

医药与日化原料

pH 响应改性木质素纳米粒子的制备及释药性能

聂少飞¹, 王闻达¹, 郭博森¹, 祁颢卓¹, 魏浩宇¹, 罗卫华^{1,2,3*}

(1. 中南林业科技大学 材料科学与工程学院, 湖南 长沙 410004; 2. 中南林业科技大学 材料表界面科学与技术湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410004; 3. 中南林业科技大学 湖南省木本生物质转化工程技术研究中心, 湖南 长沙 410004)

摘要: 以酶解木质素 (EHL) 和 *N*-乙烯基吡咯烷酮 (NVP) 为主要原料, 通过自由基聚合制备了共聚物马来酰化木质素-*g*-聚乙烯吡咯烷酮 (MEHL-*g*-PVP), 随后将共聚物自组装得到了直径约为 40 nm 的 pH 响应性纳米粒子。考察了化学修饰、聚合物浓度、水滴加速度、搅拌速度、水含量和投药量对纳米粒子形貌、尺寸和载药性能的影响。结果表明, 当聚合物初始质量浓度为 1.0 g/L、搅拌转速为 600 r/min、去离子水滴加速度为 60 mL/min、水含量为 80%, 纳米粒子与布洛芬 (IBU) 的质量比为 10 : 3 时, 纳米粒子的最大载药量可达 35.29%±2.3%, 包封率为 68.17%±1.9%。体外药物释放实验结果表明, MEHL-*g*-PVP 具有明显的 pH 响应能力, 在模拟人体内肠道环境和胃液中, IBU 的 72 h 累积释放量分别为 63.75% 和 11.10%。体外细胞毒性实验结果表明, MEHL-*g*-PVP 载药纳米粒子对正常细胞无细胞毒性, 而对结肠癌细胞具有很好的抑制作用。

关键词: 木质素; *N*-乙烯基吡咯烷酮; 响应释放; 载药量; 医药原料

中图分类号: TQ469

文献标识码: A

文章编号: 1003-5214 (2022) 04-0761-08

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



Preparation and drug release properties of pH-responsive modified lignin nanoparticles

NIE Shaofei¹, WANG Wenda¹, GUO Bosen¹, QI Haozhuo¹, WEI Haoyu¹, LUO Weihua^{1,2,3*}

(1. School of Materials Science and Engineering, Central South University of Forestry & Technology, Changsha 410004, Hunan, China; 2. Hunan Province Key Laboratory of Materials Surface & Interface Science and Technology, Central South University of Forestry & Technology, Changsha 410004, Hunan, China; 3. Hunan Engineering Research Center of Woody Biomass Conversion, Central South University of Forestry & Technology, Changsha 410004, Hunan, China)

Abstract: Copolymer maleylated lignin-*g*-polyvinylpyrrolidone (MEHL-*g*-PVP) was prepared by free-radical polymerization using enzymatically hydrolyzed lignin (EHL) and *N*-vinylpyrrolidone (NVP) as main raw materials. And then the copolymer was self-assembled to obtain pH-responsive nanoparticles with a diameter of about 40 nm. The effects of chemical modification, polymer concentration, addition rate of water, stirring speed, water content and drug dosage on morphology, size and drug-carrying properties of nanoparticles were investigated. The results showed that when the initial mass concentration of polymer was 1.0 g/L, stirring speed was 600 r/min, addition rate of deionized water was 60 mL/min and water content was 80%, the mass ratio of nanoparticles and ibuprofen (IBU) was 10 : 3, the maximum drug loading and encapsulation rate of nanoparticles could reach 35.29%±2.3% and 68.17%±1.9%, respectively. *In vitro* drug release indicated that MEHL-*g*-PVP had obvious pH response ability, and the release amount of IBU was 63.75% and 11.10% in 72 h in simulated intestinal environment and gastric juice of human body, respectively. The results of *in vitro* cytotoxicity test indicated that MEHL-*g*-PVP drug-loaded nanoparticles had no cytotoxicity to normal cells and had a good inhibitory effect on colon cancer cells.

Key words: lignin; *N*-vinylpyrrolidone; response release; drug loading; drug materials

收稿日期: 2021-11-25; 定用日期: 2022-01-17; DOI: 10.13550/j.jxhg.20211206

基金项目: 国家重点研发计划项目(2019YFB1503804, 2018YFD0600302)

作者简介: 聂少飞(1997—), 男, 硕士生, E-mail: 876554461@qq.com。联系人: 罗卫华(1968—), 男, 教授, E-mail: lwh6803@163.com。

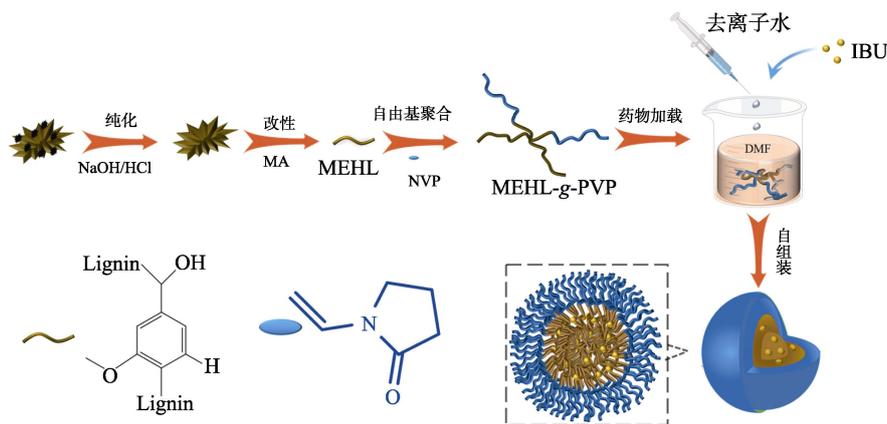
癌症是对人类健康威胁最严重的疾病之一。目前,对于癌症的治疗主要依靠化学疗法,因此,静脉注射型化疗药物在临床上被广泛应用^[1]。但注射疗法往往伴有大量的并发症从而影响患者的健康与生活质量^[2]。而口服药物因为患者依从性高,成本低,具有微创性质,因此成为首选的给药途径^[3]。

