

阴离子型含氟两亲接枝共聚物的合成及其胶束化行为研究*

刘国强¹ 熊圣东¹ 张凌飞¹ 易昌凤^{1,2} 徐祖顺^{1,2**}

(¹ 湖北大学材料科学与工程学院 武汉 430062)

(² 湖北大学功能材料绿色制备与应用教育部重点实验室 武汉 430062)

摘 要 以聚乙二醇甲醚甲基丙烯酸酯(MPEGMA)为大分子单体,甲基丙烯酸六氟丁酯(HFMA)、对苯乙磺酸钠(NaSS)为共聚单体,采用大分子单体接枝共聚法,制备了一种阴离子型含氟两亲接枝共聚物P(HFMA-co-NaSS)-g-PEG. 利用 FTIR、¹H-NMR 和¹⁹F-NMR 对共聚物的分子结构进行了表征. 表面张力法测定了 P(HFMA-co-NaSS)-g-PEG 的临界胶束浓度(CMC),发现随着 PEG 支链和阴离子含量的增加,CMC 逐渐变大;采用动态光散射法(DLS)研究发现,随着胶束溶液浓度和 PEG 支链的增加,胶束粒径逐渐增大;荧光光谱法研究了 P(HFMA-co-NaSS)-g-PEG 自组装胶束与牛血清蛋白(BSA)的相互作用,结果表明阴离子型含氟两亲接枝共聚物可以使 BSA 的荧光强度减弱,且随着共聚物浓度、含氟链段以及阴离子含量的提高,荧光强度逐渐降低;通过透射电子显微镜(TEM)研究了 P(HFMA-co-NaSS)-g-PEG 胶束以及 P(HFMA-co-NaSS)-g-PEG/BSA 聚集体的形貌,结果表明 P(HFMA-co-NaSS)-g-PEG 在水溶液中可自组装成核壳结构明显的胶束粒子,随着含氟链段的减少,共聚物胶束由树叶状转变成规则的球状结构,同时,发现 P(HFMA-co-NaSS)-g-PEG 胶束对 BSA 分子有明显的吸附作用.

关键词 阴离子, 两亲接枝共聚物, 胶束化行为, 含氟聚合物, 荧光光谱, 牛血清蛋白

两亲接枝共聚物同时含有亲水和憎水链段,其结构规整且组成可控,具有微观相分离形态结构和表面浓缩功能等特性,这些特性使其在生物材料、药物载体、分离膜、高分子表面活性剂、催化及纳米技术等领域得到了广泛的应用^[1-3]. 聚乙二醇(PEG)是一种无毒和非免疫原性的水溶性聚合物,具有良好生物相容性,常被用作两亲性共聚物的亲水链^[4-7]. 含氟聚合物具有良好的疏水疏油性能、极低的表面能、优良的耐溶剂性和耐化学稳定性等特性,将其作为两亲接枝共聚物的疏水链,将会使两亲接枝共聚物表现出一般两亲聚合物所没有的特性^[8-10]. 以 PEG 为亲水链段,含氟聚合物为疏水链段的两亲共聚物已有较多报道,但大多属于非离子型的共聚物,而对阴离子型含氟两亲接枝共聚物的研究则少有报道. 随着两亲接枝共聚物在基因传输、药物控释载体等方面的应用越来越广泛^[11,12],其胶束化行为的研究受到人们广泛的关注^[13-15]. 血清白蛋白作为最丰富的载体蛋白之一,它在结合和运输血液中内源性和

外源性物质方面起着重要的作用,体内许多具有生物活性化合物的分布和代谢都与血清白蛋白有密切关系^[16,17]. 牛血清白蛋白(BSA),由于它在医学上的重要性,成本低,容易获得,且易与阴离子、阳离子等多种配体结合^[18],在本实验中,我们选择其作为蛋白质模型. 本实验组已经制备了一系列非离子型含氟两亲接枝共聚物,且研究了其与蛋白质的相互作用^[19,20],但关于阴离子型含氟两亲接枝共聚物与 BSA 的相互作用的研究一直鲜有报道. 与非离子型的含氟两亲接枝共聚物相比,阴离子型含氟两亲接枝共聚物具有更加优良的水溶性,且含有带负电荷的表面活性离子,负电荷间的静电排斥能力使其形成的胶束具有更加良好的分散性,减少了胶束团聚现象的发生,使胶束更加稳定得存在于水溶液中. 同时,负电荷的存在使阴离子型含氟两亲接枝共聚物对带电荷的生物大分子有静电吸附作用,这使其在蛋白质分离及传输等领域有潜在的应用价值. 在本实验中,我们制备了一种以对苯乙磺酸钠为阴离子基团,

* 2010-12-30 收稿,2011-02-25 修稿;“十一五”国家科技重点支持计划(项目号 2008BAC32B03)和湖北省科技厅创新群体基金(基金号 2010CDA077)资助项目; ** 通讯联系人, E-mail: zushunxu@hubu.edu.cn

doi: 10. 3724/SP. J. 1105. 2011. 10382

PEG 为亲水链段,甲基丙烯酸六氟丁酯为疏水链段的新型阴离子含氟两亲接枝共聚物,通过临界胶束浓度、动态光散射、荧光光谱技术和透射电子显微镜的分析,研究了该接枝共聚物的胶束化行为,结果表明 P(HFMA-co-NaSS)-*g*-PEG 在水溶液中可自组装成核壳结构明显的胶束粒子,且随着含氟链段的减少,共聚物胶束由树叶状转变成更加规则的球状结构,同时,发现 P(HFMA-co-NaSS)-*g*-PEG 胶束对 BSA 分子有明显的吸附作用,这使其在作为蛋白质以及其它具有生物活性药物的传输载体方面有着潜在的应用价值.

1 实验部分

1.1 主要试剂

甲基丙烯酸六氟丁酯(HFMA),哈尔滨雪佳氟硅化学有限公司,于冰箱中存放备用;聚乙二醇甲醚甲基丙烯酸酯(MPEGMA),数均分子量为 1100, Sigma-Aldrich 公司,在室温下真空干燥 24 h 后使用;对苯乙烯磺酸钠(NaSS),纯度为 90%, Sigma-Aldrich 公司;牛血清蛋白(BSA),华美生物工程公司,配置为 0.68 g/L 的水溶液,于冰箱中保存备用;偶氮二异丁腈(AIBN),化学纯,无水乙醇重结晶处理;四氢呋喃(THF),分析纯,采用氯化钙脱水并减压蒸馏精制后备用;正己烷,分析纯,国药集团化学试剂有限公司,放入分子筛存放 24 h 后使用;甲醇,分析纯,国药集团化学试剂有限公司,放入分子筛存放 24 h 后使用.

1.2 阴离子型含氟两亲接枝共聚物 P(HFMA-co-NaSS)-*g*-PEG 的制备

在 50 mL 两口圆底烧瓶中先后加入 20 mL 甲醇,0.6 g MPEGMA,1.3 g HFMA,0.1 g NaSS,通入氮气,磁力搅拌 30 min,混合均匀后,加入 0.012 g AIBN,逐渐升温至 72℃,聚合反应 24 h,反应结束后,旋转蒸馏除去溶剂,然后用 THF 溶解产物,再用正己烷进行沉淀纯化,最后 35℃ 下真空干燥 72 h,得到白色固体聚合物.用重量法测定聚合物转化率,改变 MPEGMA, HFMA 和 NaSS 的比例,制备含氟链段和阴离子含量不同的阴离子型含氟两亲接枝共聚物.

