

嵌段共聚物 OSM₁-PCLA-PEG-PCLA-OSM₁ 的合成及其 pH 和温度敏感性

郝堂娜, 乔明曦, 古建春, 李 镇, 胡海洋, 赵秀丽, 陈大为
(沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016)

摘要 采用开环聚合法和自由基聚合法合成了生物可降解嵌段共聚物 OSM₁-PCLA-PEG-PCLA-OSM₁, 并对其进行了结构表征. 采用荧光分光光度计和激光粒度仪对共聚物溶液临界胶束浓度(CMC)和粒径大小及分布进行了考察, 研究了温度和 pH 对共聚物胶束形成的影响. 相转变过程研究结果表明, 共聚物溶液具有 pH 和温度双重敏感性. 共聚物溶液在一定温度和 pH 条件下可发生溶液-凝胶相转变.

关键词 pH 敏感; 温度敏感; 生物可降解; 嵌段共聚物; 水凝胶

中图分类号 O631 **文献标识码** A **文章编号** 0251-0790(2008)10-2101-06

近年来, 环境敏感型共聚物作为一种新型智能化高分子材料, 已成为制备生物工程材料和设计自调式给药系统载体材料领域的研究热点之一, 其中对环境 pH 和温度变化产生响应的生物可降解共聚物的研究更是备受关注^[1,2]. pH 和温度敏感型生物可降解共聚物是由聚氧乙烯 (Polyoxyethylene, PEO)、聚氧丙烯 (Polyoxypropylene, PPO)、聚乳酸 (Polylactic acid, PLA)、聚羟基乙酸 (Polyglycolide acid, PGA)、聚乳酸羟基乙酸 (Poly lactic-co-glycolic acid, PLGA) 和聚己内酯 [Poly (ϵ -caprolactone), PCL] 等组成的两亲性嵌段共聚物^[3]. 根据链段单元的排列规律, 可分为 A-B 型二嵌段, A-B-A 和 B-A-B 型三嵌段共聚物, 通过调节嵌段组成比例或加入符合要求的新嵌段调控其物理化学性质, 控制药物释放速度或释放部位, 达到不同的设计要求. 由于这类材料具有一定的双亲性、独特的响应性、良好的机械强度和物理化学特性而成为一种很有发展潜力的生物高分子材料, 目前被广泛用于医用包装材料、生物粘附性材料、药物释放体系高分子载体材料等^[4-6].

本文以丙交酯 (LA)、 ϵ -己内酯 (ϵ -CL)、聚乙二醇 (PEG) 和磺胺甲噁唑 (SM₁) 为原料, 先后采用开环聚合法和自由基聚合法, 合成了一种新型 pH/温度双重敏感生物可降解嵌段共聚物 OSM₁-PCLA-PEG-PCLA-OSM₁, 并对其 pH 和温度敏感性质进行了研究, 为进一步应用于药物释放领域奠定了基础.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

磺胺甲噁唑 (Sulfamerazine, SM₁, Sigma 公司); 丙交酯 (DL-lactide, LA, 北京康安高分子开发中心); ϵ -己内酯 (ϵ -caprolactone, ϵ -CL, 上海浩深贸易有限公司); 聚乙二醇 (PEG2000, 上海浦东高南化工厂); 异辛酸亚锡 [Stannous 2-ethylhexanoate, Sn(Oct)₂, Sigma USA]; 甲基丙烯酰氯 (Methacryloyl chloride, MC, 北京偶合科技有限公司); 偶氮二异丁腈 (Azodiisobutyronitrile, AIBN, 上海第四试剂厂); 3-巯基丙酸 (3-Mercaptopropionic acid, MPA, Alfa Aesar); 二环己基碳二亚胺 (Dicyclohexylcarbodiimide, DCC, 上海延长生化科技发展有限公司); 4-二甲氨基吡啶 (4-Dimethylaminopyridine, DMAP, 上海市嘉辰化工有限公司); *N,N*-二甲基甲酰胺 (*N,N*-dimethyl formamide, DMF, 天津市博迪化工有限公司). 其余试剂均为市售分析纯.

DF-101B 集热式恒温磁力搅拌器 (浙江省乐清县乐成电器厂); 2XZ-2 型旋片式真空泵 (浙江省临

收稿日期: 2007-12-18.

