

新型聚合物聚乙二醇 - 胆酸 (PEG-CA) 自组装 为胶束负载药物的研究*

徐黎强, 周国永, 程 度
(中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275)

摘 要: 设计并合成了一种具有特定结构的新型聚合物: 聚乙二醇 - 胆酸 (PEG-CA), 并分别采用核磁共振、红外光谱等表征手段确定聚合物的结构, 然后通过 Zeta-Plus 电位粒径仪测得其自组装后胶束的粒径大小及分布。最后测定了聚乙二醇 - 胆酸 (PEG-CA) 胶束负载阿霉素 (DOX) 的载药量。实验结果表明聚合物聚乙二醇 - 胆酸 (PEG-CA) 具有作为纳米药物载体的药物输送的潜在应用。

关键词: 聚乙二醇 - 胆酸; 药物输送; 抗癌药物

中图分类号: O632 文献标志码: A 文章编号: 0529 - 6579 (2014) 05 - 0085 - 03

A Novel Polymeric Micelles of Poly (ethylene glycol) -Cholic Acid (PEG-CA) for Anticancer Drug Delivery

XU Liqiang, ZHOU Guoyong, CHENG Du

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: The diblock copolymer of Poly (ethylene glycol) -Cholic acid (PEG-CA) was synthesized and assembled to a novel polymeric micelles for drug delivery. Nuclear magnetic resonance (NMR) and infrared (FTIR) spectroscopy were used to analyze the structure of the polymer. Particle size and distribution of the self-assembled micelles were measured using Zeta-Plus particle size analyzer. The Doxorubicin (DOX) loading capacity of PEG-CA micelles was evaluated and potential ability for drug delivery in future clinical practice.

Key words: poly (ethylene glycol) -cholic acid; drug delivery; anticancer drug

癌症是一种复杂的疾病, 同时也严重威胁着人类的生命。新型高分子纳米药物载体作为与生命科学、生物工程技术交叉发展的重要发展方向并已成为高分子科学研究的热点, 高分子纳米药物载体的组成、结构和性质决定着控制药物释放特性。抗癌药物的毒副作用是制约其应用的重要原因, 通过纳米载体负载抗癌药物, 不仅可以提高药物传输到肿瘤部位的效率, 也会减少其对正常组织器官的副作用。因此, 应用生物相容性好、生物可降解高分子材料开发纳米药物载体, 备受人们关注^[1-4]。

本文设计并合成了具有特定结构的聚合物: 聚乙二醇 - 胆酸 (PEG-CA), 并分别采用核磁共振、

红外光谱等表征手段研究聚合物的结构和粒径大小及分布。实验结果表明聚合物聚乙二醇 - 胆酸 (PEG-CA) 所自组装成的胶束, 可负载抗癌药物阿霉素 (Doxorubicin, DOX)。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

核磁共振波谱仪 Mercury-Plus 300, 美国; 红外光谱分析仪 Nicolet/Nexus 670; Zeta 电位及粒度测定仪 90Plus/BI-MAS, 美国; 紫外可见分光光度计 PE/Lambda 750, PerkinElmer Ltd., United Kingdom。

* 收稿日期: 2014 - 05 - 16

基金项目: 国家自然科学基金面上资助项目 (21174166)

作者简介: 徐黎强 (1990 年生), 男; 研究方向: 智能控释多功能载体及其用于传输药物和诊断探针的研究;

通讯作者: 程 度; E-mail: chengdu@mail.sysu.edu.cn

聚乙二醇 (PEG-OH, $M_n = 2\ 000$), 二甲基甲酰胺 (DMF), *N*-羟基琥珀酰亚胺 (NHS), 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC·HCl), 对甲苯磺酰氯 (TsCl) 二甲基亚砜 (DMSO), 二氯甲烷, 三氯甲烷, 吡啶, 无水乙醚, 盐酸等试剂均为分析纯; 胆酸 ($\varphi = 98\%$), 氨水 ($\varphi = 25\%$)。

1.2 聚乙二醇氨基 (PEG-NH₂) 的合成

据文献 [5-6] 报道的方法, 合成 PEG-NH₂, 称取聚乙二醇 ($M_n = 2\ 000$, 20 g) 于干燥的三口瓶中 (250 mL), 70 °C 抽真空干燥 4 h, 然后加入新蒸的二氯甲烷 (100 mL)、吡啶 (50 mL) 和对甲苯磺酰氯 (TsCl, 5 g), 室温下避光反应 24 h。反应液用 HCl (3 mol·L⁻¹) 萃取洗涤, 有机层用 NaHCO₃ (5 g) 洗涤, 将溶液慢慢滴加到大量无水乙醚中, 真空干燥得白色粉末 PEG_{2k}-OTS。

