

·研究简报·

端氨基聚乙二醇-聚己内酯二嵌段共聚物的合成 及其微球表面氨基和形态的调控*

于国强^{1,2} 石旭东^{1,2} 甘志华^{1**}

(¹中国科学院化学研究所工程塑料实验室 北京 100080) (²中国科学院研究生院 北京 100039)

关键词 生物降解高分子, 端氨基, 微载体, 表面性质

生物降解高分子作为一种重要的生物材料已经发展到第3代^[1], 实际应用的复杂性不仅要求高分子材料本身具有合适的降解性能、热性能、力学性能和加工性能等, 而且还要求高分子材料具有能够刺激细胞生长、识别特定细胞等生物活性特征. 高分子材料的这些生物活性主要是通过高分子材料的表面与组织和细胞之间的相互作用来表现出来的. 因此, 如何模拟细胞外基质(ECM)的结构与性质, 利用各种物理和化学的方法, 对原本生物惰性的有机高分子材料表面进行改性, 使其具有类似于ECM的细胞活性, 是当前生物高分子材料研究的重要课题之一, 对于开展生物降解高分子材料作为细胞培养和靶向药物释放的载体研究具有重要的意义^[2].

氨基是重要的官能团, 它可以通过化学反应进一步与一些肽如精氨酸-甘氨酸-天门冬氨酸(RGD)结合^[3]. 由于RGD是ECM中促进细胞吸附的最小的氨基酸序列和识别单位, 因此通过氨基结合了RGD的高分子材料可以极大地促进细胞在其表面的吸附与生长^[4]. 有两个基本方法可以将氨基引入到高分子材料表面. 一种是目前普遍采用的方法, 先制备高分子材料, 再将氨基引入到材料表面^[5,6]. 如文献^[5]报道将高分子制成微球后, 再将其与己二氨反应以引入氨基. 另一种方法是先合成带氨基的高分子化合物, 然后再组装成高分子材料^[5,7]. 但关键问题是如何控制高分子链上的氨基在高分子材料表面上的分布, 这一点对于发挥高分子材料上氨基的功能至关重要.

已有文献报道用双(三甲基硅)酰胺钾做催化剂来开环聚合环氧乙烷, 可以得到端氨基的聚环

氧乙烷^[8,9]. Tessmar等利用端氨基的聚环氧乙烷做大分子引发剂, 进一步开环聚合丙交酯, 得到了端氨基的嵌段共聚物, 但第二步聚合反应是在辛酸亚锡的催化下进行的^[10]. 本文报道了一个合成路径, 仅以双(三甲基硅)酰胺钾为催化剂, 采用顺序加料的方法, 通过调节反应条件, 合成了端氨基的两亲性嵌段共聚物. 将所制备的共聚物采用水/油/水(W/O/W)二次乳化溶剂挥发法^[11]制备了旨在用于细胞培养微载体、直径从数十到数百微米的微球. 分析了所合成的端氨基的嵌段共聚物的化学结构, 并研究了聚合物的化学结构对氨基在微球表面的分布以及微球表面形态的影响.

1 实验原料

环氧乙烷(EO, BDH Limited, Poole, England)以氢化钙和氢氧化钾(质量比为1:1)为干燥剂, 蒸馏后在-10℃(冰盐浴中)收集馏分. ϵ -己内酯(Acros)用氢化钙干燥48 h后减压蒸馏. 四氢呋喃(北京北化精细化学品公司, 北化)在金属钠存在下回流3天, 蒸馏备用. 引发剂双(三甲基硅)酰胺钾(Aldrich)、二氯甲烷(北化)以及异硫氰酸罗丹明B(Serva, NY)购后直接使用.

