

·研究简报·

## 聚乳酸-*b*-聚(*N*<sup>ε</sup>-苄氧羰基-L-赖氨酸)-*b*-聚乙二醇的合成与表征\*

向 莉 龙 凤 阳 科 樊俊兵 向建南\*\* 朱明强\*\*

(湖南大学化学化工学院 化学生物传感与计量学国家重点实验室 长沙 410082)

**摘 要** 用端氨基聚乳酸做引发剂,在 DMF 中引发 *N*<sup>ε</sup>-苄氧羰基-L-赖氨酸酐(Lys(Z)-NCA)聚合,合成了端氨基聚(*N*<sup>ε</sup>-苄氧羰基-L-赖氨酸)-*b*-聚乳酸两嵌段共聚物。以端羧基聚乙二醇经 NHS 活化与端氨基聚(*N*<sup>ε</sup>-苄氧羰基-L-赖氨酸)-*b*-聚乳酸偶联,合成了聚(乳酸-*b*-*N*<sup>ε</sup>-苄氧羰基-L-赖氨酸-*b*-乙二醇)三嵌段聚合物。利用 IR、<sup>1</sup>H-NMR、GPC 和 TEM 对它们的结构、形态进行了表征,结果表明,所合成的分子量可控、分子量分布窄( $M_w/M_n = 1.07$ )的嵌段共聚物,酰化反应产率达 70% 以上。同时聚乙二醇和 *N*<sup>ε</sup>-苄氧羰基-L-赖氨酸被引入到聚乳酸主链中,在聚合物侧链脱保护后有望改善聚乳酸的细胞亲和性。

**关键词** 聚乳酸-*b*-聚(*N*<sup>ε</sup>-苄氧羰基-L-赖氨酸)-*b*-聚乙二醇三嵌段聚合物,聚乙二醇,聚乳酸,聚 *N*<sup>ε</sup>-苄氧羰基-L-赖氨酸, *N*<sup>ε</sup>-苄氧羰基-L-赖氨酸酐(Lys(Z)-NCA)

聚乳酸(PLA)是一种具有良好生物相容性的可降解聚酯,在医学和药学领域,已得到广泛应用<sup>[1-4]</sup>。然而,PLA 因为没有可功能化的高活性基团引发化学反应,而且其表面是疏水性基团,从而限制了其应用范围。为了改善其性能,许多研究者通过引入各种亲水基团,如合成组成为 PLA-PEG-PLA 片段的 ABA 型的三嵌段聚合物<sup>[5]</sup>。聚乙二醇(PEG)具有无毒、无免疫原性、极好的亲水性、良好的生物相容性<sup>[6-8]</sup>等优点而经常被用于修饰蛋白质药物,在生物医用材料方面得到了广泛应用;聚赖氨酸(PZLL)由于具有低免疫原性和相对安全性等方面的优势,与人体具有良好的相容性,而且其代谢产物能被人体吸收或通过新陈代谢途径及时排出体外,不影响组织的生长<sup>[9,10]</sup>。非离子亲水的 PEG 与聚赖氨酸及聚乳酸结合后,有望通过控制聚合物的分子量和亲疏水嵌段的比例调节共聚物的各种性能,并可以减少血清蛋白质的调理作用,进一步拓展 PZLL 衍生物在药学和组织工程等领域的应用。有研究者报道过从 PEG-PLA 制备 PEG-PLA-PLL 三嵌段聚合物<sup>[11-13]</sup>,本文用聚乙二醇作为亲水段,聚乳酸作为疏水段,聚(*N*<sup>ε</sup>-苄氧羰基-L-赖氨酸)既可作为疏水段,也可作为潜在的亲水段,结合开环聚合和共价偶联方法,以

PLA-NH<sub>2</sub> 引发 Lys(Z)-NCA 开环聚合再和 mPEG-COOH 酰化合成了聚乳酸-*b*-聚(*N*<sup>ε</sup>-苄氧羰基-L-赖氨酸)-*b*-聚乙二醇三嵌段聚合物,有望应用于生物医学领域,且方法简单,产率较高。

