

巯基-烯点击化学法制备还原响应两亲性聚合物*

卢彦兵[†], 谢元彬, 夏迎春

(湖南大学 化学化工学院, 湖南 长沙, 410082)

摘要:以胱胺二盐酸盐、氯甲酸烯丙酯、1,6-己二硫醇及端巯基聚乙二醇单甲醚等为原料,通过巯基-烯点击化学反应,合成了疏水段含二硫键的两亲性三嵌段共聚物 mPEG-*b*-P1-*b*-mPEG.对 mPEG-*b*-P1-*b*-mPEG 在水溶液中的自组装行为进行了深入的研究.结果表明, mPEG-*b*-P1-*b*-mPEG 的临界胶束浓度为 0.032 mg/mL,形成胶束的平均粒径为 61.3 nm.包载模拟药物尼罗红的释放行为研究表明,在 D,L-二硫苏糖醇(DTT)存在的条件下,包裹在胶束中的尼罗红可以被释放出来,显示出快速的还原响应性能,表明合成的两亲性三嵌段共聚物 mPEG-*b*-P1-*b*-mPEG 有望作为疏水性药物载体,应用于药物控释领域.

关键词:两亲性聚合物;巯基-烯点击化学;还原响应性;胶束;药物控释

中图分类号:O633.3

文献标志码:A

Synthesis of Reduction-responsive Amphiphilic Copolymer by Thiolene Click Chemistry

LU Yanbing[†], XIE Yuanbin, XIA Yingchun

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan University, Changsha 410082, China)

Abstract: Amphiphilic triblock copolymer mPEG-*b*-P1-*b*-mPEG, with disulfide bond in the main chain of the hydrophobic block, was prepared from cystamine dihydrochloride, allyl chloroformate, 1,6-hexanedithiol and monomethoxy poly(ethylene glycol) with a thiol end group through thiolene click chemistry method. Self-assembly of the obtained mPEG-*b*-P1-*b*-mPEG was further investigated. The results showed that the critical micelle concentration of the amphiphilic block polymer was 0.032 mg/mL, and the average diameter of the micelle was about 61.3 nm. The loaded model drug Nile Red could be released from the micelles in the presence of DTT, indicating the reduction responsiveness of the obtained amphiphilic copolymer. Therefore, these findings suggested the potentials of the amphiphilic copolymers as smart intracellular drug delivery systems.

Key words: amphiphilic polymer; thiol-ene click chemistry; reduction responsiveness; micelle; controlled drug delivery

作为环境响应聚合物的一种,分子结构内含二硫键的还原响应聚合物引起了人们的关注.二硫键具有在体内血液循环过程中可以长期稳定存在,但

是在存在还原剂的条件下会发生断裂.癌细胞与正常细胞相比含有大量的谷胱甘肽(GSH),作为一种还原剂,它在癌细胞中的量足可以将二硫键还原.根

* 收稿日期:2016-05-17

作者简介:卢彦兵(1976—),男,河南鄢陵人,湖南大学副教授,博士生导师

[†] 通讯联系人, E-mail: yanbinglu@hnu.edu.cn.

据这一特性,设计研发了大量具有二硫键的还原响应性聚合物胶束^[1-3]. Tang 等^[4]合成了一种以聚磷酸酯作为亲水链段、聚己内酯作为疏水链段,中间用二硫键连接的两亲性聚合物聚己内酯-聚磷酸酯(PCL-SS-PEEP).在体外药物释放的检测中发现包载有阿霉素(DOX)的这种胶束,在 10 mM GSH 存在下,100 h 内 DOX 基本全部释放完毕,而在没有 GSH 存在条件下,载药胶束在 100 h 内只释放出约 40% 的 DOX 药物. Wei 等^[5]通过可逆加成断裂链转移聚合(RAFT)合成了聚乙二醇-*b*-聚(N-羟丙基甲基丙烯酰胺)-硫辛酸(PEG-*b*-PHPMA-LA).两亲性聚合物 PEG-*b*-PHPMA-LA 可以在催化剂 DTT

(D,L-二硫苏糖醇)的作用下,发生核交联,使得形成的胶束变得更加稳定.在没有 DTT 的作用下,经过 24 h 后,没有交联的胶束的 DOX 释放量达到 85%,而交联后的胶束的 DOX 释放量只有 20% 左右.当 DTT 的浓度为 10 mM 时,经过 24 h 后,交联后的胶束的 DOX 释放量达到 90%. Liu 等^[6]以二硫二吡啶和 1,6-己二硫醇为原料,通过缩聚反应,制备了端基为二硫吡啶、主链中含二硫键的聚合物,进而通过选择性巯基-二硫键交换反应,合成了 ABA 型两亲型三嵌段聚合物,对其还原响应性能进行了深入的研究,合成路线见图 1.

