

·研究简报·

具有电活性苯胺四聚体接枝聚谷氨酸的合成与表征^{*}

郎 乐^{1,2} 庄秀丽¹ 刘亚栋^{1,2} 陈学思^{1**} 危 岩^{3**}

(¹ 中国科学院长春应用化学研究所生态环境高分子材料重点实验室 长春 130022)

(² 中国科学院研究生院 北京 100039)

(³ Department of Chemistry, Drexel University, Philadelphia, PA 19104 USA)

摘 要 以 *N*-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 活化聚 L-谷氨酸的羧基并与苯胺四聚体的氨基缩合, 得到了以可生物降解的聚谷氨酸为主链, 具有电活性的苯胺四聚体为侧链的新型接枝聚合物. 用 ¹H-NMR、质谱分析、光谱分析的方法确定了化合物的结构. 侧链羧基的存在使聚合物可以溶解于碱性的缓冲溶液中. 对聚合物的电化学性质进行了紫外及循环伏安的表征, 研究结果表明, 接枝后的聚合物具有与苯胺低聚体相似的可逆的氧化还原过程并可被质子酸掺杂, 表现出良好的电化学活性. 同时, 以定量紫外吸收及元素分析的方法分别测定了聚合物的接枝率. 实验中通过控制反应的投料比可以使苯胺四聚体的接枝率达到 40% 以上, 并对聚合物的自掺杂现象进行了讨论.

关键词 聚谷氨酸, 苯胺四聚体, 接枝共聚物, 电活性, 生物材料

自 20 世纪 70 年代导电高分子被发现以来, 因其具有特殊的结构和优异的物理化学性能, 在能源、光电子器件、传感器、分子导线和分子器件, 以及电磁屏蔽、金属防腐和隐身技术上有广泛和诱人的应用前景而受到关注. 近年来, 生物医学领域的研究证明, 微量的电信号刺激对于多种细胞的生长、增殖与分化, 都具有明显的诱导和促进作用^[1]. 导电高分子如聚苯胺、聚吡咯等, 作为一种能为细胞提供具有电活性的生长环境, 同时又有良好的生物相容性的支架材料, 一度成为组织工程学研究的热点^[2,3]. 但由于导电高分子的不可降解性, 长期存在于生物体内会引起组织的炎症, 使其在实际应用中受到了限制. 而导电高分子低聚体由于具有与导电高分子相似的电化学性质, 越来越多地被用在构建新型的功能高分子^[4,5] 和组织工程支架材料的研究中^[6]. 如将苯胺低聚体引入到传统的生物高分子如聚乳酸、聚 ϵ -己内酯以及天然生物高分子壳聚糖中, 得到了一系列同时具有电活性和生物可降解性的高分子材料^[7~9]. 在体内酶的作用下, 生物高分子部分最终降解成可吸收的小分子, 而苯胺低聚体部分由于分子量较小也可被人体排出体外.

本文将具有电活性的苯胺四聚体 (AT) 接枝到聚谷氨酸 (PLGA) 侧链上, 得到了以可生物降解的聚谷氨酸为主链的新型接枝共聚物, 并对共聚物的结构与电活性进行了表征. 共聚物结构如图 1 所示.

1 试剂与仪器

聚 (L-谷氨酸) (PLGA) 参照文献 [10] 合成; *N*-苯基-1,4-对苯二胺 (纯度 98%, Aldrich 公司); 4,4'-二胺基-二苯胺硫酸盐 (纯度 85%, TCI 公司); 二环己基碳二亚胺 (DCC, 纯度 99%, Aldrich 公司); *N*-羟基琥珀酰亚胺 (NHS, 吉尔生化有限公司); 丁二酸酐 (国药集团化学试剂有限公司); 二甲基亚砜 (DMSO) 以 CaH₂ 干燥处理后减压蒸馏精制.

