

2 聚合物 PLGA-PEG-PLGA 的合成及表征

鉴于聚合物作为药物载体在医药中应用的优势,各种新型两亲共聚物被研究合成,其中以 GA、LA 和 PEG 为原料合成的 ABA 型、BAB 型及 AB 型嵌段共聚物被广泛研究(其中 A 代表 PEG, B 代表 PLGA)。PLGA 和 PEG 是常见的医用、药用材料,且均被食品及药物管理局(FDA)批准作为医用材料。PLGA 段是疏水的聚酯,可在体内降解为乳酸和羟基乙酸,参与人体代谢,被广泛用于药物缓释胶囊材料、外科手术缝线、骨科内固定材料等。通过调节 GA 与 LA 的用料比例,可以调节 PLGA 段的亲疏水性和降解速率。PEG 段具有亲水性,独特的生物相容性,无毒性,无抗原性和免疫原性,常用于修饰疏水性药物,改变药物在体内的分布。除此之外,这种类型的共聚物在水溶液中可自组装成为胶束,且具有温度敏感性。

合成 PLGA-PEG-PLGA 的路线有两种^[11]: 缩合共聚法和开环聚合法。缩合共聚法是用乳酸、羟基乙酸先行聚合生成低聚 PLGA,将其作为 B 段,然后将 PLGA 与 PEG(A 段)按比例反应生成 PLGA-PEG-PLGA。此法简单,易操作,但得到的共聚物产率低、热敏性小。开环聚合法则利用丙交酯、乙交酯和 PEG 按比例在一定条件下聚合得到嵌段聚合物。该法需要先利用乳酸和羟基乙酸合成丙交酯和乙交酯,成本高,操作复杂,但该方法产率高,聚物理化性质理想,重现性好。

2.1 材料和仪器

2.1.1 材料

D, L-丙交酯、乙交酯(济南岱罡生物技术有限公司)

PEG1000(天津天泰精细化学品有限公司)

PEG1500(成都科龙化工试剂厂)

辛酸亚锡(美国 Sigma 试剂公司)

乙酸乙酯(重庆川东化工有限公司)

氯仿(重庆川东化工有限公司)

纯氮(重庆创亿气体有限公司,纯度:99.99%)

蒸馏水(minipore 纯水机)

2.1.2 仪器

603 精密恒温油浴(重庆银河试验仪器有限公司)

高速搅拌器 D90-2F(杭州仪表电机厂)

电热恒温水浴锅(北京长风仪器仪表公司)

精密电子天平（上海恒平科学仪器有限公司）
冷冻干燥机（北京德天佑科技发展有限公司）
超声清洗机（无锡上佳生物科技有限公司）
AVANCE-500 超导核磁共振仪（德国 BRUKER 公司）
傅里叶变换红外光谱仪（PerkinElmer 公司）
接触角测量仪（台湾翰光高科技股份有限公司）

2.2 实验方法

2.2.1 PLGA-PEG-PLGA 的制备

① 丙交酯的纯化

重结晶法：将购买的丙交酯放入烧杯，加入体积大约是丙交酯体积 3 倍的乙酸乙酯，水浴加热使丙交酯完全溶解，然后将丙交酯-乙酸乙酯溶液置于室温冷却后，再放入冰箱继续冷却过夜。待丙交酯晶体析出停止后，抽滤、真空干燥，放入干燥器，备用。重结晶 3 次。因乙交酯购买保存时间短，无需纯化。

② PLGA-PEG-PLGA 的合成

开环聚合法^[12]：在氮气保护下，将 PEG 加入三颈瓶中。160℃油浴，搅拌干燥 2h。再加入丙交酯（5.673g）和乙交酯（1.74g），继续搅拌 30min 后，停止搅拌，并加入 2 滴辛酸亚锡，150℃氮气保护下反应 8h，得到粗产品。为考察不同组成对聚合物性质的影响，设计两组样品，样品 A：PEG1000：PEG1500 为 1：1（质量比），共 3g；样品 B：仅采用 PEG1000(3g)。

2.2.2 PLGA-PEG-PLGA 的纯化

将得到的粗产品加入蒸馏水，低温下搅拌待其充分溶解后，将聚合物水溶液置 80℃水浴中使其完全沉淀，去除上清液中含有未反应的单体及低分子物质。溶解-沉淀过程重复三次。将最后一次纯化得到的沉淀物冷冻干燥，于-20℃低温保存备用。

