

PEGMA 磁性纳米凝胶的光化学原位合成、表征及载药性能研究

孙汉文^{①*}, 张连营^①, 朱新军^①, 孔春燕^①, 张存兰^①, 姚思德^{②*}

① 德州学院化学系, 德州 253023;

② 中国科学院上海应用物理研究所, 上海 201800

* 联系人, E-mail: hanwen916@163.com, yaoside@sinap.ac.cn

收稿日期: 2008-03-10; 接受日期: 2008-10-05

山东省自然科学基金(批准号: Q2006F01)、山东省科技攻关计划(批准号: 2007GG3WZ02066)和山东省教育厅科研发展计划(批准号: J07WC01)资助项目

摘要 报道了一种应用光化学法一步原位合成具有良好亲水性和生物相容性的 PEGMA 磁性纳米凝胶的方法。在亲水性 Fe_3O_4 纳米粒子水体系中, 以甲基丙烯酸聚乙二醇酯(PEGMA)为单体, *N,N*-亚甲基双丙烯酰胺(MBA)为交联剂, 紫外光辐照下原位聚合制备了聚(甲基丙烯酸聚乙二醇酯)磁性纳米凝胶(简称为 PEGMA 磁性纳米凝胶), 应用傅立叶变换红外光谱(FTIR)和热重分析仪(TGA)对磁性纳米凝胶的表面官能团和组分进行了分析, 结果显示经紫外辐照后 PEGMA 成功包覆在 Fe_3O_4 纳米粒子表面, 从而制备得到 PEGMA 磁性纳米凝胶, 磁性 Fe_3O_4 含量高达 53.4%; 对磁性纳米凝胶的形貌、粒径、表面 Zeta 电位及磁学性质等进行了表征, 结果显示磁性纳米凝胶形状较规则, 具有核-壳结构, 干燥状态下平均粒径约为 46 nm, 而湿态下平均水合粒径为 68.4 nm, 表明其外层的水凝胶在水相中具有较强的吸水膨胀能力; 磁性纳米凝胶具有超顺磁性, 饱和磁化强度为 58.6 emu/g, 在生理 pH 下, 磁性纳米凝胶的表面 Zeta 电位为 -16.3~ -17.3 mV, 能够减少与血红蛋白的吸附作用, 可在血液中保持稳定。在其载药性能中发现, PEGMA 磁性纳米凝胶对模型药物阿霉素具有良好缓释性能。该超顺磁性纳米凝胶具有高的饱和磁化强度, 生理 pH 下负的表面 Zeta 电位, 以及良好的亲水性和生物相容性等特性, 预示着在靶向载药等生物医学领域有着广泛的应用前景。

关键词

磁性纳米凝胶

光化学制备

甲基丙烯酸聚乙二醇酯

药物载体

阿霉素

磁性纳米凝胶是一种纳米尺度的、具有核-壳结构的磁性高分子复合材料, 内核为磁性 Fe_3O_4 (或 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 等)磁性纳米微粒, 外层为高分子水凝胶, 兼有内核的磁响应性及外层水凝胶的生物相容性、溶胀性、可修饰性等特点, 在蛋白/酶固定、生物分离、

DNA 检测、磁共振成像、靶向药物载体等生物医学领域有着广泛的应用前景^[1-4]。甲基丙烯酸聚乙二醇酯(poly(ethylene glycol) methacrylate, PEGMA)是聚乙二醇(poly(ethylene glycol), PEG)的一种重要派生物, 每个单体都包括一个端羟基, 具有良好的亲水

性及生物相容性，在生物医学领域有着诱人的前景^[5,6]，最近Fan等将PEGMA修饰在Fe₃O₄ 纳米粒子表面，可明显提高其亲水性和生物相容性^[7]，但其制备过程繁杂。本文应用具有自主知识产权的紫外光聚合方法^[8]，以PEGMA为单体，N,N-亚甲基双丙烯酰胺(N,N'-methylene-bis-(acrylamide), MBA)为交联剂，应用紫外辐照聚合，一步法制备了具有溶胀性能的聚(甲基丙烯酸聚乙二醇酯)包覆磁性纳米凝胶，对其相关性质进行了表征，并以阿霉素(doxorubicin, DOX)为模型药物，初步考察了PEGMA磁性纳米凝胶对DOX的缓释性能。

