

接枝聚合物 PAA-g-PIPA 微球的 制备及其温控释药研究*

李雄伟 严昌虹 廖 奇

(中国科学院成都有机化学研究所, 成都, 610015)

摘 要

采用自由基溶液聚合法合成出N-异丙基丙烯酰胺齐聚物(Poly-N-Isopropylamide, PIPA). 通过缩合将PIPA接枝在聚烯丙胺盐酸盐(Polyallyamine hydrochloride, PAA)上得到接枝聚合物PAA-g-PIPA. 用化学交联法将PAA-g-PIPA制备成 $10\mu\text{m}$ 左右的微球. 所得微球通过物理法吸附阿霉素(Adriamycin, AD)后, 采用动力学透析法测定其体外释药性能. 实验数据拟合数学模型得到表征药物微球的释药特性的药物扩散系数 K_m . K_m 在 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ — $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 范围内随温度的升高而增大, 反映了载药PAA-g-PIPA微球具有温控释药性.

关键词 接枝聚合物、微球、温度敏感性、昙点、控制释放

最近, 人们对具有外部信号应答性聚合物产生了很大的兴趣. 普遍认为外部信号应答性聚合物在生物医学领域有着极大的应用价值. 所谓外部信号是指聚合物材料存在的环境条件, 如pH值、温度、电流和化学物质等. 对外部信号的应答, 即一旦这些外部条件产生一个小的扰动, 材料的性能就会产生相应的变化, 如相态的变化等. 利用这种变化形成“On-Off”控制系统可实现生物医学领域的新课题——药物控制释放.

目前, 已有多具外部信号应答性的聚合物见诸报道^[1-7]. 通常对热信号较敏感的有N-IPA, Heskins等人^[5-7]证明PIPA水溶液在 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 附近有一个临界昙点. Kitano等人^[3]最近则发现分子量2,000左右的PIPA昙点在 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以上. 由于PIPA的昙点十分接近人的体温, 因而具有用于人体实现温控释药的可能性.

Gupta等人^[9]曾建立了一系列的微球释药动力学模型来模拟微球的释药过程, 较好地定量表征了药物微球的药物释放性能. 我们参考Gupta的数学模型, 用非线性最小二乘法拟合实验数据, 定量地表征出PAA-g-PIPA微球的温控释药特性.

实 验 部 分

1. 材料及试剂

IPA (Tokyo Kasai, Tokyo, Japan)在丙酮-乙醚体系中重结晶纯化. 2,2'-偶

* 1991年12月3日收到

氮二异丁腈 (2,2'-Azobisisobutyronitrile, AIBN, 上海试剂四厂), 在甲醇中重结晶。PAA · HCl ($M = 60,000$, Nittobo, Co., Tokyo, Japan), AD (Farmitalia Carlo Erba limited, Italy)。实验用水经二次蒸馏。其它试剂均为市售商品。

2. PIPA 的合成

在四颈烧瓶中加入甲醇, 通氮气, 升温至 70°C 。加入单体 IPA、引发剂 AIBN 及链转移剂 β -巯基丙酸 (β -mercaptopropionic acid, MPA)。反应时间 6h, 蒸发除去部分残余溶剂, 在丙酮-正己烷体系中纯化聚合物。用超滤器 (膜截留分子量 10,000, 上海瑞丽分析仪器厂) 除去分子量较高的组分, 收集低分子量聚合物。产物用 0.01mol/l NaOH 溶液进行电导滴定 (DDSIIA 型电导仪, 上海第二分析仪器厂) 测量聚合物末端羧基, 得 PIPA 的平均分子量 2930。

3. 接枝聚合物的制备

将 PAA · HCl 和 PIPA 溶于水, 加入水溶性碳二亚胺 (3-Ethyl-3-(3-Dimethylamino-propyl)-Carbodiimide hydrochloride, EDC), 溶液的 pH 值调至 5.0, 在 10°C 条件下搅拌过夜。产物经透析、超滤纯化, 冷冻干燥后用红外光谱 (Nicolet, MX-1) 分析确定结构, 用元素分析测定其接枝率。

4. 微球制备及接药

采用戊二醛 (Glutaraldehyde, GA) 作交联剂, 在 W/O 乳液体系中介联聚合物成球。将产物微球洗净, 光学显微镜下测定其粒径。冷冻干燥产物微球备用。