¹H-NMR 用 Bruker AM400 核磁共振仪测试, 以 DMSO-*d*₆ 为溶剂. 质谱用 Bruker autoflex III 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪进行测试. 紫外-可见光谱用 UV-2401 谱仪进行测试. 循环伏安曲线用 CHI 600C 电化学分析仪测试, 扫描速率为 50 mV/s. 样品被涂在薄的 ITO 玻璃表面作为工作电极, 铂片为对电极, Ag/Ag⁺ 为参比电极. 元素分析用 Vario EL 分析仪进行测试.

^{*} 2010-03-09 收稿, 2010-03-30 修稿; 国家自然科学基金 (基金号 50773081, 50733003, 50425309) 和科技部国际合作项目 (项目号 2007DFR50200) 资助; ^{**} 通讯联系人, E-mail: xschen@ciac.jl.cn; weiyen@drexel.edu

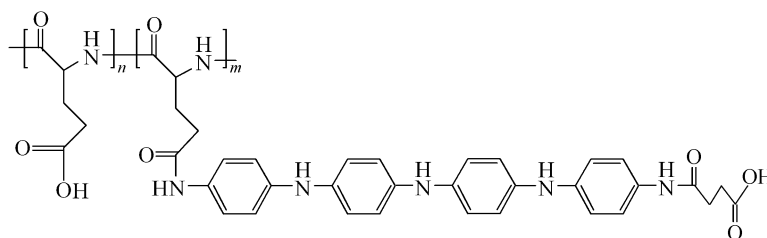


Fig. 1 Structure of copolymer PLGA-g-AT

2 样品合成

2.1 苯胺四聚体(aniline tetramer, AT)的合成

参照文献[11]的合成方法,先以丁二酸酐保护 *N*-苯基-1,4-对苯二胺的端氨基,再用保护后的 *N*-苯基-1,4-对苯二胺与 4,4'-二胺基-二苯胺硫酸盐在酸性条件下以过硫酸铵氧化,得到一端以丁二酸酐保护的苯胺四聚体,产率 42%。MS: 481.2 (MH^+/e), ^1H -NMR(300 MHz, DMSO- d_6 , δ): 2.74 (t, 2H, CH_2COOH), 2.50 (t, 2H, CH_2CONH), 6.75 ~ 7.04 (m, 16H, Ph), 9.70 (s, 1H, COOH)。

2.2 聚(L-谷氨酸)羧基的活化^[12] 氮气保护下将 0.5 g PLGA ($M_n = 10$ kDa, $[COOH]$ 约为 3.8 mmol), 0.445 g NHS (3.8 mmol), 0.8 g DCC (3.8 mmol) 依次加入反应瓶内,用注射器加入 10 mL 新蒸无水 DMSO 溶解,室温下搅拌,反应 12 h 后以 G4 漏斗抽滤,除去白色晶状不溶物,滤液在 300 mL 无水乙醇中沉降出来,得到的白色粉末再次溶于 15 mL *N,N*-二甲基甲酰胺并于 300 mL 无水乙醇中沉降,重复 2 ~ 3 次除去小分子产物,得白色粉末状固体,产率 35%。 ^1H -NMR (DMSO- d_6 , δ): 4.24 (broad, 1H, $\underline{CH}$), 2.80 (s, 4H, $COCH_2-CH_2CO$), 2.28 (b, 2H, CH_2COOH), 1.92 (b, 2H, CH_2CH_2COOH), 8.22 (b, 1H, NH), 12.15 (b, 1H, COOH)。

2.3 接枝共聚物 PLGA-g-AT 的合成 氮气保护下取 NHS 活化后的 PLGA 0.64 g, 苯胺四聚体 1.86 g 加入反应瓶,注射器加入 10 mL 无水 DMSO 溶解,50℃ 下反应 48 h 后沉降在 300 mL 无水乙醇中,抽滤,沉淀物以 DMF/乙醇反复沉降多次至上清液无色,除去未反应的苯胺四聚体,得蓝色粉末状固体产物,产率 87%。 ^1H -NMR (DMSO- d_6 , δ): 4.24 (b, 1H, $\underline{CH}$), 2.28 (b, 2H, CH_2COOH), 1.92 (b, 2H, CH_2CH_2COOH), 6.75 ~ 7.50 (m, 16H, Ph), 9.67 (s, 1H, COOH)。元素分析实测值(%): C 58.04, H 4.54, N 13.06。