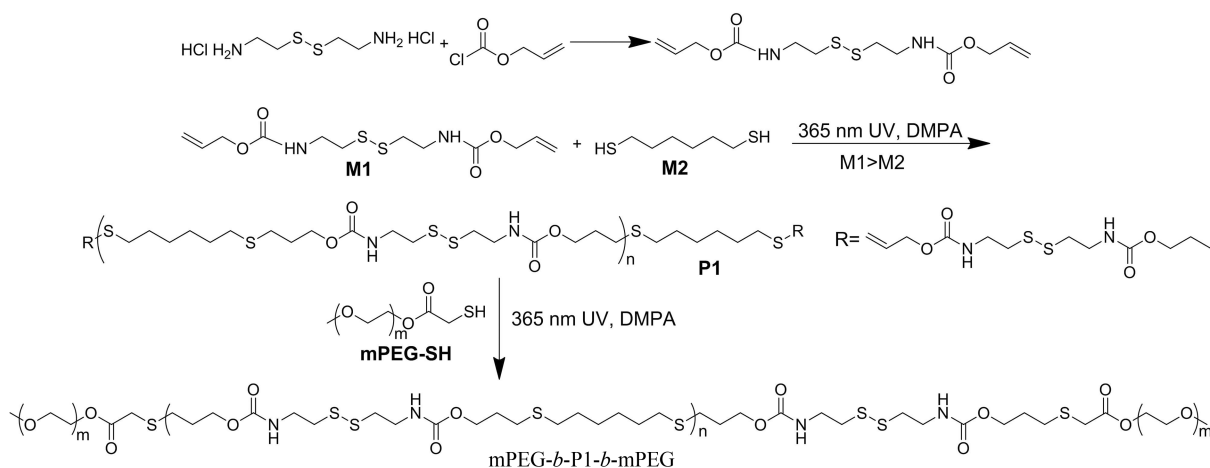


图 1 疏水聚合物 P1 及两亲性三嵌段聚合物 mPEG-*b*-P1-*b*-mPEG 的合成路线图

Fig.1 Synthesis of hydrophobic polymer P1 and amphiphilic triblock polymer mPEG-*b*-P1-*b*-mPEG

本文以胱胺二盐酸盐、氯甲酸烯丙酯、1,6-己二硫醇及端巯基聚乙二醇单甲醚等为原料,通过连续的巯基-烯点击化学,将二硫键引入聚合物疏水链段,制备具有还原响应性的两亲性聚合物,对其自组装行为及聚合物胶束的还原响应性能进行深入的探索.

1 实验部分

1.1 实验原料

胱胺二盐酸盐(97%)、氯甲酸烯丙酯(分析纯)、安息香二甲醚(分析纯)、D,L-二硫苏糖醇(分析纯)及 1,6-己二硫醇(98%)购自上海安耐吉试剂有限公司;端巯基聚乙二醇单甲醚(自制^[7],聚乙二醇单甲醚数均分子量 2000);其它溶剂均为化学纯.

1.2 实验方法

1.2.1 含二硫键的二烯丙基单体 M1 的制备

称取 4.50 g(0.02 mol)胱胺二盐酸盐溶解于 80

mL H₂O/1,4-二氧六环混合溶剂(体积比为 1:1)中;加入 13.44 g(0.16 mol)碳酸氢钠,0 °C 条件下搅拌至不再有气泡生成.用恒压滴液漏斗逐滴滴加 6.03 g(0.05 mol)氯甲酸烯丙酯,室温下反应 24 h 之后停止反应.向溶液中加入 100 mL 饱和食盐水,用 100 mL 二氯甲烷萃取四次;萃取液经无水硫酸钠干燥后旋蒸得到无色油状物质,柱分离(二氯甲烷为洗脱剂)后得白色晶体含二硫键的二烯丙基单体 M1,产率为 54%.¹H NMR(400 MHz, CDCl₃, TMS); δ (ppm): 2.75 (t, 4H), 3.45 (m, 4H), 4.5 (d, 4H), 5.15 (d, 2H), 5.25 (d, 4H), 5.86 (m, 2H).