1 实验

1.1 试剂和仪器

甲基丙烯酸聚乙二醇酯(PEGMA, $M_n \sim 360$)，分析纯，购自 Sigma 公司；N,N-亚甲基双丙烯酰胺(MBA)，分析纯，购自中国医药集团上海化学试剂公司，重结晶后使用；FeCl₃·6H₂O, Na₂SO₃，均为分析纯，购自中国医药集团上海化学试剂公司；注射用盐酸阿霉素购自法玛西亚有限公司；高纯氮气(99.99%)购自德州龙力气体有限公司；实验所用水均为三蒸水。

数显电动搅拌器(德国 IKA 公司)用于 Fe₃O₄ 纳米粒子及磁性纳米凝胶的制备；英国马尔文 Malvern 公司光子相关光谱(photon correlation spectroscopy, PCS) (Zetasizer Nano ZS) 用于测定磁性纳米凝胶的平均水合粒径、粒径分布及表面 Zeta 电位；波长范围 4000~500 cm⁻¹ Nicolet 傅立叶变换红外光谱用于测定磁性纳米凝胶的表面官能团；热重分析仪(TGA-60, 日本岛津)进行磁性纳米凝胶的组分含量分析；扫描电子显微镜(SEM, LEO 1530VP)、透射电子显微镜(TEM, Philips, CM120) 用于观测磁性纳米凝胶的形貌；振动样品磁强计(VSM, Princeton Applied Research Model 155)用于测定样品室温下的磁学性质；UV-Vis 分光光度计(UV-1800, 日本岛津) 用于检测磁性纳米凝胶的稳定性；荧光分光光度计(日立F-4500)用于阿霉素的定量检测。

实验所用紫外光源为对称 2 根 8 W 低压汞灯管，辐射以波长 253.17 nm 为主的短波紫外线，系上海金光灯具厂 ZSZ 系列紫外灯。装置如图 1 所示。

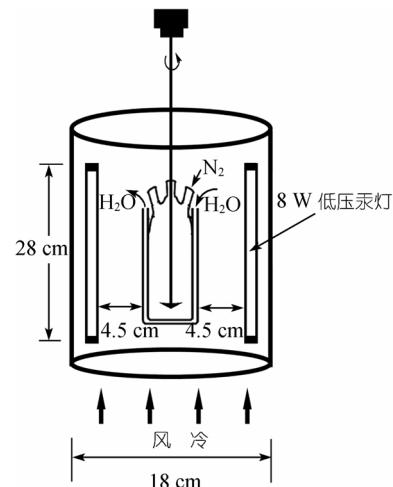


图 1 光化学反应装置示意图

1.2 磁性 Fe₃O₄ 纳米粒子的合成

Fe₃O₄ 纳米粒子采用部分还原法制备，具体过程如下：称取 3.25 g FeCl₃·6H₂O，配成 100 mL 溶液。取 Na₂SO₃ 0.63 g 溶于 5 mL H₂O 中，超声溶解充分，取 2 mL 稀释至 5 mL。在三颈瓶中加入 100 mL FeCl₃ 溶液，在 30°C, 1000 r/min 与通 N₂ 条件下，用恒压漏斗快速加入 5 mL Na₂SO₃ 溶液。此时溶液颜色由黄变深很快又变浅，将搅拌器转速调为 2000 r/min，取 25% 浓氨水 24 mL 稀释至 40 mL 加入反应器中。将体系迅速升温至 72°C，持续一段时间后撤去加热装置，继续通 N₂ 和 2000 r/min 搅拌。自然冷却后，用三蒸水反复洗涤去掉 NaCl, NH₄Cl 等盐类，加入少量 2 mol/L HCl，过滤后调 pH 值为 2，测定固含量为 9 mg/mL，保存备用。

1.3 PEGMA 磁性纳米凝胶的光化学制备

将 10 mg Fe₃O₄ 纳米粒子稀释为 60 mL，加入柱状夹层石英烧瓶中，N₂ 保护，在 500 r/min 转速搅拌下加入 186 mg PEGMA，搅拌 10 min 使溶液充分混合，加入 0.8 mL 1% MBA 溶液，同时进行紫外灯辐照，反应 20 min，整个反应过程中用夹层自来水冷却，反应完毕，磁性分离，用三蒸水反复清洗后保存备用。

1.4 PEGMA 磁性纳米凝胶的载药及体外释药

为了确定 PEGMA 磁性纳米凝胶作为药物载体的可行性，本实验以抗肿瘤药物阿霉素为模型药物，

研究了 PEGMA 磁性纳米凝胶对阿霉素的载药及缓释效应.

