

侧链为端羧基聚乙二醇的梳形聚氨酯的合成与表征*

武向阳 刘 帅 周晓勇 钟银屏 傅 强 谢兴益**

(四川大学高分子科学与工程学院 成都 610065)

摘 要 以 L-赖氨酸、乙二醇和端羧基聚乙二醇(PEG)为原料合成一种带聚乙二醇侧链的二元胺扩链剂(Lys-NH-PEG),然后以 4,4'-二苯基甲烷二异氰酸酯(MDI)和 Lys-NH-PEG 为硬段,聚碳酸酯二醇(PCD)为软段,制备一种含端羧基聚乙二醇侧链的梳形聚氨酯.对所合成聚氨酯材料进行傅立叶变换红外光谱(FTIR)、氢核磁共振谱($^1\text{H-NMR}$)、凝胶渗透色谱(GPC)测试,测试结果表明得到了目标聚合物.该聚合物能在水中形成胶体,并能化学接枝白蛋白,表明所合成的聚氨酯的 PEG 侧链端羧基具有反应活性.这种具有可反应性的聚氨酯为进一步接枝生物分子以提高生物相容性提供了广阔的空间.

关键词 聚氨酯,聚乙二醇,亲水性改性,白蛋白

聚氨酯(PU)大分子主链一般由异氰酸酯和扩链剂组成的硬段和聚醚或聚酯二元醇组成的软段交替构成,其独特的微相分离结构使之具有较好的力学性能、血液相容性和生物相容性^[1].然而单纯的聚氨酯材料在与血液接触时表面仍会形成血栓.聚乙二醇(PEG)无毒无刺激性,具有良好的亲水性和柔顺性,能抗非特异性蛋白吸附,具有优异的生物相容性.因此,PU 材料表面接枝 PEG^[2~5],并进一步进行生物伪饰或负载抗凝血剂^[6~9],如黏附内皮细胞^[10]、接枝胶原蛋白^[11]和肝素^[12],可大大提高材料的生物相容性.但表面改性一般需要复杂的表面活化技术,如等离子处理等.本体接枝则更方便和有效,张鸿志等^[13]用带 PEG 侧链的扩链剂合成了聚醚聚氨酯,其凝血复钙时间比未接枝 PEG 的聚氨酯延长约 1 倍,抗凝血性显著提高.但是,现有的本体改性技术所得的聚氨酯其 PEG 侧链的端基为甲氧基^[13,14]或磺酸根^[15],不能够与生物分子(如白蛋白)进一步反应.白蛋白具有优良的抗凝血性,白蛋白修饰能大大提高材料的血液相容性^[16].本文合成侧链为端羧基 PEG 的聚碳酸酯聚氨酯,并利用其侧链羧基接枝白蛋白.本文所得到的新型梳形聚氨酯具有可反应的侧链羧基,可为进一步接枝生物活性分子提供反应位点.

1 实验部分

1.1 实验试剂

L-赖氨酸(>98.5%),端羧基聚乙二醇(PEG, $M_n = 600$),4,4'-二苯基甲烷二异氰酸酯(MDI, >99.5%),1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC, 97%)和四甲基异硫氰酸罗达明标记的猪白蛋白(TRITC-Alb)均为 Sigma-Aldrich 公司产品.二环己基碳二亚胺(DCC, >98%)为秦皇岛天华化学试剂经销有限公司产品.*N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS, AR),为成都科龙化工试剂厂产品.乙二醇(>99%)和聚(碳酸-1,6-己二醇)酯二醇(PCD, $M_n = 1000$)为江苏化工研究所有限公司产品.

1.2 合成双叔丁氧羰基-L-赖氨酸乙二醇单酰胺(DiBoc-lys-NH)

N,N'-双叔丁氧羰基-L-赖氨酸(DiBoc-lys)按照文献^[17]所示方法进行制备,如图 1 所示.将 10.5 g DiBoc-lys (30 mmol)溶于 60 mL 四氢呋喃(THF),加入 3.48 g NHS (30 mmol)和 9.3 g DCC (45 mmol),反应过程中产生大量白色沉淀二环己基脲(DCU),2 h 后过滤将滤液滴加到溶有 4.5 g 乙二醇(75 mmol)的 60 mL THF 中,搅拌反应 48 h.抽滤除去 DCU,将 80 mL 近饱和氯化

* 2013-10-31 收稿,2014-01-08 修稿;国家科技部国际科技合作计划项目(项目号 2010DFA31190)资助.

