

具有磁效应的温敏性药物载体的制备及表征

贾梦虹,任 杰,任天斌*

(同济大学材料科学与工程学院 纳米与生物高分子材料研究所,上海 200092)

摘要:在合成具备一定分子结构的聚(*N*-异丙基丙烯酰胺)-聚乳酸(PNIPAAm-PLA)嵌段共聚物的基础上,采用透析法制备了PNIPAAm-PLA共聚物磁性复合胶束和囊泡。本文发现不同的制备工艺条件会分别形成胶束和囊泡两种载体形态,并对两种载体的形貌进行了细致对比,发现两种结构特点的载体分别适合疏水性和亲水性药物的装载。对复合胶束的最低临界溶解温度(LCST)进行了表征研究,得到其LCST在38℃左右,略高于人体体温。对不同Fe₃O₄磁性粒子投料比对应制备的复合胶束的磁性能进行了较详细的测试,发现磁性粒子的加入量对其磁响应性影响不大。

关键词:磁效应;温敏性;药物载体

利用聚合物作为载体的靶向药物体系引起了基础科学及临床应用的广泛关注^[1]。聚乳酸(PLA)作为可降解药物载体已有许多应用研究,如广谱抗生素、抗肿瘤药、长效避孕药^[2~4]等。进入20世纪80年代以来,为克服PLA一些局限性,相关研究主要聚焦在以PLA为主的各类共聚物以及在生物医学工程方面的应用^[5]。聚异丙基丙烯酰胺(PNIPAAm)是一种有效的温敏性聚合物^[6],多个文献^[1,7,8]中报道其最低临界溶解温度(LCST)接近人体温度,可以将聚合物载体的LCST设计在40℃左右(因为此温度高于人体温度,低于临床应用的高热温度),利用温度变化带来的载体形态变化控制药物释放。因此将PLA和PNIPAAm共聚结合,可以有效利用两者的优势,制备综合性能更优的药物载体。

为了提高药物的效用,减少其毒副作用,靶向药物正成为当今的热门课题,自20世纪70年代Pilwat^[9]和Widder等^[10]提出磁控靶向药物传递系统的概念以来,磁性药物微球作为其中一种新型的靶向给药系统,已成为当前国内外抗癌药物剂型研究的重点和热点^[11~13],将磁性药物注入人体内,同时在肿瘤外部施加一定场强的外磁场,利用磁性药物的流动性能和磁场诱导性能,将磁性药物载体定向于靶区,药物以受控的方式缓慢定位释放,集中在病变部位发挥作用,相应减少了全身药物水平,从而达到高效、速效、低毒的作用^[14]。临床试验表明,磁性微球可定期安全地排出体外^[15]。

具有磁效应的温敏性复合载体利用外部磁场在药物输送上有主动靶向效应的同时,还可以产生磁热效应,将复合载体升温至LCST,主动控制药物释放。因此本文将主要研究PNIPAAm-PLA嵌段共聚物的合成控制,具有磁效应的温敏性药物载体的不同制备方法,以及不同制备工艺条件对药物载体形貌和性能的影响。

1 实验部分

1.1 主要实验试剂及仪器

过氧化苯甲酰(BPO),分析纯,国药集团;2-巯基乙醇,分析纯,阿尔法化学试剂有限公司;*N*-异丙基丙烯酰胺单体,99%纯度,上海物竞化工科技有限公司;二甲基乙酰胺(DMAc),分析纯,国药集团;丙交酯(*D,L*-LA),实验室自制;辛酸亚锡,分析纯,国药集团。

恒温磁力搅拌器,H01-3型,上海梅颖浦仪器仪表制造有限公司;冷冻干燥机,FD-1,北京博医康实验仪器有限公司;低温试验箱,DW-40,上海路达实验仪器有限公司;远红外干燥箱,70-1型,上海阳光实验

收稿:2013-03-04;修回:2013-04-19;

作者简介:贾梦虹(1983—),男,博士,研究方向为生物医用高分子材料;

* 通讯联系人,E-mail:rtb002@163.com.

