

• 研究论文 •

PtBA-*g*-PPEGMEMA 接枝共聚物的合成及其包埋阿霉素的研究

郑兴良* 丁爱顺 罗丹 高鸿盛
(长沙理工大学化学与生物工程学院 长沙 410076)

摘要 通过可逆加成-裂解链转移聚合和原子转移自由基聚合, 制备了以聚丙烯酸叔丁酯为主链、以聚(聚乙二醇单甲醚甲基丙烯酸酯)为侧链的两亲性接枝共聚物 PtBA-*g*-PPEGMEMA, 该方法克服了以往通过聚合物修饰来引入接枝点时所存在的接枝点密度不高和不可控的局限性。接着, 以 PtBA-*g*-PPEGMEMA 为载体, 对抗肿瘤药物阿霉素进行了负载, 制备得到了尺寸为 164.8 nm 的纳米载药胶束。其释放试验表明, 该体系具有缓释特征。

关键词 两亲性接枝共聚物; 可逆加成-裂解链转移聚合; 原子转移自由基聚合; 药物载体

Synthesis of PtBA-*g*-PPEGMEMA Graft Copolymer and Its Loading of DOX

Zheng, Xingliang* Ding, Aishun Luo, Dan Gao, Hongsheng
(Institute of Chemistry and Biological Engineering, Changsha University of Science and Technology, Changsha 410076)

Abstract PtBA-*g*-PPEGMEMA amphiphilic graft copolymer, consisting of poly(*tert*-butylacrylate) backbone and poly(poly(ethylene glycol)methyl ether methacrylate) side chains, was synthesized by the combination of reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT) polymerization and atom transfer radical polymerization (ATRP). The limitation of low and uncontrolled grafting density while introducing the grafting points onto the polymer backbone by polymer post-modification can be overcome by this strategy. The anti-cancer drug, doxorubicin (DOX), was loaded using PtBA-*g*-PPEGMEMA as the carrier to get a DOX-loaded micelle-based nano-carrier with a D_h around 164.8 nm. Drug release experiment of the nano-carrier indicated the delayed drug release characteristics.

Keywords amphiphilic graft copolymer; RAFT; ATRP; drug carrier

两亲性共聚物可以自组装形成胶束, 在表面活性剂^[1~3]、生物医学^[4~9]和复合纳米金属粒子^[10~13]等领域有着很好的应用价值, 特别是聚合物胶束作为药物纳米载体在药物传输和控释研究领域具有很好的发展前景^[14~20]。自组装形成的纳米药物传输体系可以解决小分子药物或生物大分子药物给药的许多缺点, 如传统的小分子药物进入生物体后, 体内药物浓度在短时间内远超过实际需求量, 且新陈代谢快、半衰期短、体内浓度

很快降低, 造成不必要的浪费, 疗效不理想, 同时, 小分子药物无法对生物组织进行选择性定位, 对正常的细胞造成一定的毒副作用; 对于大分子药物, 在短时间内体内的药物浓度虽然大大降低, 但是这类药物在体内非常容易发生酶解而失活, 药物的半衰期也很短, 需要重复给药, 同时生物大分子药物还受到如免疫系统、细胞膜等的限制, 不易通过这些生物屏障, 因而药物的利用率也不高。而通过两亲性共聚物自组装得到的药物纳米

* E-mail: xingliangzheng@163.com

Received November 25, 2011; accepted December 19, 2011.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 20976017) and 2011 Foundation of Key Laboratory of Organofluorine Chemistry, Shanghai Institute of Organic Chemistry, CAS.

国家自然科学基金(No. 20976017)和中国科学院上海有机化学研究所有机氟化学重点实验室开放基金 2011 资助项目。

载体除具有低毒、长效稳定、缓释、副作用小等优点外，还有可识别的能力，因此它在控释给药体系 (controlled release drug delivery system, CRDDS) 中很有应用前景。CRDDS 体系是指将药物载体与药物制成一定的剂型，药物可以从制剂中以受控的形式恒速地释放，作用到靶位器官而发挥治疗效用。CRDDS 体系可以在最大化药物治疗活性的同时最小化其它的负面效应。纳米胶体粒子如微球、脂质体和聚合物胶束等常被用作载体实现药物缓释^[21~25]，其中聚合物胶束是最具优势的候选载体^[26,27]。因为聚合物胶束的结构在体外和体内都能稳定，有好的生物相容性，较小的粒径使胶束可以达到一般药物无法到达的毛细管层，并且体内循环时间长，还可具有主动和被动靶向性的能力。