1.3 仪器与表征

$^1\text{H-NMR}$ 和 $^{19}\text{F-NMR}$ 由美国 Varian 公司 UNITY INVOA-600 型核磁共振仪测定, TMS 为内标;共聚物的临界胶束浓度(CMC)由表面张力法测定,将所得纯共聚物加水溶解配成一系列浓度

的溶液,用德国 Krüss 公司 KrüssK12 型动态表面能分析仪在 25℃ 测定共聚物溶液的表面张力,从而得到临界胶束浓度;胶束的水合粒径和粒径分布采用英国 Malvern 公司 Autosize Loc-Fc-963 型激光光散射粒度仪进行测定,入射光波长 $\lambda = 679$ nm,入射角 90°,温度为 25℃;荧光光谱用日本岛津公司 RF-540 型荧光分光光度计测定,测定前取各浓度聚合物溶液 10 mL,再加入一定量的 BSA 溶液,旋涡混合,放置 5 min 后测定,温度为 25℃,荧光激发波长选择 280 nm,发射波长为 350 nm,狭缝宽度为 10 nm,同时作试剂空白;共聚物胶束的形貌由美国 FEI 公司 Tecnai G20 型透射电子显微镜观察得到,试样置于铜网上,真空干燥成膜后测定.

2 结果与讨论

2.1 共聚物的合成及表征

2.1.1 阴离子型含氟两亲接枝共聚物的红外光谱分析

大分子单体 MPEGMA 和共聚物 P(HFMA-co-NaSS)-*g*-PEG 的红外光谱图如图 1 所示,(a)为 MPEGMA 的红外光谱图,(b)为 P(HFMA-co-NaSS)-*g*-PEG 共聚物的红外光谱图.

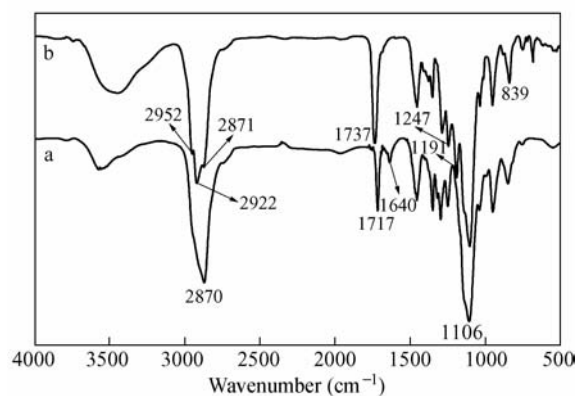


Fig. 1 FTIR spectra of (a) MPEGMA and (b) P(HFMA-co-NaSS)-*g*-PEG

对于(a)MPEGMA 的红外光谱图,1106 cm^{-1} 是醚键(C—O)的伸缩振动吸收峰;2870 cm^{-1} 处的强峰是甲基和亚甲基的伸缩振动吸收峰相互叠加的结果;1717 cm^{-1} 为酯羰基(C=O)的伸缩振动吸收峰,由于 C=C 和 C=O 共轭效应, C=O 吸收频率变低;1640 cm^{-1} 为碳碳双键(C=C)的伸缩振动吸收峰;3573 cm^{-1} 是原料中残存微量水的(O—H)特征吸收峰.

对于 (b) P(HFMA-NaSS)-*g*-PEG 共聚物的红外光谱图,与 (a) 相比,醚键(C—O)的伸缩振动吸收峰(1104 cm^{-1})仍然存在,碳碳双键($\text{C}=\text{C}$)的伸缩振动吸收峰(1640 cm^{-1})消失,这表明单体已聚合完全; 1737 cm^{-1} 为酯羰基($\text{C}=\text{O}$)的伸缩振动吸收峰,较 (A) 中吸收强度变大,频率变高,这是 MPEGMA 和 HFMA 中的酯羰基互相叠加的结果,也证明了 $\text{C}=\text{C}$ 聚合完全,共轭效应消失; 1455 cm^{-1} 为苯环骨架振动吸收峰, 839 cm^{-1} 为对二取代苯环中碳氢($=\text{C}-\text{H}$)吸收峰, 1247 cm^{-1} 为磺酸基中硫氧键($\text{S}=\text{O}$)的特征吸收峰,这表明 NaSS 参加了反应; 1191 cm^{-1} 为 HFMA 中碳氟键($\text{C}-\text{F}$)的特征吸收峰,初步表明 HFMA 也参加了接枝共聚反应; 2952 cm^{-1} 和 1378 cm^{-1} 分别为甲基中($\text{C}-\text{H}$)的不对称伸缩振动吸收峰和对称伸缩振动吸收峰; 2922 cm^{-1} 为聚合物主链和 PEG 支链中亚甲基中($\text{C}-\text{H}$)的不对称伸缩振动吸收峰; 3445 cm^{-1} 是样品中残存微量水的($\text{O}-\text{H}$)特征吸收峰。

2.1.2 阴离子型含氟两亲接枝共聚物的 ^1H -NMR 分析

大分子单体 MPEGMA 和 P(HFMA-*co*-NaSS)-*g*-PEG 的 ^1H -NMR 谱如图 2 所示,(A)为 MPEGMA 的 ^1H -NMR 谱图,溶剂为 D_2O ,(B)为 P(HFMA-*co*-NaSS)-*g*-PEG 共聚物的 ^1H -NMR 谱图,溶剂为 CDCl_3 。

对于 (A) MPEGMA 大分子单体,在 $\delta = 3.54$ (d) 出现强的宽峰是 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ 质子峰, $\delta = 3.35$ (e) 是末端的 $\text{CH}_3\text{O}-$ 质子峰, $\delta = 5.54$ (a) 和 6.10 (a) 为碳碳双键质子峰, $\delta = 4.27$ (c) 是和酯基相连的亚甲基质子峰, $\delta = 1.87$ (f) 和 $\delta = 1.11$ (f) 是跟碳碳双键相连的甲基质子峰, $\delta = 4.73$ (b) 为溶剂 (D_2O) 峰。对于 (B) P(HFMA-*co*-NaSS)-*g*-PEG 共聚物的 ^1H -NMR 谱图,与 (A) 相比,双键质子峰消失,出现了新的质子峰。 $\delta = 7.76$ (h) 和 7.05 (h) 是 NaSS 中苯环 $-\text{CH}-$ 质子峰, $\delta = 5.00$ (j) 是 HFMA 中的 $-\text{CHF}\text{CF}_3$ 质子峰, $\delta = 4.11$ (i) 是 $(-\text{OCH}_2-\text{CF}_2-)$ 中 CH_2 —质子峰, $\delta = 1.89$ (a) 是主链上 $-\text{CH}_2-$ 的质子峰, $\delta = 2.45$ (g) 是主链上和苯环相连的 $-\text{CH}-$ 质子峰, $\delta = 0.80 \sim 1.45$ (f) 是和主链相连的甲基质子峰, $\delta = 7.27$ (b) 是溶剂 (CDCl_3) 峰。