仪器厂;超声仪,B5200S型,必能信超声有限公司;透析袋,截留分子量14000,国药集团;注射器型有机过滤器,滤孔直径 $0.22\mu\text{m}$,国药集团;离心机,80-2型,上海手术器械厂。

1.2 合成与制备

1.2.1 羟基封端的 PNIPAAm 大分子的合成 称取一定量的提纯后的 NIPAAm 装入三颈瓶中,倒入 THF,待完全溶解后,分别加入少量 BPO 和 2-巯基乙醇。最后加入搅拌磁子,接上冷凝管,密封。充氮时间 20~30min,反复充氮气一抽真空 2~3 次。保持氮气气氛,把三颈瓶放入 70°C 油浴锅中,磁力搅拌下冷凝回流反应 7h。反应结束后将反应液在真空下挥发掉一半体积 THF,搅拌条件下逐滴滴到大量乙醚中使产物沉淀。用布氏漏斗过滤出沉淀物,并反复用乙醚清洗过滤产物。然后分别以丙酮-乙醚作良溶剂-不良溶剂,反复清洗两次进一步提纯产物。待溶剂挥发干净后,放在真空烘箱中, 30°C 真空干燥 24h,烘干后得到白色 PNIPAAm 粉末。

1.2.2 PNIPAAm-PLA 的合成 将原料 LA 和 PNIPAAm 在 50°C 下真空干燥 2h。干燥后,称取一定量 LA 和 PNIPAAm 加入于三颈瓶中。加入 1mL 二甲苯,待粉料完全溶解后,用注射器注入 0.2mL 辛酸亚锡。最后加入搅拌磁子,接上冷凝管,密封。 150°C 磁力搅拌下反应 24h,提纯后得到 PNIPAAm-PLA 共聚物。

1.2.3 含磁性粒子载体的制备 本研究采用透析法^[16]来制备药物载体。用取 125mg PNIPAAm-PLA 溶于 25mL DMAc,完全溶解后,装入透析袋中。接着往透析袋中滴入不同量的 Fe_3O_4 纳米粒子,在大量去离子水中透析,每 12h 换一次水,3 天后透析袋中的液体即为磁性载体;将此液体冷冻干燥后再溶于一定温度的去离子水中可得到新形态的磁性载体。

1.3 分析表征

1.3.1 核磁共振分析 采用德国 Bruker 公司的 DMX500 型核磁共振仪分析均聚物和共聚物的组成。

1.3.2 凝胶渗透色谱(GPC)分析 采用 Waters 150C 型 GPC 凝胶渗透色谱仪。柱温 35°C ,流动相四氢呋喃,淋洗速率 0.1mL/min,窄分布的聚苯乙烯作内标,每个样品扫描时间 42min。对溶解后有杂质的试样,进行离心处理,3000r/min,离心时间 5min。

1.3.3 透射电镜(TEM)分析 采用日立 H-800 型透射电镜,在加速电压 150kV 下观察胶束粒径和形状。观察前将新制的胶束溶液置于超声振荡器中使其分散均匀,蘸取胶束溶液滴于铜网上,用 2% 磷钨酸溶液染色。样品沉积后,滤纸吸收溶液并在空气中干燥。

1.3.4 紫外-可见分光光度计分析 采用 Varian CARY 100 Bio 型紫外-可见分光光度计,超级恒温水浴配合控温。将水槽的进水口和循环出水口接到光度计,打开水槽外循环开关,样品池的底座在水浴加热 30min 直至恒热。将浓度为 0.2mg/mL 的聚合物水溶液置于比色皿中,测定不同温度时聚合物水溶液对可见光的透过率(波长为 500nm 处)。

1.3.5 示差扫描量热分析 采用 MDSC-Q100 型差示扫描量热仪(美国 TA 仪器公司)记录胶束的相变温度及其吸热/放热焓。取胶束的水溶液(0.5mg/mL,大于临界胶束浓度 $1\mu\text{g}/\text{mL}$)进行测量,氮气流速率为 50mL/min,升温范围 $25^\circ\text{C} \sim 55^\circ\text{C}$,升温速率 $0.5^\circ\text{C}/\text{min}$,量热动态范围: $+/-500\text{mW}$;量热精度(金属标样): $\pm 0.05^\circ\text{C}$;灵敏度:0.2 微瓦;相对解析度:2.1。

1.3.6 磁响应性分析 采使用南京大学仪器厂 LH-3 型振动样品磁强计测试磁响应性。称取一定量包有磁性粒子的胶束粉末于小称量纸中,将称量纸折成小包,夹入样品夹中,进行磁响应性测试,得到磁滞回线。

