新型温度/pH 敏感性 ABA 型三嵌段共聚物的合成、胶束化及凝胶化行为研究

韩雅楠 刘守信* 毛虹光 田蕾 宁文燕

(应用表面与胶体化学教育部重点实验室 陕西师范大学化学化工学院 西安 710062)

摘要 采用原子转移自由基聚合(ATRP)方法合成了水溶性良好的不同聚合度的三嵌段共聚物 P(DEAEMA-co-MEO₂MA-co-HMAM)-*b*-PEG-*b*-P(DEAEMA-co-MEO₂MA-co-HMAM)。利用傅里叶变换红外光谱(FT-IR)、核磁共振氢谱(¹H NMR)以及凝胶渗透色谱(GPC)对聚合物结构及组成进行表征;通过透光率、表面张力的测定以及动态光散射(DLS)、荧光探针和透射电镜(TEM)技术研究了共聚物水溶液的性质及胶束化行为。通过对不同 pH 下共聚物的凝胶状态和不同 pH 下温度诱导的溶胶-凝胶转变过程的观察,研究了温度和 pH 对共聚物凝胶化行为的影响。测定了载药凝胶在不同温度和不同 pH 的缓冲溶液中对药物的累积释放率。结果表明:ABA 型三嵌段共聚物具有良好的温敏性和 pH 敏感性,在温度或 pH 诱导下可形成核壳胶束和凝胶。载药凝胶对药物的累积释放率随温度和 pH 的降低而升高。
关键词 温度和 pH 敏感性;胶束化;凝胶化;药物缓释

Studies on the Synthesis, Micellization and Gelation of Novel Temperature- and pH-Sensitive ABA Triblock Copolymers

Han, Yanan Liu, Shouxin* Mao, Hongguang Tian, Lei Ning, Wenyan

(Key Laboratory of Applied Surface and Colloid Chemistry, Ministry of Education, School of Chemistry and Chemical Engineering, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

Abstract Novel ABA triblock copolymers P(DEAEMA-co-MEO₂MA-co-HMAM)-*b*-PEG-*b*-P(DEAEMA-co-MEO₂MA-co-HMAM) with different polymerization degrees which were more hydrophilic were synthesized by ATRP (atom transfer radical polymerization). The composition and structure of the copolymer were characterized by ¹H NMR, FT-IR, and gel permeation chromatograph (GPC). The temperature- and pH-sensitivity and micellization of the ABA triblock copolymer have been studied using transmittance, surface tension, fluorescence spectra, dynamic light scattering (DLS) and transmission electron microscopy (TEM) measurements. The effects of temperature and pH on the gelation of the copolymer were studied through the gel state and the process of sol-gel transitions of copolymer induced by temperature at different pHs. The drug release of a drug-loaded gel which informed by the copolymer was tested respectively at different temperatures and pHs in buffer solutions. It was found that the copolymer had a good temperature- and pH-sensitivity, and the copolymer chains can form stable core-shell structure micelles through temperature and pH inducing. The different strength of gel can be induced by pH. In addition, the drug release of the drug-loaded gel was increased with the decrease of temperature and pH values.

Keywords temperature- and pH-sensitivity; micellization; gelation; drug release

1 引言

环境敏感性聚合物能够对 pH、温度、离子强度、电场、磁场的变化做出响应^[1~5]。温度敏感性聚合物^[6]和 pH 敏感性聚合物^[7]研究比较广泛,常见的温度敏感性单体有 *N*-异丙基丙烯酰胺(NIPAM)、甲基丙烯酸-2-(2-甲氧基乙氧基)乙酯(MEO₂MA)和甲基丙烯酸寡聚乙二醇甲醚酯(OEGMA)等^[8~10]。常见的 pH 敏感性单体有丙烯酸(AA)、甲基丙烯酸(MAA)、*N,N*-二乙基胺基甲基丙

烯酸乙酯(DEAEMA)、*N,N*-二甲基胺基甲基丙烯酸乙酯(DMAEMA)等^[11]。环境敏感性聚合物材料及其水凝胶在护肤品、生物传感器、组织工程、药物释放、生物标记等领域具有良好的应用前景^[12~15]。

近年来,人们致力于多重响应性共聚物及水凝胶的研究^[16~26]。Zhao 等^[1]利用 ATRP 技术合成了 pH/温度双重敏感型的 ABA 型三嵌段共聚物 P(DEGEA-co-AA)-*b*-PEO-*b*-P(DEGEA-co-AA),并对其溶液的性质及其凝胶化和胶束化进行了详细的研究,结果表明共聚物的溶

* E-mail: liushx@snnu.edu.cn; Tel.: 029-81530781

Received June 28, 2016; published August 9, 2016.

Supporting information for this article is available free of charge via the Internet at <http://sioc-journal.cn>.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (20973106), the Fundamental Research Funds for the Central Universities of China (GK201301004), and the Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University (IRT_14R33).

项目受国家自然科学基金(20973106),中央高校基本科研业务费专项资金(GK201301004),长江学者和创新团队发展计划(IRT_14R33)资助。

胶-凝胶转变温度和凝胶强度可以通过改变溶液的 pH 来进行调节, 这就为此类凝胶在药物释放方面的应用提供了灵活的设计空间. Lee 等^[26]合成出一种 pH/温度双重敏感性共聚物, 其在室温下和 pH 8.0 时均是溶液, 只有温度和 pH 的共同诱导才会形成凝胶. 可以用作疏水药物和蛋白质的注射载体. 当注射到人体后, 其所处的环境为 37 °C、pH 7.4 时, 聚合物溶液才能转变成凝胶. 这样便避免了注射过程中由于温度升高而导致的针头内的凝胶化.