### 1 试剂和仪器

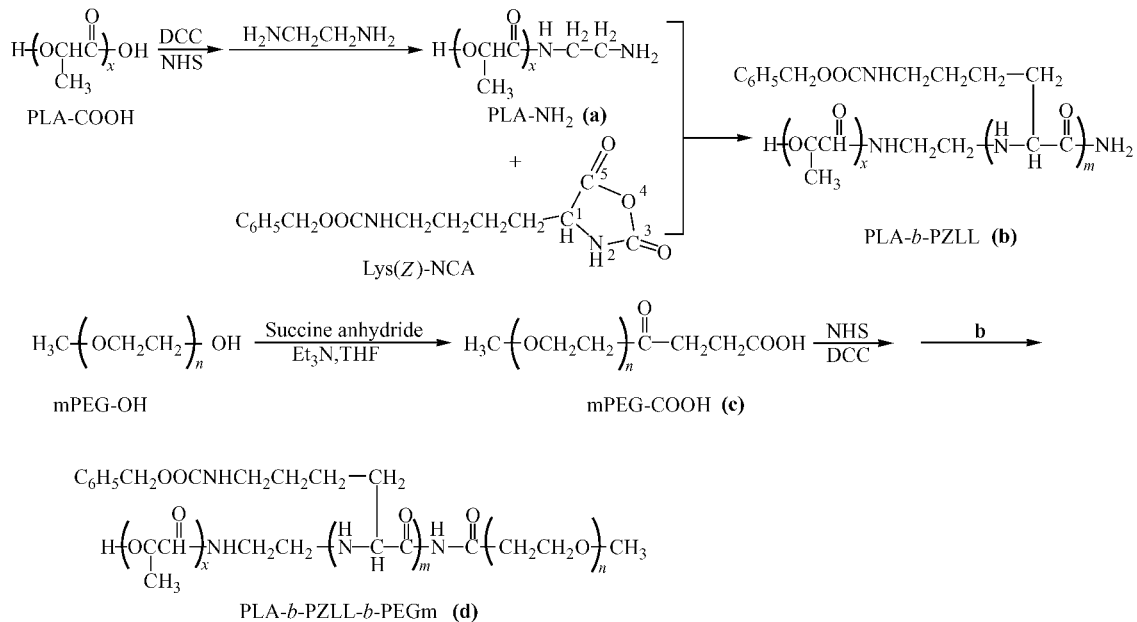
*N*<sup>ε</sup>-苄氧羰基-L-赖氨酸酐(Lys(Z)-NCA)自制<sup>[8,14]</sup>。聚乙二醇单甲醚( $M_n = 5000$ ) (Fluka 公司,美国),*N*<sup>ε</sup>-苄氧羰基-L-赖氨酸和三光气(TCI 公司,日本),端羧基聚乳酸(PLA-COOH,  $M_n = 5000$ , 济南岱罡生物科技有限公司),琥珀酸酐,乙二胺,*N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS),*N,N'*-二环己基碳二亚胺(DCC)直接使用;四氢呋喃、正己烷,*N,N*-二甲基甲酰胺,三乙胺使用前用标准方法无水处理;其它试剂均为分析纯,直接使用。

Varian INOVA-400 型核磁共振仪,溶剂为 CDCl<sub>3</sub>, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 内标为 TMS; FD-5DX 型红外光谱仪(KBr 压片); JEOL-1230 型透射电镜(TEM, 100 kV); PL-50 型凝胶渗透色谱仪(GPC, 英国),单分散性线性聚苯乙烯标样作参比, THF 为流动相,流速为 1.0 mL/min。

### 2 嵌段共聚物的合成

嵌段共聚物的合成步骤如下<sup>[15]</sup>:

\* 2009-11-10 收稿, 2009-12-23 修稿;国家自然科学基金(基金号 20874025)和教育部新世纪优秀人才(项目号 NCET-07-00273)资助项目; \*\* 通讯联系人, E-mail: jnxiang@hnu.cn; mqzhu@hnu.cn



