

聚(L-丙氨酸-co-羟丙-L-谷氨酰胺)无规共聚物的 两亲性及其胶束行为研究*

张 洁 伍国琳** 王 铮 徐 旭 王亦农 马建标

(南开大学高分子化学研究所 功能高分子材料重点实验室 天津 300071)

摘 要 采用丙氨酸作为疏水聚合单体,谷氨酸作为亲水聚合单体,一步开环聚合反应,合成了具有两亲性的聚氨基酸无规共聚物.利用 IR, $^1\text{H-NMR}$ 等方法对所合成的聚合物进行了详细的表征,结果表明两种单体都能够按照投料比参加聚合反应生成无规共聚物.对比聚丙氨酸-聚羟丙谷氨酰胺嵌段共聚物,探讨了无规共聚物与嵌段共聚物在两亲性及结构性质上的差异和特点.研究表明,聚(L-丙氨酸-co-羟丙-L-谷氨酰胺)无规共聚物与嵌段共聚物一样,具有两亲性,在水溶液中也能够形成胶束,但胶束尺寸较嵌段共聚物要小,胶束形态也不像嵌段共聚物是规整的球形.实验发现,亲疏水单体的比例对胶束的形成有很大影响, $\text{P}(\text{A}_{10}\text{-co-HPG}_{40})$ 所制得的胶束分散最为均匀.所形成的胶束以疏水的聚丙氨酸为内核,亲水的聚羟丙谷氨酰胺为外壳.

关键词 聚氨基酸, 谷氨酸, 丙氨酸, 开环聚合, 胶束

聚氨基酸是一类新型的生物降解材料,被广泛用于医学领域.它具有良好的生物相容性,对生物体无毒、无副作用、无免疫源性,并可通过体内的水解或酶解反应最终降解为小分子的氨基酸,被人体吸收或排出体外.聚氨基酸材料在医学领域如药物控释^[1~3]、组织工程^[4,5]等方面有着广泛的应用.近年来,利用双亲性嵌段共聚物制备纳米胶束作为脂溶性药物和基因的投递和释放载体的研究取得了很大的进展.目前研究的双亲性高分子材料大都是由较长的亲水链段和疏水链段接枝或嵌段形成.大多数双亲共聚物的结构具有以下规律,亲水嵌段多为具有生物相容的共聚物聚乙二醇、聚氧化乙烯、聚乙烯吡咯烷酮等形成亲水性外壳.疏水嵌段由聚环氧丙烷、聚苄基天门冬氨酸、聚苄基谷氨酸、聚 ϵ -己内酯、聚乳酸、精胺等组成,长链脂肪酰基也可作内核,起包埋作用.也可用不可降解的聚苯乙烯、聚异丙基丙烯酸酯等作为疏水嵌段^[6,7].聚合物的疏水部分聚集在胶束的内核,通过化学或物理的作用将药物包裹其中,而亲水部分则聚集在胶束外表面形成栅栏状结构以保持胶束的稳定.正由于这种稳定的结构,胶束的释放过程缓慢,可以保持药物的长效缓释和靶向部位的集中释放. Kwon 等^[8]通过将聚乙二醇-L-

天冬酰胺化化合物的共聚物制成两性霉素 B 胶束,聚乙二醇端为亲水性外壳,聚氨基酸为内核,过微调共聚物的组成,控制最终产物胶束的结构在直径 30 ~ 50 nm 之间,其在治疗艾滋病的使用上降低毒性,增强了抗毒功能. Yokoyama 制备的聚乙二醇-b-聚天门冬氨酸(PEO-b-PASP)构成的共聚物胶束,粒径为 20 ~ 60 nm,低于被网状内皮系统(RES)所识别的临界颗粒(100 nm),可使药物在血中停留时间延长,其与抗癌药物多柔比星(ADR)结合的 PEO-P(ASP-AR)在血循环中的半衰期为 70 min,可更有效到达靶位,对 P388 白血病及实体瘤有很强的活性,从而达到一定的抗癌作用^[9,10]. 本课题组长期以来对于两亲性聚氨基酸类嵌段共聚物也进行了深入的研究^[11~16].然而,此类聚合物往往需要较为复杂的合成步骤,造成合成的目标产物产率很低,不利于大规模的生产和应用,限制了此类材料的进一步开发利用.最近,人们发现某些由亲水和疏水单体无规共聚而成的聚合物同样具有两亲性^[17~19]. Khokhlov 等合成了由疏水性单体和极性单体组成的无规共聚物.研究发现,此共聚物可以自聚成球体胶束结构,其中疏水单体处于内核,而极性单体处于外壳部分^[17]. Khokhlov 称之为“proteinlike”共聚物. Yan 等也发现无规共

