

两亲性树状接枝己内酯共聚物的合成与表征^{*}

程 娟 凌秀君 张振国 卓仁禧 钟振林^{**}

(武汉大学化学与分子科学学院 生物医用高分子材料教育部重点实验室 武汉 430072)

摘 要 通过树状接枝聚己内酯的侧羟基及端羟基与氯甲酰化的聚乙二醇进行接枝反应,得到带有亲水性聚乙二醇链段的新型两亲性树状接枝共聚物。¹H-NMR 分析显示,接枝率为 50% 左右。GPC 分析结果表明,共聚物分子量呈较窄的单峰分布,分子量与接枝前相比明显增高。两亲性共聚物能直接分散在水中形成胶束溶液。以芘为荧光探针的测试结果表明其临界胶束浓度有降低。动态光散射测得胶束平均粒径在 16 至 31 nm 之间,粒径分散指数适中,PDI 在 0.25 至 0.39 之间。TEM 显示胶束粒子为不规整球形,由更小的粒径为几个纳米的微粒聚集而成,这些微粒的大小刚好与单个大分子的尺寸相匹配。因此,两亲性树状接枝聚己内酯在水相中存在单分子胶束与多分子组装胶束的平衡。得益于支化聚合物结构中的纳米空腔,两亲性树状接枝聚合物胶束对紫杉醇具有优良的包载能力。

关键词 树状接枝聚合物, 聚己内酯, 两亲性共聚物, 载药载体

生物可降解两亲性高分子在药物控制释放领域的应用越来越受到人们的关注。由其构成的高分子胶束作为药物载体,能对疏水性药物起到增溶作用,避免被肾脏排出和网状内皮系统快速吞噬,延长在血液里的循环时间,有助于药物在病灶部位的释放,从而起到降低毒性、提高药效的作用^[1-4]。高分子胶束包括由多个分子组装而成的胶束^[5,6]和只含一个分子的单分子胶束^[7-10]。多分子胶束由两亲性高分子通过氢键、静电作用、疏水作用等分子间弱作用力聚集而成,其组装过程具有可逆性。而单分子胶束中各链段通过共价键连接,因此具有很高的稳定性。具有核壳结构的树形分子是一种典型的单分子胶束。树形分子的结构高度规整,呈球状结构,内部存在空腔。这种特殊的结构使得树形分子可作为抗癌药物或基因药物的载体^[11-13]。通过对树形分子末端的活性基团进行化学修饰,使其表面与内部具有不同的亲/疏水性,则可形成单分子胶束^[14-16]。然而,树形分子的合成通常步骤繁多,受代数和分支单元的长度所限,分子量通常较低,整个分子的尺寸和内部空腔的尺寸都较小,这些都使得树形分子作为药物载体受到一定限制^[17,18]。

我们在以前的工作中用树状接枝共聚的方法

合成了树枝状聚己内酯,克服了树形分子的分子量难以做得很高的局限性,表面密布活性羟基,并具有较为紧密的内部结构和生物可降解性^[19]。由于其具有多重的支化度并且内部有很多纳米级的空腔,因此在其表面接枝亲水性的链段,使其分散在水中,可望形成具有良好载药能力的纳米胶束粒子。本文通过在含有活性伯羟基的生物可降解树状接枝聚己内酯的侧基上接枝引入亲水性的聚乙二醇,得到新型的带有亲水性聚乙二醇侧链的两亲性聚合物,并研究其自组装形成胶束的行为和对抗癌药物紫杉醇的载药能力。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

树状接枝聚己内酯 G0-OH ($M_n = 6400$, $M_w/M_n = 1.18$, 每 6.6 个单体单元中有一个羟乙氧基侧基)和 G1-OH ($M_n = 23200$, $M_w/M_n = 1.26$, 每 5.3 个单体单元中有一个羟乙氧基侧基)按文献方法合成^[15]。单甲氧基聚乙二醇 MePEG ($M_n = 750$; $M_n = 2000$)为 Aldrich 公司产品。光气为实验室自制,配成 26% 的甲苯溶液。THF、甲苯、吡啶在使用前分别用金属钠或氢化钠干燥并重蒸。

