

## 壳聚糖-*O*-聚(聚乙二醇甲醚甲基丙烯酸酯) 接枝共聚物的 ATRP 合成及其自组装研究\*

何 嫒 於 麟 谭松巍 蒋宏亮\*\* 涂克华 王利群\*\*

(浙江大学高分子科学与工程学系 高分子合成与功能构造教育部重点实验室 杭州 310027)

**摘 要** 以十二烷基硫酸钠-壳聚糖复合物(SCC)为起始物,将溴代异丁酸偶联到 SCC 的羟基上,得到溴代 SCC(Br-SCC).以 Br-SCC 作为大分子引发剂,溴化亚铜、二联吡啶为催化剂,引发聚乙二醇单甲醚甲基丙烯酸酯(MPEGMA)原子转移自由基聚合,得到 SCC-*O*-PMPEGMA;SCC-*O*-PMPEGMA 中十二烷基硫酸钠(SDS)用 Tris-2-甲基-2-氨基-1,3-丙二醇(Tris)解复合脱除,最终制备得到壳聚糖-*O*-PMPEGMA(CS-*O*-PMPEGMA).用 FTIR 和  $^1\text{H-NMR}$  对中间产物与 CS-*O*-PMPEGMA 进行了表征,结果表明 SCC 的溴化度可以通过改变溴代异丁酸/SCC 的投料比调节,改变 MPEGMA/Br-SCC 的投料比则可调控 PMPEGMA 的聚合度.用动态光散射、zeta 电位仪以及 TEM 等手段研究了 CS-*O*-PMPEGMA 与肝素钠的复合行为,结果表明随着肝素钠/壳聚糖结构单元摩尔比( $X$ )增加,复合胶束的粒径增大、表面电位降低;当  $X$  超过 2 时,肝素钠与 CS-*O*-PMPEGMA 复合形成球形纳米颗粒,其水合半径约 44 nm, zeta 电位为  $-8.9$  mV. 合成得到的 CS-*O*-PMPEGMA 具有规整化学结构,能与聚阴离子复合形成球形胶束,很有希望在基因传递与肿瘤靶向等领域得到应用.

**关键词** 壳聚糖, 复合物, 聚乙二醇, 原子转移自由基聚合, 自组装

壳聚糖是甲壳素脱乙酰基产物,具有良好的生物相容性、生物可降解性和抗菌性特点,被广泛应用于生物、医药、化工、农业、纺织、食品等领域<sup>[1]</sup>. 壳聚糖作为唯一一类天然聚阳离子,可以结合阴离子药物或 DNA 形成离子复合物,这种特性使其在药物控释、基因传递和蛋白质控释等方面具有很好的应用前景<sup>[2~4]</sup>. 但是由于其分子链上大量的氨基和羟基形成分子内和分子间氢键,导致壳聚糖结晶度高、溶解性差,很大程度上限制了其应用<sup>[5]</sup>.

对壳聚糖(CS)进行接枝改性可以改善其加工与溶解性,同时赋予其各种独特性能<sup>[6~9]</sup>. 最近,利用原子转移自由基聚合(ATRP)对 CS 等天然聚合物进行接枝改性引起了人们的关注<sup>[10~12]</sup>. 聚乙二醇(PEG)具有无毒、极强的水化作用和高度的构象柔顺性等特点,将 PEG 或 PEG 衍生物接枝到壳聚糖上可增加 CS 的水溶性,调节其与阴离子活性物质的装配行为,从而进一步拓宽其生物医学应用<sup>[13~16]</sup>. 目前研究集中在利用壳聚糖氨基进行接枝反应,这导致壳聚糖阳离子电荷密度降低,限制了其在基因传递、肿瘤靶向等领域应用. 本文以十二烷基硫酸钠-壳聚糖复合物(SCC)

为起始物,采用 ATRP 法将聚乙二醇单甲醚甲基丙烯酸酯(MPEGMA)接枝到壳聚糖羟基上,得到结构规整的 CS-*O*-PMPEGMA,避免目前其它接枝方法反应步骤繁琐、条件苛刻等缺点. 此外,还研究了 CS-*O*-PMPEGMA 与肝素钠的复合作用,得到分散良好的球形胶束.