精确配制不同浓度 DOX 标准品, 溶于生理盐水, 于激发/发射波长为 502/554 nm 下检测各浓度(C)相应的荧光值(F), 建立回归方程为: $F=596.4 C + 21.37$, $r=0.9996$, $n=4$. 取 1 mg 磁性纳米凝胶于 5 mL 离心管中, 磁性分离, 弃上清, 加入不同量的阿霉素溶液, 避光摇床反应 10 h, 磁性分离, 取上清液于 502/554 nm 下检测荧光强度, 测定上清液中 DOX 荧光值, 根据回归方程计算上清液中 DOX 含量, 计算磁性纳米凝胶对阿霉素的吸附量.

精确配制不同浓度DOX标准品, 溶于模拟体液(simulated body fluid, SBF, pH=7.4), 于激发/发射波长为 502/554 nm下检测各浓度(C)相应的荧光值(F), 建立回归方程为: $F = 581.2 C + 24.40$, $r = 0.9969$, $n = 4$. 参照文献方法^[9], 将 1 mg 吸附阿霉素的磁性纳米凝胶(载DOX量为 60 μg)溶于 5 mL SBF, 混匀避光反应一定时间, 磁性分离, 取 0.1 mL 上清液于 502/554 nm下检测荧光强度, 测定上清液中阿霉素浓度, 同时, 向反应体系中加入 0.1 mL 新鲜 SBF, 继续温育. 在 t_i 时刻处的药物释放量 M_i 按公式 1 计算.

$$M_i = C_i V + \sum C_{i-1} V_s, \quad (1)$$

C_i 为 t_i 时刻取出的 0.1 mL SBF 中的 DOX 浓度, V 为释放环境的总体积(即 5 mL), V_s 为取出的样品种体积(即 0.1 mL).

在时间 t_i 处的释放率按(2)式计算.

$$\text{释放率}(\%) = \frac{\text{时间 } t_i \text{ 处的药物释放量}}{\text{磁性纳米凝胶载药量}} \times 100\%. \quad (2)$$

2 结果与讨论

2.1 PEGMA 磁性纳米凝胶制备及组分分析

在 Fe_3O_4 纳米粒子、PEGMA 单体及 MBA 混合液中, 由于 Fe_3O_4 纳米粒子具有高的表面能, 能将体系中的 PEGMA 单体及 MBA 吸附在表面, 由于 Fe_3O_4 的光子截面远大于单体或交联剂分子的光子截面, 当紫外光辐照时, Fe_3O_4 纳米粒子吸收了近乎全部的光子, 在表面形成“价带空穴”(valence band holes)和“导带电子”(conduction band electrons)^[10,11], 价带空穴激发单体形成单体自由基, 从而引发光化学聚合, 在交

联剂作用下, 将单体聚合包覆在 Fe_3O_4 纳米粒子表面. 另外, 高速搅拌及对称辐照可使光聚合反应在整个体系中均匀发生, 最终制备表面包覆 PEGMA 的磁性纳米凝胶(图 2). 在水相环境中, 凝胶表层亲水的 PEG 链伸展在最外层, 推测该磁性纳米凝胶可能的结构为 Fe_3O_4 纳米粒子表面紧包覆一层甲基丙烯酸凝胶, 在凝胶外层伸展着大量的 PEG 链.

