两亲性双硒聚合物的制备及其聚集体形成

顾晓瑜 王朝阳* 童真

(华南理工大学材料科学研究所 广州 510640)

摘要 由于 Se—Se 键相对活泼, 对外部氧化和还原环境敏感, 双硒聚合物在药物控释系统有广泛的应用. 采用双硒二醇, 异佛尔酮二异氰酸酯和低分子壳聚糖为原料制备出了两亲性的双硒聚合物. 这种共聚物能够在水中发生自组装现象, 形成稳定的以 PU 为核, 壳聚糖为壳的球形纳米聚集体, 粒径约为 130 nm. 并探索了该聚集体在氧化还原条件下的响应性, 发现不管在弱氧化还是弱还原环境下, 这种双硒聚合物都能发生 Se—Se 键断裂, 使得装载在聚集体中的正电荷药物盐酸阿霉素达到控制释放的效果.

关键词 双硒; 两亲性; 氧化还原; 盐酸阿霉素; 释放

Preparation of Amphiphilic Diselenide Copolymer and Formation of Its Aggregates

Gu, Xiaoyu Wang, Chaoyang* Tong, Zhen

(Research Institute of Materials Science, South China University of Technology, Guangzhou 510640)

Abstract Selenium has several unique biological effects in many aspects, making use of bioactive components and inorganic selenium to prepare antitumor organic selenium compounds will have a great significant impact on cancer therapy and patient wellbeing. It was well-known that Se—Se bond is very reactive and sensitive to the dual redox environment, therefore, we can take advantage of such feature to prepare diselenide-containing polymers which can be applied in the area of drug controlled release. In this paper, we prepared amphiphilic diselenide copolymers with diselenide-containing diols (HO—SeSe—OH), isophorone diisocyanate (IPDI), and water soluble low-molecular chitosan (LW-CS). The synthetic copolymers were characterized by means of gel permeation chromatography (GPC), ¹H NMR and FTIR spectroscopy. The molecular weight of CS-PUSeSe-CS copolymer was 4.42×10^4 g/mol which calculated according to the integral ratio of the peaks at δ 4.00 and 4.42 which related to CH₂O groups of chitosan and NHCOOCH₂ groups of IPDI, respectively. The size distribution of aggregates measured by dynamic light scattering (DLS) measurements, which gave a result of about 130 nm in average diameter. The critical aggregate concentration (CAC) of aggregates was measured by the fluorescent probe method and the result was 0.01 mg/mL. The dual redox responsive of aggregates was studied both in VC and H₂O₂ solution, the results showed that amphiphilic diselenide copolymer would cause Se—Se chain scission in no matter weak oxidative or reductive ambient environment. Although negative charged drug-rhodamine B (RB) could not release out from aggregates due to electrostatic attraction. However, positive charged drug-doxorubicin hydrochloride (Doxo) can easily release from aggregates in reductive VC solution by analyzing UV-spectra at the wavelength of 500 nm, indicating aggregates assembled from diselenide-containing copolymers may act as powerful and efficient bionano reactors and realize controllable drug delivery by breaking Se—Se bonds.

Keywords diselenide; amphiphilic copolymer; dual redox; Doxo; drug release

1 引言

结构和功能可以随条件改变的嵌段共聚物在药物控制释放领域有越来越多的作用^[1,2], 特别是两亲性聚合物, 它们在水中形成的聚集体的性质受其化学组成影响很大^[3], 比如疏水和亲水链段之比, 端基组成及交联程度等^[4,5]. 这种特性使响应性聚合物能够通过调节外部环境条件实现精确控制其在水中聚集体的组成结构. 在多种功能化应用中, 具有氧化还原特性的聚合物已经

吸引了许多研究者的目光, 并在药物装载和控释领域取得了较多进展^[6]. 但是, 对于具有氧化和还原双响应的嵌段共聚物的研究还比较少^[7,8].

Se—Se 键由于键能较低而比较活泼, 使得含硒高分子成为一类特殊的刺激响应性材料, 具有许多独特和优异的性质. 硒元素在诸多方面具有独特的生物效应, 其中最重要的是抗氧化性: 含硒谷胱甘肽过氧化物酶 (GPx) 可以催化谷胱甘肽 (GSH) 分解体内的氢过氧化物 (ROOH). 与无机硒化合物相比, 有机硒化合物生物活

* E-mail: zhywang@scut.edu.cn.

