

侧链含氨基的 PLGA-(PEG-ASP)_n 共聚物的合成与表征*

罗丙红^{1**} 全大萍² 廖凯荣² 卢泽俭² 周长忍¹

(¹暨南大学化学系生物材料教研室 广州 510630) (²中山大学高分子研究所 广州 510275)

摘要 以聚乙二醇(PEG)和 *N*-苄氧羰基-*L*-天冬氨酸酐为原料,通过溶液缩聚法制备了聚(聚乙二醇-*co*-*L*-天冬氨酸)交替预聚物(PEG-ASP)_n;进一步以辛酸亚锡为催化剂,(PEG-ASP)_n 为共引发剂引发 *D*, *L*-LA 和 GA 开环共聚合成了带有侧氨基功能基团的 PLGA-(PEG-ASP)_n 共聚物.用 GPC、FT-IR、¹H-NMR、DSC 等研究了共聚物的结构和性能.结果表明,共聚物表现为典型的无定形聚合物;(PEG-ASP)_n 的含量对共聚物的性能有显著影响,随(PEG-ASP)_n 含量增加,共聚物的亲水性增强,玻璃化转变温度(*T*_g)下降;以 Pd(5 wt%)-C 为催化剂,采用催化加氢方法可完全脱除共聚物侧氨基上的保护基团;脱除侧氨基上的保护基团后,共聚物的分子量和 *T*_g 值均略有增大,亲水性有所提高.

关键词 组织工程, 聚(*D*, *L*-丙交酯-*co*-乙交酯), 聚(聚乙二醇-*co*-*L*-天冬氨酸), 功能化

聚乳酸(PLA)、聚羟基乙酸(PGA)以及两者的共聚物(PLGA)具有良好的生物相容性、可降解吸收性以及优良的力学性能,是目前组织工程和药物缓释中研究和应用最为广泛的一类材料^[1,2].然而,由于这类聚酯材料分子链中缺乏活性功能基团,难以与生物活性分子复合,作为组织工程支架材料使用,材料的细胞亲和性不够理想,不利于细胞的粘附、分化和增殖.因此,通过将 LA、GA 与功能性单体共聚来合成含功能化基团的生物活性可降解聚合物,是目前组织工程支架材料研究中的一个主要方向.

氨基酸作为生物的重要组成部分,从赋予聚乳酸类材料生物学功能的角度出发,在它们的分子中引入氨基酸结构单元或链段,自然受到材料和生物学家的重视,已有许多相关研究报道^[3-5].考虑到聚乙二醇(PEG)亲水性强以及对细胞和多肽蛋白(如生长因子)相容性好的特点,本文设计在将氨基酸引入到 PLGA 分子中的同时,又引入 PEG 链段,使合成的共聚物分子中既具有大量可控的能与肽链结合的活性位点,又有亲水且对细胞和多肽蛋白相容性好的 PEG 链段,而材料同时又可降解吸收,从而合成了具有生物活性的高分子材料.为此,首先采用侧氨基被保护的 *L*-天冬氨酸酐来修饰 PEG,合成带有侧氨基的聚(聚乙二

醇-*co*-*L*-天冬氨酸)交替预聚物(PEG-ASP)_n,然后将预聚物与 *D*, *L*-LA 和 GA 共聚而得到目标产物.文献已有氨基酸修饰 PEG 以及含氨基酸分子结构的 PLA 和 PLGA 的研究报道^[3-8],而在 PLA 或 PLGA 分子中同时引入氨基酸和 PEG 的研究却很少.

