

pH 响应性可降解聚膦腈的合成和表征*

邱利焱^{1**} 朱康杰²

(¹ 浙江大学药学院 杭州 310031)(² 浙江大学高分子系 杭州 310027)

摘 要 采用亲核取代引入侧基再进一步修饰的方法合成了一种新型的可降解聚膦腈,红外光谱、氢核磁共振谱、元素分析证实了聚合物的化学组成.体外降解实验表明当侧基修饰达一定比例时,聚合物降解行为表现出强烈的 pH 响应性,即聚合物的降解在 pH6.0~7.4 之间迅速加快,这类聚合物可望作为口服药物控释制剂的载体材料.

关键词 聚膦腈,降解, pH 响应性

环境响应性高分子是一类对于外界环境微小物理或化学刺激(温度、pH、离子、电场、溶剂、反应物、光、应力和磁场等),自身的某些物理或化学性质,如相、形状、光学、力学、电场、表面能、反应速度、渗透速率等会发生相应的突变的聚合物^[1].近年来,随着生物技术药物口服控释制剂的兴起, pH 响应性高分子作为药物载体的应用愈来愈受到人们的关注.一般的 pH 响应性高分子主要是指聚电解质,包括含羧基的聚丙烯酸及其衍生物、海藻酸、聚谷氨酸等聚阴离子,和含氨基的壳聚糖、聚乙烯亚胺、聚赖氨酸等聚阳离子.这些材料常常是以聚阴离子水凝胶或聚电解质复合物两种形式包载药物,利用材料溶胀性对胃肠道 pH 变化的响应,使药物到达肠部再释放和吸收^[2].但是由于材料中存在大量亲水性基团,制剂通过胃部时仍然会有部分膨胀,导致药物溶解扩散或受到酸性胃液和消化酶的侵袭而失活^[3],因此增加材料的疏水性可保证药物制剂在到达给药部位时的有效剂量,从而提高口服药物的生物利用度.

聚膦腈是一族较新发展起来由交替的氮、磷原子以交替的单键、双键构成主链,有机基团作为侧基的高分子,具有强大的侧基功能化特性^[4].最近通过对侧基先进行亲核取代再修饰的方法合成了一种疏水性的 pH 响应性可降解聚膦腈.实验发现当侧基修饰达一定比例时,所得聚合物的降解在 pH6~7.4 范围内迅速加快.本文将对该聚合

物的合成及表征,特别是材料的水解行为进行讨论和分析.

1 实验部分

1.1 原料

六氯环状膦腈三聚体,Fluka 公司,使用前用石油醚重结晶两次,再常压升华两次得到精制单体,mp110~112℃.苯,杭州化学试剂厂,用 CaH₂ 减压蒸馏.石油醚,bp30~60℃,杭州炼油厂, CaH₂ 浸泡脱水.乙醚,杭州化学试剂厂, CaH₂ 浸泡脱水.苯甲酰氯,上海试剂三厂,蒸馏纯化.盐酸羟胺,杭州双林化工试剂厂,使用前常压烘干.甘氨酸乙酯盐酸盐用酸催化共沸酯化法制备.甲醇钠,上海试剂一厂.甲醇,巨化集团公司试剂厂.氢氧化钾,杭州萧山化学试剂厂.以上试剂均为分析纯.

1.2 聚合物合成

合成过程见图1.首先参照文献[5],将精制六氯环状膦腈三聚体为单体,于255℃熔融开环聚合并亲核取代引入甘氨酸乙酯基,制备得到浅黄色聚[(双-甘氨酸乙酯)膦腈](PGP)弹性体.然后将一定量预先烘干的盐酸羟胺溶于5 mL 甲醇,加入5 mL 含有等量甲醇钠的甲醇溶液,室温搅拌15 min后,过滤,除去不溶物 NaCl,得到游离羟胺的甲醇液,立即加入含有 PGP(0.004 mol P-Cl)的甲醇溶液中,用甲醇钠调节反应液 pH 至9左右,

* 2002-07-08 收稿,2002-10-31 修稿;国家自然科学基金(基金号 50203012)和浙江省医药卫生优秀人才青年专项科研专项基金(基金号 G20020371)资助项目; ** 通讯联系人

逐渐析出固体物,继续反应 24 h 后,减压蒸馏除去溶剂至干燥.然后将干燥产物 PGBP' 溶于 20 mL 蒸馏水中,并加入少量 KOH(0.224 g, 0.004 mol),在剧烈搅拌下,向溶液中缓慢滴加过量新鲜蒸馏

的苯甲酰氯(1 mL, 0.0086 mol),待产物充分析出后,离心分离,用蒸馏水洗至中性,真空干燥得到粗产物,再用干燥乙醚反复洗涤粗产物,过滤干燥,得到白色粉末状产物 PGBP,产率约为 72%.