Received March 14, 2013; published May 17, 2013.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 21274046) and the Natural Science Foundation of Guangdong Province (No. S2012020011057).

项目受国家自然科学基金 (No. 21274046) 和广东省自然科学基金 (No. S2012020011057) 资助.

性强、毒性低、吸收率高、污染小,利用有潜力的生物活性成分和无机硒制备具有抑制肿瘤等作用的有机硒化合物具有重大的研究意义^[9,10].若将硒元素引入两亲性嵌段高分子结构中,则其化学和生物化学性质有可能在生物医学药物领域中具有更深入的应用价值^[11].

本文成功合成了 ABA 型的两亲性双硒共聚物 (CS-PUSESe-CS). 其中中间部分 PUSE 很好的引入了 Se—Se 双键并提供了疏水链段,两端的壳聚糖端基提供了亲水链段,使得聚合物能够在水中形成稳定聚集体.我们分别将盐酸阿霉素(Doxo)与罗丹明 B (RB)装载到聚集体内,并在还原性的维生素 C (VC)水溶液中释放,发现正电荷的 Doxo 实现了很好的释放.

2 结果与讨论

2.1 聚合物的制备与表征

两亲性双硒聚合物 CS-PUSESe-CS 的合成路线如图 1 所示.首先是用硼氢化钠和硒粉合成双硒二钠,然后利用得到的 SeSe 负离子与溴十一醇发生亲核取代反应从而制得中间体对称双硒十一醇(HO-SeSe-OH).得到的 HO-SeSe-OH 与稍过量的 IPDI 反应形成聚氨酯预聚体(PUSE).其中 PUSE 两端均为 NCO 基团封端,再与带有丰富的羟基和氨基的壳聚糖缩合聚合,得到两亲性的 CS-PUSESe-CS 聚合物.普通壳聚糖水溶性不好,一般实验都选用酸性水溶液不断搅拌,得到悬浮的壳聚糖水

溶液.我们选用 H_2O_2 进行氧化降解壳聚糖可以避免一些特殊氧化剂如 Cl_2 等的毒性.

我们对每一步合成的聚合物都进行了核磁和红外表征.其中图 2 是中间体 HO-SeSe-OH 和聚合物 CS-PUSESe-CS 的核磁共振氢谱.

图 2 中 HO-SeSe-OH 的核磁氢谱中化学位移 δ 3.63 的特征峰属于两端的 HOCH_2 , δ 2.90 归属于 SeSeCH_2 上的特征峰,而 δ 1.71~1.27 上的宽特征峰则是由 $\text{HO}(\text{CH}_2)_{11}\text{SeSe}$ 造成的.

图 2 中 CS-PUSESe-CS 的核磁氢谱中化学位移 δ 4.22 处是 IPDI 与十一醇连接的 NHCOOCH_2 基团特征峰, δ 4.00 是壳聚糖上 CH_2O 的特征峰, δ 1.96~1.25 处的宽峰仍是 $\text{COO}(\text{CH}_2)_{11}\text{SeSe}$ 的特征峰,而 δ 0.98~0.70 处新的特征峰则是 IPDI 环上的 CH_3 引起的.

双硒十一醇的氢谱图上的峰尖锐且单一,这说明合成出的 HO-SeSe-OH 比较纯,符合我们的制备要求且能用于下一步反应.相比较 CS-PUSESe-CS 的核磁氢谱, δ 1.96~1.25 处的 $(\text{CH}_2)_{11}\text{SeSe}$ 特征峰没有太大变化,说明聚合物中的二硒醇结构没有被破坏.但是 δ 4.22, 4.00 及 0.98~0.70 处出现了新的峰,这是由于加入了 IPDI 和壳聚糖反应的结果.如 δ 4.00 处的酰胺基特征峰证明了 IPDI 与壳聚糖连接成功,而且壳聚糖 δ 4.22 处的特征峰,以及 IPDI 的 δ 0.98~0.70 处的特征峰,更加有力地证明了 CS-PUSESe-CS 聚合物成功制得.