3 讨论

聚合物的结构通过 ^1H -NMR 的方法进行了表征。经 NHS 活化后的 PLGA 在 $\delta = 2.8$ 处出现了 NHS 基团上的亚甲基氢 ($-CH_2-$) 的化学位移,如图 2(A) 所示。而接枝苯胺四聚体后的聚合物上,该化学位移完全消失,同时在 $\delta = 6.75 \sim 7.50$ 之间出现了苯胺四聚体中苯环及芳仲胺上氢的化学位移,说明 NHS 基团已全部被苯胺四聚体所取代^[5,13],如图 2(B) 所示。以主链次甲基氢为参照计算出的 NHS 的接枝率比同样条件下计算得到的苯胺四聚体的接枝率略大,但因聚谷氨酸在 DMSO- d_6 中以螺旋构型存在,化学位移不明显,积分误差较大,故所得接枝率整体处于同一水平。

共聚物 PLGA-g-AT 可以很好地溶解在 DMF、DMSO 等强极性非质子溶剂中。图 3(a) 是在氧化剂过硫酸铵的氧化作用下,共聚物的苯胺四聚体部分从还原态被氧化到中间氧化态所得到的紫外-可见光谱跟踪记录。当共聚物中的苯胺四聚体部分处于全还原态时,紫外-可见光谱上 325 nm 处出现吸收峰,这一吸收峰归属为苯环中的 $\pi-\pi^*$ 跃迁。随时氧化反应的进行,此峰位逐步蓝移,并且在 590 nm 处出现了新的吸收峰,与从苯环到醌环的激子跃迁有关,并且随着氧化程度的不断增加,吸收峰的强度也逐渐增强并达到最大,此时即为苯胺四聚体的中间氧化态。可以看出共聚物保留了与苯胺低聚体相似的紫外吸收曲线^[14]。同时,由于主链聚谷氨酸具有侧羧基的结构,共聚物可溶在碱性的缓冲溶液中,并随着溶液 pH 值的降低,在 430 nm 处出现苯胺低聚体被掺杂时的极化子吸收峰,如图 3(b) 所示。同时,由于被质子酸掺杂使 N 原子上 H 原子的价电子分配到整个分子链上形成共轭,使苯胺四聚体部分共轭效应增强, π 电子跃迁所需能量降低,因此吸收带发生红移,由 590 nm 移到 750 nm。