** 通讯联系人,E-mail:xiexingyi@263.net

doi:10.3724/SP.J.1105.2014.13389

钠水溶液加入滤液中,搅拌 0.5 h,分液弃水相,有机相再用食盐水萃取 3 次以除去未反应的乙二醇.有机相中加少量氯化钠以使体系分层,搅拌并滴加盐酸 (pH = 1) 至水相 pH 为 3 左右,继续搅拌至少 1 h.若有白色沉淀产生,则过滤.分液保留水相,加适量氯仿并搅拌,用氢氧化钠溶液调水相 pH 约 11.拌拌 1 h 后静置分层,收集有机相.多次用氯仿萃取水相,合并有机相.无水硫酸钠除水,40 ~ 50 °C 旋蒸除溶剂,真空烘箱 60 °C 烘 24 h,得到黄色固体 5.56 g,产率为 47.2%.

1.3 带羧基聚乙二醇侧链的二元胺 (Lys-NH-PEG) 扩链剂的制备

将 17.34 g PEG (29 mmol) 和 5.61 g DiBoc-

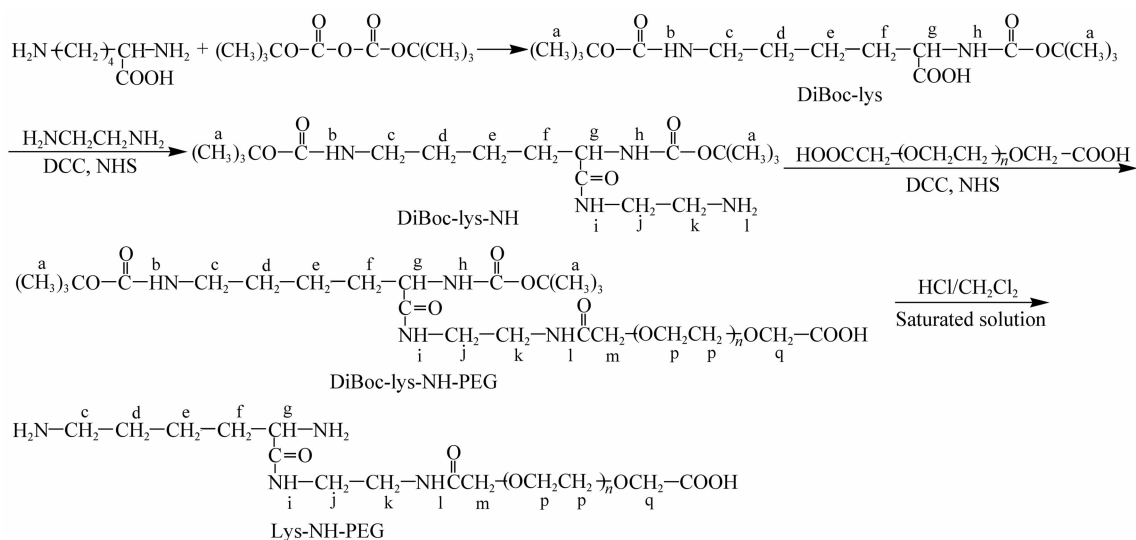


Fig. 1 Synthesis route of Lys-NH-PEG

1.4 侧链为端羧基聚乙二醇的聚氨酯的合成

将 1.16 g Lys-NH-PEG 溶于 10 mL 蒸馏水中,采用文献^[18]方法,测得其氨基含量为 4.11×10^{-5} mol/L,即含 Lys-NH-PEG 为 0.93 mmol,100 °C 蒸发浓缩至 5 mL 备用.

在装有温度计、真空管、搅拌装置的三颈瓶中,加入 10 g PCD (10 mmol),90 ~ 100 °C 条件下真空脱水 2 h.冷却至 60 °C,搅拌下加入 5.5 g MDI (22 mmol),在 50 ~ 60 °C 下真空反应 3 h,得到聚氨酯预聚体.

