生理条件下分子内环化自降解聚(4-羟基丁酸)衍生物

阚晓伟, 张丽晶, 李昭玥, 杜福胜*, 李子臣*

北京分子科学国家研究中心, 高分子化学与物理教育部重点实验室, 北京大学化学与分子工程学院, 北京 100871

*通讯作者, E-mail: fsdu@pku.edu.cn; zcli@pku.edu.cn

收稿日期: 2020-07-12; 接受日期: 2020-09-04; 网络版发表日期: 2020-09-28

国家重点研发计划(编号: 2016YFA0201400)和国家自然科学基金(编号: 21534001)资助项目

摘要 通过水溶低聚乙二醇异腈(OEG-NC)与(E)-4-氧杂-2-丁烯酸的Passerini多组分聚合反应以及聚合物的氢化反应制备了两种新型的水溶性聚(4-羟基丁酸)衍生物. 利用核磁共振(NMR)和凝胶渗透色谱详细研究了这两种聚合物在水溶液中的降解行为, 结果表明, 在37℃的磷酸缓冲溶液中(pD 7.4), 聚合物的分子量随时间延长逐步下降, 同时生成唯一的 γ -丁内酯衍生物, 其数量逐渐增加, 1 d后降解达到85%. 进一步比较了它们在磷酸缓冲溶液(pD 6.8)及混合溶液(pD 7.4缓冲溶液/丙酮)中的降解行为, 发现 γ -丁内酯衍生物仍是唯一的降解产物, 但由于降解环境pH或极性的降低, 降解速度明显减慢. 模拟聚合物的重复单元、端基以及降解产物结构, 设计合成了三种模型小分子化合物, 详细研究了它们在相同条件下的水解行为, 证明实验条件下酯键不会发生无规水解断裂, 确定了这类聚合物在磷酸缓冲溶液中的降解机理, 聚合物首先以从头到尾内环化的方式快速解聚为 γ -丁内酯衍生物, 随后该内酯化合物缓慢水解开环生成4-羟基丁酸盐类化合物.

关键词 聚(4-羟基丁酸)衍生物, Passerini多组分聚合, 解聚合, γ -丁内酯衍生物, 生理条件

1 引言

脂肪族聚酯, 特别是聚乳酸(PLA)、乳酸-乙醇酸共聚物(PLGA)以及聚己内酯(PCL), 由于具有良好的可降解性和生物相容性, 被广泛地用于药物载体、组织工程支架材料等生物医用领域^[1-6]. 脂肪族聚酯在生物体内的降解主要包括无规水解或者在水解酶作用下的降解, 为满足不同的生物需求, 需要对降解速率及降解产物进行精确调控^[7-10]. 一般而言, 通过共聚的方法增加聚酯的亲水性、降低其结晶性均可加速其降

解^[10-14], 精确序列结构的PLGA的降解速率更能被精确调控^[15,16]. 脂肪族聚酯的降解产物是由聚合物的结构决定的, 其水解或酶解产物通常是羟基酸类物质. 虽然这些羟基酸一般没有毒性或毒性较低, 但是其酸性往往会引起材料所处微环境中pH的下降^[17,18]. 当用于药物载体时, 会导致一些较敏感的包载物, 如蛋白类药物的变性或聚集^[19-21], 或者导致材料内部产生自催化效应, 加速材料的不可控降解^[8]. 刺激响应自牺牲聚合物是一类可同时调控聚合物降解速率和产物的新型聚合物体系^[22-24], 当聚合物端基被保护时, 聚合物

引用格式: Kan XW, Zhang LJ, Li ZY, Du FS, Li ZC. Poly(4-hydroxybutyric acid) derivatives with rapid self-degradation via intramolecular cyclization under physiological conditions. *Sci Sin Chim*, 2020, 50: 1449–1459, doi: 10.1360/SSC-2020-0131

是化学或热稳定的,一旦端基被去除,游离出的反应性端基促进高分子链内发生1,6-或1,4-消除及环化反应,聚合物发生从头到尾的顺序降解,生成结构确定的小分子化合物。目前的大多数体系存在合成困难、降解产物生物环境不友好等缺点,难以真正在生物体系获得应用。但将自牺牲连接基元的概念引入到聚合物体系,构筑刺激响应性纳米载体体系是实现聚合物在生物体内应用的重要策略^[25-27]。另外,将自牺牲思想用于刺激响应降解的聚酯、聚碳酸酯体系,通过在聚合物侧基(或末端)引入含保护基的羟基、氨基或巯基,当保护基团被脱除后,侧基官能团会进攻主链酯键或碳酸酯键,发生分子内环化反应,导致聚合物降解并生成中性小分子环状化合物,在生物医药领域有重要的应用价值^[28-35]。尽管这种分子设计能实现聚酯的刺激响应性可控降解,但由于降解方式为主链的无规断裂,降解产物不唯一。