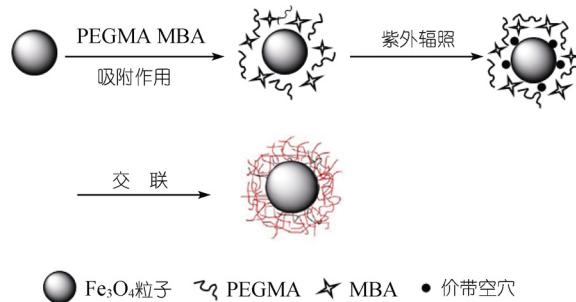


图 2 光化学聚合制备 PEGMA 磁性纳米凝胶示意图

为确定 PEGMA 对 Fe_3O_4 纳米粒子的包覆, 将制备的磁性纳米凝胶反复洗涤真空干燥后, 进行红外光谱测定. 图 3 为 Fe_3O_4 纳米粒子及磁性纳米凝胶的红外光谱, 曲线 2 中 1726 和 1113 cm^{-1} 分别对应于 PEGMA 中 $\text{C}=\text{O}$ 键和 $\text{C}-\text{O}$ 键的伸缩振动, 3423 cm^{-1} 宽峰对应 $\text{O}-\text{H}$ 的伸缩振动, 2871 和 1470~1380 cm^{-1} 对应饱和 CH_2 的伸缩和弯曲振动,

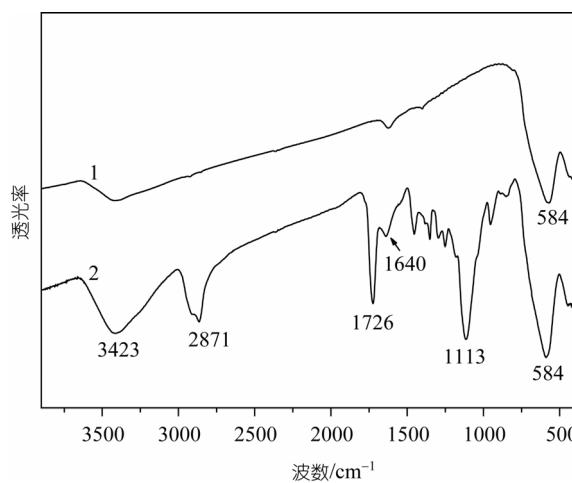


图 3 Fe_3O_4 纳米粒子(1)及 PEGMA 磁性纳米凝胶(2)的红外光谱

1640 cm⁻¹ 对应 MBA 中酰胺键 CONH 的特征振动, 曲线 1, 2 中 584 cm⁻¹ 强吸收对应于 Fe₃O₄ 特征吸收峰。综上可以看出 PEGMA 已成功包覆在 Fe₃O₄ 粒子表面, 同时也赋予该磁性纳米凝胶良好的亲水性和生物相容性, 为其生物医学应用奠定了基础。磁性纳米凝胶样品真空干燥 48 h 后进行 TGA 测定, 结果见图 4, 由室温升至 120℃ 失重 1.1%, 为样品中含有的少量水分, 样品在 120~300℃ 间失重 26.8%, 推测该部分主要为伸展在磁性纳米凝胶表面的 PEG 组分, 在 320~450℃ 间样品失重 18.7%, 推测该部分主要为紧贴在 Fe₃O₄ 纳米粒子表面的聚甲基丙烯酸骨架部分, 120~450℃ 间失重为磁性纳米凝胶的壳层组分; 样品在 500℃ 后趋于恒定, 为 Fe₃O₄ 纳米粒子, 占总重量的 53.4%, 具有较高的磁含量。

2.2 PEGMA 磁性纳米凝胶的性能表征

为确认 PEGMA 磁性纳米凝胶的形貌, 将其多次清洗后, 进行 SEM、TEM 表征, 结果如图 5 所示。由图可见, PEGMA 磁性纳米凝胶形状较规则, 具有核-壳结构, 粒径约为 46 nm。而应用 PCS 所测得磁性纳米凝胶在湿态下的平均水合粒径为 68.4 nm, 且具有窄的粒径分布(如图 6), 说明该磁性纳米凝胶在水相中具有很强的吸水膨胀性能, 这在药物控释方面具有良好应用^[12]。