¹H-NMR 用 Mercury VX-300 型核磁共振波谱

^{*} 2013-08-15 收稿,2013-10-18 修稿;国家自然科学基金(基金号 21374084)资助项目。

^{**} 通讯联系人,E-mail:zljzhong@whu.edu.cn

仪在 300 MHz 下测定, CDCl_3 为溶剂, TMS 为内标. 聚合物的数均分子量和多分散度由 Waters-2690D HPLC 高压液相凝胶色谱仪 (GPC) 系统进行测定, 使用 Styragel HR1 THF 和 HR4 THF 柱, Waters-2410 折光指数分析仪, THF 为溶剂, 单分散聚苯乙烯为标样, 流速为 0.3 mL/min, 温度为 25 $^{\circ}\text{C}$. 纳米粒子的粒径和粒径分布由 Beckman Coulter N4 Plus 亚微粒径分析仪测定. UV 用 Perkin-Elmer Lambda Bio 40 紫外可见光谱仪测定. 纳米粒子的形态用 JEOL JEM-100CXII 型透射电镜观察, 加速电压为 80 kV. 荧光光谱用 Perkin Elmer LS55 荧光光谱仪测得.

1.2 单甲基聚乙二醇氯甲酸酯 MePEG-COCl 的合成

PEG-COCl 参照文献[20]方法合成. 将干燥的 MePEG 装入干燥烧瓶中, 加入无水甲苯, 搅拌溶解完全后加入过量 5 倍的光气甲苯溶液 (26 wt%). 室温下搅拌反应 24 h 后, 用水泵减压除去过量的光气和甲苯, 室温真空干燥过夜得到浅黄色的固体. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , TMS, δ): 4.46 (br s, CH_2OCOC), 3.79 ~ 3.54 (m, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.38 (s, OCH_3).

1.3 两亲性树状接枝己内酯共聚物 Gn-g-PEG_x 的合成

在圆底烧瓶中加入树状接枝聚合物 Gn, 真空干燥后充氩气, 然后加入过量 2 倍的 MePEG-COCl (以聚合物的端羟基计), 再次抽真空后充氩气. 用注射器加入无水 THF, 搅拌溶解后加入无水吡啶. 室温下搅拌反应一天, 离心除去吡啶盐酸盐沉淀后, 溶液在乙醚中沉淀除去过量的反应物, 并继续在正己烷中分级沉淀, 真空干燥后得到最终产物. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , TMS, δ): 4.28 (m, $\text{CH}_2\text{OCOOCH}_2$), 4.18 (m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCO}$), 4.07 (m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.75 (m, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.53 (m, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OR})$), $\text{CHOCH}_2\text{CH}_2\text{O-CO}$), 3.38 (s, OCH_3), 2.40 (m, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OR})$), 2.31 (m, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.82 (m, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{OR})\text{CH}_2$), 1.63 (m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{O}$), 1.40 (m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$).

1.4 聚合物胶束的制备

采用直接溶解法制备聚合物胶束. 将一定量聚合物直接溶于水中, 然后采用超声仪使其分散. 用芘为荧光探针测定聚合物的临界胶束浓度

(CMC). 用 DLS 测定聚合物胶束的粒径和分布. 用 TEM 测定粒子表面形貌和粒径大小.

1.5 聚合物载药胶束的制备

将聚合物与抗癌药物紫杉醇 (PTX) 以一系列比例混合溶于 5 mL 乙腈中. 室温下震荡混合物溶液使聚合物和药物溶解完全, 然后用旋转蒸发器将溶剂去除干净, 得到透明的膜状混合物. 在此混合物中按照每毫克聚合物 1 mL 的量加入蒸馏水, 超声并加热至 60 $^{\circ}\text{C}$, 使其溶解并分散, 将所得溶液用孔径为 0.22 μm 的滤膜过滤, 制得聚合物胶束溶液.

载药纳米胶束的载药量及包封率由紫外-可见光谱仪定波长的方法测得. 称取一定量冻干的载药纳米胶束溶于乙腈中, 测定其中药物在最大吸收波长 228 nm 处的吸光度并扣除聚合物在此波长的吸收, 根据标准曲线计算药物浓度及纳米胶束的载药量, 最后根据投药量计算出包封率.