1 实验部分

1.1 原料和试剂

N-(苄氧羰基)-*L*-天冬氨酸(*N*-CB₂-*L*-ASP)(ACROS ORGANICS 公司);PEG,平均分子量为 200,进口分装,用前于 120℃减压干燥 24 h;*D*, *L*-LA(实验室合成)和 GA(北京康安高分子开发中心),经乙酸乙酯多次重结晶纯化;Sn(Oct)₂,工业品,使用前经减压蒸馏;Pd(5 wt%)-C 催化剂,参照文献[9,10]制备;对甲苯磺酸·H₂O(CP,常州市新华活性材料研究所);氯化亚砷(SOCl₂),二甲苯、氯仿、乙酸乙酯、无水乙醚、石油醚、邻苯二甲酸酐、吡啶、咪唑、氢氧化钠(均为 AR,广州化学试剂厂).

1.2 PLGA-(PEG-ASP)_n 共聚物的合成

1.2.1 *N*-苄氧羰基-*L*-天冬氨酸酐(II)的制备^[6,7] 由 *N*-(苄氧羰基)-*L*-天冬氨酸(*N*-CB₂-*L*-ASP)(I)在氯化亚砷的催化脱水作用下生成.

* 2004-02-02 收稿,2004-03-16 修稿;国家自然科学基金(基金号 30270393,30170270)、广东省“十五”重点攻关(基金号 A302020201)和暨南大学博士启动经费(编号 51204007)资助项目;** 通讯联系人

产物的元素分析结果(%), C(57.12); H(4.53); N(5.47), 理论值(%), C(57.83); H(4.41); N(5.62), 实验结果与理论值相接近. 实验测得产物的熔点为 118 ~ 120℃.

1.2.2 (PEG-ASP)_n 预聚物的合成^[6,7] 由单体 II 和 PEG200 通过溶液缩聚法制备. 对甲苯磺酸·H₂O 为催化剂, 用量为 0.12 mol%; 二甲苯为溶剂; 反应 48 h.

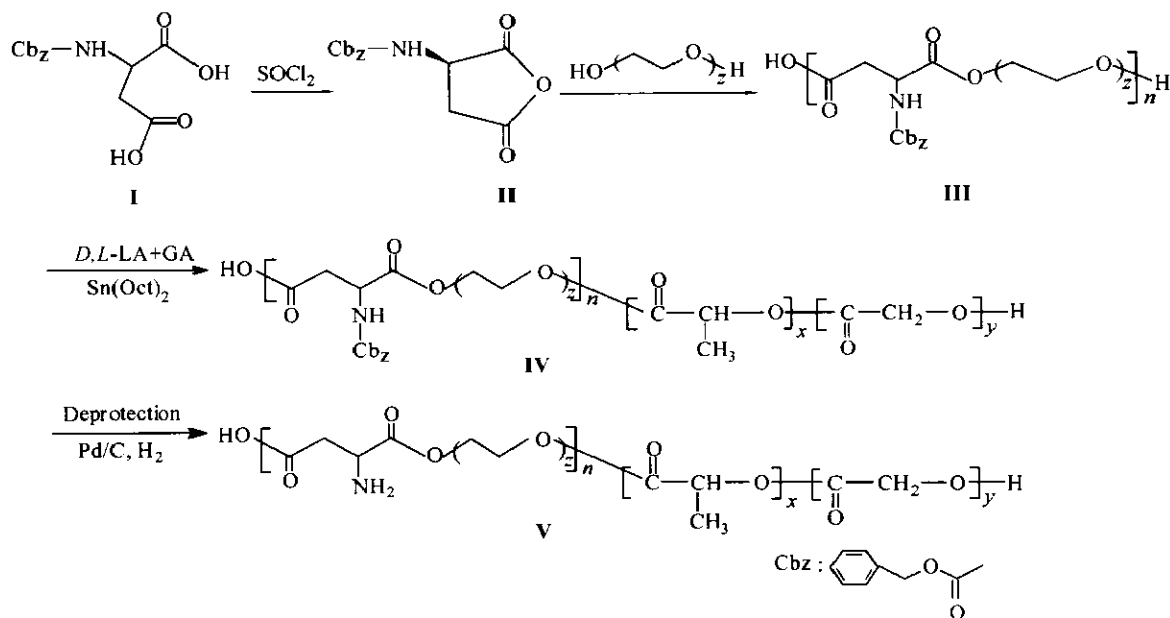
1.2.3 PLGA-(PEG-ASP)_n 共聚物的合成 采用本体封管聚合方法制备. 将一定量的单体 D, L-LA/GA(D, L-LA/GA 摩尔比: 75/25) 和单体总质量 5%, 10% 和 15% 的 (PEG-ASP)_n 预聚物装入经过硅烷化处理并充分干燥的安瓿瓶中, 催化剂

