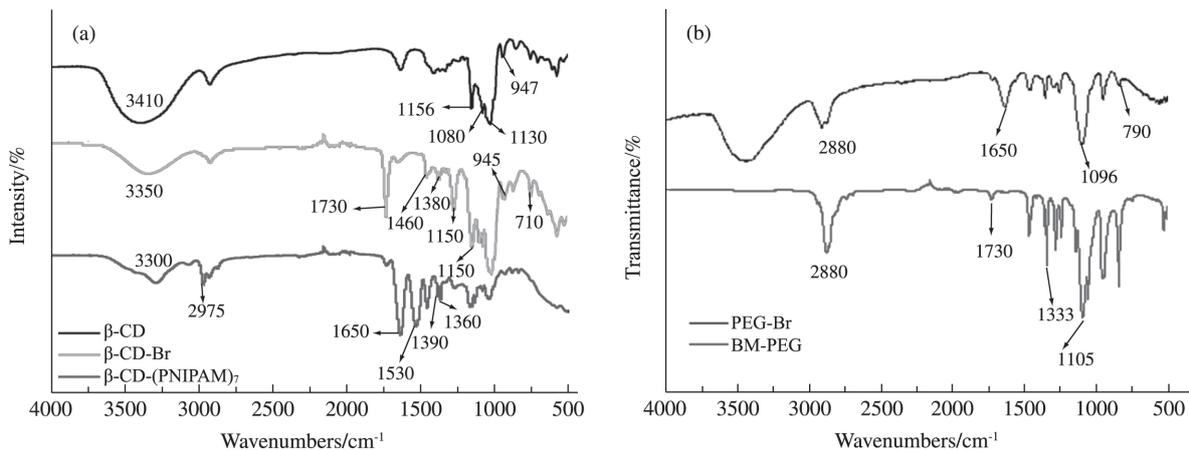


图3 (a) β-CD-(PNIPAM)₇和(b) BM-PEG的红外光谱图

Fig.3 FTIR spectra of (a) β-CD-(PNIPAM)₇ and (b) BM-PEG

2.2 超分子胶束的粒径及形貌分析

图4(a)为激光粒度仪测定的超分子胶束的粒径及分布图,由图可以看出超分子胶束的直径处于200~300 nm之间,且其分布比较窄.图4(b)为β

-CD-(PNIPAM)₇/BM-PEG的透射电镜图,由图可以看出超分子胶束微球的粒径在50~100 nm之间,不同胶束的大小分布也比较均匀.因为透射电镜在干燥的情况下测定,而粒径分布是在溶液中,所以测得的超分子胶束粒径会有差异.

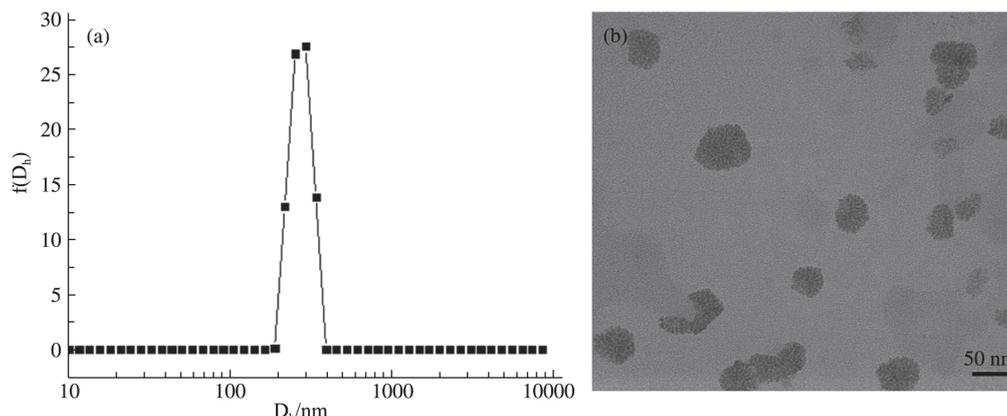


图4 (a) 超分子胶束粒径分布图和(b) 超分子胶束透射电镜图

Fig. 4 (a) Distribution of diameters and (b) TEM image of supramolecular micelles