基于五元环内酯衍生物在通常聚合条件下存在的开环聚合-解聚合平衡, Hong等^[36,37]在低温下采用高活性催化剂实现了 γ -丁内酯的开环聚合,得到了高分子量聚(4-羟基丁酸),在高温下将聚合物拉链式(unzip-ping)降解实现了单体回收。2014年,我们利用Passerini多组分聚合(P-3CR)并氢化所得聚合物制备了一类侧基含叔丁基的聚(4-羟基丁酸)衍生物^[38]。研究发现,该聚合物能在丙酮、二氯甲烷等溶剂中保持稳定,但在丙酮/水混合溶剂中,会发生从头到尾的自降解(示意图1),分子量随时间延长逐步下降,降解产物是唯一的 γ -丁内酯衍生物。但这种聚合物的降解速度太慢,不利于构筑自牺牲降解聚酯,也不能在生理条件下应用。考虑到促进这类聚酯降解的内环化反应为羟基到酯键进攻的亲核取代反应,其反应速率与溶剂极性直接关联,增加降解环境的极性可能大幅度提升降解速率。为此,本文设计合成了一种类似结构的水溶性聚(4-羟基丁酸)衍生物,发现在生理条件下这类聚合物能发生快速

示意图 1 水溶性环化自降解聚(4-羟基丁酸)衍生物(网络版彩图)

Scheme 1 Water-soluble poly(4-hydroxybutyric acid) derivatives with rapid self-degradation via intramolecular cyclization (color online).

的从头到尾自降解,生成单一的水溶性 γ -丁内酯衍生物。最近也有关于在有机溶剂中碱催化自降解聚酯、聚硫酯和聚氨基甲酸酯体系的研究报道^[39-42]。

2 实验部分

2.1 试剂与仪器

三氯氧磷(99%)、叔丁基异腈(98%)、甲酸乙酯(99%)、(E)-4-氧杂-2-丁烯酸乙酯(96%)、钯碳(5%钯)、Pd(OH)₂/C (20%钯,含有60%水)购于北京百灵威科技有限公司(中国)。正丁醛(95%)、4-戊烯酸(98%)、四丁基碘化铵(99%)、三苯基膦(99%)、硼酸(98%)、乙酸(99%)、三乙胺(99%)、二氯甲烷(DCM, HPLC)和乙酸乙酯(HPLC)购于国药集团化学试剂公司(中国)。氨基四甘醇单甲醚(98%)购于北京安司莫森技术有限公司(中国)。四氢呋喃(THF): 钠丝存在下回流,至二苯甲酮显色后蒸出。N,N-二甲基甲酰胺(DMF): 氢化钙干燥过夜后减压蒸馏。

核磁共振(NMR)仪: Bruker ARX-400核磁共振仪,以CDCl₃为氘代试剂,四甲基硅(TMS, $\delta=0$ ppm)为化学位移内标。

凝胶渗透色谱(GPC)仪: Waters 1525双高效液相色谱泵, Waters 2414示差扫描检测器,三根Waters Styragel色谱柱(孔径分别为 1×10^4 、 1×10^3 和500 Å)。流动相为THF,流速为1.0 mL/min,测试温度为35℃。以窄分布的聚苯乙烯为标样。数据采集和谱图处理软件为3.30 SPA软件。

电喷雾电离高分辨质谱仪(ESI-HRMS): Bruker Solarix XR傅里叶变换高分辨质谱仪,阳离子模式进行检测。

2.2 小分子化合物及聚合物的合成

2.2.1 OEG-NC的合成

以氨基四甘醇单甲醚为原料,参考文献^[43]方法按示意图2的反应路线,经两步反应合成得到OEG-NC。

将氨基四甘醇单甲醚(10 g, 48 mmol)溶于100 mL甲酸乙酯中,加热至溶液回流,反应24 h后冷却至室温。旋蒸除去甲酸乙酯得到甲酰胺基四甘醇单甲醚,淡黄色液体,收率为98%。未经纯化,直接用于下一步反应。将甲酰胺基四甘醇单甲醚(5.76 g, 24 mmol)溶于

示意图 2 OEG-NC的合成

Scheme 2 Synthetic route of OEG-NC.