2.3 表征

2.3.1 IR 测定

将样品 A 溶于氯仿，制备 15mg/mL 样品氯仿溶液。取压制好的 KBr 片，分别将氯仿及溶有样品的氯仿滴于 KBr 片上。红外灯下干燥后，前者作为空白片，在 Spectrum GX 傅立叶红外光谱仪上测定样品的化学结构。

2.3.2 ¹H-NMR 测定

以氘代氯仿 CDCl₃ 为溶剂，四甲基硅烷（TMS）为内标，室温下使用 AVANCE-500 超导核磁共振仪测定聚合物的化学结构。

2.3.3 分子量测定

利用核磁共振图谱，端基分析法计算聚合物的平均分子量 (M_n) [3]。

2.3.4 静态接触角测定

采用坐点 (Sessile Drop) 法测定水与样品的接触角。将材料溶于氯仿后在显微镜载玻片上溶液浇注成膜，在室温下使氯仿挥发完全。将铺有材料薄膜的载玻片固定在接触角测定仪的载玻台上，用精确度为 $0.1\mu\text{L}$ 的微量注射器吸取 $5\mu\text{L}$ 蒸馏水滴到膜表面，在放大倍数为 $10\times$ 的显微镜下观察液滴轮廓，读数并拍照。测定温度为 25°C ，测定 3 组样品，每组样品表面上分别选取 3 处测定静态水接触角，并计算平均值。

2.4 结果与讨论

2.4.1 PLGA-PEG-PLGA 的合成

丙交酯和乙交酯长期不使用，容易吸潮开环生成乳酸和羟基乙酸。在合成聚合物时，要求原料具有相对高的纯度，特别是合成高分子聚合物。所以在合成聚合物前需将丙交酯和乙交酯纯化。经过三次重结晶后的丙交酯是白色片状晶体。

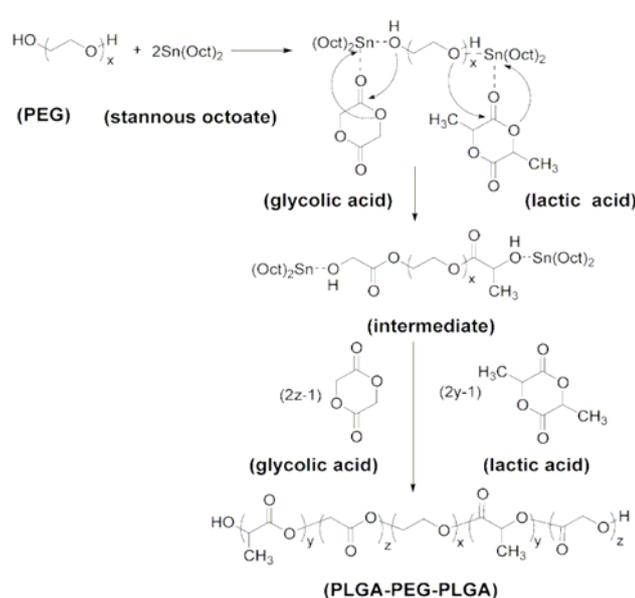


图 2.1 聚合物 PLGA-PEG-PLGA 的合成机理图

Fig.2.1 The synthetic scheme of PLGA-PEG-PLGA triblock copolymer

以 PEG1000、PEG1500、D,L-LA 和 GA 为原料，催化剂为辛酸亚锡，利用开环聚合法得到三嵌段共聚物 PLGA-PEG-PLGA，其合成机理路线图如图 2.1^[5]所示。所得产物在室温下为粘弹性、易拉丝、透明的固体。因共聚物主链由饱和单键构成（醚键、酯键），分子链可以围绕单键进行内旋转，各组成物质之间没有化学交

联共聚物,且分子量不大等因素导致了所得聚合物具有较低的玻璃化温度(T_g)^[13],故 PLGA-PEG-PLGA 在室温下为粘弹性而非坚硬的固体。Young Min Kwon^[14]等人合成 PLGA-PEG-PLGA ($M_w \sim 4000, 1500-1000-1500$) 的玻璃化温度为 -3°C 左右。