将接枝苯胺四聚体的共聚物样品还原至全还原态,并配制成不同浓度的 DMF 溶液,通过紫外

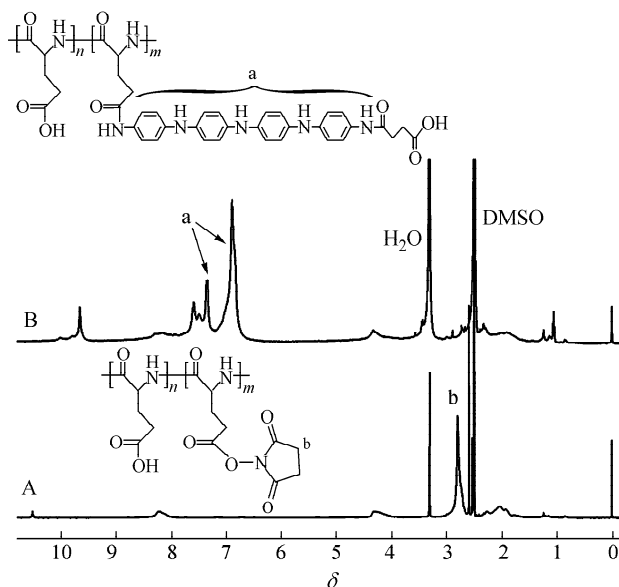


Fig. 2 ^1H -NMR spectra of (A) PLGA-g-NHS and (B) PLGA-g-AT in $\text{DMSO}-d_6$

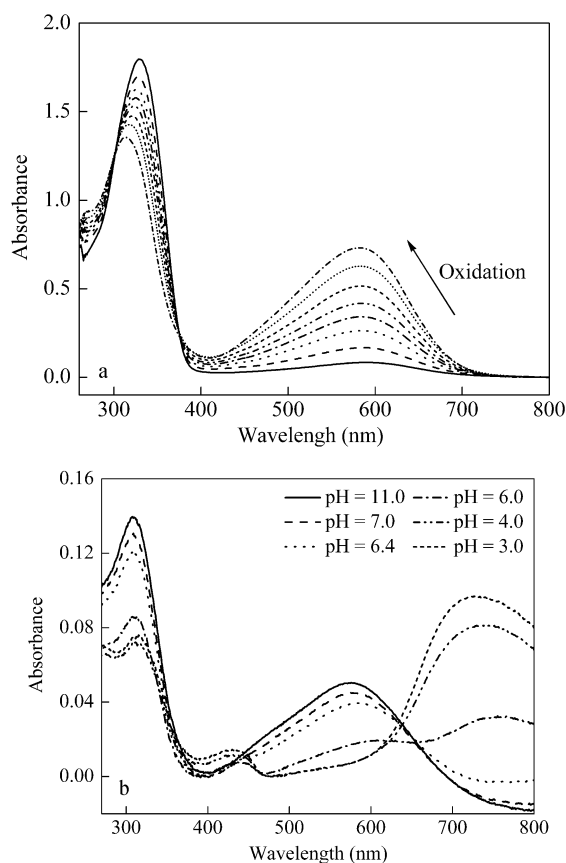


Fig. 3 The UV-Vis spectra of copolymer dissolve in (a) DMF and (b) buffer

可见光谱定量测量其 325 nm 处苯胺四聚体部分 $\pi-\pi^*$ 跃迁吸收值, 并对浓度做图, 与纯苯胺四聚

体的吸收-浓度曲线相比较(图 4), 可以计算出共聚物的接枝率. 同时, 所得结果与通过分析元素分析数据中的 C、N 比例所估算出的接枝率进行比较. 苯胺四聚体的接枝率受到反应体系黏度大小、反应投料比、羧基活化程度及空间位阻的影响. 实验中以 $[\text{COOH}]:[\text{AT}] = 1:1$ 的投料比反应, 紫外吸收定量法计算其接枝率约为 48%, 元素分析方法估算其接枝率约为 35% 左右.

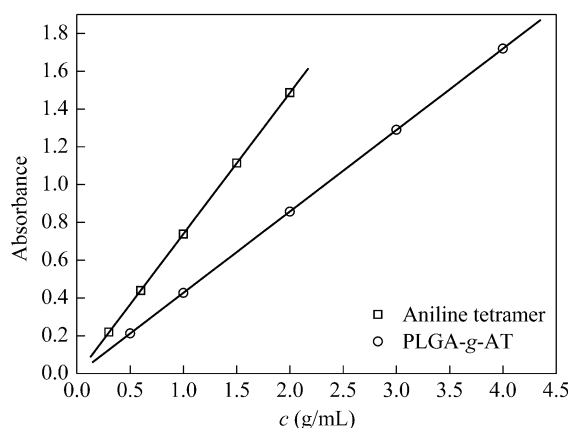


Fig. 4 Calculation of the graft ratio of copolymer PLGA-g-AT

为了表征聚合物的电化学性质, 将共聚物的 DMF 溶液在 ITO 玻璃的表面涂覆成膜, 以 Pt 电极为对电极, Ag/AgCl 电极为参比电极, 于 1 mol/L 的 HCl 溶液中进行循环伏安的测试. 由图 5 可见, 聚合物有两对可逆的氧化还原峰, 其中第一对氧化还原峰对应着苯胺四聚体的还原态和中间氧化

态的氧化还原关系,第二对氧化还原峰对应着中间氧化态和高氧化态的苯胺四聚体,即全醌式结构的苯胺四聚体之间的氧化还原关系.说明聚合物依然具有较好的电活性.