2 端氨基嵌段共聚物的合成及其微球制备

聚合反应在无水无氧和氩气保护下进行. 环氧乙烷单体、四氢呋喃和引发剂双(三甲基硅)酰胺钾首先在40℃和搅拌的条件下反应48 h, 得到无色透明或明黄粘稠的聚环氧乙烷(PEO). 进一步加入一定量的四氢呋喃溶剂和 ϵ -己内酯单体, 在40℃下继续反应4 h, 然后用乙酸/丙酮(V/V=1:9)终止反应, 产物在无水乙醚中沉淀得到白色固体. 所合成聚合物的组成和分子量分别用

Bruker 公司生产的 AV400 核磁共振能谱仪和 Tosoh 公司生产的 HLC-8220 凝胶渗透色谱仪 (GPC) 来表征。

采用二次乳化溶剂挥发法来制备微球。首先聚合物的二氯甲烷溶液与内水相在超声乳化的作用下得到均一乳液,然后通过注射器将所得乳液滴入剧烈搅拌的聚乙烯醇水溶液中,溶剂挥发后得到聚合物微球。将制得的聚合物微球用蒸馏水反复洗涤后冷冻干燥。表面喷金后在 Hitachi 公司生产的 S4300 扫描电镜 (SEM) 下观察微球的表面形态。

3 氨基分析

用共聚焦扫描电子显微镜 (CLSM) (Carl Zeiss 公司生产 LSM510) 来观察高分子链的端氨基在微球表面的分布。首先将高分子链的端氨基与染色剂异硫氰酸罗丹明 B (RBITC) 在丙酮中反应,通过

化学键结合将嵌段聚合物染色,然后采用同样的二次乳化溶剂挥发法制备高分子微球,共聚焦扫描电子显微镜观察到的微球上的荧光光强分布,可以表示氨基在微球上的分布。

所合成的嵌段共聚物链上的端氨基则采用 AV400 核磁共振仪来确认。

4 端氨基嵌段共聚物的合成与表征

图 1 为聚合反应路线,引发剂双(三甲基硅)酰胺钾将环氧乙烷 (EO) 开环聚合后,如果用酸处理,就可以得到一端为氨基,一端为羟基的聚环氧乙烷 $\text{H}_2\text{N}-\text{PEO}-\text{OH}$ (图 1 中产物 I)。本工作中,不用酸处理,而是直接加入第二单体 ϵ -己内酯 (CL),聚合反应后再用酸处理,就可以得到两亲性的 PEO-*b*-PCL 两嵌段共聚物 (图 1 中产物 II),其中亲水的 PEO 嵌段的端基为氨基 NH_2 ,而疏水的 PCL 嵌段的端基为羟基 OH 。

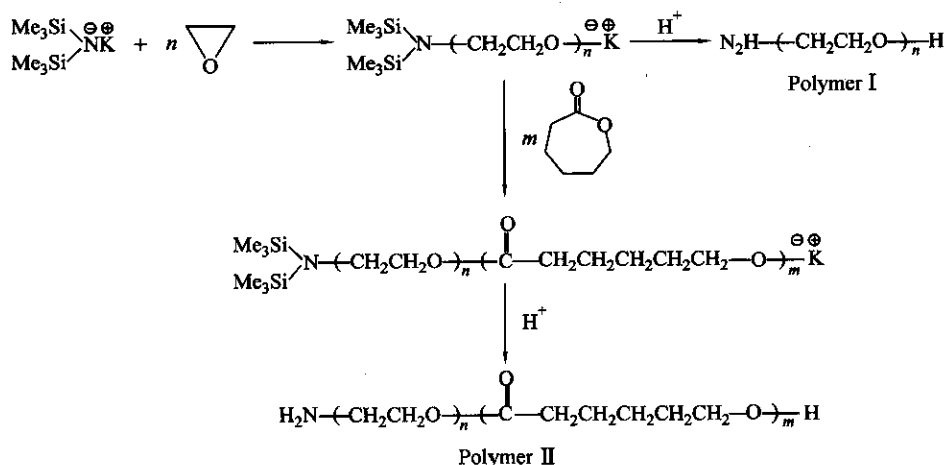


Fig. 1 Reaction scheme of the polymers with functional amino end-group

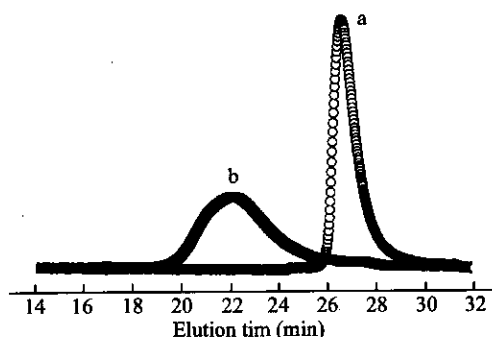


Fig. 2 Typical GPC traces of PEO prepolymer and PCL-*b*-PEO block copolymer

a) PEO, $M_n = 4000$, $M_w/M_n = 1.1$; b) PCL-*b*-PEO, $M_n = 3.03 \times 10^4$, $M_w/M_n = 1.9$