目前大部分口服药物均表现为疏水性,在胃肠道中吸收率较低,极大地限制了其利用度和治疗效果。木质素作为自然界中含量仅次于纤维素的生物质,主要由松柏醇、芥子醇和对-香豆醇 3 种醇单体衍生而来,具有抗氧化和抗菌活性^[4-6]。同时,木质素还具有低细胞毒性、生物相容性与生物降解性等有益特性^[7-8]。此外,酶解木质素的制备条件较为温和,其官能团含有大量的醇羟基与酚羟基,一方面可进一步进行化学修饰,为其功能化提供便捷^[9-10],另一方面因其具有两亲性,酶解木质素可以作为口服药物理想的候选材料^[11]。

木质素虽具两亲性,但也存在疏水性较强、自组装体颗粒尺寸偏大的问题。聚乙烯基吡咯烷酮(PVP)是一种被广泛应用在化妆品、医药等领域

的有机烃类化合物,具有良好的生物相容性和可降解性,并且在水和有机溶剂中具有良好的溶解性^[12]。通过 PVP 改性改变亲、疏溶剂链段比例,进而调控纳米粒子的尺寸^[13],以避免被细胞中的巨噬细胞吞噬,也避免侵入毛细血管,使纳米粒子被人体系统清除^[14]。同时由于纳米粒子具有较小的尺寸,使其可以更好地在肿瘤部位聚集,增强肿瘤的高通透性和滞留效应^[15]。因此,PVP 可通过发挥优异的亲水性与显著的络合能力增强木质素的药物递送性能。

本文将 PVP 与酶解木质素大分子偶联,并在 *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)/水混合溶剂中自组装形成具有 pH 响应的纳米粒子。采用物理包埋法实现口服药物布洛芬(IBU)的有效负载,合成路线如下所示。以木质素基纳米粒子的形态、粒径、稳定性为评价标准,考察不同制备条件(去离子水滴加速度、初始聚合物浓度、搅拌速度、水含量和溶剂)对纳米粒子尺寸、载药量和包封率的影响规律。随后基于探索的工艺条件考察载药纳米粒子体外释放和体外细胞毒性,为木质素在药物负载与控制释放方面做出进一步的探索,并提供相关理论依据。



1 实验部分

1.1 试剂与仪器

酶解木质素(EHL),山东龙力生物科技股份有限公司;偶氮二异丁腈(AIBN)、*N*-乙烯基吡咯烷酮(NVP),AR,上海麦克林生化有限公司;顺丁烯二酸酐(MA)、DMF,AR,国药集团化学试剂有限公司;4-二甲氨基吡啶(DMAP),AR,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;NaOH、HCl,AR,湘中化学试剂有限公司;IBU、磷酸盐缓冲溶液,北京索莱宝科技有限公司;44 mm 透析袋(M_w 为2000),美国Viskase公司;去离子水,实验室自制;小鼠成纤维细胞(L929细胞)与人结肠癌细胞(HT-29细胞)、CCK-8 试剂盒、胎牛血清(FBS),上海弗元生物科技有限公司。

Nicolet iS5 傅里叶变换红外光谱仪, Thermo

Nicolet 公司; Nano ZS90 激光纳米粒度及 Zeta 电位分析仪,英国 Malvern 公司; K-Alpha X 射线光电子能谱仪,美国 Thermo Scientific 公司; N4S 紫外-可见分光光度计,上海仪电分析仪器有限公司; G2 20S-Twin 透射电子显微镜,美国 FEI 公司; Multiskan FC 酶标仪,美国 Thermo Fisher 公司。

1.2 方法

1.2.1 酶解木质素的纯化

使用碱-酸沉淀法处理和纯化木质素样品^[16]。将 20 g EHL 置于烧杯中,向其中逐滴加入 200 mL 2 mol/L NaOH 溶液。将混合物在 35 °C 水浴中加热 30 min,随后将碱性木质素与不溶性残余物通过抽滤分离。用去离子水洗涤残留的碱不溶性木质素,直至滤液为中性。合并滤液后滴加 2 mol/L HCl 使其 pH 降至 6.5,滤液开始从深黑色变为暗褐色。搅拌 20 min 后,再次将 pH 调至 2 并转移至 65 °C 水浴中加热搅

拌 30 min。然后通过真空过滤回收沉淀的木质素并用热水 (70 ~ 80 °C) 洗涤, 将经洗涤的木质素在 -80 °C 下冷冻干燥得到纯化木质素。

1.2.2 马来酰化木质素 (MEHL) 的合成

将 4.00 g (2 mmol) 纯化 EHL、2.0 g (20.4 mmol) MA、196 mg (1.6 mmol) DMAP 加入 60 mL DMF 中, 在 50 °C 恒温水浴锅中搅拌反应 4 h。反应结束后, 加入 600 mL 去离子水使之沉淀, 过滤, 用去离子水与无水乙醇洗涤 3 次, 并在 -80 °C 条件下冷冻干燥得到深棕色粉末状 MEHL。

1.2.3 马来酰化木质素-g-聚乙烯吡咯烷酮 (MEHL-g-PVP) 共聚物的合成

将 2.0 g (0.67 mmol) MEHL、1.48 g (13.33 mmol) NVP 与 0.015 g (0.09 mmol) AIBN 溶于 20 mL DMF 溶液中, 75 °C 恒温水浴锅中搅拌反应 5 h。随后, 将溶液转移到透析袋中, 并使用大量去离子水透析去除有机溶剂。透析 48 h 后, 将样品加水沉淀并用去离子水与乙醇洗涤 3 次, 待干燥后用去离子水作为溶剂提馏以去除残留的未反应物和 PVP 均聚物, 随后在 -80 °C 下冷冻干燥得纯化的 MEHL-g-PVP 共聚物。接枝率按下式计算:

$$\text{接枝率}/\% = (m_1 - m_0) / m_0 \times 100 \quad (1)$$

式中: m_0 为反应前 MEHL 质量 (mg); m_1 为接枝反应后 MEHL-g-PVP 的质量 (mg)。

1.2.4 MEHL-g-PVP 纳米粒子的制备

使用溶剂交换法制备纳米粒子^[17]。室温下, 称取一定量 MEHL-g-PVP 聚合物溶于 DMF 溶液中, 超声 15 min, 随后在一定转速下缓慢滴加去离子水。改变聚合物质量浓度、去离子水滴加速度、搅拌转速和水含量得到不同的 MEHL-g-PVP 纳米粒子。共聚物的初始质量浓度为 1.0 g/L, 默认搅拌转速 600 r/min、水滴加速度 60 mL/min、水含量 (即水体积占总溶液体积的百分数, 下同) 80%。