由于嵌段共聚物的合成相对容易，因此两亲性嵌段共聚物的自组装研究行为已形成一定成熟的理论，故其作为药物载体的研究也比较广泛。而接枝共聚物的合成过程较为复杂困难，因此在 20 世纪 90 年代中期以前由于聚合方法的局限，关于接枝共聚物的研究没有嵌段共聚物那么广泛和深入。最近十几年随着活性可控自由基聚合等新的聚合技术的发展，具有各种组成的结构规整的接枝共聚物已被合成出来，从而带动接枝共聚物在各个领域的研究。目前，文献中报道的接枝共聚物制备方法主要有以下三种^[28]: 直接接枝法(grafting through)、偶合接枝法(grafting onto)和从主干接枝法(grafting from)。对比这三种策略，从主干接枝法利用活性可控自由基聚合方法，成为制备结构规整的接枝共聚物的有效途径，也是近年来发展最为迅速的合成方法。但是，以往在聚合物链上引入接枝点的方法是通过聚合物修饰来实现的，由于大分子上的化学反应效率不高，接枝点密度不高并且难以精确控制。因此，要实现高密度接枝和密度可控的接枝，就要尽量避免借助大分子上的反应引入引发基团的方法。在本文中，我们采用的方法就体现了这点，我们将引发基团直接连到单体上，对含有引发基团的单体选用合适的聚合方法进行均聚，就能够得到每个重复单元都含有一个引发基团的大分子；与另一不含有引发基团的单体共聚，通过改变共聚投料比便能方便地调控引发基团的密度，这样就可以得到不同接枝点密度的大分子引发剂，然后引发第二单体聚合，就可以制得高接枝密度和接枝密度可控的接枝共聚物。

本文以阿霉素为模型药物，以用上述方法制备的两亲性接枝共聚物 PtBA-g-PPEGMEMA 进行药物负载的研究。阿霉素(DOX)为蒽环类抗肿瘤药物，可直接作用于 DNA，插入 DNA 的双螺旋链，使之解链，改变 DNA 的模板性质，同时抑制 DNA 聚合酶，从而抑制 DNA 合成。它具有较广抗癌谱，对临幊上多种恶性肿瘤均有较

好疗效，是当前常用抗肿瘤药物之一。它除了在淋巴瘤、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、软组织肉瘤、膀胱瘤、甲状腺瘤、肝癌等的治疗中得到肯定的疗效，在骨肿瘤的治疗中也得到很好的应用，可用于骨巨细胞瘤和多发性骨转移肿瘤的姑息性治疗等。但是，阿霉素对机体可产生广泛的生物化学效应，具有强烈的细胞毒性作用，静脉应用易引起骨髓抑制、脱发、消化道反应等副作用，甚至引起心脏毒性。目前，骨肿瘤术后局部应用化疗药物的价值已得到肯定^[29]，肿瘤的化疗须同时满足短时间内的大剂量及长时间维持量的双重要求。因此，骨肿瘤术后理想的局部用药应选择局部用量大，维持时间长，全身血药浓度低及副作用小的缓释制剂，这种缓释制剂可以局部持续释放阿霉素抑杀残存肿瘤细胞，减轻全身毒副作用，更有助于药物的合理利用。如吴芳等^[30]将阿霉素载入磷酸钙骨水泥(calcium phosphate cement, CPC)材料中，制备 DOX-CPC 缓释给药系统，考察了其体外释药速率，结果表明 DOX-CPC 体系具有明显的缓释作用，且缓释时间长、局部浓度高；药物包埋量对缓释速率的影响较大，可以通过调节包埋量的大小来调整药物的缓释速率。章莹等^[31]制备了几丁糖阿霉素缓释药粒，并在临幊上应用该缓释药粒于 4 例骨巨细胞瘤刮除术后的残腔，无一例复发。本文关于接枝共聚物负载阿霉素的研究，旨在发展阿霉素缓释体系，以达到阿霉素控释要求，满足肿瘤治疗中短时间内的大剂量及长时间维持量的双重要求。

1 实验部分

1.1 实验仪器与方法

核磁共振：超导核磁共振仪，在 Varian MERCURY 300, Bruker AM-300 和 DPX 300 上完成。溶剂为氘代氯仿，四甲基硅(TMS)为内标。红外光谱：傅立叶变换红外光谱仪，Nicolet AVATAR-360。所有红外谱图累加 32 次，分辨率为 4.0 cm^{-1} 。元素分析：元素分析仪，Elementar VARIOEL, Heraeus 1106, Carlo-erba 1108。气相色谱：HP6890, SE-54 柱。凝胶色谱法测定聚合物分子量及分子量分布：实验仪器为 Waters 1515 凝胶色谱仪(HR3, HR4, HR5)，采用 Waters 2410 示差折光检测器和 Waters 2487 紫外检测器。用 THF 将聚合物配成 1 mg/mL 的溶液，淋洗剂为 THF，流速为 1 mL/min，采用线性聚苯乙烯标样对分子量进行校正。荧光光谱法测定临界胶束浓度：在 Hitachi F-4500 荧光分光光度计上完成；以 N-苯基-1-萘胺(PNA)为荧光探针。激发和发射狭缝均为 5 nm，激发波长为 340 nm。动态光散射粒径仪：Marlven Nano-ZS90 Zetasizer，溶液过 0.45 μm 滤膜，25

℃下平衡 2 min, 采集粒径数据. 紫外分光光度计: Cary 100, 25 ℃下扫描阿霉素(DOX)的 200~800 nm 的全谱, 测定 480 nm 处的吸收强度.

