

热响应全氟聚醚丙烯酸酯共聚物的制备及载药性能

徐德忠^{1,2}, 肖旺钊^{1,2}, 林伟杰¹, 王长园³, 李 翱¹, 黄 方^{1*}

(1. 福建农林大学 材料工程学院, 福建 福州 350108; 2. 三明学院 资源与化工学院, 福建 三明 365004; 3. 福建医科大学附属协和医院 小儿外科, 福建 福州 350001)

摘要: 以甲基丙烯酸羟乙酯 (HEMA) 和全氟聚醚酰氟 (HFPO) 反应生成的全氟聚醚酰氟甲基丙烯酸羟乙酯 (PFPHM) 为疏水内核, *N,N*-二甲基丙烯酰胺 (DMAA) 为热响应功能段, 聚乙二醇甲基丙烯酸酯 (PEGMA₃₆₀) 为亲水外壳, 通过 3 次原子转移自由基聚合反应制备出热响应聚合物 [P(PFPHM₉-*b*-DMAA-*b*-PEGMA₃₆₀)], 考察了其对于盐酸阿霉素 (DOX/HCl) 的载药性能。通过 ¹⁹FNMR、¹HNMR、FTIR、DLS、UV-Vis、激光共聚焦显微镜和荧光分光光度计对其化学结构、临界胶束浓度 (CMC)、最低临界溶解温度 (LCST)、生物毒性、胶束稳定性及载药性能进行了研究。结果表明, P(PFPHM₉-*b*-DMAA-*b*-PEGMA₃₆₀) 的 CMC 为 1.0 μg/mL, LCST 为 38.7 °C, 胶束稳定性良好, 载药量为 20.6%, 包封率为 86.6%, 在 42 和 37 °C 下, 72 h 的累积释药率分别为 91.9% 和 35.4%, 表明 P(PFPHM₉-*b*-DMAA-*b*-PEGMA₃₆₀) 具有热响应性, 作为 DOX/HCl 物载体具有很大潜力。

关键词: 热响应性; 全氟聚醚酰氟; 两性性; 药物载体; 最低临界溶解温度; 医药原料

中图分类号: TQ460.1; TQ317 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5214 (2022) 07-1434-09

Preparation and drug loading properties of thermally responsive perfluoropolyether acrylate copolymer

XU Dezhong^{1,2}, XIAO Wangchuan^{1,2}, LIN Weijie¹, WANG Changyuan³, LI Ao¹, HUANG Fang^{1*}

(1. School of Materials Engineering, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350108, Fujian, China; 2. School of Resources and Chemical Engineering, Sanming College, Sanming 365004, Fujian, China; 3. Department of Pediatric Surgery, Fujian Medical University Union Hospital, Fuzhou 350001, Fujian, China)

Abstract: Thermally responsive polymer [P(PFPHM₉-*b*-DMAA-*b*-PEGMA₃₆₀)] was prepared by atom transfer radical polymerization using perfluoropolyetheryl fluoromethyl acrylate (PFPHM) synthesized from hydroxyethyl methacrylate (HEMA) and hexafluoropropylene oxide (HFPO) as hydrophobic core, *N,N*-dimethylacrylamide as thermal response function segment, and poly(polyethylene glycol methacrylate₃₆₀) as hydrophilic shell. Then, its DOX/HCl drug loading properties was investigated. The chemical structure, critical micelle concentration (CMC), lower critical solution temperature (LCST), biological toxicity, stability of micelles and drug loading properties were characterized and analyzed by ¹⁹FNMR, ¹HNMR, FTIR, DLS, UV-Vis, laser confocal microscopy and fluorescence spectrophotometer. The results showed that P(PFPHM₉-*b*-DMAA-*b*-PEGMA₃₆₀) exhibited a CMC of 1.0 μg/mL, LCST of 38.7 °C and excellent micelle stability. Moreover, analysis of drug loading indicated that the polymer displayed a drug loading capacity for DOX/HCl of 20.6%, encapsulation rate of 86.6%, and 72 h cumulative drug release rate at 42 and 37 °C were 91.9% and 35.4%, respectively, which suggested that P(PFPHM₉-*b*-DMAA-*b*-PEGMA₃₆₀) was temperature sensitive and had great potential as a drug carrier for DOX/HCl.

收稿日期: 2021-11-27; 定用日期: 2022-03-28; DOI: 10.13550/j.jxhg.20211211

基金项目: 国家自然科学基金项目 (22078061); 福建省科技创新联合资金资助项目 (2018Y9003); 福建省自然科学基金项目 (2018J01305)

作者简介: 徐德忠 (1995—), 男, 硕士生, E-mail: dezongxu@fafu.edu.cn. 联系人: 黄 方 (1974—), 男, 博士, 副教授, E-mail: fang.huang@fafu.edu.cn.

Key words: thermal responsiveness; perfluoropolyether acyl fluoride; amphiphilicity; drug carrier; lower critical solution temperature; drug materials

癌症是一个全球公共卫生问题, 因其发病率和死亡率极高, 严重威胁着人类的健康^[1], 虽然当前癌症治疗已取得了重大进展, 但彻底治愈癌症仍是一个棘手问题。化疗是非靶向性的治疗癌症的方法之一, 但在化疗中, 药物的非特异性行为会损害正常的组织细胞, 从而对患者产生毒副作用。因此, 提高药物对癌细胞的利用率和选择性至关重要。

两性性聚合物自组装形成的纳米载药胶束在治疗癌症上有巨大潜力, 它们具有良好的生物相容性、高载药量以及能在特定条件下释放药物, 实现药物的靶向释控, 降低药物毒性等^[2-3], 但在 XU 等^[4]的研究中, 当聚合物临界胶束浓度 (CMC) 较高时, 聚合物载药胶束在到达肿瘤组织时会突然释放药物甚至会发生爆裂, 发生这一现象的原因是聚合物胶束在递送药物的过程中被稀释, 导致浓度低于 CMC 值, 聚合物胶束无法形成而引起聚合物胶束突然释放药物甚至是爆裂。为了克服此缺点, DOMIŃSKI 等^[5]制备出聚乙二醇-2,2-二甲基-5,5-双(羟甲基)-1,3-二噁烷的碳酸酯-寡([R]-3-羟基丁酸酯) (PEG-PKPC-oPHB) 和聚乙二醇-2,2-二甲基-5,5-双(羟甲基)-1,3-二噁烷的碳酸酯 (PEG-PKPC) 两种共聚物, 并进行 CMC 测试。结果表明, PEG-PKPC-oPHB 的 CMC 计算值为 0.0027 g/L, 比 PEG-PKPC 的 0.0056 g/L 降低了 51.8%, 这是因为添加高疏水性 oPHB 后, 增强了胶束内部的疏水作用。在 MAYSINGER 等^[6]的研究中也证明, 通过提高聚合物中疏水链段的疏水性可降低聚合物胶束的 CMC 值。近年来, 含氟聚合物因其具有极强的疏水性、热稳定性、化学稳定性、气体溶解能力、高流动性、低介电常数以及低表面能而备受关注^[7-8]。相对于常规碳链两性性聚合物, 含氟碳链两性性聚合物具有较低的 CMC 值, 使其具有良好的热力学稳定性, 使负载的药物可缓慢、持续地从聚合物胶束中释放, 以延长药物对癌细胞的作用期, 减少药物所需用量, 以达到降低药物毒副作用的目的, 这是非氟化两性性聚合物无法实现的^[9]。而肿瘤微环境相对于正常细胞具有弱酸性、低氧和温度升高等生理特性, 这些特性为设计出一种最低临界溶解温度 (LCST) 高于生理体温 ($T_b \approx 37^\circ\text{C}$), 但低于肿瘤组织温度 ($T_h \approx 42^\circ\text{C}$)^[10-11]的纳米胶束提供了新的研究方向。