2.4.2 红外吸收光谱分析

对共聚物样品A进行IR表征,结果如图2.2,此图谱与已报道文献的结论一致^[15]。该IR谱中,在 $\delta=3509.24\text{cm}^{-1}$ 附近宽吸收峰为两端的OH吸收峰, $\delta=2877.54\text{cm}^{-1}$ 为C-H的伸缩震动吸收峰, $\delta=1756.28\text{cm}^{-1}$ 为酯羰基C=O的伸缩震动吸收峰, $\delta=1455.62\text{cm}^{-1}$ 为C-C的一系列伸缩震动吸收峰, $\delta=1186.28\text{cm}^{-1}$ 为酯键的C-O伸缩震动吸收峰, $\delta=1094.86\text{cm}^{-1}$ 为PEG中醚键C-O-C的伸缩震动吸收峰。

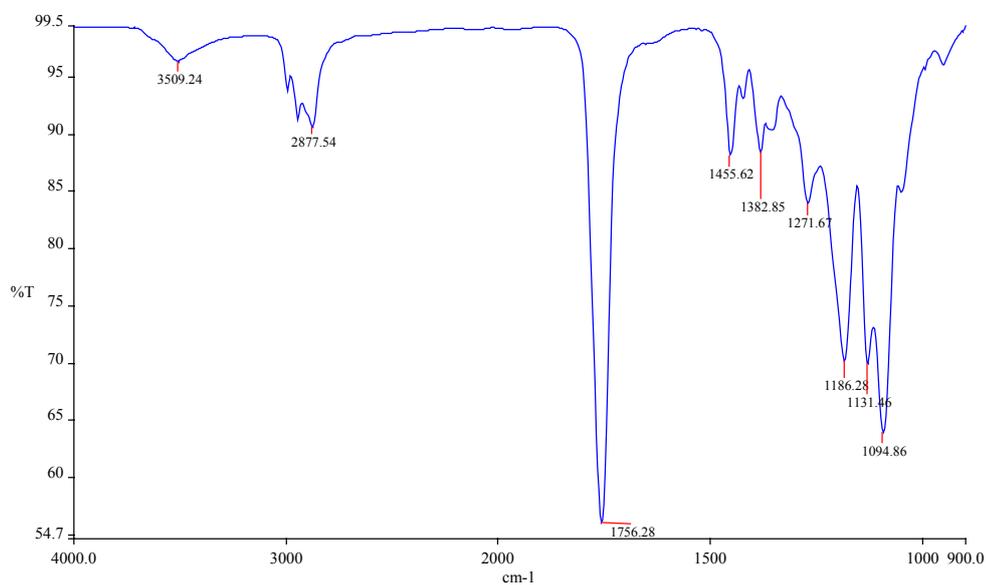


图 2.2 PLGA-PEG-PLGA 的红外吸收光谱图

Fig.2.2 The typical IR spectra of PLGA-PEG-PLGA copolymer

2.4.3 核磁共振图谱分析

利用核磁共振对样品 A 和 B 分别进行化学结构的分析,结果见图 2.3。共聚物样品的核磁共振图谱中的各峰归属及其面积,见表 2.1。

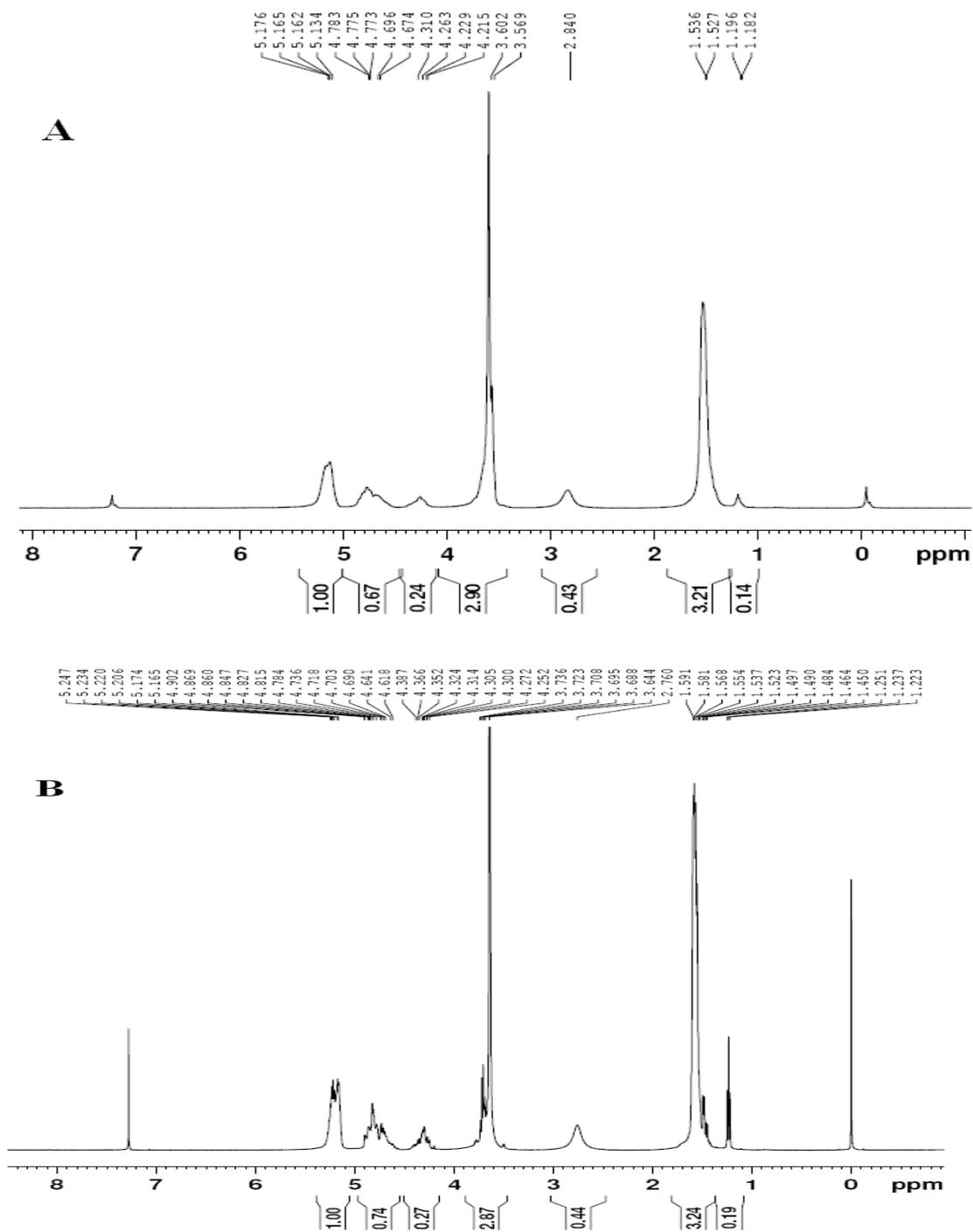