图 7 为 PEGMA 磁性纳米凝胶的磁滞回线, 从图中可以看出, PEGMA 磁性纳米凝胶矫顽力几乎为零,

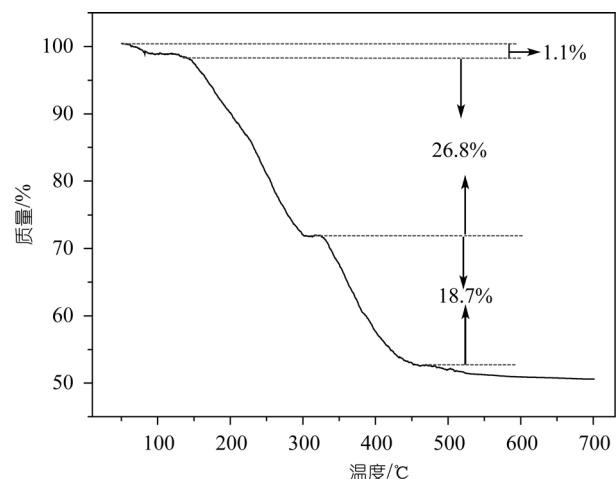


图 4 PEGMA 磁性纳米凝胶的 TGA 曲线

具有超顺磁性, 饱和磁化强度为 58.6 emu/g, 略低于 Fe₃O₄ 纳米粒子(65.46 emu/g)。

Zeta 电位是纳米粒子的一个重要的特征参数, 与纳米粒子体系的稳定性、尤其是在动物体内的稳定性密切相关。我们考察了磁性纳米凝胶在不同 pH 下的表面 Zeta 电位情况, 结果如图 8 所示, 该磁性纳米凝胶的等电点 pI=5.8, 在生理条件下(pH=7.35~7.45) 表面 Zeta 电位为 -16.3~ -17.3 mV, Zeta 电位的绝对值较高, 则体系中不同粒子间的排斥作用较强, 可减少粒子之间的团聚, 同时, 负的 Zeta 电位可以减少磁性纳米凝胶与血红蛋白之间的结合, 有利于在体内环境中保持稳定。

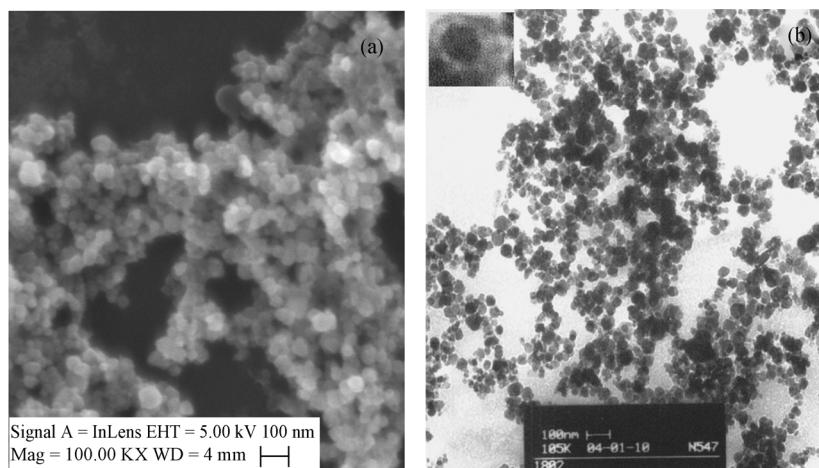


图 5 PEGMA 磁性纳米凝胶的 SEM 照片(a)和 TEM 照片(b)