1.2.5 MEHL-g-PVP@IBU 载药纳米粒子的制备

将 40 mg MEHL-g-PVP 和 20 mg IBU 溶于 4 mL DMF 中, 超声 15 min, 然后在一定转速下缓慢滴加去离子水。滴加结束后, 避光搅拌 60 min 使纳米粒子稳定。随后, 将溶液转移到透析袋中, 并使用大量去离子水透析 3 d, 每隔 8 h 更换 1 次。透析结束后, 通过有机微孔膜 (0.45 μm) 过滤, 随后冷冻干燥得到 MEHL-g-PVP@IBU 载药纳米粒子用于后续表征。

1.3 结构表征与性能测试

1.3.1 FTIR 表征

采用红外光谱仪观察各样品的红外光谱。将样品在 80 °C 下干燥 1 h, 随后与溴化钾充分混合均匀后压片。

1.3.2 XPS 分析

取适量聚合物样品, 通过 X 射线电子能谱仪对聚合物的表面元素进行分析。

1.3.3 形貌与粒径分析

通过透射电子显微镜观察 EHL 和 MEHL-g-PVP 纳米粒子形貌。将 1 g/L 的样品溶液滴在碳支持膜上, 随后置于 25 °C 的烘箱中干燥。使用激光纳米粒度仪测定微球的平均粒径和分散情况, 每组样品平行测定 3 次。

1.3.4 IBU 载药量与包封率的测定

使用不同浓度的 IBU/PBS 缓冲溶液建立浓度-吸光度标准曲线, 通过其在 265 nm 处的紫外吸光度来确定纳米粒子中 IBU 的载药量。根据下式来计算载药量 (DLC) 与包封率 (DLE):

$$\text{DLC}/\% = M_1 / M \times 100 \quad (2)$$

$$\text{DLE}/\% = M_1 / M_0 \times 100 \quad (3)$$

式中: M_1 为纳米粒子中 IBU 包载的质量 (mg); M 为纳米粒子的质量 (mg); M_0 为 IBU 的投药量 (mg)。

1.3.5 IBU 体外释放实验

使用透析法评估载药胶束的体外释放能力。将 5 mg 冻干载药纳米粒子置于含有 10 mL PBS 的透析袋中, 并放入 37 °C 的释放介质 (pH=1.65 与 7.40) 中, 在特定的时间间隔, 取出 5 mL 释放介质并放入等量透析液。通过 UV 法在 265 nm 处测量吸光度来计算 IBU 的释放量。根据下式计算药物累积释放量: 累积释放量/% =

$$[V_1(C_1 + \dots + C_{n-1}) + V_0 C_n] / M_1 \times 100 \quad (4)$$

式中: V_1 是给药介质的体积 (mL); C_n 是第 n 次换药时药物在给药介质中的质量浓度 (g/L); V_0 是初始给药介质的体积 (mL); M_1 是胶束中 IBU 的包封质量 (mg)。

1.3.6 细胞毒性实验

采用 CCK-8 法检测样品的体外细胞毒性。将 L929 细胞与 HT-29 细胞 (4×10^4 个/孔) 种于 96 孔板中, 在 200 μL 培养基中孵育 24 h。然后, 用 DMSO 处理的不同浓度的 IBU 与 MEHL-g-PVP@IBU 加入培养基继续培养 48 h, 不同对照组中 IBU 质量浓度均为 15、30、45、60、75 μg/mL。随后除去培养基, 并用 PBS 洗涤 3 次。接下来, 每孔加入 10 μL CCK-8 试剂, 并进一步孵育 4 h。最后, 将板放入酶标仪中, 测定其在 490 nm 处的光密度值 (OD)。细胞存活率按下式计算:

$$\text{细胞存活率}/\% = \text{OD}_C / \text{OD}_T \times 100 \quad (5)$$

式中: 下标 C 代表试样; 下标 T 代表对照组。

2 结果与讨论

2.1 FTIR 分析

图 1 为 EHL 与 MEHL-g-PVP 的 FTIR 谱图。如

图所示, EHL 在 $3200 \sim 3500 \text{ cm}^{-1}$ 处的宽峰对应于一OH 的伸缩振动吸收峰, 2900 cm^{-1} 处对应于甲基或亚甲基的 C—H 拉伸振动吸收峰, 1700 cm^{-1} 为 C=O 拉伸振动吸收峰, 1600 cm^{-1} 处为芳香族的骨架振动吸收峰, 1514 cm^{-1} 处为芳香族骨架的 C=C 拉伸振动吸收峰, 1458 cm^{-1} 处为芳香族骨架的 C—H 拉伸振动吸收峰, 1425 cm^{-1} 处为芳香族骨架振动与 C—H 平面内变形相结合所引起的吸收峰, 1325 cm^{-1} 处为丁香基单元振动吸收峰, 1123 cm^{-1} 处为丁香基单元中 C—H 的变形振动吸收峰, 1043 cm^{-1} 为伯醇—OH 的拉伸振动吸收峰^[18-19]。与 EHL 相比, MEHL-g-PVP 中 $1220 \sim 1270 \text{ cm}^{-1}$ 处宽峰与 1700 cm^{-1} 处峰的增强归因于马来酸酐中 C—O—C 与 C=O 的伸缩振动与 PVP 的—CO—N—(酰亚胺)基团和吡咯烷酮环的振动叠加^[20-21], 而 833 与 877 cm^{-1} 处的两个峰是由于马来酸中 H—C=C 的弯曲振动所造成的^[22]。因为产物已被提馏纯化, 未反应完单体和 PVP 均聚物皆已被除去, 以上结果表明已成功合成出 MEHL-g-PVP 目标产物。

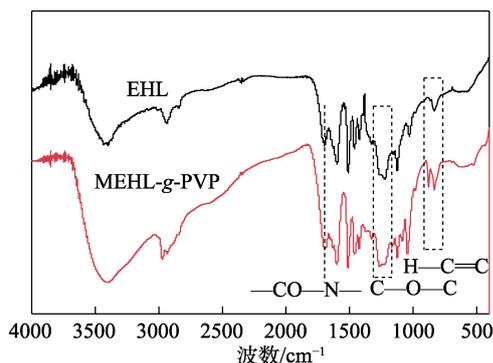


图 1 EHL 与 MEHL-g-PVP 的 FTIR 谱图
Fig. 1 FTIR spectra of EHL and MEHL-g-PVP

2.2 表面元素分析

图 2 为 MEHL-g-PVP 的 XPS 图谱。由图可知, 材料中主要包含 C、H、O、N 元素。其中, N 元素的出现表明 MEHL-g-PVP 的成功合成。通过 XPS 测试可得, MEHL-g-PVP 中 C、N、O 元素相对含量分别为 72.96%、2.16%和 24.87%。