Sn(Oct)₂ 用量为单体总质量的 0.03%, 抽真空脱去溶剂、水分和氧后, 熔封反应瓶, 于 160℃ 真空烘箱里反应 24 h. 粗产物经氯仿溶解, 酒精沉淀纯化处理. 纯化后的产物于 40℃ 减压干燥至恒重, 储存于干燥器中备用.

1.2.4 侧氨基上保护基团的脱除反应^[6,7,11]

将 1g 的 PLGA-[(PEG-ASP)_n-10%] 共聚物溶解于 20 mL DMF 中, 然后加入 0.5 g 的 Pd(5 wt%)-C 催化剂, 电磁搅拌下于 25℃ 通 H₂ 反应 48 h. 结束后反应后, 共聚物溶液前后经滤纸过滤、0.2 μm 过滤头过滤和高速离心分散纯化. 将滤液倒入大量的蒸馏水中, 所得沉淀物于 40℃ 减压干燥至恒重.

反应过程示意如下:



1.3 测试表征

分子量测定, Waters Breeze 凝胶色谱仪 (GPC). 聚苯乙烯 (PSt) 作标样, THF 为洗脱剂, 洗脱速率 1 mL/min, 测试温度为 40℃.

红外光谱 (FT-IR), Nicolet 205 型傅立叶变换红外光谱仪. 单体 *N*-苄氧羰基-*L*-天冬氨酸酐采用与 KBr 共研磨后压片制样; 其它样品均采用 KBr 涂膜制样, CHCl₃ 为溶剂.

¹H-NMR, Varian 公司的 INOVA500 型超导核磁共振仪. TMS 为内标, CDCl₃ 为溶剂, 测试温度为 28℃.

热分析 (DSC), TA instruments DSC 2910. N₂ 气氮 (40 mL/min). 试样质量 5 ~ 8 mg, 升温速率 10 K/min, 扫描范围 -40 ~ 240℃.

表面接触角, OCA20 接触角光学测量仪. 溶液 (CHCl₃ 为溶剂) 成膜法制样, 选取平整的膜面, 用去离子水测定; 取连续 10 次测量误差在 0.5° 范围内的平均值.

熔点测定, 显微熔点仪, 广州正一科技有限公司.

元素分析 (EA), 德国 Elementar 公司 Vario EL 元素分析仪.

2 结果与讨论

2.1 共聚物的结构

不同组成共聚产物的 IR 谱如图 1 所示. 从图中可看出, 与 PLGA75/25 的 IR 谱相比较, 共聚产物的 IR 谱上在 1523.5 cm⁻¹ 处出现一新的吸收峰,

该吸收峰应为(PEG-ASP)_n 链段中的 C—N 伸缩振动峰;随单体组成中(PEG-ASP)_n 含量增加,共聚产物的 C—N 吸收峰的强度明显增大.从图 1 还可观察到,不同组成共聚产物的 IR 谱上在 2885 ~ 2840 cm⁻¹ 对应亚甲基的 C—H 伸缩振动峰的强度也随单体组成中(PEG-ASP)_n 含量增加而增大.