将上述白色粉末 (10 g) 与浓氨水 (500 mL, $\varphi = 25\%$) 置于 1000 mL 容器中, 室温下反应 5 天。用同体积的 CH₂Cl₂ 萃取后将其与同体积 NaOH 溶液 (1 mol·L⁻¹) 充分混合搅拌 2 h, 将有机层用水洗至中性, 真空干燥得 PEG_{2k}-NH₂。通过核磁计算出氨基转换率为 80%。

1.3 聚乙二醇-胆酸 (PEG-CA) 的合成

称取胆酸 (0.20 g), EDC (0.14 g) 和 NHS (0.085 g) 于反应瓶 (50 mL) 中, 加 DMF/HCCl₃ ($V(\text{DMF}):V(\text{HCCl}_3) = 1:1, 10\ \text{mL}$) 溶解后, 搅拌 30 min, 加 PEG-NH₂ (3.00 g), 室温反应 48 h。将溶液沉淀到无水乙醚中, 过滤, 水洗, 真空干燥得到 PEG-CA。

1.4 负载阿霉素 (DOX) 的聚乙二醇-胆酸 (PEG-CA) 胶束的制备

取 60 mg PEG-CA, 6 mg DOX 以 1 mL 的四氢呋喃溶解, 超声下逐滴加入至 20 mL 超纯水中, 将胶束透析 2 d, 除去游离的 DOX。

1.5 阿霉素 (DOX) 载药量的测定

阿霉素载药量定义为胶束中阿霉素的质量百分比, 用 PE-Lambda 750 紫外可见分光光度计检测。首先, 将负载阿霉素的 PEG-CA 胶束溶液冻干, 称取一定质量溶于氯仿和二甲基亚砜 (DMSO) ($V(\text{HCCl}_3):V(\text{DMSO}) = 1:1$) 中, 检测 480 nm 处阿霉素的吸光度。配制一系列浓度的阿霉素氯仿/二甲基亚砜溶液, 检测 480 nm 处的吸光度, 用浓度和吸光度作出阿霉素吸光度的标准曲线, 根据这条标准曲线算出负载阿霉素的 PEG-CA 胶束中阿霉素

的载药量。

2 表征与分析

2.1 核磁共振波谱

本文合成了 PEG-CA 聚合物。简要地说, 先将 PEG 末端羟基通过对甲苯磺酰氯活化再和氨水反应将羟基转变成氨基, 然后由酰胺化反应将胆酸连接到 PEG-NH₂ 末端得到 PEG-CA。

PEG-CA 的核磁共振波谱图如图 1 所示, 该化合物中 H 的化学位移如下: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 0.6 (CH₃— of Cholic acid), 0.8 ~ 1.9 (Cholic acid), 2.6 ~ 2.95 (—NH(—CO—)CH—CH₂—COO—), 3.35 (CH₃— OCH₂CH₂—), 3.65 (—CH₂CH₂O—), PEG 上的甲基氢在 3.35 (CH₃— OCH₂CH₂—) 与水峰重叠, PEG 重复单元上的亚甲基氢在 3.62 (—OCH₂CH₂—); 各化学位移与文献 [7] 中报道吻合, 同时在 δ 0.6 ~ 1.7 间出现了胆酸环上甲基亚甲基等特征峰表明成功合成了 PEG-CA。

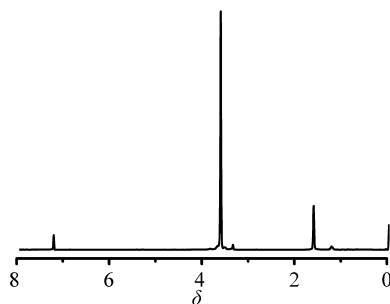


图 1 PEG-CA 的核磁共振波谱图

Fig. 1 ¹H NMR spectra of PEG-CA

2.2 红外光谱

PEG-CA 的红外光谱图如图 2 所示。

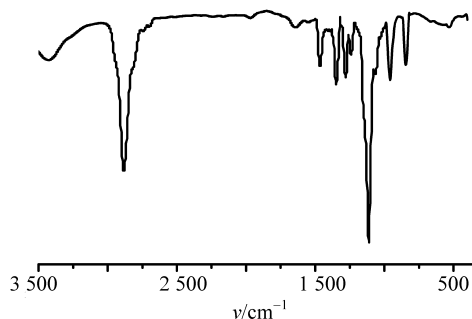


图 2 PEG-CA 红外光谱图

Fig. 2 FTIR spectra of PEG-CA

通过分析图 2 可以得出如下结构信息: $1\ 111.96\ \text{cm}^{-1}$, C—O 伸缩振动峰; $1\ 267.34\ \text{cm}^{-1}$ 为—C—N 伸缩振动—N—H 弯曲振动峰; $1\ 345.4\ \text{cm}^{-1}$ 为—CH₃ 的弯曲振动峰; $1\ 466.78\ \text{cm}^{-1}$ 为酰胺键中羰基的伸缩振动峰; $2\ 885.29\ \text{cm}^{-1}$ 为—CH₂—H 伸缩振动峰; $3\ 404.76\ \text{cm}^{-1}$ 是 N—H 的伸缩振动峰; 以上信息也佐证了 PEG-CA 的成功合成^[8-9]。