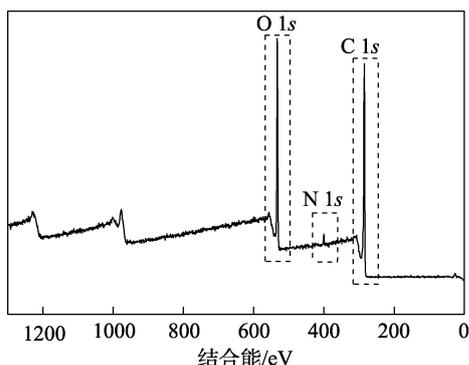


图 2 MEHL-g-PVP 的 XPS 谱图
Fig. 2 XPS spectrum of MEHL-g-PVP

2.3 化学修饰对纳米粒子粒径与形貌的影响

图 3 为 EHL 和 MEHL-g-PVP 的粒径分布曲线。由图 3 可知, EHL 的平均粒径为 318.3 nm , 多分散性指数(PDI)为 0.252, 粒径分布较窄。MEHL-g-PVP 的平均粒径为 91.43 nm , PDI 为 0.185。相较于 EHL, 由于 PVP 的接枝(接枝率为 36.7%), MEHL-g-PVP 粒径明显降低且均匀性较好, 有助于纳米粒子在人体内的输送。

图 4 为 EHL 与 MEHL-g-PVP 纳米粒子在水溶液中的粒径变化。在 72 h 内, EHL 和 MEHL-g-PVP 的粒径未见明显变化, 表明 MEHL-g-PVP 在水介质中具有良好的稳定性。

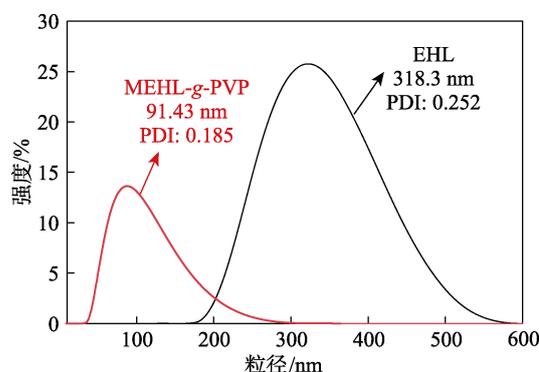


图 3 EHL 和 MEHL-g-PVP 的粒径分布
Fig. 3 Particle size distribution of EHL and MEHL-g-PVP

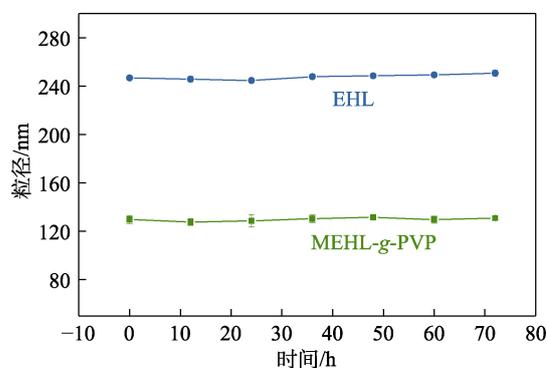


图 4 EHL 与 MEHL-g-PVP 在水溶液中 72 h 的粒径变化
Fig. 4 Particle size change of EHL and MEHL-g-PVP in aqueous solution for 72 h

EHL 在 $\text{pH}=7.40$ (a)、MEHL-g-PVP 在 $\text{pH}=7.40$ (b) 和 MEHL-g-PVP 在 $\text{pH}=1.65$ (c) 的 TEM 图见图 5。如图 5a 所示, EHL 在中性水介质中为形状均匀的球状结构, 表面圆润光滑, 没有明显的凸起和褶皱, 直径约为 300 nm 。MEHL-g-PVP (图 5b) 同样在中性水介质中形成分散较为均匀的球状结构, 但由于 PVP 的修饰, 粒径尺寸锐减至约 40 nm , 这样较小的粒径有利于纳米粒子在体内的滞留, 增强药物在体内的释放与治疗效果。同样观察了 MEHL-g-PVP 在 $\text{pH}=1.65$ 条件下的形貌结构(图 5c), 发现纳米颗粒聚集较为严重, 这可能是由于纳米粒子在 $\text{pH}<3.5$

时其表面的电荷下降造成的^[23]。另外, TEM 测得的粒径相比激光粒度测得的粒径要小很多, 这是由于

TEM 是在干燥状态下测得的直径, 而激光粒度仪测得的粒径为纳米粒子的水合直径。

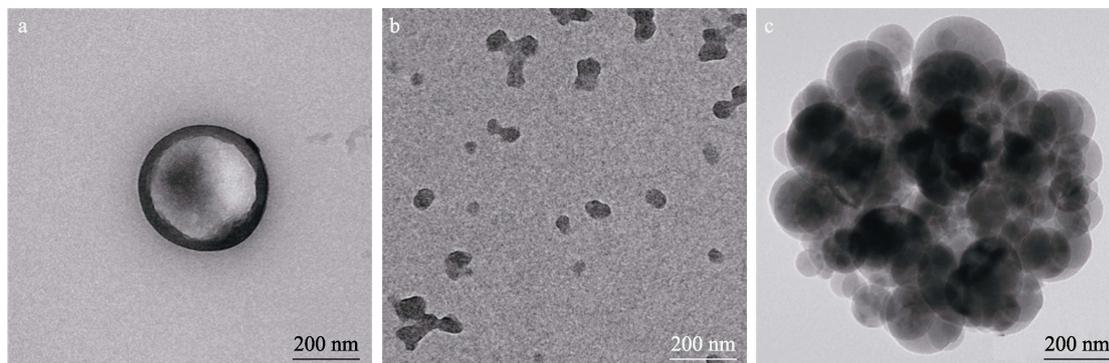


图 5 EHL 在 pH=7.40 (a)、MEHL-g-PVP 在 pH=7.40 (b) 和 pH=1.65 (c) 的 TEM 图
Fig. 5 TEM images of EHL at pH = 7.40 (a), MEHL-g-PVP at pH = 7.40 (b) and pH = 1.65 (c)