聚乙二醇(PEG)是中性、无毒且具有独特理化性质和良好生物相容性的高分子聚合物, 是 FDA 批准的能作为体内注射药用的合成聚合物之一^[27]. MEO₂MA 属于聚甲基丙烯酸寡聚乙二醇甲醚酯类, 这类温度敏感性单体无毒并具有良好的生物相容性. *N*-羟甲基丙烯酰胺(HMAM)带有功能性羟基, 与其他单体共聚后可以增强共聚物与生物大分子间的相互作用和水溶性, 并且 HMAM 链上的酰胺键与 PEG 间可形成氢键, 增加物理交联点, 提高凝胶的强度. DEAEMA 是一种 pH 敏感性单体, 与其它单体形成共聚物后依然具有明显的 pH 敏感性. 那么, 在温度/pH 双重敏感的 ABA 型三嵌段共聚物的胶束化与凝胶化中, pH 诱导凝胶化和 pH 对温度诱导凝胶化的影响如何? 通过对不同 pH 下共聚物的凝胶状态、温度诱导的共聚物溶胶-凝胶的转变过程和不同 pH 下温度诱导凝胶化的观察, 研究了温度和 pH 对共聚物凝胶化的影响.

本文采用原子转移自由基聚合(ATRP)方法合成了不同聚合度且水溶性良好的温度/pH 双重敏感的 ABA 型三嵌段共聚物 P(DEAEMA-*co*-MEO₂MA-*co*-HMAM)-*b*-PEG-*b*-P(DEAEMA-*co*-MEO₂MA-*co*-HMAM). 对共聚物的结构、组成进行了表征, 研究了其胶束化和凝胶化, 测定了载药凝胶对药物的缓释作用.

2 结果与讨论

2.1 共聚物的结构表征

2.1.1 共聚物的红外光谱分析

S1(见 Supporting Information)为共聚物 PH2 的红外谱图, 各个吸收峰的标记如图: 1111 cm⁻¹ 处的谱带为 C-O-C 的吸收振动峰; 1251 cm⁻¹ 处为 -N⁺(CH₂)₃- 的特征频率峰; 1460 cm⁻¹ 处对应的是 -CH₃ 的不对称弯曲振动峰; 1726 cm⁻¹ 处的谱带为 C=O 的振动吸收峰; 2892 cm⁻¹ 处对应的是 -CH₂ 的伸缩振动峰; 3334 cm⁻¹ 为酰胺键上的 N-H 的伸缩振动峰; 3449 cm⁻¹ 和 3540 cm⁻¹ 处的谱带为 -OH 的伸缩振动峰; 3641 cm⁻¹ 处的谱带为 N-H 的伸缩振动峰. 红外光谱结果可初步判断该共聚物已合成.

2.1.2 共聚物的核磁谱图分析

S2(见 Supporting Information)为共聚物 PH2 的 ¹H NMR 谱图, 具体氢的特征峰的归属均已标记, 其中 δ

7.2 为溶剂峰; δ 3.7 (h) 为 PEG 链段上氢的特征峰; δ 6.9 (k) 为 HMAM 上酰胺氢, δ 4.2 (l) 为 HMAM 上亚甲基氢, δ 3.6 (i) 为 MEO₂MA 上亚甲基氢, δ 3.4 (j) 为 MEO₂MA 上甲基氢, δ 2.8 (p) 为 HMAM 上羟基氢, δ 2.3 (a) 和 1.3 (c) 为主链亚甲基氢, δ 1.9 (e) 和 1.8 (f) 为 DEAEMA 亚甲基氢, δ 1.1 (g) 为 DEAEMA 甲基氢, δ 0.9 (b) 为主链甲基氢的特征峰. 核磁谱图进一步证明了嵌段共聚物 PH2 合成.

2.1.3 共聚物的 GPC 分析

图 1 为不同聚合度的共聚物 PH1, PH2, PH3 的 GPC 流出曲线. 如图, 从 PH3 到 PH1 的流出时间是明显滞后的, 并且分散度也逐渐增加的, 这说明其分子量是逐渐减小的. 表 1 为由 GPC 测得的聚合物数均分子量 M_n 以及分散性, 同时也列出了四个样品的组成以及聚合度. 结合图 1 和表 1, 可以看出, 共聚物的分子量的明显增加是由于共聚物聚合度的增加, 其分散性指数均在 1~1.2 之间, 分布范围较窄, 说明合成的共聚物比较稳定单一. 由表 1 GPC 测得的聚合物 PH1, PH2 和 PH3 数均分子量 M_n 依次为 44653, 62680 和 80593, 它们的理论分子量依次为 44245, 62468 和 80491. 可以看出: 随聚合度增加, 分子量依次增加; 另外也可以看出分子量实验值均略高于理论值, 这可能是由于 α -溴代异丁酰溴取代聚乙二醇中醇羟基所致.