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

壳聚糖(CS,脱乙酰度 95%,玉环金壳生物化学有限公司);十二烷基硫酸钠(SDS,国药集团化学试剂有限公司);溴代异丁酸(Sigma-Aldrich);*N*-羟基丁二酰亚胺(NHS,百灵威化学技术有限公司);*N,N'*-二环己基碳二亚胺(DCC, Acros Organics);溴化亚铜(CuBr,国药集团化学试剂有限公司,用前经 5% 醋酸溶液反复洗涤,后用丙酮洗涤多次);2,2'-联吡啶(国药集团化学试剂有限公司);聚乙二醇单甲醚甲基丙烯酸酯(MPEGMA,  $M_n = 1100$ , Sigma-Aldrich,使用前用丙酮溶解后再沉淀到石油醚中,过滤除去阻聚剂);三(羟甲基)氨基甲烷(Tris,百灵威化学技术有限公司);溴化钾(百灵威化学技术有限公司);1-甲

\* 2009-08-11 收稿,2009-11-13 修稿;国家自然科学基金(基金号 20774081)和浙江省教育厅科研项目(项目号 Y200804954)资助;

\*\* 通讯联系人, E-mail: hljiang@zju.edu.cn; lqwang@zju.edu.cn

基-2-吡咯烷酮(国药集团化学试剂有限公司,用前用分子筛处理后减压蒸馏收集);二甲基亚砜(DMSO,国药集团化学试剂有限公司,用 $\text{CaH}_2$ 处理后减压蒸馏收集);离子交换树脂;肝素钠(上海三杰生物技术有限公司).

8200 型超滤杯搅拌式超滤装置(美国 MILLIPORE 公司);高回收率再生纤维素超滤膜(10K Ultracel Amicon YM, 美国 MILLIPORE 公司);傅立叶红外光谱仪(Bruker Vector 22, 德国布鲁克光谱仪器有限公司);核磁共振仪(Advance DMX 500, 以 TMS 为内标);动态光散射粒径测试仪(Brookhaven 90 Plus, 散射角为  $90^\circ$ );透射电子显微镜(JEOL JEM-1230);Zetasizer Nano 系列动态激光散射仪(ZEN 3600, Malvern U. K.).

## 1.2 CS/SDS 复合物(SCC)的合成

先称取 4.83 g CS 溶解于 500 mL 的 2% (V/V) HAc 溶液中,再称取 17.28 g SDS 溶解于 300 mL 的 2% (V/V) HAc 溶液中. 两者完全溶解后,在磁力搅拌条件下,将 SDS 溶液倒入 CS 溶液中,产生许多絮状沉淀,离心收集沉淀并反复清洗,直至洗液没有气泡为止,冷冻干燥得到 9.83 g SCC (75.3%).

## 1.3 Br-SCC 大分子引发剂制备

称取 1.002 g (6 mmol) 溴代异丁酸、1.4825 g (7.2 mmol) DCC 和 0.8287 g (7.2 mmol) NHS 溶于 9 mL 冷的干燥的 1-甲基-2-吡咯烷酮中,然后  $40^\circ\text{C}$  搅拌 24 h,反应完毕,过滤除去白色沉淀  $N,N'$ -二环己基脲(DCU). 取 0.9 g SCC 溶于 10 mL DMSO 中,加入上述滤液后,  $40^\circ\text{C}$  搅拌 48 h. 反应完后将反应液加入乙醚丙酮混合溶剂中 ( $V_{\text{丙酮}}:V_{\text{乙醚}} = 1:9$ ),离心收集下层固体,得到 0.8 g (66.7%) 黄色粉末状固体.

## 1.4 ATRP 制备 CS-O-PMPEGMA

取一定量的 Br-SCC、MPEGMA 和二联吡啶,  $40^\circ\text{C}$  下溶于 DMSO 中. 完全溶解后,用液氮冷却,抽真空,再通入氩气,抽真空,反复 3 次;在氩气正压的情况下加入 CuBr,抽真空,通入氩气,反复 3 次. 在氩气条件下,  $40^\circ\text{C}$  反应 3 h.

反应结束后将产物取出,将反应液逐滴加入 pH 为 8~9 的 15% 的 Tris 溶液中(用 HCl 调节 Tris 溶液的 pH),后转入透析袋(MWCO: 3500)进行透析,透析袋内加入离子交换树脂以除去产物中的铜离子. 透析 24 h 后,过滤除去离子交换树脂,将滤液倒入超滤机中超滤,用 pH 8~9、浓度

为 15% 的 Tris/HCl 溶液清洗两遍后,用去离子水洗至溶液上没有泡沫. 将产物冻干,进行核磁、红外表征.