1.2 试剂

THF、甲苯在氮气保护下, 经钠丝在二苯甲酮存在下回流除水至呈紫色后蒸出, 现蒸现用. 三乙胺先用 KOH 干燥数天, 在 CaH_2 存在下回流蒸出, 现蒸现用. CuBr 经乙酸搅拌过夜后, 再经乙醇、乙醚和丙酮等顺次洗涤至淡黄色, 真空烘箱 40 ℃减压干燥 24 h, 避光保存备用. 丙烯酸叔丁酯(*t*BA)经减压蒸馏提纯. AIBN 用乙醇 35 ℃重结晶两次后, 25 ℃真空干燥 1 d, 避光保存. *N*-苯基-1-萘胺(PNA)用甲醇/水重结晶避光保存备用. 聚乙二醇单甲醚甲基丙烯酸酯(PEGMEMA)通过 Al_2O_3 柱除去阻聚剂. 盐酸盐阿霉素由浙江海正药业有限公司提供, 其他未注明试剂均未经处理直接使用. PBS 缓冲液的配制: 先配制 0.2 mol/L Na_2HPO_4 (71.6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 溶于 1000 mL 水) 和 0.2 mol/L NaH_2PO_4 (31.2 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶于 1000 mL 水), 然后取 19 mL 0.2 mol/L 的 NaH_2PO_4 和 81 mL 0.2 mol/L 的 Na_2HPO_4 混合, 即可配得 pH=7.4 的 0.2 mol/L PBS 缓冲液; 取 68.5 mL 0.2 mol/L 的 NaH_2PO_4 和 31.5 mL 0.2 mol/L 的 Na_2HPO_4 混合, 即可配得 pH=6.5 的 0.2 mol/L PBS 缓冲液. dHbpy^[32], *S*-十二烷基-*S'*-(1-甲基-1-氟基丁酸)三硫代碳酸酯^[33]和单体(2-溴异酰氧基)甲基丙烯酸叔丁酯(*t*BIBMA)^[34]按照文献中的方法合成.

1.3 大分子引发剂 PtBBIBMA (3)的合成

向一预置搅拌子的 25 mL Schlenk 瓶中(使用前真空火烤二次)加入 AIBN (40.0 mg, 0.244 mmol) 和 *S*-十二烷基-*S'*-(1-甲基-1-氟基丁酸)三硫代碳酸酯(295.3 mg, 0.733 mmol), 抽真空通氮气 3 次后, 加入干燥的甲苯 (1.7 mL) 和单体 *t*BIBMA (1) (15 g, 48.86 mmol). 经三次冷冻-抽真空-充氮解冻循环来除去反应液中的氧气. 将 Schlenk 瓶置于恒温的 70 ℃油浴中加热, 氮气保护下反应 18 h 后液氮淬灭. 加 THF 稀释, 在冰甲醇中沉淀多次, 烘干后得 6.59 g 淡黄色粉末状固体 **2**, 收率 44%. GPC: $M_n = 7900$, $M_w/M_n = 1.20$. ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 4.12 (2H, $\text{CH}_2\text{-O}$), 3.21 (2H, CH_2S), 2.02 (2H, CCH_2C and 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 1.45 (9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.25 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 0.88 (CH_3CH_2).

将 **2** (6.59 g) 和 AIBN (2.98 g, 18.16 mmol) 加入到 100 mL Schlenk 瓶中(使用前真空火烤 2 次), 抽真空通氮气三次后, 加入干燥的甲苯 (320 mL), 然后置于 70 ℃油浴中搅拌反应 36 h, 溶液从淡黄色变为无色, 液氮淬灭, 用冰甲醇沉淀三次, 得到 4.13 g 白色固体粉末 **3**,

收率 62.7%. GPC: $M_n = 8300$, $M_w/M_n = 1.15$. ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 1.48 (9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.01 (2H, CH_2CCO_2 and 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{CBr}$), 4.10 (2H, CO_2CH_2); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 22.6, 25.6 ($(\text{CH}_3)_2\text{CBr}$), 28.4, 29.7 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 31.5 (CH_2CCO_2), 48.6 (CH_2CCO_2), 56.3, ($(\text{CH}_3)_2\text{CBr}$) 67.9 (CO_2CH_2), 83.6 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 170.9 (CO_2CH_2) and $\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$; FT-IR ν : 2974, 2925, 1734, 1464, 1369, 1271, 1158, 1109, 1013, 839 cm^{-1} . HPIC: S% = 0.065%. EA: Br%, 24.98%.