2 结果与讨论

2.1 两亲性共聚物的合成与表征

两亲性共聚物的合成路线见图 1, 带有羟基侧基的树状接枝聚己内酯 G0-OH 或 G1-OH^[15] 与过量的单甲基聚乙二醇氯甲酸酯 (MePEG-COCl) 在一定量吡啶存在的条件下进行接枝反应, 分别得到两亲性树状接枝聚己内酯 G0-g-PEG_x 和 G1-g-PEG_x (x 表示 PEG 链的聚合度, 对于分子量为 750 和 2000 的 PEG, x 分别为 16 和 45). 反应中产生的吡啶盐酸盐经过离心除去. 过量的 MePEG-COCl 和其它杂质通过在乙醚和正己烷中分级沉降除去.

所制得的两亲性树状接枝聚己内酯的 $^1\text{H-NMR}$ 谱图及解析如图 2. 与原料 G0-OH 或 G1-OH 的谱图相比, 2 种两亲性接枝聚合物均在 $\delta = 3.75$ 处出现一个很强的单峰, 说明 PEG 链段的存在. 并且, $\delta = 4.27$ 附近 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCO}_2$ 峰的出现, 以及原料 MePEG-COCl 在 $\delta = 4.43$ 的 CH_2OCOC 峰的出现, 说明 PEG 链段被成功地通过碳酸酯键连接到支化聚己内酯上. 通过比较 $\delta = 3.75$ 处 PEG 链段 $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ 单峰的积分面积以及 $\delta = 3.4$ 附近的 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}$ 峰面积, 可以计算出平均每个羟乙氧基己内酯单元接枝 PEG 链的个数, 即接枝率 (表 1). 从表中可见, G1-g-PEG_x 和 G0-g-PEG_x 的接枝率均在 50% 左右.

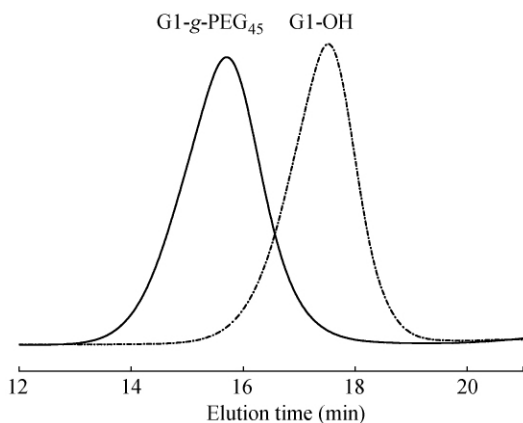


Fig. 3 GPC chromatograms of G1-g-PEG₄₅ and G1-OH

2.2 临界胶束浓度 (CMC) 的测定

以芘为荧光探针测定了两亲性树状接枝共聚物的 CMC. 芘具有很强的疏水性, 聚合物的浓度大于 CMC 时, 芘优先进入胶束核的疏水微结构域, 同时导致荧光性质的改变. 因此, 随着聚合物浓度的增加, 芘的发射光谱的荧光强度有个突变, 这个突变指示着芘进入了胶束的疏水核和胶束的形成, 被用来测定聚合物的 CMC. 以芘的发射光

谱中第一发射峰 (373 nm) 的荧光强度对聚合物浓度的对数作图, 曲线的拐点处对应的浓度即为 CMC, 结果如表 1 所示. 所制备的树状接枝共聚物的胶束具有较低的 CMC 值, 在 2 至 5 mg/L 之间. 当疏水内核相同时, 亲水 PEG 链段较长的 G0-g-PEG₄₅ 和 G1-g-PEG₄₅ 的 CMC 比相应的 G0-g-PEG₁₆ 和 G1-g-PEG₁₆ 的 CMC 稍高.