图 1 PH1, PH2 和 PH3 的 GPC 流出曲线
Figure 1 GPC traces of PH1, PH2 and PH3

表 1 共聚物表征

Table 1 Characterization of copolymers

样品	ABA triblock Polymerization composition	degree	M_n (Br-PEG-Br)	M_n (ABA)	PDI
PH1	A ₁₀₀ BA ₁₀₀	100	8359	44653	1.18
PH2	A ₁₅₀ BA ₁₅₀	150	8359	62680	1.11
PH3	A ₂₀₀ BA ₂₀₀	200	8359	80593	1.01

2.2 共聚物的温度敏感性和 pH 敏感性

2.2.1 共聚物溶液的透光率分析

当环境温度和 pH 变化时, 温度和 pH 敏感性共聚物水溶液会发生相变, 可以通过测定共聚物溶液透光率的

变化来确定共聚物的温度敏感性和 pH 敏感性. 图 2 为 PH1, PH2 和 PH3 水溶液的透光率随温度的变化. 如图, 随着温度的逐渐增加, 共聚物溶液的透光率逐渐降低, 当温度高于 LCST 后, 其透光率会急剧下降, 并且溶液由清澈透明变为白色乳液, 这说明该共聚物的温度敏感性比较强. 当达到一定的温度后, 其透光率趋于一个稳定值, 这表明大量胶束已经形成.

图 2 PH1, PH2 和 PH3 水溶液透光率随温度的变化($w=0.5\%$)
Figure 2 Transmittance curves of PH1, PH2 and PH3 aqueous solutions versus temperature ($w=0.5\%$)

当温度低于其 LCST 时, 共聚物的亲水基团与水分子间存在氢键, 其链段呈伸展状态, 此时的共聚物链亲水性较强, 其透光率较大. 当温度高于 LCST 时, 氢键遭到破坏, 疏水链段开始收缩聚集, 共聚物链变得疏水, 其透光率急剧降低. 另外, 从 PH1, PH2 到 PH3, 随着共聚物聚合度的增加, 共聚物中疏水基团的量也随之增加, 温敏性逐渐增强, 所以其 LCST 逐渐减小. 其中, 样品 PH2 的 LCST 为 $36.8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右, 比较接近于人体生理温度.

图 3 为共聚物 PH1, PH2 和 PH3 的水溶液的透光率随溶液 pH 的变化, 总体来说, 共聚物溶液的透光率

图 3 PH1, PH2 和 PH3 水溶液透光率随 pH 变化($w=0.5\%$)
Figure 3 Transmittance curves of PH1, PH2 and PH3 aqueous solutions versus pH ($w=0.5\%$)

随 pH 的增加而逐渐减小, 从其变化曲线上来看, 对共聚物来说由于 DEAEMA 的加入, 当溶液 pH 较小时, DEAEMA 链段中的叔胺基在酸性环境中被质子化而带正电, 同种电荷间的静电排斥作用使共聚物亲水性较强, 透光率较大, 溶液比较清澈. 而在碱性环境中, 叔胺基的去质子化使共聚物链收缩聚集, 共聚物链疏水脱水, 导致透光率急剧下降, 溶液变得浑浊. 此外, 随共聚物聚合度的增加, DEAEMA 的量也随之增加, 使得其 pH 敏感性也逐渐增强, 所以其临界相变 pH 值随聚合度的增加而减小.

2.2.2 共聚物溶液的表面张力分析

在一定浓度下, 嵌段共聚物会吸附在空气-水界面形成饱和层, 该共聚物在空气-水界面的吸附能力会在温度的刺激下发生变化. 图 4 为不同聚合度的共聚物 PH1, PH2 和 PH3 水溶液的表面张力随温度的变化. 由图可知, 随着温度升高, 共聚物链中的亲水基与水分子间形成的氢键遭到破坏, 导致共聚物亲水性下降, 共聚物在空气-水界面的吸附能力增强, 导致表面张力急剧下降. 当达到 LCST 附近时, 表面张力缓慢下降并达到一个平稳值. 这是因为在低温下, 系统处于单聚体和胶束的平衡态, 而在高温时共聚物溶液发生相变, 相分离粒子作为附加组分介入到单聚体-胶束的平衡中, 此时的吸附过程及吸附层重排都发生的很慢, 从而导致共聚物溶液的表面张力下降^[28]. 并且共聚物链的亲水性随着共聚物聚合度的增加而逐渐减弱, 同时表面张力也会有所降低.

图 4 PH1, PH2 和 PH3 水溶液表面张力随温度的变化($w=1.5\%$)
Figure 4 The surface tension of the PH1, PH2 and PH3 aqueous solutions versus temperature ($w=1.5\%$)

2.2.3 共聚物聚集体粒径的测定

为了进一步研究共聚物溶液的温度敏感性, 测试了共聚物 PH1, PH2 和 PH3 的聚集体粒径随温度的变化. 如图 5 所示, 当温度比较低时, 单分散共聚物分子尺寸较小, 但随着温度的升高, 聚集体粒径也随之增大, 当温度升高到 LCST 后, 共聚物由于温度诱导发生自组装,

在溶液中形成大量比较稳定的核壳胶束, 粒径基本达到一个稳定值. 这个变化过程与透光率的测定结果是一致的, 这也进一步确定了共聚物的温度敏感性. 此外, 聚集体粒径随着共聚物聚合度的增加而增加.