2.1 端氨基聚乳酸 (PLA-NH<sub>2</sub>) 的合成 取 PLA-COOH (1 g, 0.2 mmol) 溶于 25 mL 干燥的 CHCl<sub>3</sub> 中, 磁力搅拌, 冰水浴, 加入 DCC (197.6 mg, 1 mmol) 和 NHS (127 mg, 1 mmol), 在 N<sub>2</sub> 保护下, 0℃ 搅拌反应 2 h, 自然升至室温, 搅拌反应 24 h. 将乙二胺 (0.63 mL, 0.2 mmol) 缓慢滴加到上述已活化的反应液中, 室温下反应 24 h. 产物经无水乙醚沉淀, 过滤, 真空干燥, 得产物 a 0.86 g, 产率 85.9%.

## 2.2 两嵌段共聚物 PLA-*b*-PZLL-NH<sub>2</sub> 的合成

Lys(Z)-NCA (1.5 g, 4.9 mmol) 溶解在 12 mL DMF 中, PLA-NH<sub>2</sub> 0.4 g 溶于 12 mL DMF 并加入其中, 通入干燥的 N<sub>2</sub> 气, 搅拌, 40℃ 反应 72 h, 减压蒸出溶剂后用 CHCl<sub>3</sub> 溶解, 然后用过量的无水乙醚沉淀, 过滤, 真空室温抽干, 得棕黄色沉淀 b 1.4 g, 产率为 75.8%. 该反应是端氨基聚乳酸的伯氨基进攻 Lys(Z)-NCA 的 C5 引发的阴离子开环聚合, 因为脂肪族伯氨的亲电性比链末端氨基要强, 引发比增长要快, 因此, 所有的引发剂均参与聚合. 在生成的聚合物中, 除了两嵌段共聚物外, 还有第一步可能残留的极少量未氨基化的聚乳酸. 在产物后处理时, 先将聚合物溶解在 CHCl<sub>3</sub> 中, 再用无水乙醚沉淀即可有效的除去其中的聚乳酸. 虽然聚乳酸也能在无水乙醚中沉淀, 但在 CHCl<sub>3</sub> 存在下聚乳酸不会从无水乙醚中沉淀<sup>[16]</sup>. 另外反应对水、O<sub>2</sub> 极其敏感, 所以反应应在无水的 N<sub>2</sub> 气保护中进行.

2.3 聚乳酸-*b*-聚(*N*<sup>ε</sup>-苄氧羰基-L-赖氨酸)-*b*-聚乙二醇 (PLA-*b*-PZLL-*b*-mPEG) 三嵌段聚合物的合成 将 mPEG-OH (5 g, 1 mmol) 和琥珀酸酐 (0.5 g, 5 mmol) 溶解在 10 mL THF 中, 加入 0.1 mL Et<sub>3</sub>N, 加热回流 24 h 所得的反应混合物用氯仿: 甲醇 = 10:1 (V/V) 的淋洗剂洗脱 (淋洗剂中加入两滴浓 HCl), 柱后产品减压抽干得白色固体端羧基聚合物 c 4.9 g, 产率为 89.1%. 将 c (1 g, 0.2 mmol) 溶于 25 mL 干燥的 CHCl<sub>3</sub> 中, 磁力搅拌, 冰水浴, 加入 DCC (0.12 g, 0.6 mmol) 和 NHS (0.07 g, 0.6 mmol), 在 N<sub>2</sub> 保护下, 0℃ 搅拌反应 b 2 h, 自然升至室温, 搅拌反应 24 h. 将共聚物 (1.1 g, 0.6 mmol) 溶于 30 mL 干燥的 CHCl<sub>3</sub> 中, 缓慢滴加到上述已活化的溶液中, 密封, 室温下反应 24 h. 反应产物滴加入 90 mL 无水乙醚, 过滤, 沉淀真空干燥得浅绿色黏稠状固体 d 1.5 g, 产率为 72.0%. 该反应是通过聚乙二醇的端羧基在 NHS 的存在下活化以后再与端氨基两嵌段聚合物发生酰反应而生成最终产物, 反应过程简单, 产率达到了 72%.