联系人简介: 陈大为, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事药物新剂型及高分子药物载体的研究.

E-mail: chendawei@syphu.edu.cn

海市精工真空设备厂); DZF-150 型数显恒温真空干燥箱(郑州市上街华科仪器厂); Waters 1515 高效液相色谱泵(Waters, USA); Waters 2414 示差折光检测器(Waters, USA); IFS-55 型红外光谱仪(Bruker, Switzerland); ARX-300 型核磁共振谱仪(Bruker, Switzerland); RF-5301PC 型荧光分光光度计(日本岛津株式会社); LS230 型激光粒度仪(美国 Beckman 公司).

1.2 嵌段共聚物 OSM₁-PCLA-PEG-PCLA-OSM₁ 的合成

1.2.1 共聚物 PCLA-PEG-PCLA 的合成 根据文献[7,8]报道,采用开环聚合法合成温度敏感共聚物 PCLA-PEG-PCLA. 按一定比例称取适量 PEG2000、LA、 ϵ -CL 和催化剂 Sn(Oct)₂, 装入干燥的聚合管中, 经氮气除氧后真空熔封, 于 120 °C 反应 24 h, 冷却至室温, 得到无色透明状半固体产物. 用冷水 (<10 °C) 纯化, 除去杂质. 将纯化后的共聚物 PCLA-PEG-PCLA 于室温下真空干燥 48 h.

1.2.2 磺胺甲噁啉低聚物(OSM₁)的合成 根据文献[9]报道, 将 SM₁ 经酰化反应得到磺胺甲噁啉酰化产物(Sulfamerazine monomer, SM₁M), 以 MPA 为链延长剂, AIBN 为链引发剂, 采用自由基聚合法, 合成 OSM₁. 按一定摩尔比称取 SM₁ 和 NaOH 置于圆底烧瓶中, 用丙酮/水溶液溶解, 0 °C 下缓慢滴加 MC 直至白色沉淀析出. 用甲醇/水溶液混悬纯化 3 h 后, 过滤, 将沉淀物于室温真空干燥 48 h 即得 SM₁M. 称取一定量的 SM₁M, 以 DMF 为溶剂, 在 N₂ 气流下加入 AIBN 和 MPA, 于 60 °C 反应 48 h, 冷却至室温, 以水为沉淀剂, 过滤纯化后, 于室温真空干燥 48 h 得 OSM₁ 低聚物.

1.2.3 嵌段共聚物 OSM₁-PCLA-PEG-PCLA-OSM₁ 的合成 按一定摩尔比称取 OSM₁ 和 PCLA-PEG-PCLA 共聚物, 置于圆底烧瓶中, 于 85 °C 真空干燥 2 h, 用 DMF 溶解. 称取适量的 DCC 和 DMAP, 在 N₂ 流下加入到 DMF 溶液中, 通 N₂ 气密封, 室温下反应 72 h^[10]. 反应结束后, 减压蒸发, 挥发除去部分有机溶剂, 加入冷水溶解, 加热沉淀, 过滤, 于室温真空干燥 48 h, 即得嵌段共聚物 OSM₁-PCLA-PEG-PCLA-OSM₁.

1.3 临界胶束浓度测定

采用芘(Pyrene)荧光探针法测定嵌段共聚物 OSM₁-PCLA-PEG-PCLA-OSM₁ 的临界胶束浓度(cmc)^[11]. 配制一系列浓度的共聚物溶液, 将其分别置于 10 mL 容量瓶中, 并使芘在这些共聚物溶液中的浓度为 6×10^{-8} mol/L, 室温过夜平衡后分别测定各溶液的荧光光谱.

1.4 共聚物胶束溶液粒径测定

配制一定浓度 PCLA-PEG-PCLA 水溶液和不同 pH 的 OSM₁-PCLA-PEG-PCLA-OSM₁ 磷酸盐缓冲液(PBS), 采用激光粒度测定仪分别测定 25 和 37 °C 时的粒径大小及分布.