全氟聚醚酰氟 (HFPO) 是一种具有超疏水性, 且在生物体内无积聚性, 几乎没有生物毒性的氟化物, *N,N*-二甲基丙烯酸酰胺 (DMAA) 因其具有接近

生理温度的 LCST 被广泛应用于热响应聚合物胶束的制备中^[12]。SZWEDA 等^[13]研究了聚[低聚(乙二醇)甲基丙烯酸酯] (POEGMA) 与不同细胞系 (如肝癌细胞 HepG2 和结肠腺癌细胞 Caco-2) 的相互作用, 结果表明, POEGMA 具有良好的生物相容性。

本研究拟将 HFPO 和甲基丙烯酸羟乙酯 (HEMA) 反应生成全氟聚醚酰氟甲基丙烯酸羟乙酯 (PFPHM), 通过 3 次原子转移自由基聚合反应制备三嵌段聚合物。以溴化铜 (CuBr_2) 作为催化剂, 2-溴异丁酸乙酯 (EBIB) 作为引发剂, 引发 PFPHM 自聚合并引入端基溴原子, 生成 PPFPHM₉-Br; 后以 PPFPHM₉-Br 为大分子引发剂引入热响应功能单体 DMAA 生成 P(PFPHM₉-*b*-DMAA)-Br, 并以 P(PFPHM₉-*b*-DMAA)-Br 作为热响应性大分子引发剂引入亲水链段聚乙二醇甲基丙烯酸酯 (PEGMA₃₆₀), 最终生成热响应两性三嵌段聚合物 P(PFPHM₉-*b*-DMAA-*b*-PEGMA₃₆₀)。通过 NMR 和 FTIR 对聚合物的结构进行表征, 并测定聚合物胶束的稳定性及载药性。此研究开发了基于热响应共聚物的高效控释抗癌药物递送系统, 并为设计智能药物递送系统提供一种潜在的、有效的简便方法。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

HFPO 由三明海斯福化工有限责任公司免费赠送; Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 培养液和胎牛血清 (FBS) 购于武汉普诺赛生命科技有限公司; 肝癌细胞 HepG2 购于上海中科院细胞库; 三乙胺 (TEA)、盐酸阿霉素 (DOX/HCl)、HEMA、丙酮、甲醇、 CuBr_2 、EBIB、2,2,2-三氟乙醇 (TFEA)、无水乙醇 ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)、异辛酸亚锡 [$\text{Sn}(\text{Oct})_2$]、五甲基二亚乙基三胺 (PMDETA)、正己烷 (C_6H_{12})、DMAA、PEGMA₃₆₀ (摩尔质量 360 g/mol)、溴化钾 (KBr)、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、中性氧化铝 (200 目) 和噻唑蓝 (MTT) 均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 均为分析纯, 未经处理直接使用。

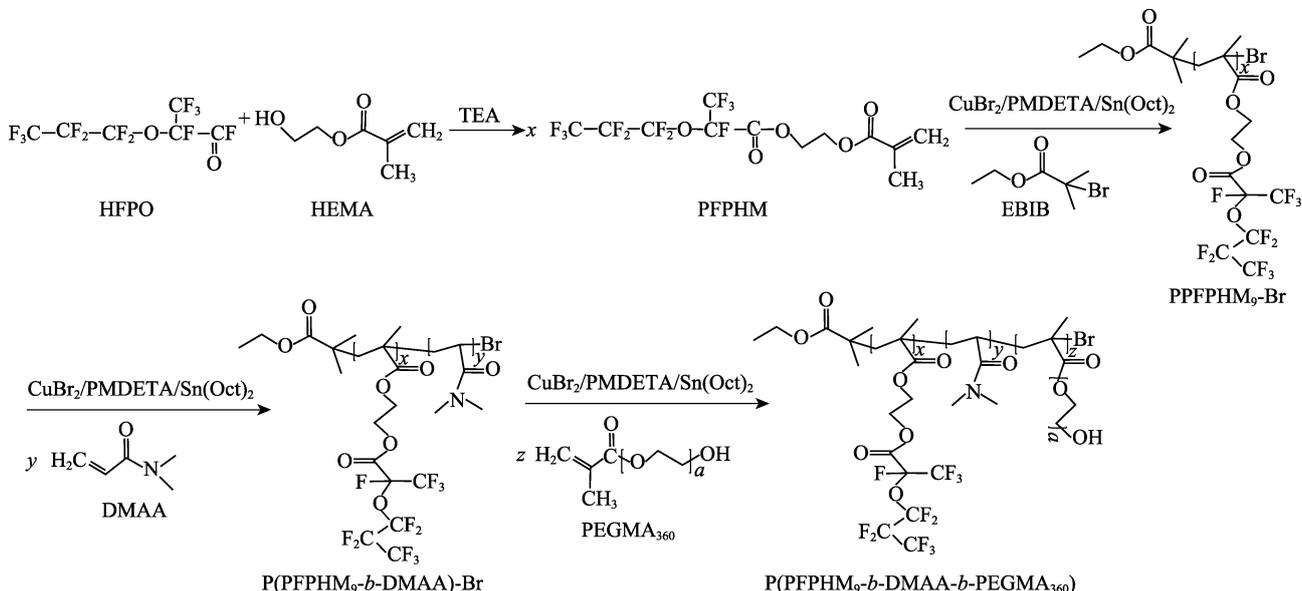
Avance III 400 MHz 核磁共振波谱仪 (NMR)、Vertex 70 傅里叶变换红外光谱仪 (FTIR), 德国 Bruker 公司; Fluoroskan Ascent 荧光分光光度计, 美国 FEI 公司; UV6300 紫外-可见分光光度计, 上海美谱达仪器有限公司; D2F-6020 真空鼓风干燥箱, 上海精宏实验设备有限公司; E2695 型凝胶渗透色谱仪 (GPC), 美国 Waters 公司; Zetasizer

Nano-ZS 激光粒度仪,英国 Malvern 公司;HERAcell 240i 二氧化碳培养箱,美国 Thermo Forma 公司;LEICA SP8 激光共聚焦显微镜,波长范围:400~800 nm,激光器:405 nm/488 nm/552 nm/638 nm,

德国 Leica 公司。

1.2 制备方法

1.2.1 P(PFPHM₉-*b*-DMAA-*b*-PEGMA₃₆₀)的制备合成路线如下所示:



1.2.2 PFPHM 的制备

取 5.20 g HEMA (40 mmol)、4.05 g TEA (40 mmol) 和 50 mL TFEA 加入单口烧瓶中搅拌 10 min, 在恒压滴定漏斗中加入 26.56 g HFPO (80 mmol) 和 30 mL TFEA 的混合液后缓慢滴入单口烧瓶中, 于 25 °C 反应 8 h。用浓度为 0.1 mol/L 的稀盐酸萃取洗涤反应液, 取下层, 再用去离子水萃取洗涤 3 次, 得到 23.8 g 淡黄色黏稠液体, 即 PFPHM, 收率为 89.6%。