## 3 共聚物 PLA-*b*-PZLL-*b*-mPEG 胶束的制备

称取 10 mg PLA-*b*-PZLL-*b*-mPEG 共聚物, 溶于 10 mL THF 中, 量取 10 mL 二次水逐滴滴加到上述 THF 聚合物溶液, 室温下搅拌过夜, 减压除去 THF, 即得到水溶性嵌段共聚物胶束.

## 4 嵌段共聚物的结构及性能表征

4.1 IR 光谱 图 1(e) 是合成的聚合物的 IR 光谱图. 可以看出, 对于图 1(a) 中, 在 3340 cm<sup>-1</sup>

处有较强的 NH/OH 吸收峰,  $3065\text{ cm}^{-1}$  处为苯环的 C—H 伸缩振动吸收峰,  $1693\text{ cm}^{-1}$  为苯氧羰基的 C=O 处的羰基峰,  $1269\text{ cm}^{-1}$  处为苯环的 C—H 面内弯曲振动吸收峰, 说明赖氨酸的侧链上已经接上了苯氧羰基保护基,  $744$ 、 $700\text{ cm}^{-1}$  为苯环面外的变形振动吸收峰. 而在图 1(b), 图 1(c), 图 1(e) 中,  $3340$ 、 $3065$ 、 $1693$ 、 $1269$ 、 $744$ 、 $700\text{ cm}^{-1}$  的吸收峰均存在, 只是峰强度与宽度增加, 同时图 1(b) 中出现了明显的  $1855$  和  $1813\text{ cm}^{-1}$  处的酸酐羰基峰, 说明生成了酸酐. 在图 1(c) 中  $2943$  和  $1381\text{ cm}^{-1}$  为 PLA 的  $\text{CH}_3$  的伸缩振动吸收峰, 而图 1(c) 和图 1(e) 与图 1(b) 相比, 在图 1(b) 中出现的  $1855$  和  $1813\text{ cm}^{-1}$  处的酸酐羰基峰已经消失, 说明氨基 PLA 引发了酸酐的开环聚合. 同时 PLA 嵌段也存在于图 1(e) 的最后产物中. 图 1(d)  $2889\text{ cm}^{-1}$  为 PEG 的 C—H 伸缩振动和  $1107\text{ cm}^{-1}$  为 PEG 的 C—O 伸缩振动, 很明显, PEG 嵌段也存在于图 1(e) 中的最后产物中. 在图 1(c) 中出现了明显的  $1641$  和  $1539\text{ cm}^{-1}$  处的肽链的酰胺 I 峰和酰胺

II 峰, 表明了聚合反应的发生. 图 1(e) 和图 1(c) 相比,  $1641\text{ cm}^{-1}$  和  $1539\text{ cm}^{-1}$  处的肽链的酰胺 I 峰和酰胺 II 峰仍然存在, 并且均为单峰, 这是  $\alpha$ -螺旋形聚氨基酸的一个重要标志<sup>[17]</sup>. 可以证明所合成的嵌段共聚物均具有  $\alpha$ -螺旋结构.

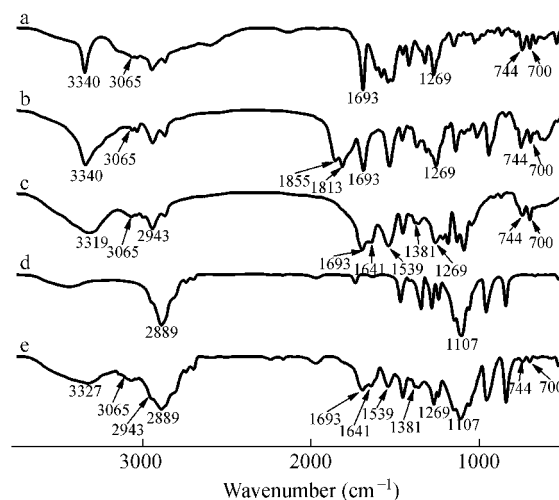


Fig. 1 IR spectra of Lys(Z) (a), Lys(Z)-NCA (b), PLA-PLL(Z) (c), MPEG-COOH (d) and block copolymer (e)