将准确称量的冻干微球, 加到一定浓度的 AD 水溶液中, 室温下搅拌 24h, 再在 45°C 水浴中静置 1h。接药过程中避光。接药后的微球用水洗涤, 用紫外分光光度计 (UV-120-02, Shimadzu Co., Kyoto, Japan) 测定洗涤上清液在 233nm 处的吸光率, 计算接药量。冻干接药微球备用。

接药量 = 原液中药物含量 - 上清液中药物量。

PAA-AD 的接药率为 $70.9\text{ }\mu\text{g AD/mg 微球}$, PAA-g-PIPA-AD 接药率为 $60.6\text{ }\mu\text{g AD/mg 微球}$ 。

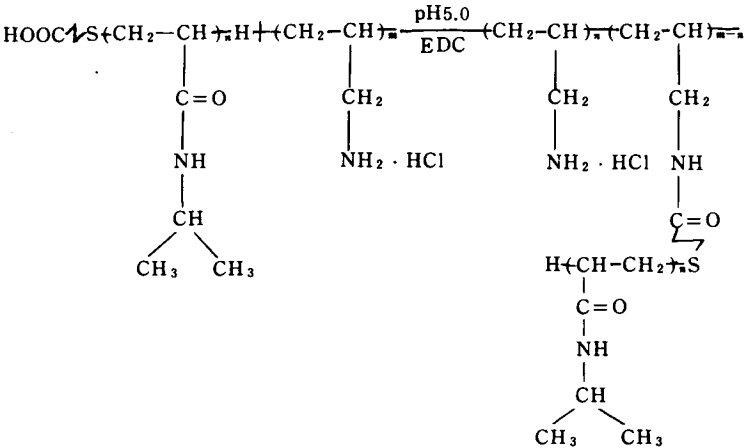
5. 药物释放实验

定量称取接药微球, 置于透析膜 (Size :24/32, Viskase sales Co. Japon) 做成的透析袋中, 加入 5ml 生理盐水, 密封透析袋, 将其置于装有 150ml 生理盐水的容器中, 在恒温振荡及避光条件下, 定时抽取外液, 用紫外分光光度计测定其外液药物浓度。用该法测定药物在 30°C 、 35°C 、 40°C 、 45°C 各温度条件下的释放性能。

结 果 与 讨 论

1. 接枝聚合物的制备及接枝率

通过自由基溶液聚合得到 PIPA, PIPA 的分子量由反应过程中加入的 MPA 来控制。由于 MPA 作为链转移剂参加反应, 使产物 PIPA 的末端带 $-\text{COOH}$ 功能基团。因此, 用电导滴定法测定产物的 $-\text{COOH}$ 含量可推算出产物的平均分子量。同时 PIPA 中的末端 $-\text{COOH}$ 基团使 PIPA 在 EDC 为缩合剂的条件下容易地接枝在 PAA · HCl 链上, 生长 PAA-g-PIPA 接枝聚合物 (Scheme A)。



Scheme A

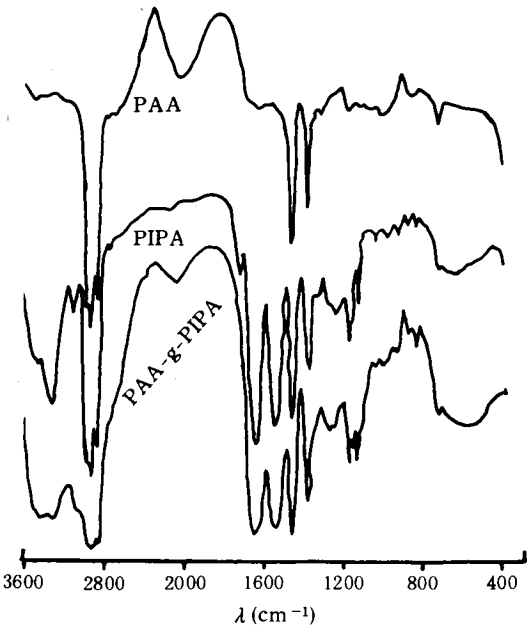


Fig. 1 IR spectra of various polymers

将PAA-g-PIPA做红外光谱分析,结果表明PAA-g-PIPA的红外谱图即具有明显的PAA特征吸收,又具有PIPA的特征吸收,特别是PIPA的—CO—OH (1710cm⁻¹)吸收峰消失, PAA·HCl的H—Cl (720cm⁻¹) 伸缩振动减弱,说明了 PAA·HCl 上的部分—NH₂与PIPA的—CO—OH已转化成了—CO—NH—基团,得到了接枝产物PAA-g-PIPA (图1).