1.5 相转变温度(PTT)测定

参照文献[12,13]方法测定. 称取共聚物适量, 加入不同 pH(7.0, 7.4, 7.8)的 PBS 溶液溶解, 配制质量分数分别为 15%, 17%, 20%, 23% 和 25% 的共聚物溶液, 将上述溶液转移至玻璃容器中, 调节磁力搅拌的转速为 200 r/min, 同时保持水浴缓慢升温, 升温速率为 1~2 °C/min, 记录溶液形成凝胶和析出沉淀时的温度, 每个样品平行测定 3 次, 取平均值.

2 结果与讨论

2.1 嵌段共聚物 OSM₁-PCLA-PEG-PCLA-OSM₁ 的表征

采用装备有 Waters 1515 高效液相色谱泵, Waters 2414 示差折光检测器, Styragel 系列色谱柱 HT3 和 HT4 的凝胶渗透色谱仪, 测定嵌段共聚物 OSM₁-PCLA-PEG-PCLA-OSM₁ 的分子量及分子量分布系数. 色谱条件如下: 流动相 *N,N*-二甲基甲酰胺; 柱温 35 °C; 流速 1 mL/min; 标样为聚苯乙烯. GPC 测定结果见图 1. 计算得到的重均分子量(M_w)和数均分子量(M_n)分别为 8490 和 7430, 分子量分散系数(M_w/M_n)为 1.14, 结果见表 1. 共聚物的 GPC 图给出的对称单峰可以确定所得到的产物为纯粹的共聚物, 其中不包含各单体及其它的共聚物.

Table 1 Molecular weights and polydispersity of OSM₁-PCLA-PEG-PCLA-OSM₁

$10^{-4} M_n$	$10^{-4} M_w$	$10^{-4} M_z$	$10^{-4} M_{z+1}$	M_z/M_w	M_{z+1}/M_w	M_w/M_n
0.743	0.849	0.954	1.06	1.12	1.24	1.14

图2为合成各阶段产物的红外光谱图. 在 SM₁M 的红外谱图中, 在 3037 和 1682 cm⁻¹ 处出现明显的不饱和末端 =CH₂ 和酰胺羰基伸缩振动吸收, 表明 SM₁ 发生了酰化反应, 生成了 SM₁M. 在 PCLA-PEG-PCLA 的共聚物红外谱图中, 3494 cm⁻¹ 处为羟基伸缩振动吸收, 表明形成了以羟基封端的 PCLA-PEG-PCLA; 2872 cm⁻¹ 处为饱和 C—H 伸缩振动吸收; 1755 cm⁻¹ 处为酯羰基伸缩振动吸收; 1382 cm⁻¹ 为带有甲基的 C—H 对称弯曲振动吸收; 1094 cm⁻¹ 处为 C—O 伸缩振动吸收. OSM₁-PCLA-PEG-PCLA-OSM₁ 的红外谱图显示酰胺羰基吸收峰消失, 表明 OSM₁ 中的—COOH 与 PCLA-PEG-PCLA 的端羟基发生脱水缩合, 在 1749 cm⁻¹ 处形成酯羰基的特征吸收.