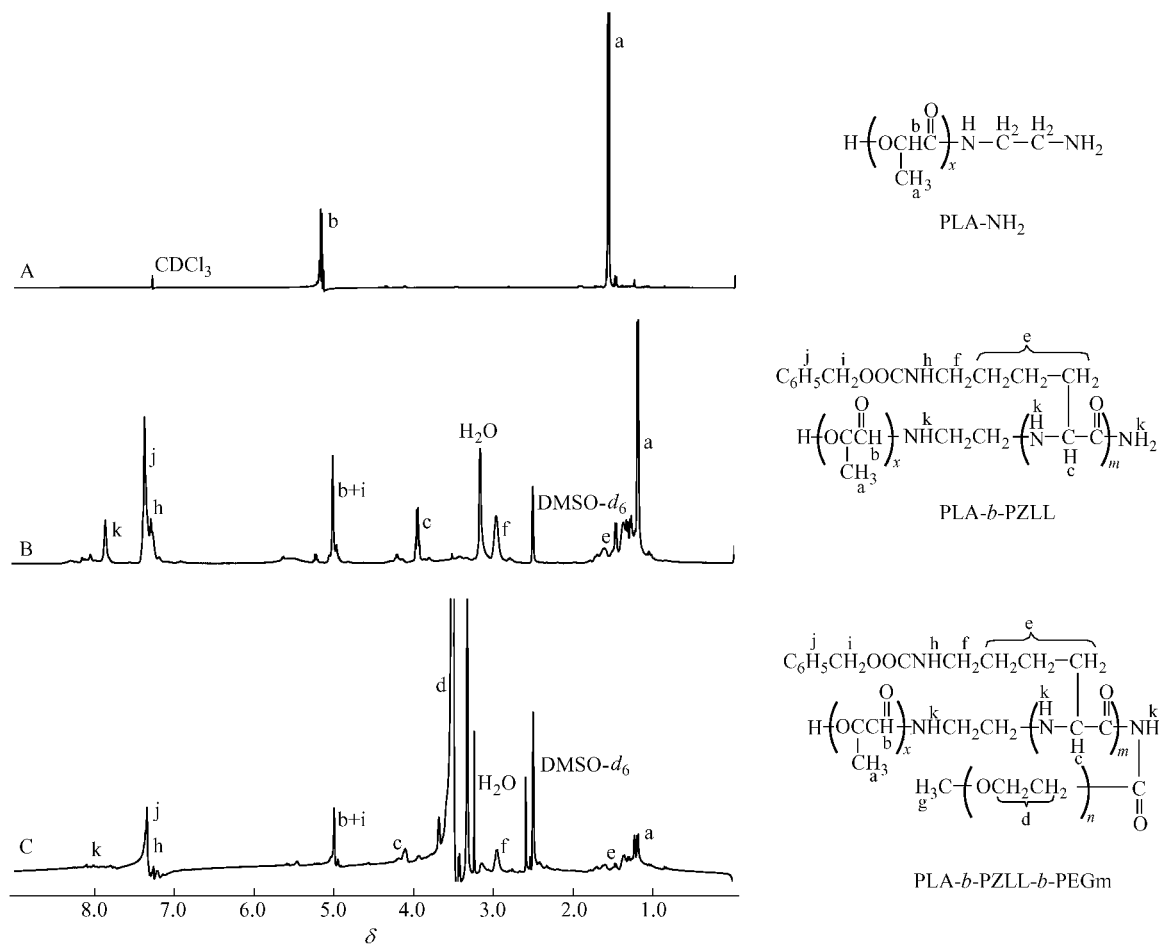


Fig. 2  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of block copolymers

4.2 <sup>1</sup>H-NMR 谱 嵌段共聚物的化学位移和对应的质子如图 2 所示.