1.4 接枝共聚物 PtBA-g-PEGMEMA (4)的合成

将催化剂 CuBr (25 mg, 0.174 mmol), PtBBIBMA (3) 大分子引发剂 (54 mg, 0.173 mmol) 引发位点) 和配体 dHbpy (61 mg, 0.173 mmol) 加入到预置搅拌子的 Schlenk 瓶中(反应瓶使用前抽真空火烤三次). 经过三次抽真空通氮气后, 用针筒加入单体 PEGMEMA (10 mL, 34.6 mmol), THF (4.2 mL) 和 EtOH (4.2 mL), 经三次冷冻-抽真空-充氮解冻循环来除去反应液中的氧气. 将反应管置于恒温的 45 ℃油浴中加热, 氮气保护下反应 1 h 后, 液氮淬冷终止反应. 反应粗产物用 THF 溶解, 过氧化铝柱予以除去催化剂. 滤液浓缩后在冷的正己烷中沉淀, 并反复溶解沉淀三次, 真空烘干, 得到无色粘稠液体 PtBA-g-PEGMEMA (4).

GPC: $M_n = 108000$, $M_w/M_n = 1.10$. ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 0.87, 1.01, 1.23 (CCH_3 on PEGMEMA side chains), 1.43 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.92, 1.78 (CH_3CCH_3 and $\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 3.39 (OCH_3), 3.67 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 4.09 ($\text{CH}_2\text{COOC}(\text{CH}_3)_2$ and $(\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{O})$; FT-IR ν : 2870, 1729, 1452, 1350, 1247, 1109, 1032, 946, 859 cm^{-1} .

1.5 载药胶束的制备

将 20 mg 接枝共聚物 PtBA-g-PEGMEMA (4) 溶于 10 mL DMF 中, 搅拌溶解, 然后加入 15 mg 阿霉素和 11 mg 三乙胺, 搅拌 2 h 后, 滴入 40 mL 水中. 将上述溶液转移到透析袋中, 置入 400 mL 高纯水中透析, 每隔 3 h 更换一次水. 1 d 后, 将袋中溶液转移到表面皿中, 冷冻干燥得到 31 mg 产品.

用动态光散射粒径仪测试载药胶束的粒径: 取 1 mg 载药胶束 **5** 用 5 mL 高纯水溶解分散, 溶液过 0.45 μm 滤膜, 25 ℃下平衡 2 min, 采集粒径数据, 测得载药胶束 **5** 的粒径为 164.8 nm, 粒径分布为 0.194.

1.6 紫外分光光度法检测载药胶束 5 的载药量

精确称取 25.7 mg 盐酸盐阿霉素和 9.3 mg 三乙胺, 加 DMF 溶解, 转移至 50 mL 容量瓶中, 加 DMF 定容至 50 mL, 得 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的阿霉素溶液. 用上述溶液分别配制得到浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10

$\mu\text{g/mL}$, $5 \mu\text{g/mL}$, $2 \mu\text{g/mL}$ 和 $1 \mu\text{g/mL}$ 的溶液, 测试其在 480 nm 处的吸光度, 绘出吸光度-浓度曲线.

精确称取 2 mg 载药胶束 **5**, 用 DMF 溶解, 定容至 25 mL , 放置 1 d 后, 测试其在 480 nm 处的吸光度, 在吸光度-浓度标准曲线上推算其含量浓度. 进而算得药物载体的载药量为 34.2% .

1.7 药物载体 5 的体外释药过程

精确称取 6 mg 载药胶束 **5**, 用 6 mL 高纯水溶解分散, 马上将溶液转移到透析袋中, 将透析袋放入 400 mL PBS ($\text{pH}=7.4$ 的磷酸缓冲溶液)或 PBS ($\text{pH}=6.5$ 的磷酸缓冲溶液)中, 于 37°C 下进行体外药物释放. 定期取出 5 mL 释放液, 紫外测定其中 DOX 浓度, 并同时补充相同体积的缓冲液继续释放. 分别测试取出液在 480 nm 处的吸光度值, 在吸光度-浓度标准曲线上推算其浓度, 进而算得释药量, 绘制释药率与时间曲线.

2 结果与讨论

2.1 接枝共聚物 PtBA-g-PPEGMEMA (4) 的合成

我们以 *S*-十二烷基-*S'*-(1-甲基-1-氰基丁酸)三硫代碳酸酯为链转移剂, AIBN 为引发剂, 在甲苯中进行单体 tBBIBMA (**1**) 的 RAFT 聚合(Scheme 1), 得到红色聚合物 **2**. 在其 ^1H NMR 谱图(图 1A)中, 在 δ 5.84 和 6.31 处的双键端基氢的特征峰消失, 而在 δ 2.02 处出现的聚合物骨架的亚甲基峰(CCH_2C)和与溴相邻的甲基峰($\text{C}(\text{CH}_3)_2$)都呈宽峰, 原先单体 **1** 在 δ 4.88 处的峰向高场移动至 δ 4.10 处, 说明单体发生了聚合, 得到对应的聚合物, 另外, 在 δ 1.25 和 0.88 处出现的两个峰是 RAFT 试剂的烷基峰, 说明单体 **1** 在 RAFT 试剂的调控下进行了聚合.