图5 PH1, PH2 和 PH3 水溶液聚集体粒径随温度的变化($w=0.5\%$)
Figure 5 The aggregate particle diameters of PH1, PH2 and PH3 aqueous solution as a function of temperature ($w=0.5\%$)

图 6 为共聚物 PH1, PH2 和 PH3 的 Zeta 电位随 pH 的变化, 如图, 在酸性环境中时, DEAEEMA 链段的叔胺基质子化而带有正电荷. 与之相反, 在碱性及中性条件下, 环境中叔胺基的去质子化使共聚物链几乎不带电. 随着聚合度的增加, DEAEEMA 的量随之增加, 所以其 Zeta 电位随溶液 pH 的变化趋势更加明显, 这同时也说明了共聚物的 pH 敏感性的增加.

图6 PH1, PH2 和 PH3 水溶液的 Zeta 电位随 pH 的变化($w=2\%$)
Figure 6 The Zeta potential of PH1, PH2 and PH3 aqueous solution as a function of pH ($w=2\%$)

2.3 共聚物临界胶束浓度(CMC)的测定

共聚物水溶液的胶束化一般利用以芘(Py)为探针的荧光技术进行测定. 疏水微区的形成用 Py 荧光发射峰中的第三发射峰(I_3 at 384 nm)与第一发射峰(I_1 at 373 nm)的强度比 I_3/I_1 来检测. I_3/I_1 的值会随探针环境极性的降低而增加. 如图 7 所示, 在共聚物溶液浓度比较低时, 由于大分子间的距离较远, 所以共聚物链中的疏水基团之间发生疏水缔合的机率和数量很小, 即使存在分子内

缔合, 由于共聚物浓度太低也只会形成很少量的疏水微区. 因此 Py 的 I_3/I_1 值较小, 而且随聚合物浓度的变化很小, 说明此时芘探针处于极性较大的环境中. 但当溶液浓度达到某一特定浓度后, I_3/I_1 值急剧上升, 说明此时溶液环境的极性开始减小, 共聚物链在水溶液中开始缔合形成胶束, 大量的疏水微区逐渐形成, Py 开始向极性较小的疏水微区迁移, 此时的共聚物浓度为临界胶束浓度(CMC). 由图可知, 聚合度较小的 PH1 水溶液的 CMC 为 $0.16 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 而聚合度较大的 PH2 和 PH3 水溶液的 CMC 分别为 $0.14 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $0.09 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 这是因为聚合度较大的共聚物所含的疏水链较长, 较低浓度下就可缔合形成胶束, 所以其 CMC 值较小.

图7 Py 的 I_3/I_1 值随 PH1, PH2 和 PH3 水溶液浓度的变化
Figure 7 Curves of the I_3/I_1 ratio of Py for various concentrations (logarithmic scale) of PH1, PH2 and PH3 aqueous solution

2.4 共聚物胶束的 TEM 测定

图 8 (a), (b), (c) 分别展示了共聚物 PH1, PH2, PH3 在 40°C 下的水溶液中形成的胶束的透射电镜图. 嵌段共聚物链形成了以 P(DEAEEMA-co-MEO₂MA-co-HMAM) 链段为核, PEG 为壳的核壳稳定胶束. 并且可以清楚的看到共聚物 PH1, PH2, PH3 胶束的粒径分别为 100 nm, 150 nm, 200 nm. 作为核的 P(DEAEEMA-co-MEO₂MA-co-HMAM) 链长随着聚合度的增加而增长, 导致胶束的粒径随聚合度的增加而增大. 此外, 在水溶液中的胶束会比干燥状态下的胶束略微膨胀, 所以 DLS 测得的胶束聚集体粒径大于 TEM 所测的结果.

2.5 共聚物的凝胶化研究

2.5.1 pH 对温度诱导的溶胶-凝胶转变的影响

利用数码照片记录不同 pH 下温度诱导的溶胶-凝胶的转变情况, 如图 9 所示, 当温度为 25°C 时, 在 pH 为 5, 7, 9 下共聚物溶液都是可以自由流动的; 当温度升高到 34°C , 碱性环境(pH 9)下的共聚物溶液开始形成弱凝胶, 表明碱性环境下容易形成凝胶; 温度为 37°C 时, 共聚物溶液在碱性环境(pH 9)下已经以硬凝胶的状态存在, 在中性环境(pH 7)下也已形成弱凝胶, 但在酸性环境(pH 5)中仍然是自由流动的液体; 温度到达

图 8 PH1 (a), PH2 (b) 和 PH3 (c) 在 40 °C 下形成胶束的 TEM ($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)
Figure 8 TEM images of micelles of PH1 (a), PH2 (b) and PH3 (c) at 40 °C ($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)

图 9 不同 pH 下 PH2 水溶液的溶胶-凝胶转变随温度变化 ($20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)
Figure 9 Sol-gel transition of PH2 as a function of temperature at different pH ($20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)

45 °C 时, 碱性环境 (pH 9) 下的硬凝胶转变为站立式凝胶, 在中性环境 (pH 7) 下的弱凝胶转变成硬凝胶, 而酸性环境 (pH 5) 中的溶液仍无明显变化; 在 65 °C 下, 碱性环境 (pH 9) 中的共聚物凝胶已经转变成白色的浊液, 中性环境 (pH 7) 中的硬凝胶也转变为站立式凝胶; 当温度升到 75 °C, 共聚物溶液在酸性环境 (pH 5) 下终于形成弱凝胶, 而在碱性和中性环境中, 凝胶已经转变成浊液。所以, 溶液的 pH 越大越有利于溶胶-凝胶的转变。