图 2.3 聚合物 PLGA-PEG-PLGA 的 $^1\text{H-NMR}$ 图谱, (A)样品 A, (B)样品 B.

Fig.2.3 The typical $^1\text{H-NMR}$ spectra of PLGA-PEG-PLGA triblock copolymer.

(A) Sample A, (B) sample B

表 2.1 共聚物核磁共振峰的归属及面积

Table 2.1 The adscription and area of resonance peaks in ¹H-NMR spectra

样品 A		样品 B		峰归属
位移 (ppm)	面积	位移 (ppm)	面积	
1.182	0.14	1.237	0.19	CH ₃ (LA)
1.527	3.21	1.523	3.24	CH ₃ (LA)
3.569	2.9	3.644	2.87	CH ₂ (PEG)
4.263	0.24	4.324	0.27	CH ₂ (PEG)
4.775	0.67	4.815	0.74	CH ₂ (GA)
5.162	1.00	5.206	1.00	CH (LA)

2.4.4 聚合物分子量的测定

测定合成聚合物的分子量，比低分子物质要困难的多，这不仅是由于其分子量比低分子大几个数量级，而且还由于其分子量的多分散性所致。常用于高聚物分子量测定的方法有：凝胶渗透色谱法（GPC），端基化学分析法，粘度法，光散射法等。