2.4 工艺条件对 MEHL-g-PVP 粒径、载药量与包封率的影响

2.4.1 聚合物质量浓度的影响

不同聚合物质量浓度下 MEHL-g-PVP 纳米粒子的粒径、载药量与包封率见表 1。

表 1 聚合物质量浓度对 MEHL-g-PVP 粒径、载药量与包封率的影响

Table 1 Effect of polymer mass concentration on particle size, drug loading and encapsulation efficiency of MEHL-g-PVP

聚合物质量浓度/(g/L)	粒径/nm	PDI	载药量/%	包封率/%
0.5	112.8±4.6	0.126±0.003	29.82±1.3	82.63±2.4
1.0	128.5±3.8	0.102±0.006	26.64±0.9	75.29±2.2
1.5	213.2±6.8	0.167±0.008	23.70±1.6	68.40±1.7
2.0	276.9±5.3	0.198±0.006	18.64±1.0	59.36±1.6

注: 搅拌转速为 600 r/min, 去离子水滴加速度为 60 mL/min, 水含量为 80%。 $m(\text{纳米粒子}):m(\text{IBU})=10:2$, 表 1~4 同。

如表 1 所示, 纳米粒子的粒径随聚合物初始质量浓度的增加而逐渐增大, 是因为较高的聚合物初始质量浓度会导致更多的共聚物分子参与到每个胶束的形成过程, 进而导致聚合物自组装体形成较大粒径^[24-25]。但载药量与包封率却随着聚合物初始质量浓度的增加而逐渐降低, 这是由于参与自组装的共聚物分子会与加载的药物相互竞争, 随着共聚物初始质量浓度的增加, 参与自组装的药物会逐渐减少, 从而导致载药量与包封率降低。当聚合物质量浓度为 0.5 g/L 时, 载药量与包封率最高, 但在此浓度下所制备出的载药纳米粒子的量较少, 因此, 选取 1.0 g/L 为最佳聚合物质量浓度。

2.4.2 水滴加速度的影响

水滴加速度对 MEHL-g-PVP 粒径、载药量与包

封率的影响见表 2。可以看出, 随着去离子水滴加速度的增加, 纳米粒子的粒径呈下降趋势。主要是因为木质素自组装的过程中, 表现出热力学与动力学之间的不断竞争, 在该过程中动力学比值不断升高, 从而导致木质素分子以“冻结”状态迅速转化形成纳米粒子^[26]。并且由于木质素具有疏水性, 在滴加去离子水的同时由于疏水基团的存在使其不溶于水, 溶液中的木质素分子更趋向于与周围含有疏水基团的木质素相互聚拢, 从而使最终得到的木质素自组装体粒径较大。然而, 随着去离子水的滴加速度加快, 木质素之间来不及相互聚拢, 直接形成自组装体, 自组装体粒径呈现出不断变小的趋势。随着水滴加速度的增加, 纳米粒子的载药量与包封率同样呈下降趋势。也是因为参与自组装的共聚物与药物被“冻结”, 参与自组装的分子较少, 快速形成纳米粒子。当水滴加速度为 30 mL/min 时, 载药量与包封率最高, 但由于过大的粒径不利于纳米粒子在人体内的输送, 综合考虑, 最佳的水滴加速度为 60 mL/min。

表 2 水滴加速度对 MEHL-g-PVP 粒径、载药量与包封率的影响

Table 2 Effect of addition rate of water on particle size, drug loading and encapsulation efficiency of MEHL-g-PVP

水滴加速度/(mL/min)	粒径/nm	PDI	载药量/%	包封率/%
30	177.9±4.7	0.212±0.023	31.72±2.4	87.30±2.6
60	128.5±3.1	0.102±0.017	26.64±1.7	75.29±1.8
90	124.8±2.5	0.117±0.015	21.90±1.8	65.86±2.0
120	124.5±1.7	0.074±0.013	16.30±2.2	49.37±1.9

注: 聚合物初始质量浓度为 1.0 g/L, 搅拌转速为 600 r/min, 水含量为 80%。

2.4.3 搅拌速度的影响

搅拌速度对 MEHL-g-PVP 粒径、载药量与包封率的影响见表 3。可以看出,随着搅拌转速增大,纳米粒子粒径呈减小趋势。这主要是因为转速越高,剪切力越大,形成的纳米粒子粒径尺寸越小^[27]。但搅拌速度对纳米粒子载药量的影响较小,整体呈平稳趋势,对包封率影响较大,呈下降趋势。当搅拌速度为 600 r/min 时,其粒径,载药量与包封率相对较好。

表 3 搅拌速度对 MEHL-g-PVP 粒径、载药量与包封率的影响

Table 3 Effect of stirring speed on particle size, drug loading and encapsulation efficiency of MEHL-g-PVP

搅拌速度/ (r/min)	粒径/nm	PDI	载药量/%	包封率/%
200	207.2±6.7	0.243±0.007	24.83±2.2	91.49±2.3
400	133.1±4.4	0.197±0.006	23.32±1.8	85.68±2.3
600	128.5±5.1	0.102±0.005	26.64±1.7	75.29±1.8
800	123.4±6.5	0.092±0.011	25.57±1.0	67.46±1.4

注:聚合物初始质量浓度为 1.0 g/L,去离子水滴加速度为 60 mL/min,水含量为 80%。

2.4.4 水含量的影响

水含量对 MEHL-g-PVP 粒径、载药量与包封率的影响见表 4。如表 4 所示,随着水含量的增大,纳米粒子粒径逐渐减小。这是由于在制备过程中,亲疏水作用使得纳米粒子中的疏水部分在水相与溶剂边界形成一层“膜”,并被水包裹。随着制备过程中水含量不断增大,大量的木质素分子聚集在“膜”的内部表面上,只有少部分木质素分子参与自组装体外壳的形成^[28-29]。因此,水含量增加会使压力差变大,自组装体直径减小。

表 4 水含量对 MEHL-g-PVP 粒径、载药量与包封率的影响

Table 4 Effect of water content on particle size, drug loading and encapsulation efficiency of MEHL-g-PVP