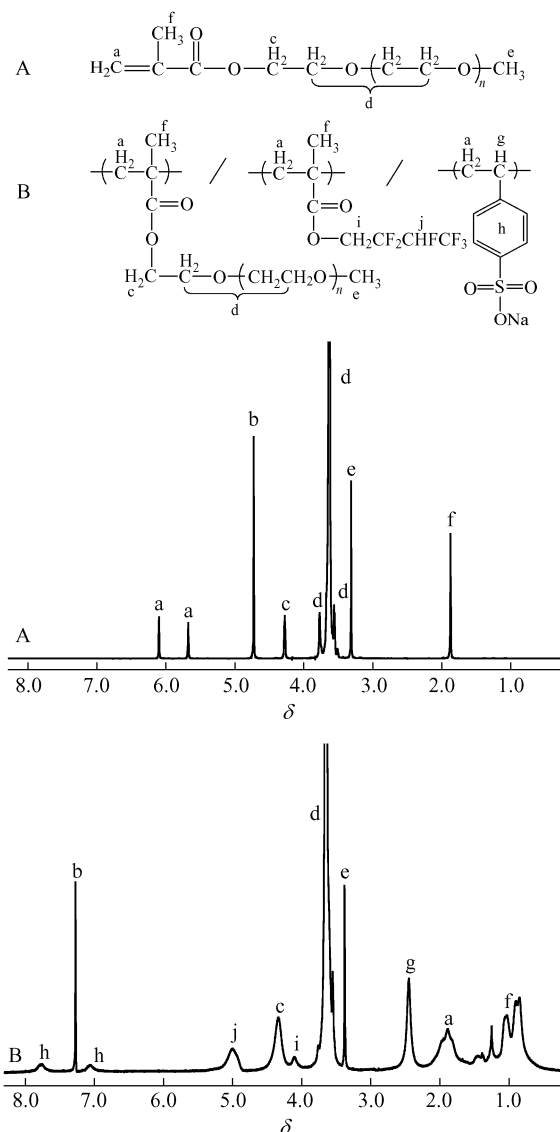


Fig. 2 ^1H -NMR spectra of (A) MPEGMA macromonomer and (B) P(HFMA-*co*-NaSS)-*g*-PEG

2.1.3 阴离子型含氟两亲接枝共聚物的 ^{19}F -NMR 分析

图 3 是 P(HFMA-*co*-NaSS)-*g*-PEG 的 ^{19}F -NMR 谱图,共聚物中的氟元素全部来自 HFMA,

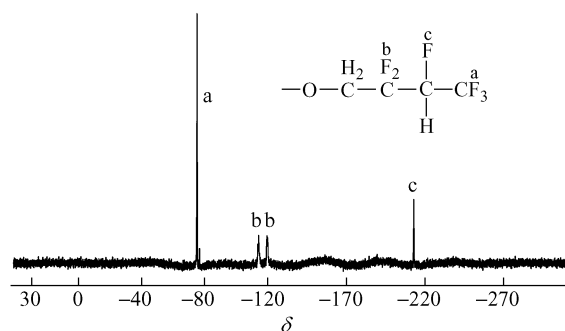


Fig. 3 ^{19}F -NMR spectrum of P(HFMA-*co*-NaSS)-*g*-PEG

从分子结构分析,共聚物中氟原子分别处于 3 种不同的化学环境, $\delta = -75.3$ (a) 是 $-\text{CF}_3$ 基团的峰,因受到范德华效应,故出现在低场区; $\delta = -114.4$ (b) 和 $\delta = -120.3$ (b) 是 $-\text{CF}_2-$ 基团的峰,由于受到相邻基团 $-\text{CH}_2-$ 的耦合作用,故分裂成双重峰; $\delta = -213.0$ (c) 是 $-\text{CHF}-$ 基团的峰,没有范德华效应的作用,故出现在高场区。

FTIR 和核磁共振的分析结果表明,大分子单体 MPEGMA、HFMA 和 NaSS 之间通过自由基接枝共聚合成了阴离子型含氟两亲接枝共聚物。共聚物中含氟链段和阴离子单体的含量由 HFMA 中 $(-\text{OCH}_2-\text{CF}_2-)$ ($\delta = 4.11$) 质子峰、

MPEGMA 中 $\text{CH}_3\text{O}-$ ($\delta = 3.35$) 质子峰和 NaSS 中苯环 $-\text{CH}-$ ($\delta = 7.76$ 和 7.05) 质子峰的积分值计算得到。本实验合成了 9 种阴离子型含氟两亲接枝共聚物,用 PEG-FXNaY , X 代表聚合物中含氟链段的质量百分含量, Y 表示聚合物中阴离子链段的质量百分含量,依次表示为 PEG-F65Na5、PEG-F55Na5、PEG-F45Na5、PEG-F35Na5、PEG-F25Na5、PEG-F45Na1、PEG-F45Na3、PEG-F45Na7、PEG-F45Na9,图 2 中 (B) 为 PEG-F65Na5 的 $^1\text{H-NMR}$ 谱图。不同投料比合成的 $\text{P}(\text{HFMA-co-NaSS})-g\text{-PEG}$ 的配方、转化率及特征参数列于表 1。

Table 1 Recipe, conversion and characteristic data of the graft copolymers

Sample code	HFMA (g)	MPEGMA (g)	NaSS (g)	Conversion (%)	HFMA (wt%) ($^1\text{H-NMR}$ results)	NaSS (wt%) ($^1\text{H-NMR}$ results)	CMC (g/L)	γ_{CMC} (mN/m)
PEG-F65Na5	1.302	0.603	0.103	94.6	64.3	4.81	0.16	42.52
PEG-F55Na5	1.103	0.802	0.105	95.7	56.8	4.93	0.18	43.97
PEG-F45Na5	0.902	1.006	0.100	94.3	43.2	5.22	0.21	45.15
PEG-F35Na5	0.698	1.214	0.101	96.2	36.7	4.87	0.23	47.59
PEG-F25Na5	0.511	1.427	0.108	95.8	24.2	5.31	0.25	51.60
PEG-F45Na1	0.909	1.085	0.021	96.6	43.7	0.98	0.19	43.65
PEG-F45Na3	0.903	1.047	0.065	94.8	45.2	3.13	0.20	44.72
PEG-F45Na7	0.908	0.970	0.144	95.6	44.3	6.58	0.23	45.83
PEG-F45Na9	0.902	0.936	0.181	95.9	43.6	10.21	0.24	46.17

2.2 共聚物的胶束化行为研究

2.2.1 胶束溶液的配制

采用透析法制备含氟两亲共聚物的胶束溶液,具体步骤如下:将制得的 PEG-FXNaY 溶于少量 THF 中,用孔径为 450 nm 的 Millipore 滤膜过滤,在匀速磁力搅拌下将一定量的 THF 溶液缓慢滴加于一定体积的超纯水中,然后转入透析袋中,用超纯水透析 3 天,即得自组装胶束溶液。