取预聚体 5.768 g 于三颈瓶中,加入 40 mL THF,室温下搅拌溶解.滴加前述的 Lys-NH-PEG 溶液,反应 10 min.称取 L-lysine 0.408 g (2.79 mmol),溶于 4 mL 等体积混合的水和 THF 中,也滴加到三颈瓶中,反应 20 min 后静置 12 h.加入 100 mL *N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF),将所得聚氨

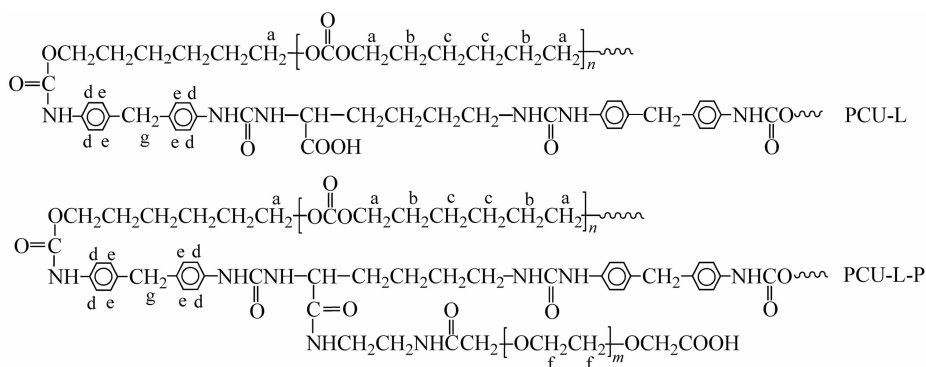
lys-NH (14.5 mmol) 加入 60 mL THF 中,完全溶解后再加入 6.67 g NHS (58 mmol) 和 18 g DCC (87 mmol),搅拌反应 48 h,过滤除去 DCU 沉淀.50 °C 旋干溶剂,将产物溶于 60 mL 氯仿中,然后滴加 0.1 mol/L 盐酸溶液,调 pH = 3,再搅拌 2 h,加水萃取分离,保留有机相,并用无水硫酸钠除水.用氯仿和甲醇做淋洗液,将滤液进行硅胶柱层析分离,收集 Boc 保护的扩链剂 (DiBoc-lys-NH-PEG) 的组分.45 °C 旋蒸除去溶剂,45 °C 真空干燥 24 h,得 DiBoc-lys-NH-PEG,呈黄色黏稠状.用盐酸二氯甲烷饱和溶液脱 Boc 基团,旋蒸得 Lys-NH-PEG 5.32 g,产率为 37.9%.其合成路线见图 1.

酯溶液滴加入 100 mL 蒸馏水中,形成胶体.在蒸馏水中透析 5 天 (截留分子量为 8000 ~ 14000),每 4 h 换一次水.透析后的胶体冻干 (-53 °C, 9.2 Pa) 即得侧链为端羧基聚乙二醇的聚氨酯 (PCU-L-P, 见图 2),其中 PCD, MDI, Lys-NH-PEG 和 L-lysine 的摩尔比为 1:2.2:0.25:0.75.

加 75 mL THF 于剩余的预聚体 (9.732 g) 中,室温下搅拌溶解.称取 L-lysine 0.918 g (6.3 mmol) 溶于 8 mL 等体积混合的水和 THF 中,滴加至三颈瓶中,搅拌反应 20 min,静置 12 h,倒入蒸馏水中析出聚氨酯.将产物浸泡在蒸馏水里 5 天,每 4 h 换 1 次水.真空烘箱 75 °C 烘干得带侧羧基的聚氨酯 (PCU-L, 图 2) 作为对照材料,其中 PCD, MDI 和 L-lysine 的摩尔比为 1:2.2:1.

1.5 聚氨酯 (PCU-L-P) 胶体上接枝白蛋白

称取 0.1 g PCU-L-P 溶于 35 mL DMF 中,搅



拌下滴加到 40 mL 水中,形成胶体,按 1.4 节方法透析提纯后浓缩至 5 mL,得 PCU-L-P 胶体溶液 (ca. 2%, W/V).

白蛋白 TRITC-Alb 溶于 50 mmol/L 磷酸缓冲溶液 (PBS, pH = 7.4) 制得 1 mg/mL 的蛋白溶液. 在 2 mL 的棕色小瓶中, 加入 0.6 mL PBS 溶液, 0.2 mL PCU-L-P 胶体 (*ca.* 2%, W/V), 0.2 mL TRITC-Alb, 49 mg NHS (0.43 mmol) 以及 82 mg EDC (0.43 mmol), 作为实验组. 吸附对照组未加 EDC/NHS 缩合剂, 空白对照组只加胶体和 PBS 溶液. 三组胶体磁力搅拌 (200 r/min) 30 h, 13000 r/min 下离心 30 min, 弃上清液, 加入 0.8 mL PBS 振荡分散. 重复此操作 6 次以除去未接枝的白蛋白. 最后一次用 0.2 mL 的 PBS 溶液重新分散, 并避光保存.