1.2.3 具有引发功能的 PPFPHM₉-Br 的合成

取 50 mL TFEA、0.032 g PMDETA (0.2 mmol)、0.044 g CuBr₂ (0.2 mmol) 先加入圆底烧瓶中, 超声处理 5 min 使 CuBr₂ 溶解和分散。随后, 往烧瓶中加入 8.84 g PFPHM (20 mmol) 和 0.33 g EBIB (2 mmol), 密封搅拌 10 min 后, 加入 0.08 g Sn(Oct)₂ (2 mmol), 并马上将烧瓶转移至装有液氮的杜瓦瓶中进行脱气, 以 3 次液氮冷冻-抽真空-解冻循环除去氧气后, 往烧瓶中充入高纯氮气, 密封烧瓶, 并将其转移到 40 °C 的油浴锅内, 反应 9 h。反应结束后, 冷却, 往烧瓶加入 30 mL 无水乙醇稀释反应液。随后, 以无水乙醇为洗脱剂, 在 25 °C 时将稀释后的反应液过 200 目中性氧化铝柱子以除去 CuBr₂, 将所收集的液体逐滴滴入过量且快速搅拌的 *n*(去离子水): *n*(无水乙醇)=3:1 溶液中, 离心分离, 倒掉上清液收集沉淀, 反复洗涤 3 次除去未反应的单体。将收集的沉淀置于真空鼓风干燥箱于 60 °C 干燥 24 h, 得到 0.27 g 固体, 即 PPFPHM₉-Br, 收率为 81.8%。

1.2.4 温度敏感功能性大分子引发剂 P(PFPHM₉-*b*-DMAA)-Br 的合成

取 0.60 g PPFPHM₉-Br、0.011 g CuBr₂ (0.05 mmol)、0.008 g PMDETA (0.05 mmol)、3.96 g DMAA (40 mmol)、0.02 g Sn(Oct)₂ (0.5 mmol) 和 30 mL TFEA 置于两口烧瓶中, 反应步骤与 1.2.3 节相同, 在 40 °C 持续反应 9 h。反应结束后, 冷却, 往烧瓶加入 30 mL 无水乙醇稀释反应液。随后, 以丙酮为洗脱剂, 在 25 °C 时将稀释后反应液过 200 目中性氧化铝柱子以除去 CuBr₂, 过柱所得液体滴入 *n*(去离子水): *n*(无水乙醇)=3:1 的溶液中, 离心分离后, 倒掉上清液收集沉淀, 反复洗涤 3 次除去未反应的单体。沉淀用真空鼓风干燥箱 60 °C 干燥 24 h, 得到 0.43 g 固体, 即 P(PFPHM₉-*b*-DMAA)-Br, 收率为 71.7%。

1.2.5 P(PFPHM₉-*b*-DMAA-*b*-PEGMA₃₆₀)的合成

取 0.30 g P(PFPHM₉-*b*-DMAA)-Br、0.005 g CuBr₂ (0.025 mmol)、0.004 g PMDETA (0.25 mmol)、3.60 g PEGMA₃₆₀ (10 mmol)、0.02 g Sn(Oct)₂ (0.5 mmol) 和 15 mL TFEA 置于两口烧瓶中, 反应步骤与 1.2.3 节相同, 在 40 °C 持续反应 9 h。反应结束后, 处理方法与 1.2.4 节相同, 用过柱法除去 CuBr₂, 最终得到 0.23 g 固体, 即 P(PFPHM₉-*b*-DMAA-*b*-PEGMA₃₆₀), 收率为 76.7%。

1.2.6 空白/载药胶束的制备

通过透析法制备空白/载药聚合物胶束。称取 10 mg P(PFPHM₉-*b*-DMAA-*b*-PEGMA₃₆₀)溶于 5 mL

丙酮中。随后, 将 10 mL 去离子水以 10 $\mu\text{L/s}$ 滴入到快速搅拌的 P(PFPHM₉-*b*-DMAA-*b*-PEGMA₃₆₀)的丙酮溶液中。最后, 将聚合物溶液转移至截留相对分子质量为 3500 的透析袋中, 透析 24 h。在初始的 6 h 内, 每隔 2 h 彻底更换去离子水, 随后间隔 6 h 彻底更换去离子水。最后, 将透析所得的样品用真空冷冻干燥箱在 -78 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻干燥 72 h, 即得空白胶束。

载药胶束的制备: 称取 3 mg DOX/HCl 溶解于 1 mL 丙酮中, 10 mg P(PFPHM₉-*b*-DMAA-*b*-PEGMA₃₆₀) 溶解于 4 mL 丙酮中, 将两者混合 150 r/min 搅拌 60 min, 将 10 mL 去离子水以 10 $\mu\text{L/s}$ 滴入快速搅拌的 P(PFPHM₉-*b*-DMAA-*b*-PEGMA₃₆₀)、DOX/HCl 丙酮溶液中。最后, 将聚合物溶液按照上述步骤进行透析 24 h, 且在透析过程中全程避光。将透析所得的样品用真空冷冻干燥箱在 -78 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻干燥 72 h 后, 得到载药胶束 12.598 mg。

1.3 结构表征

NMR: 以 CDCl_3 为 PPFPHM₉-Br 的溶剂, 在 250 MHz 和 25 $^{\circ}\text{C}$ 下测定样品 ^1H NMR 谱图; 以 CDCl_3 为 HEMA 和 PPFPHM 的溶剂, 以 $\text{DMSO}-d_6$ 为 P(PFPHM₉-*b*-DMAA)-Br 的溶剂, 以氘代丙酮为 PPFPHM₉-Br 和 P(PFPHM₉-*b*-DMAA-*b*-PEGMA₃₆₀) 的溶剂, 在 250 MHz 和 25 $^{\circ}\text{C}$ 下测定样品 ^1H NMR 谱图。FTIR: 采用 KBr 压片法, 波数范围 4000~400 cm^{-1} , 分辨率设置为 4 cm^{-1} , 扫描 32 次。

空白/载药聚合物胶束的粒径测试: 采用 WANG 等^[14]测试方法, 在 25 $^{\circ}\text{C}$ 测试 15 d 内稀释 10 倍后的空白/载药胶束的粒径及其分布, 对每个样品进行 3 次重复测试, 求得平均粒径, 分散性指数 (PDI) 由 Zetasizer 软件计算。

1.4 空白胶束的血清稳定性测试

分别将 3.0 mL 胎牛血清和 2.0 mL 去离子水混合, 后加入 5.0 mL 质量浓度为 1.0 g/L 的聚合物胶束溶液中, 形成体积分数为 30% 的胎牛血清溶液, 用激光粒度仪测量 7 d 内胶束的粒径。

1.5 LCST 测试

使用 UV-Vis 测试胶束的 LCST, 配制质量浓度为 1.0 g/L 的 P(PFPHM₉-*b*-DMAA-*b*-PEGMA₃₆₀) 水溶液, 在 510 nm 下测试 20~50 $^{\circ}\text{C}$ 时溶液的透光率。

1.6 CMC 测试

以芘作为探针测定聚合物的 CMC 值。将 P(PFPHM₉-*b*-DMAA-*b*-PEGMA₃₆₀) 配成 $0.50\sim 1\times 10^{-4}$ g/L。称取 24 mg 芘溶于 100 mL 甲醇配成 1.2 mmol/L 芘的甲醇溶液, 待用。移取 1 mL 芘的甲醇溶液, 加入 99 mL 甲醇稀释至 1.2×10^{-5} mol/L, 密封保存。取

0.5 mL 芘的甲醇溶液置于相应数量的 10 mL 试样瓶中, 放置 24 h 以挥发甲醇, 往含芘的试样瓶中加入 10 mL 不同质量浓度 (ρ , g/L) 的聚合物溶液超声 1 h 并避光平衡 24 h 后进行荧光光谱测试。芘在样品溶液中的浓度为 6×10^{-7} mol/L。测试参数设置为: 发射波长为 373 nm, 在 300~350 nm 内扫描混合溶液。

1.7 空白/载药胶束的激光共聚焦显微镜测试

将 10 μL 质量浓度为 1 g/L 的空白/载药胶束丙酮溶液滴在载玻片中央, 将盖玻片的一端先接触滴液, 随后缓慢放下, 后在激光共聚焦显微镜下观察, 使用 LAS AF Lite 软件处理数据。