2.3 胶束粒径和形貌

树状接枝共聚物胶束的粒径及粒径分布用激光光散射法测定, 结果列于表 1. G1-g-PEG_x 所形成的胶束比 G0-g-PEG_x 胶束的粒径大, 可能是因为 G1-g-PEG_x 的分子量大于 G0-g-PEG_x 的分子量, 单个分子形成的胶束的粒径较大. 所制备的共聚物胶束的平均粒径在 16 至 31 nm 之间, 粒径分布适中, PDI 在 0.25 至 0.39 之间.

胶束的粒径和形貌进一步用 TEM 观测 (图 4). 用浓度为 0.05 mg/mL 的 G0-g-PEG₄₅ 和 G1-g-PEG₄₅ 稀溶液制样的 TEM 图片 (图 4(a) 和 4(b)) 中可见形状不规则的球形粒子, 粒径多为几十纳米. 通过仔细观察发现, 这些粒子具有类似草莓的

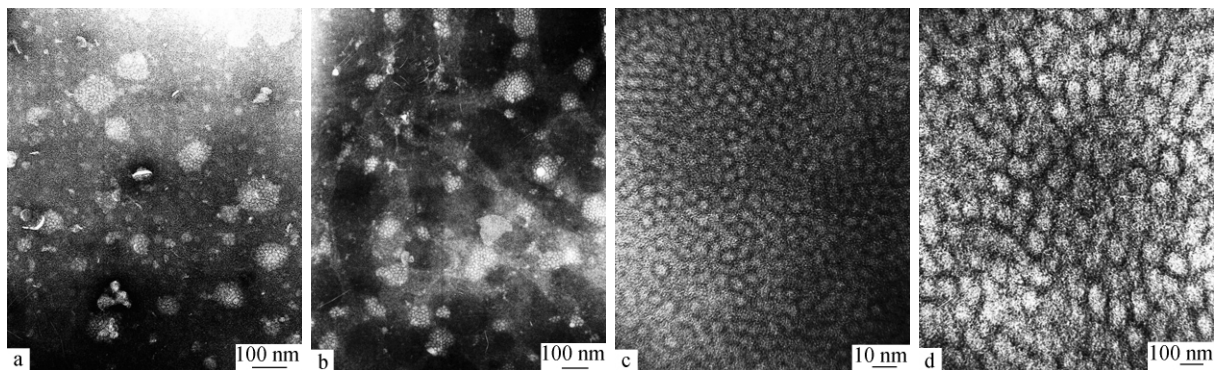


Fig. 4 TEM images of (a) G0-g-PEG₄₅ and (b) G1-g-PEG₄₅ at 0.05 mg/mL; (c) G0-g-PEG₄₅ and (d) G1-g-PEG₄₅ at 1 mg/mL

结构, 由更小的粒径为几个纳米的微粒聚集而成. 图 4(c) 和 4(d) 显示了用较高浓度的溶液 (1 mg/mL) 制样的 TEM 图片, 从这些高倍率的照片可见, 直径约为 5 nm (图 4(c)) 和 10 nm (图 4(c)) 的微粒紧密排列在一起, 它们的大小刚好分别与分子量为 14400 的 G0-g-PEG₄₅ 和分子量为 67200 的 G1-g-PEG₄₅ 的单个大分子尺寸相匹配. 由此可见, 这种两亲性树状接枝聚己内酯会聚集成由多个分子组成的较大粒子, 但分子间链段的缠结不明显, 每个分子以相对独立的单分子微粒存在.

这些树状接枝两亲性大分子, 平均每隔十几个单体单元即有一个支化点, 每个大分子带有多

个亲水的 PEG 链. 在水中, 单个分子内疏水的聚酯链段收缩到一起、多个 PEG 链伸展在外, 而倾向于形成具有类似核壳结构的单分子胶束. 虽然外层的亲水 PEG 链在一定程度上能阻止疏水聚酯链段的分子间聚集, 但因为该类非离子型两亲性大分子胶束的 zeta 电位较低 (−8.3 至 −10.9 mV, 见表 1), 这些单分子胶束仍然可能汇集成较大的粒子. 所制备的新型两亲性树状接枝聚己内酯在水相中存在单分子胶束与多分子聚集粒子的平衡.