2.5.2 pH 诱导的凝胶化

pH 对温度诱导的溶胶-凝胶转变的影响, 既说明了温度可以诱导共聚物溶液的凝胶化行为, 又反映了共聚物的 pH 敏感性, 那么通过对 pH 诱导共聚物溶液的凝胶状态的研究来确定该共聚物的 pH 敏感性。在酸性环境中, 叔胺基的质子化使得共聚物链比较疏松, 亲水性较好, 在一定浓度范围内很难形成凝胶, 但是在碱性环境中, 叔胺基去质子化后, 共聚物链收缩聚集, 形成凝胶就比较容易。图 10 为温度为 25 °C 时, 不同浓度的 PH2 共聚物的凝胶化随 pH 的变化。随着共聚物溶液浓度的增加, 形成凝胶所需的 pH 在逐渐减小, 这同时也说明浓度较高也有益于凝胶的形成。

为了形象的展现 pH 诱导共聚物溶液成胶的过程, 以数码照片的形式记录了浓度为 $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 PH2 水溶液的凝胶化过程随 pH 的变化, 如图 11 所示, 温度为

图 10 不同浓度的 PH2 的凝胶化随 pH 的变化 (25 °C)
Figure 10 The gelation for various concentrations of PH2 aqueous solution induced by pH at 25 °C

图 11 共聚物 PH2 溶液 ($20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的凝胶行为随 pH 变化的照片图 (25 °C)
Figure 11 Photos of gelation of PH2 aqueous solution ($20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) induced by pH at 25 °C

25 °C 时, 当溶液 pH 为 6.5 时, 共聚物溶液仍然是自由流动的液体, 当 pH 升高到 8.3 时, 溶液中已经有少量凝胶形成, 在 pH 10.2 下, 共聚物溶液已转变成弱凝胶, 当 pH 升高到 11.4, 弱凝胶转变成站立式凝胶, 在 pH 为 12.1 和 13.2 下, 站立式凝胶依然存在。这说明共聚物的 pH 敏感性是比较强的, pH 可单独诱导共聚物水溶液的凝胶化。

综上所述, 共聚物溶液的胶束化过程和凝胶化过程如图 12 所示。澄清透明的共聚物溶液在温度或 pH 的诱导下, 低浓度时, 伸展的共聚物链开始收缩聚集形成 P(DEAEMA-co-MEO₂MA-co-HMAM) 链段为核, PEG 链段为壳的核壳胶束; 高浓度时, 相邻胶束间亲水的 PEG 链段交互桥联形成水凝胶。

图 12 共聚物溶液的胶束化和凝胶化示意图

Figure 12 Micellization and gelation of copolymer aqueous solution

2.6 载药凝胶的释药行为

选用营养类药物牛血清蛋白(BSA)作为模型药物,在温度诱导下浓度为 $30 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的共聚物 PH2 水溶液形成的智能水凝胶作为药物载体进行药物缓释实验. 在 $0.01 \sim 1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内, BSA 的浓度(c)与吸光度(Abs)之间存在如下线性关系: $c = 1.14286A - 0.10202$ (S3 见 Supporting Information). BSA 在缓冲溶液中的累积释放量计算公式如下^[29]:

$$\text{Cumulative release (\%)} = \frac{(V_e \times \sum_{i=1}^{n-1} c_i + V_0 \times c_n)}{w} \times 100$$

式中 V_0 为缓冲溶液总体积(100 mL), V_e 为每次分析所取出缓冲溶液的体积(5 mL), c_i 为第 i 次取样时溶液中 BSA 的浓度, c_n 为第 n 次取样时溶液中 BSA 的浓度, c_{n-1} 为第 $n-1$ 次取样时溶液中 BSA 的浓度, w 为凝胶包裹的 BSA 的总量.

图 13 为不同温度下载药凝胶在缓冲溶液(pH7.4)中对 BSA 的累积释放量随时间的变化. 在 100 min 内, 温度为 25°C 时, 载药凝胶的累积药物释放率可达到 92%, 温度为 37°C 时, 累积药物释放率为 52%, 而在 40°C 时, 累积药物释放率仅为 20%. 可见载药凝胶对药物的累积释放率随温度的升高逐渐减小. 温度较低时, 亲水基团会与水分子间形成氢键, 共聚物链伸展, 使得 BSA 容易从载药凝胶中释放出来. 温度较高时, 共聚物链段

图 13 不同温度下载药凝胶在 pH 7.4 时对 BSA 的累积释放量随时间的变化

Figure 13 The BSA cumulative release curves of the drug-loaded micellar gel versus time at different temperatures at pH 7.4

聚集收缩, 导致载药凝胶更加稳定, BSA 的释放就比较困难, 所以药物释放率较低.

温度一定不同 pH 下, 载药凝胶的药物释放率也有所不同, 如图 14 所示, 温度固定为 37°C , 在人工模拟胃液(pH 1.5)中, 100 min 内载药凝胶对 BSA 的累积释放率达到 85%, 在人工模拟血液(pH 7.4)下, 其累积药物释放率为 51%, 而在人工模拟肠液(pH 7.6)中, 其累积药物释放率仅为 46%. 这说明随着溶液 pH 的升高, 载药凝胶的累积药物释放率随之降低. 叔胺基在酸性环境下被质子化, 由于静电相互作用, 共聚物链变得伸展疏松, BSA 很容易被释放出来. 而在弱碱性环境中, 叔胺基的去质子化使载药凝胶中的共聚物链收缩, 使得载药凝胶更稳定, BSA 的释放也就比较困难.