* 2008-10-27 收稿,2009-02-16 修稿.天津市自然科学基金(基金号 09JCYBJC03400)资助项目和国家重点基础研究发展计划(973 计划前期研究专项,项目号 2009CB626612)资助;** 通讯联系人, E-mail: guolinwu@hotmail.com

聚物聚(苯乙烯-*co*-丙烯酰胺),具有很好的两亲性,并利用 DSL 和 AFM 研究了其溶液中自组装结构及胶束结构的形成,并且讨论了溶剂对聚集态结构结构和尺寸的影响^[18]. 陈树森等通过疏水性的脂肪族二元酸和亲水性的二元醇聚合,合成了一系列新型聚酯 $\text{HO}[(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{COO}]_x\text{H}$. 在该类聚合物中,主链是由短的亲水链段和短的疏水链段交替连接构成的,也能够呈现两亲性材料的特征^[19]. 此类无规共聚物与嵌段共聚物相比,具有合成步骤少,操作简单,可调节性高,适用范围广等优点,是嵌段共聚物很好的替代材料.

丙氨酸(alanine)的侧基为一个甲基(CH_3 —),是结构最简单的含疏水侧链的天然氨基酸. 聚丙氨酸、聚谷氨酸苄酯^[20]具有良好的生物相容性和生物可降解性,但水溶性差,反应活性也不高,不宜直接作为高分子键合药物的载体. 本文以聚(L-丙氨酸-*co*-L-谷氨酸苄酯)无规共聚物为原料,用丙醇胺对聚谷氨酸苄酯链段进行氨解^[21,22]得到水溶性良好、反应活性较高的聚(L-丙氨酸-*co*-羟丙-L-谷氨酰胺)无规共聚物. 此聚合物合成方法简单,合成步骤少,可控性很强.

1 实验部分

1.1 主要原料

L-谷氨酸, L-丙氨酸(生化试剂,北京新经科生物技术公司,室温真空干燥),三聚光气(化学纯,威海燕威橡塑公司),正丙胺,正丁胺(分析纯,上海试剂三厂,氯化钙回流干燥),3-氨基丙醇(AR,天津化学试剂三厂). L-谷氨酸苄酯(BLG),参考文献[23]进行,白色片状固体,产率 24.3%, mp 为 172 ~ 173 °C (文献值 173 ~ 175 °C^[21]). 谷氨酸苄酯-*N* 羧酸酐(BLG-NCA)与丙氨酸-NCA(A-NCA),参考文献[24]进行. BLG-NCA 产率 51%, mp 为 89.3 °C, A-NCA 产率 20%, mp 为 90.6 °C. 结果显示两种物质的熔点与文献中的基本一致^[22,23].

1.2 聚(L-丙氨酸-*co*-L-谷氨酸苄酯)无规共聚物(P(A-*co*-BLG))的合成

参考文献[25],在反应瓶中加入 A-NCA/BLG-NCA 摩尔比分别为 10:10,10:20,10:40,10:80 的混合物,反复通 N_2 抽真空. 再加入纯化后的二氧六环-苯液(20:80). 按引发比例用微量注射器加

入引发剂正丙胺. N_2 保护下反应 48 h,反应物变成白色胶状黏稠溶液. 过量的无水乙醚中沉淀,过滤,用乙醇、乙醚反复洗涤,得到白色纤维状固体产物.

1.3 聚(L-丙氨酸-*co*-羟丙-L-谷氨酰胺)无规共聚物(P(A-*co*-HPG))的合成

参考文献[26],利用 3-氨基丙醇,60 °C 下对 P(A-*co*-BLG)进行氨解反应. 产物用蒸馏水透析 48 h,过滤,液体通过冷冻干燥,得到白色固体,产率约为 50% ~ 60%.