2.4 载药胶束的制备和表征

以紫杉醇 (PTX) 为模型药物研究了两亲性树

状接枝共聚物的载药性能. 首先用乙腈配制一定比例的聚合物和 PTX 混合溶液,接着减压旋蒸除去溶剂得到均匀的混合物,然后加入蒸馏水使混合物溶解. 为了确保聚合物完全溶解并且使胶束更好地分散,我们将溶液加热至 60 ℃ 并超声处理. 溶液经过滤去除没包裹到胶束里的 PTX 结晶后,冻干后溶于乙腈中测定 PTX 在 228 nm 处的紫外吸收,除去聚合物的吸光度后,根据 PTX 在乙腈中的吸光度的标准曲线计算包药率 (drug encapsulation rate, DER) 和载药量 (drug loading content, DLC),结果如表 2 所示.

从表 2 的数据可见,两亲性树状接枝共聚物对疏水性药物 PTX 有优良的包载性能. 随着药物/聚合物比例的提高,胶束的载药量逐渐增高. 当药物/聚合物比例为 4/10 时, G0-*g*-PEG₄₅ 载药量可达到 23.7%, G1-*g*-PEG₄₅ 载药量则高达 28.8%. 在相同药物/聚合物配比下, G1-*g*-PEG₄₅ 对 PTX 的载药量与包封率均明显优于 G0-*g*-PEG₄₅. 两亲性树状接枝共聚物胶束对 PTX 的显著增溶作用,可能得益于支化聚合物结构中含有许多纳米空腔. 相较于低代数的 G0-*g*-PEG₄₅,代数更高的 G1-*g*-PEG₄₅ 分子量更大,且具有更高的支化程度和更多的纳米空腔,因而具有更强的载药能力.

载药后胶束的表面电荷密度有所增加. 例如,未载药的 G0-*g*-PEG₄₅ 和 G1-*g*-PEG₄₅ 胶束的 zeta

电位分别为 -10.9 和 -8.3 mV,而它们在 PTX/聚合物比例为 4/10 的条件下制备的载药胶束的 zeta 电位分别为 -13.0 和 -14.3 mV.

Table 2 Drug loading of the polymers

$W_{\text{Drug}}/W_{\text{Polymer}}$	G0- <i>g</i> -PEG ₄₅		G1- <i>g</i> -PEG ₄₅	
	DLC ^a (%)	DER ^b (%)	DLC ^a (%)	DER ^b (%)
1/10	4.5	45.3	8.6	86.1
2/10	10.8	53.9	15.5	77.6
3/10	19.0	63.5	26.3	75.1
4/10	23.7	59.1	28.8	72.0

^aDLC (drug loading content) is the percent content of drug in the drug-loaded micelles; ^bDER (drug encapsulation rate) is the percent rate of encapsulated drug to the whole fed drug.

3 结论

通过树状接枝聚己内酯的羟乙氧基侧基以及端羟基与氯甲酰化的单甲基聚乙二醇进行接枝反应,制备了生物可降解的两亲性树状接枝共聚物. 该两亲性聚合物在水中形成纳米胶束,TEM 显示胶束粒子为不规整球形,由更小的粒径为几个纳米的微粒聚集而成. 这些微粒的大小刚好与单个大分子的尺寸相匹配. 说明所制备的新型两亲性树状接枝聚己内酯在水相中存在单分子胶束与多分子组装胶束的平衡. 得益于支化聚合物结构中的纳米空腔,两亲性树状接枝聚合物胶束对紫杉醇表现出优良的包载能力.

REFERENCES

1 Rösler A, Vandermeulen W G, Klok H A. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 53: 95 ~ 108

2 Nishiyama N, Kataoka K. *Pharmacol Ther*, 2006, 112: 630 ~ 648

3 Mundargi R C, Babu V R, Rangaswamy V, Patel P, Aminabhavi M T. *J Control Release*, 2008, 125: 193 ~ 209

4 Riess G. *Prog Polym Sci*, 2003, 28: 1107 ~ 1170

5 Xiong Menghua (熊梦华), Tang Lingyan (唐凌燕), Wang Jun (王均). *Acta Polymerica Sinica* (高分子学报), 2011, (8): 853 ~ 860

6 Wei H, Zhuo R X, Zhang X Z. *Prog Polym Sci*, 2013, 38: 503 ~ 535

7 Zhong Ling (钟玲), He Xiaohua (贺小华), Zhou Yongfeng (周永丰), Yan Deyue (颜德岳), Pan Caiyuan (潘才元). *Acta Polymerica Sinica* (高分子学报), 2007, (10): 986 ~ 992