1.2.2 端基为烯丙基的疏水聚合物 P1 的制备

称取合成的含二硫键的二烯丙基单体 M1 0.40 g(1.25 mM)溶解于 1 mL N,N-二甲基酰胺(DMF)中,加入 15 mg(0.058 mM)安息香二甲醚(DMPA)及 0.156 g(1.04 mM)1,6-己二硫醇后,室温下 365 nm 紫外光照 2 h,生成白色沉淀,停止反应.白色沉淀离心后,加入 2 mL 三氯甲烷将其完全溶解,再加

入冰乙醚,析出白色絮状物,离心后得到棕黄色油状物质,甲醇洗涤三次后真空干燥得棕黄色的端基为烯丙基的疏水聚合物 P1,产率为 78%。

1.2.3 两亲性三嵌段聚合物 mPEG-*b*-P1-*b*-mPEG 的制备

称取合成的疏水段聚合物 P1 0.1 g (0.018 mM)溶解于 1 mL 三氯甲烷溶液中,加入 0.12 g (0.

056 mM)端巯基聚乙二醇单甲醚 (mPEG-SH) 和 15 mg (0.058 mM) DMPA,室温下 365 nm 紫外光照 0.5 h.将溶液用去离子水透析 24 h (选择截止分子量为 3500 Da 的透析袋,隔 12 h 换一次去离子水)除去三氯甲烷.得到的白色固体真空干燥后得到两亲性三嵌段聚合物 mPEG-*b*-P1-*b*-mPEG 148 mg,收率为 83%。

表 1 疏水性聚合物 P1 和两亲性三嵌段聚合物 mPEG-*b*-P1-*b*-mPEG 的合成

Tab.1 Synthesis of hydrophobic polymer P1 and amphiphilic triblock copolymer mPEG-*b*-P1-*b*-mPEG

Entry	M1 : M2 ratio	Yield / %	M_w/M_n^a	$M_{n,GPC}^a / (\text{kDa})$	$M_{n,NMR}^b / (\text{kDa})$
P1a	1.2 : 1	78	1.74	4.8	4.1
P1b	1.15 : 1	73	1.71	6.5	7.7
P1c	1.1 : 1	75	2.45	8.0	9.7
mPEG- <i>b</i> -P1a- <i>b</i> -mPEG	—	83	2.09	5.8	8.4
mPEG- <i>b</i> -P1b- <i>b</i> -mPEG	—	85	2.2	7.7	11.7
mPEG- <i>b</i> -P1c- <i>b</i> -mPEG	—	81	2.44	11.1	14.0

^a聚合物的数均分子量(M_n , GPC)和分散性系数(M_w/M_n)由 GPC 测定.^b数均分子量(M_n , NMR)由 ¹H NMR 测定.

1.2.4 聚合物胶束的制备

称取 5 mg mPEG-*b*-P1-*b*-mPEG 溶解于 1 mL DMF 中,快速搅拌下缓慢滴加 10 mL 去离子水,继续搅拌 2 h.将溶液用去离子水透析 24 h (选择截止分子量为 3500 Da 的透析袋,隔 12 h 换一次去离子水)除去 DMF 溶剂.用去离子水将聚合物溶液定容至 25 mL,得到浓度为 0.2 mg/mL 的聚合物胶束.

1.2.5 聚合物临界胶束浓度的测定

以疏水性尼罗红为探针,采用荧光光谱法测定聚合物临界胶束浓度.取 30 μ L 浓度为 0.1 mg/mL 的尼罗红四氢呋喃溶液,用微量注射器注入小玻璃瓶.在蒸干四氢呋喃后,加入 4 mL 的胶束溶液,胶束溶液的浓度从 0.2 到 2×10^{-4} mg/mL 不等.然后继续搅拌溶液 12 h 进行荧光测试.测试激发波长为 550 nm,发射光谱扫描范围为 560 nm 到 750 nm.

1.2.6 聚合物胶束还原响应性能测试

在尼罗红浓度为 1.5×10^{-3} mg/mL 的条件下,分别测试在含和不含 10 mM DTT 时 mPEG-*b*-P1-*b*-mPEG 胶束(0.2 mg/mL)的荧光发射光谱的变化

1.3 表征与测试

单体及聚合物的 ¹H NMR 核磁共振谱由 INOVA-400 核磁共振仪测得,以 TMS 为内标.嵌段共聚物的凝胶渗透色谱由 Waters 1515 凝胶渗透色谱仪在 THF 溶液中测得,使用标准聚苯乙烯为参照.荧光光谱由 HITACHI F-4600 荧光分光光度计在激发和发射狭缝宽度均为 5.0 nm 的条件下测得.透射电镜图由 Tecnai G2 F20 S-twin 透射电子显微镜在 80 kV 的条件下测得.动态光散射测试使用了 Nano-ZS9 电动电位和粒子分析仪.

