

变温反相悬浮聚合制备温度敏感性聚合物微凝胶*

张颖 丁建东**

(聚合物分子工程教育部重点实验室 复旦大学高分子科学系 上海 200433)

摘要 报道了一种利用变温的途径制备具有温度敏感性聚合物凝胶微粒的悬浮聚合方法.以正庚烷为连续相,过硫酸铵和四甲基乙二胺为引发剂,采用将具有反向温敏性的可降解大分子单体水溶液在低温下分散好以后再升高到聚合温度的变温反相悬浮聚合的方法制备了反向温敏性的可降解微凝胶.该方法避免了由于分散相在聚合温度下发生物理凝胶化所导致的分散困难等问题.考察了微凝胶的温敏性、粒径分布和降解行为等,并研究了油水比对微凝胶形貌的影响.

关键词 微凝胶, 反向温敏性, 可降解, 反相悬浮聚合

智能凝胶由于具有对环境的刺激而体积发生变化的特性^[1-7],广泛用于药物控释等研究领域.其中具有可注射性的微凝胶越来越引起人们的关注^[8].制备微凝胶的方法有很多,如反相悬浮聚合、沉淀聚合和乳液聚合等^[9-15].早在1988年 Matsuo 和 Tanaka^[12]就使用了反相悬浮聚合的方法制备了温敏性的 *N*-异丙基丙烯酰胺微凝胶.根据该方法,单体溶液被加入到石蜡油(连续相)中,在20℃(低于微凝胶的体积相转变温度)的条件下引发聚合.但是该方法并不直接适用于本文的大分子单体聚合制备微凝胶,因为大分子单体由于有效的可聚合基团浓度低而导致常温下聚合反应速率偏低,同时考虑到引发剂向连续相的流失,导致我们在常温下通过悬浮聚合得不到具有足够交联度的微凝胶.本课题组制备了可用作蛋白质药物缓释载体的温敏性可降解的凝胶^[16]与微凝胶^[17].我们在以往制备微凝胶时也采用了反相悬浮聚合的方法,即将含有引发剂的大分子单体溶液加入到预定聚合温度的连续相中.但是由于所采取的温度高于大分子单体溶液和微凝胶的相转变温度,不适合高浓度的大分子单体溶液.当浓度较高时,聚合温度下过早的物理凝胶化会导致分散困难,而得不到所需要的凝胶微粒.而大分子单体的浓度又是决定微凝胶网络孔径的重要因素之一,即最终会影响蛋白质药物的包裹和释放^[18-20].

本文所用的是具有反向温敏性的大分子单

体,具有如 Acryl-oligoLA-(PEO-PPO-PEO)-oligoLA-acryl 的结构.其中,中间部分为温敏性三嵌段共聚物,在我们的实验中为 Sigma 公司的 Pluronic F127,两侧为二聚或低聚乳酸,两端为可聚合的丙烯酸酯.此大单体可简称为 F127-oligoLA-DA,其水溶液的 sol-gel 相转变温度和微凝胶的相转变温度在室温附近,因此针对本文的反向温敏性大分子单体要求在低温下(低于大分子单体溶液的相转变温度)分散好以后再升高温度引发聚合.该变温悬浮聚合的方法适用范围较广,有利于我们的后续工作,即利用该温敏性可降解的微凝胶包裹蛋白质药物.

1 实验部分

1.1 原料

Pluronic F127, Sigma; 辛酸亚锡,分析纯, Aldrich,减压蒸馏提纯(220~240℃,13.33 Pa);丙交酯, Purac,乙酸乙酯重结晶3次;无水乙醚,二氯甲烷,分析纯,上海试剂四厂昆山分厂;正庚烷,分析纯,上海新高化学试剂有限公司;司班80,吐温80,化学纯,中国医药(集团)上海化学试剂公司;丙烯酰氯,自制(由苯甲酰氯和丙烯酸反应收集60~90℃馏分,再蒸馏收集70~74℃馏分);过硫酸铵,上海爱建试剂厂,使用前重结晶.