## 1.5 CS-O-PMPEGMA/肝素钠复合胶束的制备及表征

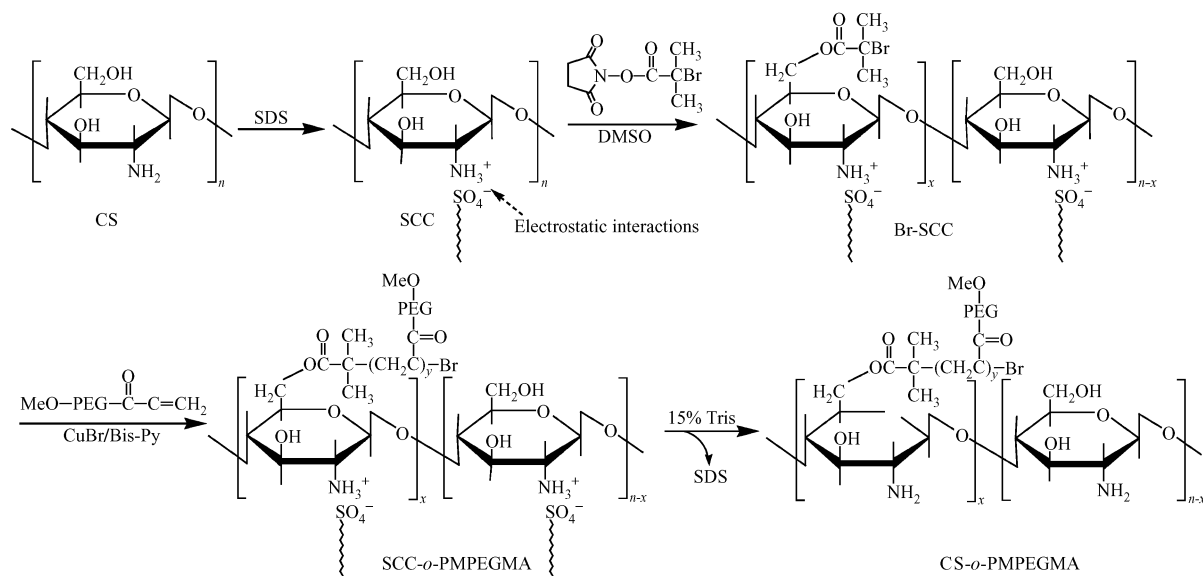
称取 6 mg CS-O-PMPEGMA,溶于 10 mL 去离子水中,并将 pH 调节至 3.3. 同样方法配置 pH 3.3、浓度为 0.6 mg/mL 的肝素钠溶液. 将肝素钠溶液逐滴加入 CS-O-PMPEGMA 溶液中,并跟踪测定混合溶液粒径与 zeta 电位变化. 当肝素钠的结构单元摩尔数与 CS-O-PMPEGMA 中 CS 结构单元摩尔数之比为 2.6 时,将 12  $\mu\text{L}$  的胶束溶液滴在表面附着碳膜的铜网上,冷冻干燥后,用透射电子显微镜观察胶束形态.

# 2 结果与讨论

## 2.1 CS-O-PMPEGMA 的合成与表征

CS-O-PMPEGMA 合成路线如示意图 1 所示. 首先将 CS 与 SDS 通过静电相互作用复合,制备得到 SCC<sup>[17,18]</sup>,该复合物能溶解在 DMSO 中. 然后以 DMSO 为反应溶剂,利用活泼酯法将溴代异丁酸引入壳聚糖的 6 位碳,制备得到 Br-SCC. 以 Br-SCC 作为大分子引发剂,引发 MPEGMA 进行 ATRP 聚合,从而在壳聚糖的羟基上引入 PEG 长链,得到 SCC-O-PMPEGMA. 将 SCC-O-PMPEGMA 溶解于 DMSO 中,直接沉淀到 Tris 水溶液中,除去 SDS,得到 CS-O-PMPEGMA.