2 结果与讨论

2.1 PNIPAAm-PLA 共聚嵌段比分析

图 1 为 PNIPAAm-PLA 与 PNIPAAm 的核磁共振对比图。由图可以看到,在 5.2ppm 和 1.6ppm 处分别明显地增加了 PLA 链上的次甲基的特征质子共振峰 f 和侧链上的甲基峰 g,在 4.3ppm 和 1.6ppm 处明显增加了共聚官能团巯基乙醇($-\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$)上的特征质子共振峰。同时仍能清楚地看到 PNIPAAm 侧链上的两个甲基和一个次甲基上的特征质子共振峰(1.2ppm 和 4.0ppm),PNIPAAm

链上亚甲基和次甲基的特征质子共振峰与 PLA 甲基峰有些重叠,不是很容易分辨出。共聚物的氢谱上很好地显示了 PNIPAAm 和 PLA 的特征振动峰。

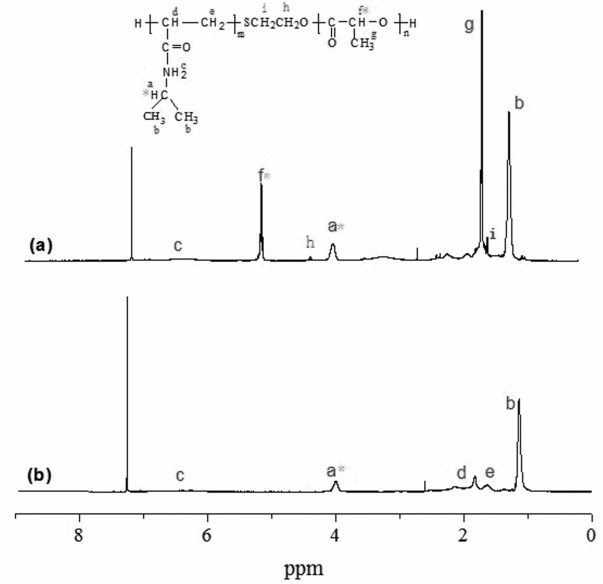


图 1 核磁共振谱图

(a)PNIPAAm-PLA;(b)PNIPAAm

Figure 1 ¹H-NMR

(a)PNIPAAm-PLA;(b)PNIPAAm

由¹H-NMR 谱图中的各基团对应峰的面积可以计算出共聚物的链段比。PNIPAAm 的次甲基峰(4.0ppm)和 PLA 的次甲基峰(5.2ppm)受干扰较小,故利用两处的积分值 I_N 和 I_L 计算嵌段共聚物中 PNIPAAm 链段和 PLA 链段的摩尔组成比(F_N/F_L)。

$$\frac{F_N}{F_L} = \frac{I_N}{I_L} = \frac{9.328}{10.000} = 1 : 1.07$$

通过公式(1)计算,两嵌段之比 PNIPAAm:PLA=1:1.07。由此可知,疏水链段与亲水链段比例相当,这对形成球形核-壳结构的胶束是有利的。

2.2 PNIPAAm-PLA 共聚物嵌段分析

2.2.1 PNIPAAm 的分子量 反应后所得产物干燥后,为白色粉末,极易溶于水和 THF。通过 GPC 测量 PNIPAAm 反应产物(以 THF 为溶剂,PS 为标样,淋洗速率 0.1mL/min),测得分子量 $M_w = 7800$ 。对于两性性的 PNIPAAm 聚合物,分子量过大,形成胶束的尺寸大;过小将无法形成胶束。实验中制备该分子量较适宜。同时,分子量大小还将影响羟端基对亲水/疏水链段比例的调节作用,如果分子量过大,端羟基调节的作用很小,LCST 提高的幅度小。

2.2.2 PNIPAAm-PLA 共聚物的分子量 PNIPAAm-PLA 共聚产物在做 GPC 检测时,在 THF 中有一部分没有溶解,可能是由于共聚物极性较大造成的。离心后,将溶解的部分做检测。结果发现分子量 $M_w = 6600$,分子量分布指数为 2.5。相比较共聚前的 PNIPAAm,分子量反而减小了,但分子量分布指数降低了。