2 结果与讨论

2.1 两亲性三嵌段聚合物 mPEG-*b*-P1-*b*-mPEG 的合成与表征

以胱胺二盐酸盐、氯甲酸烯丙酯为原料,合成了分子结构中含二硫键的二烯丙基单体 M1,进而与 1,6-己二硫醇在 365 nm 紫外光照下,利用巯基-烯点击化学反应,制备端基为烯丙基结构的疏水性聚合物,结果见表 1.当两种单体物质的量比为 1.2 : 1 时,通过核磁共振谱图积分面积计算得到的聚合物分子量为 4.1 kDa,GPC 测试结果表明聚合物的分子量呈单峰状.同样,利用巯基-烯点击化学反应,合成的端基为烯丙基的疏水聚合物 P1 与端巯基聚乙二醇单甲醚进行反应,制备疏水段含二硫键的两亲性三嵌段聚合物,其核磁共振谱图见图 2.由 mPEG-*b*-P1a-*b*-mPEG 的 ¹H NMR 可以看出,单体 M1 及疏水聚合物 P1 在 5~6 ppm 之间的对应于双键的质子峰消失,且在 3~3.5 ppm 附近出现 mPEG 的吸收峰,表明嵌段聚合物已经成功制备.

2.2 两亲性聚合物的自组装

两亲性聚合物可以在选择性溶剂中自组装形成聚合物胶束或者囊泡等组装体.通过溶剂交换法制备了 mPEG-*b*-P1-*b*-mPEG 聚合物胶束,并对其自组装进行了深入的研究.

从图 3 中可以看出,当聚合物浓度低于一定值时,尼罗红的荧光强度基本保持不变,这说明此时的聚合物浓度低于聚合物的临界胶束浓度,没有形成聚合物胶束,但是当胶束浓度超过时,荧光强度

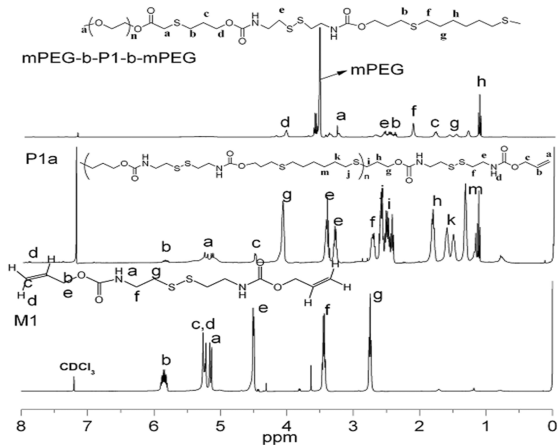


图 2 单体及聚合物的¹H NMR 谱图

Fig.2 ¹H NMR spectra of the monomer and polymers

则快速增加,这表明聚合物溶液浓度达到了聚合物的临界胶束浓度,尼罗红被包裹在了胶束的疏水区域内.图 3(b)中,交点所对应的胶束浓度就是两性性三嵌段共聚物 mPEG-*b*-P1-*b*-mPEG 的临界胶束浓度,为 0.032 mg/mL.

采用 TEM 和 DLS 对两性性三嵌段共聚物 mPEG-*b*-P1-*b*-mPEG 胶束的形貌以及平均粒径进行了测试. TEM 测试结果显示,聚合物胶束为球形,平均粒径为 50 nm 左右.而 DLS 测试聚合物胶束的平均粒径是在 61.3 nm,胶束粒径分布较窄, PDI 为 0.216.两种测试中胶束平均粒径的差异主要是由于 TEM 测试制样过程中,胶束外壳 PEG 在干燥时失水收缩,导致胶束的平均粒径小于在其水溶液中的平均粒径^[8~10].