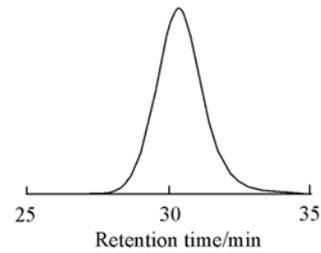


Fig. 1 Typical GPC spectrum of OSM₁-PCLA-PEG-PCLA-OSM₁ block copolymer

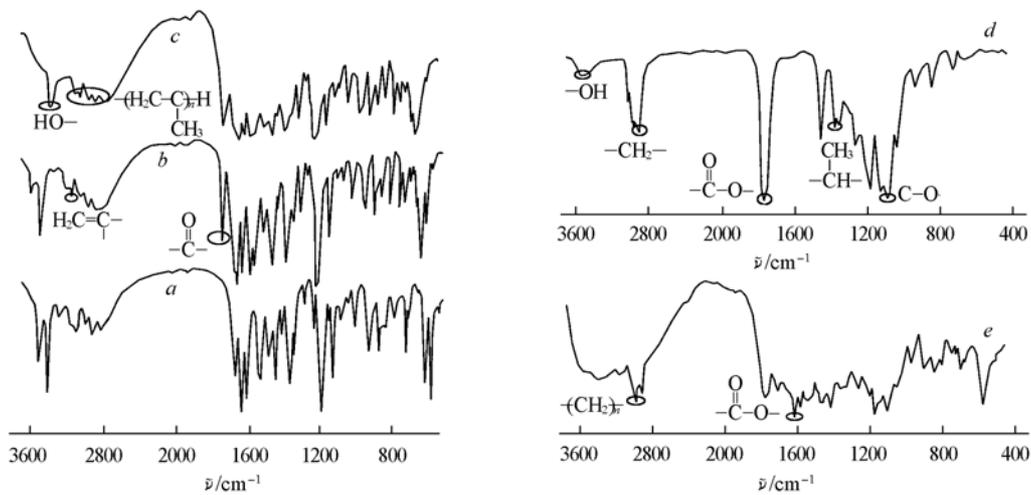


Fig. 2 IR spectra of SM₁ (a), SM₁M (b), OSM₁ (c), PCLA-PEG-PCLA (d) and OSM₁-PCLA-PEG-PCLA-OSM₁ (e) copolymers

以 CDC₁₃ 为溶剂, SM₁M, OSM₁, PCLA-PEG-PCLA 和 OSM₁-PCLA-PEG-PCLA-OSM₁ 的 ¹H NMR 谱图见图 3. 在 SM₁M 的谱图中, 出现了 3 个特征峰 (δ 5.82, 5.56, 1.93), 分别为不饱和 C=C 中的质

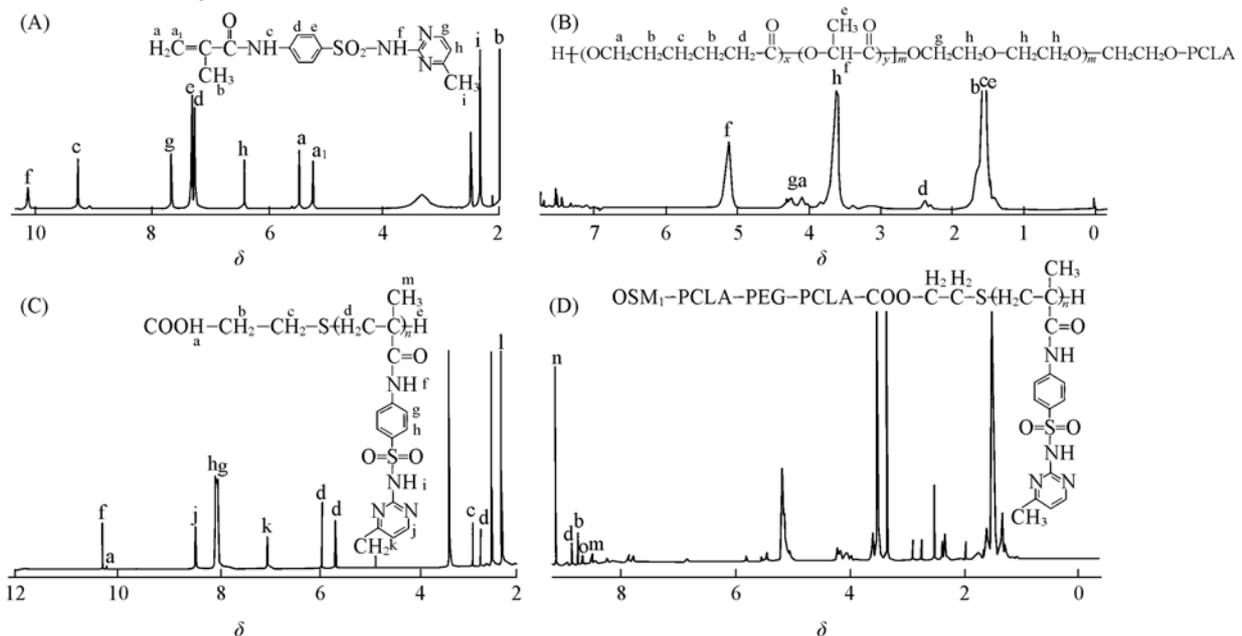
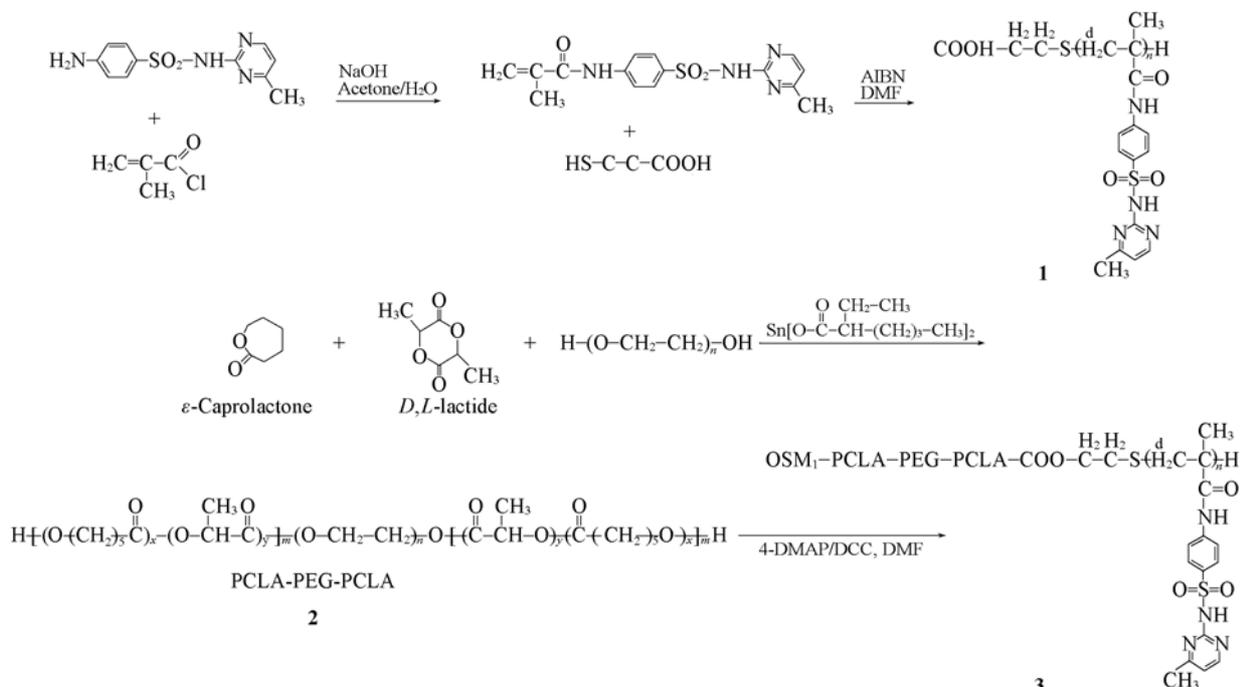