1.8 生物毒性测试

采用 MTT 比色法测定空白胶束的生物毒性。使用 DMEM 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% 的 CO_2 饱和湿度培养箱中培养 HepG2 细胞。在 96 孔板中, 每孔 180 μL 接种 5×10^3 个细胞, 分别与 0.016、0.08、0.4、2 和 10 $\mu\text{g/mL}$ 的 DOX/HCl、负载 DOX/HCl 的胶束 [P(PFPHM₉-*b*-DMAA-*b*-PEGMA₃₆₀)-DOX/HCl] 和 P(PFPHM₉-*b*-DMAA-*b*-PEGMA₃₆₀) 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养细胞 48 h 后加入 20 μL MTT 溶液 (质量浓度 5.0 g/L) 培养 4 h 后移除所有溶液, 每孔加入 150 μL DMSO 溶解形成的甲臜晶体, 置于恒温水浴摇床中振荡 (37 $^{\circ}\text{C}$, 100 r/min) 10 min 后测定 490 nm 处的吸光度值, 按下式计算细胞生长抑制率:

$$\text{细胞生长抑制率}/\% = \frac{\text{OD}_{\text{对照}} - \text{OD}_{\text{实验}}}{\text{OD}_{\text{对照}}} \times 100 \quad (1)$$

式中: $\text{OD}_{\text{对照}}$ 为 HepG2 细胞培养后 490 nm 下的吸光度值; $\text{OD}_{\text{实验}}$ 为 HepG2 细胞分别与 DOX/HCl、P(PFPHM₉-*b*-DMAA-*b*-PEGMA₃₆₀)-DOX/HCl 和 P(PFPHM₉-*b*-DMAA-*b*-PEGMA₃₆₀) 培养后 490 nm 处的吸光度值。

1.9 载药及释药性能测试

载药量及包封率按下式计算:

$$\text{载药量}/\% = \frac{m_1}{m_2} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{包封率}/\% = \frac{m_1}{m_3} \times 100 \quad (3)$$

式中: m_1 为聚合物胶束内装载药物的质量, mg; m_2 为载药胶束质量, mg; m_3 为投入药物质量, mg。

对制备的载药胶束进行称重后溶解于 10 mL 无水乙醇, 转移至截留相对分子质量为 3500 的透析袋中, 置于 200 mL pH=6.5 的磷酸盐缓冲溶液中, 参考 XU 等^[15]的研究分别在 37 和 42 $^{\circ}\text{C}$ 下进行透析, 在 1、2、4、8、12、24、48 和 72 h 分别取样 3 mL, 并补充 3 mL 新鲜介质且全程注意避光。配制质量浓

度分别为 1.00、0.75、0.50、0.25、0.10、0.075、0.050、0.025 和 0.010 g/L 的 DOX/HCl 的乙醇溶液，随后，用紫外-可见分光光度计检测其在 495 nm 处的吸光度，绘制 DOX/HCl 乙醇溶液的标准曲线。使用紫外-可见分光光度计测定不同取样样品的吸光度，再根据 DOX/HCl 的乙醇的标准曲线计算出样品中 DOX/HCl 的质量浓度，按下式计算累积药物释放率：

$$\text{累积药物释放率} / \% = \frac{V_e \sum_{n=1}^{n-1} \rho_1 + V_0 \rho_n}{m_{\text{DOX/HCl}}} \times 100 \quad (4)$$

式中： V_e 为补充释放介质的体积，mL； V_0 为释放介质的体积，mL； ρ_n 为第 n 个样品中 DOX/HCl 的质量浓度，g/L； $m_{\text{DOX/HCl}}$ 为胶束中 DOX/HCl 的质量，mg； ρ_1 为第 1 个样品质量浓度，g/L。

2 结果与讨论

2.1 ^{19}F NMR 和 ^1H NMR 分析

PPFPHM₉-Br 的 ^{19}F NMR 如图 1 所示。

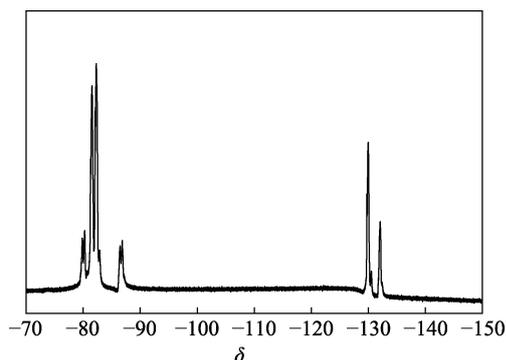


图 1 PPFPHM₉-Br 的 ^{19}F NMR 谱图
Fig. 1 ^{19}F NMR spectrum of PPFPHM₉-Br

由图 1 所示， $\delta = -79.1 \sim -86.6$ 为 $-\text{CF}(\text{CF}_3)\text{CF}_2\text{O}$ 吸收峰， $\delta = -82.2$ 为 $\text{CF}_3-\text{CF}_2-\text{CF}_2-$ 吸收峰， $\delta = -129.9$ 和 -132.0 分别为 $\text{CF}_3-\text{CF}-\text{O}-$ 和 $\text{CF}_3-\text{CF}_2-\text{CF}_2-$ 吸收峰^[16]。图 2 为 HEMA、PFPHM、P(PFPHM₉-*b*-DMAA)-Br、PPFPHM₉-Br 和 P(PFPHM₉-*b*-DMAA-*b*-PEGMA₃₆₀) 的 ^1H NMR 谱图。

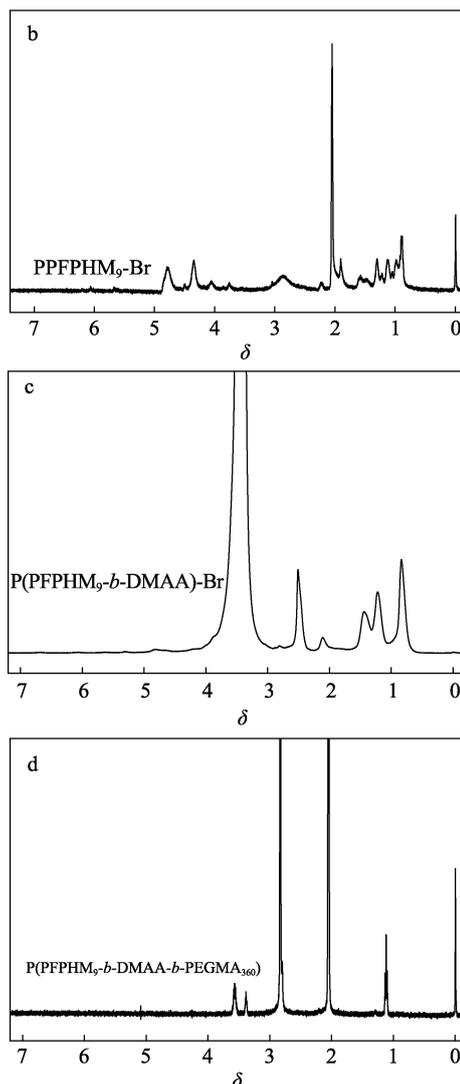
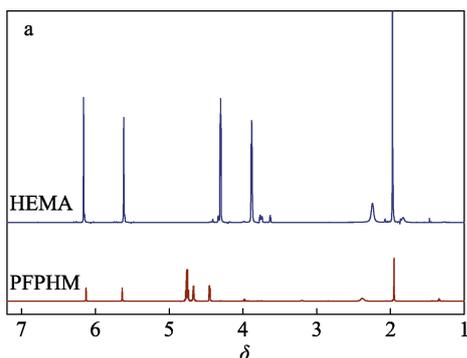


