

原子转移自由基聚合合成具有 pH 敏感性壳聚糖材料及其对辅酶 A 的控制释放

郭保林¹, 袁金芳¹, 张晓丽^{1,2}, 高青雨¹

(1. 河南大学精细化学与工程研究所, 河南 开封 475001;
2. 河南质量工程职业学院, 河南 平顶山 467000)

摘要:合成了大分子引发剂壳聚糖(CS)接枝 α -溴代异丁酰溴(CS-Br), 然后利用原子转移自由基聚合(ATRP)合成了一种新型 pH 敏感性的壳聚糖材料——壳聚糖接枝 α -溴代异丁酰溴共聚甲基丙烯酸聚乙二醇酯 P(CS-Br-PEGMA), 并对其结构进行了表征, 研究了其对辅酶 A(CoA)的控制释放, 结果发现在 24℃、P(CS-Br-PEGMA)在不同浓度或 pH 在 3.7~9 之间变化时, 聚合物都能对辅酶 A 进行控制释放, 同时对其控制释放机理进行初步探讨。

关键词: 聚合物 P(CS-Br-PEGMA); pH 值敏感性; 原子转移自由基聚合; 控制释放; 辅酶 A

中图分类号: TQ460.6

文献标识码: A

文章编号: 0253-4320(2006)10-0049-03

Preparation of pH-sensitive chitosan by atom transfer radical polymerization and its controlled delivery on coenzyme A

GUO Bao-lin, YUAN Jin-fang, ZHANG Xiao-li, GAO Qing-yu

(1. Institute of fine Chemical and Engineering, Henan University, Kaifeng 475001, China;
2. College of Henan Quality Project, Pingdingshan 467000, China)

Abstract: A pH-sensitive chitosan material was prepared via atom transfer radical polymerization (ATRP) of chitosan with poly (ethylene glycol) methacrylate (PEGMA), which was successfully conducted in water and methanol system with CS-Br as macroinitiator and CuBr/bpy as a catalyst. The copolymer obtained was analyzed. The results of UV analysis showed that at 24℃ and under different concentration or at 24℃ and with pH value between 3.7~9, P(CS-Br-PEGMA) can well control delivery on coenzyme A, and the release mechanism of coenzyme A was also discussed.

Key words: polymer P (CS-Br-PEGMA); pH-sensitivity; atom transfer radical polymerization (ATRP); controlled delivery; coenzyme A

智能材料是对环境可感知且可响应并具有功能发现能力的新材料, 如温度敏感性、光敏性(可见光、紫外线或射线等)、pH 敏感性等, 在物料分离、药物控制释放、固定化酶、免疫分析等新型材料方面具有潜在应用价值^[1-3]。pH 敏感性以羧基阴离子聚合物居多, 对温度、pH 双敏感性聚合物的研究也时有报道, 其热点主要集中在新型聚合物的合成及应用性能的研究^[4-5]。原子转移自由基聚合(ATRP)是活性聚合中最重要的方法之一^[6-9], 而壳聚糖(CS)是最重要的天然医用高分子材料之一^[10-11]。笔者以 CuBr 和连吡啶(bpy)为络合引发体系, 以水和甲醇为混合溶剂(质量比 30:20), 大分子引发剂 CS-Br 引发甲基丙烯酸聚乙二醇酯($M_n = 526$)的原子转移

自由基聚合, 得到一种新型的具有 pH 敏感性的梳型壳聚糖材料, 研究了其对辅酶 A 的控制释放。

1 实验部分

1.1 主要试剂和仪器

壳聚糖(CS), 壳聚糖脱乙酰度为 83%, 东京化成工业株式会社; 甲基丙烯酸聚乙二醇酯(PEGMA, $M_n = 526$)、 α -溴代异丁酰溴、辅酶 A, Aldrich 公司; 溴化亚铜, Acros 公司, 用冰醋酸与乙醇反复洗涤, 于 50℃ 真空干燥后, 密封避光贮存; 连吡啶(bpy), 上海试剂一厂; 其他试剂均为国产分析纯。

Avatar-360 FT-IR 红外光谱仪; EW360L 型核磁共振谱仪(400 MHz); UV-540 紫外分光光度仪, 日本

收稿日期: 2006-07-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(50273010)

作者简介: 郭保林(1981-), 男, 硕士生; 高青雨(1963-), 男, 教授, 博士, 主要从事功能高分子及生物医用高分子的研究, 通讯联系人, 0378-2192445, qingyugao@henu.edu.cn。