由于在后面的反应中, 我们将利用聚合物 **2** 中的 ATRP 引发基团进行第二单体的 ATRP, 为了避免聚合物 **2** 的链转移端基影响 ATRP, 故必须将聚合物 **2** 中的端基脱除. 我们通过自由基引发的还原将残留的端基通过自由基反应脱除: AIBN 受热产生初始自由基, 对硫

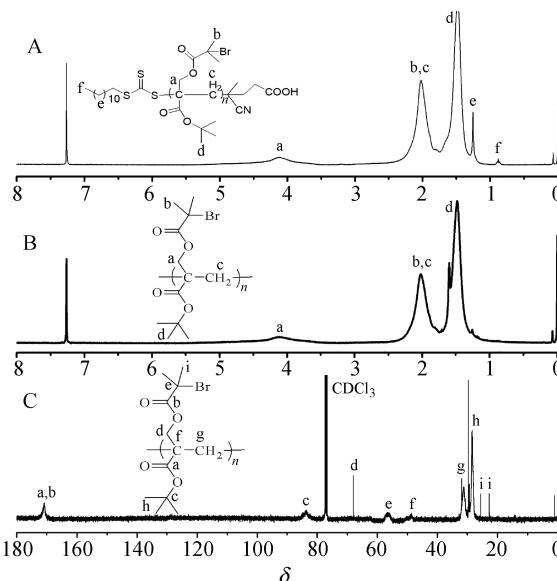
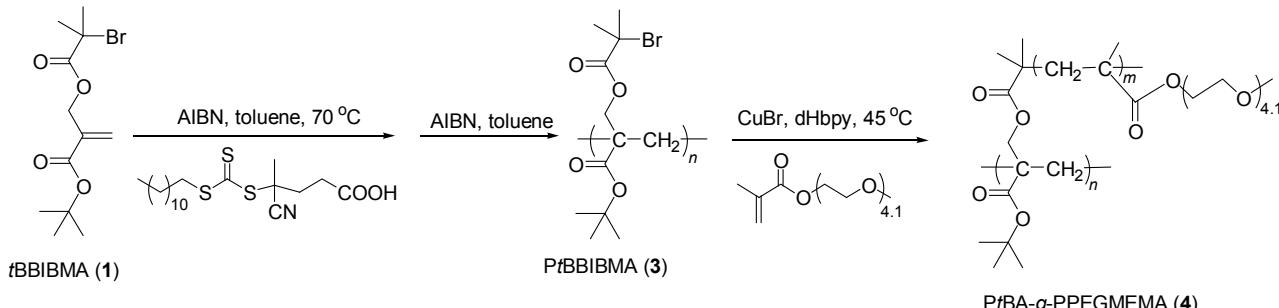


图 1 PtBBIBMA (**2**) 的核磁氢谱(A, CDCl_3)和 **3** 的核磁氢谱(B, CDCl_3)与碳谱(C, CDCl_3)

Figure 1 ^1H NMR (A, CDCl_3) spectrum of PtBBIBMA (**2**) and ^1H NMR (B, CDCl_3) and ^{13}C NMR (C, CDCl_3) spectra of PtBBIBMA (**3**)

酯的双键加生成类似 RAFT 聚合过程中的中间体, 然后 β 位发生自由基均裂, 二硫代的酯基断裂形成小分子链转移剂, 同时高分子链被初始自由基封端. 在所得聚合物的紫外吸收光谱中, 310 nm 处三硫代酯结构的吸收峰消失, 说明聚合物 **2** 中 RAFT 端基被 100% 脱除了, 反应彻底. 在实验过程也发现体系从淡黄色变为无色透明, 后处理得到的聚合物为白色粉末, 同时元素分析的结果证明脱除端基前后的 Br 含量几乎没有发生变化, 说明该自由基脱除端基过程对 ATRP 引发基团没有任何影响. 这样我们得到聚合物 PtBBIBMA (**3**).

聚合物 PtBBIBMA (**3**)通过 GPC, FT-IR, ^1H NMR, ^{13}C NMR 等进行表征. GPC 测得其分子量和分子量分布为: $M_n=8300$, $M_w/M_n=1.15$, 窄分布说明单体 **1** 的聚合过程是活性聚合行为. 在其核磁氢谱(图 1B)中, δ 1.48 和 2.01 处 RAFT 端基中与硫相连的亚甲基($\text{C}_{11}\text{H}_{23}\text{CH}_2-$



Scheme 1 Preparation of PtBA-g-PPEGMEMA (4)

SCSS)在 δ 3.21 处的吸收峰消失了, 其它相应氢的特征峰都出现了, δ 1.48 处的峰对应于叔丁基的特征峰, δ 2.01 处的峰对应于聚合物骨架亚甲基(CH_2CCO_2)和与溴相邻的甲基($(\text{CH}_3)_2\text{CBr}$)的特征峰, δ 4.10 处的峰对应于与酯氧相连的亚甲基(2H, CO_2CH_2)的特征峰。在其 ^{13}C NMR 谱图(图 1C)中, 相应的特征峰都出现了, 具体归属见图中和实验部分, 其中 $\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ 中碳基碳从单体时的 δ 164.1 移至 171.0, 这是由于聚合后双键消失导致的。以上结果表明我们成功制得结构清晰、分子量分布窄的含 ATRP 引发基团的大分子引发剂 PtBBIBMA (3)。