2.2.2 临界胶束浓度的测定

浓度较低时,两亲接枝共聚物以单分子链存在;浓度达到临界胶束浓度时,共聚物开始缔合,自组装成稳定的胶束体系,因此测定聚合物的 CMC 是研究两亲性接枝共聚物胶束化行为的重要方面,而表面张力法更是测定 CMC 的常用方法。将 PEG-F65Na5 和 PEG-F45Na5 分别配制成不同浓度的水溶液,在 25℃ 下测定其表面张力,图 4 为测得的 PEG-F65Na5 和 PEG-F45Na5 水溶液表面张力随浓度变化的曲线。

由图 4 可知,对于 PEG-F65Na5,当浓度小于 0.16 g/L 时,表面张力随浓度增加逐渐下降,当

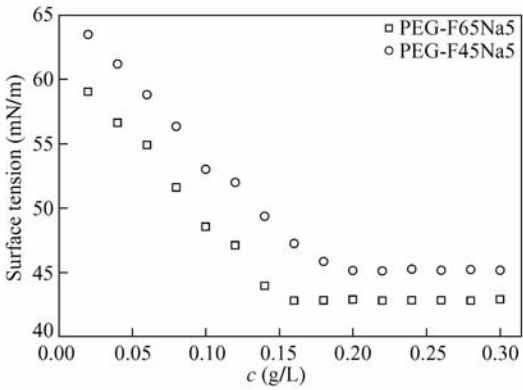


Fig. 4 Surface tension versus concentration plots of PEG-F65Na5 and PEG-F45Na5

All the measurements are carried out at 25℃.

浓度大于 0.16 g/L 时,表面张力基本不变,这表明 PEG-F65Na5 在水溶液中形成了胶束,其 CMC 为 0.16 g/L,此浓度下的表面张力 (γ_{CMC}) 为 42.52 mN/m。对于 PEG-F45Na5,当浓度小于 0.21 g/L 时,表面张力随浓度增加逐渐下降,当浓度大于 0.21 g/L 时,表面张力基本不变,这表明 PEG-

F45Na5 在水溶液中也形成了胶束,其 CMC 为 0.21 g/L, γ_{CMC} 为 45.15 mN/m. 测得的各个样品的临界胶束浓度及此浓度下的表面张力值列于表 1.

临界胶束浓度受很多因素的影响,如亲水链段 PEG 分子量、测试温度、共聚物链段比及分子量等,本实验研究了共聚物链段比对 CMC 及 γ_{CMC} 的影响. 从 9 种阴离子型含氟两亲接枝共聚物的 CMC 及 γ_{CMC} 可以看出一方面,合成的接枝共聚物大大降低了水的表面张力,可作为离子型含氟高分子表面活性剂使用;另一方面,随着含氟链段的减少,临界胶束浓度逐渐升高, γ_{CMC} 也逐渐变大. 一般认为,强疏水性的含氟链段可以增加两亲性共聚物的表面活性, HFMA 的含量减少, P(HFMA-co-NaSS)-g-PEG 的表面活性就会降低,而亲水性的 PEG 支链含量相对增加,提高了共聚物的水溶性,故 CMC 和 γ_{CMC} 均变大. 同时,当共聚物中含氟链段相同的情况下,随着阴离子单体含量的提高,CMC 逐渐变大, γ_{CMC} 逐渐升高,这是因为离子段含量增加,共聚物亲水能力增强,加之静电斥力作用使 CMC 增大.

2.2.3 P(HFMA-co-NaSS)-g-PEG 胶束的 DLS 分析

临界胶束浓度的测定,表明所合成的阴离子型含氟两亲接枝共聚物在选择性溶剂水中可自组装形成胶束体系,疏水性的含氟主链成为胶束的核,而亲水性的 PEG 支链和 NaSS 支链则形成胶束的壳. 为了研究 P(HFMA-co-NaSS)-g-PEG 胶束的粒径及其分布,将制备的 PEG-F65Na5 和 PEG-F45Na5 胶束溶液分别配制成不同浓度(0.3, 0.5, 1.0 g/L),采用动态光散射(DLS)的方法测定聚合物胶束的水合粒径及粒径分布,结果如图 5 和图 6 所示.

从图 5 和图 6 可知,PEG-F65Na5 和 PEG-F45Na5 在水溶液中都能形成纳米尺寸的胶束,且胶束的粒径分布较均一. 同时,随着 PEG-F65Na5 和 PEG-F45Na5 胶束溶液浓度的增大,其所得的胶束水合粒径都明显的增加. 这是由于聚合物胶束的形成过程是一个动力学平衡过程,胶束溶液的浓度会对胶束的基本性能产生影响,一般认为随着浓度的增大,胶束内部分子聚集数增多,从而胶束粒径变大. 另外,在相同浓度的条件下,与 PEG-F65Na5 相比,高 PEG 支链含量的 PEG-F45Na5 所形成的胶束粒径要比 PEG-F65Na5 所

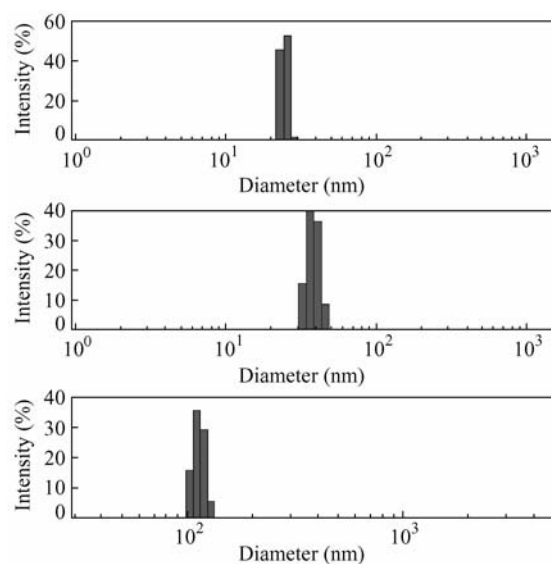


Fig. 5 Hydrodynamic diameters and distribution of PEG-F65Na5

Top-down: 0.3, 0.5, 1.0 g/L

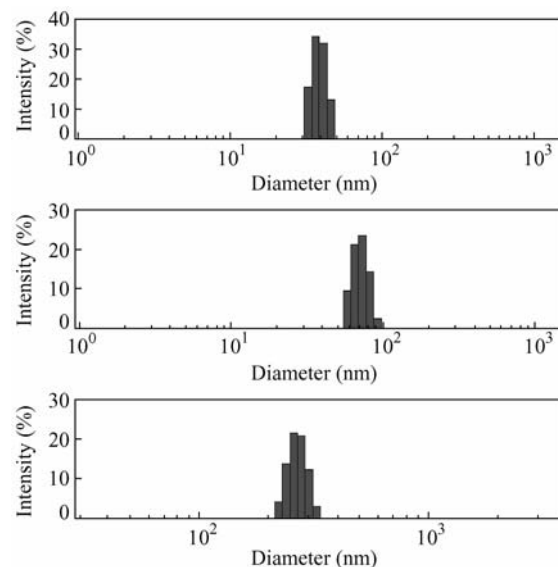


Fig. 6 Hydrodynamic diameters and distribution of PEG-F45Na5

Top-down: 0.3, 0.5, 1.0 g/L

形成的胶束粒径大,这是由于 PEG 支链是亲水性的,在水溶液中处于伸展状态,而疏水性的含氟链段在水溶液中处于收缩状态,这样 PEG 支链的增加必然造成胶束体积的增大.