岛津; PE 2400 II 型 CHNS10 元素分析仪。

1.2 合成步骤

以吡啶为溶剂,加入一定量 CS 于干燥的三口瓶中,再加入计算量的 α -溴代异丁酰溴,密封搅拌,室温反应 24 h,然后减压抽滤,用吡啶多次洗涤,以除去未反应的 α -溴代异丁酰溴,真空干燥得大分子引发剂 CS-Br。

在装好的装置中,先通 N_2 30 min,然后加入 9.4 mg CuBr 和 29.6 mg bpy,搅拌使 CuBr 和 bpy 充分络合,在另一个容器中加入 5 g H_2O 和 3.3 g CH_3OH 溶解 CS-Br,再加入 526 mg (1 mmol, $M_n = 526$) PEGMA 单体,混合均匀后,加入到络合引发体系中,然后继续通 N_2 ,室温反应 24 h 后,使溶液通过 Al_2O_3 柱子,以除去未反应的单体和铜离子,最后真空干燥得 P(CS-Br-PEGMA)。

1.3 聚合物的表征

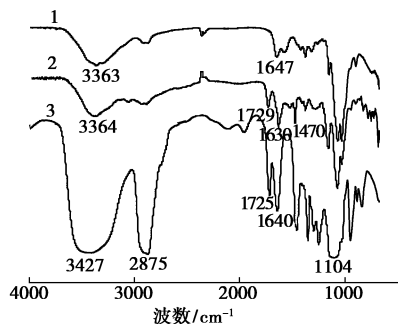
壳聚糖(CS)、大分子引发剂 CS-Br,共聚物 P(CS-Br-PEGMA)经烘干研碎后,用 KBr 压片,用 Avatar-360 FT-IR 光谱仪测其红外光谱。以 D_2O 为溶剂,用 EW360L 型核磁共振谱仪(400 MHz)对共聚物 P(CS-Br-PEGMA)的结构进行 1H -NMR 分析。

用 PE 2400 II 型 CHNS10 元素分析仪分别测壳聚糖(CS),大分子引发剂 CS-Br,共聚物 P(CS-Br-PEGMA)的元素含量,以进一步确定共聚物的组成。

将聚合物 P(CS-Br-PEGMA)和质量分数 0.5% 的辅酶 A 混合水溶液静置 24 h 后,在不同浓度和不同 pH 的条件下,用紫外分光光谱仪 UV-540 分别测其吸收光谱,根据 260 nm 处吸收峰强弱的变化,来分析其对辅酶 A 的控制或释放。

2 结果与讨论

2.1 红外谱图的分析



1—CS;2—CS-Br;3—P(CS-Br-PEGMA)

图 1 CS、CS-Br 和 P(CS-Br-PEGMA) 的红外光谱

如图 1 所示,CS-Br 中除了有 CS 的特征吸收峰

外,还有 $C=O$ 在 1729 cm^{-1} 的特征吸收峰, $-CH_3$ 在 1470 cm^{-1} 处的吸收峰也明显增强,说明 α -溴代异丁酰溴接枝到 CS 上。在谱线 3 上, $-OH$ 在 3427 cm^{-1} 的振动吸收峰剧烈增强, 2875 cm^{-1} 有 $-CH_2O$ 的特征吸收峰, 1725 cm^{-1} 酯基的特征吸收峰的强度也明显增强, 1104 cm^{-1} 有 $-CH_2OCH_2-$ 的特征吸收峰,都说明合成了 P(CS-Br-PEGMA)。

2.2 共聚物的核磁共振分析

核磁共振图(略)对照图 2 分子结构,CS 中六元糖环每个 H 原子的化学位移 δ 分别为 $\delta_1 = 3.65$ (2H), $\delta_2 = 3.35$ (1H), $\delta_3 = 3.37$ (1H), $\delta_4 = 3.10$ (1H), $\delta_5 = 4.49$ (1H), $\delta_6 = 8.59$ (1H), 支链中 H 原子的化学位移 δ 为 $\delta_7 = 1.22$ (3H), $\delta_8 = 1.23$ (2H), $\delta_9 = 4.30$ (2H), $\delta_{10} = 3.74$ (1H)。