50 mL DCM中, 加入三乙胺(12.24 g, 120 mmol)和四丁基碘化铵(100 mg). 反应体系用冰盐浴降温, 20 min后缓慢滴加三氯氧磷(7.31 g, 48 mmol). 加料完毕后升高反应温度至25℃并继续反应2 h. 将反应液慢慢滴入碳酸钾溶液(23 g, 120 mL水)中, 分液收集有机相. 用DCM (2×120 mL)萃取水相, 与原来有机相合并. 有机相用30 mL碳酸钾溶液洗涤, 无水硫酸钠干燥. 过滤除去固体, 旋蒸除去有机溶剂后得到棕红色粗产品. 经硅胶柱色谱分离(淋洗剂为石油醚/乙酸乙酯, v/v=1:3)得到淡黄色液体OEG-NC, 收率为75%.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 3.75~3.62 (m, 12H), 3.61~3.53 (m, 4H), 3.38 (s, 3H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 157.29, 71.94, 70.88, 70.67, 70.61, 70.60, 70.52, 68.69, 59.02, 41.86.

HRMS (ESI): $[\text{M}+\text{Na}^+]$ calcd: 240.1212; found: 240.1206.

2.2.2 聚合物的合成

聚合物P1的合成: 在一史莱克管中依次加入(E)-4-氧杂-2-丁烯酸(2.0 g, 20 mmol)、OEG-NC (5.2 g, 24 mmol)和THF(10 mL). 经过三次冷却-抽气-解冻循环, 氮气下密封, 于30℃聚合72 h. 然后将聚合物溶液沉淀于乙醚三次, 真空干燥后得到淡黄色黏性固体P1, 收率为69%, 数均分子量 $M_n=11200$ Da, 分散度 $D=1.49$.

聚合物P2的合成: 在一史莱克管中依次加入(E)-4-氧杂-2-丁烯酸(2.0 g, 20 mmol)、叔丁基异腈(1.0 g, 12 mmol)、OEG-NC (2.6 g, 12 mmol)和THF(10 mL). 经过三次冷却-抽气-解冻循环, 氮气下密封, 于30℃聚合72 h, 然后将聚合物溶液沉淀于乙醚三次, 真空干燥得到淡黄色黏性固体P2, 收率为71%, $M_n=12500$ Da, $D=1.85$.

聚合物P3的合成: 将聚合物P1 (500 mg, 重复单元含量为1.67 mmol)溶于20 mL乙酸乙酯中, 加入 $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ (50 mg)并转移至高压反应釜中, 经过三次抽真空-氢气置换循环, 在5 MPa压力的氢气气氛下于25℃反应7 h. 过滤除去 $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$, 旋蒸除去溶剂后, 用THF溶解聚合物, 沉淀于乙醚三次, 真空干燥得到无色黏性固体P3, 收率为78%, $M_n=4500$ Da, $D=1.60$.

聚合物P4的合成: 通过P2的高压氢化反应得到, 反应步骤与P3的合成相同, 收率为79%, $M_n=5200$ Da, $D=1.75$.

2.2.3 模型化合物A和B的合成

模型化合物A和B按示意图3的反应路线合成得到, 中间体为化合物1.

在25 mL圆底烧瓶中加入10 mL DCM, 依次加入乙酸(150 mg, 2.5 mmol)、(E)-4-氧杂-2-丁烯酸乙酯(320 mg, 2.5 mmol)和OEG-NC (543 mg, 2.5 mmol). 30℃下反应12 h, 旋蒸除去DCM得到粗产品, 经硅胶柱色谱分离(淋洗剂为石油醚/乙酸乙酯, v/v=8:1)后得到两种异构体1-A和1-B, 均为无色液体, 总收率为65%.

异构体1-A: ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.00 (dd, $J=15.8, 4.9$ Hz, 1H), 6.78 (s, 1H), 6.08 (dd, $J=15.8, 1.8$ Hz, 1H), 5.77 (dd, $J=4.9, 1.8$ Hz, 1H), 4.20 (q, $J=$

示意图 3 模型化合物A和B的合成

Scheme 3 Synthetic route of compounds A and B.

7.2 Hz, 2H), 3.75~3.61 (m, 12H), 3.62~3.52 (m, 2H), 3.52~3.43 (m, 2H), 3.37 (s, 3H), 2.22 (s, 3H), 1.29 (t, $J=7.2$ Hz, 3H).

异构体**1-B**: ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 6.65~6.55 (m, 2H), 4.22 (q, $J=7.1$ Hz, 2H), 3.76~3.60 (m, 12H), 3.63~3.50 (m, 4H), 3.53~3.42 (m, 2H), 3.37 (s, 3H), 2.27 (s, 3H), 1.30 (t, $J=7.1$ Hz, 3H).