各峰的归属如下:图 2(A)中,δ 5.0(Hb)是聚乳酸嵌段—CH 质子和 δ 1.30(Ha)是聚乳酸嵌段的—CH<sub>3</sub> 质子的特征共振峰;图 2(B)中,不仅在 δ 5.0(Hb)和 δ 1.23(Ha)出现了聚乳酸质子的特征共振峰,而且在 δ 7.82(Hk)、δ 7.30(Hj)、δ 7.25(Hh)、δ 5.0(Hi)、δ 3.94(Hc)、δ 2.96(Hf)和 δ 1.48~1.23(He)还出现了苄氧羰基赖氨酸酸酐的特征峰,说明端氨基的 PLA 引发了赖氨酸酸酐的开环聚合.图 2(C)中,不仅除了有 δ 3.64(Hd)是嵌段 PEG 中—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—的质子峰和 δ 3.38(Hg)是 mPEG 上的端甲基质子峰外,同时还有聚乳酸和聚(*N*<sup>ε</sup>-苄氧羰基赖氨酸)的特征峰,表明这个聚合物中同时存在 PEG 嵌段、PLA 嵌段和 PZLL 的嵌段.说明已合成了三嵌段共聚物 d.

FTIR 与 <sup>1</sup>H-NMR 的分析肯定了所合成的三嵌段共聚物 d,且纯度较高,根据共聚物的 <sup>1</sup>H-NMR 谱图 2(C)中聚乳酸嵌段的—CH(δ 5.0, Hb)和聚(*N*<sup>ε</sup>-苄氧羰基赖氨酸)嵌段的 ε-CH<sub>2</sub>(δ 2.96, Hf)的峰面积之比,用如下的公式  $MP_{PZLL} = (5000) / (72) \times 262 \times A(\delta 2.96) / [2A(\delta 5.0 \sim 2.96)]$ ,可以推算出所得的两嵌段聚合物 PZLL-*b*-PLA 中 PZLL 的数均相对分子量为 9100,式中, A 为峰面积,72 为 PLA 的聚合度,262 是 PZLL 重复单元的分子量,2 是 PZLL 链段中 ε-CH<sub>2</sub> 中氢原子的个数.而三嵌段聚合物的分子量  $M_n$  (PLA-*b*-PZLL-*b*-mPEG) =  $M_n$  PEG (5000) +  $M_n$  (PZLL) +  $M_n$  PLA (5000),由此计算所得该三嵌段聚合物的分子量为 19100.

4.3 GPC 测量 产物 d 的 GPC 测试结果如图 3 所示.其测试结果列于表 1.表中可见,分子量的分布较窄,而且 GPC 流出曲线为单峰,说明产物为单一物质.从共聚物 GPC 图中可知 PLA-NH<sub>2</sub> 完全与 Lys(Z)-NCA 反应,没有均聚物或环状物的生成.但从表中也可以看出,由 GPC 测得的分子量与通过 <sup>1</sup>H-NMR 谱算得的分子量差别较大,这是因为 GPC 测量是以聚苯乙烯为标准样品,只有聚合物和聚苯乙烯在溶剂中的状态完全一致,GPC 的测量结果才能与实际相符.而由 <sup>1</sup>H-NMR 谱峰面积比计算分子量是一种绝对方法,不会受到其它因素的影响,因此,聚合物的分子量应该以 <sup>1</sup>H-NMR 谱测定结果为准.