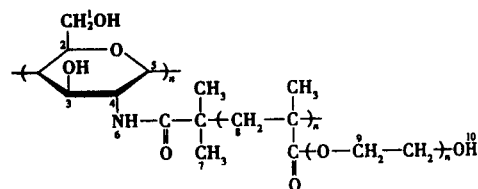


图 2 共聚物 P(CS-Br-PEGMA) 的结构式

2.3 元素分析

聚合物 P(CS-Br-PEGMA) 的元素分析结果如表 1 所示。通过表 1 计算出大分子引发剂 CS-Br 的接枝率为 44%,在聚合物 P(CS-Br-PEGMA) 中,壳聚糖与甲基丙烯酸聚乙二醇酯的质量比为 1: 19.1。

表 1 聚合物的元素分析 %

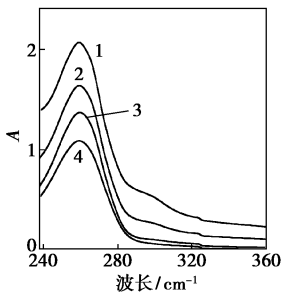
组成	C	H	N
CS	43.30	8.15	8.37
CS-Br	34.94	5.70	5.83
P(CS-Br-PEGMA)	38.24	7.02	0.29

2.4 P(CS-Br-PEGMA) 对辅酶 A 的控制释放

2.4.1 浓度对辅酶 A 的控制释放的影响

从紫外吸收图(图 3)上可看出,随着共聚物的浓度增加,辅酶 A 的吸收加强(聚合物在 260 nm 处无吸收)。这可能是因为,在共聚物 P(CS-Br-PEGMA) 中,存在羟基、酰胺基、醚基及大量未反应的氨基,这些基团都能和辅酶 A 中的磷酸基通过氢键的形式进行结合,从而使磷酸基与吡啶环上的氮原子的结合减少,使吡啶环的供电子能力增强,故使其吸收峰增大。随着 P(CS-Br-PEGMA) 浓度的增大,氨基、羟基、酰胺基及醚基的数量也急剧增加,从而与辅酶 A 中的磷酸基结合的几率也大大增多,所以其吸收峰随着聚合物浓度的增大而增大。可以通过紫

外吸收的峰高来确定聚合物用作药物载体时的合适浓度。

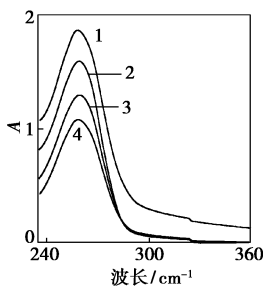


pH = 6.8, 辅酶 A 质量分数为 0.5%, P(CS-Br-PEGMA) 质量分数: 1—0.1%; 2—0.05%; 3—0.01%; 4—0

图 3 P(CS-Br-PEGMA) 浓度对辅酶 A 控制释放的影响

2.4.2 P(CS-Br-PEGMA) 溶液的 pH 对辅酶 A 控制释放的影响

配制 pH 分别为 9.0、3.7、6.8 的 P(CS-Br-PEGMA) 质量分数为 0.01%、辅酶 A 的质量分数为 0.5% 的溶液, 在室温下测其紫外吸收光谱如图 4 所示。可以看出, 含聚合物的曲线在约 260 nm 出现辅酶 A 紫外特征吸收峰, 而且其强度依次减弱, 但均比相同条件下而无聚合物的曲线的吸收强度高, 表明聚合物在酸、碱和中性环境中都可不同程度地捕捉辅酶 A, 并且碱性条件下聚合物对辅酶 A 捕捉能力较大, 可认为辅酶 A 基本处于被控制状态, 中性条件下聚合物对辅酶 A 捕捉能力较小, 辅酶 A 处于释放状态。反复调节酸碱性, 其紫外吸收强度具有可逆性, 表明 P(CS-Br-PEGMA) 对辅酶 A 的控制释放可以通过调节溶液的 pH 来实现。



24°C, P(CS-Br-PEGMA) 质量分数为 0.01%, 辅酶 A 质量分数为 0.5% pH: 1—3.7; 2—6.8; 3—9.0; 4—无聚合物

图 4 pH 对辅酶 A 控制释放的影响

这可能是因为在聚合物 P(CS-Br-PEGMA) 中, 存在大量的羟基、醚基、酰胺基和未反应的氨基。聚合物在酸性水溶液 (pH = 3.7) 中时, 主链上的 $-NH_2$ 被离子化, 以铵盐 $-NH_3^+$ 的形式存在, 主链之间的