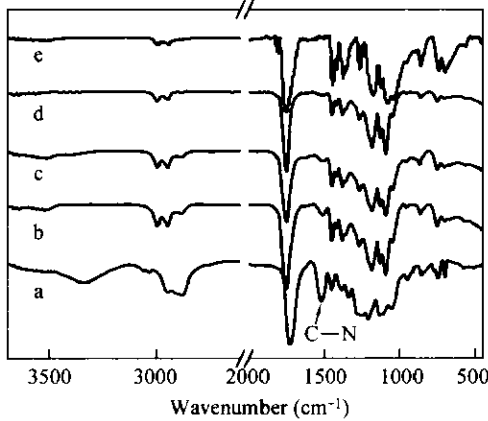


Fig. 1 IR spectra of (PEG-ASP)_n (a) and PLGA-(PEG-ASP)_n copolymers ((b) 15%; (c) 10%; (d) 5%; (e) 0%)

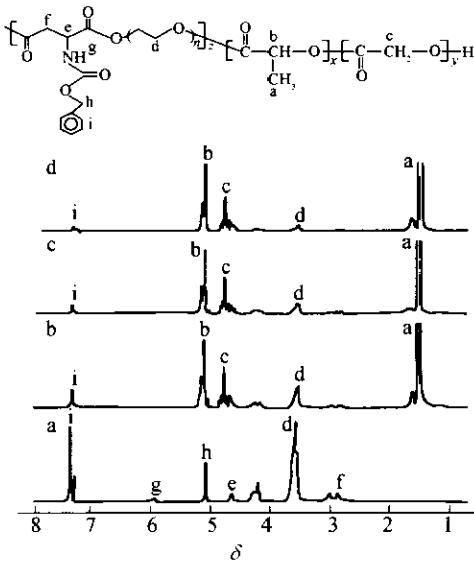


Fig. 2 ¹H-NMR spectra of (PEG-ASP)_n (a) and PLGA-(PEG-ASP)_n copolymers ((b) 15%; (c) 10%; (d) 5%)

图 2 为(PEG-ASP)_n 和不同组成共聚产物的 ¹H-NMR 谱图.共聚产物中各质子共振峰的归属如图所示,δ = 7.3(i) 处为(PEG-ASP)_n 链段上的 L-天冬氨酸单元上的芳香环中的质子共振峰^[12]; δ = 5.2(b) 为 PLA 链段上的次甲基的质子共振

峰;δ = 4.8(c) 处为 PGA 链段上的亚甲基的质子共振峰;δ = 4.3 处为 PEG 末端单体结构单元分别与酯羰基和羟基相连的亚甲基的质子共振峰^[13]; δ = 3.6(d) 处为 PEG 主链上的亚甲基质子的共振峰;δ = 1.6(a) 的共振峰为 PLA 链段上甲基的质子共振峰.从图中还可看出,δ = 7.3、4.3 和 3.6 处的质子共振峰强度随原料配比中(PEG-ASP)_n 含量增加而增大.不同组成共聚产物的 ¹H-NMR 谱结果与 IR 谱图结果相一致,表明本文采用本体封管聚合方法,以(PEG-ASP)_n 预聚物为大分子引发剂引发 D, L-LA 和 GA 开环共聚,合成了 PLGA-(PEG-ASP)_n 共聚物.由于共聚物中(PEG-ASP)_n 链段上的 CB₁ 保护基团上的亚甲基质子共振峰与 PLA 链段中的次甲基质子共振峰重叠,(PEG-ASP)_n 链段中 L-天冬氨酸单元上的次甲基和氨基的质子共振峰强度较弱,这些共振峰在共聚物的 ¹H-NMR 谱图上难以准确分辨.根据 ¹H-NMR 谱中各质子共振峰的相对强度可计算出共聚物中(PEG-ASP)_n 链段的摩尔含量,结果见表 1.从表中可看出,随(PEG-ASP)_n 用量增加,共聚物中(PEG-ASP)_n 链段含量相应增加.