为了确定第一步 EO 开环聚合所得 PEO 预聚

物能继续引发第 2 单体 CL,用 GPC 分别分析了两步反应所得的聚合产物的分子量及其分布,结果如图 2 所示。可以发现,PEO 预聚物和 PEO-*b*-PCL 共聚物分子量均具有较窄的分布,而且 PEO 预聚物在加入第 2 单体 CL 反应后,聚合物的分子量向高分子量区域移动。结合下面的核磁分析结果,说明根据图 1 合成路线所得的聚合物确为嵌段共聚物。

在图 1 所示的聚合反应中,一方面共聚物中两个嵌段 PEO 和 PCL 的分子量均可以通过改变相应单体与引发剂的摩尔比来调控,以 PEO 嵌段为例,表 1 的结果表明,PEO 的分子量随着单体与引发剂摩尔比的升高而增大。

Table 1 Controlled polymerization of varied molecule weight PEO

Reaction time (h)	^a [EO]/[I] (mol/mol)	M_n		^d M_w/M_n
		^b Theoretical	^c Experimental	
24	25	1100	N.D.	N.D.
48	50	2200	3200	1.25
72	100	4400	4700	1.32

^a[EO] and [I] are the concentrations of ethylene oxide and initiator potassium bis(trimethylsilyl)amide ($[(CH_3)_3Si]_2NK$), respectively; ^b The number-average molecular weight M_n calculated from the molar ratio of monomer to initiator in feed; ^c M_n determined by GPC with narrow distributed polystyrene as standard; ^d M_w/M_n is the molecular weight distribution determined by GPC. [EO] = 0.98 mol/L; Reaction temperature, 40°C

另一方面,可以通过改变两个单体的摩尔配比来调控 PEO-*b*-PCL 两嵌段共聚物的化学组成.表 2 是通过改变反应配比中 EO 和 CL 两个单体

的浓度来调节最终共聚物组成的聚合反应结果.反应前 CL 与 EO 的摩尔比分别为 2.0、4.0 和 7.9,反应后用核磁分析共聚物中两个组分含量的摩尔比分别对应为 2.0、4.8 和 7.7,两个组分的摩尔比与投料中两个单体的摩尔比基本吻合,说明聚合反应是一个可控的聚合反应.从所制备共聚物的 GPC 结果来看,共聚物分子量在 2×10^4 以下,分子量分布较窄,在 2.0 以内,但当分子量达到 3×10^4 或更高,分子量分布变宽,其原因主要在于阴离子引发剂对 CL 单体的开环聚合具有很高的活性,聚合反应中体系黏度迅速增大,使链活性端的运动受限,分布不匀,从而导致分子量分布加宽,这一现象在 CL 单体浓度较高时尤为明显.

Table 2 Reaction conditions and results of the copolymerization of CL and EO with potassium bis(trimethylsilyl)amide ($[(CH_3)_3Si]_2NK$) as an initiator

[M] (mol/L)		[M]/[I] (mol/mol)		[CL]/[EO] (mol/mol)		^c $M_n \times 10^{-3} (M_w/M_n)$
[EO]	[CL]	EO	CL	^a Theoretical	^b Experimental	
0.98	1.93	50	100	2.0	2.0	7.2(1.4)
1.61	6.41	50	200	4.0	4.8	19.8(1.8)
0.94	7.43	50	400	7.9	7.7	28.2(3.2)

^a Calculated from the ratio of added monomer to initiator in feed; ^b Determined from the spectra of ¹H-NMR; ^c Number-average molecular weight M_n determined by GPC; The numbers in parentheses are the molecular weight distribution.