1.2 Pluronic F127/低聚酯大分子单体的合成

将20 g Pluronic F127和0.46 g 丙交酯加入预

* 2004-12-31 收稿,2005-02-03 修稿;863 计划(项目号 2004AA215170)、国家自然科学基金(基金号 20221402,20374015)、教育部科学技术研究重大项目(项目号 305004)、高等学校青年教师教学和科研奖励基金、973 计划(项目号 G1999054306-03)、上海市科技发展基金(基金号 04JC14019)和中国博士后科学基金(基金号 2004035115)资助项目; ** 通讯联系人, E-mail: jdding1@fudan.edu.cn

先真空干燥的安瓿管内,抽真空 1 h,期间用氩气置换数次.加入 1.3 mL 辛酸亚锡(10 mg/mL 甲苯溶液)后,振荡摇匀,抽真空(13.33 Pa)30 min 左右,期间用氩气置换 2 次.将安瓿管 60℃ 油浴中抽真空 6 h,以除去易挥发物,期间用氩气置换 3~4 次,之后在真空下热封安瓿管,再在 150℃ 油浴中反应 24 h,冷却后用二氯甲烷溶解;然后用过量的无水乙醚沉淀并去除多余的辛酸亚锡,抽滤得到 F127-LA₂ 共聚物,室温下真空干燥 2~3 天;将干燥后的 F127-LA₂ 共聚物 18 g 溶解于 120 mL 的无水二氯甲烷中,加入 3.5 mL 的三乙胺,然后滴加 60 mL 溶有丙烯酰氯(3.4 mL)的无水二氯甲烷溶液,在冰水中反应 12 h 后,再在室温下反应 12 h.过滤后,将滤液用过量无水乙醚沉淀,所得产品真空干燥 2~3 天,即得 F127-LA₂-DA 大分子单体^[21-23],大分子单体得率为 86%. LA₂ 指以进料摩尔比算, F127 两端平均有两个乳酸重复单元(一个丙交酯), DA 指二丙烯酰基,即 F127-LA₂ 共聚物两端各有一丙烯酰基.乳酸的实际聚合度由 ¹H-NMR (Bruker, DMX500) 计算为 1.9. 大分子单体在低温氩气下保存.

1.3 温敏性可降解微凝胶的制备

在有氮气保护、冷凝管和机械搅拌的 250 mL 四口烧瓶中先后加入 5 g 司班 80 或 4.2 g 司班 80 与 0.8 g 吐温 80 的混合物和 120 mL 正庚烷,在冰浴中搅拌,搅拌速度为 250~550 r/min,滴加 5 g 16.7%~25% 浓度的大单体水溶液(含有 15~20 μL 的四甲基乙二胺和大单体重量 3% 的过硫酸铵),大分子单体溶液的物理凝胶化相转变温度约 36~22℃(对本文所用的 F127-LA₂-DA 大单体,相转变温度主要与浓度有关,由倒管法测定^[24]),每秒 1~2 滴.在冰浴中稳定 15~20 min 后,将水浴加热至 70℃,逐滴补加入含有一定量四甲基乙二胺和过硫酸铵的水溶液,1 h 后停止搅拌,趁热用筛网过滤.先后用丙酮和去离子水洗涤后,放入冰箱内保存或者用丙酮梯度脱水并真空干燥后在干燥器内保存.微凝胶得率为 45%.

1.4 性能测试

微凝胶的形貌用倒置显微镜(Axiovert 200, ZEISS, 德国)和带有热台的显微镜(Olympus BX51)对微球进行观察,根据测量的直径计算微球的体积.

微凝胶的粒径分布用激光粒度仪(Laser particle size analyzer, LS230, 美国)测量,测试温度

为 20℃.