Fig. 3 ¹H NMR spectra of SM₁M (A), OSM₁ (B), PCLA-PEG-PCLA (C) and OSM₁-PCLA-PEG-PCLA-OSM₁ (D) copolymers

子化学位移. 与 SM_1M 相比, OSM_1 结构中由于聚合反应存在不同链接顺序的 $-CH_2-$ 和 $C-H$, 分别在 δ 5.82, 5.55, 2.87, 2.72, 1.48 处出现特征峰. $PCLA-PEG-PCLA$ 谱图显示, 除了 $-CH_3$ 特征峰外, 其余均为不同链接顺序的 $-CH_2-$ 特征峰. 而与 OSM_1 和 $PCLA-PEG-PCLA$ 的谱图比较, $OSM_1-PCLA-PEG-PCLA-OSM_1$ 中各质子的化学位移基本相同.

2.2 合成路线的选择

磺胺类药物不同衍生物由于末端取代基不同而具有不同的 pK_a , 表现出一定的 pH 敏感性^[14]. 本文采用自由基聚合法, 将 SM_1 进行酰化聚合, 得到具有一定聚合度的 OSM_1 低聚物, 使其 pK_a 接近人体生理条件 ($pH = 7.4$). 在 $PCLA-PEG-PCLA$ 的合成过程中, 根据所采用的单体化合物不同, 可采用两种不同途径: 一是缩合共聚法, 二是开环聚合法^[15]. 本文采用开环聚合法, 将 LA, ϵ -CL 和 PEG 在熔融条件下本体开环聚合得到嵌段共聚物, 与缩合共聚法比较, 该方法产率高, 重现性好. 最后将上述两种合成产物在偶联剂作用下, 经脱水缩合反应, 得到嵌段共聚物 $OSM_1-PCLA-PEG-PCLA-OSM_1$. DCC 反应活性较高, 室温下短时间即可发生, 副产物为二环己基脲 (DUC), 与 DCC 溶解性差别较大, 有利于产物的分离纯化. 合成反应路线如 Scheme 1 所示.