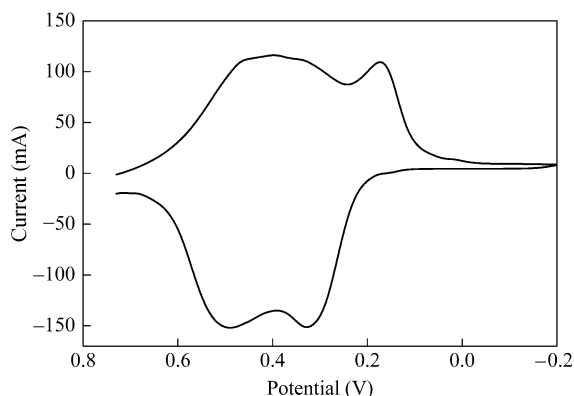


Fig. 5 Cyclic voltammogram of copolymer. Measured in 1 mol/L HCl aq

由于主链大量酰胺键的存在使聚合物的溶解性相对较差,只能溶解在 DMF、DMSO 及碱性的缓冲溶液中,使聚合物的分子量很难用常规的 GPC 等方法表征.但由于可测得苯胺四聚体的接枝率,同时反应前的聚 L-谷氨酸可以用黏度法及 GPC 方法表征其分子量,故可对聚合物的分子量进行估算.如实验中所用的聚 L-谷氨酸黏均分子量约为 1×10^4 Da,若按接枝率 48% 计算,接枝后共聚

物分子量约为 2.9×10^4 Da.

NHS 活化后的酯在 50℃ 下与苯胺四聚体的胺基具有较高的反应活性,这一点可以从反应后聚合物上 NHS 的亚甲基峰消失得到证实,实际上,实验中为了控制苯胺四聚体的接枝率,对反应的投料比及反应时间进行了控制.因为对于一种潜在的组织工程支架材料,过高的苯胺低聚体的含量可能会带来过高的细胞毒性,同时也会降低材料的亲水性,不利于细胞的生长和增殖.适量的侧羧基的存在可以调节材料表面的亲水性,使材料更能适应细胞生长的需要.

4 结论

通过 NHS 活化聚 L-谷氨酸侧羧基的方法成功将具有电活性的苯胺四聚体接枝到了聚 L-谷氨酸的侧链上,得到了同时具有电活性与生物可降解性的新型接枝共聚物.对聚合物的紫外及循环伏安的表征显示聚合物具有良好的电化活性.此外,由于处于中间氧化态的苯胺低聚体可以被质子酸掺杂,主链上剩余羧基的存在使聚合物在一定条件下会发生分子间或分子内的自掺杂现象,并常伴随着凝胶现象的出现.若对这一现象深入研究有可能在应用中不需要外加掺杂剂即可使苯胺低聚体处于掺杂态.同时,凝胶现象的出现也可以赋予材料更好的韧性,有望在组织工程支架材料的研究中发挥作用.