2.3 聚合物胶束的还原响应性研究

由于疏水链段主链结构中含可被还原而断裂的二硫键,利用 DLS 对两性性 mPEG-*b*-P1a-*b*-mPEG 胶束在加入还原剂 DTT 后的粒径变化进行了测试,结果见图 3(d).由图 3(d)可以看出,在加入 DTT 后,聚合物胶束的粒径迅速变小,2 h 和 5 h 时聚合物胶束的平均粒径分别减小为 31.1 nm 和 21.5 nm.这主要是由于 DTT 存在时,聚合物主链的二硫键被还原而发生断裂,使得聚合物胶束结构被破坏.

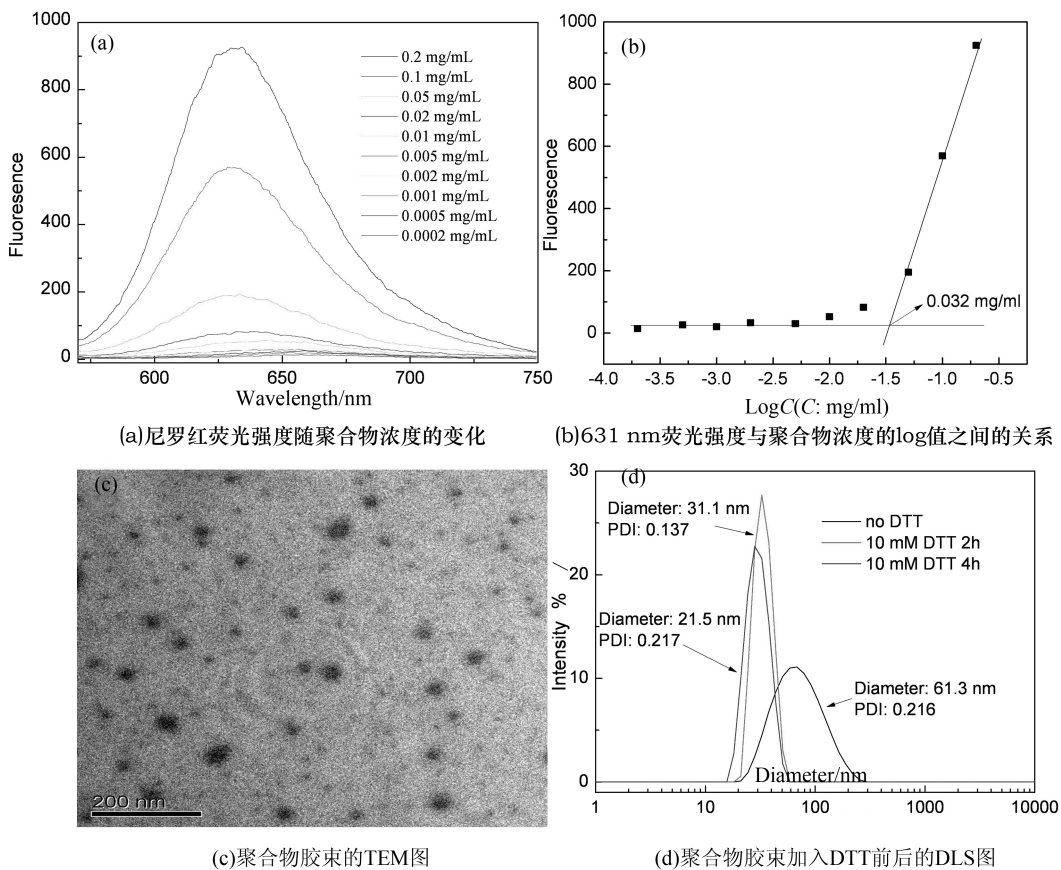


图 3 两性性三嵌段聚合物 mPEG-*b*-P1a-*b*-mPEG 聚合物胶束的表征

Fig.3 Characterization of the amphiphilic triblock polymer mPEG-*b*-P1a-*b*-mPEG micelles

为进一步考察 mPEG-*b*-P1a-*b*-mPEG 聚合物胶束的还原响应性能及其在药物控释领域的应用可能性,对包载模拟药物尼罗红分子的聚合物胶束在 DTT 存在下的释放行为进行了研究.如图 4 所示,无 DTT 存在时,尼罗红的荧光强度缓慢下降.而 DTT 存在时,由于疏水链段主链中的二硫键断裂,聚合物胶束被破坏,尼罗红分子被释放进入水溶液中,荧光强度迅速下降,12 h 时荧光强度减小 40% 左右,48 h 时荧光强度保持在 20% 左右.结果表明,所合成的两亲性三嵌段共聚物 mPEG-*b*-P1a-*b*-mPEG 胶束具有良好的还原响应性能,可在还原剂存在时快速释放所包载的疏水性药物.