图 1 CS-PUSESe-CS 聚合物的制备路线图

Figure 1 Synthetic routes for the CS-PUSESe-CS copolymer

图2 HO-SeSe-OH及CS-PUSeSe-CS聚合物的核磁共振氢谱图
Figure 2 ^1H NMR spectra of HO-SeSe-OH and CS-PUSeSe-CS

由凝胶渗透色谱测出降解后的低分子量壳聚糖(LW-CS)的重均分子量(M_w)为 10^4 g/mol, 则可知低分子量壳聚糖的聚合度为32. 再通过 δ 4.00和4.42两处的 ^1H NMR积分比, 以及壳聚糖的聚合度算出PUSe的聚合度 n . 计算公式如下:

$$n = [I_{\delta 4.22}/I_{\delta 4.00}] \times [2 \times \text{DP}_{\text{CS}}/3] \quad (1)$$

公式中, $I_{\delta 4.22}$ 和 $I_{\delta 4.00}$ 分别为壳聚糖的 CH_2O 和IPDI的 NHCOOCH_2 的氢原子的特征峰的积分面积, DP_{CS} 是壳聚糖的聚合度, 2和3则代表 CH_2O 和 NHCOOCH_2 中的氢原子个数. 通过计算得出PUSe的聚合度 n 为35, 则聚合物的分子量为 4.4×10^4 g/mol. 而GPC结果为 2.9×10^4 g/mol, 略有差异.

图3 HO-SeSe-OH, PUSe, LW-CS和CS-PUSeSe-CS的傅里叶变换红外光谱图
Figure 3 FTIR spectra of HO-SeSe-OH, PUSe, LW-CS and CS-PUSeSe-CS

图3为HO-SeSe-OH, PUSe, LW-CS, CS-PUSeSe-CS的红外吸收谱图. 如图3所示, 在 3411 cm^{-1} 处显示为双硒十一醇的O—H伸缩振动峰; $2919, 2848\text{ cm}^{-1}$ 则为亚甲基 CH_2 的对称和不对称伸缩振动峰; $1467, 1342, 1297\text{ cm}^{-1}$ 分别为 CH_2 弯曲振动, C—H弯曲振动和 CH_2 的摇

摆振动峰; $1201 \sim 1056\text{ cm}^{-1}$ 则对应于C—O—C的振动峰. 对于含硒聚合物, $500 \sim 600\text{ cm}^{-1}$ 之间的吸收峰如: 518 和 640 cm^{-1} 是Se—Se键的振动峰. $700 \sim 800\text{ cm}^{-1}$ 之间的吸收峰如: 721 和 775 cm^{-1} 则归属于C—Se键的吸收峰. 加入IPDI和壳聚糖后, Se—Se的吸收峰减弱, C—Se的吸收峰增强. 而其在 $1699, 1646, 1556\text{ cm}^{-1}$ 处的弱峰是由反应生成的NH—CO官能团造成的. 最后加入壳聚糖后, 1727 cm^{-1} 处的羰基峰和 1263 cm^{-1} 处C—O峰明显加强, 则更加有力地证明了壳聚糖成功封端.

2.2 聚集体的形成与表征

两亲性聚合物CS-PUSeSe-CS在水中会形成球形聚集体. 图4(a)是用动态光散射法测得的聚集体粒径及其分布图. 由图4(a)可知, 聚集体粒径约为 137.8 nm 且分布较窄. 根据之前其他研究知道, 聚集体粒径一般都在 $100 \sim 200\text{ nm}$. 图4(b)是聚集体在水中的TEM图. 从图4(b)也可看出, 球形的聚集体在水中稳定存在, 粒径确实为 130 nm 左右, 与动态光散射法测得的数据一致. 我们也采用了荧光探针法^[12]测得聚集体的临界聚集浓度(CAC)为 0.01 mg/mL . 根据此CAC值我们决定采用 0.5 mg/mL 的聚集体溶液用于接下来的药物释放试验.