图 2 HEMA 和 PFPHM (a)、PPFPHM₉-Br (b)、P(PFPHM₉-*b*-DMAA)-Br (c) 及 P(PFPHM₉-*b*-DMAA-*b*-PEGMA₃₆₀) (d) 的 ^1H NMR 谱图
Fig. 2 ^1H NMR spectra of HEMA and PFPHM (a), PPFPHM₉-Br (b), P(PFPHM₉-*b*-DMAA)-Br (c) and P(PFPHM₉-*b*-DMAA-*b*-PEGMA₃₆₀) (d)

如图 2a 所示，HEMA 的 ^1H NMR 谱图中， $\delta = 6.1$ 为主链上 CH_2 中 $\text{C}-\text{H}$ 键的吸收峰，因为 $=\text{CH}_2$ 被相邻碳上的氢裂分，而变成两重峰， $\delta = 4.5$ 处为 HEMA 上 $-\text{CH}_2-$ 的质子吸收峰， $\delta = 3.9$ 为主链上 $-\text{O}-\text{CH}_2-$ 的质子吸收峰^[17]， $\delta = 2.2$ 为 $-\text{OH}$ 的氢质子吸收峰， $\delta = 1.9$ 处为 HMEA 的 $-\text{CH}_3$ 质子吸收峰^[18]。在 PFPHM 的 ^1H NMR 谱图中，主链上 $-\text{O}-\text{CH}_2-$ 和 $-\text{CH}_2-$ 吸收峰移至 $\delta = 4.7 \sim 4.4$ ， $\delta = 2.2$ 的 $-\text{OH}$ 吸收峰消失，由此可见，HEMA 和 HFPO 反应生成了 PFPHM。

如图 2b 所示，PPFPHM₉-Br 的 ^1H NMR 中 $=\text{CH}_2$ 吸收峰消失，以及 $\delta = 1.2 \sim 0.9$ 出现了 $-\text{CH}_2-$ 的吸收峰，说明 PFPHM 成功自聚合，生成了大分子引发剂 PPFPHM₉-Br。如图 2c 所示， $\delta = 2.8$ 出现了一个明显的小尖峰，该峰为 $-\text{N}-\text{CH}_3$ 的质子吸收峰^[19]，此

峰的出现说明温度敏感型功能的大分子引发剂 P(PFPHM₉-*b*-DMAA)-Br 成功合成。如图 2d 所示, $\delta=3.4$ 出现了一OH 的质子吸收峰^[20], $\delta=3.6$ 出现了一O—CH₂ 的吸收峰说明 P(PFPHM₉-*b*-DMAA-*b*-PEGMA₃₆₀)三嵌段聚合物成功合成。

2.2 FTIR 分析

HEMA、PPFPHM₉-Br、P(PFPHM₉-*b*-DMAA)-Br、P(PFPHM₉-*b*-DMAA-*b*-PEGMA₃₆₀)的 FTIR 谱图如图 3 所示。

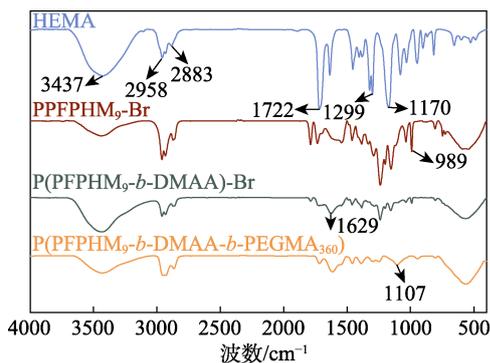


图 3 HEMA、PPFPHM₉-Br、P(PFPHM₉-*b*-DMAA)-Br 和 P(PFPHM₉-*b*-DMAA-*b*-PEGMA₃₆₀)的 FTIR 谱图

Fig. 3 FTIR spectra of HEMA, PPFPHM₉-Br, P(PFPHM₉-*b*-DMAA)-Br and P(PFPHM₉-*b*-DMAA-*b*-PEGMA₃₆₀)

由图 3 可见, 3437 cm⁻¹ 处为 HEMA 的一OH 的伸缩振动吸收峰^[21], 2958 和 2883 cm⁻¹ 处为一CH₃ 和 CH₂—中的 C—H 的伸缩振动吸收峰, 1722 cm⁻¹ 处为 C=O 伸缩振动吸收峰, 1299 cm⁻¹ 为 HEMA 中 C—O—C 非对称伸缩振动吸收峰, 1170 cm⁻¹ 处为 C—O—C 单键伸缩振动吸收峰; 989 cm⁻¹ 处为全氟聚醚酰氟结构—CF(CF₃)的 C—F 振动吸收峰, 400~750 cm⁻¹ 为 CF₃—CF₂ 面内摇摆振动吸收峰, 说明 PPFPHM₉-Br 的成功合成; 1629 cm⁻¹ 处为 P(PFPHM₉-*b*-DMAA)-Br 中 C—N 的弯曲振动吸收峰^[19], 说明 P(PFPHM₉-*b*-DMAA)-Br 的成功合成; 1107 cm⁻¹ 处为 PEGMA₃₆₀ 的 C—O 键伸缩振动吸收峰^[22], 说明 P(PFPHM₉-*b*-DMAA-*b*-PEGMA₃₆₀)的成功合成。

2.3 LCST 分析

图 4 为 P(PFPHM₉-*b*-DMAA-*b*-PEGMA₃₆₀)水溶液透光率随温度的变化及 P(PFPHM₉-*b*-DMAA-*b*-PEGMA₃₆₀)水溶液相分离可逆变化照片。将质量浓度为 1.0 g/L 的 P(PFPHM₉-*b*-DMAA-*b*-PEGMA₃₆₀)在透光率为 50%时的温度定义为 LCST^[23]。由图 4a 所示, 随着温度的升高, 样品溶液的透光率开始降低, 在 45 °C 时趋于稳定, 在 38.7 °C 时透光率为 50%, 所以 P(PFPHM₉-*b*-DMAA-*b*-PEGMA₃₆₀)的 LCST 为 38.7 °C; 由图 4b 所示, 质量浓度为 1.0 g/L 的 P(PFPHM₉-*b*-DMAA-*b*-PEGMA₃₆₀)溶液在 25 °C 较为澄清, 在加热

至 45 °C 发生清转浊变化, 溶液变浑浊, 说明 P(PFPHM₉-*b*-DMAA-*b*-PEGMA₃₆₀)具有热响应性。

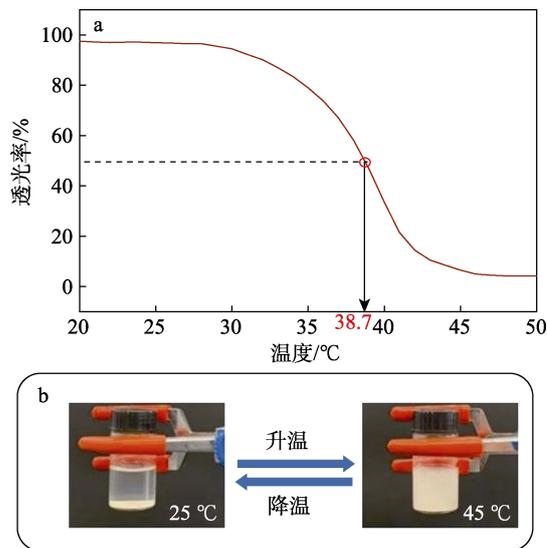


图 4 P(PFPHM₉-*b*-DMAA-*b*-PEGMA₃₆₀)水溶液透光率随温度的变化 (a) 及 P(PFPHM₉-*b*-DMAA-*b*-PEGMA₃₆₀)水溶液相分离可逆变化照片 (b)