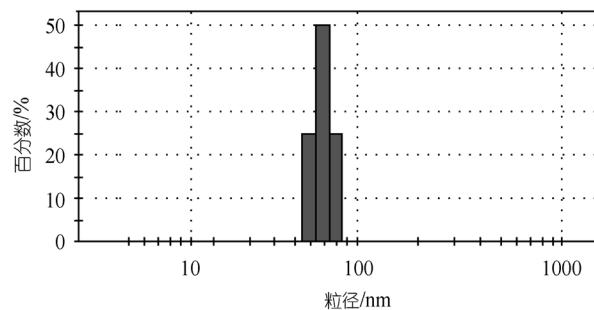


图 6 PEGMA 磁性纳米凝胶 PCS 粒径分布图

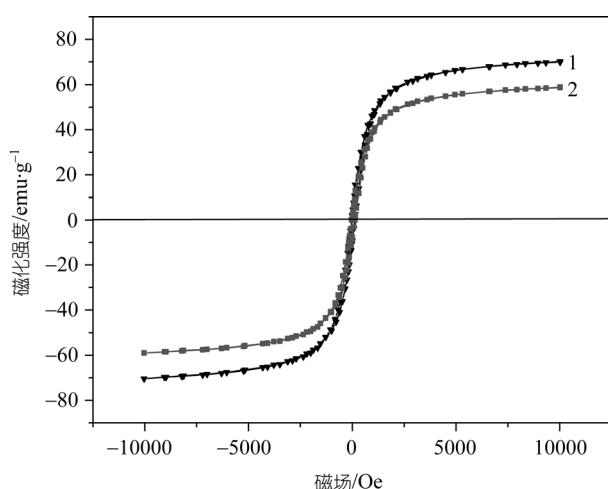
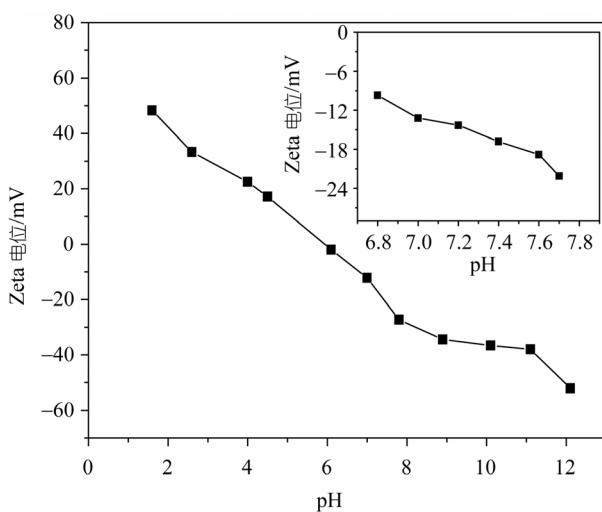
图 7 Fe₃O₄ 纳米粒子(1)及 PEGMA 磁性纳米凝胶(2)的磁滞回线

图 8 PEGMA 磁性纳米凝胶表面 Zeta 电位

稳定性是纳米粒子的另一个重要特征, 为了考察该磁性纳米凝胶的稳定性, 参照文献方法^[13], 取 10 mg PEGMA 磁性纳米凝胶保存于 20 mL 三蒸水中, 混匀并测定其最大吸收峰 215 nm 处的吸光度值, 记为 OD_0 . 将该磁性纳米凝胶静置保存在 4℃ 条件, 在不同时间间隔, 小心吸取 0.5 mL 上层液, 测其在 215 nm 处的吸光度值, 记为 OD_n , 按(3)式计算该磁性纳米凝胶的稳定性。

$$\text{稳定性}(\%) = \frac{OD_n}{OD_0} \times 100\%. \quad (3)$$

结果如图 9 所示, 由图可以看出, PEGMA 磁性纳米凝胶在静置保存条件下, 沉降缓慢, 一周内可保持 86.2% 的稳定性, 两周内可保持约 82.4%. 说明该磁性纳米凝胶在水体系中具有较高的稳定性。

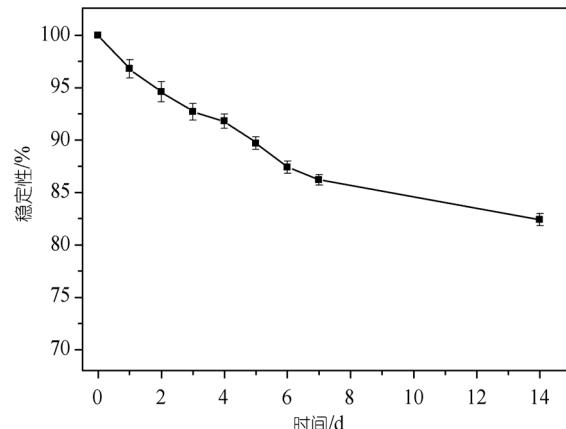


图 9 PEGMA 磁性纳米凝胶在水体系中的稳定性

2.3 PEGMA 磁性纳米凝胶的药物缓释研究

阿霉素(doxorubicin, DOX) 是当今公认的强效广谱抗癌药, 对白血病及各种实体瘤如乳腺癌、肺癌、肝癌等都具有很好的疗效, 但体内半衰期短, 静脉注射后在血浆中迅速消失, 广泛分布于心、肝、脾、肺、肾脏等组织中, 对正常组织, 尤其是心脏的毒副作用较大, 因此限制了阿霉素的临床应用, 开发研制阿霉素的靶向及缓释载体具有重要意义^[14-16]。