2.3 临界胶束浓度

芘是一种弱极性的稠环芳烃类化合物, 其荧光光谱对外界环境的极性变化非常敏感. 当共聚物分子聚集形成胶束时, 芘立即分布到胶束的疏水内核中, 荧光强度增强, 并且其荧光光谱发生变化, 激发波长发生明显红移. 本文利用共聚物形成胶束后荧光光谱激发峰红移, 导致荧光强度比 I_{321}/I_{320} 发生

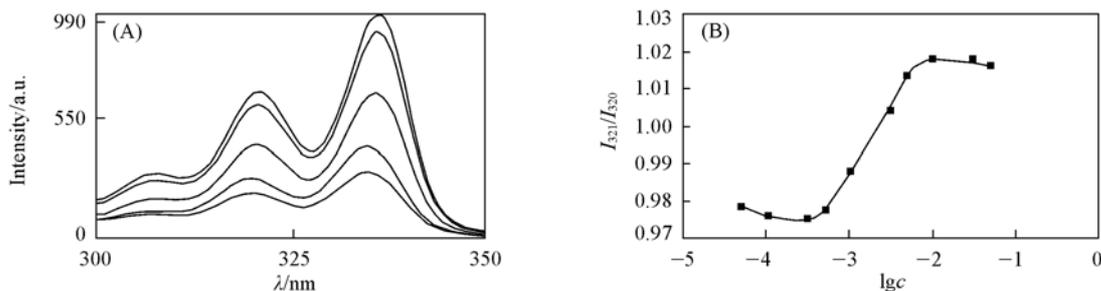


Fig. 4 Excitation spectra of pyrene (A) and cmc curve (B) as a function of $OSM_1-PCLA-PEG-PCLA-OSM_1$ concentration in water

变化未测定胶束溶液的 cmc^[7,16,17]. 从图 4(A) 可见, 当共聚物质量浓度大于 3×10^{-5} g/mL 时, 激发波长发生红移, 由 320 移至 321 nm, 335 移至 336 nm, 这证实了共聚物 OSM₁-PCLA-PEG-PCLA-OSM₁ 在水溶液中形成胶束. 当聚合物浓度小于 cmc 时, 体系中芘的 I_{321}/I_{320} 值与其在水中值一致; 当聚合物浓度达到 cmc 时, 芘被增溶在胶束内核中, I_{321}/I_{320} 值急剧增大; 当聚合物浓度大于 cmc 时, 芘的外界环境极性不再变化, I_{321}/I_{320} 值基本不变. 芘的 I_{321}/I_{320} 值急剧增大时对应的溶液浓度就是胶束开始形成的浓度, 即 cmc. 芘的 I_{321}/I_{320} 值对共聚物浓度对数作图见图 4(B), 测得共聚物 cmc 为 2.98×10^{-5} g/mL.

2.4 共聚物胶束溶液的粒径和相转变温度

在不同 pH 和温度条件下, PCLA-PEG-PCLA 和 OSM₁-PCLA-PEG-PCLA-OSM₁ 共聚物胶束的粒径大小及分布情况如图 5 所示. 随着温度的升高, 两个共聚物胶束体系均因失水而使粒径略微减小. 与 PCLA-PEG-PCLA 相比, OSM₁-PCLA-PEG-PCLA-OSM₁ 中的疏水/亲水链段比例大大增加, 因此形成的胶束粒径较大. 实验结果表明, 与 pH = 7.4 时相比, OSM₁-PCLA-PEG-PCLA-OSM₁ 共聚物胶束粒径在 pH = 8.0 时变小, 其具体原因目前尚未见明确的解释, 参考 Woo 等^[18] 的相关研究分析其可能是与 OSM₁ 具有 pH 敏感性, 在不同 pH 条件下其在水溶液中的存在形式不同有关. 当溶液 pH 为 7.4 时,