1.5 微凝胶的降解行为

大约 20 mg 的干燥微凝胶混悬在 5 mL 的降解介质中,降解介质是 PBS 缓冲溶液(PBS: pH = 7.2, NaCl 8.5 g/L, KCl 0.2 g/L, Na₂HPO₄·12H₂O 2.85 g/L, KH₂PO₄ 0.27 g/L). 样品在 37℃ 恒温台式振荡器上振荡,转速为 100 r/min. 21 个样品同时进行降解实验,在预定的时间取出其中 3 个样品,其余继续降解.取出的样品分别收集固体和液体部分.固体部分用聚砜超滤膜(截留分子量 5×10^4)分离,真空干燥后至恒重,精密称定.降解前微球重量为 W_1 ,经降解后微球重量为 W_2 ,则失重百分率为 $[(W_1 - W_2)/W_1 \times 100\%]$,同时用 pH 计测定溶液的 pH 值.100% 的重量损失时微凝胶完全降解为可溶性的产物^[23].

2 结果与讨论

2.1 微凝胶的温敏性

将微凝胶放在带有热台的显微镜下观察其形貌.升温速率为 5 K/min,在预定的温度下稳定 3 min.图 1 为微凝胶的体积随温度变化的情况和微凝胶在不同温度时的形貌,以在 4℃ 时微凝胶的体积为参比.与 4℃ 时的微凝胶相比,37℃ 时微凝胶的体积减小了一半多,微凝胶在 25℃ (微凝胶的相转变温度)左右时体积变化最大.说明微凝胶具有显著的温度敏感性,这对于我们今后利用微凝胶的温敏性控制蛋白质类药物的后包裹和释放的工作非常有利.

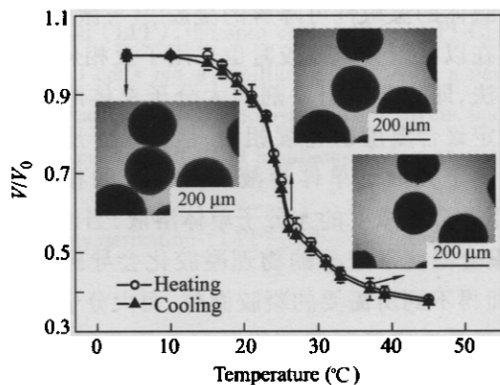


Fig. 1 Micrographs of microgels at different temperatures and volume phase transition of microgels with temperatures
 V_0 indicates the volume of microgels at 4℃

微凝胶之所以具有温度敏感性是由于构成微凝胶前身的大分子主体是具有反向温敏性的三嵌

段共聚物. Pluronic F127 的水溶液具有升温而物理凝胶化的行为^[25]. 对于化学交联的微凝胶而言, 当温度升高到一定值时, 聚合物分子链段间疏水作用变强, 凝胶收缩, 将出现体积相变.

2.2 微凝胶的粒径分布

本文制备微凝胶采用的是变温反相悬浮聚合的方法, 即在低温时加入大分子单体溶液, 使之均匀地分散成微滴后, 再升高温度聚合. 图 2 给出了用该法制备得到的微凝胶的粒径分布, 为 $(313 \pm 119) \mu\text{m}$.