图 1(a) 是 SCC 的红外谱图,在 1230 和 810  $\text{cm}^{-1}$  出现  $\nu(\text{S}-\text{O})$  和  $\nu(\text{C}-\text{O}-\text{S})$  吸收峰,证明 SDS 与壳聚糖形成复合物. SCC 的核磁谱图如图 2 所示,  $\delta = 0.85$  处是 SDS 中的甲基质子的化学位移,  $\delta = 2.85$  处是与壳聚糖 2 位碳相连质子的化学位移. 当 SDS/CS (mol/mol) 为 2:1 时,磺酸基团和氨基的摩尔比为 1.02:1,表明壳聚糖与 SDS 形成化学计量比复合物. 溴代异丁酸经 DCC-NHS 活化后,偶联到壳聚糖 6 位碳上,得到壳聚糖基大单体引发剂. 图 1(a) 的 SCC 在 1730  $\text{cm}^{-1}$  处没有吸收峰,图 1(b) 的红外谱图上 1730  $\text{cm}^{-1}$  出现了  $\nu(\text{C}=\text{O})$  吸收峰,表明溴代异丁酸与壳聚糖羟基之间形成酯基. 溴代异丁酸接枝度按照方程(1)计算,其中  $I_7$  为 7 号峰的面积,  $I_2$  为 2 号峰的面积,  $\delta = 1.93$  (7 号峰) 是 Br-SCC 中溴代异丁酸甲基质子的化学位移,  $\delta = 2.85$  (2 号峰) 处是与壳聚糖 2 位碳相连质子的化学位移. 具体的溴代异丁



Scheme 1 Synthesis route of CS-O-PMPEGMA

酸的接枝度的计算结果见表 1. 通过改变溴代异丁酸与复合物的投料比,可以实现不同溴代异丁酸接枝度. 同时可以看到,溴代异丁酸取代率很低. 文献[13]在非均相条件下将溴代异丁酸偶联到壳聚糖氨基上,同样发现其取代率很低. 与文献[13]不同的是,本文溴代异丁酸与 SCC 的偶联反应虽然可以在均相条件下进行,但由于 SCC 中 SDS 有较大空间位阻,导致溴代异丁酸的取代率也较低.

$$DS_{\text{bromoisobutyric acid}} = 0.95I_7/6I_2 \quad (1)$$

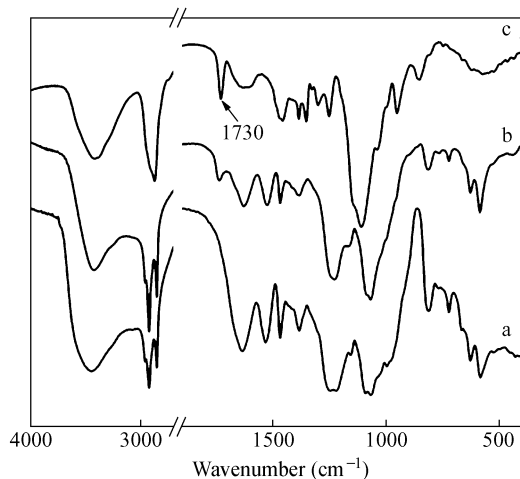


Fig. 1 IR spectra of (a) SCC, (b) Br-SCC, (c) CS-O-PMPEGMA

**Table 1** The effect of bromoisobutyric acid/SCC feed ratio on the substitution degree (DS) of bromoisobutyric acid

| Samples  | Feed ratio (mol%) | DS (mol%) |
|----------|-------------------|-----------|
| Br-SCC-1 | 37.5              | 2.5       |
| Br-SCC-2 | 47.4              | 5.5       |
| Br-SCC-3 | 60                | 10.8      |

CS-O-PMPEGMA 核磁谱图中  $\delta = 2.96$  (2 号峰)处是与壳聚糖 2 位碳相连质子的化学位移, $\delta = 3.3$  (c 峰)是 PMPEGMA 中端甲氧基质子的位移. 通过计算 c 峰和 2 号峰的积分比,可计算得到 PMPEGMA 的聚合度,结果如表 2 所示. PMPEGMA 的聚合度可以通过改变 PMPEGMA/Br-SCC 投料比来进行调节. 同时发现,壳聚糖上 PMPEGMA 接枝反应的转化率均达到 80% 以上,有较好的可控性. CS-O-PMPEGMA 的红外谱图在  $810 \text{ cm}^{-1}$  处还有一个小峰,说明 SDS 在最终产物仍有少量残留. 主要原因可能是,产物沉淀于 Tris 溶液中后,SDS 从壳聚糖主链上解复合,在超滤过程中少量 SDS 吸附于超滤膜表面,很难完全洗脱. 在我们以前的研究中,以 SCC 为起始物,合成了一类结构规整的接枝共聚物,壳聚糖-*O*-聚己内酯 (CS-O-PCL),SDS 通过将 SCC-O-PCL 的 DMSO 溶液沉淀于 Tris 水介质中脱除,结果发现 SDS 可完全从最终产物中除去<sup>[19]</sup>. 本文中由于最终产物无法在 Tris 水介质中沉淀,仅能通过超滤将 CS-O-PMPEGMA 与游离 SDS 分离,而该过程很难完全有效地除去 SDS. 预计采用反复超离心等手段有望完全纯化最终产物,而该实验目前还受到技术条件限制,在本文中未能进行.