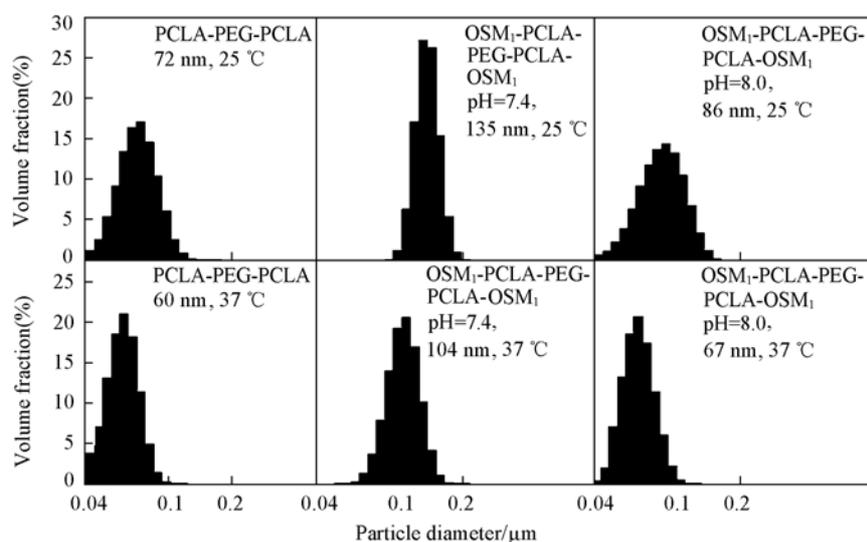


Fig. 5 Micelle size and its distribution of OSM₁-PCLA-PEG-PCLA-OSM₁ and PCLA-PEG-PCLA copolymer solutions at different temperatures and pH values

OSM₁ 以分子形式存在, 呈疏水性, 增强了 PCLA-OSM₁ 之间的疏水作用力, 形成胶束时疏水内核变大, 粒径增加; 当溶液 pH 为 8.0 时, OSM₁ 处于离子化状态, 干扰了 PCLA-OSM₁ 段之间的疏水作用, 导致疏水链段长度大大减小, 处于离子化状态的 OSM₁ 由于分子间的氢键作用、胶束内部缔合作用的存在, 以及其自身链长度的影响, 并未处于胶束的亲水外层, 而以无定形态存在于胶束亲水层和疏水内核之间, 致使胶束粒径减小, 与共聚物 PCLA-PEG-PCLA 胶束粒径相似.

图 6 为共聚物 OSM₁-PCLA-PEG-PCLA-OSM₁ 在不同 pH 下相转变温度随浓度变化曲线, 可见随着 pH 的增大, 相转变温度升高. 由实验结果可知, 在人体生理 pH (pH = 7.4) 下, 共聚物水溶液发生相转变的温度低于人体生理温度 (36 ~ 37 °C), 高于室温 (25 °C), 这可确保共聚物溶液在室温下保持液相状态, 便于注射给药; 注入体内后, 在生理条件下发生相转变, 形成凝胶状态的药物贮库, 以延缓药物释放. 共聚物溶液-凝胶相转变过程的主要

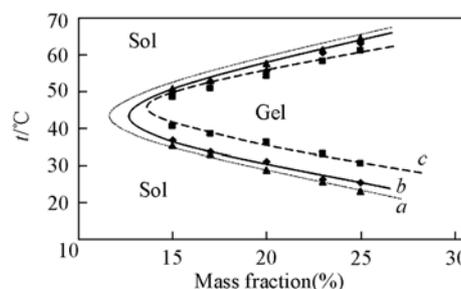


Fig. 6 Sol-gel transition phase diagrams of OSM₁-PCLA-PEG-PCLA-OSM₁ with various mass fractions at different pH values

a. pH = 7.0; b. pH = 7.4; c. pH = 7.8.

驱动力是分子间的疏水作用力, 因此共聚物分子的疏水性变化可以影响相转变温度. 由于 OSM₁ 低聚物的 pK_a 接近 7.4, 当 pH ≤ 7.4 时, OSM₁ 处于去离子化状态, 使得共聚物 OSM₁-PCLA-PEG-PCLA-OSM₁ 的疏水性增加, 具有较低的相转变温度. 反之, 当 pH > 7.4 时, OSM₁ 处于离子化状态, 共聚物的疏水性降低, 因此相转变温度升高. 此外, 在相同 pH 条件下, 相转变温度随着共聚物浓度的增加而降低.