Fig. 4 Transmittance of P(PFPHM₉-*b*-DMAA-*b*-PEGMA₃₆₀) aqueous solution with temperature (a) and phase separation reversible change photos of P(PFPHM₉-*b*-DMAA-*b*-PEGMA₃₆₀) aqueous solution (b)

2.4 CMC 分析

以芘的荧光探针法测定 P(PFPHM₉-*b*-DMAA-*b*-PEGMA₃₆₀)聚合物自组装成胶束的 CMC, 结果如图 5a 所示。由图 5a 可知, 随着 P(PFPHM₉-*b*-DMAA-*b*-PEGMA₃₆₀)质量浓度的增加, 芘的荧光强度不断增加且第三峰发生化学位移, 逐渐从 336.1 nm 红移至 338.4 nm, 说明芘从亲水环境向疏水环境变化^[23]。以 $I_{336.1}$ 和 $I_{338.4}$ 的比值为纵坐标、聚合物溶液质量浓度的对数为横坐标作图, 如图 5b 所示。由图 5b 可知, $I_{336.1}/I_{338.4}$ 急剧增加的转折点即为聚合物的 CMC 值, 计算得出 P(PFPHM₉-*b*-DMAA-*b*-PEGMA₃₆₀)的 CMC 值为 1.0 μg/mL。

增加胶束内部的疏水性能降低聚合物胶束的 CMC 值, 由于含氟聚合物具有疏脂性和极端疏水性, 也称为亲氟性, 且与数量相同的碳氢化合物相比, 氟碳化合物的疏水性要高出 1.5 倍^[9], 因此, 将含氟段掺入聚合物胶束中, 降低了胶束的 CMC 值, 使胶束获得稳定的自组装能力。

图 6 为本研究与其他文献^[5,24]中 CMC 的比较。如图 6 所示, 本研究制备的 P(PFPHM₉-*b*-DMAA-*b*-PEGMA₃₆₀)胶束 CMC 值低于常规碳链两亲性聚合物, 而具有较低的 CMC, 表明聚合物胶束具有良好

的热力学稳定性,可防止聚合物胶束在给药时被稀释而过早地释放药物,从而减少药物的使用量,达到降低药物的毒副作用的目的。

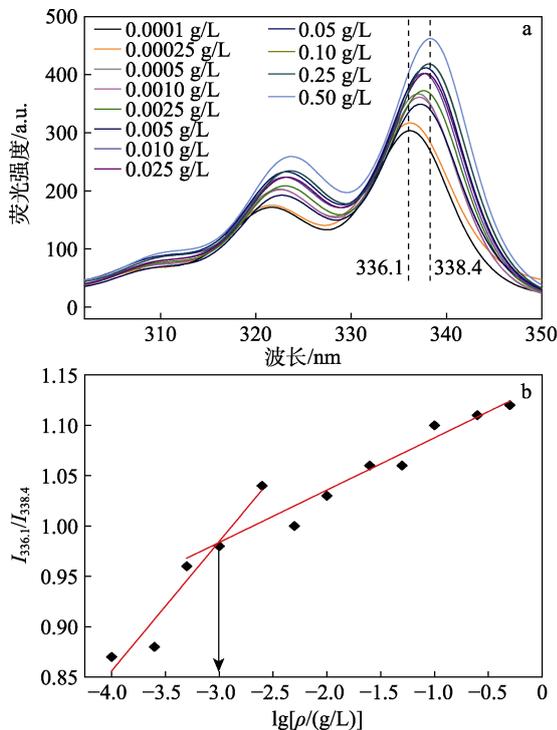
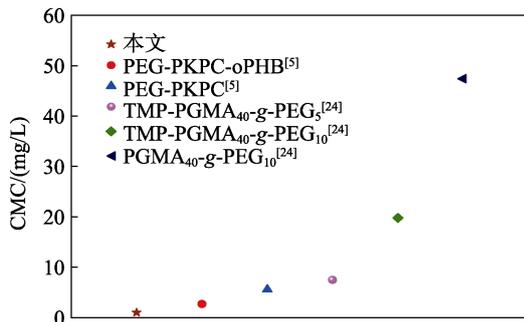


图 5 不同质量浓度 P(PFPHM₉-b-DMAA-b-PEGMA₃₆₀) 甲醇溶液的荧光光谱 (a); $I_{338.4}/I_{336.1}$ 与 P(PFPHM₉-b-DMAA-b-PEGMA₃₆₀) 质量浓度的对数关系 (b)

Fig. 5 Fluorescence spectra of P(PFPHM₉-b-DMAA-b-PEGMA₃₆₀) methanol solutions with different mass concentrations (a) and relationship between $I_{338.4}/I_{336.1}$ and P(PFPHM₉-b-DMAA-b-PEGMA₃₆₀) mass concentration (b)



注: TMP-PGMA₄₀-g-PEG₅ 为三(2-溴异丁酰基)丙烷-聚甲基丙烯酸缩水甘油酯₄₀-聚乙二醇₅; TMP-PGMA₄₀-g-PEG₁₀ 为三(2-溴异丁酰基)丙烷-聚甲基丙烯酸缩水甘油酯₄₀-聚乙二醇₁₀; PGMA₄₀-g-PEG₁₀ 为聚甲基丙烯酸缩水甘油酯₄₀-聚乙二醇₁₀

图 6 不同两性亲聚合物 CMC 的比较^[5,24]

Fig. 6 Comparison of different amphiphilic polymers CMC^[5,24]

2.5 HepG2 细胞毒性分析

通过 MTT 比色法对 DOX/HCl、载药胶束、空白胶束进行 HepG2 细胞毒性实验,结果见图 7。

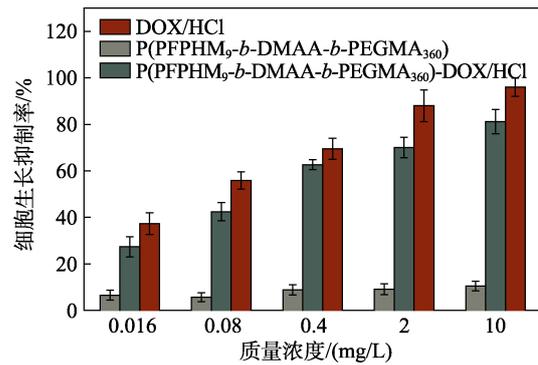


图 7 DOX/HCl、P(PFPHM₉-b-DMAA-b-PEGMA₃₆₀) 和 P(PFPHM₉-b-DMAA-b-PEGMA₃₆₀)-DOX/HCl 的生物毒性

Fig. 7 Biological toxicity of DOX/HCl, P(PFPHM₉-b-DMAA-b-PEGMA₃₆₀) and P(PFPHM₉-b-DMAA-b-PEGMA₃₆₀)-DOX/HCl

如图 7 所示,随着空白胶束的质量浓度从 0.016 μg/mL 增加至 10 μg/mL 时, HepG2 细胞生长抑制率都低于 10%,表明 P(PFPHM₉-b-DMAA-b-PEGMA₃₆₀) 胶束具有良好的生物相容性,而载药胶束和 DOX/HCl 对 HepG2 细胞生长抑制率明显高于空白胶束,表明载药胶束对 HepG2 细胞具有与单纯 DOX/HCl 类似的抑制作用,有望用于肿瘤治疗作用,可作为纳米载体适用于生物医学中。