图4 (a) DLS法测聚集体粒径, (b)聚集体的透射电镜图
Figure 4 (a) The DLS size distribution and (b) TEM image of CS-PUSeSe-CS aggregates

2.3 药物释放

由于双硒键对氧化还原环境十分敏感, 因此本工作

分别采用 VC^[13]和双氧水模拟氧化还原环境,使 Se—Se 键断裂和聚集体破裂达到装载的药物释放的目的. 我们首先用负电荷的 RB 作为模拟药物装载到聚合物上. 装载了 RB 的聚集体水溶液放在透析袋里,分别浸入 5 mg/mL VC 或者 0.5%的 H₂O₂ 水溶液中,5 h 后拿出用于透射电镜实验. 从 TEM 图上可看出,不论用双氧水还是 VC 水溶液浸泡 5 h 后,聚集体都由于双硒键断裂而失去了球形,它们都变回了聚氨酯膜的形状,由原来 130 nm 铺展到 2 μ m 左右. 但是外部水溶液中用 UV 检测不到 RB 的特征峰,说明外部水溶液中没有 RB. 这与文献[8]得到的结果不同. 此种现象的原因可归结为:我们制备的聚合物两端用壳聚糖封端,壳聚糖带正电荷且具有众多的氨基官能团,它将负电荷的 RB 吸附在壳聚糖上,才导致了电镜图显示聚集体已破裂而 RB 不能释放的现象. 而之前其他课题组制备的聚合物两端是 PEG,只带有少量羟基,因此与 RB 之间不存在静电吸附作用. 为了验证此观点,我们又在聚集体上装载盐酸阿霉素 Doxo. 盐酸阿霉素是一种正电荷抗癌药物,经常被采用于释放试验^[14]. 将它装载在聚集体上,壳聚糖则不会与之吸附,这就排除了两者的静电吸附作用. 释放步骤与 RB 相同,但结果却大不相同. 如图 5 所示,在前 2 h Doxo 释放的较快,超过 50%的 Doxo 能够在 2 h 内释放到 VC 水溶液中. 这是由吸附在聚集体表面的 Doxo 造成的. 在接下来的几个小时 Doxo 也不断的释放,但是速度明显变慢,最终在 8 h 左右达到平衡. UV 检测到外部水溶液中 Doxo 的量不再变化且透析袋里的溶液变为无色. 最后将透析袋里释放完毕的溶液溶于 DMF 中,确认是否仍有剩余的 Doxo. UV 检测无 Doxo 吸收峰,因此可认为 Doxo 已完全释放出来. 同时 Doxo 在聚集体中的装药量为 5.94%,与释放总量一致. 我们也用紫外对纯 Doxo (或者 RB)和释放出来的 Doxo(或者 RB)进行了测试. 发现两者无区别,说明聚合物以及 VC 水溶液都不会对药物造成破坏.

图 5 Doxo 从聚集体中的释放

Figure 5 The Doxo molecule released from aggregates in VC solution

3 结论

成功制备出了聚氨酯为疏水链段,壳聚糖为亲水链段的 ABA 型两亲性双硒聚合物,并研究了该聚合物在水中的聚集体在氧化还原条件下的响应性. 药物控制释放试验表明,两亲性双硒聚合物不管在弱氧化还是弱还原环境下都能发生 Se—Se 双键断裂,从而导致聚集体破裂. 负电荷的 RB 由于与壳聚糖有静电吸附作用不能顺利释放,而聚集体上装载的正电荷药物 Doxo 却可以在还原性 VC 水溶液中得到很好的释放. 这表明两亲性的双硒聚合物确实是一种潜在的可用于药物控释系统的纳米级药物载体.

4 实验部分

4.1 试剂

溴十一醇、硒粉、异佛尔酮二异氰酸酯(IPDI),分析纯,阿拉丁试剂有限公司;硼氢化钠、二甲基亚砜(DMSO)、四氢呋喃(THF)、乙酸乙酯、二氯甲烷、*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF),分析纯,广州试剂厂;壳聚糖,上海伯奥生物科技有限公司;Doxo,广州威佳科技有限公司;RB,天津市天新精细化工开发中心;实验用水为高纯水,由 Millipore 净化装置处理,电阻率 > 18.0 M Ω ·cm.