Table 1 Copolymerization results of D, L-LA and GA with (PEG-ASP)_n prepolymer

Sample	$f_{(PEG-ASP)_n}$ (%)	$F_{(PEG-ASP)_n}$ (%)	T (°C)	t (h)	M_n (10 ³)	M_w/M_n	T_g (°C)	Contact angles(°)
a	100	100	140	48	3.32	1.53	-9.9	-
b	15	6.8	160	24	23.17	2.51	33.5	67.3
c	10	4.3	160	24	27.73	2.75	36.4	68.8
d	5	2.4	160	24	31.19	2.58	43.3	70.1
e	0	0	160	24	93.57	1.94	53.2	73.6

Note: $f_{(PEG-ASP)_n}$ (%), feed mass fraction of (PEG-ASP)_n; $F_{(PEG-ASP)_n}$ (%), molar contents of (PEG-ASP)_n in copolymer, calculated from ¹H-NMR; T , polymerization temperature; t , polymerization time; M_n , number average molecular weight, measured by gel permeation chromatography (GPC); M_w/M_n , polydispersity; T_g , glass transition temperature

2.2 组成对共聚物性能的影响

图 3 为不同组成 PLGA-(PEG-ASP)_n 共聚物的 GPC 曲线.从图中可见,共聚物中预聚物峰消失,不同组成共聚物的 GPC 曲线上均只有一个单峰,共聚物的分子量明显大于相应的预聚物.图 3 中共聚物的 GPC 曲线上的微小肩峰可能是聚合过程中形成了较高分子量的 PLGA 共聚物的缘故.以聚苯乙烯为标样测定的数均分子量(M_n)和

分子量分布宽度 (M_w/M_n) 列于表 1. 从表中可看出, 随 (PEG-ASP) $_n$ 含量增加, 共聚物的分子量有所下降. 这是因为随 (PEG-ASP) $_n$ 含量增加, 活性端基比例增大, 共聚单体 (*D, L*-LA 和 GA) 的相对含量下降, 聚合过程中链转移反应也会随活性端基含量增大而变得突出, 这些因素都导致共聚物的分子量降低.

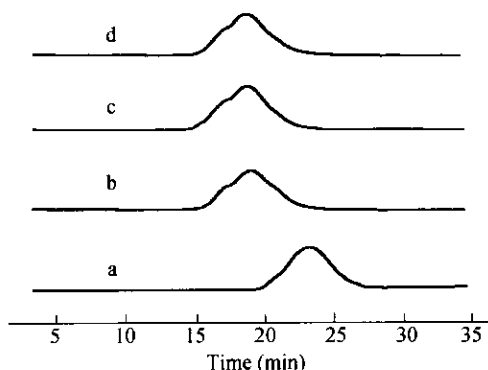


Fig. 3 GPC curves of (PEG-ASP) $_n$ (a) and PLGA-(PEG-ASP) $_n$ copolymers ((b) 15%; (c) 10%; (d) 5%)

图 4 为不同组成 PLGA-(PEG-ASP) $_n$ 共聚物的 DSC 曲线. 从图中看出, 共聚物的 DSC 曲线上均只有一个玻璃化温度转变, 未见任何熔融峰, 表明合成的 PLGA-(PEG-ASP) $_n$ 共聚物为无定形聚合物. 从图中还可看出, 共聚物的 T_g 值均介于 (PEG-ASP) $_n$ 预聚物和 PLGA75/25 共聚物的 T_g 值之间 (见表 1), 且随共聚物中 (PEG-ASP) $_n$ 链段含量增加而逐渐下降. 这一方面是因为在 PLGA75/25 分子链中引入了 PEG 柔性链的缘故, 同时也说明 PLGA 嵌段与预聚物嵌段是互容的.