2.6 胶束的粒径分析

图 8 为空白/载药胶束的粒径分布图及载药胶束的 PDI。

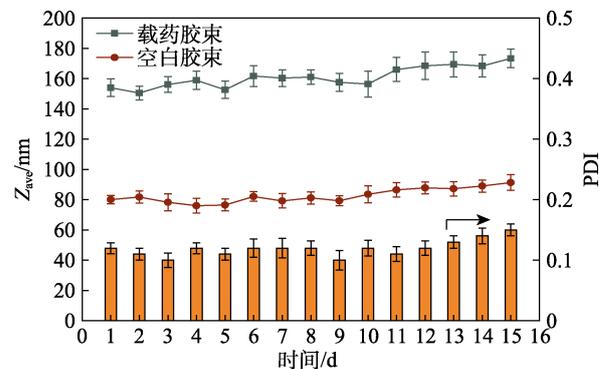


图 8 空白/载药胶束的粒径分布图及载药胶束的 PDI
Fig. 8 Particle size distribution and PDI of blank/drug-loaded micelles

如图 8 所示,15 d 内空白胶束 P(PFPHM₉-b-DMAA-b-PEGMA₃₆₀) 的粒径大约为 76~91 nm,载药胶束的粒径约 150~173 nm, PDI 为 0.10~0.15,表明聚合物胶束具有良好的动力学稳定性,且分散性较好,就载药前后粒径对比,载药后胶束粒径明显增大,表明胶束空腔内成功包裹 DOX/HCl,与 THAMBI 等^[25]的研究报道一致。

2.7 空白/载药胶束的激光共聚焦显微镜分析

图 9 为空白/载药胶束的激光共聚焦显微镜图。

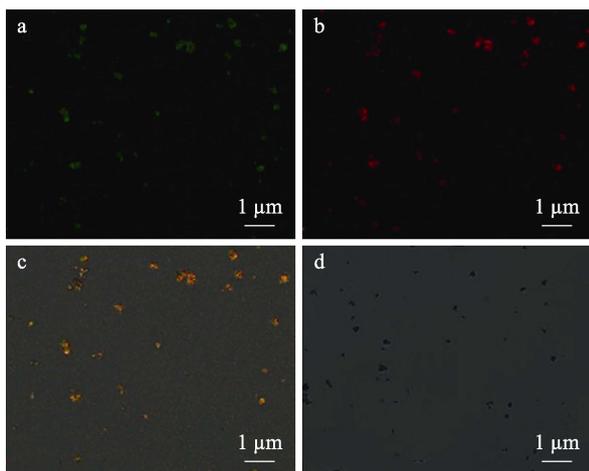


图 9 载药胶束 488 nm (a)、载药胶束 552 nm (b)、载药胶束 488 和 552 nm (c)、空白胶束 488 和 552 nm (d) 的激光共聚焦显微镜图

Fig. 9 Confocal microscopy images of drug-loaded micelles 488 nm (a), drug-loaded micelles 552 nm (b), drug-loaded micelles 488 and 552 nm (c) and blank micelles 488 and 552 nm (d)

由图 9a、b 可见, 在激发波长为 488 和 552 nm 下, 载药胶束中 DOX/HCl 分别发射出绿色和红色荧光; 由图 9c 可见, 图 9a、b 中 DOX/HCl 发出的绿色和红色荧光重合下呈现橙色荧光; 图 9d 为 488 和 552 nm 下在空白胶束的激光共聚焦显微镜图, 并未观察到荧光。由此说明, DOX/HCl 的成功负载, 表明 P(PFPHM₉-*b*-DMAA-*b*-PEGMA₃₆₀) 聚合物胶束有潜力作为纳米载体应用于生物医学中。

2.8 空白/载药胶束的血清稳定性分析

图 10 为空白/载药胶束在血清中的稳定性。

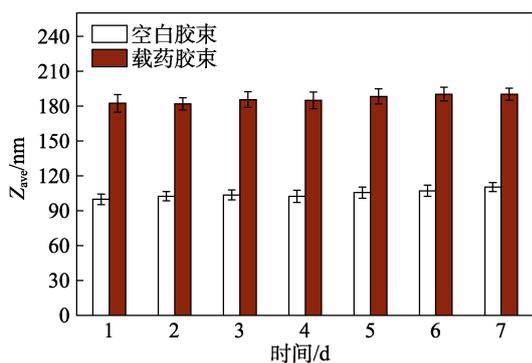


图 10 空白/载药胶束在血清中的稳定性

Fig. 10 Stability of blank/drug-loaded micelles in serum

如图 10 所示, 载药胶束置于血清中导致粒径增大是因为胶束在进入胎牛血清后, 表面吸附了一层或多层蛋白形成了蛋白冠, 从而导致聚合物胶束的尺寸变大^[26], 聚合物胶束 7 d 内的粒径较为稳定, 表明聚合物胶束具有良好的血清稳定性。

2.9 载药胶束的载药量及包封率分析

采用透析法制备 P(PFPHM₉-*b*-DMAA-*b*-

PEGMA₃₆₀) 空白/载药胶束。经过公式 (2) 和公式 (3) 计算可得, P(PFPHM₉-*b*-DMAA-*b*-PEGMA₃₆₀) 的载药量为 20.6%, 包封率为 86.6%, 表明该聚合物胶束能有效包裹 DOX/HCl。

2.10 载药胶束的体外释放性能分析

图 11 为 37 和 42 °C 时不同时间下载药胶束中 DOX/HCl 体外累积释放率。从图 11 可见, 随着释放时间的延长, DOX/HCl 累积释放率升高, 且在 42 °C 下 DOX/HCl 释放率明显快于 37 °C, 72 h 的药物累积释放率达 91.9%。而在 37 °C 时, 72 h 的累积药物释放率仅为 35.4%。这是因为在 LCST 前后水溶液会发生清-浊相转变, 温度低于 LCST 时, 酰胺基与水分子有氢键作用, 当温度高于 LCST 时, 氢键作用减弱或断裂, 聚合物链相互缠结^[27], 使得 DOX/HCl 更容易释放, 且其亲疏水性、体积、胶束结构等都会发生显著的变化, 因此, 在 42 °C 释放率明显快于 37 °C。

在 37 °C 时, 药物释放得缓慢, 有利于药物在体内的循环, 降低药物使用剂量, 减少药物对人体的副作用。而在 42 °C 时药物快速释放, 有利于在短时间内作用于病患位置, 减少治疗时间。

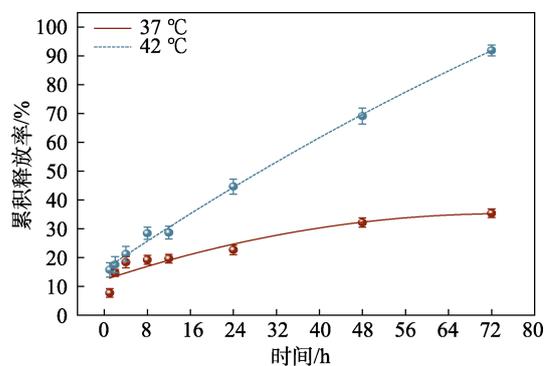


图 11 37 和 42 °C 时载药胶束体外模拟释放曲线

Fig. 11 *In vitro* simulated release curves of drug-loaded micelles at 37 and 42 °C

3 结论

在进行 3 次原子转移自由基聚合合成了两亲性三嵌段共聚物 P(PFPHM₉-*b*-DMAA-*b*-PEGMA₃₆₀)。通过 NMR 和 FTIR 对 PFPHM、P(PFPHM₉-*b*-DMAA)-Br 和 P(PFPHM₉-*b*-DMAA-*b*-PEGMA₃₆₀) 的结构进行表征, 证实得到目标聚合物。用荧光探针技术测定并计算 P(PFPHM₉-*b*-DMAA-*b*-PEGMA₃₆₀) 的 CMC, 在水性介质中其 CMC 值为 1.0 μg/mL, 说明聚合物胶束具有良好的热力学稳定性; 且在 15 d 内聚合物胶束的 DLS 测试以及 7 d 内胶束的血清稳定测试表明, 胶束具有良好的动力学稳定性; 在 HepG2 细胞