5 嵌段共聚物链上端氨基的确认

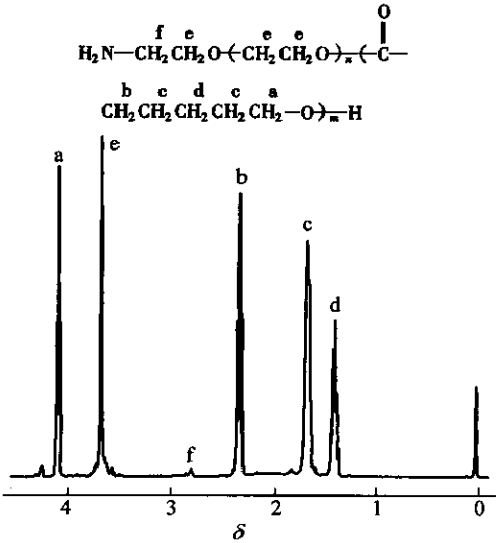
图 3 为所制备的 PEO-*b*-PCL 两嵌段共聚物的 ¹H-NMR 谱图.共聚物中 PEO 嵌段上的亚甲基上的氢原子的信号峰在 $\delta = 3.6$ 附近,而在 $\delta = 2.8$ 附近的信号峰则来自于与氨基相连的 PEO 嵌段上的亚甲基上的氢原子,这一结果与文献中的 H₂N-PEO-OH 的 ¹H-NMR 结果是一致的^[10],说明氨基 NH₂ 确实连接在 PEO 嵌段的末端.氨基上的氢的 NMR 信号峰应在 $\delta = 2.3$ 附近,但该峰因与 PCL 嵌段中亚甲基上的氢原子峰相重合而被掩盖.以上结果证实,采用本文的合成方法所制备的 PEO-*b*-PCL 两嵌段共聚物,氨基是连接在 PEO 嵌段的末端.

6 氨基在分子微球上的分布

本文的研究目的是采用分子工程的方法来控制氨基在分子微球表面的分布.上述研究已表明氨基已接到高分子的链端.当我们采用二次乳化溶剂挥发的方法来制备分子微球时,氨基是否分布在微球的表面仍需要进一步的实验证明.

图 4(a)是将 H₂N-PEO-*b*-PCL-OH 两嵌段共聚物的端氨基接上荧光指示剂异硫氰酸罗丹明 B 后制备的微球的共聚物显微照片.利用共聚物显微照片可以对样品进行光学切片的特点,得到

Fig. 3 ¹H-NMR spectra of H₂N-PEO-*b*-PCL-OH ($M_n = 8600$)



了荧光在微球 Z 轴上各个切片上的分布.由于荧光基团与氨基化学键合,荧光的分布可以代表氨基的分布.图 4(a)结果清楚表明微球的表面有强烈的荧光,说明氨基主要分布在微球的表面,这是因为制备微球的二次乳化是一个油相(聚合物的二氯甲烷溶液)分散到水相中的过程,在溶剂挥发和聚合物微球形成的过程中,亲水的氨基在外水

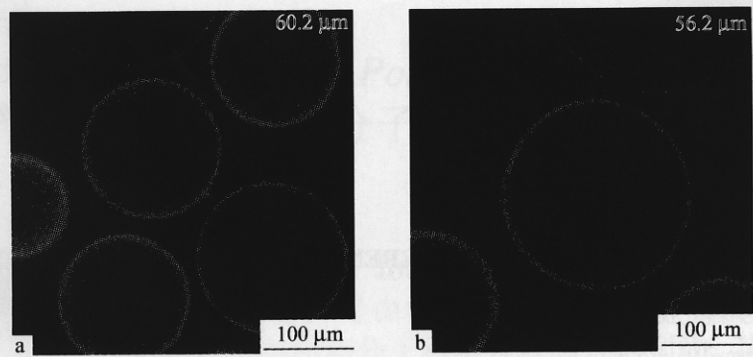


Fig. 4 Typical confocal laser scanning microscopy photographs of polymeric microspheres
a) Microspheres prepared from PCL_{23K}-PEO_{1K}-NH-RBITC; b) Microspheres prepared from PCL-NH-RBITC; The number on the right-top of each picture denotes the coordinate of slice on z-axes