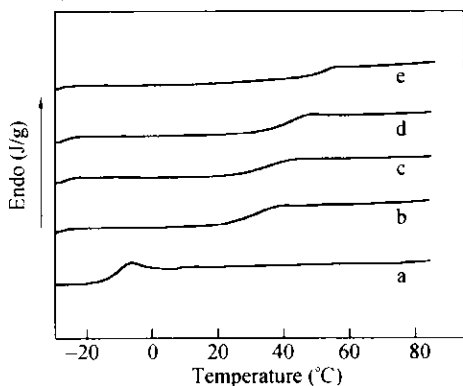


Fig. 4 DSC spectra of (PEG-ASP) $_n$ (a) and PLGA-(PEG-ASP) $_n$ copolymers ((b) 15%; (c) 10%; (d) 5%; (e) 0%)

PLGA75/25 和不同组成 PLGA-(PEG-ASP) $_n$ 共聚物薄膜的表面接触角见表 1. 从表中可看出, PLGA75/25 分子中经引入 (PEG-ASP) $_n$ 链段后, 材料的表面接触角明显下降, 共聚物中 (PEG-ASP) $_n$ 含量越大, 共聚物薄膜的表面接触角下降越明显. 液滴接触角可反映材料亲水性的强弱, 表面接触角小, 表明材料的亲水性好, 液滴易于在材料表面铺展. 因此, 上述结果表明 PLGA-(PEG-ASP) $_n$ 的亲水性优于 PLGA75/25 的亲水性; 随 (PEG-ASP) $_n$ 链段含量增加, PLGA-(PEG-ASP) $_n$ 的亲水性增强.

2.3 共聚物侧氨基上 CB₂ 基团的脱除反应

图 5 为 PLGA-[(PEG-ASP) $_n$ -10%] 共聚物在脱除 CB₂ 基团前后的 ¹H-NMR 谱. 从图中可观察到, 脱除 CB₂ 基团后, 共聚物的 ¹H-NMR 谱上 $\delta = 7.3$ 对应于 CB₂ 基团中的芳香环上的质子共振峰消失. 结果表明采用催化加氢法, 以 Pd(5 wt %)-C 为催化剂, 直接通 H₂ 可完全脱除共聚物侧氨基上的 CB₂ 基团.

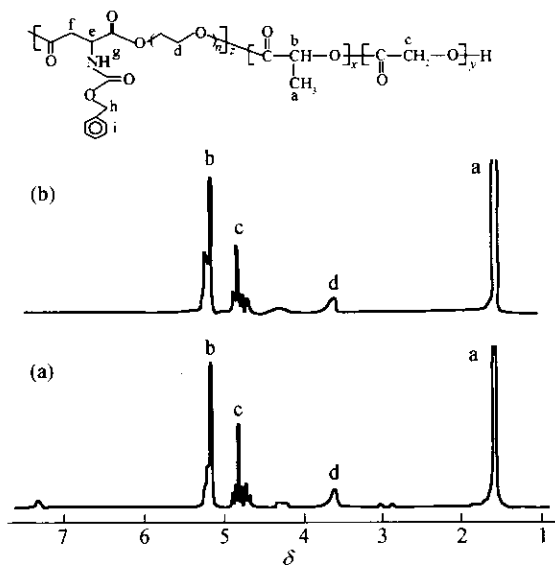


Fig. 5 ¹H-NMR spectra of PLGA-[(PEG-ASP) $_n$ -10%] copolymer prior to (a) and after (b) deprotection

图 6 为脱除 CB₂ 基团前后共聚物 PLGA-[(PEG-ASP) $_n$ -10%] 的 GPC 曲线. 从图中可看出, 共聚物脱除 CB₂ 基团后的 GPC 曲线上也仅有一个单峰. 以聚苯乙烯为标样测定的数均分子量 (M_n) 和分子量分布宽度 (M_w/M_n) 见表 2. 从表中可看出, 共聚物脱除 CB₂ 基团后的分子量大于按脱 CB₂ 基团前共聚物的分子量计算得到的理论值, 而且, 还略大于脱 CB₂ 基团前共聚物的分子