图 14 不同 pH 下载药凝胶在 37°C 时对 BSA 的累积释放量随时间的变化Figure 14 The BSA cumulative release curves of the drug-loaded micellar gel versus time at different pH at 37°C

3 结论

采用原子转移自由基聚合(ATRP)技术, 合成了水溶性更好的 PEG 基温度/pH 双重敏感的 ABA 型三嵌段共聚物 $\text{P}(\text{DEAEMA}-co\text{-MEO}_2\text{MA}-co\text{-HMAM})\text{-}b\text{-PEG}\text{-}b\text{-P}(\text{DEAEMA}-co\text{-MEO}_2\text{MA}-co\text{-HMAM})$, 利用 FT-IR、 ^1H NMR 和 GPC 对共聚物的组成和结构进行表征, 通过透光率、表面张力、粒径和 Zeta 电位的测定研究了共聚物溶液的性质. 该共聚物的水溶液具有较强的 pH 敏感性和温度敏感性, 其 LCST 大约为 36.8°C , 临界相变 pH 约为 7.4, 二者均随共聚物聚合度的增加而降低. 利用荧光探针技术测得共聚物 PH2 水溶液的临界胶束浓度(CMC)为 $0.14 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 且共聚物溶液的 CMC 值随共聚物聚合度的增加而减小; 透射电镜观察到共聚物形成的核壳胶束的粒径随共聚物聚合度的增加而增加. 共聚物凝胶化表明温度和 pH 可以分别诱导共聚物溶液的溶胶-凝胶相转变, 溶液的 pH 对温度诱导的溶胶-凝胶转变过程有重大影响. 载药胶束凝胶分别在 37°C 和 pH7.4 下对 BSA 有良好的缓释作用.

4 实验部分

4.1 试剂与仪器 (见 supporting information)

4.2 Br-PEG-Br 和共聚物的合成

4.2.1 大分子引发剂 Br-PEG-Br 的合成

将真空干燥过的分子量为 8000 的聚乙二醇 (1.063 mmol, 8.504 g) 溶解在甲苯 (300 mL) 中, 待其充分溶解后, 加入三乙胺 (9.2 mmol, 1.3 mL), 室温下, 通入氮气, 并搅拌 30 min 后, 缓慢滴入 α -溴代异丁酰溴 (18.3 mmol, 2.3 mL), 约 40 min 内滴完. 此后反应体系在室温下, 由氮气保护并且搅拌 12 h. 反应结束后, 抽滤除去杂质, 滤液通过旋转蒸发除去大量甲苯溶剂后, 用乙醚沉淀, 以二氯甲烷为溶剂, 乙醚为沉淀剂, 溶解沉淀三次. 将最后一次沉淀所得的产物溶解在二次水中, 用二氯甲烷萃取三次, 有机相用无水硫酸镁干燥过夜. 最后, 抽滤除去硫酸镁, 滤液通过旋转蒸发浓缩后, 用乙醚沉淀, 沉淀物真空干燥, 得到白色粉末状固体 Br-PEG-Br, 反应过程见图式 1.

4.2.2 共聚物 P(DEAEMA-co-MEO₂MA-co-HMAM)-b-PEG-b-P(DEAEMA-co-MEO₂MA-co-HMAM) 的合成

将 PEG 大分子引发剂 Br-PEG-Br (0.43 g, 0.0538 mmol) 及 5 mL 甲醇溶剂加入 Schlenk (希莱克) 瓶内, 待其充分溶解后向体系中加入 DEAEMA (652 μ L, 3.29 mmol), MEO₂MA (1.28 mL, 6.78 mmol), HMAM (0.076 mL, 0.75 mmol) ($n_{\text{DEAEMA}}:n_{\text{MEO}_2\text{MA}}:n_{\text{HMAM}}=30:63:7$), 将体系冷冻、抽真空、常温解冻反复三次后通入氮气, 尽量排尽体系中的空气和水分, 加入催化剂 CuCl (0.0054 g, 0.0538 mmol) 和配体 2,2'-联二吡啶 bpy (0.017 g, 0.1076 mmol). 在 75 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 12 h 后将体系置于空气中使反应停止, 随后加入过量的甲醇稀释反应液并将其置于透析袋 (截留分子量 8000~10000) 中进行透析纯化, 每隔一定时间换水, 透析一周, 待溶液变得透亮, 对其进行冷冻干燥除掉水分, 得到白色粘稠固体, 合成过程见图式 1. 共制备了 3 种不同聚合度的共聚物, 依次标

记为 PH1, PH2 和 PH3 (聚合度由小到大, 见表 1).

4.3 共聚物的表征

室温下取少量共聚物和 KBr 混合压片并用傅立叶变换红外光谱仪测定其红外谱图; 以氘代氯仿为溶剂, 使用 Bruker Avance 300 MHz 超导傅里叶数字化核磁共振谱仪测定共聚物的 ^1H NMR 谱; 以聚苯乙烯为标样 (M_w : 6480, 9890, 13900, 18200, 44200, 120000, 205000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$), 以四氢呋喃溶液为流动相, 流速为 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 共聚物溶液浓度为 1.5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. 通过 GPC 测定不同聚合度共聚物的分子量和单分散性.