在共聚产物后处理时,单体丙交酯和可能的副产物 PLA 均聚物都用乙醚反复洗涤过。而均聚物 PNIPAAm 是极易溶于 THF 的,但共聚后产物有部分不溶,可能是由于共聚反应发生引起的。而其中不溶的部分是因为共聚上的 PLA 链段过长,分子量较大;由于不能溶解,没法测到分子量,所以测得的分子量反而变小了。从分子量分布上考虑,分子量大的没能测量,从而减小了分布指数,某种程度上也能补充解释共聚物的生成。

2.3 载体形貌分析

图 2 为 PNIPAAm-PLA 磁性复合胶束溶液未冷冻干燥前的电镜照片。图中可以很清楚地看到球周

围有一圈浅色圆环,即是胶束的核壳结构^[17]。胶束成球形相当好,粒径均一,相比较空白的 PNIPAAm-PLA 胶束,粒径为 200nm 左右。胶束内层看见深色的小点为 Fe_3O_4 纳米颗粒。从照片的平面角度上看磁性纳米颗粒并没有团聚在一起,而是较均匀地分散在胶束表面。因为磁性粒子未改性,氧化物与带胺基的亲水性外壳会形成离子键,在静电作用下,磁性粒子吸附在胶束的表面,可能由于表面磁性粒子之间的相互作用力,胶束多聚集在一起。

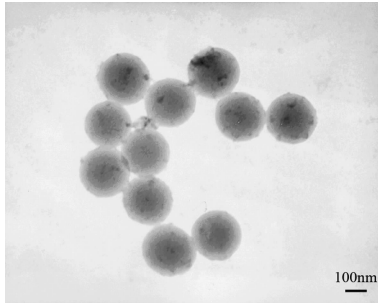


图 2 未冻干前磁性胶束的 TEM 照片

Figure 2 Morphology of composite micelles(before freeze-drying)

为磁性胶束冷冻干燥后,再在去离子水中溶解透析后形成的囊泡的 TEM 照片。从图中观察到胶束不是球形的,而是菱形和球状共存的奇特囊泡结构。囊泡的直径大约在 $1\mu\text{m}$ 左右。囊泡形貌从放大图片图中可以清楚看到,其中间有一个实心的核,外壳一圈均匀地附有黑色壳层。尽管外壳大小不同,但其内核直径相当均一,在 300nm 左右。

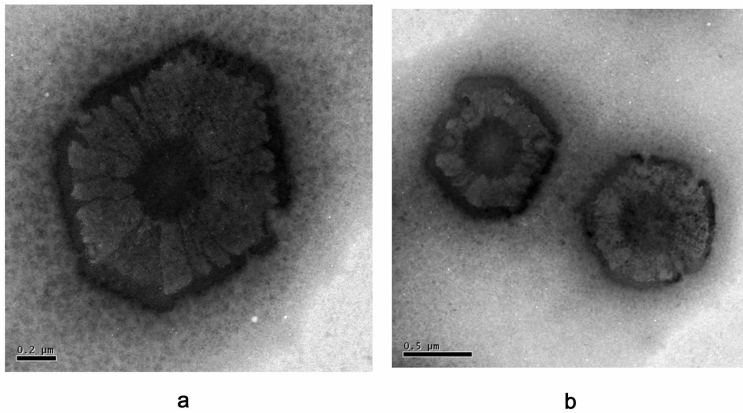


图 3 胶束冻干再溶解后形成囊泡的 TEM 照片

Figure 3 Morphology of composite vesicles(freeze-dried and then dissolved)

通常,囊泡的结构取决于核内链段的伸展^[18],囊泡壳内链段的排斥以及溶剂-囊泡界面能三者之间的相互影响。在水溶液中形成的囊泡,在 PLA 胶束核内将会存在很强的应力。这种应力可以通过增加胶束尺寸在很大程度上得到松弛;然而,为了降低 PLA-水之间的不相容接触,链段的进一步伸展是受迫的。这两方面影响的竞争作用下,可能会倾向于形成球形或菱形囊泡。