参 考 文 献

- [1] LIN You-Wen(林友文), CHEN Qing(陈庆), LUO Hong-Bin(罗红斌). Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2007, **28**(1): 183—187
- [2] Thomas Kissela, Youxin Lib, Florian Ungera. Advanced Drug Delivery Reviews[J], 2002, **54**: 99—134
- [3] ZHAO Qun(赵群), Ni Pei-Hong(倪沛红). Progress in Chemistry(化学进展)[J], 2006, **18**(6): 768—779
- [4] HUO Mei-Rong(霍美蓉), ZHOU Jian-Ping(周建平). Chin. J. Nat. Med.(中国天然药物)[J], 2003, **1**: 246—251
- [5] HU Xing(胡兴), ZOU Guo-Lin(邹国林). Amino Acids and Biotic Resources(氨基酸和生物资源)[J], 2004, **26**(3): 61—64
- [6] HAN Li-Mei(韩丽妹), FANG Xiao-Ling(方晓玲). Chin. Pharm. J.(中国药学杂志)[J], 2004, **39**(3): 167—169
- [7] LIN Hao(林浩), TIAN Hua-Yu(田华雨), SUN Jing-Ru(孙敬茹), *et al.*. Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2006, **27**(7): 1385—1388
- [8] QIAO Ming-Xi, CHEN Da-Wei, MA Xi-Chen, *et al.*. International Journal of Pharmaceutics[J], 2005, **294**: 103—112
- [9] Kang S. I., Bae Y. H. J. Controlled Release[J], 2002, **80**: 145—155
- [10] Shim W. S., Yoo J. S., Bae Y. H., *et al.*. Biomacromolecules[J], 2005, **6**: 2930—2934
- [11] LI Wen-Juan(李文娟), ZHOU Cong-Shan(周从山), YANG Tao(杨涛). Petrochemical Technology and Application(石化技术与应用)[J], 2007, **25**(1): 48—50
- [12] Dai P. H., Woo S. S., Hi H. K., *et al.*. Polymer[J], 2006, **47**: 7918—7926
- [13] Lin Yu, Huan Zhan, Jiandong Ding. Angew. Chem. Int. Ed. [J], 2006, **45**(14): 2232—2235
- [14] Seong I. K., You H. B. Journal of Controlled Release[J], 2002, **80**: 145—155
- [15] WANG Jing(王晶), ZHOU Qing-Song(周庆颂), YUAN Yue(袁悦), *et al.*. Journal of Shenyang Pharmaceutical University(沈阳药科大学学报)[J], 2005, **22**(5): 348—351
- [16] Sang Cheon Lee, Chang Youngkyu, Yoon Jin-San, *et al.*. Macromolecules[J], 1999, **32**: 1847—1852
- [17] Seung Kil Han, Kun Na, You Han Bea. Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects[J], 2003, **214**: 49—59
- [18] Woo Sun Shim, Sung Wang Kim, Doo Sung Lee. Biomacromolecules[J], 2006, **7**: 1935—1941

Synthesis and pH and Temperature Sensitive Properties of OSM₁-PCLA-PEG-PCLA-OSM₁ Block Copolymers

HAO Tang-Na, QIAO Ming-Xi, GU Jian-Chun, LI Zhen, HU Hai-Yang, ZHAO Xiu-Li, CHEN Da-Wei*
(School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract A new kind of biodegradable pH and temperature sensitive block copolymers were synthesized by ring-opening and conventional free radical polymerizations. The chemical structure of OSM₁-PCLA-PEG-PCLA-OSM₁ block copolymers was characterized *via* FTIR and ¹H NMR. Critical micelle concentration and particle size distribution were studied by fluorospectrophotometer and laser size detector to verify the copolymers micelle formation. The results of sol-gel transition show that the block copolymers solution possesses both pH and temperature sensitive properties. Different block copolymer solutions can form a stable gel obviously at certain temperature. OSM₁-PCLA-PEG-PCLA-OSM₁ block copolymers could be potential intelligent polymers materials for drug delivery system because of its pH and temperature sensitive properties.

Keywords pH sensitivity; Temperature sensitivity; Biodegradation; Block copolymer; Hydrogels

(Ed.: D, Z)