静电斥力使大分子间距离的增大, 使大分子处于一种膨胀的状态, 另一方面聚合物中的羟基、酰胺基和醚基在大分子内和大分子之间形成氢键, 使大分子具有向内收缩的趋势, 这 2 种作用力作用的结果使大分子在酸性条件下处于一种大分子之间距离较大的疏松状态, 从而使羟基、酰胺基和醚基在大分子之间形成氢键的机会大大减少, 与辅酶 A 中磷酸基结合的机会增多, 使吡啶环自身的供电子能力显著增强, 辅酶 A 的特征吸收峰也最大。而聚合物在中性水溶液 (pH = 6.8) 中时, $-NH_2$ 的离子化程度比在酸性溶液中要小, 离子之间的静电斥力也减小, 所以大分子所处状态较酸性条件下收缩。聚合物中的羟基、酰胺基和醚基在大分子内和大分子之间形成氢键的几率较酸性条件下要大, 从而与辅酶 A 磷酸基结合机会较酸性条件下要小。所以在酸性水溶液中 (pH = 3.7), 聚合物吸附的辅酶 A 的量比中性条件下要大, 辅酶 A 的特征吸收峰也较中性溶液条件下高。聚合物在碱性水溶液中 (pH = 9) 时, 所有基团都处于无电荷状态, 聚合物中的所有基团相互之间都可形成氢键, 大分子处于紧密收缩状态, 与辅酶 A 的结合机会最少, 所以辅酶 A 吸收峰最低。

参考文献

- [1] Chu L Y, Takuya N, Takeo Y, *et al.* Thermoresponsive transport through porous membranes with grafted PNIPAM gates [J]. *AIChE Journal*, 2003, 49(4): 896 - 909.
- [2] Damon S, Remy D, Shuai X T, *et al.* Poly (D, L-lactide-co-glycolide)/poly (ethylenimine) blend matrix system for pH sensitive drug delivery [J]. *J Appl Polym Sci*, 2006, 100: 89 - 96.
- [3] Zain B, Angela K P. Gene delivery through cell culture substrate adsorbed DNA complexes [J]. *Biotech and Bioengine*, 2005, 90(3): 290 - 302.
- [4] Veena C, Sonal R, Dipiti S. Studies on the copolymerisation of N-isopropyl-acrylamide with glycidyl methacrylate [J]. *Macromol Symp*, 2004, 210: 49 - 57.
- [5] Aleksandra P, Philip D, Ivaylo D, *et al.* Synthesis and aqueous solution properties of functionalized and thermoresponsive poly (D, L-lactide)/polyether block copolymers [J]. *Macromol Symp*, 2004, 210: 427 - 436.
- [6] Wang J S, Matyjaszewski K. Controlled/"living" radical polymerization atom transfer radical polymerization in the presence of transition-metal complexes [J]. *J Am Chem Soc*, 1995, 117(20): 5614 - 5615.
- [7] 应圣康, 罗宁, 王晓松. 一种橡胶与乙烯基单体接枝物的制备方法: 中国, 97106319.2 [P]. 1997 - 11 - 26.
- [8] Haddleton D M, Jasieczek C B, Hannon M J, *et al.* Atom transfer radical polymerization of methyl methacrylate initiated by alkyl bromide and 2-pyridinecarbaldehyde imine copper (I) complexes [J]. *Macromolecules*, 1997, 30: 2190 - 2193.

器有限公司;KH-2000型薄层色谱扫描仪;紫外-可见分光光度计,HP8453,采用 BIOSEP SEC2S3000; BURKE 120 HK 红外光谱仪。质谱仪为 Waters ZQ 4000 型,质谱条件:毛细管电压 3 kV;扫描范围 200~900 (m/z);电离电压 (cone) ES + 10 V、30 V, ES - 10 V、30 V。

1.2 实验步骤

1.2.1 反应底物阿魏酸乙酯的合成^[7]

5 g 阿魏酸与 50 mL 无水乙醇在 3 mL 亚硫酸氯催化下,80℃回流加热并连续搅拌 5 h,将反应液转蒸发除去溶剂得到淡黄色油状物质,将其溶于少量乙醚中,用饱和的碳酸氢钠溶液萃取 3 次。旋转蒸发除去乙醚,将得到的液态物质静止至大量的白色结晶析出得到阿魏酸乙酯。

1.2.2 不同介质酶促阿魏酸双甘酯的合成

有机相反应体系:25 mL 的三角瓶中加入 2.0 mmol 阿魏酸乙酯、2.0 mmol 油酸甘油酯、有机介质 10 mL,加入 140 mg CRL 脂肪酶、一定量硅藻土,或 220 mg 固定化的 Novozym435 脂肪酶,在不同温度下空气浴振荡反应。反应体系在加酶前用分子筛除水 48 h。