2.3 超分子胶束的可逆相转变

图5(a)为 β -CD-(PNIPAM)₇与BM-PEG在不同比例下超分子胶束溶液(体积比3:1, 2:1, 1:1)及在相同浓度下 β -CD-(PNIPAM)₇溶液温度变化时的透光率变化图. 室温下, PNIPAM表现为亲水性, β -CD-(PNIPAM)₇和 β -CD-(PNIPAM)₇/BM-PEG包合物均无法聚集

形成自组装胶束, 溶液透光率比较高, 接近100%. 当温度高于PNIPAM的LCST时, PNIPAM变得疏水, 形成以PNIPAM为核, PEG为壳的自组装胶束, 溶液透光率降低. 由图中透光率曲线的变化趋势可以求出超分子胶束的LCST在32℃附近. 图5(b)为循环测定25℃及50℃下超分子胶束的透光率变化, 由图可以看出, 经过多次循环后超分子胶束仍具有良好的温度响应稳定性.

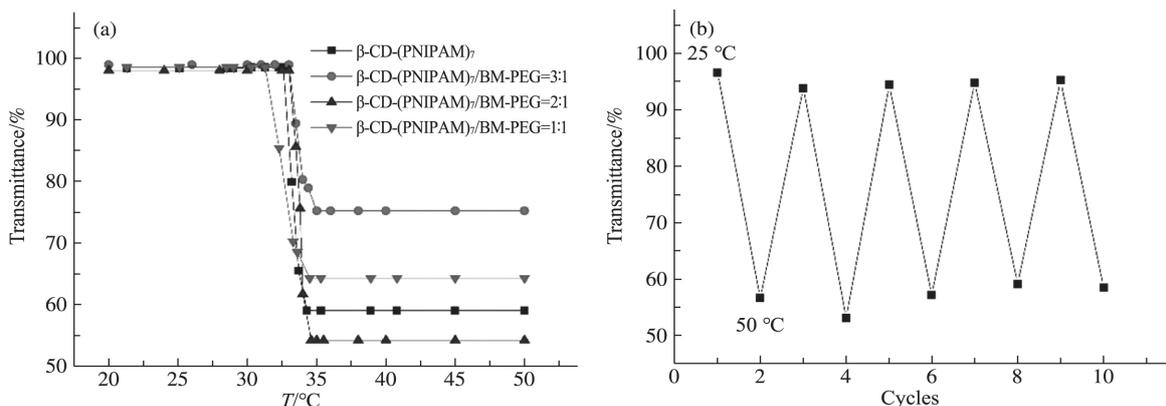


图5 (a) 超分子胶束透光率随温度变化图和(b) 25℃与50℃下超分子胶束温度响应稳定性

Fig. 5 (a) Plots of transmittance as a function of temperature and (b) Temperature responsive stability at 25℃ and 50℃ of supramolecular micelles

2.4 载药性能分析

表1为 β -CD-(PNIPAM)₇/BM-PEG超分子胶束对阿霉素的载药性能分析. 结合载药量和包封率两方面因素, 由表可以看出随着投药比的增大, 超分子胶束对DOX的载药量逐渐增大, 当投药量为100%时, 载药量能达到41.70%, 而包封率可以达到71.54%.