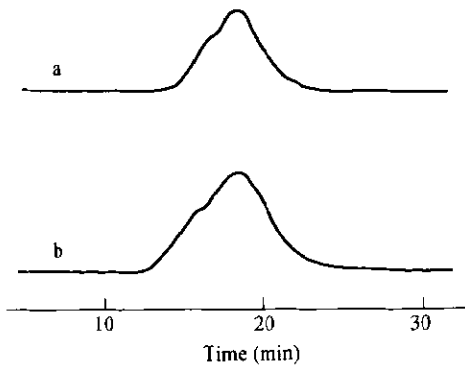


Fig. 6 GPC curves of PLGA-[(PEG-ASP)_n-10%]
copolymer prior to (a) and after (b) deprotection

量.这可能是脱除共聚物侧链上的 CB₂ 基团后,共聚物的流体动力学体积增加或分子间形成了氢键的缘故^[14,15].

Table 2 Properties of PLGA-[(PEG-ASP)_n-10%] copolymers prior to and after deprotection

Sample	<i>n</i> (PEG-ASP) _n (%)	<i>M</i> _n ^a (10 ³)	<i>M</i> _n ^b (10 ³)	<i>M</i> _w / <i>M</i> _n	<i>T</i> _g (°C)	Contact angles (°)
Prior to deprotection	4.3	-	21.68	2.24	32.2	68.8
After deprotection	4.3	21.39	22.15	2.82	32.9	67.1

Note: *n* (PEG-ASP)_n, molar contents of (PEG-ASP)_n in copolymer, calculated from ¹H-NMR, *M*_n^a, calculated by the *M*_n value of PLGA-[(PEG-ASP)_n-10%] prior to deprotection; *M*_n^b, by GPC, relative to polystyrene standards

图 7 为脱除 CB₂ 保护基团前后共聚物 PLGA-[(PEG-ASP)_n-10%] 的 DSC 曲线.从图中可看出,

脱除保护基团后的共聚物的 DSC 曲线上也仅有一个玻璃化温度转变,未见任何熔融峰,这说明共聚物分子链上的芳香环保护基团被脱除后,共聚物仍然为无定形聚合物.按 DSC 测定结果得到的共聚物在脱除保护基团前后的 *T*_g 值见表 2.从表中可看出,共聚物侧链上的芳香环基团被脱除后,共聚物的 *T*_g 变化不大,略有升高.这可能是由于脱除 CB₂ 基团前后共聚物的分子链段的运动相似以及脱除 CB₂ 基团后分子间形成了氢键的缘故^[14,15].

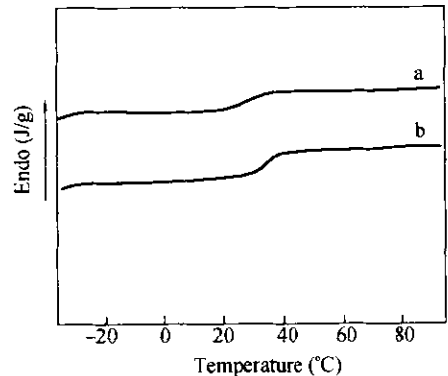


Fig. 7 DSC curves of PLGA-[(PEG-ASP)_n-10%]
copolymer prior to (a) and after (b) deprotection

从表 2 还可看出,PLGA-[(PEG-ASP)_n-10%] 共聚物的接触角在脱除 CB₂ 基团后较未脱除保护基团前有所下降,这说明脱除共聚物侧基上的芳香环基团后,共聚物的亲水性得到提高.