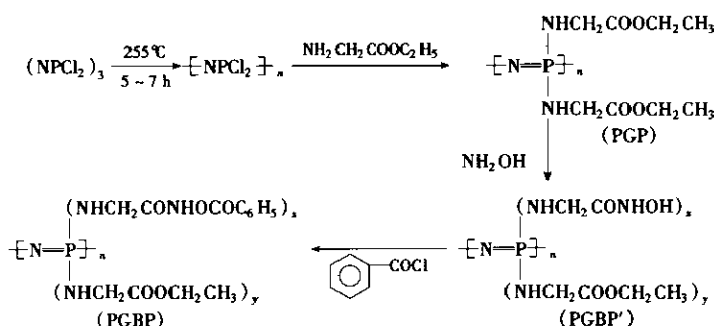


Fig. 1 Synthesis of PGBP

1.3 聚合物表征

1.3.1 红外光谱 聚合物样品用二氯甲烷溶解,在 KBr 盐片上成膜,用 Nicolet 5DX 傅立叶红外光谱分析仪测定记录红外光谱.

1.3.2 ¹H-NMR 表征 聚合物用 *d*₆-DMSO 溶解,用 Avance DMX500 核磁共振仪测定¹H-NMR, Me₄Si 为内标,测试温度为 90℃.

1.3.3 元素分析 用 EMA EA-1106 元素分析仪测定聚合物中碳、氢、氮的含量.

1.3.4 DSC 分析 约 15 mg 聚合物样品置于铝制样品池中,用 Perkin Elmer DSC-7 热分析仪记录 DSC 曲线,测定温度范围 -70 ~ 200℃,升温速度 10 K/min.

1.3.5 分子量测定 将聚合物溶于 DMSO,用 Knauer 蒸汽压渗透仪测定数均分子量,八乙酰蔗糖为标样.

1.4 聚合物降解

由于在降解过程中需要测定聚膦腈降解产物磷酸根的含量,应选择无磷缓冲液作降解介质. pH5.0 和 pH6.0 条件下为柠檬酸/柠檬酸钠缓冲液, pH7.4 和 pH8.0 为硼酸/硼砂缓冲液.

约 25 mg 的 PGBP 粉末用自制模具在 40℃, 9.8 × 10⁶ Pa 压力下压制成直径为 2.5 mm,厚度为 2 mm 的圆型小片.将此小片分别浸入 20 mL 不同 pH 的缓冲液中,置于 37℃ 恒温振荡器中.定期取出一个小片,干燥后称重并用 VPO 测定分子量.并定期从降解体系中取出 0.2 mL 降解介质,同时加入 0.2 mL 新鲜的缓冲液,测定降解介质中 PGBP 降解产物的浓度,磷酸根根据 Vc 法^[6]用 UV-Vis 分光光度计(Shimatz-1201 型)在 570 nm 处

测定吸收度,苯甲酸的浓度用高效液相色谱(HPLC)测定(Shimadzu-R4A HPLC 仪, Alltoma 5 × 250 mm C18 柱为固定相,甲醇/水/乙酸(60/40/2, V/V)作流动相,流速为 0.8 mL/min,用 UV 检测器,254 nm 为检测波长,苯甲酸作参照).