8 Kumar K R, Brooks D E. *Macromol Rapid Commun*, 2005, 26: 155 ~ 159

9 D' Emanuele A, Attwood D. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005, 57: 2147 ~ 2162

10 Gao H F. *Macromol Rapid Commun*, 2012, 33: 722 ~ 734

11 Jiang Chao (江超), Sheng Mingming (盛明明), He Bin (何斌), Wang Gang (王刚), Wu Yao (吴尧), Gu Zhongwei (顾忠伟). *Acta Polymerica Sinica* (高分子学报), 2011, (8): 845 ~ 852

12 Beezer A E, King A S, Martin I K, Mitchel J C, Twymanb L J, Wainb C F. *Tetrahedron*, 2003, 59: 3873 ~ 3880

13 Gillies Elizabeth R, Fréchet J M J. *Drug Discovery Today*, 2005, 10: 35 ~ 43

14 Cao W Q, Zhu L. *Macromolecules*, 2011, 44: 1500 ~ 1512

15 Kim Y, Klutz A M, Jacobson K A. *Bioconjugate Chem*, 2008, 19: 1660 ~ 1672

16 Zou J H, Zhao Y B, Shi W F. *J Phys Chem B*, 2006, 110: 2638 ~ 2642

- 17 Lee I, Yu M K, Kim I H, Lee J, Park T G, Sang J. J Control Release, 2011, 155: 88 ~ 95
- 18 Ma X P, Zhou Z X, Jin E, Sun Q H, Zhang B, Tang J B, Shen Y Q. Macromolecules, 2013, 46: 37 ~ 42
- 19 Cheng J, Lin X J, Zhong Z L, Zhuo R X. Macromol Rapid Commun, 2011, 32: 1839 ~ 1845
- 20 Zeng F Q, Lee H, Chidiac M, Allen C. Biomacromolecules, 2005, 6: 2140 ~ 2149

Synthesis and Characterization of Amphiphilic Dendrigrraft ϵ -Caprolactone Copolymers

Juan Cheng, Xiu-jun Ling, Zhen-guo Zhang, Ren-xi Zhuo, Zhen-lin Zhong*

(Key Laboratory of Biomedical Polymers of Ministry of Education, College of Chemistry and Molecular Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072)

Abstract Amphiphilic dendrigrraft ϵ -caprolactone copolymers were prepared *via* the grafting reaction of polyethylene glycol chloroformate on the side and terminal hydroxyl groups of the dendrigrraft poly(ϵ -caprolactone)s. The copolymers were characterized by $^1\text{H-NMR}$ and GPC. $^1\text{H-NMR}$ analysis revealed that the graft rate was approximately 50%. GPC analysis showed that the molecular weight of the amphiphilic copolymers had a relatively narrow unimodal distribution. Their molecular weights were apparently increased comparing to the raw dendrigrraft poly(ϵ -caprolactone)s. The amphiphilic copolymers were able to disperse directly in water forming micelles. The diameters of the micelles were measured by DLS to be in the range of 16 to 31 nm with moderate PDI of 0.25 to 0.39. The morphology of the micelles was observed by transmission electron microscopy (TEM). The micelle particles with an irregular globular shape were composed of smaller particles whose size is in accordance with the size of a single polymer molecule. In water, there might be an equilibrium between the unimolecular micelles and assembled multimolecular micelles. The amphiphilic copolymers showed high drug-loading capacity and drug encapsulation rate to hydrophobic antitumor drug paclitaxel, owing to the nano-sized cavities inside the dendrigrraft structures.

Keywords Dendrigrraft polymer, Poly(ϵ -caprolactone), Amphiphilic copolymer, Drug carrier

* Corresponding author: Zhen-lin Zhong, E-mail: zllzhong@whu.edu.cn