Nicolet 560 型红外光谱仪(美国 Nicolet 公司)和 Varian 400 MHz 核磁共振谱仪(美国 Varian 公司)表征产物结构. LCQDeca 型电喷雾质谱仪(美国 Thermo Finnigan 公司)测试扩链剂 Lys-NH-PEG 的质谱. 聚氨酯的分子量及其分布用 Waters 410 型凝胶渗透色谱仪(美国 Waters 公司)测试. 聚氨酯胶体粒径和 zeta 电位用激光粒度仪 3000 HSA Zetasizer(英国 Malvern 仪器公司)测试. 接枝白蛋白的胶体颗粒用 BFX 43 荧光显微镜观察(日本 Olympus 公司).

2.1 扩链剂 Lys-NH-PEG 的结构

合成扩链剂 Lys-NH-PEG 各步产物的结构由 $^1\text{H-NMR}$ 和 FTIR 谱(图 3)得到证实. DiBoc-lys 的谱图符合文献报道^[17], 其核磁谱在 $\delta = 1.45$ 的峰(Ha)为 Boc 基团的甲基峰, 而红外谱在 1720

cm^{-1} 的峰可归属于 Boc 的羰基。接上乙二胺以后 (DiBoc-lys-NH), 新出现的 j 和 k 峰, 为乙二胺链节的质子峰; 羰基主峰移至 1694 cm^{-1} , 显示出酰胺羰基的影响; C—N 伸缩振动和 N—H 弯曲振动的合频 (1521 cm^{-1}) 也明显加强。接上 PEG 链后 (DiBoc-lys-NH-PEG), 核磁谱在 $\delta = 3.6$ 处出现了 PEG 的质子峰 (H_p , $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$), 红外谱在 1113 cm^{-1} 处出现了 PEG 中醚键的伸

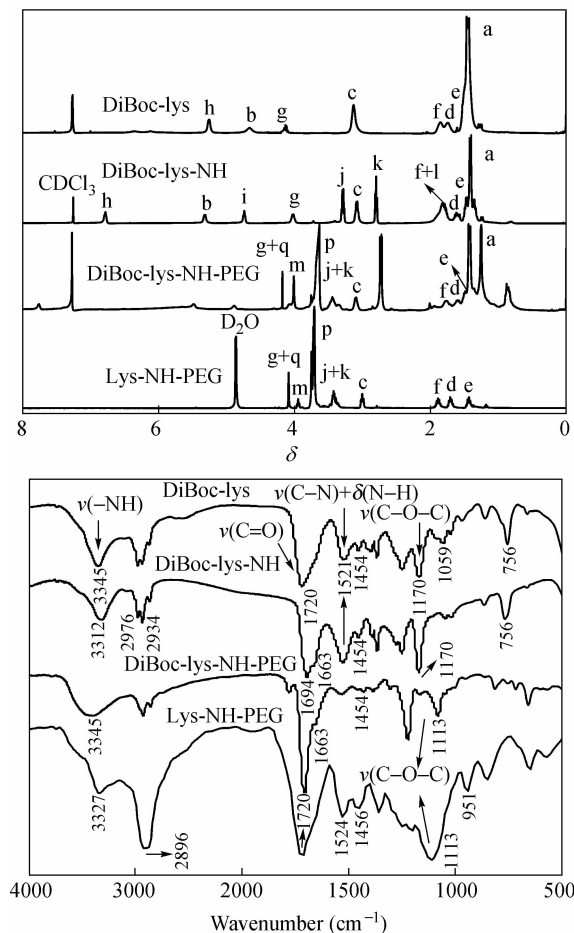


Fig. 3 ^1H -NMR and FTIR spectra of DiBoc-lys, DiBoc-lys-NH, DiBoc-lys-NH-PEG and Lys-NH-PEG

缩振动峰. 脱除 Boc 基团后 (Lys-NH-PEG), Boc 基团的甲基质子峰($\delta = 1.45$)已消失;相应的,在红外谱图上,C—H 的振动峰(伸缩 2976 cm^{-1} ,弯曲 1456 cm^{-1})以及酰胺羰基伸缩振动峰(1663 cm^{-1})都相对变弱. 这些谱图的变化和化学结构的变化相一致.