然后, 我们以 PtBBIBMA (3)为大分子引发剂, 以 CuBr/dHbpy 为催化剂, 以 $\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$ 为溶剂, 引发甲基醚聚乙二醇甲基丙烯酸酯(PEGMEMA)聚合, 通过改变聚合时间, 成功得到了一系列具有不同侧链长度的接枝共聚物 PtBA-g-PPEGMEMA (4), 相关数据列在表 1 中。所有接枝聚合物 4 的分子量都远远大于大分子引发剂 3 ($M_n = 8300$) 的分子量, 说明单体 PEGMEMA 在 PtBBIBMA (3)的引发下成功地发生了聚合; 并且, 所有 GPC 曲线都呈对称的窄分布($M_w/M_n < 1.20$), 这是可控活性自由基聚合的特征, 说明聚合过程中的分子间偶合反应甚微, 可以忽略。其结构通过 ^1H NMR 表征, 在图 2 中, δ 0.87, 1.01 和 1.26 对应于 PPEGMEMA 中 CCH_3 的特征峰, δ 3.39 和 3.67 对应于 PPEGMEMA 中 OCH_3 和 OCH_2CH_2 的特征峰, 同时可以看到 PtBA 中 $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ (δ 1.43, 峰 h)等的特征峰。综上所述, 我们成功制备了一系列结构规整的接枝共聚物 PtBA-g-PPEGMEMA (4)。

表 1 PtBA-g-PPEGMEMA (4)接枝共聚物的合成^a

Table 1 Synthesis of PtBA-g-PPEGMEMA (4) graft copolymer^a

Sample	Time/min	$M_n^b/(g \cdot mol^{-1})$	M_w/M_n^b	n_{PEGMEMA}^c
4a	35	43200	1.15	4.36
4b	40	49400	1.19	5.14
4c	50	67800	1.15	7.44
4d	60	108000	1.10	12.05
4e	65	116300	1.15	13.50

^a Initiated by PtBBIBMA (3) macroinitiator ($M_n = 8300$, $M_w/M_n = 1.15$) in THF/EtOH at 45 °C, $V_{\text{PEGMEMA}}/V_{\text{THF}}/V_{\text{EtOH}} = 2.4/1/1$, [PEGMEMA] : [Br group] : [CuBr] : [dHbpy] = 200 : 1 : 1 : 1。^b Measured by GPC in THF at 35 °C。^c The number of PEGMEMA repeating unit per side chain obtained by GPC.

2.2 接枝共聚物 PtBA-g-PPEGMEMA (4)对 DOX 的负载

为了测试接枝共聚物对阿霉素 DOX 包封以及释放的结果, 我们先测定了 DOX 在溶液中的标准曲线。用 DMF 精确配制 1~100 mg/L 的 DOX 溶液, 紫外分光光

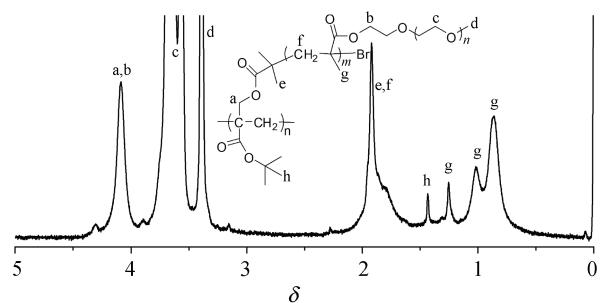


图 2 PtBA-g-PPEGMEMA (4)的核磁氢谱(CDCl_3)

Figure 2 ^1H NMR spectrum of PtBA-g-PPEGMEMA (4) in CDCl_3

度计扫描不同 DOX 浓度的水溶液, 在 480 nm 处测定其吸光度, 将测得的数据绘出吸光度-浓度曲线(图 3), 在 1~100 mg/L 的浓度范围内, DOX 在 480 nm 处的吸光度与浓度成线性关系。按回归法处理得标准曲线方程, 该曲线有高的相关系数($R = 0.99999$)和低的标准偏差($SD = 0.00453$), 说明这是一条有效的吸光度-浓度标准曲线。