接枝聚合物的接枝百分率由参加反应的PIPA与PAA的摩尔比控制. 实际接枝百分率由元素分析测定, 见表1.

2. PIPA 的热应答机理

实验表明, PAA-g-PIPA 交联成

Tab.1 Elemental analysis and graft percentage of PAA-g-PIPA *

No.	PIPA	PAA	Elemental analysis			Graft percentage	
	(g)	(g)	C%	N%	H%	Theorical	actual
G-I	4.0	1.65	54.00	11.93	9.53	9%	9.51%
G-II	4.0	3.00	49.24	11.95	9.32	5%	5.04%

* MW: PIPA, 2930; Determined by conductivity titration

球后, 对药物AD的负载小于PAA微球;但前者具有对药物的热敏控放性.

PIPA 是已知的具有水溶胀热敏感性物质。在接枝聚合物中, PIPA 以支链形式存在。支链的两端有较强极性的 $-\text{CO}-\text{NH}-$, 可与水产生氢键相互作用, 使链在水中伸展。由于 PIPA 的昙点在 35°C 附近, 这意味着 PIPA 在 35°C 邻近的温度区域内其水溶性将随温度的变化而显著变化, 即随着温度的升高其水溶性变差。Okahata 等^[2,4,5] 将其解释为, 当温度升高时, H_2O 分子与 $-\text{CO}-\text{NH}-$ 基团之间的氢键作用被削弱, PIPA 与水的相容性减弱, 构象从伸展的链变为卷曲收缩的链, 从而产生相分离。PIPA 支链的这种溶胀 / 收缩热可逆性, 使 PAA-g-PIPA 微球对所包封的药物产生热响应性释放控制。如图 2 所示, 在昙点附近, 温度较低时, 接枝链在水中舒展开来, 彼此交叉覆盖, 阻塞了微球的孔洞, 被包封的药物扩散受阻。温度增高时, 接枝链自身收缩, 孔洞显现出来, 使药物能顺利地扩散到水中, 扩散速度加快。

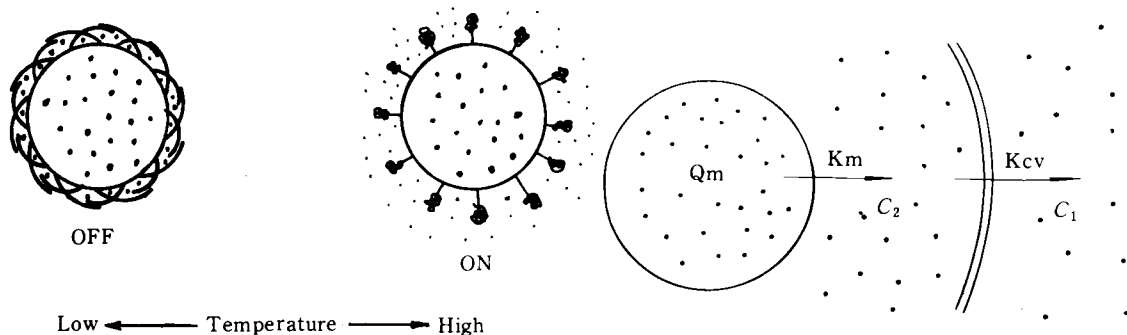


Fig.2 On-Off mechanism of temperature responsive drug modulated controlled release

Fig.3 Procedure of drug delivery from drug-carrying microspheres through a dialysis membrane

3. 微球释药的数学模型及定量表征

微球用作药物载体, 其释药特性可用动力学透析实验来测定。在透析释药过程中, 药物的释放过程如图 3 所示。 Q_m 为时刻 t 微球的带药量。 C_2 和 C_1 分别为透析袋内液和外液在时刻 t 的药物浓度。由于透析袋的存在, $C_2 \neq C_1$ 。实验中仅 C_1 能被监测, 故我们须首先知道透析袋膜的扩散性能, 继而推出内液药物浓度 C_2 , 最终求得微球本身的释药特性。