聚合物分子量测定应用较多的是GPC法，它根据聚合物分子链流体力学体积大小的比较来测定聚合物相对分子质量（以下简称分子量）的，测得的聚合物分子量与聚合物分子链在溶剂中的构象有关^[16]。两亲性嵌段共聚物分子链中亲水链段和亲油链段的极性差异很大，几乎在任何溶剂中它们的构象都不相同，因此，用GPC法很难准确测定两亲性嵌段共聚物的分子量。核磁共振法测聚合物¹H-NMR谱的结果与聚合物的构象无关，只与质子的化学环境有关，因此通过有关质子峰的积分面积比应能比较准确地测定两亲性嵌段聚合物的分子量和组成^[17]。

本文根据材料的¹H-NMR 图谱和分子结构式，应用端基分析法计算材料的平均分子量（ M_n ），计算过程如下：

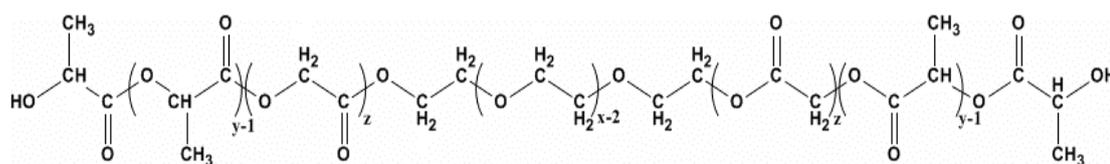


图 2.4 PLGA-PEG-PLGA 的分子结构

Fig.2.4 The molecular structure of PLGA-PEG-PLGA copolymer

$$A = \begin{cases} \frac{y-1}{1} = \frac{A_{1.527}}{A_{1.182}} \\ \frac{2z}{3} = \frac{A_{4.775}}{A_{1.182}} \end{cases} \quad B = \begin{cases} \frac{y-1}{1} = \frac{A_{1.523}}{A_{1.237}} \\ \frac{2z}{3} = \frac{A_{4.815}}{A_{1.237}} \end{cases}$$

对样品 A: PEG1000 与 PEG1500 的摩尔比为 3:2, 则 PEG 的平均分子量为 $1000 \times 0.6 + 1500 \times 0.4 = 1200$ 。根据公式 $M_n = y \times 2 \times 72 + z \times 2 \times 58 + 1200$ 计算分子量; 对样品 B: PEG 的分子量为 1000, 根据公式 $M_n = y \times 2 \times 72 + z \times 2 \times 58 + 1000$ 计算分子量, 结果见表 2.2。

由表 2.2 可知: 聚合物 A 的平均分子量大于聚合物 B。催化剂辛酸亚锡在聚合过程中主要对 LA 和 GA 起催化开环作用, PEG 的端羟基诱导聚合反应发生。当聚合反应系统中含有的端羟基数量越多, 合成的聚合物分子量就越小。对于样品 B, PEG 组成为单一分子量 1000。相同质量下的 PEG, PEG1000 所含的端羟基数目大于 PEG1000 与 PEG1500 混合的。故样品 B 的平均分子量小于样品 A。理论推测与实际所测定的 M_n 相符。

表 2.2 聚合物的平均分子量和静态水接触角

Table 2.2 average molecular weight and static water contact angle of copolymer

样品	y	z	M_n	静态水接触角 ($^\circ$)
A	23.929	7.179	5478	21.445
B	18.053	5.842	4277	24.1067

2.4.5 静态水接触角的测定

坐点法是一测量接触角的光学方法。这一方法可用来估计固体表面某一局部区域的润湿性。可直接测量介于液滴基线和液/固/流-三相接触点处的液/固-界面切线间的角度(接触角)。水接触角可反映固体表面的亲/疏水性。在许多亲水性表面, 一滴水滴上去后会形成一介于 $3-30^\circ$ 的接触角。在一些高疏水性、与水不相溶的表面, 水滴会在其上面形成一个大的接触角, 介于 $70-90^\circ$ 。水滴在某些表面的接触角可达到 $150-180^\circ$, 这些表面被称为超疏水性表面。从表 2.2 和图 2.5 可以看出: 样品 A 的水接触角小于样品 B, 即聚合物 A 较为亲水。