在 TEM 检测前,胶束需要用磷钨酸染色,方便在 TEM 下清楚观察。在图中黑色部分较易被磷钨酸染色所以在透射电镜下较暗,而图中颜色相对较淡的区域由于较难被磷钨酸染色所以在透射电镜下较亮。这说明图中胶束里黑色区域是由亲水性高分子链段(PNIPAAm)组成的,这些黑色区域分布在胶束中心和边缘,将有利于亲水性药物的包覆;而照片中胶束里其它较亮的区域主要由疏水性高分子链段(PLA)组成的,这些较亮区域分布在胶束中间,将有利于疏水性药物的包覆和装载。

2.4 磁性复合胶束温敏性分析

图 4 为 PNIPAAm 聚合物胶束在水性溶液中的透光率与温度关系图,由图可得,胶束的 LCST 为

38.3℃左右;图 5 为磁性复合胶束水溶液的 DSC 差热分析图。从图中可以看到在 37.6℃出现一个吸热峰,所以得到磁性复合胶束的 LCST 为 37.6℃,与空白共聚物胶束的 LCST36.4℃相差不大,可见加入磁性胶束复合后对其 LCST 影响不大,其 LCST 在 38℃左右。

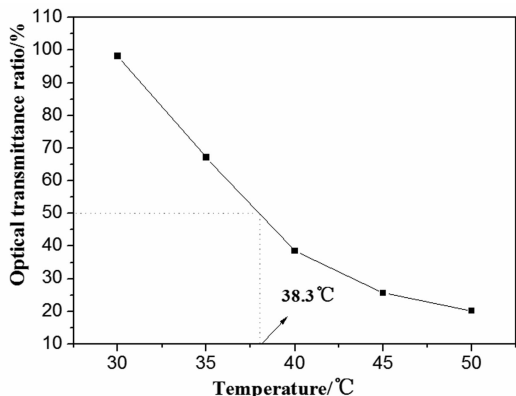


图 4 磁性复合胶束在水性溶液中的透光率与温度关系图

Figure 4 Transmittance change of composite micelles as a function of temperature

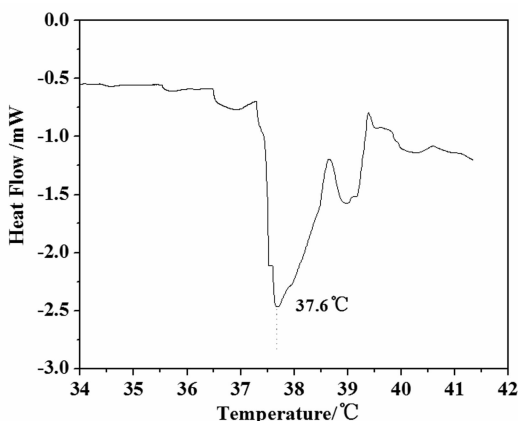


图 5 磁性复合胶束水溶液的 DSC 差热分析图

Figure 5 DSC thermogram of micelles solution

2.5 胶束磁响应性分析

用振动样品磁强计对 Fe₃O₄ 纳米粒子和各组磁性复合胶束的磁响应性进行测定,如表 1 所示。结果发现,磁性粒子的加入量对其磁响应性影响不是很大。图 6 为 298K 下 Fe₃O₄ 纳米粒子和磁性复合胶束 Run 3 的磁滞曲线。可以看出,胶束的饱和磁化强度为 1.2emu·g⁻¹,相比于磁性粒子,磁性复合胶束的磁化强度下降较多,这是因为存在没有磁性的聚合物胶束外壳包裹的影响,同时磁性物质在其中的比例降低,因此磁响应性也削弱了。结果所得到的曲线不够光滑,可能是由于测试中胶束样品量少,而本身含磁性粒子比例又小,磁响应性较低造成的。

表 1 不同磁性粒子投料比的磁性能

Table 1 Magnetic effect of different feed ratio

编号	PNIPAAm-PLA/mg	Fe ₃ O ₄ /mg	DMAc/mL	饱和磁化强度/(emu·g ⁻¹)
Run 1	125	40	25	0.8
Run 2	125	80	25	1.2
Run 3	125	120	25	1.2