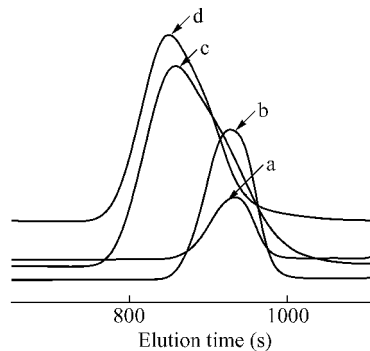


Fig. 3 GPC traces of (a) PLA-COOH, (b) PLA-NH<sub>2</sub>, (c) PLA-*b*-PZLL and (d) PLA-*b*-PZLL-*b*-mPEG

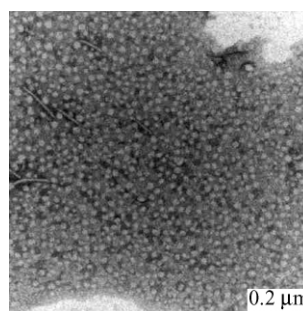


Fig. 4 Transmission electron micrographs of copolymer PLA-*b*-PZLL-*b*-mPEG

Table 1 GPC Characterization of the block copolymer

Polymer	$M_n^a$	$M_n^b$	$M_w^b$	$M_w^b/M_n^b$
PLA-COOH	5000	7000	8800	1.25
PLA-NH <sub>2</sub>	5000	7600	9700	1.28
PLA- <i>b</i> -PZLL	14100	14500	15000	1.03
PLA- <i>b</i> -PZLL- <i>b</i> -PEGm	19100	15500	16600	1.07

PLA: poly (lactic acid); PLA-*b*-PZLL: amino-end poly(*N*<sup>ε</sup>-carbobonyloxy-L-lysine)-*b*-poly (lactic acid); PLA-*b*-PZLL-*b*-mPEG: poly (ethylene glycol)-*b*-poly (*N*<sup>ε</sup>-carbobonyloxy-L-lysine)-*b*-poly (L-lactic acid); <sup>a</sup> As determined by <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy; <sup>b</sup> As determined by GPC

4.4 嵌段共聚物自组装胶束形貌 图 4 是胶束 PELLA 冷冻干燥后重新分散于水,再滴加在铜网上,经磷钨酸负染后的透射电镜照片,从图中可以看到,胶束为类球形,具有良好的尺寸均一性和单分散性,粒径约为 30~40 nm.

## 5 结论

采用氨基的苄氧羰基保护,用光气法制备,端氨基聚乳酸引发聚合,最后引入端羧基聚乙二醇,这个方法简单易行,最后酰化制备的三嵌段聚合物可获得很好的产率(70%以上),其相对分子量可由单体/引发剂摩尔比控制.所得双亲性嵌段

共聚物在溶液中很易组装成规整的球形胶束. 有 究正在进行.  
 关侧链脱保护后的共聚物作为基因载体的应用研 致谢 衷心感谢李子臣教授对本文给予的宝贵意见.