2.3 PEG-CA 胶束的粒径

用 Zeta-Plus 电位粒径仪 (Brooken Haven) 测量 PEG-CA 胶束的粒径, 入射激光波长 $\lambda = 532\ \text{nm}$, 入射角 $\theta = 90^\circ$, 温度为 $25\ ^\circ\text{C}$; 取 3 次测量值的平均值, 得到 PEG-CA 胶束的粒径分布图如图 3 所示。由图 3 可以看出 PEG-CA 自组装后形成的胶束的粒径主要分布在 $220\ \text{nm}$ 左右。

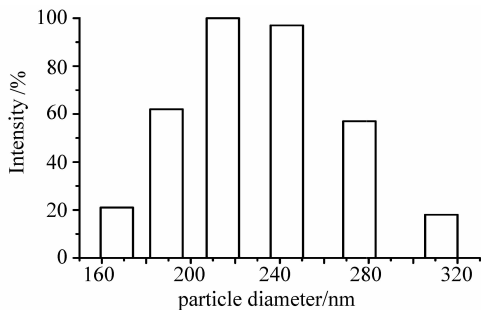


图 3 PEG-CA 粒径分布图

Fig. 3 The diameter distribution of the PEG-CA nanoparticle

2.4 聚合物 PEG-CA 胶束负载阿霉素 (DOX) 的载药量

胶束载药量是聚合物胶束药物载体的一个重要参数, 定义为胶束中药物的质量百分比。本文中

$$\text{DOX 载药量} = \frac{m(\text{DOX})}{m(\text{DOX}) + m(\text{PEG-CA 胶束})}$$

计算得载药量为 1.24% 。结果表明聚合物 PEG-CA 胶束具有负载药物阿霉素 (DOX) 的功能。

3 结论

本文研究了一种可作为纳米药物载体的聚合物聚乙二醇-胆酸 (PEG-CA) 的合成方法, 并对其

进行了必要的表征。然后对聚乙二醇-胆酸进行自组装并形成胶束, 最后进行阿霉素 (DOX) 载药量的测定, 研究结果表明, 聚合物 PEG-CA 胶束具有载药功能, 在药物输送方面具有潜在应用。

参考文献:

- [1] DAI J, LIN S D, CHENG D, et al. Interlayer-crosslinked micelle with partially hydrated core showing Reduction and pH dual sensitivity for pin pointed intracellular drug release[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2011, 50: 9404 - 9408.
- [2] 代元坤, 贺继东, 张鑫, 等. 聚合物基抗癌药物载体的研究进展[J]. *高分子通报*, 2013, 26(5): 34 - 30.
- [3] 刘娱娜, 高署, 柯学, 等. 难溶性药物固体分散体研究新进展[J]. *药学进展*, 2013, 37(4): 167 - 173.
- [4] 姜虎林. 生物相容性高分子基因载体的研究进展[J]. 2013, 44(5): 476 - 481.
- [5] MA N, LI Y, XU H P, et al. Dual redox responsive assemblies formed from diselenide block copolymers[J]. *Am Chem Soc*, 2010, 132: 442 - 443.
- [6] NEAL J C, STOLNIK S, SCHACHT E, et al. *In vitro* displacement by rat serum of adsorbed radiolabeled poloxamer and poloxamine copolymers from model and biodegradable nanospheres [J]. *Pharm Sci*, 1998, 87: 1242 - 1248.
- [7] KOIDE A, KISHIMURA A, OSADA K, et al. Semipermeable polymer vesicle (PICsome) self-assembled in aqueous medium from a pair of oppositely charged block copolymers: physiologically stable micro-/nano containers of water-soluble macromolecules [J]. *Am Chem Soc*, 2006, 128: 5988 - 5989.
- [8] 王伟伟. 基于功能高分子的多功能纳米载体在纳米医学中的研究[D]. 广州: 中山大学. 2011.
- [9] LI C C, WANG G J, GAO H Y, et al. Temperature-, pH-, and ion- stimulus-responsive swelling behaviors of poly (dimethyl aminoethyl methacrylate) gel containing cholic acid [J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 2014, 131(6): DOI: 10.1002/app.39998 10.1002.