1.4 聚 L-丙氨酸-聚羟丙-L-谷氨酰胺嵌段共聚物(PA-*b*-PHPG)的合成

在反应瓶内将一定量新制备的 A-NCA 溶于二氧六环-苯液(20:80)中(单体浓度 2%),加入计量的正丙胺. 在 25 °C、 N_2 保护下反应 24 h,反应物变成无色黏稠溶液. 取少量反应液滴在 KBr 晶片上,用 IR 检测 NCA 聚合反应是否完全. 再加入计量的 BLG-NCA 二氧六环-苯溶液(浓度 2%),在 25 °C、 N_2 保护下反应 36 h. 形成的无色黏稠溶液倒入过量的无水乙醚中,有沉淀生成. 3 °C 下静置过夜,过滤,用乙醚、乙醇反复洗涤,干燥得到白色纤维状固体. 利用 3-氨基丙醇氨解.

1.5 测试与表征

1.5.1 红外光谱测定 样品与 KBr 粉末研磨制片,采用 Bio-Rad FTS 6000 傅立叶红外光谱仪测定.

1.5.2 $^1\text{H-NMR}$ 测定 使用 Varian UNITY Plus-400 核磁共振谱仪,以 D_2O 或 CF_3COOD 为溶剂,室温下测定 $^1\text{H-NMR}$ 谱.

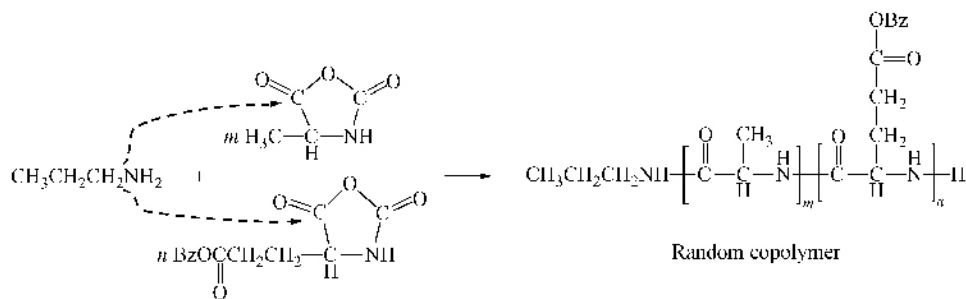
1.5.3 透射电子显微镜(TEM)测定 将 P(A-*co*-HPG), PA-*b*-PHPG 溶于 CF_3COOH 中,在去离子水中透析 48 h 后配制成 5×10^{-5} g/mL 的水溶液,将溶液滴在铜网上,在 Tecnai G220 Stwin 透射电子显微镜(TEM)上观测胶束的形态结构,加速电压为 200 kV.

2 结果与讨论

2.1 P(A-*co*-BLG)的合成

P(A-*co*-BLG)的合成路线图如示意图 1 所示.

由所合成的无规共聚物 $\text{P}(\text{A}_{10}\text{-co-BLG}_{40})$ 与单体间的红外数据可以确定两种单体都参与了聚合反应,在共聚物中都以聚合物的形态存在.



Scheme 1 Diagrams of the preparation of P(A-co-BLG)

聚合反应按照共混单体不同投料比进行,分别是 A-NCA : BLG-NCA 为 10 : 10, 10 : 20, 10 : 40, 10 : 80. 图 1 是 P(A_{10-co}-BLG₁₀), P(A_{10-co}-BLG₂₀), P(A_{10-co}-BLG₄₀) 和 P(A_{10-co}-BLG₈₀) 的氢核磁谱图. 从核磁谱图上可以确定 A-NCA 和 BLG-NCA 均参加了反应. 通过端基正丙胺的 ω -CH₃ 的信号峰 ($\delta = 0.95$) 和丙氨酸单元中 β 位甲基的信号峰 ($\delta = 1.5$) 及谷氨酸苄酯单元中苄基上 CH₂ 信号峰 ($\delta = 5.20$) 积分面积比计算出丙氨酸及谷氨酸苄酯的聚合度, 分别为 12 : 9, 12 : 20, 10 : 38, 8 : 70 与投料比大致相同, 说明混和单体后能够按引发比例进行开环反应且基本引发反应完全.