PEGMA 磁性纳米凝胶载带阿霉素实验结果如图 10 所示, 随着 DOX 加入量的增大, 吸附在磁性纳米凝胶中的 DOX 含量呈增加趋势, 当 DOX 加入量超过

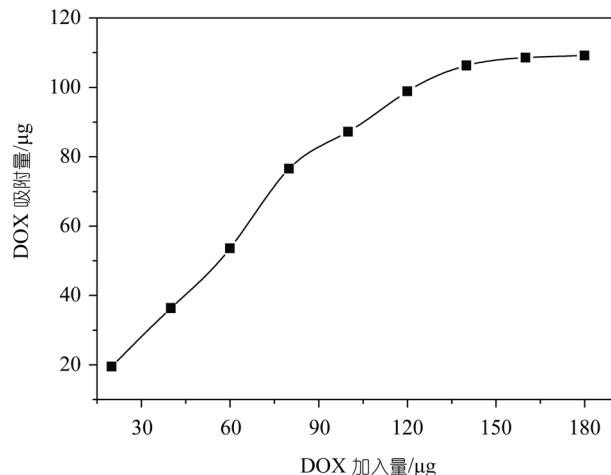


图 10 1 mg PEGMA 磁性纳米凝胶吸附 DOX 曲线

130 μg 后, 吸附量基本饱和, 1 mg 磁性纳米凝胶可吸附 DOX 含量为 110 μg , 磁性纳米凝胶表面伸展着大量 PEG 链, 内部结构较为疏松, 有利于药物进入空腔, 因而可以吸附较大量的药物.

图 11 为载 DOX 磁性纳米凝胶的药物释放曲线, 由图可见, 随时间的延长, DOX 缓慢从磁性纳米凝胶中释放出来, 在前 20 h 内, 约有 38.9% 的药物释放出来, 在 70 h 内, 约有 83.6% 的药物释放出来, 70 h 后药物释放速率减慢, 在 90 h 内约有 85.4% 的药物释放出来. 说明 PEGMA 磁性纳米凝胶对 DOX 具有明显的缓释作用, 加之磁性纳米凝胶的超顺磁性, 可作为一种潜在药物靶向载体应用于临床研究.

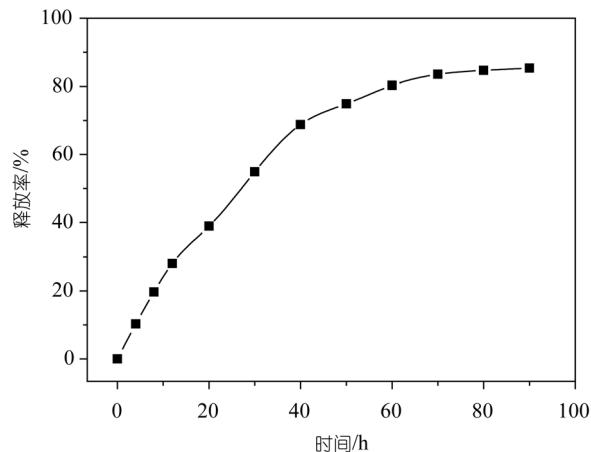


图 11 PEGMA 磁性纳米凝胶载带药物阿霉素的体外释放曲线

3 结论

本文应用紫外辐照法原位合成了 PEGMA 超顺磁性纳米凝胶, 表面 PEGMA 赋予该磁性纳米凝胶良好的亲水性和生物相容性, 同时具有较强的吸水膨胀性能, 在生理 pH 条件下绝对值高的负表面 Zeta 电位, 有利于在血液等体液中保持稳定, 该磁性纳米凝胶磁含量占 53.4%, 饱和磁化强度为 58.6 emu/g. 载药实验显示该磁性纳米凝胶对模型药物阿霉素具有明显的缓释作用, 初步证明其作为药物靶向载体的可行性.