### REFERENCES

- 1 Eling S ,Gogolewski B ,Pennings J A. *Polymer* ,1982 ,23:1587 ~ 1590
- 2 Jeoung Y S ,Kim W S. *Arch Pharm Res* ,1986 ,9:63 ~ 66
- 3 Kricheldorf R H ,Kreiser-Samders I. *Macromol Symp* ,1996 ,103:85 ~ 89
- 4 Langer R. *Acc Chem Res* ,2000 ,33:94 ~ 98
- 5 Ouchi T ,Uchida T ,Arimura H ,Ohya Y. *Biomacromolecules* ,2003 ,4:477 ~ 480
- 6 Harris J M. *Poly(ethylene glycol) Chemistry:Bio-technical and Biomedical Applications*. New York:Plenum Press ,1992. 1 ~ 10
- 7 Deible C R ,Petrosko P ,Johnson P C. *Biomaterials* ,1998 ,19(20):1885 ~ 1893
- 8 Yang Zigang(杨子刚) ,Yuan Jianjun(袁建军) ,Cheng Shiyuan(程时远). *Chinese Journal of Applied Chemistry(应用化学)* ,2004 ,21(6): 637 ~ 640
- 9 Varga C M ,Tedford N C ,Thomas M ,Klibanov A M ,Griffith L G ,Lauffenburger D A. *Gene Ther* ,2005 ,12:1023 ~ 1032
- 10 Pan Shirong(潘仕荣) ,Shi Feng(施锋) ,Huang Ningfang(黄宁芳). *Chinese J Biomed Eng(中国生物医学工程学报)* ,1993 ,12(2): 161 ~ 163
- 11 Deng C ,Chen X S ,Yu H J ,Sun J ,Lu T C ,Jing X B. *Polymer* ,2007 ,48:139 ~ 149
- 12 Park S ,Healy K E. *Bioconjugate Chem* ,2003 ,14:311 ~ 319
- 13 Peng H ,Xiao Y ,Mao X L ,Chen L ,Ross C ,Andrew K W. *Biomacromolecules* ,2009 ,10:95 ~ 104
- 14 Hu Haimei(胡海梅) ,Pan Shirong(潘仕荣) ,Wen Yuting(温玉婷) ,Guo Zhenhuan(郭振寰). *Acta Scientiarum Naturalium University of Sunyatseni(中山大学学报)* ,2006 ,45(1):64 ~ 68
- 15 Yuan Jianjun(袁建军) ,Li Xiaoqin(李小琴) ,Cheng Shiyuan(程时远). *Chem J Chin U(高等学校化学学报)* ,2003 ,(2):371 ~ 373
- 16 Cho C ,Jo B W ,Kwong J K. *Macromol Chem Phys* ,1994 ,195:2195 ~ 2199
- 17 Fasman G D ,Idelsin M ,Blout E R. *J Am Chem Soc* ,1975 ,74:38 ~ 41

## SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF AMPHIPHILIC TRIBLOCK COPOLYMERS PEG-POLY(*N*<sup>ε</sup>-CBZ-LYSINE)-POLY(LACTIC ACID)

XIANG Li , LONG Feng , YANG Ke , FAN Junbing , XIANG Jiannan , ZHU Mingqiang

( State Key Laboratory of Chemo/Biosensing and Chemometrics , School of Chemistry and Chemical Engineering , Hunan University , Changsha 410082 )

**Abstract** A poly(lactic acid)-based block copolymer was synthesized in order to increase the cell adhesion of poly(lactic acid). Lys(Z)-NCA was first synthesized from *N*<sup>ε</sup>-carbobenzyloxy-L-lysine and triphosgene in THF. Diblock copolymers amino-ended poly(*N*<sup>ε</sup>-carbobenzyloxy-L-lysine)-*b*-poly(lactic acid) were synthesized in DMF in the condition that amino-ended PLA was used as initiator. Amphiphilic triblock copolymers poly(L-lactic acid)-*b*-poly(*N*<sup>ε</sup>-carbobenzyloxy-L-lysine)-*b*-poly(ethylene glycol) were synthesized in CHCl<sub>3</sub> in the condition that amino-ended poly(lactic acid)-*b*-poly(*N*<sup>ε</sup>-carbobenzyloxy-L-lysine) was acylated by carboxyl-terminal poly(ethylene glycol). The block copolymers were characterized *via* IR (infrared spectroscopy) , <sup>1</sup>H-NMR (nuclear magnetic resonance) , GPC (gel permeation chromatography) and TEM (transmission electron micrographs). The results revealed that triblock copolymers with controlled *M*<sub>n</sub> and narrow molecular weight distribution (*M*<sub>w</sub>/*M*<sub>n</sub> = 1.07) were synthesized , the acylation reaction yield was more than 70%. Poly(ethylene glycol) and *N*<sup>ε</sup>-carbobenzyloxy-L-lysine were introduced into the main chain of poly(lactic acid) and a kind of ideal bioabsorbable polymer materials were obtained.

**Keywords** Poly(ethylene glycol)-*b*-poly(*N*<sup>ε</sup>-carbobenzyloxy-L-lysine)-*b*-poly(lactic acid) triblock copolymer , poly(ethylene glycol) , Poly(lactic acid) , Poly(*N*<sup>ε</sup>-carbobenzyloxy-L-lysine) , Lys(Z)-NCA