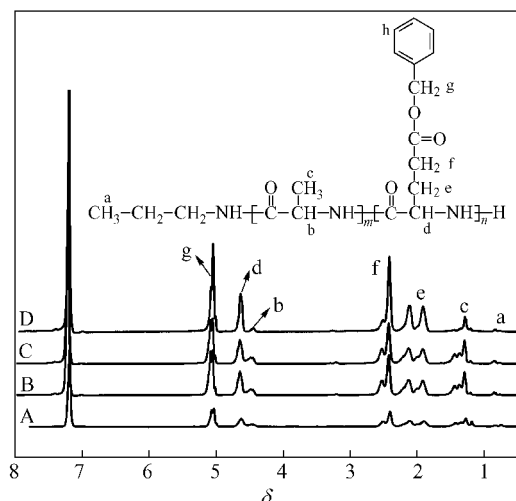


Fig. 1 ¹H-NMR of P(A_{10-co}-BLG₁₀) (A), P(A_{10-co}-BLG₂₀) (B), P(A_{10-co}-BLG₄₀) (C) and P(A_{10-co}-BLG₈₀) (D) in CF₃COOD

图 2 是 L-丙氨酸与 L-谷氨酸苄酯的无规共聚物 P(A_{10-co}-BLG₁₀) 与嵌段共聚物 PA_{10-b}-PBLG₁₀ 的核磁谱图对比, 从谱图上可以看出无规共聚物中丙氨酸 β 位甲基质子峰(c)和谷氨酸 γ 位亚甲基质子峰(f)较嵌段共聚物均发生了更多的分裂, 这是由于在无规共聚物中交替单体链段长短不

同, 这些基团处于多种不同的化学环境造成的. 无规共聚物较嵌段共聚物具有更加复杂的化学结构.

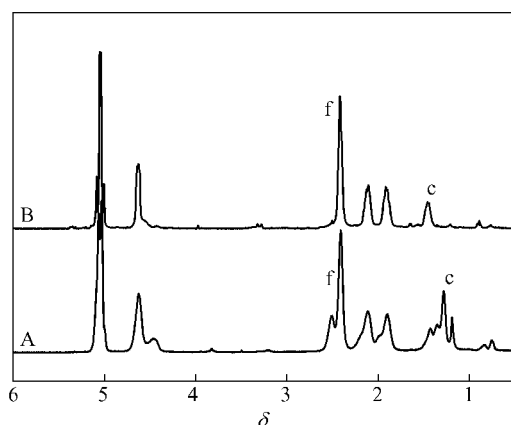


Fig. 2 ¹H-NMR of P(A_{10-co}-BLG₁₀) (A) and PA_{10-b}-PBLG₁₀ (B) in CF₃COOD

2.2 P(A-co-HPG)的合成

示意图 2 是 P(A-co-BLG) 的氨解反应. 图 3 是聚(L-丙氨酸-co-L-谷氨酸苄酯)无规共聚物氨解后产物(P(A_{10-co}-HPG₁₀))的核磁谱图, 从谱图上可以清楚地找出氨解后各特征峰的信号, 在 $\delta = 7.4$ 处已经看不到苯环上质子峰, 说明氨解脱苄很充分. 氨解后的聚合物在峰形上更为规整和尖锐, 这是由于氨解产物在溶剂中溶解性更好, 链运动更加自由, 同时通过透析除去了产物中低分子量的聚合物和杂质.

图 4 中 P(A-co-BLG) 的红外光谱在 1737 cm⁻¹ 苄酯的酯羰基的伸缩振动吸收峰, 754 cm⁻¹, 697 cm⁻¹ 的苯环面内变形振动吸收峰, 胺解脱苄后, 在 P(A-co-HPG) 的红外谱图中基本消失. 1655、1540 cm⁻¹ 酰胺 I 带、酰胺 II 带的吸收峰仍然存在, 同时, 在 3300 cm⁻¹ 附近出较强的羟基吸收峰. 核磁和红外数据充分说明了氨解反应的进行, 确定了目标产物的结构.