透析膜的扩散性能可通过内外液药物浓度的关系求出。因而采用游离药物释放实验来测试透析膜的扩散性能。实验中, 透析膜内液浓度为 C_2 , 体积为 V_2 ; 外液浓度为 C_1 , 体积为 V_1 ; 膜厚 δ , 透析面积为 A , 膜渗透常数 K_{21} , 根据 Fick 定律

$$\frac{dQ_1}{dt} = \frac{K_{21}A(C_2 - C_1)}{\delta} \quad (1)$$

式中 Q_1 为时刻 t 外液药物量, $Q_1 = C_1 V_1$, 设游离药物总量为 Q_s^0 , 代入各种条件, 得到外液浓度 C_1 与时间 t 的关系式:

$$\ln(1 - C_1/a) = -K_{cv}t \quad (2)$$

式中: $a = Q_s^0 / (V_1 + V_2)$, $K_{cv} = K_{21} A (V_1 + V_2) / V_1 V_2 \delta$

K_{cv} 即反应膜的药物渗透能力的渗透常数, 在某时刻 t , 取 C_1 的值由 (2) 式即可求得 K_{cv} . 引入时间修正项来修补实验条件随时间变化而可能造成的偏差, 修正式为:

$$\ln(1 - C_1/a) = -K_{cv} t + a_1 t^2 + \dots a_i t^{i+1} \quad (3)$$

本处只取一阶时间修正, 即 $i=1$, K_{cv} , a_1 用最小二乘法拟合实验数据求得, 计算结果列入表 2.

从上面的推导可看出, K_{cv} 是一个由透析膜自身性质所决定的一个常数, 与内外液药物浓度无关.

在实验中, 载药微球的药物扩散表现出了一级动力学特征, 其数学模型应为

$$Q_m = Q_m^0 e^{-K_m t} \quad (4)$$

Q_m 为微球的残余药量, Q_m^0 为微球的初始带药量, K_m 即为微球释药的一级扩散系数. 在时刻 t , 药物从微球中扩散到溶液介质中的量为

$$Q_m^0 - Q_m = Q_m^0 - Q_m^0 e^{-K_m t}, \quad \text{即} \quad C_1 V_1 + C_2 V_2 - C_2^0 V_2 = Q_m^0 (1 - e^{-K_m t}) \quad (5)$$

C_2^0 为内液初始药物浓度, 整理上式, 代入各种初始条件, 化简, 得

$$e^{-K_{cv} t} + \frac{C_1}{a} - 1 = b (e^{-K_m t} - e^{-K_{cv} t}) \quad (6)$$

式中 $a = \frac{C_2^0 V_2 + Q_m^0}{V_1 + V_2}$, C_1 和 t 皆可测得, 相应条件下的 K_{cv} 由前部分算出. 故 (6) 式

为关于 K_m 及 b ($b = \frac{K_{cv}}{K_m - K_{cv}} \cdot \frac{Q_m^0}{C_2^0 V_2 + Q_m^0}$) 的非线性方程. 用泰列展式展成关于

b, k_m 的线性方程

$$-b_0 K_{m_0} t e^{-K_m t} + \frac{C_1}{a} + e^{-K_{cv} t} - 1 = x + (e^{-K_{cv} t} - e^{-K_{m_0} t}) b - b_0 t e^{-K_{m_0} t} \cdot K_m \quad (7)$$

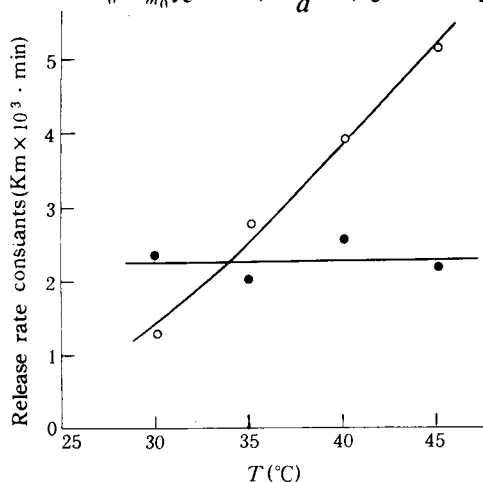


Fig.4 Relationship of release rate constants of drug from mioraspheres and temperatures
(○) PAA-g-PIPA; (●) PAA