2 结果与讨论

2.1 聚合物的合成

侧基直接引入法是制备功能化聚膦腈较简便的方法,但是当侧基体积过大时,其较大的空间障碍效应将导致最终聚合物的取代率低且容易交联^[7].在以前的文章中曾报道用亲核取代引入甘氨酸乙酯侧基可得到取代率为 100% 的 PGP^[7],因此本文采用先合成 PGP 再对其作进一步修饰的方法来制备高取代率并具有线性结构的新型聚膦腈.酯与羟胺反应是制备氧膦酸化合物最常用的方法^[8].我们根据这一反应机理,将 PGP 与一定量的羟胺反应,使 PGP 侧基甘氨酸乙酯部分转变成甘氨酸羟胺,再通过苯甲酰化进一步将氧膦酸转化成氧膦酸酯来制备新型的聚膦腈,并通过调节 PGP 与羟胺的投料比(表 1),最终得到了两种聚合物,分别称为 PGBP-1 和 PGBP-2.在 PGP 与羟胺的反应中,甲醇钠的加入非常重要,它可以大大提高反应的速度.加入甲醇钠 1 h 左右,反应物用 FeCl₃ 甲醇液检测就会显示特殊的红色,说明氧膦酸已经开始生成;若不加甲醇钠,反应物即使混合搅拌 1 天也不会出现上述现象.含氧膦酸基团的大分子中间体 PGBP'-1 和 PGBP'-2 都能在水中完全溶解,并且在碱性条件下遇苯甲酰氯立即反应生成不溶于水的含氧膦酸酯的 PGBP-1 和 PGBP-

2.反应过程中生成的副产物苯甲酸可以用乙醚彻底清除,不影响产物的纯度.PGBP-1 和 PGBP-2 都是白色粉末.PGBP-1 可以溶于乙醇、CH₂Cl₂、THF、DMSO,而 PGBP-2 不能溶于乙醇和 THF.

Polymer	x	y	Feed ratio of PGP/NH ₂ OH (mol) ^a	M _n	T _g (°C)	Element analysis (%)		
						C	N	H
PGBP-1	0.8	1.2	2:1	6430	34	Exp 44.01	15.96	5.12
						The 44.74	16.53	5.22
PGBP-2	1.6	0.4	1:5	7400	55	Exp 48.14	16.01	4.61
						The 48.66	16.32	4.46

^a The amount of PGP was calculated on glycine ethyl ester side groups.

PGBP-1 和 PGBP-2 的傅利叶红外谱图具有相似的特征峰分布(图 2),3350 cm⁻¹为胺基的伸缩振动峰,3100~2800 cm⁻¹处分别为苯环 C—H 和甲基、亚甲基的 C—H 伸展振动吸收峰,1750 cm⁻¹为典型酯键 —O—C(=O)— 伸展振动吸收峰,1650 cm⁻¹为酰胺 —C(=O)NH— 伸展振动吸收峰,1600,1580 cm⁻¹为苯环 —C=C— 特征吸收峰.比较后发现,PGBP-2 在 1650 cm⁻¹处的峰明显比 PGBP-1 要强,说明 PGBP-2 中含有较多的甘氨酸肟酸苯甲酯基团.

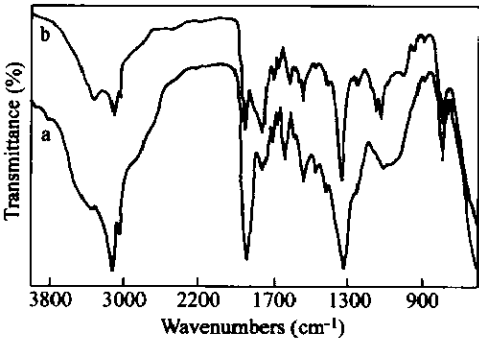


Fig. 2 The IR spectra of (a) PGBP-1 and (b) PGBP-2

PGBP-1 和 PGBP-2 具有相似的¹H-NMR 谱图(图 3),1.2 的峰对应于—CH₃,3.78 对应于—CH₂CH₃—中的亚甲基,4.15 对应于—NHCH₂—中的亚甲基,7.3~8.2 对应于苯环上的氢.谱图上 6.4 的宽峰会随测试温度升高至 120℃ 而向高场迁移至 5.2,说明它是一个活泼氢的质子峰,归属于试样中的—NH—.这些吸收峰同样证明了反应产物的结构与预期设计的相符.通过对峰面积积分计算得到 PGPB-1 和 PGPB-2 侧基甘氨酸乙酯转化成甘氨酸肟酸苯甲酯的转化率分别为 40% 和 80%,即 PGBP 分子式中的 x 分别为 0.8 和 1.6,y 分别为 1.2 和 0.4,可见通过改变 PGP 与羟氨的投料比可以调节 PGP 中甘氨酸乙酯转化成

甘氨酸肟酸苯甲酯的转化率,并且当投料比较小时,转化率接近与投料比,如 PGBP-1;但投料比较高时,可能由于空间位阻作用,即使羟氨过量很多,转化率也不能达到 100%.表 1 中元素分析的结果与转化率 40% 和 80% 情况下的理论值非常接近.