最终产物 Lys-NH-PEG 的结构由质谱得到进一步确认(图 4),其理论分子量 $M = 304.1747 + 44.0262n$. 假设 $n = 13$, 理论分子量应为 $M =$

876.52 ,与质谱最强峰 915.50 正好相差 39 ;假设 $n = 14$,得分子量 $M = 920.54$,与质谱次强峰 959.56 也正好相差 39 . 因此所得的质谱符合目标分子和钾离子加合物 $\{C_{12}H_{24}O_5N_4 + (CH_2CH_2O)_n + K\}^+$ 的质荷比,相邻谱线相差 44 ,正好是 PEG 重复单元的分子量,符合理论结构. 虽然所用的合成反应是常规化学反应,但这种带端羧基 PEG 侧链的二元胺的合成却鲜见文献报道.

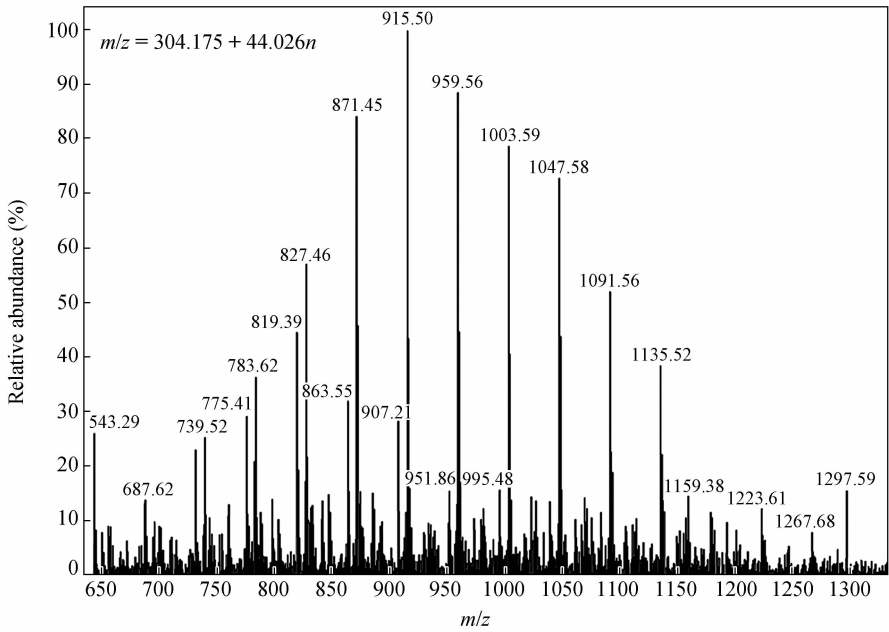


Fig. 4 Mass spectrum of Lys-NH-PEG

2.2 侧链为端羧基聚乙二醇的聚氨酯的结构

该聚氨酯(PCU-L-P)和对照聚氨酯(PCU-L)的化学结构由¹H-NMR 和 FTIR 谱得到证实(图 5). 核磁谱中(图 5(A)), a ($\delta = 4.0$), b ($\delta = 1.6$), c ($\delta = 1.3$)处的峰归属于聚碳酸酯软段,大于 $\delta = 7$ 的 2 个峰(d, e)是 MDI 苯环上的氢产生的,而 g ($\delta = 3.7$)处的峰为 MDI 上的—CH₂—产生的. PCU-L-P 在 $\delta = 3.5$ (f)处的峰为 PEG 链的质子信号峰,说明该聚氨酯中含有聚乙二醇侧链. 在 $\delta = 3.3$ 处的峰为水峰,加氘代甲醇后(图 5(B)),活泼氢峰的位移偏移至 $\delta = 4.16$ 处. PCU-L-P 与 PCU-L 的红外谱相比(图 5(C)), 1112 cm^{-1} (PEG 中 C—O 的伸缩振动)处吸收峰相对增强,也说明该聚合物含 PEG 侧链. 由于所用的 PEG 为端羧基 PEG,因此可后续接枝生物分子进一步提高其生物相容性. 2 种聚合物都有较高的分子量($M_n = 30000 \sim 40000$),较窄的分子量分布

(表 1).