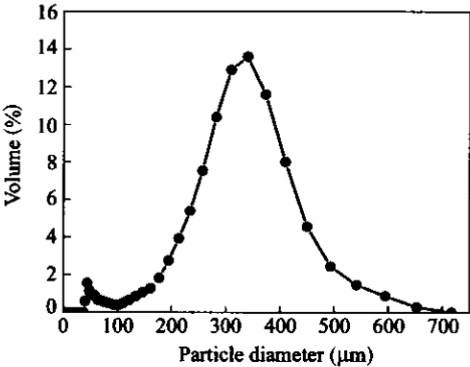


Fig. 2 Size distribution of microgels
Testing temperature = 20 °C

2.3 微凝胶的降解行为

降解性对于许多医用高分子材料至关重要^[26-30]. 图 3 为经 F127-LA₂-DA 大单体制得的微凝胶的降解行为和降解所引起的体系的 pH 值的变化. 微凝胶的降解行为与聚乳酸 (PLA) 等本体聚酯医用材料的降解行为是不同的. PLA 等聚酯水解的酸性产物导致“自催化效应”^[31-33]. 本文的微凝胶是亲水性的 Pluronic F127 与疏水的二聚酯或低聚酯共聚而得到的, 高的溶胀度降低了凝胶网络内的酸的浓度, 而且更利于降解产物从网络中除去. 所以酸的“自催化效应”没有起到太大的作用. 二聚酯或低聚酯赋予微凝胶的可降解性, 随着降解时间的延长, 酯键不断断裂, 凝胶的交联度

下降, 溶胀度不断增大, 交联点之间链段不断从微凝胶网络中扩散出来, 导致微球重量损失, 最后微球完全崩溃.

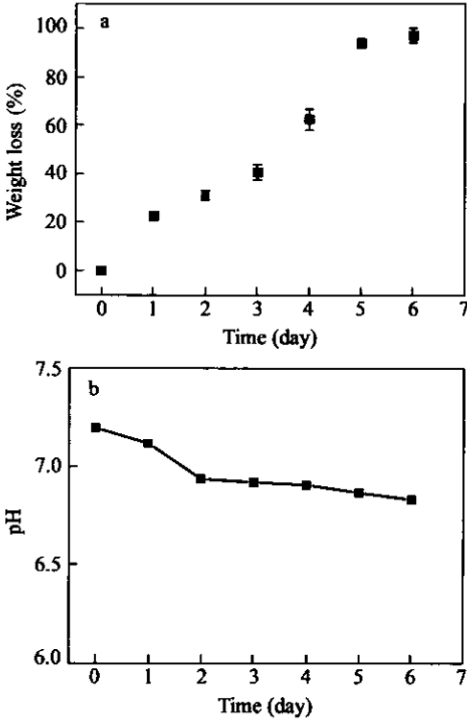


Fig. 3 *In vitro* degradation behaviors of microgels in PBS at 37 °C
(a) Weight loss of microgels; (b) pH change in medium

2.4 油/水比对微凝胶形貌的影响

在分散过程中, 一部分加速剂四甲基乙二胺会溶解到正庚烷中, 所以有时需要补加一部分引发剂和加速剂. 在后补加引发剂和加速剂时, 由于过硫酸铵是水溶性的, 并且只有通过引发剂和加速剂的液滴同大单体液滴间的分散和聚并, 才能使后补加的引发剂和加速剂进入到大单体液滴中, 所以将其溶入水中是十分必要的. 在补加相同量的引发剂和加速剂时, 溶剂水的量对微凝胶的形态也有影响, 如图 4 所示. 115 mL 正庚烷和 6 g 16.7% 的大单体水溶液 (含 0.03 g 过硫酸铵和 15 μL 的四甲基乙二胺) 在低温 (4 °C) 下分散好之后,

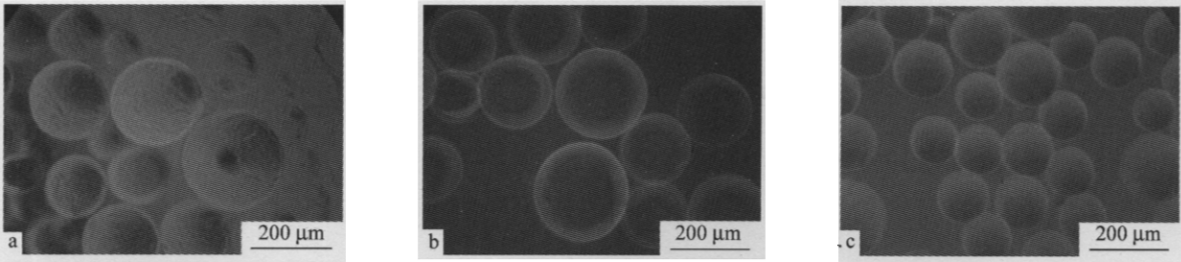


Fig. 4 Morphology of microgels with marked amounts of water (containing initiator and accelerator) added after dispersion
a) 5 g; b) 2.5 g; c) 1 g