$$\text{ABS} = -0.00842 + 0.02219[\text{DOX}]$$

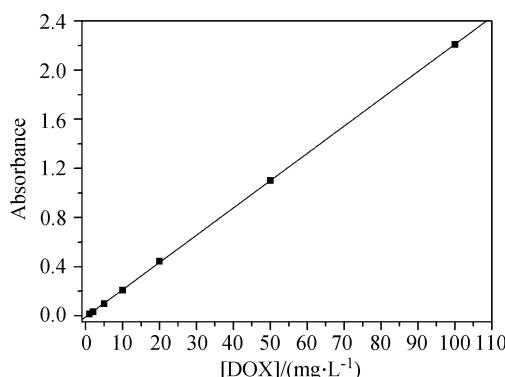


图 3 DOX 在 480 nm 的吸光度-浓度标准曲线

Figure 3 Standard concentration curve of DOX at 480 nm

利用接枝共聚物 4d 对 DOX 进行胶束负载, 制备载药胶束 5。往接枝共聚物的 DMF 溶液中加入盐酸盐阿霉素(DOX·HCl)和三乙胺, 搅拌 2 h 后, 然后透析以除去未包封的药物和其它小分子, 得到的载药胶束溶液经冷冻干燥就能得到 DOX 负载的载药胶束 5。用 DMF 溶解一定量的载药胶束 5, 配制成一定浓度的 DMF 溶液, 测试其在 480 nm 的吸光度, 对照标准曲线计算其浓度, 最后可以算出聚合物胶束的载药量(drug loading content, DLC)和药物的包封率(drug loading efficiency, DLE), 我们计算得到载药胶束 5 的载药量为 30% 和包埋率 70%, 都达到了较高的数值。

用动态光散射测得载药胶束 5 的粒径为 164.8

nm(图 4), 正好处于 50~200 nm 这个范围内, 是一种很适合用于肿瘤治疗的载药胶束. 因为特定尺度(50~200 nm)的纳米粒子对肿瘤组织具有增强渗透和停留效应(EPR, enhanced permeability and retention effect), 能够渗入到肿瘤组织的内部并聚集, 因此可以提高化疗药物的药效, 降低其毒副作用, 从而具有更好的治疗效果.

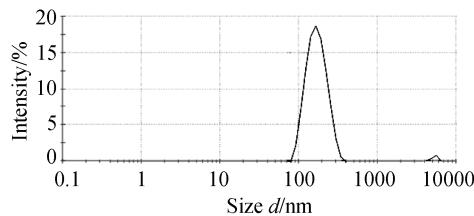


图 4 载药胶束 5 的流体动力学直径

Figure 4 Hydrodynamic diameter distribution of drug carrier 5

2.3 载药胶束 5 的体外释药

药物载体的体外释药曲线一般可分为三个阶段: (1) 突释阶段, 外部环境的突变对药物载体造成冲击, 使药物在很短的时间内快速地释放; (2) 缓释阶段, 此时载体与环境相互平衡, 载体内外有较为稳定的药物浓度差, 药物匀速缓慢地释放; (3) 平衡阶段, 此阶段载体与环境的药物浓度平衡, 药物浓度基本不变, 释药停止.

在模拟肠液/体液(0.2 mol/L 的 pH=7.4 的磷酸缓冲溶液)中进行载药胶束的释放, 以累积释药分数对时间作图得到药物释药曲线. 从图 5 中可以看出, 由 4d 所得的载药胶束 5 存在突释阶段和缓释阶段, 在 9 h 内, 释药量约为 40%, 缓释释药约为 10%, 这说明该药物胶束具有较好的缓释过程.

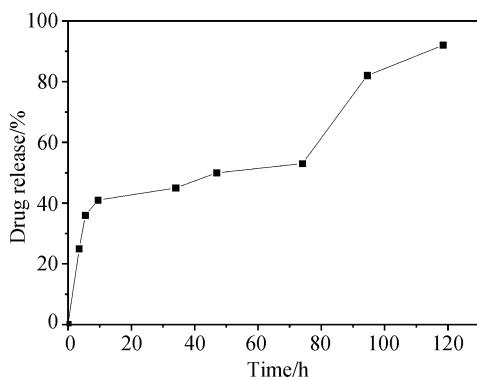


图 5 载药胶束 5 在 pH 7.4 时的体外释放曲线(37 °C)

Figure 5 DOX release profiles *in vitro* of drug carrier 5 under pH 7.4 at 37 °C

对于载药胶束的进一步研究, 包括细胞毒性, 聚合物 PtBA-g-PPEGMEMA 的接枝密度和侧链长度对载药行为的研究, 正在继续, 将在以后的文章中报道.

3 结论

我们采用新的方法制备了两亲性接枝共聚物 PtBA-g-PPEGMEMA, 该方法通过将接枝基团直接引入单体, 单体聚合即可得含接枝点的大分子引发剂, 通过引发接枝得到接枝共聚物, 从而避免了以往通过聚合物修饰来引入接枝点所存在的接枝点密度不高和不可控的局限性. 通过 PtBA-g-PPEGMEMA 对阿霉素的负载, 制得纳米载药体系, 该体系具有缓释特征.