水含量/%	粒径/nm	PDI	载药量/%	包封率/%
20	287.6±6.7	0.054±0.017	15.43±1.4	46.84±2.5
40	156.2±5.5	0.211±0.023	19.21±1.2	58.83±1.9
60	134.9±4.7	0.223±0.016	23.47±1.0	67.28±2.4
80	128.5±4.5	0.102±0.009	26.64±2.1	75.29±1.4

注:聚合物初始质量浓度为 1.0 g/L,搅拌转速为 600 r/min,去离子水滴加速度为 60 mL/min。

然而,随着水含量的增加,纳米粒子的载药量与包封率都出现增大的趋势。这可能是由于随着制备过程中内外压差的增大,导致更多的药物进入到纳米颗粒中,最终呈现载药量与包封率增大的趋势。因此,确定最佳的水含量为 80%。

2.4.5 投药量的影响

投药量对纳米粒子载药量与包封率的影响见表 5。如表 5 所示,随着药物 IBU 与纳米粒子的质量比从 1:10 增加到 5:10,载药量先上升后趋于平缓,但包封率呈现逐步下降的趋势。随着药物与聚合物质量比的提高,可有效阻止载药纳米粒子制备过程中药物向外相的渗漏,增强 MEHL-g-PVP 纳米粒子对 IBU 的包埋效果^[30]。但当药物与聚合物质量比过高时,由于所制备的纳米粒子粒径一定,孔隙率也相对恒定,纳米粒子的包载能力有限,载药量趋于恒定^[31-32]。同时,过多的药物也会导致不能被完全包封进纳米粒子内部,从而造成药物损失,使包封率下降^[33]。综合考虑,选择纳米粒子与药物 IBU 的质量比为 10:3,此时,纳米粒子的载药量为 35.29%±2.3%,包封率为 68.17%±1.9%。

表 5 投药量对 MEHL-g-PVP 的载药量与包封率的影响
Table 5 Effect of drug dosage on drug loading and encapsulation efficiency of MEHL-g-PVP

m(纳米粒子):m(IBU)	载药量/%	包封率/%
10:1	14.32±1.1	95.07±3.6
10:2	25.40±1.6	79.29±2.8
10:3	35.29±2.3	68.17±1.9
10:5	35.32±2.1	54.23±1.7

注:聚合物初始质量浓度为 1.0 g/L,搅拌转速为 600 r/min,去离子水滴加速度为 60 mL/min,水含量为 80%。

2.5 MEHL-g-PVP @IBU 的药物释放性能

通过工艺条件对 MEHL-g-PVP 粒径、载药量与包封率的影响规律研究,选择在搅拌速度为 600 r/min、MEHL-g-PVP 质量浓度为 1 g/L、去离子水滴加速度为 60 mL/min、水含量为 80%和纳米粒子与 IBU 质量比为 10:3 的条件下制备载药纳米粒子,并研究了药物的 pH 释放特性。将 MEHL-g-PVP@IBU 在 37 °C, pH=7.40 和 pH=1.65 的条件下分别来模拟在人体内肠道环境和胃液中的释放情况,结果见图 6。

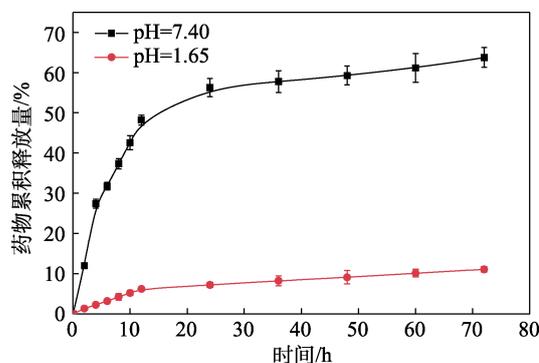


图 6 MEHL-g-PVP@IBU 在不同环境(pH 7.40 和 pH 1.65) 中的药物释放行为

Fig. 6 Drug release behavior of MEHL-g-PVP@IBU in different environments (pH 7.40 and pH 1.65)

如图6所示,在pH=1.65的条件下,MEHL-g-PVP@IBU在12h内仅释放了6.23%,72h内释放了11.10%的IBU。但在pH=7.40的条件下,载药纳米粒子12h内释放了48.23%,72h内释放了63.75%的IBU。最初的快速释放可能是因为部分药物负载在聚合物的表面^[34]。MEHL-g-PVP纳米粒子表现出了较为宽泛的pH响应特性,在模拟胃液环境中能够极大地保护药物免受侵蚀,并促进了药物在人体肠道内的释放,可增强口服药物的输送效果^[35-36]。

2.6 体外细胞毒性与生物相容性分析

采用CCK-8法检测了MEHL-g-PVP与MEHL-g-PVP@IBU对L929细胞与HT-29细胞的细胞毒性(图7)。如图7a所示,在与L929细胞共孵育了48h后,MEHL-g-PVP的质量浓度在0~250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,细胞存活率在85%以上,表明纳米载体对正常细胞的毒性非常小,具有良好的生物相容性。

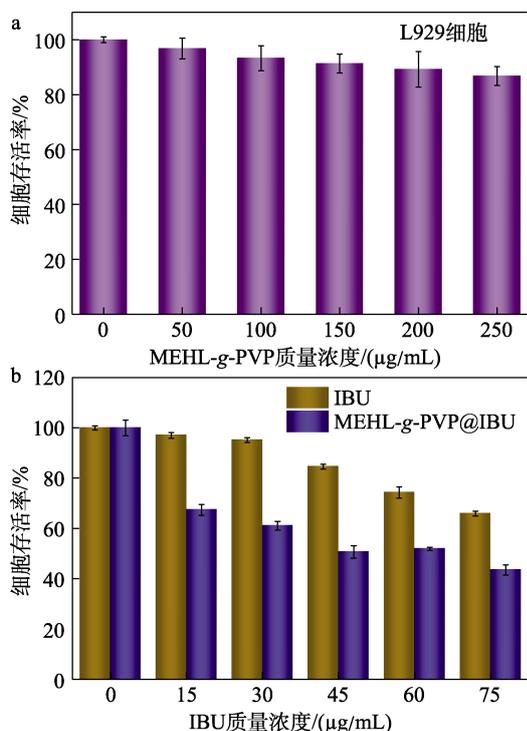


图7 MEHL-g-PVP与L929细胞共孵育48h后的细胞活性(a);IBU和MEHL-g-PVP@IBU与HT-29细胞共孵育48h后的细胞活性(b)