升高温度至 70℃,然后补加同样量的过硫酸铵和四甲基乙二胺,只是所用的溶剂水的量不同.从图 4 中可以看到,加入 5 g 溶剂时制得的微凝胶表面皱褶,补加 1 g 溶剂时制得的微凝胶表面光滑,补加 2.5 g 溶剂时制得的微凝胶的光滑度介于两者之间.这可能是由于水的加入造成系统中油/水比的变化引起的.实验还表明,在我们的研究体系中,单纯补加引发剂而不升温则得不到足够交联

的微凝胶.

综上所述,用变温反相悬浮聚合制备了温敏性聚合物微凝胶,即在大分子单体水溶液和微凝胶的相转变温度以下,将大分子单体液滴分散好再升高到可聚合温度以完成聚合交联反应.所得到的微凝胶具有良好的反向温敏性和可降解性.需要补加引发剂与加速剂的水溶液;此时,油水比对微凝胶的形貌也有一定的影响.

REFERENCES

- 1 Zhang J T, Huang S W, Cheng S X, Zhuo R X. *J Polym Sci, Part A, Polym Chemistry*, 2004, 42(5): 1249 ~ 1254
- 2 Zhuo Renxi(卓仁禧), Zhang Xianzheng(张先正). *Acta Polymerica Sinica(高分子学报)*, 1998, (1): 39 ~ 42
- 3 Ji S C, Ding J D. *Polym J*, 2002, 34(4): 267 ~ 270
- 4 Ji Shichen(纪仕辰), Ding Jiandong(丁建东). *Chem J Chinese U(高等学校化学学报)*, 2001, 22(7): 1254 ~ 1255
- 5 Yao F L, Chen W, Wang H, Liu H F, Yao K D. *Polymer*, 2003, 44: 6435 ~ 6441
- 6 Liu W G, Zhang J R, Yao K D. *J Applied Polym Sci*, 2002, 86(1): 259 ~ 263
- 7 Zeng Fang(曾舫), Liu Xinxing(刘新星), Tong Zhen(童真), Yang Yanyin(杨燕银), Wu Shuizhu(吴水珠). *Science in China, Ser B(中国科学, B 辑)*, 2000, 43(4): 428 ~ 434
- 8 Pelton R. *Advance in Colloid and Interface Sci*, 2000, 85: 1 ~ 33
- 9 D' Emanuele A, Dinaruand R. *Int J Pharm*, 1995, 118: 237 ~ 242
- 10 Agbugba C B, Hendriksen B A, Chowdhry B Z, Snowden M. *J Colloids Surf A*, 1998, 137: 155 ~ 164
- 11 Tobita H, Kumagai M, Aoyagi N. *Polymer*, 2000, 41: 481 ~ 487
- 12 Matsuo E S, Tanaka T. *J Chem Phys*, 1988, 89(3): 1695 ~ 1703
- 13 Dowding P J, Vicent B, Williams E. *J Colloid Interface Sci*, 2000, 221: 268 ~ 272
- 14 Gao Y B, Au-Yeung S C F, Wu C. *Macromolecules*, 1999, 32(11): 3674 ~ 3677
- 15 Gao Jun(高均), Wu Chi(吴奇). *Acta Polymerica Sinica(高分子学报)*, 1997, (3): 324 ~ 330
- 16 Zhang Ying(张颖), Zhu Wen(朱文), Wang Biaobing(王标兵), Yu Lin(俞麟), Ding Jiandong(丁建东). *J Pharm Sci*, 2005, 94(8): 1676 ~ 1684
- 17 Ding Jiandong(丁建东), Zhu Wen(朱文), Wang Biaobing(王标兵). *Chinese patent(中国专利)*, 03115319.4. 2003-02-08
- 18 Cruise G M, Scharp D S, Hubbell J A. *Biomaterials*, 1998, 19: 1287 ~ 1294
- 19 Lu S X, Anseth K S. *Macromolecules*, 2000, 33: 2509 ~ 2515
- 20 Elliott J E, Anseth J W, Bowman C N. *Chem Eng Sci*, 2001, 56: 3173 ~ 3184
- 21 Ha J C, Kim S Y, Lee Y M. *J Control Release*, 1999, 62: 381 ~ 392
- 22 Kim S Y, Ha J C, Lee Y M. *J Control Release*, 2000, 65: 345 ~ 358
- 23 Sawhney A S, Pathak C P, Hubbell J A. *Macromolecules*, 1993, 26: 581 ~ 587
- 24 Jeong B, Kim S W, Bae Y H. *Adv Drug Deliver Rev*, 2002, 54: 37 ~ 51
- 25 Jeon S, Granick S, Kwon K W, Char K. *J Polym Sci Polym Phys*, 2002, 40: 2883 ~ 2888
- 26 Zhang G L, Ma J B, Li Y H, Wang Y N. *J Biomater Sci, Polym Ed*, 2003, 14(12): 1389 ~ 1400
- 27 Feng Peng(冯鹏), Ma Jianbiao(马建标), Wang Yinong(王亦农), He Binglin(何炳林). *Acta Polymerica Sinica(高分子学报)*, 2000, (5): 620 ~ 625
- 28 Zhang Hanwei(张汉威), Cai Qing(蔡晴), Bei Jianzhong(贝建中), Wang Shenguo(王身国). *Acta Polymerica Sinica(高分子学报)*, 2003, (3): 454 ~ 457
- 29 He B, Wan Y Q, Bei J Z, Wang S G. *Biomaterials*, 2004, 25 (22): 5239 ~ 5247
- 30 Wu L B, Ding J D. *Biomaterials*, 2004, 25(27): 5821 ~ 5830
- 31 Kissel T, Li Y X, Unger F. *Adv Drug Deliver Rev*, 2002, 54: 99 ~ 134
- 32 Metters A T, Anseth K S, Bowman C N. *Polymer*, 2000, 41: 3993 ~ 4004
- 33 Witt C, Kissel T. *Eur J Pharm Biopharm*, 2001, 51: 171 ~ 181