Table 1 Molecular weights of PCU-L and PCU-L-P

Sample	$M_n \times 10^{-4}$	$M_w \times 10^{-4}$	M_w/M_n
PCU-L	3.41	5.86	1.72
PCU-L-P	3.80	5.37	1.41

2.3 聚氨酯胶体性质

合成的 PCU-L-P 由于含有聚乙二醇亲水链,其溶液滴加到水中会形成外层亲水内层疏水的胶体. 透析提纯后,其粒径分布如图 6 所示,胶体的平均粒径约为 212.5 nm ,粒径分布范围在 $50 \sim 500\text{ nm}$ 之间,分散系数为 0.23 . 胶体带负电荷,其 zeta 电位为 -19 mV ,这是由于聚乙二醇侧链的端羧基在 PBS (pH = 7.4) 中电离为羧酸根负离子所致,胶体颗粒之间既有电荷排斥力,又有 PEG 亲水链的空间排斥作用,这样的胶体具有良好的稳定性. PCU-L-P 能形成胶体,进一步说明聚乙二醇已经接枝到聚氨酯主链上,形成了梳形聚合物,因

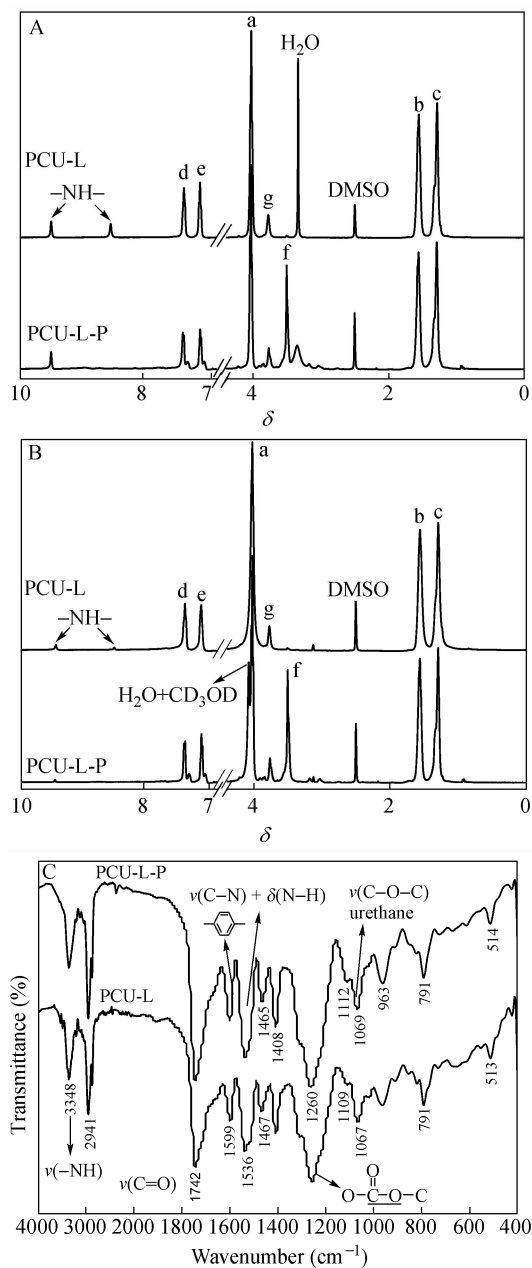


Fig. 5 Spectroscopic analyses of PCU-L and PCU-L-P: (A) ¹H-NMR in DMSO, (B) ¹H-NMR in DMSO and CD₃OD (5:1) and (C) FTIR spectra

为不含 PEG 链的对照聚合物 PCU-L 不能够形成胶体.

2.4 聚氨酯胶体颗粒接枝白蛋白

本文所合成的聚氨酯的胶体颗粒外周的亲水链 PEG 带有端羧基,可用于化学接枝生物分子. 接枝罗达明标记的白蛋白后,聚氨酯胶体颗粒有很强的红色荧光(图 7(c)),可以观察到很小的颗粒. 空白组(图 7(a))和吸附组(图 7(b))只有较大的颗粒才有微弱的自发荧光. 由此表明经过 6 次离心提纯后,物理吸附的白蛋白已除去,而化