REFERENCES

- Holy C E, Cheng C, Davies J E, Shoichet M S. *Biomaterials*, 2001, 22: 25 ~ 31
- Lu L C, Peter S J, Lyman M D, Lai H L, Leite S M, Tamada J A, Uyama S, Vacanti J P, Langer R, Mikos A G. *Biomaterials*, 2000, 21(8): 1837 ~ 1845
- Hrkach J S, Ou J, Lotan N, Langer R. *Macromolecules*, 1995, 28: 4736 ~ 4739
- Elisseeff J, Anseth K, Langer R, Hrkach J S. *Macromolecules*, 1997, 30: 2182 ~ 2184
- Cook A D, Hrkach J S, Gao N N, Johnson L M, Pajvani U B, Gannizzaro S M, Langer R. *J Biomed Mater Res*, 1997, 35: 513 ~ 523
- Won C Y, Chu C C, Lee J D. *J Polym Sci, Polym Chem*, 1998, 36: 2949 ~ 2959
- Won C Y, Chu C C, Lee J D. *Polymer*, 1998, 39(25): 6677 ~ 6681
- Lee K H, Won C Y, Chu Chih-Chang. *Cell Transplantation*, 1997, 6(5): 1x
- Mozingo R, Adkins H, Carnahan J E. *Organic Syntheses*, 1946, 26: 77 ~ 82
- Chen Songying(陈涌英), Chen Bei(陈蓓), Wang Qin(王琴). *Journal of Fuel Chemistry and Technology(燃料化学学报)*, 2001, 29(suppl.): 244 ~ 246
- Caron A, Braud C, Bunel C, Vert M. *Polymer*, 1990, 31: 1797 ~ 1802
- Yokoyama M, Inoue S, Kataoka K, Yui N, Sakurai Y. *Makromol Chem*, 1989, 190: 2041 ~ 2054
- Zhang Yong(张勇), Zhang Aiyong(张爱英), Feng Zengguo(冯增国), Ye Ling(叶玲), Xu Ruixing(徐瑞兴). *Acta Polymerica Sinica(高分子学报)*, 2002, (2): 167 ~ 172
- Kimura Y, Shirota K, Yamane H, Kitao T. *Polymer*, 1993, 34(8): 1741 ~ 1748
- Feng Y, Klee D, Hecker H. *Macromol Chem Phys*, 2002, 203: 819 ~ 824

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF NOVEL COPOLYMERS CONTAINING PENDANT AMINE FUNCTIONAL GROUPS BASED ON *D, L*-LACTIDE, GLYCOLIDE AND POLY(PEG-*co-L*-ASPARTIC ACID)

LUO Binghong¹, QUAN Daping², LIAO Kairong², LU Zejian², ZHOU Changren¹

(¹ Biomaterials Research Lab of Chemistry Department, Jinan University, Guangzhou 510630)

(² Institute of Polymer Science, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

Abstract Poly(poly(ethylene glycol)-*co-L*-aspartic acid)(PEG-ASP)_n alternating prepolymer was first prepared by the solution polycondensation from *N*-(benzyloxycarbonyl)-*L*-aspartic acid anhydride and poly(ethylene glycol). Then, the novel PLGA-(PEG-ASP)_n copolymers with pendant amine functional groups were synthesized by bulk ring-opening copolymerization of *D, L*-LA with GA using tin octoate(Sn(Oct)₂) as a catalyst, and (PEG-ASP)_n prepolymer as a co-initiator. The structure and properties of the novel copolymers were studied by GPC, FT-IR, ¹H-NMR and DSC, etc. Results showed that the PLGA-(PEG-ASP)_n copolymers were typical amorphous polymers. The content of (PEG-ASP)_n prepolymer had significant influence on the properties of the copolymers. The hydrophilicity of the copolymers was improved and the value of the glass transition temperature(*T*_g) decreased as the content of the prepolymer increased. The benzyloxycarbonyl(CB_z) protecting groups of the copolymer were totally removed by catalytic transfer hydrogenation using palladium over activated carbon (5 wt%) as a catalyst and H₂ as an effective hydrogen donor. The molecular weight, the value of *T*_g and hydrophilicity of the copolymer were somewhat increased as the CB_z protecting groups were removed.

Key words Tissue engineering, Poly(*D, L*-lactide-*co*-glycolide), Poly(poly(ethylene glycol)-*co-L*-aspartic acid), Functionalization