2.2.4 共聚物胶束与 BSA 作用的荧光光谱分析

荧光光谱技术是研究微观非均相环境局部性质的一种先进技术,它在两亲性聚合物胶束化行为研究方面的应用越来越广泛,可利用探针分子周围环境的变化而引起荧光光谱改变这一现象来

研究胶束内部的微环境性质,如微极性、微黏度、微电荷作用、局部黏结力等^[21,22].

BSA 含有色氨酸残基,当受到紫外光激发时能产生自身荧光,纯 BSA 以 280 nm 激发时,在 350 nm 处有最大荧光特征发射峰.当 BSA 分子与其它物质发生作用使其微环境发生改变时,色氨酸残基由于受到外界环境的影响,会改变其荧光强度,若这种相互作用影响了 BSA 的分子结构,色氨酸残基所表现的最大发射峰的波长将会出现蓝移的现象^[23~25].在临界胶束浓度以上时, P(HFMA-co-NaSS)-*g*-PEG 会自组装形成胶束,由于 P(HFMA-co-NaSS)-*g*-PEG 与 BSA 之间的相互作用,BSA 分子所处的微环境就会发生变化,荧光强度也会随之变化,因此可以利用荧光光谱来研究 P(HFMA-co-NaSS)-*g*-PEG 与 BSA 的相互作用,进而研究共聚物 P(HFMA-NaSS)-*g*-PEG 的胶束化行为.

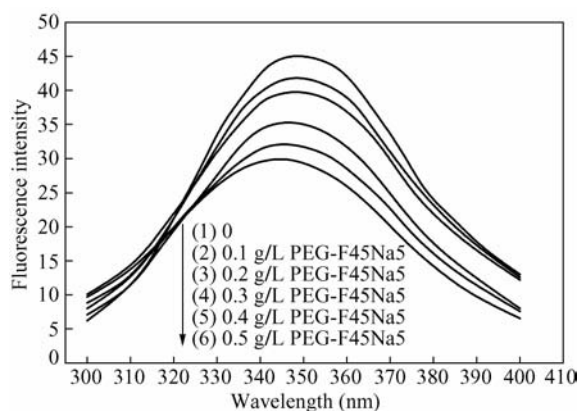


Fig. 7 Fluorescence spectra of BSA in different concentrations of PEG-F45Na5

BSA concentration was kept at 0.68 g/L; Volume ratio of PEG-F45Na5: BSA was 5:1.

图 7 是纯 BSA 在不同浓度的 PEG-F45Na5 水溶液中的荧光光谱图,从图中可以看出,当加入 PEG-F45Na5 之后,BSA 在 350 nm 处的荧光发射峰强度明显减弱,这表明 PEG-F45Na5 与 BSA 之间有很强的相互作用.随着 PEG-F45Na5 浓度的增加,BSA 的荧光强度逐渐减弱,且发射峰有轻微的蓝移,当 PEG-F45Na5 的浓度在临界胶束浓度(0.21 g/L)以下时,BSA 荧光强度减弱幅度较小,且蓝移不明显,而当 PEG-F45Na5 的浓度在临界胶束浓度以上时,荧光强度的减弱幅度明显增大,且蓝移变得明显.在临界胶束浓度以下时,共聚物主要以单分子链的形式存在于溶液中,其分子中

的阴离子与 BSA 的正电基团之间的静电作用是造成 BSA 荧光强度减弱的主要原因^[26].而在临界胶束浓度以上时,PEG-F45Na5 在水溶液中自组装形成胶束,疏水性的含氟链段聚集在胶束内部,形成一个强疏水性的内核,由于胶束与 BSA 分子之间的强疏水力作用,BSA 分子会从水相迁移至胶束相^[20].这时,处于胶束内部的 BSA 分子除了静电作用力之外,还有强的疏水力使其与 PEG-F45Na5 分子发生相互作用.且随着聚合物浓度的增加,聚合物胶束的粒径和数量都会增加,从而导致更多的 BSA 分子进入到胶束的内部发生更强烈的相互作用,这样就增加了碰撞的能量损失和其他非辐射去活化过程以及各种猝灭效应的产生,降低了 BSA 分子荧光的量子产率,使荧光逐渐减弱,另外其相互作用的增强也导致了发射峰的蓝移.

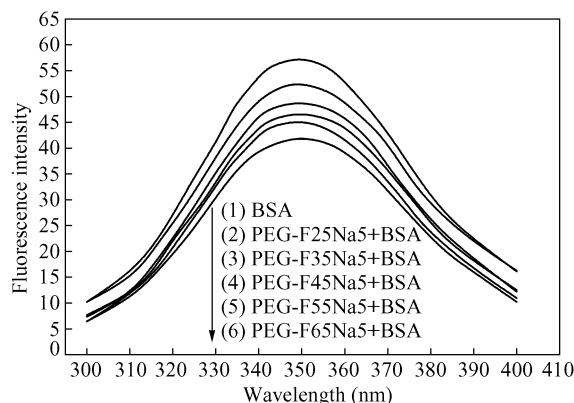


Fig. 8 Fluorescence spectra of BSA in different types of PEG-FXNa5 solutions

BSA concentration was kept at 0.68 g/L; All the PEG-FXNa5 concentration was kept at 0.30 g/L; Volume ratio of PEG-FXNa5: BSA was 5:1.

图 8 是纯 BSA 和 BSA/PEG-FXNa5 混合溶液的荧光光谱图,混合溶液中 PEG-FXNa5 的浓度均在 CMC 以上.从图中可以看出,当加入 PEG-FXNa5 后,BSA 在 350 nm 处的荧光强度减弱,且伴随发射峰有轻微的蓝移,同时,随着 PEG-FXNa5 中含氟链段的增加,BSA 的荧光强度逐渐减弱,但蓝移程度没有明显改变,可以推断含氟链段的存在是影响 PEG-FXNa5 与 BSA 相互作用的主要因素之一,并且这种相互作用没有对 BSA 的分子结构造成影响.牛血清蛋白分子中存在色氨酸、酪氨酸、苯基丙氨酸残基等疏水性基团,PEG-FXNa5 中亲水性的 PEG 链段与蛋白质之间也没有强的相互吸附作用^[27,28],而疏水性的含氟链段

使 PEG-FXNa5 水溶液中具有很强的疏水力,在浓度和带电荷数均相同的情况下,疏水力是导致 PEG-FXNa5 与 BSA 相互作用的主要原因^[29-31]. 随着 PEG-FXNa5 中含氟链段含量的提高,由于疏水力的作用,导致聚合物与 BSA 之间的相互作用逐渐增强,增加了碰撞的能量损失和其他非辐射去活化过程以及各种猝灭效应的产生,降低了 BSA 分子荧光的量子产率,使荧光强度逐渐减弱.