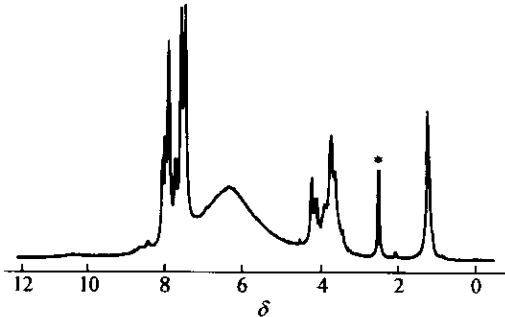


Fig. 3 The ¹H-NMR spectrum of PGBP-2 measured at 90°C
* Solvent peak

PGPB-1 和 PGPB-2 的 DSC 曲线都只有 T_g 没有 T_m,说明它们都是无定形高分子材料.反应物 PGP 的 T_g 是 -19℃,经反应在分子中引入刚性的苯环基团,使得产物 T_g 有所提高,且 T_g 与反应转化率有关,PGBP-1 的 T_g 是 34℃,PGBP-2 是 55℃.

2.2 聚合物的降解

Ruiz^[6]等曾报道 PGP 在 pH7.4 时降解最慢,在碱性和酸性条件下降解加快,可是经侧基修饰后聚合物表现出完全不同的现象.图 4 是 PGBP-1 试样在不同 pH 缓冲液中的重量损失.从图上可以看到试样在不同 pH 值的缓冲液中逐渐溶蚀,且溶蚀速度随着 pH 降低而减慢,降解 10 h 时,放置在 pH8.0 缓冲液中的样品已溶蚀完毕,而在 pH5.0 缓冲液中重量损失只有 4%,在 pH7.4 和 6.0 缓冲液中降解速度相差不多,重量损失分别为 25% 和 18%.图 5 是 PGBP-2 试样在不同 pH 缓

冲液中重量损失的情况.从图上可明显发现虽然 PGBP-2 的降解速度仍与 PGBP-1 一样随 pH 降低而减慢,但是 pH6.0 和 pH5.0 的降解速度比 pH8.0、7.4 慢了很多,在图上形成两种完全不同的降解曲线,PGBP-2 试样在 pH8.0 缓冲液中仅需 12 h 即可完全消失,pH7.4 中 1.5 天,但在 pH6.0 和 5.0 的弱酸条件下 10 天分别降解 48% 和 7.6%,完全溶蚀需要 20 多天时间,呈现出强烈的 pH 依赖性.可见侧基甘氨酸乙酯与甘氨酸肟酸苯甲酯的含量比例对最终聚合物的降解 pH 响应性有十分密切的影响.