将 PAA 均聚物微球 APP-g-PIPA 接枝聚合物微球的药物释放速率常数 K_m 对温度作图 4, 看出两种微球具有不同的变化趋势. 接枝共聚物微球的药物释放速率常数 K_m

式中 X 为引入的修正项, b_0 和 K_{m_0} 是进行迭代的初值. 用 (7) 式对 PAA 均聚微球及 PAA-g-PIPA 接枝聚合物微球在不同温度条件下药物释放实验数据拟合, 即可求得各种条件下微球释药的药物释放速率常数. 计算结果列表 2.

Tab.2 K_{cv} of dialysis membrane and K_m of drug microspheres on various temperatures

$T (^{\circ}\text{C})$	30	35	40	45
$K_{cv} \times 10^4 \text{ min}$	113.6	129.2	112.5	169.6
$K_m \times 10^4 \text{ min}$				
1	23.8	20.1	25.7	21.9
2	12.4	27.2	39.0	51.1

*1. PAA microspheres; 2. PAA-g-PIPA microspheres

随温度的升高而增大, 具有明显的温度控释性, 而不接枝的均聚物微球不具有该性质.

参 考 文 献

- [1] Fujishige, S., Kubota, K., Ando, I., *J. Phys. Chem.*, **1989**, 93, 3311
- [2] Okano, T., Sakurai, Y., *Kobunshi*, **1990**, 39, 662
- [3] Tanaka, T., *Polymer*, **1979**, 20, 1404
- [4] Okahata, Y., Noguchi, H., Seki, T., *Macromolecules*, **1986**, 19, 493
- [5] Heskins, M., Guillet, J.E., *J. Macromol. Sci., Chem.*, **1968**, A2, 1441
- [6] Ishihara, K., Kobayaishi, M., Shionohana, I., *Macromol. Chem. Rapid Commun.*, **1983**, 4, 327
- [7] Bae, Y.H., Okano, T., Kim, S.W., *Macromol. Chem. Rapid Commun.*, **1988**, 9, 185
- [8] Kitano, H., Ochmichem, T., Ise, N., *Macromol. Chem. in press*, 1991
- [9] Kitano, H., Yan, C.H., Nakamura, K., *Die Makromolekulare Chemie. in press*, 1991

PREPARATION AND RELEASING BEHAVIOUR OF TEMPERATURE RESPONSIVENESS OF GRAFT COPOLYMER PAA-g-PIPA MICROSPHERES

LI Xiongwei, YAN Changhong, LIAO Qi

(Chengdu Institute of Organic Chemistry, Academia Sinica, Chengdu, 610015)

ABSTRACT

Oligomer poly (N-isopropylacrylamide) has been made up with azobisisobutyronitrile (AIBN) as initiator and methonal as solvent. Graft copolymer PAA-g-PIPA could be prepared by graft polymerization of PIPA onto the chain of polyallylamine-hydrochloride(PAA) with 3-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimidehydrochlorid(EDC) as condensation agent. Microspheres with size range of 10 μ m or so could be made of graft copolymer PAA-g-PIPA with glutaraldehyde(GA) as cross-link agent in water/oil system. Antitumer drug adriamycin(AD) can be carried on the PAA-g-PIPA microspheres by physical adsorption. In vitro drug release behaviour of drug-carrying PAA-g-PIPA microspheres was examined by dynamic dialysis technique. Data from dialysis experiment were treated with a computer after setting a methematical model which can provide a quantitative assessment of drug release. The drug release rate constant Km of drug-carrying PAA-g-PIPA microspheres were achieved. It has been shown that Km of PAA-g-PIPA microspheres representing the specificity of drug release increased with increasing the temperature in the range of 30—45 $^{\circ}$ C. This indicated that drug release of drug-carrying PAA-g-PIPA microspheres was obviously temperature responsive.

Key words Graft polymer; Microspheres, Temperature responsiveness, Clouding point, Controlled release