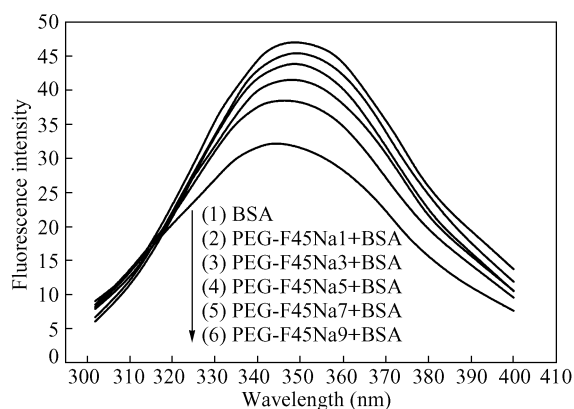


Fig. 9 Fluorescence spectra of BSA in different types of PEG-F45NaY solutions

BSA concentration was kept at 0.68 g/L; All the PEG-F45NaY concentration was kept at 0.30 g/L; Volume ratio of PEG-F45NaY: BSA was 5:1.

图 9 是纯 BSA 和 BSA/PEG-F45NaY 混合溶液的荧光光谱图,混合溶液中 PEG-F45NaY 的浓度均在 CMC 以上.从图中可以看出,当加入 PEG-FXNa5 后,BSA 在 350 nm 处的荧光强度减弱,且伴随发射峰的蓝移,同时,随着 PEG-F45NaY 中阴离子含量的增加,BSA 的荧光强度逐渐减弱,蓝移也更加明显.可以发现,聚合物中的阴离子与 BSA 分子中的静电作用不仅是导致 BSA 荧光强度减弱的重要因素,也是造成 BSA 荧光发射峰蓝移的主要原因.相关文献报道也发现,共聚物中的阴离子基团与 BSA 分子中正电基团之间的静电吸引作用会导致 BSA 荧光发射峰蓝移^[32],这是由于它们之间的静电作用会对 BSA 分子中正负电荷的分布产生一定的影响,导致 BSA 分子的空间结构发生微小的变化.随着阴离子含量的增加,静电作用增强,PEG-F45NaY 与 BSA 之间的相互作用逐渐增大,发射峰的蓝移也变得明显.

总之,在临界胶束浓度以上时,P(HFMA-co-NaSS)-g-PEG/BSA 混合体系中不仅存在静电作用,而且还有疏水力的强相互作用,它们都是造成 BSA 分子荧光减弱的重要因素,其中静电作用更

是引起发射峰蓝移的主要原因,但蓝移程度微小,对 BSA 的分子结构影响较小.

2.2.5 P(HFMA-co-NaSS)-g-PEG 胶束以及 PEG-F45Na5/BSA 聚集体的 TEM 分析

两亲共聚物超分子聚集状态的研究正受到广泛的关注,普遍认为自组装胶束是核壳结构分明的球状粒子.但是随着测试技术的发展,人们发现聚合物胶束存在许多形态,如球形、棒状、树叶状、蠕虫状、囊泡状等^[33,34],它们的几何形态是由胶束核链段伸展程度、胶束核与溶剂的界面效应以及亲水链段间相互作用等共同决定的.另外,胶束溶液的浓度、共聚物链段的组成、制备胶束的方法及使用的溶剂都是影响胶束形态的关键因素^[35,36].测得的 PEG-F65Na5, PEG-F45Na5 以及 PEG-F45Na5/BSA 聚集体的 TEM 图如 10 所示.

从图 10 中可以看出,该阴离子型含氟两亲接枝共聚物在水溶液中具有明显的自组装效应.不同含氟链段的分子结构得到了不同的聚集体形貌.对于 PEG-F65Na5 体系,在 1.0 g/L 的浓度下,所得到的聚集体为树叶状的形态,直径在 100 nm 左右,且分散较为均一.从放大图 10(b)中可以看出这种形貌具有明显的核壳结构,这是由于含氟链段特殊的疏水性质,使其在 PEG-F65Na5 自组装的过程中会自动迁移到胶束的内部,形成一个疏水性很强的内核.这种强疏水力是 PEG-F65Na5 在水溶液中能自组装成为胶束结构的主要驱动力,也是胶束能稳定存在于水溶液中的保障,而亲水性的 PEG 链段处于胶束的表层,分散在水中,它对胶束的形成起到阻力的作用,另外 NaSS 链段所带的负电荷间的相互排斥作用力也是胶束形成的阻力,但是在强疏水性链段 HFMA 含量较高的 PEG-F65Na5 分子结构中这些亲水力和电荷间的排斥力显得相对较弱,动力学上的不平衡致使胶束发生变形,所以得到的聚集体是一种严实的具有核壳结构的树叶状胶束.

当分子结构中 HFMA 含量降低到 45% 的时候,PEG-F45Na5 在 1.0 g/L 的浓度下所得到的聚集体形貌如图 10(c,d)所示.与 PEG-F65Na5 体系相比,其形貌和尺寸都发生了明显的变化,形成了另一种聚集体结构——球状结构.由前面的分析可以知道,HFMA 的强疏水力是导致 PEG-F45Na5 在水溶液中能自组装成为胶束结构的主要驱动力,而 PEG 链段的亲水力和 NaSS 链段电荷间的排斥力是胶束形成的阻力.在 PEG-

F45Na5 体系中由于疏水性的 HFMA 链段减少,体系疏水力下降,而亲水力和电荷排斥作用力相对增强,致使胶束聚集体所受到的作用力达到相对平衡的状态,所以形成了如图 10(c,d)所示的更为规则的球状核壳结构.同时,在相同浓度的条件下,PEG-F45Na5 所形成的胶束粒径要比 PEG-

F65Na5 所形成的胶束粒径大,这是由于 PEG 支链是亲水性的,在水溶液中处于伸展状态,而疏水性的含氟链段在水溶液中处于收缩状态,随着溶剂水的蒸发,PEG 支链的增加必然造成胶束体积的增大,这与前面胶束水合粒径测试结果基本吻合.