REFERENCES

- Wong J Y, Langer R, Ingber D E. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(8): 3201 ~ 3204
- Schmidt C E, Shastri V R, Vacanti J P, Langer R. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(17): 8948 ~ 8953
- Gomez N, Schmidt C E. J Biomed Mater Res Part A, 2007, 81A(1): 135 ~ 149
- Liu Siwei(刘四委), Zhu Kaizheng(朱凯征), Zhang Yi(张艺), Zhu Yafei(祝亚非), Xu Jiarui(许家瑞). Acta Polymerica Sinica(高分子学报), 2005, (2): 264 ~ 267
- Sun Wendong(孙文东), Hu Zhicheng(胡志成), Pan Caiyuan(潘才元). Acta Polymerica Sinica(高分子学报), 2006, (5): 692 ~ 696
- Rivers T J, Hudson T W, Schmidt C E. Adv Funct Mater, 2002, 12(1): 33 ~ 37
- Huang L H, Hu J, Lang L, Wang X, Zang P B, Jing X B, Wang X H, Chen X S, Lelkes P I, MacDiarmid A G, Wei Y. Biomaterials, 2007, 28(10): 1741 ~ 1751
- Huang L H, Zhuang X L, Hu J, Lang L, Zhang P B, Wang Y, Chen X S, Wei Y, Jing X B. Biomacromolecules, 2008, 9(3): 850 ~ 858
- Hu J, Huang L H, Zhuang X L, Zhang P B, Lang L, Chen X S, Wei Y, Jing X B. Biomacromolecules, 2008, 9(10): 2637 ~ 2644
- Cao Tian(曹田), Yin Jingbo(尹静波), Luo Kun(罗坤), Chen Hongdan(陈红丹), Chen Xuesi(陈学思). Chemical Journal of Chinese Universities(高等学校化学学报), 2006, (27): 369 ~ 371
- Chen Liang(陈梁). Synthesis of monodisperse oligoanilines and their properties(电活性苯胺齐聚物的分子设计及其性质的研究). Doctoral Dissertation of Jilin University(吉林大学博士论文), 2005
- Iwata H, Matsuda S, Mitsuhashi K, Itoh E, Ikada Y. Biomaterials, 1998, 19: 1869 ~ 1876
- Han D H, Pan C Y. Polymer, 2006, 47(20): 6956 ~ 6962
- Chen L, Yu Y H, Mao H P, Lu X F, Zhang W J, Wei Y. Mater Lett, 2005, 59: 2446 ~ 2450

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF ELECTROACTIVE GRAFT COPOLYMER OF POLY(L-GLUTAMIC ACID)-*g*-ANILINE TETRAMER

LANG Le^{1,2}, ZHUANG Xiuli¹, LIU Yadong^{1,2}, CHEN Xuesi¹, WEI Yen³

(¹ Key Laboratory of Polymer Ecomaterials, Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022)

(² Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039)

(³ Department of Chemistry, Drexel University, Philadelphia, PA 19104 USA)

Abstract Novel electroactive and biodegradable graft copolymers with aniline tetramer side chains were synthesized by conversing the side carboxyl groups of poly(L-glutamic acid) to active *N*-oxysuccinimide ester, which can be easily substituted by amino compounds. The main chain of grafting copolymer, poly(L-glutamic acid) was recognized as a biodegradable polymer, and the aniline tetramer side chain, which is similar with polyaniline in electrical chemical properties, enabled the copolymer to gain or lose electron reversibly, *i. e.* electroactivity. The chemical structures of the copolymers were confirmed by ¹H-NMR, UV-Vis spectrum and elemental analysis. The copolymer can be dissolved in DMF, DMSO or alkaline aqueous solution. The UV-Vis spectrum of the copolymer was measured in DMF at different buffer pH values. The aniline tetramer side chain can be oxidized to its emeraldine state in the presence of oxidant and doped by protonic acid. The cyclic voltammogram of the copolymer, measured in 1 mol/L HCl aqueous solution, showed that there were two pairs of reversible redox peaks, which correspond to two redox processes. These characters indicated that the graft copolymer showed a good electroactivity. The graft ratio of aniline tetramer was confirmed by both element analysis method and quantitative UV absorbance of the copolymer in its leucoemeraldine state. The graft ratio could reach to upon 40% by appropriate feed ratio, which meant a higher weight percentage of electroactive units compared with those block copolymers previously reported. A new route to build both electroactive and biodegradable polymers was reported, which may have potential application in nerve tissue engineering and some other aspects of biological researches.

Keywords Poly(L-glutamic acid), Aniline tetramer, Graft copolymer, Electroactive, Biomaterials