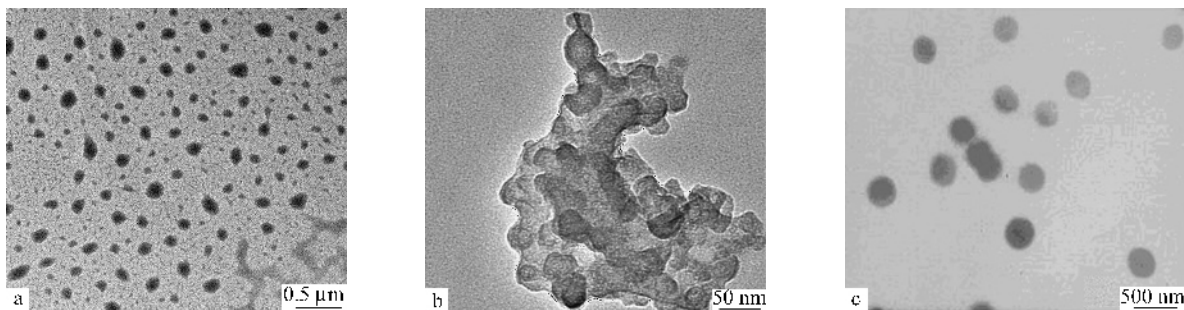


Fig. 5 TEM Images of $P(A_{10}\text{-}co\text{-}HPG_{40})$ (a), (b) and $PA_{10}\text{-}b\text{-}PHPG_{40}$ (c)

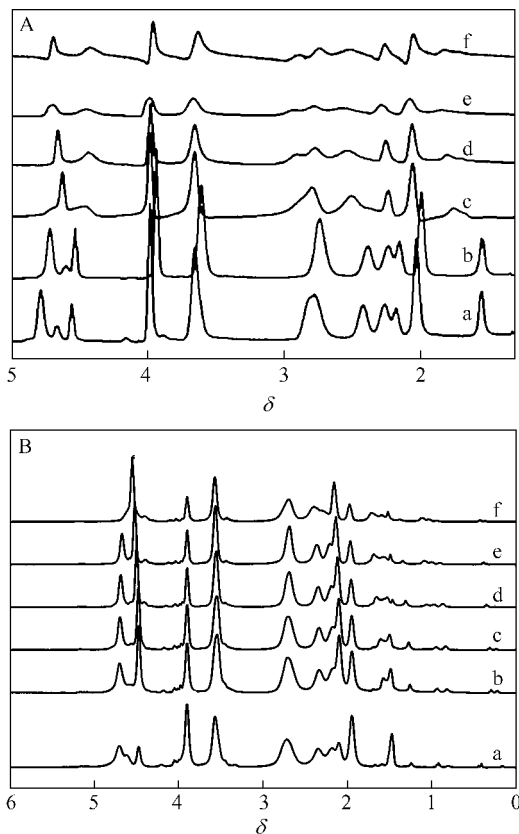


Fig. 6 $^1\text{H-NMR}$ spectra of 2.085 mg $P(A_{10}\text{-}co\text{-}HPG_{40})$ (A) and $PA_{10}\text{-}b\text{-}PHPG_{40}$ (B) in different amount of solvent

a) 0.5 mL CF_3COOD ;b) 0.5 mL CF_3COOD + 0.04 mL D_2O ;c) 0.5 mL CF_3COOD + 0.08 mL D_2O ;d) 0.5 mL CF_3COOD + 0.12 mL D_2O ;e) 0.5 mL CF_3COOD + 0.28 mL D_2O ;f) 0.5 mL CF_3COOD + 0.40 mL D_2O

示,相同条件下嵌段共聚物 $PA_{10}\text{-}b\text{-}PHPG_{40}$ 在选择性溶剂氘代水中自组装形成胶束的过程中,聚丙氨酸链段同样发生聚集,形成胶束.所不同的是在 $PA_{10}\text{-}b\text{-}PHPG_{40}$ 中,随着氘代水的加入,聚羟丙谷氨酰胺的信号峰对溶剂环境的变化并没有明显的反应,这是因为聚羟丙谷氨酰胺链段处于在胶束的