Fig. 7 Cell viability of L929 cells incubated with MEHL-g-PVP for 48 h (a); Cell viability of HT-29 cells incubated with MEHL-g-PVP@IBU and IBU for 48 h (b)

图7b显示了MEHL-g-PVP@IBU与HT-29细胞共培养时的细胞存活率。发现MEHL-g-PVP@IBU对HT-29细胞有很强的抑制率,随着IBU质量浓度的增加,抑制率逐渐上升,当IBU质量浓度为75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,MEHL-g-PVP@IBU的抑制率达到了56.9%,远高于游离药物组对细胞的抑制率(34.1%)。说明本

实验制备的载药纳米粒子可增强IBU对肿瘤细胞的抑制作用,这可能是由于PVP分子中羰基与难溶药物分子中的活性氢原子通过氢键结合在一起,提高难溶药物的溶解度,以及MEHL-g-PVP延长了IBU的释放时间,降低被吞噬细胞清除的概率,从而增强了载药纳米粒子对癌细胞的抑制作用^[37]。

3 结论

本文通过NVP的修饰,构筑了木质素基纳米粒子,并用于口服药物的输送,探讨了纳米粒子自组装过程中的聚合物浓度、水滴加速度、磁搅转速和水含量等因素对药物加载的影响和机理。结果表明,PVP亲水链段的引入导致MEHL-g-PVP相对于EHL更容易发生自组装行为,拥有更小的粒径。亲水链段的引入也使得MEHL-g-PVP具有更高的药物负载能力与较为广泛的pH响应释药性能。体外实验表明,MEHL-g-PVP纳米粒子对正常细胞几乎没有毒性,当MEHL-g-PVP纳米粒子质量浓度达到250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,细胞存活率仍可达85%以上。但是对于癌细胞具有较强的细胞毒性,与负载药物表现出了高效的协同抑制作用,大大提高了抗癌效果,是一种具有潜力的药物载体。

参考文献:

- PAN X Q, GONG Y C, LI Z L, *et al.* Folate-conjugated pluronic/poly(lactide) polymersomes for oral delivery of paclitaxel[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 139: 377-386.
- FENG S S, MEI L, ANITHA P, *et al.* Poly(lactide)-vitamin E derivative/montmorillonite nanoparticle formulations for the oral delivery of docetaxel[J]. *Biomaterials*, 2009, 30(19): 3297-3306.
- SANT S, TAO S L, FISHER O Z, *et al.* Microfabrication technologies for oral drug delivery[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2012, 64(6): 496-507.
- CARRILLO I, VIDAL C, ELISSETCHE J P, *et al.* Wood anatomical and chemical properties related to the pulpability of *Eucalyptus globulus*: A review[J]. *Southern Forests: A Journal of Forest Science*, 2018, 80(1): 1-8.
- SIPPONEN M H, LANGE H, AGO M, *et al.* Understanding lignin aggregation processes. A case study: Budesonide entrapment and stimuli controlled release from lignin nanoparticles[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2018, 6(7): 9342-9351.
- FAROOQ M, ZOU T, RIVIERE G, *et al.* Strong, ductile, and waterproof cellulose nanofibril composite films with colloidal lignin particles[J]. *Biomacromolecules*, 2018, 20(2): 693-704.
- FIGUEIREDO P, LINTINEN K, KIRIAZIS A, *et al.* *In vitro* evaluation of biodegradable lignin-based nanoparticles for drug delivery and enhanced antiproliferation effect in cancer cells[J]. *Biomaterials*, 2017, 121: 97-108.
- LI H, DENG Y, LIU B, *et al.* Preparation of nanocapsules via the self-assembly of kraft lignin: A totally green process with renewable resources[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2016, 4(4): 1946-1953.
- JIN Y, CHENG X, ZHENG Z. Preparation and characterization of phenol-formaldehyde adhesives modified with enzymatic hydrolysis lignin[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(6): 2046-2048.