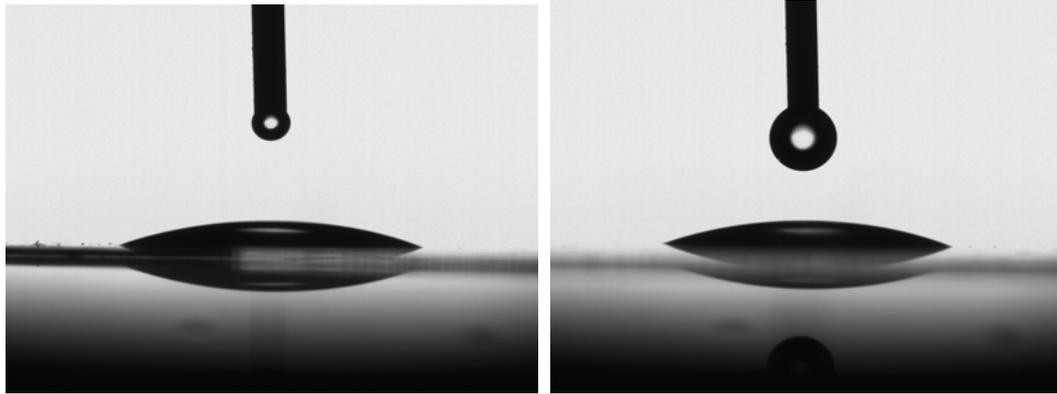


图 2.5 聚合物的静态水接触角，（左）样品 A，（右）样品 B

Fig.2.5 The static water contact angle of copolymer, (left) sample A, (right) sample B

2.5 小结

本章以 PEG1000、PEG1500、D,L-LA 和 GA 为原料，利用开环聚合法制备两种不同组成成分的三嵌段共聚物 PLGA-PEG-PLGA。利用红外吸收光谱和核磁共振对材料的化学结构表征。实验表明，合成的共聚物 PLGA-PEG-PLGA 的红外及核磁共振图谱与已有文章报道的结果相符。同时，端基分析法计算的聚合物的平均分子量符合理论推测的结果。材料的亲/疏水性通过静态水接触角测定表征，样品 A 的亲水性大于样品 B，所以选择样品 A 进行胶束制备。

3 胶束自组装行为及温度敏感性考察

PLGA-PEG-PLGA 是两亲三嵌段共聚物,它以疏水性的 PLGA 为分子链两端,以亲水性的 PEG 为中间段。在水中,分子链两端的 PLGA 段自发向内聚集成核,组成疏水性药物的贮存池,亲水的 PEG 链成环形分布在胶束表面。共聚物自组装成形貌类似花瓣型的胶束^[18-19]。

证明两亲聚合物在水中自组装成胶束的手段有许多,常见的有:增溶法、表面张力法^[20]、流变学实验等。随着科技的进步,许多先进的手段被发现,如:光散射法(DLS)^[18]、核磁共振(NMR)^[21]、芘探针荧光法^[22]、凝胶渗透色谱(GPC)、洗脱凝胶渗透色谱(EGPC)^[23]和环形伏安测量法等^[24]。本文采用核磁共振法和芘探针荧光法证明共聚物在水中的自组装行为,并用芘探针荧光法测定聚合物的临界胶束浓度(CMC)。

3.1 材料和仪器

3.1.1 材料

芘(美国 Sigma 试剂公司)

重水(D₂O)、氘代氯仿(CDCl₃)(北京崇熙科技孵化器有限公司)

蒸馏水(minipore 纯水机)

PBS(武汉博士德生物工程有限公司)

3.1.2 仪器

LS-50B 型荧光/磷光分光光度计(美国 Perkin Elmer 公司)

AVANCE-500 超导核磁共振仪(德国 BRUKER 公司)

UV752S 型紫外分光光度计(上海棱光技术有限公司)

3.2 实验方法

3.2.1 核磁共振法

称取聚合物样品 A 26mg,分别溶于 0.5mL 的重水和氘代氯仿中(内标为 TMS),室温下使用核磁共振仪测定样品的图谱。

3.2.2 芘探针荧光法

芘探针荧光法不仅可以证明聚合物在水中的自组装行为,还可以测定聚合物的 CMC。实验步骤如下:

① 溶液的配制

聚合物水溶液的配制:准确称取 20mg 聚合物,溶于 10mL 蒸馏水中,完全溶