外部,且氘代水对于聚羟丙谷氨酰胺是良溶剂,始终处于伸张状态,所以没有明显的变化.然而,在 $P(A_{10}\text{-}co\text{-}HPG_{40})$ 的图中可以明显看到聚羟丙谷氨酰胺的信号随着氘代水的加入也发生了明显的变化,随着加入氘代水体积百分数的增加聚羟丙谷氨酰胺链段的质子峰也有变宽的现象.这是因为聚羟丙谷氨酰胺链段与聚丙氨酸链段处于无规交替的状态,随着加入氘代水体积百分数的增加,聚丙氨酸链段发生聚集的同时影响了聚羟丙谷氨酰胺的运动和旋转,使其无法自由伸展,造成羟丙谷氨酰胺链段的质子峰也出现了变宽的现象.核磁共振实验的结果证明了聚合物自聚集的发生.同时确定了形成胶束的结构.疏水的聚丙氨酸链段聚集形成胶束的内核而亲水的聚羟丙谷氨酰胺链段则形成胶束的外壳.

结果表明聚(L-丙氨酸-co-羟丙-L-谷氨酰胺)无规共聚物在水溶液中也能够形成胶束,其中亲疏水单体的比例对胶束的形成有很大影响,相对于疏水部分的丙氨酸单体,羟丙谷氨酰胺的含量要远大于它才能在水中形成胶束.但也绝非含量越高越好,亲水部分与疏水部分之间有个最佳的比例关系.在本实验中 $P(A_{10}\text{-}co\text{-}HPG_{40})$ 所制得的胶束分散最为均匀.相同单体比例的无规共聚物所形成的胶束粒子比嵌段共聚物要小.

3 结论

聚(L-丙氨酸-co-羟丙-L-谷氨酰胺)无规共聚物与嵌段共聚物一样,具有两亲性,在水溶液中也能够形成胶束,但胶束尺寸较嵌段共聚物要小.研究表明亲疏水单体的比例对胶束的形成有很大影响, $P(A_{10}\text{-}co\text{-}HPG_{40})$ 所制得的胶束分散最为均匀.所形成的胶束以疏水的聚丙氨酸为内核,亲水的聚羟丙谷氨酰胺为外壳.

REFERENCES

1 Yu B G,Okano T.J Control Release,1998,53 :131 ~ 136

2 Yu L,Kwon G S. Pharm Res,2000,17(5) :607 ~ 611

3 Okamo T,Sakurai Y.J Control Release,2000,64 :143 ~ 153

4 Lescure F,Gurny R.J Biomed Mater Res,1989,23 :1299 ~ 1313

5 Kim H J,Choi E Y. Biomaterials,2000,21 :131 ~ 141

6 Wu Shangang(伍善广),Yang Fan(杨帆),Wu Hemou(吴和谋),Situ Meizhen(司徒美珍). Journal of Modern Food and Pharmaceuticals(现代食品与药品杂志),2007,17(2) :14 ~ 17

7 Xu Xu(徐旭),Wu Guolin(伍国琳),Zhang Jie(张洁),Wang Yinong(王亦农),Fan Yunge(范云鸽),MA Jianbiao(马建标). Chem J Chinese Universities(高等学校化学学报),2008,66 :1102 ~ 1106

8 Kwon G S. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst,2003,20(5) :357 ~ 403

9 Yokoyama M,Okano T,Sakurai Y. Cancer Res,1991,51 :3229 ~ 3236

10 Yokoyama M,Kwon G S,Okano T. Drug Delivery,1993,1 :11 ~ 19

11 Zhang Guolin(张国林),Ma Jianbiao(马建标),Wang Yinong(王亦农). Polymer Materials Science and Engineering(高分子材料科学与工程),2006,22(3) :50 ~ 53

12 Zhang Guolin(张国林),Ma Jianbiao(马建标),Wang Yinong(王亦农). Polymer Materials Science and Engineering(高分子材料科学与工程),2006,22(3) :159 ~ 166

13 Zhang Guolin(张国林),Ma Jianbiao(马建标),Wang Yinong(王亦农). Chem J Chinese Universities(高等学校化学学报),2006,27(4) :767 ~ 770

14 Zhang Guolin(张国林),Wu Qiu Hua(吴秋华),Pan Tong(潘彤),Ma Jianbiao(马建标). Acta Polymerica Sinica(高分子学报),2004,(2) :223 ~ 227

15 Wu Guolin(伍国琳),Sun Pingchuan(孙平川),Ma Jianbiao(马建标). Chem J Chinese Universities(高等学校化学学报),2003,24(8) :1515 ~ 1518

16 Wu Guolin(伍国琳),Sun Pingchuan(孙平川),Zhang Guolin(张国林),Ma Jianbiao(马建标). Chinese Journal of Magnetic Resonance(波谱学杂志),2003,20(1) :1 ~ 7