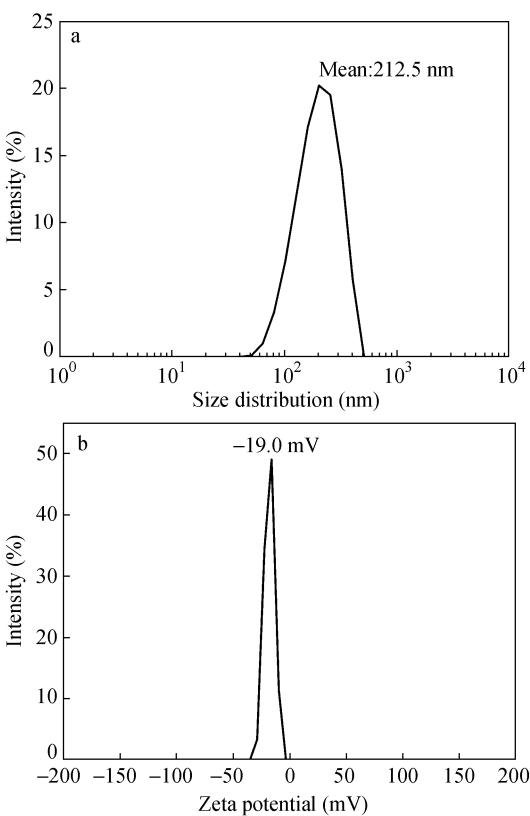


Fig. 6 Particle size distribution (a) and zeta potential (b) of PCU-L-P hydrocolloid

学接枝的白蛋白不能除去. PEG 接枝改性过的聚氨酯能在水中形成胶体,并可化学接枝白蛋白,说明所合成的聚氨酯的侧链端羧基具有反应活性,可以接枝白蛋白等生物分子.

传统的梳形聚氨酯一般采用化学惰性的聚乙二醇(其端基为甲氧基或磺酸根)作为侧链^[13~15],该聚氨酯不具有反应活性. 本文所合成的梳形聚氨酯的侧链为端羧基聚乙二醇,能在水中形成胶体,并能化学接枝白蛋白分子. 这种胶体材料可以涂覆于人工血管的内表面,形成多孔的涂层,其可反应基团可以用于接枝肝素以提高抗凝血性能;或者接枝 RGD 等多肽分子以提高内皮细胞粘附性,有望提高人工血管的内皮化,达到长期抗凝的目的. 同时,柔性的 PEG 链可以保持所接枝的生物分子的天然构象,为生物活性的发挥提供最大可能. 这种聚氨酯胶体材料的应用正在进行之中.

最后需要指出的是,本文所合成的梳形聚氨酯材料由于 PEG 链很好的亲水性,其在水相环境的力学性能会大大下降,因此不宜单独作为承力材料使用.

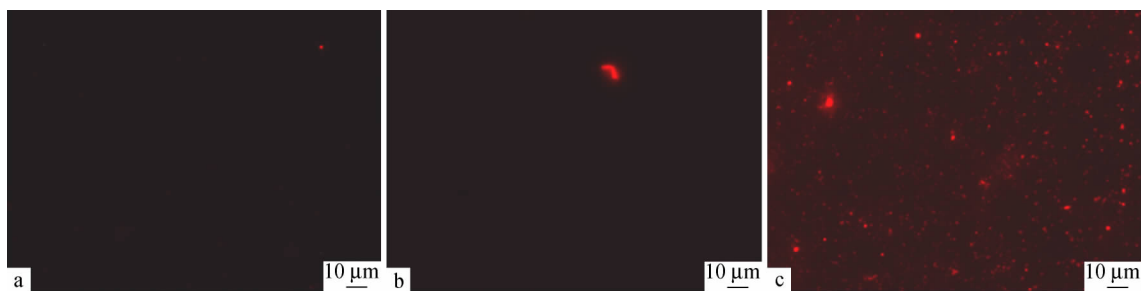


Fig. 7 Fluorescence photomicrographs of the PCU-L-P colloidal particles: (a) blank, (b) adsorption and (c) immobilization

3 结论

本文合成了新型的带端羧基 PEG 侧链的二元胺扩链剂,从而将羧基引入到梳形聚氨酯的侧

链中,使所得到的聚氨酯具有可反应性,能够接枝白蛋白等生物分子.本文所合成的新型聚氨酯作为生物材料将有良好的应用前景,值得进一步研究.