**Table 2** The effect of PMPEGMA/Br-SCC feed ratio on degree of polymerization (DP) and grafting level (GL) of PMPEGMA

| Samples        | Feed ratio (mol%) | DP  | GL (mol%) |
|----------------|-------------------|-----|-----------|
| CS-O-PMPEGMA-1 | 0.3:1             | 2.3 | 24.5      |
| CS-O-PMPEGMA-2 | 1.2:1             | 9.7 | 105.1     |
| CS-O-PMPEGMA-3 | 2.4:1             | 19  | 204.9     |

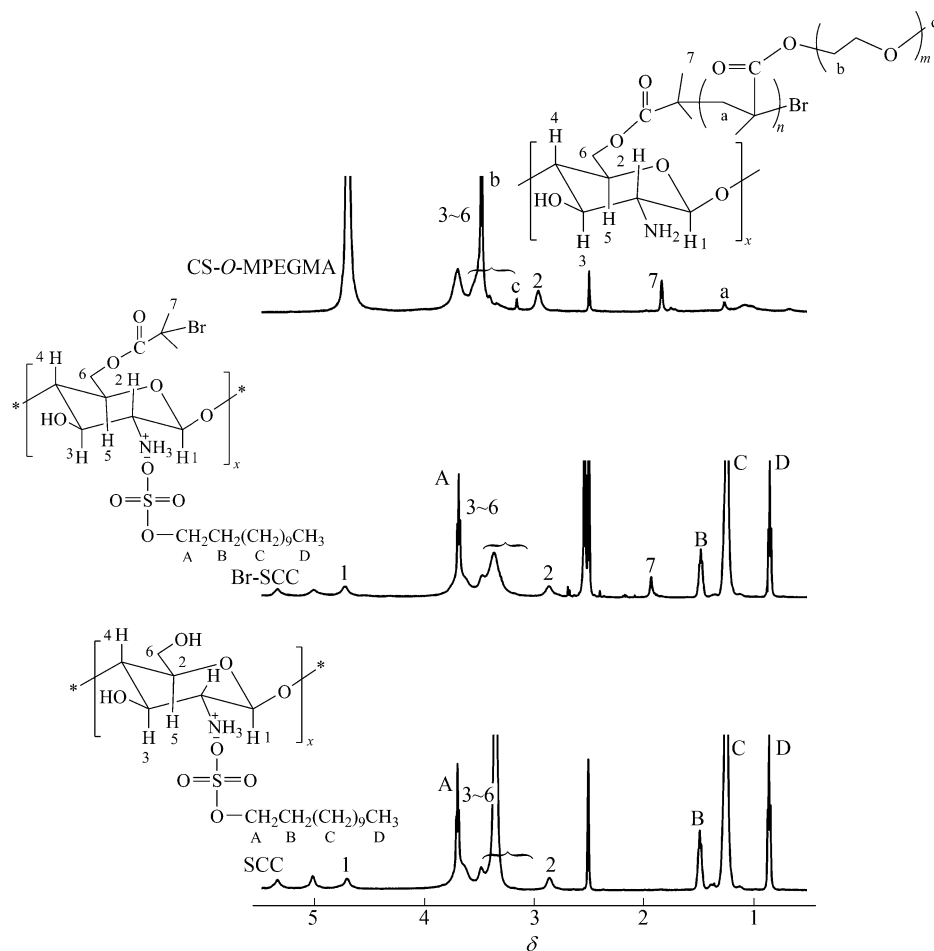


Fig. 2  $^1\text{H}$ -NMR spectra of SCC in  $\text{DMSO}-d_6$ , Br-SCC in  $\text{DMSO}-d_6$  and CS-O-PMPEGMA in 1% (V/V)  $\text{CD}_3\text{COOD}/\text{D}_2\text{O}$