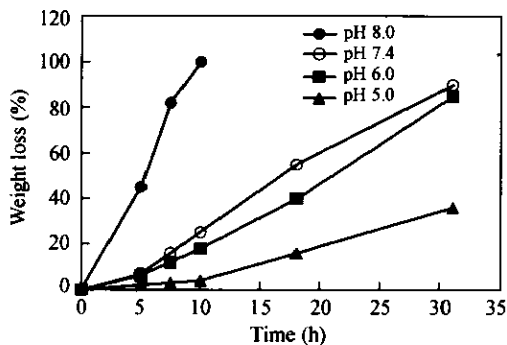


Fig. 4 Weight loss of PGBP-1 in pH8.0, 7.4, 6.0 and 5.0 buffer at 37℃

由于甘氨酸乙酯具有酯的共性,在中性条件下水解缓慢,酸性或碱性条件水解加快.而甘氨酸肟酸苯甲酯的水解与介质中碱的浓度成正比关

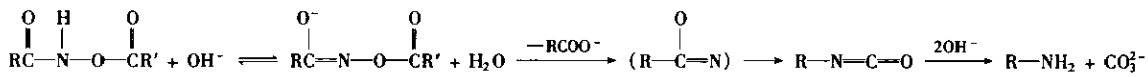


Fig. 6 Hydrolysis mechanism of hydroxamic acid

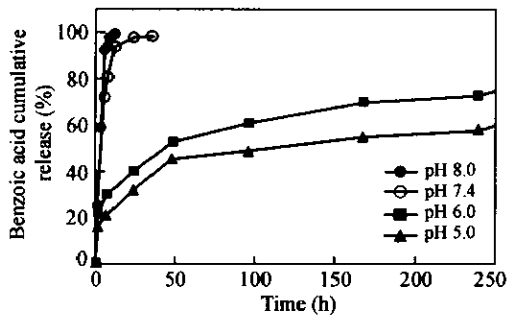


Fig. 7 Benzoic acid release of PGBP-2 in pH8.0, 7.4, 6.0 and 5.0 buffer solution at 37℃

时监测了聚合物降解过程中小分子降解产物的产生.肟酸苯甲酯容易经历 Lossen 重排分解生成苯甲酸^[8],因此,缓冲液中苯甲酸浓度的变化可以

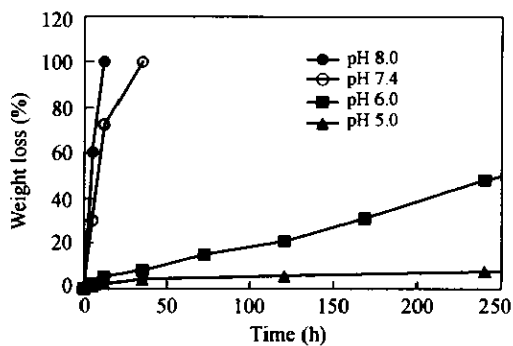


Fig. 5 Weight loss of PGBP-2 in pH8.0, 7.4, 6.0 and 5.0 buffer at 37℃

系^[9,10](图 6),因此在弱酸性环境下稳定,在中性和弱碱条件下易水解.由于两种侧基的水解机理不同,当它们在聚合物中所占比例不同时必然导致聚合物表现出不同的降解行为.PGBP-1 带有几乎等量的两种不同的侧基,因此结合了两种侧基的水解性质,表现在 pH6.0 和 5.0 时降解比 PGBP-2 快;而 PGBP-2 侧基带有约 80% 的甘氨酸肟酸苯甲酯,因此使整个材料明显表现出肟酸酯的水解特性而具有强烈的 pH 响应降解性.这一结果与最近 Ulbrich 等关于肟酸酯交联水凝胶的报道相吻合^[11,12].而且 PGBP-2 降解速度的突跃范围正好在 pH6~7.4 之间,所以非常适合于作为肠定位口服药物控释载体使用.

为进一步探讨 PGBP 的降解机理,实验中同

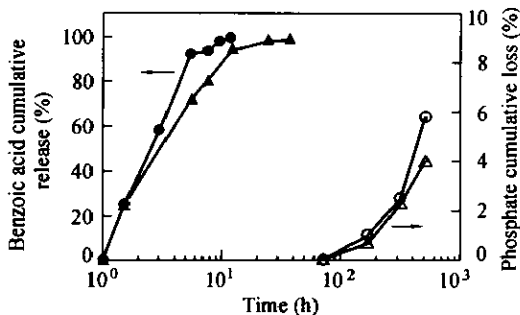


Fig. 8 Benzoic acid and phosphate release of PGBP-2 in pH8.0, 7.4, 6.0 and 5.0 buffer solution at 37℃

表征 PGBP 侧基水解的情况,同时用 Vc 法测定磷酸根的浓度指示 PGBP 主链的降解情况.图 7 是 PGBP-2 在各 pH 缓冲液中降解产物苯甲酸的累积

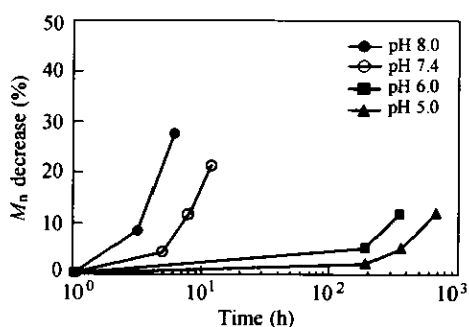


Fig. 9 M_n change of PGBP-2 in pH 8.0, 7.4, 6.0 and 5.0 buffer solution at 37°C

M_n decrease means $(M_{n0} - M_{nt}) / M_{n0} \times 100\%$

释放曲线.从图中可以看到各 pH 缓冲液中,苯甲酸的浓度随降解时间而逐渐增加,增加速度随 pH 降低而降低且弱酸情况明显比弱碱情况慢很多.图 8 是 PGBP-2 在 pH 8.0 和 pH 7.4 时,主链降解产物磷酸根释放情况与侧基苯甲酸释放情况的对