毒性实验中, 空白胶束的生物相容性良好; 在粒径测试中, 胶束的粒径载药前后发生明显变化, 且通过荧光共聚焦显微镜测试辅助证明, DOX/HCl 成功包裹于该聚合物胶束的内核中, 聚合物胶束具有作为纳米药物载体的潜力应用于生物医学中。选用 DOX/HCl 为模型药物, 在体外释放实验中, 聚合物 P(PFPHM₉-*b*-DMAA-*b*-PEGMA₃₆₀) 的包裹效果良好, 其载药量和包封率可达 20.6% 和 86.6%, 在 42 和 37 °C 下在 72 h 释药率分别为 91.9% 和 35.4%, 说明 P(PFPHM₉-*b*-DMAA-*b*-PEGMA₃₆₀) 具有温度敏感性。该文为设计高效的功能性刺激响应纳米载体提供一种潜在有效简便的方法。

参考文献:

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2019[J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2019, 69(1): 7-34.
- [2] POURMOAZZEN Z, BAGHERI M, ENTEZAMI A A, *et al.* pH-responsive micelles composed of poly(ethylene glycol) and cholesterol-modified poly(monomethyl itaconate) as a nanocarrier for controlled and targeted release of piroxicam[J]. Journal of Polymer Research, 2013, 20(12): 1-12.
- [3] CHEN Q, ZHENG J W, YUAN X Z, *et al.* Folic acid grafted and tertiary amino based pH-responsive pentablock polymeric micelles for targeting anticancer drug delivery[J]. Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications, 2018, 82: 1-9.
- [4] XU X Y, ZHANG X F, WANG X H, *et al.* Comparative study of paclitaxel physically encapsulated in and chemically conjugated with PEG-PLA[J]. Polymers for Advanced Technologies, 2009, 20(11): 843-848.
- [5] DOMIŃSKI A, KRAWCZYK M, KONIECZNY T, *et al.* Biodegradable pH-responsive micelles loaded with 8-hydroxyquinoline glycoconjugates for Warburg effect based tumor targeting[J]. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2020, 154: 317-329.
- [6] MAYSINGER D, LOVRIĆ J, EISENBERG A, *et al.* Fate of micelles and quantum dots in cells[J]. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2007, 65(3): 270-281.
- [7] LI B (李彬), XIA Y (夏瑶), AN H L (安洪利), *et al.* Research progress in the design, synthesis and application properties of fluorine-containing polyimides[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2021, 38(7): 1314-1324.
- [8] ZHU J X (朱建新), YANG J J (杨建军), WU Q Y (吴庆云), *et al.* Preparation and properties of silicone-containing waterborne polyurethane grafted with organic fluorine[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2021, 38(3): 512-517.
- [9] JEE J P, MCCOY A, MECOZZI S. Encapsulation and release of amphotericin B from an ABC triblock fluorinated copolymer[J]. Pharmaceutical Research, 2012, 29(1): 69-82.
- [10] CHILKOTI A, DREHER M R, MEYER D E, *et al.* Targeted drug delivery by thermally responsive polymers[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2002, 54(5): 613-630.
- [11] HU Y, DARCOS V, MONGE S, *et al.* Thermo-responsive drug release from self-assembled micelles of brush-like PLA/PEG analogues block copolymers[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2015, 491(1/2): 152-161.
- [12] WASSEL E, WESNER D, SCHÖNHERR H. Colloidal force probe study of poly[di(ethylene glycol) methylether methacrylate] homopolymer brush layers in aqueous media at different temperatures[J]. European Polymer Journal, 2017, 89: 440-448.
- [13] SZWEDA D, SZWEDA R, DWORAK A, *et al.* Thermoresponsive poly[oligo (ethylene glycol) methacrylate]s and their bioconjugates-Synthesis and solution behavior[J]. Polimery, 2017, 62(4): 298-310.
- [14] WANG Y, THIES-WEESIE D M, BOSMAN E D, *et al.* Tuning the size of all-HPMA polymeric micelles fabricated by solvent extraction[J]. Journal of Controlled Release, 2022, 343: 338-346.
- [15] XU N, HUANG X B, YIN G F, *et al.* Thermosensitive star polymer pompons with a core-arm structure as thermo-responsive controlled release drug carriers[J]. RSC Advances, 2018, 8(28): 15604-15612.
- [16] FRIESEN C M, AMEDURI B. Radical copolymerization of vinylidene fluoride (VDF) with oligo (hexafluoropropylene oxide)perfluorovinyl ether macromonomer to obtain PVDF-g-oligo (HFPO) graft copolymers[J]. Macromolecules, 2015, 48(19): 7060-7070.
- [17] GELIN M P, AMEDURI B. Synthesis of an original poly(vinylidene fluoride-co-hexafluoropropylene)-g-perfluoropolyether graft copolymer[J]. Journal of Fluorine Chemistry, 2003, 119(1): 53-58.
- [18] FERREIRA L, VIDAL M M, GIL M H. Evaluation of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) gels as drug delivery systems at different pH values[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2000, 194(2): 169-180.
- [19] TAKEMOTO Y, AJIRO H, AKASHI M. Hydrogen-bonded multilayer films based on poly(*N*-vinylamide) derivatives and tannic acid[J]. Langmuir, 2015, 31(24): 6863-6869.
- [20] SAVIN C L, POPA M, DELAITE C, *et al.* Chitosan grafted-poly(ethylene glycol) methacrylate nanoparticles as carrier for controlled release of bevacizumab[J]. Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications, 2019, 98: 843-860.
- [21] DING D R (丁德润), SI X W (司晓伟), YAO Y H (姚有红). Characterization and drug delivery behavior of quaternary amphiphilic chitosan derivatives[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2012, 29(6): 549-553.
- [22] DURAN A, SOYLAK M, TUNCEL S A. Poly(vinyl pyridine-poly(ethylene glycol) methacrylate-ethylene glycol dimethacrylate) beads for heavy metal removal[J]. Journal of Hazardous Materials, 2008, 155(1/2): 114-120.
- [23] DAI M Y (代明允), TIAN Y (田野), LIU Y (刘鹰), *et al.* Preparation and temperature responsive properties of 2-hydroxy-3-allyloxypropyl hydroxyethyl celluloses[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2019, 36(4): 595-601, 608.
- [24] SONG X T, YUAN K, LI H Y, *et al.* Dual pseudo and chemical crosslinked polymer micelles for effective paclitaxel delivery and release[J]. ACS Applied Bio Materials, 2020, 3(4): 2455-2465.
- [25] THAMBI T, DEEPAGAN V, YOO C K, *et al.* Synthesis and physicochemical characterization of amphiphilic block copolymers bearing acid-sensitive orthoester linkage as the drug carrier[J]. Polymer, 2011, 52(21): 4753-4759.
- [26] GUYOMARC'H F, LAW A J, DALGLEISH D G. Formation of soluble and micelle-bound protein aggregates in heated milk[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(16): 4652-4660.
- [27] ZHANG Z L (张子路), XU L (徐亮), ZANG C Y (臧春雨), *et al.* Precise synthesis and thermoresponsive property of block copolymers consisting of *N,N*-diethylacrylamide and *N,N*-dimethylacrylamide[J]. Acta Polymerica Sinica (高分子学报), 2019, 50(4): 384-392.