表1 超分子胶束对DOX的载药量DLC及包封率EE

Tab. 1 Drug-loading content (DLC) and entrapment efficiency (EE) of supramolecular micelle

m_0/m	DLC/%	EE/%
20%	3.84	20.00
40%	15.62	46.29
60%	25.12	55.90
80%	32.00	58.88
100%	41.70	71.54
120%	44.20	66.04

其中 m_0 为投药量 (mg); m 为胶束的质量。

2.5 超分子胶束对 DOX 的可控释放

超分子胶束负载 DOX 在不同温度下的体外释放行为如图 6(a) 所示。25 °C 时释放速率增大, 是因为 25 °C 时 PEG 链段与 PNIPAM 链段都为亲水性, 复合胶束发生解离, 72 h 内累积释放量达到 100%; 而 37 °C 时 PNIPAM 链段为疏水性, 可以较好的包载药物, 而亲水的 PEG 链段则保持了胶束稳定性, 因而药物释放速度较慢。图 6(b) 是

37 °C 下超分子胶束在不同 pH (2, 4, 7, 7.5) 及未负载到胶束中的药物释放曲线。对于单独使用药物, 释放速度很快, 3 h 内即达到 100%, 而负载到超分子胶束中的药物, 释放速率明显降低, 且随溶液 pH 值的变化而变化。由于 pH 降低, BM 发生质子化, 与环糊精空腔的复合作用消失, 导致部分超分子胶束分解, 药物释放增大。当将溶液 pH 从 7.5 降低到 2.0 时, DOX 累计释放量从 55% 增加到 98%。

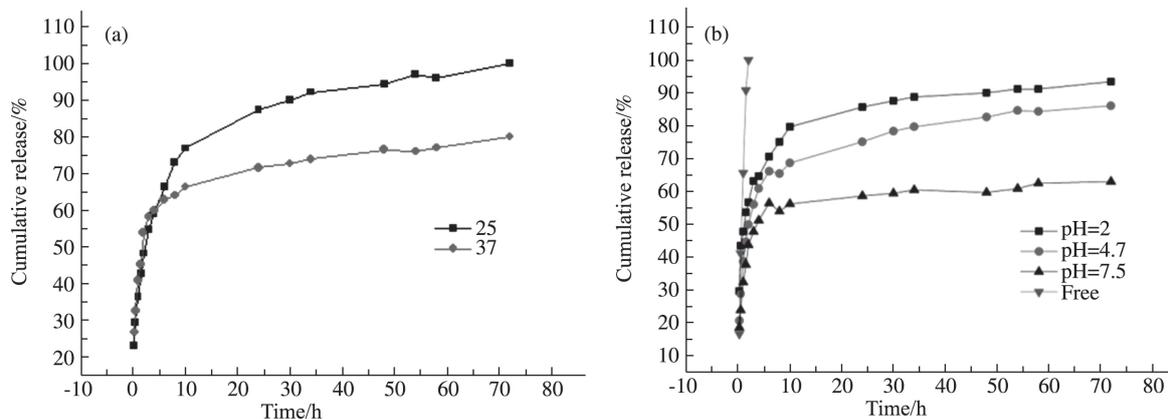


图 6 不同温度 (a) 和不同 pH (b) 下对 DOX 的释放曲线

Fig. 6 Release of DOX from micelles at (a) different temperature and (b) different pH

3 结论

利用 β -CD-(PNIPAM)₇ 和 BM-PEG 的主客体识别作用制备了温度和 pH 双重刺激响应性超分子胶束。胶束具有规则的球形结构, 透射电镜测得粒径在 30~100 nm 左右。超分子胶束的载药量能达到 41.70%, 而包封率最大可以达到 71.54%。超分子胶束对药物的释放随溶液温度和 pH 的降低而增大, 表现出良好的释药可控性。这种双重刺激响应性超分子胶束在药物运输方面有潜在的应用价值。

参考文献:

- [1] MA N, LI Y, XU H, et al. Dual Redox Responsive Assemblies Formed from Diselenide Block Copolymers [J]. *Journal of the American Chemical Society* 2010, 132(2): 442-443.
- [2] 李琳琳, 段尊斌, 朱丽君, 等. 基于修饰的 β -环糊精的超分子体系研究及应用进展 [J]. *应用化学*, 2017, 34(2): 123-138.
- [3] 廖荣强, 刘满朔, 廖霞俐, 等. 基于环糊精的智能刺激响应型药物载体 [J]. *化学进展* 2015, 27(1): 79-90.
- [4] 周在帅. 多重响应型环糊精纳米载体递送抗癌药物研究 [D]. 烟台: 鲁东大学, 2019.
- [5] 高玉荣, 于娜娜, 李桂英. 壳聚糖接枝 β -环糊精聚合物空心微球的制备及其载药性能 [J]. *离子交换与吸附* 2016(5): 33-41.
- [6] 戚旻熠, 于娜娜, 李桂英. 敏感性聚电解质纳米粒子的制备及对 5-FU 的控制释放 [J]. *鲁东大学学报 (自然科学版)* 2014, 30(4): 315-319.
- [7] SCHILD H G. Poly (N-isopropylacrylamide) - experiment, theory and application [J]. *Progress in Polymer Science*, 1992, 17(2): 163-249.
- [8] ZHANG Z, DING J X, CHEN X F, et al. Intracellular pH-sensitive supramolecular amphiphiles based on host-guest recognition between benzimidazole and beta-cyclodextrin as potential drug delivery vehicles [J]. *Polymer Chemistry* 2013, 4(11): 3265-3271.
- [9] ZHANG Z X, LIU K L, LI J. Self-Assembly and Micellization of a Dual Thermoresponsive Supramolecular Pseudo-Block Copolymer [J]. *Macromolecules*,

- 2011, 44(5): 1182–1193.
- [10] YANG K W, WAN S C, CHEN B B, et al. Dual pH and temperature responsive hydrogels based on β -cyclodextrin derivatives for atorvastatin delivery [J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 136: 300–306.
- [11] ANBARASAN B, BABU S V, ELANGO K, et al. pH responsive release of doxorubicin to the cancer cells by functionalized multi-walled carbon nanotubes [J]. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2015, 15(7): 4799–4805.
- [12] ZHOU Z, GUO F, WANG N, et al. Dual pH-sensitive supramolecular micelles from star-shaped PDMAEMA based on β -cyclodextrin for drug release. International Journal of Biological Macromolecules [J]. 2018, 116: 911–919.
- [13] ZHOU Z, GUIYI, WANG N, et al. Synthesis of temperature/pH dual-sensitive supramolecular micelles from β -cyclodextrin-poly(N-isopropylacrylamide) star polymer for drug delivery. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces [J]. 2018, 172: 136–142.

Preparation and Property of Temperature/pH Dual – responsive Supramolecular Micelles

ZHOU Hengquan, LI Guiying, CHEN Xinyi, HE Jiao, YUE Dongqi

(School of Chemistry and Materials Science, Ludong University, Yantai 264039, China)

Abstract: Temperature sensitive cyclodextrin-poly(N-isopropylacrylamide) star-shape polymer (β -CD-(PNIPAM)₇) was prepared by atom transfer radical polymerization, and benzimidazole-polyethylene glycol (BM-PEG) was obtained by modifying polyethylene glycol (PEG-OH) with benzimidazole (BM). Using the host-guest recognition between cyclodextrin and benzimidazole group, a temperature and pH sensitive supramolecular micelle with PNIPAM as the core and PEG as the shell was prepared in aqueous solution at 37°C. Doxorubicin (DOX) was used as a model drug to study the drug loading and release properties of supramolecular micelles. The results indicate that the supermolecular micelles have regular hollow structure with 30~100 nm diameter and good dispersivity. In addition, the drug-loading content and entrapment efficiency of polymer micelles were 41.70% and 71.54%, respectively. The drug release rate increases with the decrease of pH value and temperature, showing good environmental responsiveness.

Keywords: β -cyclodextrin; star-shape polymer; environmental responsiveness; supramolecular micelles

(责任编辑 刘军深)