17 Kuchanov S I,Khokhlov A R. J Chem Phys,2003,118(10) :4672 ~ 4683

18 Yan L F,Zhang G Z,Liu G M,Ji J,Li W. J Appl Polym Sci,2006,100(5) :3718 ~ 3726

19 Chen Shusen(陈树森),Fan Yunge(范云鸽),Wu Guolin(伍国琳),Wang Yinong(王亦农),Ma Jianbiao(马建标). Acta Polymerica Sinica(高分子学报),2008,(9) :867 ~ 873

20 Zhang Jingxia(张静夏),Pan Shirong(潘仕荣),Wang Qinmei(王琴梅),Feng Min(冯敏),Wu Weirong(吴伟荣). Guangzhou Chemistry(广州化学),2002,27(2) :1 ~ 5

21 Tang Guping(汤谷平),Chen Qiqi(陈启琪). J Biomed Eng(生物医学工程学杂志),1997,14(2) :99 ~ 100

22 Zhu Kalin(朱卡琳),Tang Guping(汤谷平),Chen Qiqi(陈启琪). Acta Pharmaceutica Sinica(药学报),1998,33(12) :906 ~ 909

23 Blout E R. J Am Chem Soc,1956,78 :941 ~ 946

24 William H D,Drew P. Tetrahedron Letters. ,1988,29(46) :5859 ~ 5862

25 Li Liying(李丽颖),Sun Pingchuan(孙平川),Yao Yang(要昶),Chen Tiejong(陈铁红),Li Baohui(李宝会),Jin Qinghua(金庆华),Ding Datong(丁大同). Chem J Chinese Universities(高等学校化学学报),2005,26(8) :1548 ~ 1551

26 Jokei K,Hayashi T,Furuta M,Oka M,Hayashi T. S-I GA,2000,56(2) :98 ~ 103

AMPHIPHILICITY AND MICELLIZATION OF POLY(L-ALANINE-co-5,N-HYDROXYPROPYL-L-GLUTAMINE)

ZHANG Jie, WU Guolin, WANG Zheng, XU Xu, WANG Yinong, MA Jianbiao

(Institute of Polymer Chemistry, Nankai University, Key Laboratory of Functional Polymer Materials, Tianjin 300071)

Abstract Aminolysis was used to improve the hydrophilicity of poly(γ -benzyl-L-glutamate), PBLG. Hydrophobic benzyl side chain groups in PBLG were changed to hydrophilic hydroxyalkyl groups by aminolysis reaction. Poly(L-alanine-co-5,N-hydroxypropyl-L-glutamine), P(A-co-HPG) and poly(L-alanine)-*b*-poly(5,N-hydroxypropyl-L-glutamine), (PA-*b*-PHPG) were synthesized in this paper, both initiated by *n*-propylamine. The structure and basic properties were characterized by IR and $^1\text{H-NMR}$. Both PA-*b*-PHPG and P(A-co-HPG) have the amphiphilic properties, where PA is the hydrophobic part and PHPG is the hydrophilic part. Compared with the block copolymer, the synthesis of random copolymer P(A-co-HPG) was more simple and of high efficiency. At the same time, the micellization processes of PA₁₀-*b*-PHPG₄₀ and P(A₁₀-co-HPG₄₀) were monitored by $^1\text{H-NMR}$. TEM results showed that both PA₁₀-*b*-PHPG₄₀ and P(A₁₀-co-HPG₄₀) could self-assembled into evenly micelles in water. However, the size of the micelles made of random copolymers was smaller than that of block copolymers, and the shape of random copolymer micelles were not regular spheres as micelles made of block copolymer. At the same time, it was found that the ratio between hydrophilic and hydrophobic monomers played a very important role in micelle formation. The most uniform micelle size distribution was observed in P(A₁₀-co-HPG₄₀) micellar solutions.

Keywords Poly(amino acid), Glutamic acid, Alanine, Ring-opening polymerization, Micelle