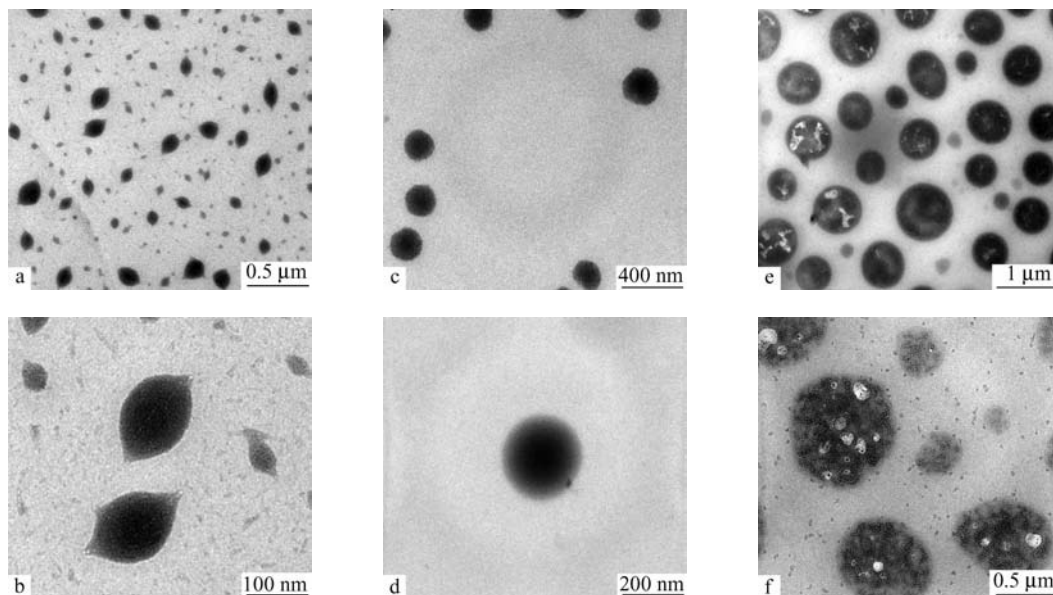


Fig. 10 TEM morphology of PEG-F65Na5 micelles in aqueous solution (1.0 g/L) (a,b); TEM morphology of PEG-F45Na5 micelles in aqueous solution (1.0 g/L) (c,d); TEM morphology of PEG-F45Na5/BSA complexes in aqueous solution (e,f)
PEG-F45Na5 concentration was kept at 1.0 g/L; BSA concentration was kept at 0.68 g/L; Volume ratio of PEG-F45Na5: BSA was 5:1.

图 10(e,f) 是 PEG-F45Na5/BSA 混合溶液所得聚集体的形貌.当 BSA 加入到 PEG-F45Na5 水溶液中后,所得聚集体仍是比较规则的球形胶束,但是粒径明显变大,胶束分散性变差,每个球形胶束由图 10(c,d)中的实心结构变成一种松散囊泡状的结构.从之前荧光光谱的分析可知,PEG-F45Na5 与 BSA 之间存在静电作用和疏水力的作用,这些强相互作用导致 BSA 分子从水相迁移至胶束相,使 BSA 与核相的聚合物分子链结合,发生分子间的缠绕作用,随着溶剂水的挥发,BSA 分子与聚合物分子链缠绕得更加紧密,致使胶束内部出现空隙,所得到的聚集体也不再出现如图 10(c,d)那样具有紧密实心内核的结构,而是呈现出一种松散的囊泡状结构. TEM 的研究表明,内部富集含氟链段和带电基团的 PEG-F45Na5 胶束对 BSA 分子有明显的吸附作用,其在作为蛋白质和其它具有生物活性药物的传输载体方面有潜在的应用价值.

在此基础上我们可以得到阴离子型含氟两亲接枝共聚物在水溶液自组装的机理如图 11 所示,

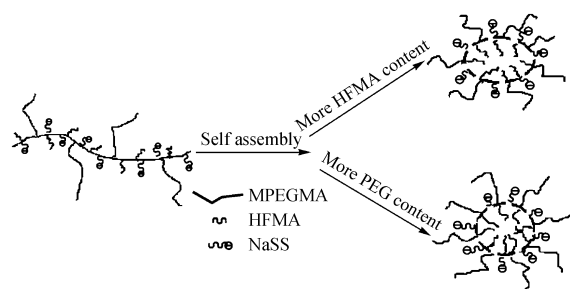


Fig. 11 Schematic drawing of self-assembled of the P(HFMA-co-NaSS)-g-PEG micelle

在高疏水性 HFMA 链段含量的情况下,聚集体成为严实的具有核壳结构的树叶状聚集体;当疏水性 HFMA 链段含量较低的时候,则成为规则的球形核壳结构.这些特性为 P(HFMA-NaSS)-g-PEG 作为药物传输载体提供了可能,其含氟链段形成的疏水性内核可作为微型药物仓库,药物可通过化学键合或物理包埋添加于其中,亲水链形成的外壳则起到稳定胶束的作用^[37~40].

3 结论

通过大分子单体技术合成了阴离子型含氟两亲接枝共聚物 P(HFMA-co-NaSS)-*g*-PEG, 用表面张力法测定了 P(HFMA-co-NaSS)-*g*-PEG 的临界胶束浓度, 发现随着 PEG 支链以及阴离子含量的提高, CMC 逐渐变大, 且此浓度下的表面张力逐渐升高. 用动态光散射的方法测定了 P(HFMA-co-NaSS)-*g*-PEG 胶束的水合粒径及其分布, 发现随着胶束溶液浓度和 PEG 含量的增加, 胶束水合粒径逐渐变大. 利用荧光光谱技术研究了阴离子

型含氟两亲接枝共聚物与 BSA 的相互作用, 发现 P(HFMA-co-NaSS)-*g*-PEG 能与 BSA 发生相互作用使其荧光强度减弱, 且随着共聚物浓度、含氟链段含量和阴离子含量的增加, 荧光强度逐渐减弱. 用透射电子显微镜观察了胶束的自组装形貌, 发现核壳结构的 P(HFMA-co-NaSS)-*g*-PEG 胶束对 BSA 有明显的吸附作用. 实验结果表明, 所合成的阴离子型含氟两亲接枝共聚物在氟碳高分子表面活性剂、蛋白质传输载体以及自组装药物控释系统方面有潜在的应用价值.