照,发现磷酸根的释放明显滞后于苯甲酸,说明 PGBP-2 的侧基比主链更易水解.由此我们推测 PGBP-2 的降解过程由两部分组成,首先侧基甘氨酸氧肟酸苯甲酯水解成亲水性氨基,并释放苯甲酸,同时可能伴随侧基甘氨酸乙酯水解成甘氨酸,使疏水性的 PGBP-2 转变成水溶性大分子;第二部分是水溶性大分子在水中进一步降解,经主链断裂变成小分子.我们还测定了各缓冲液中试样完全消失前的分子量变化(图 9),发现各 pH 值条件下, PGBP-2 的分子量变化都非常小,说明在这一时期分子量的变化主要由侧基的水解贡献,从另一侧面证实了上述的二阶段水解机理.

综上所述,采用亲核取代引入侧基再进一步修饰的方法可以合成一种新型的 pH 响应可降解聚膦腈,并且当侧基甘氨酸氧肟酸苯甲酯修饰达一定比例时,聚合物降解行为表现出强烈的 pH 响应性.

REFERENCES

- 1 Zhuo Renxi (卓仁禧), Zhang Xianzheng (张先正). *Acta Polymerica Sinica* (高分子学报), 1997, (4): 500 ~ 503
- 2 Kost J, Langer R. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 46: 125 ~ 148
- 3 Kono K, Kawakami K, Morimoto K, Takagishi T. *J Appl Polym Sci*, 1999, 72: 1763 ~ 1773
- 4 Allcock H R. *Poly Mater Sci Eng*, 1997, 76: 49 ~ 50
- 5 Qiu Liyan. *Chem J Chinese Universities* (高等学校化学学报), 2002, 23(2): 314 ~ 317
- 6 Ruiz E M, Ramitz C A, Aponte N A, Gustavo V B. *Biomaterials*, 1993, 14(7): 491 ~ 496
- 7 Allcock H R, Fuller T J, Mack D P, Matsumura K, Smeltz K M. *Macromolecules*, 1977, 10(4): 824 ~ 830
- 8 Yale H L. *Chem Rev*, 1943, 33: 209 ~ 256
- 9 Renfrow W B, Hauser C R. *J Am Chem Soc*, 1937, 59: 2308 ~ 2314
- 10 Dougherty G, Jones L W. *J Am Chem Soc*, 1924, 46: 1535 ~ 1539
- 11 Ulbrich K, Subr V, Seymour L W, Duncan R. *J Controlled Release*, 1993, 24: 181 ~ 190
- 12 Ulbrich K, Subr V, Podperova P, Buresova M. *J Controlled Release*, 1995, 34: 155 ~ 165

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF pH-RESPONSIVE DEGRADABLE POLYPHOSPHAZENE

QIU Liyan¹, ZHU Kangjie²

(¹ College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University, Hangzhou 310031)

(² Department of Polymer Science and Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027)

Abstract The method of substitution reaction followed by modification was used to synthesize a novel polyphosphazene containing amino acethydroxamic acid benzyl esters. By changing the feed ratio of reactants during the polymer modification, two resultant polymers with different contents of amino acethydroxamic acid benzyl ester were obtained. IR, ¹H-NMR and elemental analysis were applied to characterize these polymers. The degradation test in vitro was carried out in phosphorous-free buffer solutions in the pH range of 5.0 ~ 8.0. The result revealed that the polymer with certain amount of amino acethydroxamic acid side groups (80%) exhibited strong pH-responsive degradation property. After 1.5 d, the sample dissolved completely in the solution of pH7.4, but lost only about 8% and 4% in solutions of pH6.0 and pH5.0, respectively. The degradation rate of polymer accelerated suddenly in the pH range 6.0 ~ 7.4. These features are feasible for polymers to act as carriers of oral enteric drug controlled delivery systems.

Key words Polyphosphazene, Degradation, pH-Response