致谢 感谢山东省生物物理重点实验室对本课题的资助; 德州学院化学系王新芳副教授提供热重分析测试, 德州学院分析测试中心吕元琦副教授、杨敏老师提供了红外光谱测试, 在此一并致谢.

参考文献

- 1 Hu F Q, Wei L, Zhou Z, Ran Y L, Li Z, Gao M Y. Preparation of biocompatible magnetite nanocrystals for *in vivo* magnetic resonance detection of cancer. *Adv Mater*, 2006, 18(19): 2553—2556 [DOI]
- 2 Liu X Q , Guan Y P, Liu H Z, Ma Z Y, Yang Y, Wu X B. Preparation and characterization of magnetic polymer nanospheres with high protein binding capacity. *J Magn Magn Mater*, 2005, 293(1): 111—118 [DOI]
- 3 崔亚丽, 张连营, 苏靖, 张彩峰, 李婧, 崔婷, 金伯泉, 陈超. 组装型金磁微粒的制备及其在免疫学检测中的应用. 中国科学 B 辑: 化学, 2006, 36(2): 159—165
- 4 Dobson J. Magnetic nanoparticles for drug delivery. *Drug Dev Res*, 2006, 67(1): 55—60 [DOI]
- 5 Chang Y, Shih Y J, Ruaan R C, Higuchi A, Chen W Y, Lai J Y. Preparation of poly(vinylidene fluoride) microfiltration membrane with uniform surface-copolymerized poly(ethylene glycol) methacrylate and improvement of blood compatibility. *J Membr Sci*, 2008,

- 309(1-2): 165—174[\[DOI\]](#)
- 6 Xiang Y Q, Chen D J. Preparation of a novel pH-responsive silver nanoparticle/poly (HEMA-PEGMA-MAA) composite hydrogel. *Eur Polym J*, 2007, 43(10): 4178—4187[\[DOI\]](#)
- 7 Fan Q L, Neoh K G, Kang E T, Shuter B, Wang S C. Solvent-free atom transfer radical polymerization for the preparation of poly(poly(ethyleneglycol) monomethacrylate)-grafted Fe₃O₄ nanoparticles: Synthesis, characterization and cellular uptake. *Biomaterials*, 2007, 28(36): 5426—5436[\[DOI\]](#)
- 8 姚思德, 孙汉文, 乔向利, 谢雷东, 侯铮迟, 窦大营, 徐冬梅. 中国发明专利. 公开号: 1690127, 2004
- 9 Gan Q, Wang T. Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier—Systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release. *Colloid Surface B*, 2007, 59(1): 24—34[\[DOI\]](#)
- 10 Behar D, Rabani J. Laser photolysis of TiO₂ layers in the presence of aqueous iodide. *J Phys Chem B*, 2001, 105(27): 6324—6329[\[DOI\]](#)
- 11 Stroyuk A L, Granchak V M, Korzhak A V, Kuchmii S Y. Photoinitiation of butylmethacrylate polymerization by colloidal semiconductor nanoparticles. *J Photochem Photobiol A-Chem*, 2004, 162(2-3): 339—351[\[DOI\]](#)
- 12 Ward J H, Peppas N A. Preparation of controlled release systems by free-radical UV polymerizations in the presence of a drug. *J Control Release*, 2001, 71(2): 183—192[\[DOI\]](#)
- 13 Sun H W, Zhang L Y, Zhang X L, Zhang C L, Wei Z L, Yao S D. ¹⁸⁸Re-labeled MPEG-modified superparamagnetic nanogels: preparation and targeting application in rabbits. *Biomed Microdevices*, 2008, 10(2): 281—287[\[DOI\]](#)
- 14 Hortobagyi G N. Anthracyclines in the treatment of cancer: an over review. *Drugs*, 1997, 54 (Suppl 4): 1—7[\[DOI\]](#)
- 15 Kelishomi R B, Ejtemaeemehr S, Tavangar S M, Rahimian R, Mobarakeh J I, Dehpour A R. Morphine is protective against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rat. *Toxicology*, 2008, 243(1-2): 96—104[\[DOI\]](#)
- 16 Zhang J, Chen X G, Li Y Y, Liu C S. Self-assembled nanoparticles based on hydrophobically modified chitosan as carriers for doxorubicin. *Nanomedicine-UK*, 2007, 3(4): 258—265