## 2.2 CS-O-PMPEGMA/肝素钠的自组装

由于 CS-O-PMPEGMA 中壳聚糖在水介质中带正电荷,可以与阴离子类生物活性物质通过静电相互作用形成复合物,并自组装成核壳胶束. 本文以肝素钠为模型活性聚阴离子,初步研究了 CS-O-PMPEGMA 与其复合行为. 图 3 是 CS-O-PMPEGMA 与肝素钠混合体系的粒径和 zeta 电位随肝素钠溶液滴加的变化趋势图. 由图可见,随着肝素钠结构单元摩尔数与 CS-O-PMPEGMA 中 CS 结构单元摩尔数之比 ( $X$ ) 的增加,体系中胶体粒子的粒径逐渐增加, zeta 电位降低. 当  $X > 2$  时,粒径与 zeta 电位变化趋缓,并维持在一定的恒定数值,最终体系粒径为 44 nm, zeta 电位为  $-8.9 \text{ mV}$ . 随着肝素钠的加入, CS-O-PMPEGMA 中壳聚糖链段与肝素钠通过静电相互作用形成聚电解质复合物,并自组装为核壳胶束,胶束内核为水不溶性壳聚糖/肝素钠复合物,外壳为亲水性 PMPEGMA. 由于肝素钠和 CS-O-PMPEGMA 都是

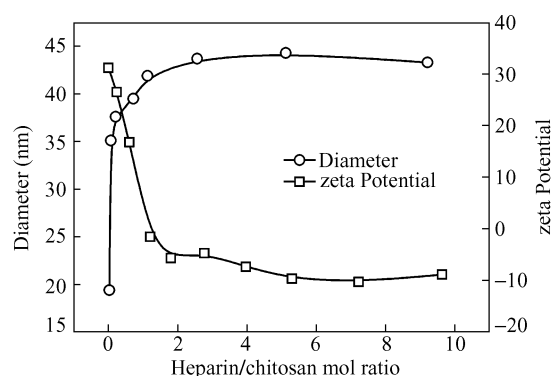


Fig. 3 Changes in the hydrodynamic diameter and zeta potential of the mixed CS-O-PMPEGMA/heparin solution with the addition of heparin solution

大分子,分子链长,容易相互缠绕,再加上空间位阻效应,肝素钠分子链上的负电荷不能完全与 CS-O-PMPEGMA 上正电荷作用,导致最终形成的胶束中肝素钠与壳聚糖比例不符合两者完全复合的化学计量比. 图 4 为  $X = 2.6$  时体系的 TEM 图,

可以看到,体系中确实存在球形纳米颗粒,且颗粒分散良好。

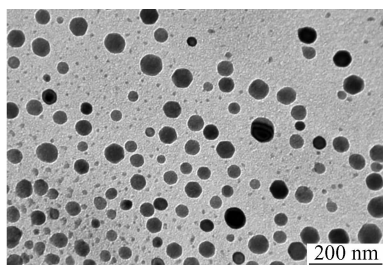


Fig. 4 TEM micrograph of CS-*O*-PMPEGMA/heparin nanoparticles prepared by titration of CS-*O*-PMPEGMA with heparin Heparin/CS molar ratio was 2.6

### 3 结论

以十二烷基硫酸钠-壳聚糖复合物为起始物,通过 ATRP 法可以很方便地在壳聚糖羟基上接枝 PMPEGMA,从而得到一类壳聚糖基接枝共聚物,CS-*O*-PMPEGMA. PMPEGMA 接枝度可以通过 Br-SCC 中溴代异丁酸取代度进行调节,改变 MPEGMA/Br-SCC 的投料比可以控制产物中 PMPEGMA 的聚合度. CS-*O*-PMPEGMA 与肝素钠可以在水介质中复合并自组装为球形纳米颗粒,当肝素钠结构单元摩尔数与壳聚糖结构单元摩尔数之比为 2 时,纳米颗粒尺寸与表面 zeta 电位趋于稳定。