4.4 共聚物水溶液的性质及胶束化研究

4.4.1 共聚物水溶液的性质

(1) 共聚物溶液透光率的测定: 配置质量百分浓度为 $w=0.5\%$ 的共聚物溶液, 测量之前用滤膜除去杂质. 在波长为 600 nm 下使用 UV-1901 型紫外-可见分光光度计测定溶液的透光率分别随温度和 pH 的变化情况.

(2) 共聚物溶液表面张力的测定: 配置质量百分浓度为 $w=1.5\%$ 的共聚物溶液, 使用 DCAT 21 表面张力仪测定不同温度下其溶液的表面张力变化.

(3) 共聚物聚集体粒径的测定: 配制质量百分浓度为 $w=0.5\%$ 的共聚物溶液, 测量之前用滤膜除去杂质. 利用 DLS 测定溶液中共聚物聚集体粒径随温度的变化.

(4) 共聚物 Zeta 电位的测定: 配置质量百分浓度为 $w=2\%$ 的共聚物水溶液, 使用激光粒度 Zeta 电位仪测定其 Zeta 电位随溶液 pH 的变化.

4.4.2 共聚物的胶束化

胶束化作用与临界胶束浓度 (CMC) 测定: 将 20 mg 芘 (Py) 置于 10 mL 容量瓶中, 加入乙醚至刻度线, 得到 $10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Py 的乙醚溶液, 然后移取 1 mL 溶液置于 10 mL 容量瓶中, 加入乙醚至刻度线, 得到 $10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Py 的乙醚溶液, 以此类推, 最后得到浓度为 $10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Py 的乙醚溶液. 然后移取此 100 μL 的 $10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Py 的乙醚溶液至 10 mL 容量瓶中, 室温下,

图式 1 ABA 三嵌段共聚物的合成

Scheme 1 Synthesis of the ABA triblock copolymer

静置过夜使乙醚完全挥发. 随后向每个容量瓶中加入不同体积的共聚物溶液, 用二次水稀释至刻度线, 得到一系列不同质量百分浓度的共聚物溶液, 经超声振荡 20 min, 使芑均匀分散于其中. 将这些溶液静置 24 h 备用. 荧光光谱测定条件: 测试温度为 25 °C, 激发波长为 340 nm, 激发和发射狭缝宽分别为 10 nm, 2.5 nm, 扫描范围 360~460 nm. 从光谱上读取 I_3 和 $I_1(I_3: 383 \text{ nm}; I_1: 372 \text{ nm})$ 的值, 以 I_3/I_1 的值对浓度的对数($\log c$)作图^[30].

4.4.3 聚合物胶束的 TEM 测定

配置浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的具有不同聚合度的共聚物 PH1, PH2 和 PH3 的水溶液, 在 40 °C 下搅拌过夜. 先在铜网上滴加适量的溶液, 使其在铜网上呈水珠状, 并在 40 °C 下将其烘干, 滴加浓度为 $w=1\%$ 的磷钨酸(中性)进行负染色, 完全干燥后再使用 JEM-2100 透射电镜观察共聚物的胶束形貌.

4.5 共聚物的凝胶化

4.5.1 pH 对温度诱导的溶胶-凝胶转变的影响

配置 pH 为 5, 7, 9 的浓度为 $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的共聚物 PH2 水溶液, 分别取 2 mL 置于小瓶中并标记. 将这些小瓶置于水浴锅中, 在 25 °C 下平衡 15 min 后, 开始逐渐升温, 每 10 min 升温一次, 升温速率固定为 1 °C/次. 期间, 观察并用数码相机记录 3 只小瓶内共聚物溶胶-凝胶的相转变过程. 溶胶-凝胶转变情况通过小瓶翻转实验来确定, 小瓶翻转后, 里面的样品流速很慢或是几乎不流动时, 证明凝胶开始形成, 此时的温度便为相转变温度, 转变过程见数码相机照片^[24].

4.5.2 pH 诱导的凝胶化行为

配置一系列浓度为 10, 12.5, 15, 17.5, 20, 22.5, 25 和 $27.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的共聚物 PH2 水溶液, 分别将它们置于小瓶中并编号, 调节小瓶内溶液的 pH, 使溶液从酸性向碱性过度, 在此过程中, 观察并记录不同浓度的共聚物溶液形成凝胶的 pH 值. 共聚物的凝胶化行为通过小瓶翻转来验证, 小瓶翻转后, 里面的样品流速很慢或是几乎不流动时, 证明凝胶开始形成. 期间, 用数码相机记录浓度为 $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的共聚物 PH2 水溶液的成胶状况.

4.6 共聚物凝胶对药物的缓释作用

标准工作曲线的绘制: 选用牛血清蛋白作为模型药物进行体外释放实验, 在恒温水浴振荡器(转速 $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$)中进行, 准确称取 100 mg 的牛血清蛋白(BSA)药物溶于 pH 7.4 的缓冲溶液中, 定容至 100 mL; 分别移取 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 7.5 和 10 mL 稀释至 10 mL 用紫外/可见分光光度计在 $\lambda=278 \text{ nm}$ 测定各个溶液的吸光度, 以 BSA 浓度对吸光度值作图即得 BSA 的标准工作曲线.