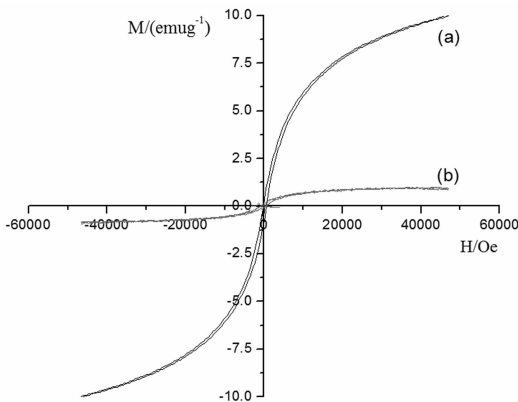


图 6 磁滞回线图

(a) Fe₃O₄ 纳米粒子;(b)磁性胶束

Figure 6 The B-H curves

(a)Fe₃O₄ nanoparticles; (b)magnetic composite micelles

3 结论

本文通过自由基聚合成功地制备了羟基封端的 PNIPAAm,并以该预聚物为引发剂引发丙交酯开环聚合,合成了 PNIPAAm-PLA 嵌段共聚物。透析法制备了 PNIPAAm-PLA 共聚物磁性复合胶束/囊泡,采用紫外-可见分光光度计和 DSC 测定了胶束的相变行为及 LCST,测定其 LCST 值在 38℃左右,适合载体释药。利用 TEM 观察胶束/囊泡的形貌和尺寸,发现未冷冻干燥的胶束形貌和冻干后再溶解形成的囊泡形貌有较大不同,推测其载药性能上各有优劣。振动样品磁强计测得胶束饱和磁化强度为 1.2emu/g。该研究结果为利用磁热产生高温触发温敏性载体相变来靶向控制释放药物奠定了基础,为肿瘤热疗提供了新途径和新思路。

参考文献:

- [1] Joseph J. Polym Adv Technol, 2006, 17(6): 395~418.
- [2] 胡培战,吴兰亭,杨士林. 生物医学工程杂志,1993,10(2):183~193.
- [3] Davis S. Trends Biotechnology, 1997, 15 (6): 217~224.
- [4] Senior J H. Ther Drug Carrier System, 1987,3:123~193.
- [5] 李孝红,袁明龙,熊成东. 高分子通报,1999,(1):24~27.
- [6] 李晓卫,刘文广,朱敦皖. 高分子通报,2005,(03):109~115.
- [7] Kim S, Healy K. Biomacromolecules, 2003, 4(5): 1214~1223.
- [8] Katherine B, Aubrecht R. J Polym Sci, Part A: Polym Chem, 2005, 43(21): 5156~5167.
- [9] Gupta P K, Hung C T. Life Sci, 1989, Vol. 44: 175~181.
- [10] Widder K J, Senyei A E, Scarpelli D G. Proc Soc EXP Biol Med, 1978, 58 (1): 141~146.
- [11] 朱瀛,陆伟根. 中国医药工业杂志,2005,36(9):581~584.
- [12] 马秀玲,黄丽梅,郑思宁. 广州化学,2003,28(3):58~64.
- [13] 吴传斌,魏树礼. 中国药学杂志,1993,28(6):330~332.
- [14] 孙雪,奚廷斐. 中国修复重建外科杂志,2006,20(2):189~193.
- [15] 郑幼伟,张培云. 河南肿瘤学杂志,2003,16(4):309~312.
- [16] 王彩霞,冯霞,杨军. 化学研究与应用,2002,18(6):54~59.
- [17] 朱蕙,江明. 应用化学,2001,15(8):336~341.
- [18] Zhang L F, Eisenberg A. Macromolecules, 1995, 268(5218): 1728~1731.

Preparation and Characterization of the Magnetic and Thermo-responsive Drug Carrier

JIA Meng-hong, REN Jie, REN Tian-bin*

(Institute of Nano and Bio-Polymeric Materials, Tongji University, Shanghai 200092, China)

Abstract: In the study, A certain molecular structure of the PNIPAAm-PLA block copolymer is synthesized. Dialysis is applied to prepare the PNIPAAm-PLA magnetic composite micelles and vesicles. Different preparation conditions form micelles and vesicles respectively, and the morphology of the two carrier s is contrasted. Two structures of the carrier are suitable for the loading of hydrophobic drug and hydrophilic drugs respectively. The LCST of composite micelles is characterized, its LCST is around 38℃, which is little higher than normal body temperature. Different feed ratios of Fe₃O₄ magnetic particles leads to different magnetic properties of micelles, but the ratio doesn't play an important role in magnetic property.

Key words: Magnetic; Thermo-responsive; Drug carrier