PREPARATION OF THERMO-SENSITIVE POLYMER MICROGELS BY ALTERED-TEMPERATURE SUSPENSION POLYMERIZATION

ZHANG Ying, DING Jiandong

(Key Laboratory of Molecular Engineering of Polymers, Department of Macromolecular Science, Fudan University, Shanghai 200433)

Abstract An altered-temperature inverse suspension polymerization, which was suitable for negatively thermosensitive macromers, was presented to prepare thermosensitive and biodegradable microgels. The thermosensitivity and biodegradability of microgels come from those of macromers. The microgels were synthesized in suspension, in which the continuous phase was heptane. Ammonium persulphate and *N, N, N', N'*-tetramethylethylenediamine were employed as the initiating system. The negatively thermosensitive macromer aqueous solution was first dispersed well at low temperatures (lower than the sol-gel transition temperature of the macromer solution) and then crosslinked after raising temperature. The highlight of this approach is the avoidance of dispersion difficulty of the dispersion phase because of its physical gelation at polymerizing temperature. The thermosensitivity and biodegradation of the resulting microgels were confirmed. The volume phase transition temperature of microgels was around 25°C, and the volume of microgels at 37°C was less than half of that at 4°C. Microgels were completely degraded into water-soluble products. It was necessary to add aqueous solutions of initiator and accelerator into the continuous phase after raising temperature. The ratio of oil to water influenced the morphology of microgels to a certain degree.

Key words Microgels, Negative thermosensitivity, Biodegradable, Inverse suspension polymerization