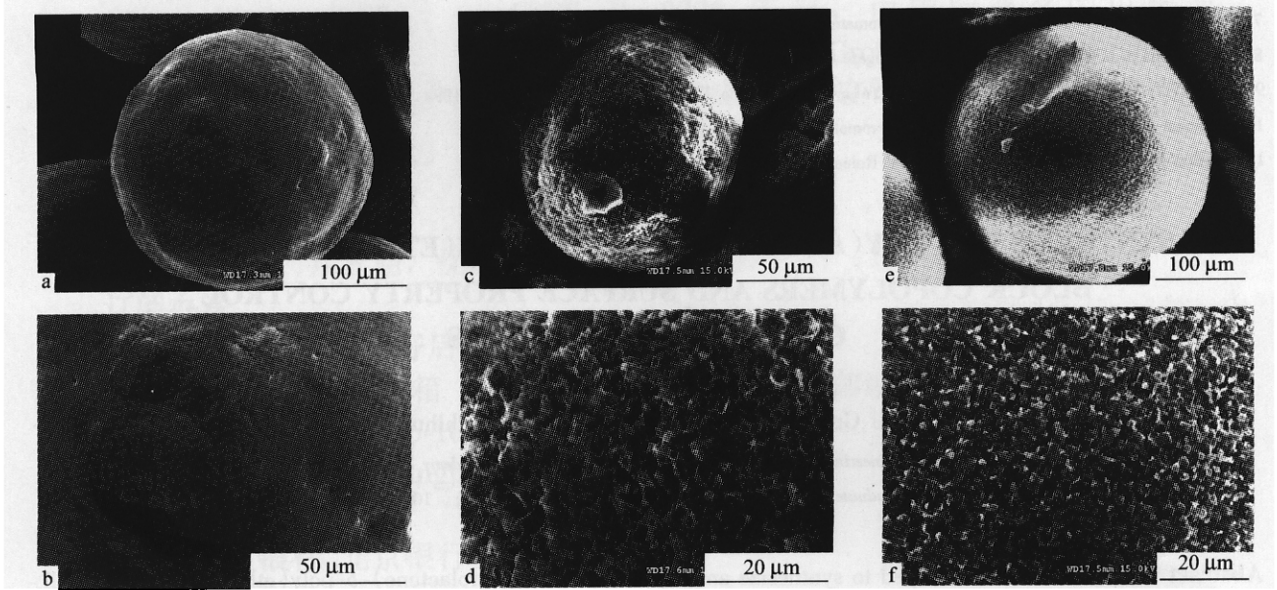


Fig. 5 SEM pictures of microspheres made of PCL-*b*-PEO copolymers with different compositions
a, b) PCL; c, d) PCL_{23K}-*b*-PEO_{2K}; e, f) PCL_{23K}-*b*-PEO_{4K}

相的作用下,主要分布在微球的表面.

7 PEO 嵌段对微球表面性质的影响

为了证明聚合物链端的氨基在微球表面的分布是否与共聚物中亲水的 PEO 嵌段有关,我们合成了不含 PEO 嵌段的端氨基的聚己内酯均聚物 H₂N-PCL-OH,用荧光标记并制成微球后用共聚焦显微镜观察的结果如图 4(b)所示.微球表面强烈的荧光说明氨基依然主要分布在微球的表面.由于荧光指示剂异硫氰酸罗丹明 B 难溶于水,因此氨基在微球表面的分布,主要是由于氨基本身的亲水性所导致的,但 PEO 嵌段的存在是否有利于促进氨基在微球表面的富集,尚有待于对表面氨基浓度进一步的定量研究.另一方面,PEO 嵌段对微球的表面形貌有很大的影响.图 5 是 H₂N-PCL-OH 均聚物和 H₂N-PEO-*b*-PCL-OH 两嵌段共聚物

微球表面形貌的扫描电镜图.均聚物微球表面有些起伏和孔洞,但总体较为平滑(图 5a, b).而嵌段共聚物微球随亲水性 PEO 组分含量的增大,其表面形貌出现明显的泡状(图 5c, d)和毛刺状(图 5e, f).形成如上形貌的主要原因是由于亲水性 PEO 链段在微球表面富集,结合了大量水,在冷冻干燥过程中,水分挥发出去,形成了微泡和毛刺状的形貌结构.这一结果说明调控亲水性 PEO 组分比例可以得到不同表面形貌与性质的聚合物微球.此外,共聚物中 PEO 嵌段的引入,还可以改善微球表面的亲水性.在 高分子微球用作细胞生长的微载体时,微球表面亲水的 PEO 层有利于细胞生长所需要的营养物质的输送.