REFERENCES

- Wang Y, Gao S J, Ye W H, Yoon H S, Yang Y Y. *Nat Mater*, 2006, 5: 791 ~ 796
- Zhang M F, Drechsler M, Muller A H E. *Chem Mater*, 2004, 16: 537 ~ 543
- Wang D Q, Tan J J, Kang H L, Ma L, Jin X, Liu R G, Huang Y. *Carbohydr Polym*, 2011, 84: 195 ~ 202
- Dong H B, Xu Y Y, Yi Z. *Chinese J Polym Sci*, 2009, 27(6): 813 ~ 820
- Lee H, Jeong J H, Park T G. *J Controlled Release*, 2001, 76: 183 ~ 192
- Shi L, Tang G P, Gao S J, Ma Y X, Liu B H, Li Y, Zeng J M, Ng Y K, Leong K W, Wang S. *Gene Ther*, 2003, 10: 1179 ~ 1188
- Fabienne D, Nicolas M, Bernard U, Nathalie L, Marcus B, Veronique P. *Eur J Pharm Biopharm*, 2009, 73: 230 ~ 238
- Hussain H, Busse K, Kressler J. *Macromol Chem Phys*, 2003, 204: 936 ~ 946
- Ojogun V A, Lehmler H J, Knutson B L. *J Colloid Interface Sci*, 2009, 338: 82 ~ 91
- He J L, Ni P H, Liu C C. *J Polym Sci Part A: Polym Chem*, 2008, 46: 3029 ~ 3041
- Kavanagh C A, Rochev Y A, Gallagher W M, Dawson K A, Keenan A K. *Pharmacol Therapeut*, 2004, 102: 1 ~ 15
- Lucke A, Fustella E, Tebmar J, Gazzaniga A, Gopferich A. *J Controlled Release*, 2002, 80: 157 ~ 168
- Najafi F, Sarbolouki M N. *Biomaterials*, 2003, 24: 1175 ~ 1182
- Harada A, Kataoka K. *Science*, 1999, 283: 65 ~ 67
- He Yuan(何媛), Yu Lin(於麟), Tan Songwei(谭松巍), Jiang Hongliang(蒋宏亮), Tu Kehua(涂克华), Wang Liquan(王立群). *Acta Polymerica Sinica(高分子学报)*, 2010, (7): 897 ~ 902
- Wang J, Zhang Y Y, Guo Y, Zhang L, Xu R, Xing Z Q, Wang S X, Zhang X D. *Dyes Pigments*, 2009, 80: 271 ~ 278
- Zsila F, Bikadi Z, Simonyi M. *Biochem Pharmacol*, 2003, 65: 447 ~ 456
- Dockal M, Carter D C, Ruker F. *J Biol Chem*, 2000, 275: 3042 ~ 3050
- Xiong Shengdong(熊圣东), Li Ling(李玲), Wu Shuilin(吴水林), Yi Changfeng(易昌凤), Xu Zushun(徐祖顺). *Acta Polymerica Sinica(高分子学报)*, 2010, (2): 149 ~ 155
- Xiong S D, Li L, Wu S L, Xu Z S, Chu P K. *J Polym Sci Part A: Polym Chem*, 2009, 47: 4895 ~ 4907
- Zhao Li(赵莉), Yan Yun(阎云), Huang Jianbin(黄建滨). *Acta Phys Chim Sin(物理化学学报)*, 2010, (26): 840 ~ 849
- Ding Min(丁敏), Guo Lihua(郭丽华), Zhang Ling(张玲), Wu Qing(伍青). *Progress in Chemistry(化学进展)*, 2010, (22): 458 ~ 464
- Yan C N, Zhang H X, Mei P, Liu Y. *Chin J Chem*, 2005, 23: 1151 ~ 1156
- Kasai S, Horie T, Mizuma T, Awazu S. *J Pharm Sci*, 1987, 76: 387 ~ 392
- Walton A G, Maenpa F C. *J Colloid Interface Sci*, 1979, 72: 265 ~ 278
- Li L, Wang Y X, Song G W, Wu S L, Chu P K, Xu Z S. *J Fluorine Chem*, 2009, 130: 870 ~ 877
- Cole M A, Thissen H, Losic D, Voelcker N H. *Surf Sci*, 2007, 601: 1716 ~ 1725
- Sun F Q, Li X S, Xu J K, Cao P T. *Chinese J Polym Sci*, 2010, 28(5): 705 ~ 713
- Lee J H, Khang G, Lee J W, Lee H B. *J Colloid Interface Sci*, 1998, 205: 323 ~ 330
- Zhu A P, Yuan L H, Chen T, Wu H, Zhao F. *Carbohydr Polym*, 2007, 69: 363 ~ 370
- Park J H, Bae Y H. *Biomaterials*, 2002, 23: 1797 ~ 1808
- Li L, Xu Z S, Song G W. *J Fluorine Chem*, 2009, 130: 225 ~ 230
- Zhang J H, Sun Z Q, Yang B. *Curr Opin in Colloid Interface Sci*, 2009, 14: 103 ~ 114
- Chen T, Wang L, Jiang G H, Wang J J, Wang X J, Zhou J F, Wang W. *Eur Polym J*, 2006, 42: 687 ~ 693

- 35 Kim J K, Yang S Y, Lee Y, Kim Y. *Prog Polym Sci*, 2010, 35: 1325 ~ 1349
- 36 Zhang K, Yu A, Wang D W, Yang W M, Li J N, Zhang X R, Wang Y J. *Mater Lett*, 2011, 65: 293 ~ 295
- 37 Choi C Y, Chae S Y, Nah J W. *Polymer*, 2006, 47: 4571 ~ 4580
- 38 Li Y Y, Zhang X Z, Kim G C, Cheng H, Cheng S X, Zhuo R X. *Small*, 2006, 2: 917 ~ 923
- 39 Wang H J, Zhao P Q, Liang X F, Gong X Q, Song T, Niu R F, Chang J. *Biomaterials*, 2010, 31: 4129 ~ 4138
- 40 Lila A S A, Doi Y, Nakamura K, Ishida T, Kiwada H. *J Controlled Release*, 2010, 142: 167 ~ 173

SYNTHESIS AND MICELLIZATION BEHAVIOR OF ANIONIC FLUORINE-CONTAINING AMPHIPHILIC GRAFT COPOLYMERS

LIU Guoqiang¹, XIONG Shengdong¹, ZHANG Lingfei¹, YI Changfeng^{1,2}, XU Zushun^{1,2}

(¹ College of Materials Science and Engineering, Hubei University, Wuhan 430062)

(² Ministry-of-Education Key Laboratory for the Green Preparation and Application of Functional Materials, Hubei University, Wuhan 430062)

Abstract A novel series of anionic fluorine-containing amphiphilic graft copolymers P(HFMA-co-NaSS)-*g*-PEG were synthesized by graft copolymerization of poly(ethylene glycol) methyl ether methacrylate (MPEGMA) macromonomer, 2, 2, 3, 4, 4, 4-hexafluorobutyl methacrylate (HFMA) and sodium 4-vinylbenzenesulfonate (NaSS). The molecular structures of the amphiphilic graft copolymer were characterized by FTIR, ¹H-NMR and ¹⁹F-NMR. The critical micelle concentration (CMC) of P(HFMA-co-NaSS)-*g*-PEG was measured by surface tension technique, indicating that the CMC increased gradually with increasing PEG branched chains and anionic contents in the copolymer. The average hydrodynamic diameter and size distribution of micelles were measured by dynamic light scattering (DLS). The measurement showed that the hydrodynamic diameter increased gradually with increasing the concentration of P(HFMA-co-NaSS)-*g*-PEG aqueous solution and the content of PEG branched chains in P(HFMA-co-NaSS)-*g*-PEG. The fluorescence spectrum showed that there was a significant interaction between P(HFMA-co-NaSS)-*g*-PEG micelles and bovine serum albumin (BSA). The fluorescence intensity of BSA decreased gradually in P(HFMA-co-NaSS)-*g*-PEG/BSA aqueous solution with increasing the concentration of P(HFMA-NaSS)-*g*-PEG aqueous solution, HFMA segments and NaSS contents. Transmission electron microscopy (TEM) was used to investigate P(HFMA-co-NaSS)-*g*-PEG micelles and the aggregates of P(HFMA-co-NaSS)-*g*-PEG/BSA, the results showed that P(HFMA-co-NaSS)-*g*-PEG copolymers could self-assemble into core-shell structure micelles. Besides, with the decrease of HFMA contents in the copolymer, the morphology of P(HFMA-co-NaSS)-*g*-PEG micelles changed from a leaf-like structure to a spherical one. In particular, when BSA was added, the micelles changed from a tight core-shell structure into a loose vesicle-like structure, and the micelle size and size distribution also increased. TEM micrographs of P(HFMA-co-NaSS)-*g*-PEG/BSA displayed a visible adsorption phenomenon between P(HFMA-co-NaSS)-*g*-PEG micelles and BSA, and suggested that P(HFMA-co-NaSS)-*g*-PEG may have potential applications in loading proteins and other bioactive drugs.

Keywords Anionic, Amphiphilic graft copolymer, Micellization, Fluoropolymer, Fluorescence spectroscopy, Bovine serum albumin