药物释放行为的测定: 将 600 mg 共聚物和 10 mg BSA 溶于 2 mL 二次蒸馏水中, 在 37 °C 下恒温形成载药凝胶. (1) 100 mL pH 7.4 的缓冲溶液作为释放介质, 将载

药凝胶分别在 25, 37 和 40 °C 下恒温加热, 每隔 10 min 取样 5 mL 测定 BSA 的累积释放量, 同时补充相同的释放液. (2) 载药凝胶在 37 °C 下恒温加热, 100 mL 的 pH 分别为 1.5, 7.4 和 7.6 的缓冲溶液作为释放介质, 每隔 10 min 取样 5 mL 测定 BSA 的累积释放量, 同时补充相同的释放液^[31,32].

References

- [1] O'Lenick, T. G.; Jin, N. X.; Woodcock, J. W.; Zhao, B. *J. Phys. Chem.* **2011**, *115*, 2870.
- [2] Li, Y.; Yang, D.; Adronov, A.; Gao, Y.; Luo, X.; Li, H. *Macromolecules* **2012**, *45*, 4698.
- [3] Woodcock, J. W.; Jiang, X.; Wright, R. A. E.; Zhao, B. *Macromolecules* **2011**, *44*, 5764.
- [4] Shim, W. S.; Kim, S. W.; Lee, D. S. *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 1935.
- [5] Sahu, A.; Choi, W.; Tae, G. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 5820.
- [6] Loh, X. J.; Goh, S. H.; Li, J. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 585.
- [7] Castelletto, V.; Hamley, I. W. *Langmuir* **2004**, *20*, 4306.
- [8] Lutz, J. F.; Akdemir, Ö.; Hoth, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 13046.
- [9] Lutz, J. F.; Weichenhan, K.; Akdemir, O.; Hoth, A. *Macromolecules* **2007**, *40*, 2503.
- [10] Zarafshani, Z.; Obata, T.; Lutz, J. F. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 2130.
- [11] Bütün, V.; Billingham, N. C.; Armes, S. P. *Chem. Commun.* **1997**, 671.
- [12] Du, J.; Armes, S. P. *Langmuir* **2009**, *25*, 9564.
- [13] Du, J.; Tang, Y.; Lewis, A. L.; Armes, S. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17982.
- [14] Madsen, J.; Armes, S. P.; Bertal, K.; Lomas, H.; MacNeil, S.; Lewis, A. L. *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 2265.
- [15] Madsen, J.; Armes, S. P.; Lewis, A. L. *Macromolecules* **2006**, *39*, 7455.
- [16] Woodcock, J. W.; Wright, R. A. E.; Jiang, X.; O'Lenick, T. G.; Zhao, B. *Soft Matter* **2010**, *6*, 3325.
- [17] Vogt, A. P.; Sumerlin, B. S. *Soft Matter* **2009**, *5*, 2347.
- [18] Zhao, W. J.; Qiao, Z. Y.; Duan, Z. Y.; Wang, H. *Acta Chim. Sinica* **2016**, *74*, 234. (赵文静, 乔增莹, 段中余, 王浩, 化学学报, **2016**, *74*, 234.)
- [19] Qi, X. J.; Liu, S. X.; Liu, T.; Dang, L.; Yang, X.; Yu, W. N.; Wang, H. M. *Acta Chim. Sinica* **2011**, *69*, 1803. (齐晓君, 刘守信, 刘腾, 党莉, 杨曦, 雨薇娜, 王红梅, 化学学报, **2011**, *69*, 1803.)
- [20] Jiang, X.; Jin, S.; Zhong, Q.; Dadmun, M. D.; Zhao, B. *Macromolecules* **2009**, *42*, 8468.
- [21] Sun, K. H.; Sohn, Y. S.; Jeong, B. *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 2871.
- [22] Anderson, B. C.; Cox, S. M.; Bloom, P. D.; Sheares, V. V.; Mallapragada, S. K. *Macromolecules* **2003**, *36*, 1670.
- [23] Determan, M. D.; Guo, L.; Thiyagarajan, P.; Mallapragada, S. K. *Langmuir* **2006**, *22*, 1469.
- [24] Chang, C.; Wei, H.; Feng, J.; Wang, Z. C.; Wu, X. J.; Wu, D. Q.; Cheng, S. X.; Zhang, X. Z.; Zhuo, R. X. *Macromolecules* **2009**, *42*, 4838.
- [25] Smith, A. E.; Xu, X.; Kirkland-York, S. E.; Savin, D. A.; McCormick, C. L. *Macromolecules* **2010**, *43*, 1210.
- [26] Shim, W. S.; Yoo, J. S.; Bae, Y. H.; Lee, D. S. *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 2930.
- [27] Qiao, C. D. *Polymer Bulletin* **2010**, (3), 23. (乔从德, 高分子通报, **2010**, (3), 23.)
- [28] Richardson, R. M.; Pelton, R.; Cosgrove, T.; Zhang, J. *Macromolecules* **2000**, *33*, 6269.
- [29] Li, X. M.; Wang, Y. Y.; Chen, J. M.; Wang, Y. N.; Ma, J. B.; Wu, G. L. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6*, 3640.
- [30] Wei, H.; Chen, W. Q.; Chang, C.; Cheng, C.; Cheng, S. X.; Zhang, X. Z.; Zhuo, R. X. *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 2888.
- [31] Li, Y.; Rodrigues, J.; Tomás, H. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2193.
- [32] Du, A. W.; Stenzel, M. H. *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 1097.

(Cheng, B.)