综上所述,采用本文所报道的合成方法可以直接得到含亲水性组分及官能团氨基的 NH₂-

PEO-*b*-PCL-OH 嵌段共聚物,以端氨基的共聚物为基质,采用二次乳化溶剂挥发法所制备的微球,官能团氨基主要分布在微球的表面,改变亲水性嵌段 PEO 的含量,可以进一步调节微球的表面形

态.所报道的生物降解高分子微球表面性质的调控方法,为进一步通过氨基化学键合生物活性大分子、实现生物降解高分子微球表面的仿生功能奠定了基础.

REFERENCES

- 1 Hench L L, Polak J M T. *Science*, 2002, 295: 1014 ~ 1017
- 2 Langer R, Tirrell D A. *Nature*, 2004, 428: 487 ~ 492
- 3 Cook, A D, Hrkach J S, Gao, N N, Johnson I M, Pajvani U B, Cannizzaro S M, Langer R. *J Biomed Mater Res*, 1997, 35: 513 ~ 523
- 4 Hersel U, Dahmen C, Kessler H. *Biomaterials*, 2003, 24: 4385 ~ 4415
- 5 Hong Y, Gao C, Xie Y, Gong Y, Shen J. *Biomaterials*, 2005, 26: 6305 ~ 6313
- 6 Hu Y, Winn S R, Krajchich I, Hollinger J O. *J Biomed Mater Res*, 2003, 64A: 583 ~ 590
- 7 Yoon J J, Song S H, Lee D S, Park T G. *Biomaterials*, 2004, 25: 5613 ~ 5620
- 8 Yokoyama M, Okano T, Sakurai Y. *Bioconjugate Chemistry*, 1992, 3: 275 ~ 276
- 9 Kim Y J, Nagasaki Y, Kataoka K, Kato M, Yokoyama M, Okano T, Sakurai Y. *Polymer Bulletin*, 1994, 33: 1 ~ 6
- 10 Tessmar J K, Mikos A, Güpferich A. *Biomacromolecules*, 2002, 3: 194 ~ 200
- 11 Freitas S, Merkle H P, Gander B. *J Control Release*, 2005, 102: 313 ~ 332

SYNTHESIS OF POLY(ϵ -CAPROLACTONE)/POLY(ETHYLENE GLYCOL) BLOCK COPOLYMERS AND SURFACE PROPERTY CONTROL OF THEIR MICROSPHERES

YU Guoqiang^{1,2}, SHI Xudong^{1,2}, GAN Zhihua¹

(¹ CAS Key Laboratory of Engineering Plastics, Institute of Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

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

Abstract A method was developed to synthesize amphiphilic poly(ϵ -caprolactone)-*b*-poly(ethylene glycol) (PCL-*b*-PEO) block copolymers with well-defined structure and with functional amino end-group connected to the PEO block. The molecular weight, composition and chain structure of the resultant copolymers were characterized by GPC and ¹H-NMR. The microspheres of the copolymers were prepared by W/O/W double emulsion solvent evaporation method. The analysis results by confocal laser scanning microscopy indicate that the amino groups are distributed dominantly on the surface of microspheres due to the hydrophilic property of amino groups and the formation process of microspheres in aqueous phase. The surface morphology of microspheres could be regulated by changing the composition of block copolymers. The results of this work indicate that the surface properties of the microspheres can be controlled by polymer chain structure, and that the microspheres with amino group located on the surface can be further conjugated with peptide such as RGD. Therefore, these microspheres are promising materials as microcarriers for promoting cell growth.

Key words Biodegradable polymers, Functional amino end-group, Microspheres, Surface properties