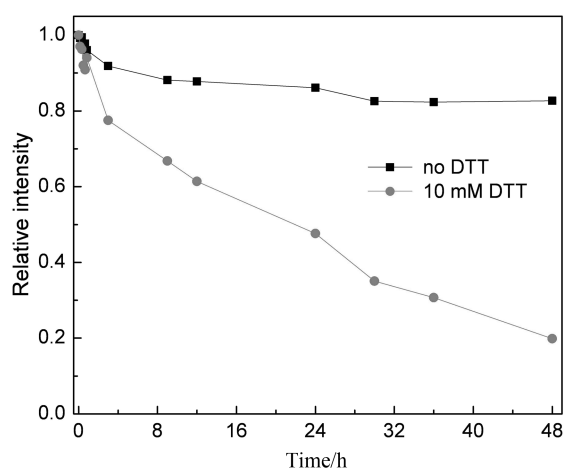


图 4 DTT 存在或不存在时尼罗红的还原响应释放行为
Fig.4 Reduction-triggered Nile Red release profiles in aqueous solution with and without DTT.

3 结 论

利用巯基-烯点击化学反应制备了具有还原响应的两亲性三嵌段共聚物 mPEG-*b*-P1-*b*-mPEG,对其结构、自组装行为以及还原响应性能进行了深入的研究.结果表明,mPEG-*b*-P1-*b*-mPEG 具有较低的临界胶束浓度,在水中自组装形成的球形胶束的平均粒径为 61.3 nm.在 DTT 存在的条件下,包载在胶束中的尼罗红可以被快速释放,48 h 时释放率可达 80%.这类具有还原响应的聚合物胶束有望用作聚合物药物载体,有效地运输和释放疏水性药物.

参考文献

- [1] RYU J H, ROY R, VENTURA J, *et al.* Redox-sensitive disassembly of amphiphilic copolymer based micelles [J]. *Langmuir*, 2010, 26(10): 7086–7092.
- [2] KOO A N, LEE H J, KIM S E, *et al.* Disulfide-cross-linked peg-poly(amino acid)s copolymer micelles for glutathione-mediated intracellular drug delivery [J]. *Chemical Communications*, 2008, 48(1): 6570–6572.
- [3] SUN H, GUO B, LI X, *et al.* Shell-sheddable micelles based on dextran-ss-poly(ϵ -caprolactone) diblock copolymer for efficient intracellular release of doxorubicin [J]. *Biomacromolecules*, 2010, 11(4): 848–854.
- [4] TANG L Y, WANG Y C, LI Y, *et al.* Shell-detachable micelles based on disulfide-linked block copolymer as potential carrier for intracellular drug delivery [J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2009, 20(6): 1095–1099.
- [5] WEI R, CHENG L, ZHENG M, *et al.* Reduction-responsive disassemblable core-cross-linked micelles based on poly(ethylene glycol)-*b*-poly(*n*-2-hydroxypropyl methacrylamide)-lipoic acid conjugates for triggered intracellular anticancer drug release [J]. *Biomacromolecules*, 2012, 13(8): 1525–7797.
- [6] LIU X Y, HE J W, HU D, *et al.* Facile synthesis of a reduction-responsive amphiphilic triblock polymer via a selective thiol-disulfide exchange reaction [J]. *RSC Advances*, 2014, 4(90): 48897–48900.
- [7] LIU X Y, HE J W, NIU Y L, *et al.* Photo-responsive amphiphilic poly(α -hydroxy acids) with pendent *o*-nitrobenzyl ester constructed via CuAAC reaction [J]. *Polymers for Advanced Technologies*, 2015, 26(5): 449–456.
- [8] HU D, LI Y F, NIU Y L, *et al.* Photo-responsive reversible micelles based on azobenzene-modified poly(carbonate)s via azide-alkyne click chemistry [J]. *RSC Advances*, 2014, 4(89): 47929–47936.
- [9] LI Y F, NIU Y L, HU D, *et al.* Preparation of Light-responsive polyester micelles via ring-opening polymerization of *O*-carboxyanhydride and azide-alkyne click chemistry [J]. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 2015, 216(1): 77–84.
- [10] HU D, PENG H, NIU Y L, *et al.* Reversibly light-responsive biodegradable poly(carbonate)s micelles constructed via CuAAC reaction [J]. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, 2015, 53(6): 750–760.