References

- 1 Riess, G. *Colloids Surf., A* **1999**, *153*, 99.
- 2 Rouzes, C.; Durand, A.; Leonard, M.; Dellacherie, E. *J. Colloid Interface Sci.* **2002**, *253*, 217.
- 3 Babadagli, T. *Colloids Surf., A* **2003**, *223*, 157.
- 4 Kataoka, K.; Kwon, G. S.; Yokoyama, M.; Okano, T.; Sakurai, Y. *J. Controlled Release* **1993**, *24*, 119.
- 5 Kwon, G. S.; Okano, T. *Adv. Drug Delivery Rev.* **1996**, *21*, 107.
- 6 Allen, C.; Maysinger, D.; Eisenberg, A. *Colloids Surf., B* **1999**, *16*, 3.
- 7 Lavasanifar, A.; Samuel, J.; Kwon, G. S. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2002**, *54*, 169.
- 8 Nishiyama, N.; Bae, Y.; Miyata, K.; Fukushima, S.; Kataoka, K. *Drug Discov. Today Technol.* **2005**, *2*, 21.
- 9 Nishiyama, N.; Kataoka, K. *Adv. Polym. Sci.* **2006**, *193*, 67.
- 10 Antonietti, M.; Wenz, E.; Bronstein, L.; Seregina, M. *Adv. Mater.* **1995**, *7*, 1000.
- 11 Schrof, W.; Rozouvan, S.; Keuren, E. V.; Horn, D.; Schmitt, J.; Decher, G. *Adv. Mater.* **1998**, *10*, 338.
- 12 Sulman, E.; Bodrova, Y.; Matveeva, V.; Semagina, N.; Cerveny, L.; Kurte, V.; Bronstein, L.; Platonova, O.; Valetsky, P. *Appl. Catal., A* **1999**, *176*, 75.
- 13 Hou, S.; Chan, W. K. *Macromol. Rapid Commun.* **1999**, *20*, 440.
- 14 Kwon, G. S.; Kataoka, K. *Adv. Drug Delivery Rev.* **1995**, *16*, 295.
- 15 Kwon, G. S. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **1998**, *15*, 481.
- 16 Lee, E. S.; Na, K.; Bae, Y. H. *J. Controlled Release* **2003**, *91*, 103.
- 17 Lee, E. S.; Shin, H. J.; Na, K.; Bae, Y. H. *J. Controlled Release* **2003**, *90*, 363.
- 18 Lee, E. S.; Oh, K. T.; Kim, T.; Youn, Y. S.; Bae, Y. H. *J. Controlled Release* **2007**, *123*, 19.
- 19 Wang, C. H.; Wang, C. H.; Hsieue, G. H. *J. Controlled Release* **2005**, *108*, 140.
- 20 Lo, C. L.; Huang, C. K.; Lin, K. M.; Hsieue, G. H. *Biomaterials* **2007**, *28*, 1225.
- 21 Zhang, X. Z.; Lewis, J.; Chu, C. C. *Biomaterials* **2005**, *26*, 3299.

- 22 Kim, H. J.; Jones, M. N. *J. Liposome Res.* **2004**, *14*, 123.
- 23 Huang, X. W.; Gu, L. N.; Lu, G. L.; Huang, X.; Zhang, Y. Q.; Huang, X. Y. *Acta Chim. Sinica* **2008**, *66*, 2653 (in Chinese).
(黄晓炜, 顾丽娜, 陆国林, 黄啸, 张亚琴, 黄晓宇, 化学学报, **2008**, *66*, 2653.)
- 24 Huang, X. W.; Gu, L. N.; Lu, G. L.; Huang, X.; Zhang, Y. Q.; Huang, X. Y. *Acta Chim. Sinica* **2009**, *67*, 1363 (in Chinese).
(黄晓炜, 顾丽娜, 陆国林, 黄啸, 张亚琴, 黄晓宇, 化学学报, **2009**, *67*, 1363.)
- 25 Yokoyama, M.; Satoh, A.; Sakurai, Y. *J. Controlled Release* **1998**, *55*, 219.
- 26 Kwon, G. S.; Kataoka, K. *Adv. Drug Delivery Rev.* **1995**, *16*, 295.
- 27 Kwon, G. S. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **1998**, *15*, 481.
- 28 Teertstra, S. J.; Gauthier, M. *Prog. Polym. Sci.* **2004**, *29*, 277.
- 29 Nilbert, M.; Saeter, G.; Eloman, I. *Acta Oncol.* **1998**, *37*(4), 375.
- 30 Wu, F.; Lin, J. H.; Dai, B. C.; Zhang, W. M. *J. Fujian Med. Univ.* **2003**, *37*, 304 (in Chinese).
(吴芳, 林建华, 戴伯川, 张文明, 福建医科大学学报, **2003**, *37*, 304.)
- 31 Zhang, Y.; Hou, C. L.; Chen, A. M. *Chin. J. Reparative and Reconstructive Surgery* **1998**, *12*, 280 (in Chinese).
(章莹, 侯春林, 陈爱民, 中国修复重建外科杂志, **1998**, *12*, 280.)
- 32 (a) Lu, G. L.; Zhang, S.; Huang, X. Y. *J. Polym. Sci. Polym. Chem.* **2006**, *44*, 5438.
(b) Matyjaszewski, K.; Patten, T. E.; Xia, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 674.
- 33 Moad, G.; Chong, Y. K.; Postma, A.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. *Polymer* **2005**, *46*, 8458.
- 34 Song, X. M.; Zhang, Y. Q.; Yang, D.; Li, Y.; Hu, J. H.; Lu, G. L.; Huang, X. Y. *J. Polym. Sci. Polym. Chem.* **2011**, *49*, 3328.

(A1111252 Cheng, B.)