无溶剂反应体系:根据油酸甘油酯为液态的特点同时作为反应底物和介质在 25 mL 三角瓶的中加入 2.0 mmol 阿魏酸乙酯、2.0 mmol 油酸甘油酯、140 mg CRL 脂肪酶和一定量硅藻土,或 220 mg 固定化的 Novozym435 脂肪酶,在不同温度下空气浴振荡反应。反应体系在加酶前用分子筛除水 48 h。

1.2.3 产物的 TLC 检测

吸取 2.5 μ L 样品点样于荧光硅胶板,展层液根据均匀实验设计筛选展开剂体系的最佳溶剂组分^[8]。各个组分之间的最佳溶剂配比为 $V(\text{苯}):V(\text{乙醚}):V(\text{二氯甲烷}):V(\text{正己烷}) = 3.306:1.655:4.871:0.017$,展开方法为上行法,展开距离 14 cm,检测波长 254 nm。

2 结果与讨论

2.1 反应介质及脂肪酶的筛选

选择不同来源的脂肪酶(采用近似活性的使用量),在不同有机介质(仅考察 $0.2 < \text{Lg}P < 3$ 的有机

溶剂,因为有机溶剂 $\text{Lg}P < 0.2$ 时,脂肪酶失活;有机溶剂 $\text{Lg}P > 3$ 时阿魏酸乙酯在有机相中析出)和无溶剂体系催化转酯反应(P 表示一种有机溶剂在正辛醇和水两相溶液中的分配系数)。以阿魏酸乙酯是否减少判断脂肪酶有无催化活性。反应条件为阿魏酸乙酯与油酸甘油酯的底物摩尔比为 1:1、温度 50℃、转速 180r/min、反应 120 h,结果如表 1。

表 1 不同脂肪酶在不同反应介质中催化转酯反应相对活性

反应介质	LgP	酶的相对活性			
		Novozym435	CRL	PPL	WGL
丙醇	0.28	-	-	-	-
四氢呋喃	0.49	-	-	-	-
丁醇	0.81	-	-	-	-
苯	1.98	+	-	-	-
四氯化碳	2.02	-	+	-	-
氯仿	2.21	-	-	-	-
甲苯	2.53	+	+	-	-
辛醇	2.89	-	-	-	-
无溶剂		+	+	-	-

从表 1 可以看出 Novozym435 脂肪酶和 CRL 脂肪酶在甲苯和无溶剂反应体系中同时具有催化反应的活性,为比较 2 种脂肪酶在不同介质反应的催化效果分别选择这 2 种体系做进一步的研究。由于 Novozym435 脂肪酶和 CRL 脂肪酶具有不同的位置专一性,根据阿魏酸乙酯的减少仅仅可以判断是否发生转酯反应(或水解反应),而不能确定生成产物即为目标产物。所以必须对生成物进行进一步的分析判断。

2.2 脂肪酶不同位置专一性的影响

脂肪酶的位置专一性是指脂肪酶区分油酸甘油酯 2 个外部位置(第一酯键)和内部位置(第二酯键)的能力^[9],根据脂肪酶位置专一性不同催化转酯反应所得的产物应有区别。将实际反应 2 种脂肪酶催化的反应液分别离心滤去酶后进行薄层层析扫描得到不同的扫描图,可以发现在 CRL 脂肪酶催化的反应 5.5~12.5 cm 之间共有 5 种物质的吸收峰,对照红外、质谱和紫外光谱,推测其依次为阿魏酸、2-阿魏酸甘油酯、阿魏酸单甘酯或其异构体、阿魏酸乙酯

(上接第 51 页)

[9] Gaynor S G, Matyjaszewski K. Step-growth polymers as macroinitiators for "living" radical polymerization: synthesis of ABA block copolymers [J]. *Macromolecules*, 1997, 30: 4241 - 4243.

[10] Fatiha C, Maryam T, Severian D, et al. In vitro and in vivo biocompatibility of chitosan-xanthan polyionic complex [J]. *J Biomed Mater Res*, 2000, 51(1): 107 - 116.

[11] 卢从华, 罗传秋, 曹维孝. 壳聚糖的改性及其应用 [J]. *高分子通报*, 2001(12): 46 - 53. ■