4.2 双硒十一醇的制备

首先在氮气气氛保护的情况下在水中加入 2.3 g 硒粉和 2.5 g 硼氢化钠,搅拌 10 min 得到硒氢化钠. 然后再加入同等分量的硒粉 2.3 g 并搅拌 15 min,合成二硒化钠约 0.55 g (2.7 mmol)^[15]. 随后在反应液中加入溶有 1 g (4 mmol)溴十一醇的 THF 溶液,50 $^{\circ}$ C 下搅拌反应 24 h^[16]. 所得产物双硒十一醇由柱层层析法[洗脱液: *V*(二氯甲烷): *V*(乙酸乙酯)=4:1]过滤提纯,最后得到黄色产物双硒十一醇 0.8 g (1.6 mmol),产率为 80%.

4.3 降解壳聚糖的制备

取 5 g 壳聚糖溶于 H₂O₂ 水溶液中(水和双氧水的体积比为 3:1),并不断搅拌 48 h. 然后抽滤所得混浊液,去除不溶物. 滤液用 2 mol/L 的氢氧化钠溶液中和至 pH 10 并不断搅拌以赶去残余的 H₂O₂. 得到的滤液旋转蒸发至 1/5,加入剩余液 3~4 倍体积的无水乙醇,水溶性的壳聚糖析出. 抽滤得到嫩黄色固体,真空干燥备用^[17,18].

4.4 CS-PUSese-CS 的制备

取 0.2 g (0.4 mmol)双硒十一醇溶于 THF 中,加入含有稍过量异佛尔酮二异氰酸酯(IPDI) (0.6 mmol)的四氢呋喃(THF)溶液,10 min 后滴入两滴二丁基二月桂酸锡并在 50 $^{\circ}$ C 下继续反应 12 h. 得到的橙黄色溶液旋转蒸发后得到聚氨酯预聚体(PUSese)固体,并将其溶于二甲基亚砜(DMSO),加热并不断搅拌. 同时取制得的水溶性

壳聚糖 0.5 g 溶于 DMSO, 逐滴加入之前的聚氨酯 DMSO 溶液中, 两者于 50 °C 下反应 12 h. 得到的橙黄色聚合物溶液用大量水冲洗并用乙酸乙酯析出, 反复 3 次. 分离出来的乙酸乙酯溶液用旋转蒸发器蒸干, 得到大约 0.8 g CS-PUSese-PU 聚合物真空干燥备用.

4.5 聚集体的制备

聚集体的具体制备步骤为: 取 10 mg 聚合物溶于 1 mL DMF, 然后在超声的情况下慢慢滴入去离子水中, 边滴边振荡. 得到的聚集体溶液放入透析袋, 然后透析袋在去离子水中透析 72 h. 最后得到的聚集体溶液用于接下来的测试.

4.6 药物的装载

将 5 mg RB(或 Doxo)和 10 mg 聚合物溶解在 1 mL DMF 里, 振荡几小时使 RB(或 Doxo)很好的吸附在聚合物上, 然后在超声的条件下慢慢滴入水中. 装载了药物的聚集体溶液放在透析袋里透析, 直至外部去离子水溶液中用 UV 检测不到 RB(或 Doxo).

4.7 释放

装载了药物的聚集体溶液经过去离子水透析后, 浸入装有 250 mL VC 水溶液(5 mg/mL)或者 H₂O₂ 水溶液(0.5%)的小烧杯中, 且水溶液用磁子不断搅拌. 每隔 0.5 h 取上层清液 3 mL 用于 UV 检测. 检测完的溶液仍倒回小烧杯中, 直到药物的吸光度不再变化, 认为药物已完全释放.

4.8 仪器与测试

透射电子显微镜(TEM)观察在 JEM-100CX II(日本)上进行, 加速电压 100 kV. 样品制备: 将 5 μ L 的 CS-PUSese-CS 聚集体溶液滴加到涂有碳膜的铜网上, 室温干燥后用于 TEM 观察.

¹H-NMR 测试采用 Bruker 300 MHz 核磁共振仪, HO-SeSe-OH 和 CS-PUSese-CS 均采用溶剂 CDCl₃, 四甲基硅为内标.