- [10] RICHTER A P, BHARTI B, ARMSTRONG H B, *et al.* Synthesis and characterization of biodegradable lignin nanoparticles with tunable surface properties[J]. *Langmuir*, 2016, 32(25): 6468-6477.
- [11] UGARTONDO V, MITJANS M, VINARDELL M P. Comparative antioxidant and cytotoxic effects of lignins from different sources[J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(14): 6683-6687.
- [12] XING Z, YANG G. Crystallization, melting behavior, and wettability of poly (ϵ -caprolactone) and poly (ϵ -caprolactone)/poly (*N*-vinylpyrrolidone) blends[J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 2010, 115(5): 2747-2755.
- [13] GAO C, WU J, ZHOU H, *et al.* Self-assembled blends of AB/BAB block copolymers prepared through dispersion RAFT polymerization[J]. *Macromolecules*, 2016, 49(12): 4490-4500.
- [14] DESAI M P, LABHASETWAR V, AMIDON G L, *et al.* Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: Effect of particle size[J]. *Pharmaceutical Research*, 1996, 13(12): 1838-1845.
- [15] GAZIT Y, BAISH J W, SAFABAKHSH N, *et al.* Fractal characteristics of tumor vascular architecture during tumor growth and regression[J]. *Microcirculation*, 1997, 4(4): 395-402.
- [16] WANG L (王磊). Extraction, modification and comprehensive utilization of lignin[D]. Jinan: Shandong Normal University (山东师范大学), 2012.
- [17] CHENG L, DENG B, LUO W H, *et al.* pH-responsive lignin-based nanomicelles for oral drug delivery[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(18): 5249-5258.
- [18] ZHOU Y, HAN Y, LI G, *et al.* Lignin-based hollow nanoparticles for controlled drug delivery: Grafting preparation using β -cyclodextrin/enzymatic-hydrolysis lignin[J]. *Nanomaterials*, 2019, 9(7): 1-11.
- [19] XIONG F, HAN Y, WANG S, *et al.* Preparation and formation mechanism of renewable lignin hollow nanospheres with a single hole by self-assembly[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2017, 5(3): 2273-2281.
- [20] HAN L, WU W, HUANG Z, *et al.* Preparation and characterization of a novel fluorine-free and pH-sensitive hydrophobic porous diatomite ceramic as highly efficient sorbent for oil-water separation[J]. *Separation and Purification Technology*, 2021, 254: 117620.
- [21] FEI P, ZENG F, ZHENG S, *et al.* Acylation of blueberry anthocyanins with maleic acid: Improvement of the stability and its application potential in intelligent color indicator packing materials[J]. *Dyes and Pigments*, 2021, 184: 108852.
- [22] ATA S, RASOOL A, ISLAM A, *et al.* Loading of cefixime to pH sensitive chitosan based hydrogel and investigation of controlled release kinetics[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 155: 1236-1244.
- [23] LIEVONEN M, VALLE-DELGADO J J, MATTINEN M L, *et al.* A simple process for lignin nanoparticle preparation[J]. *Green Chemistry*, 2016, 18(5): 1416-1422.
- [24] QIU X, LI H, DENG Y, *et al.* The acetylation of alkali lignin and its use for spherical micelles preparation[J]. *Acta Polymerica Sinica*, 2014, (11): 1458-1464.
- [25] LERON R B, LI M H. Solubility of carbon dioxide in a choline chloride-ethylene glycol based deep eutectic solvent[J]. *Thermochimica Acta*, 2013, 551: 14-19.
- [26] MATEOVIC T, KRIZNAR B, BGATAJ M, *et al.* The influence of stirring rate on biopharmaceutical properties of Eudragit RS microspheres[J]. *Journal of Microencapsulation*, 2002, 19(1): 29-36.
- [27] IOANNOU K, NYDAL O J, ANGELI P. Phase inversion in dispersed liquid-liquid flows[J]. *Experimental Thermal and Fluid Science*, 2005, 29(3): 331-339.
- [28] LYU H, LIN Q, ZHANG K, *et al.* Facile fabrication of monodisperse polymer hollow spheres[J]. *Langmuir*, 2008, 24(23): 13736-13741.
- [29] SUN M L (孙美丽), BAN J F (班俊峰), HUANG S Y (黄思玉), *et al.* Control of encapsulation efficiency and drug loading in PLGA microspheres[J]. *Journal of Guangdong Pharmaceutical University (广东药学院学报)*, 2011, 27(6): 643-648.
- [30] LIU M (刘蔓), DING J S (丁劲松). Recent progress in research of influence factors of drug loading in polymer micelles[J]. *Chinese Journal of Pharmaceuticals (中国医药工业杂志)*, 2017, 48(9): 1257-1263.
- [31] SUN M M (孙苗苗), WEI P H (魏培贺), KANG C (康纯), *et al.* Preparation and drug loading properties of an injectable CS/PLLA-SA composite hydrogel[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2021, 38(2): 358-365.
- [32] ELKHESHEN S A, RADWAN M A. Sustained release microspheres of metoclopramide using poly (D, L-lactide-co-glycolide) copolymers[J]. *Journal of Microencapsulation*, 2000, 17(4): 425-435.
- [33] LIU Y, LI K, PAN J, *et al.* Folic acid conjugated nanoparticles of mixed lipid monolayer shell and biodegradable polymer core for targeted delivery of docetaxel[J]. *Biomaterials*, 2010, 31(2): 330-338.
- [34] OUYANG W, ZHAO D, WANG Y, *et al.* Continuous flow conversion of biomass-derived methyl levulinate into γ -valerolactone using functional metal organic frameworks[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2018, 6(5): 6746-6752.
- [35] DENG Y H, FENG X J, ZHOU M S, *et al.* Investigation of aggregation and assembly of alkali lignin using iodine as a probe[J]. *Biomacromolecules*, 2011, 12(4): 1116-1125.
- [36] HE Y, LIU H, XIE Z, *et al.* PVP and surfactant combined carrier as an effective absorption enhancer of poorly soluble astilbin *in vitro* and *in vivo*[J]. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2014, 40(2): 237-243.

(上接第 740 页)

- [18] BEN A M, JO W K, ELHOUCHEH H, *et al.* Reduced graphene oxide as an efficient support for CdS-MoS₂ heterostructures for enhanced photocatalytic H₂ evolution[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2017, 42(26): 16449-16458.
- [19] ZHANG Z F (张转芳), TANG L (唐林), SUN L (孙立), *et al.* Preparation of CuS/GO nanocomposite and its photocatalytic degradation activity[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2019, 36(2): 239-242.
- [20] CHENG L, XIANG Q, LIAO Y, *et al.* CdS-based photocatalysts[J]. *Energy & Environmental Science*, 2018, 11(6): 1362-1391.
- [21] ZHANG J (张洁), TIAN J Z (田景芝), HAO X (郝欣), *et al.* Synergistic effect of CDs/ZnO/g-C₃N₄ ternary component for photocatalytic degradation of dyes[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2019, 36(7): 1439-1445.
- [22] RXUE N N, WANG Z J, ZHANG W Q, *et al.* Preparation of NiCoP/CdS and its photocatalytic activity in hydrogen evolution[J]. *Modern Chemical Industry*, 2019, 39(10): 56-60.
- [23] KUMAR D P, HONG S, REDDY D A, *et al.* Ultrathin MoS₂ layers anchored exfoliated reduced graphene oxide nanosheet hybrid as a highly efficient cocatalyst for CdS nanorods towards enhanced photocatalytic hydrogen production[J]. *Applied Catalysis B: Environmental*, 2017, 212: 7-14.
- [24] YANG M Q, HAN C, XU Y J, *et al.* Insight into the effect of highly dispersed MoS₂ versus layer-structured MoS₂ on the photocorrosion and photoactivity of CdS in graphene-CdS-MoS₂ composites[J]. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2015, 119(49): 27234-27246.
- [25] YU X, DU R, LI B, *et al.* Biomolecule-assisted self-assembly of CdS/MoS₂/graphene hollow spheres as high-efficiency photocatalysts for hydrogen evolution without noble metals[J]. *Applied Catalysis B: Environmental*, 2016, 182: 504-512.
- [26] LI P X, ZHAO H, YAN X Y, *et al.* Visible-light-driven photocatalytic hydrogen production coupled with selective oxidation of benzyl alcohol over CdS@MoS₂ heterostructures[J]. *Science China Materials*, 2020, 63(11): 2239-2250.
- [27] XU Z H, XU B T, QIAN K, *et al.* *In situ* growth of CuS nanoparticles on g-C₃N₄ nanosheets for H₂ production and the degradation of organic pollutant under visible-light irradiation[J]. *RSC Advances*, 2019, 9(44): 25638-25646.