### REFERENCES

- 1 Majeti N V, Kumar R. React Funct Polym, 2000, 46(1): 1 ~ 27
- 2 Liu W G, Yao K D. J Controlled Release, 2002, 83(1): 1 ~ 11
- 3 Chae S Y, Son S, Lee M, Jang M K, Nah J W. J Controlled Release, 2005, 109(1 ~ 3): 330 ~ 344
- 4 Kim D G, Jeong Y I, Nah J W. J Appl Polym Sci, 2007, 105(6): 3246 ~ 3254
- 5 Hirano S, Yamaguchi Y, Kamiya M. Carbohydr Polym, 2002, 48(2): 203 ~ 207
- 6 Jiang H L, Kim Y K, Arote R, Nah J W, Cho M H, Choi Y J, Akaike T, Cho C S. J Controlled Release, 2007, 117(2): 273 ~ 280
- 7 Huacai G, Wan P, Dengke L. Carbohydr Polym, 2006, 66(3): 372 ~ 378
- 8 Singh V, Tiwari A, Tripathi D N, Sanghi R. Polymer, 2006, 47(1): 254 ~ 260
- 9 Don T M, Chen H R. Carbohydr Polym, 2005, 61(3): 334 ~ 347
- 10 Li N, Bai R, Liu C. Langmuir, 2005, 21(25): 11780 ~ 11787
- 11 Liu P, Su Z X. Mater Lett, 2006, 60(9-10): 1137 ~ 1139
- 12 El Tahlawy K, Hudson S M. J Appl Polym Sci, 2003, 89(4): 901 ~ 912
- 13 Ouchi T, Nishizawa H, Ohya Y. Polymer, 1998, 39(21): 5171 ~ 5175
- 14 Mao S, Shuai X, Unger F, Wittmar M, Xie X, Kissel T. Biomaterials, 2005, 26(32): 6343 ~ 6356
- 15 Kolhe P, Kannan R M. Biomacromolecules, 2003, 4(1): 173 ~ 180
- 16 Munro N H, Hanton L R, Moratti S C, Robinson B H. Carbohydr Polym, 2009, 77(3): 496 ~ 505
- 17 Thongngam M, McClements D J. Langmuir, 2005, 21(1): 79 ~ 86
- 18 Cai G Q, Jiang H L, Tu K H, Wang L Q, Zhu K J. Macromol Biosci, 2009, 9(3): 256 ~ 261
- 19 Cai G Q, Jiang H L, Chen Z J, Tu K H, Wang L Q, Zhu K J. Eur Polym J, 2009, 45(6): 1674 ~ 1680

ATRP SYNTHESIS AND SELF-ASSEMBLY BEHAVIOR OF CHITOSAN-*O*-PMPEGMA

HE Yuan, YU Lin, TAN Songwei, JIANG Hongliang, TU Kehua, WANG Liquan

*(Department of Polymer Science and Engineering, Key Laboratory of Macromolecule**Synthesis and Functionalization, Zhejiang University, Hangzhou 310027)*

**Abstract** The bromized sodium dodecyl sulfate (SDS)-chitosan (CS) complex (Br-SCC) was synthesized by conjugating 2-bromo-2-methyl propionic acid to the hydroxyl groups of SCC which was used as an organo-soluble precursor in this study. Br-SCC was used as a macromolecular ATRP initiator to polymerize methyl ether poly(ethylene glycol) methacrylate (PMPEGMA) using copper (I) bromide/bipyridine as a catalyst, yielding SCC-*O*-PMPEGMA. SDS was removed from the product by precipitating SCC-*O*-PMPEGMA solution into aqueous tris(hydroxymethyl)amine (Tris) medium. The chemical structure of the intermediate and CS-*O*-PMPEGMA was studied by FTIR and <sup>1</sup>H-NMR. The substitution degree of bromobutyric acid could be modulated by bromobutyric acid/SCC feed ratio. The degree of polymerization of PMPEGMA could be controlled by varying the PMPEGMA/Br-SCC ratio. Complexation behaviors between CS-*O*-PMPEGMA and heparin were studied by dynamic light scattering, zeta potential analyzer and TEM. With the increase of heparin/CS molar ratio ( $X$ ), there was an increase in the nanoparticle size and decrease in the zeta potential of the particles. When  $X$  was above 2, the size and the zeta potential reached a plateau stage. The ultimate size of the spherical nanoparticles was about 44 nm and the zeta potential was  $-8.9$  mV. CS-*O*-PMPEGMA which could be conveniently synthesized according to the scheme proposed in this study has well-defined chemical structure. The grafting of PMPEGMA has no effect on the cationic density of the final product. In addition, the copolymers could form spherical micelles with anionic agents. The above characteristics of CS-*O*-PMPEGMA make it promising for tumor targeting and gene delivery.

**Keywords** Chitosan, Complex, PEG, ATRP, Self-assembly