REFERENCES

- 1 Yang Jianjun(杨建军). Polyurethane Medical Materials(聚氨酯医用材料). Beijing(北京): Chemical Industry Press(化学工业出版社), 2008. 120 ~ 122
- 2 Lin Sicong(林思聪). Polymer Bulletin(高分子通报), 1997, (1): 1 ~ 7
- 3 Snellings G M B F, Vansteenkiste S O, Corneillie S I, Davies M C, Schacht E H. Adv Mater, 2000, 12(24): 1959 ~ 1962
- 4 Archambault J G, Brash J L. Colloids Surf B: Biointerf, 2004, 33: 111 ~ 120
- 5 Archambault J G, Brash J L. Colloids Surf B: Biointerf, 2004, 39: 9 ~ 16
- 6 Chen H, Brook M A, Sheardown H. Biomaterials, 2004, 25(12): 2273 ~ 2282
- 7 Chen H, Zhang Z, Chen Y, Brook M A, Sheardown H. Biomaterials, 2005, 26(15): 2391 ~ 2399
- 8 Chen H, Hu X Y, Zhang Y X, Li D, Wu Z K, Zhang T. Colloids Surf. B: Biointerf, 2008, 61(2): 237 ~ 243
- 9 Chen H, Wang L, Zhang Y X, Li D, McClung W G, Sheardown H, Brash J L. Macromol Biosci, 2008, 8(9): 863 ~ 870
- 10 Zuo Wenyao(左文耀), Feng Yakai(冯亚凯), Zhang Shifeng(张世锋). Materials Review(材料导报), 2005, 19(9): 105 ~ 107
- 11 Guan J J, John J S, William R W. Cell Transplant, 2006, 15(Suppl 1): S17 ~ S27
- 12 Ito Y, Sisido M, Imanishi M. J. Biomed Mater Res, 1986, 20(8): 1157 ~ 1177
- 13 Zhang Hongzhi(张鸿志), Ruan Jihong(阮继红), Feng Xinde(冯新德). Acta Polymerica Sinica(高分子学报), 1995, (4): 393 ~ 397
- 14 Orban J M, Chapman T M, Wagner W R, Jankowski R. J Polym Sci A: Polym Chem, 1999, 37: 3441 ~ 3448
- 15 Han D K, Lee N Y, Park K D, Kim Y H, Cho H I, Min B G. Biomaterials, 1995, 16: 467 ~ 471
- 16 Ji Yan(吉岩), Chang Jin(常津), Xu Xiaoqi(许晓秋), Zhang Shuangnan(张爽男), Chen Yirui(陈贻瑞), Fang Dongpu(方洞浦). Chemical Industry and Engineering(化学工业与工程), 2001, 18(1): 44 ~ 51
- 17 Hernández J R, Klok H A. J Polym Sci A: Polym Chem, 2003, 41(9): 1167 ~ 1187
- 18 Snyder S L, Sobocinski P Z. Anal Biochem, 1975, 64(1): 284 ~ 288

Synthesis of Comb-like Polycarbonate Urethane with Carboxyl-terminated Polyethylene Glycol Side Chains

Xiang-yang Wu, Shuai Liu, Xiao-yong Zhou, Yin-ping Zhong, Qiang Fu, Xing-yi Xie*

(College of Polymer Science and Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065)

Abstract A diamine with carboxyl-terminated polyethylene glycol (PEG) side chains (Lys-NH-PEG) was synthesized as chain extender for polyurethanes (PUs), using L-lysine, ethylenediamine and PEG bis-(carboxymethyl) ether as raw materials. Further to this, a comb-like polycarbonate urethane with PEG side chains (PCU-L-P) was synthesized using Lys-NH-PEG and 4,4'-diphenylmethane diisocyanate (MDI) as hard segment, and polycarbonate diol as soft segment. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and proton nuclear magnetic resonance ($^1\text{H-NMR}$) were used to confirm the chemical structure of PCU-L-P, whose number-average molecular weight was about 38000 determined by gel permeation chromatography (GPC). The solution of PCU-L-P (in dimethylformamide) can be transformed into hydrocolloid stabilized by the hydrophilic PEG side chains, with a mean particle size of about 213 nm and a zeta potential of -19 mV. Model protein albumin has been successfully grafted onto the colloidal particles, indicating the reactivity of the carboxyl groups at the PEG free ends. This reactive polyurethane can be used to graft various biomolecules for improving PUs' biofunctionality.

Keywords Polyurethane, Polyethylene glycol, Hydrophilic modification, Albumin

* Corresponding author: Xing-yi Xie, E-mail: xiexingyi@263.net