动态光散射实验(DLS)在马尔文激光粒度分析仪 ZS90(英国)上进行, 实验散射角为 90°, 温度为 25 °C.

临界胶束浓度(CAC)通过荧光分析法测定, 荧光分光光度计, 型号 F-4500, 日本. 使用芘作为疏水性荧光

探针. 首先将 CS-PUSese-CS 聚合物溶于 DMF 中, 然后慢慢滴入芘的水溶液中, 得到 0.1~5 $\times 10^{-5}$ mg/mL 系列浓度的聚集体溶液. 溶液中芘探针的浓度均为 2.5 $\times 10^{-7}$ mol/L. 激发波长为 343 nm, 记录芘第 1 个和第 3 个峰的荧光强度比与聚合物浓度的关系, 临界胶束浓度通过 Boltzmann 拟合后得到.

紫外-可见分光光度计, 型号 U-3010, 日本; 傅里叶红外转换光谱, 型号 NICOLET 6700, 美国; 低分子量壳聚糖的相对分子质量及其分布用 Waters 凝胶渗透色谱仪测定; 色谱柱: Malvern CLM 3021 A6000M, 测试温度: 40 °C, 流动相: 水, 流速: 0.5 mL/min, 用聚环氧乙烷标样对色谱柱进行校正.

References

- [1] Thompson, K. L.; Chambon, P.; Verber, R.; Armes, S. P. *Macromolecules* **2012**, *45*, 8037.
- [2] Liu, G. Y.; Liu, X. S.; Wang, S. S.; Chen, C. J.; Ji, J. *Langmuir* **2012**, *28*, 557.
- [3] Thompson, K. L.; Chambon, P.; Verber, R.; Armes, S. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 12450.
- [4] Hickey, R. J.; Haynes, A. S.; Kikkawa, J. M.; Park, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 1517.
- [5] Jeong, M. G.; Jan, C. M.; Kim, K. T. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 3590.
- [6] Wang, Z. P.; Oers, M. C. M.; Rutjes, F. P. J.; Hest, J. C. M. *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 10904.
- [7] Zhang, X.; Xu, H. P.; Dong, Z. Y.; Wang, Y. P.; Liu, J. Q.; Shen, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10556.
- [8] Ma, N.; Li, Y.; Xu, H. P.; Wang, Z. Q.; Zhang, X. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 442.
- [9] Ma, N.; Li, Y.; Ren, H. F.; Xu, H. P.; Li, Z. B.; Zhang, X. *Polym. Chem.* **2010**, *1*, 1609.
- [10] Luo, Y.; Chen, T. F.; Huang, X. C.; Wang, G.; Huang, Y. C.; Zheng, W. J. *Acta Chim. Sinica* **2012**, *70*, 1295. (罗懿, 陈填烽, 黄晓纯, 王弋, 黄荫成, 郑文杰, 化学学报, **2012**, *70*, 1295.)
- [11] Ma, N.; Xu, H. P.; An, L. P.; Li, J.; Sun, Z. W.; Zhang, X. *Langmuir* **2011**, *27*, 5874.
- [12] Ray, G. B.; Chakraborty, I.; Moulik, S. P. *J. Colloid Interface Sci.* **2006**, *294*, 248.
- [13] Ren, H. F.; Wu, Y. T.; Ma, N.; Xu, H. P.; Zhang, X. *Soft Matter* **2012**, *8*, 1460.
- [14] Hu, S. H.; Liao, B. J.; Chiang, C. S.; Chen, P. J.; Chen, I. W.; Chen, S. Y. *Adv. Mater.* **2012**, *24*, 3627.
- [15] Klayman, D. L.; Griffin, T. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 197.
- [16] Wang, J.; Zhou, G. J.; Fan, W. Q. *Acta Chim. Sinica* **1992**, *50*, 504. (王瑾, 周沟钧, 范伟强, 化学学报, **1992**, *50*, 504.)
- [17] Barikani, M.; Honarkar, H.; Barikani, M. *Monatsh. Chem.* **2010**, *141*, 653.
- [18] Tian, F.; Liu, Y.; Hu, K.; Zhao, B. Y. *Carbohydr. Polym.* **2004**, *3*, 16.

(Qin, X.)