将化合物**1** (405 mg, 1 mmol)溶于15 mL乙酸乙酯, 加入15 mg钯碳, 经过三次抽真空-氢气置换循环, 在一大气压氢气下氢化(25°C, 7 h). 过滤除去钯碳, 旋蒸除去溶剂后, 得到模型化合物**A**, 收率为85%.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 6.59 (s, 1H), 5.18 (t, $J=5.8$ Hz, 1H), 4.13 (q, $J=7.1$ Hz, 2H), 3.74~3.60 (m, 10H), 3.60~3.51 (m, 4H), 3.52~3.42 (m, 2H), 3.38 (s, 3H), 2.46~2.30 (m, 2H), 2.28~2.06 (m, 5H), 1.25 (t, $J=6.0$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 172.55, 169.55, 169.13, 72.93, 71.95, 70.61, 70.55, 70.33, 69.62, 60.57, 59.02, 39.06, 29.75, 26.98, 20.86, 14.08.

将化合物**A** (200 mg, 0.5 mmol)溶于20 mL 0.05 mol/L的盐酸中, 30°C下反应48 h, 随后用DCM (3×20 mL)萃取水相. 有机相合并后用无水硫酸钠干燥, 过滤除去固体, 旋蒸除去溶剂后得到模型化合物**B**, 收率为60%.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 6.96 (s, 1H), 4.87 (t, $J=6.8$ Hz, 1H), 3.86~3.42 (m, 16H), 3.38 (s, 3H), 2.71~2.46 (m, 3H), 2.51~2.24 (m, 1H).

2.2.4 模型化合物C的合成

模型化合物**C**按示意图4所示的三步合成步骤得到.

在50 mL圆底烧瓶中加入25 mL DCM, 依次加入4-戊烯酸(500 mg, 5 mmol)、正丁醛(360 mg, 5 mmol)、叔丁基异腈(415 mg, 5 mmol). 在30°C下反应12 h. 旋蒸除去DCM后得到粗产品, 经柱色谱分离(淋洗剂为石油醚/乙酸乙酯, $v/v=8:1$)后得到无色液体化合物**2**, 收率为95%.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 5.94~5.70 (m, 2H), 5.19~4.94 (m, 3H), 2.61~2.46 (m, 2H), 2.46~2.34 (m, 2H), 1.90~1.69 (m, 2H), 1.42~1.27 (m, 12H), 0.92 (t, $J=7.4$ Hz, 3H).

示意图4 模型化合物C的合成

Scheme 4 Synthetic route of compound C.

在100 mL三口烧瓶中加入化合物**2** (1.02 g, 4 mmol)和DCM (50 mL), 反应瓶置于干冰-丙酮浴中. 向烧瓶中通入臭氧直至反应瓶中溶液变为蓝色, 并继续通5 min. 然后通入氮气至溶液蓝色褪去变为无色. 然后向反应体系中加入 PPh_3 (1260 mg, 4.8 mmol), 并缓慢升温至25°C, 在此温度下反应12 h. 旋蒸除去DCM后得到粗产品, 经硅胶柱色谱分离(淋洗剂为石油醚/乙酸乙酯, $v/v=5:1$)后得到白色固体化合物**3**, 收率为90%.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 9.83 (s, 1H), 6.01 (s, 1H), 5.05 (dd, $J=7.0, 4.9$ Hz, 1H), 3.06~2.76 (m, 2H), 2.75~2.52 (m, 2H), 1.90~1.70 (m, 2H), 1.47~1.24 (m, 11H), 0.93 (t, $J=7.4$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 199.91, 171.31, 168.73, 74.39, 51.27, 38.85, 33.76, 28.45, 26.66, 18.03, 13.75.

将化合物**3** (514 mg, 2 mmol)和叔丁基异腈(166 mg, 2 mmol)溶于4 mL DMF中, 加入硼酸(124 mg, 2 mmol), 30°C下反应12 h, 旋蒸除去DMF, 浓缩液用15 mL DCM溶解, 饱和食盐水洗涤(3×10 mL), 合并有机相并用无水硫酸钠干燥, 过滤除去固体, 旋蒸除去DCM后得到粗产品, 经硅胶柱色谱分离(淋洗剂为石油醚/乙酸乙酯, $v/v=1:1$)后得到无色液体化合物**C**, 收率为60%.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 6.76~6.15 (m, 1H), 5.82~5.69 (m, 1H), 5.19~4.77 (m, 1H), 4.10~4.00 (m, 1H), 2.86~2.40 (m, 2H), 2.25~2.12 (m, 1H), 2.11~1.87

(m, 1H), 1.85~1.73 (m, 2H), 1.42~1.29 (m, 18H), 0.97~0.91 (m, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ: 173.07, 172.29, 169.24, 74.21, 71.14, 51.52, 51.01, 34.11, 30.64, 29.69, 28.73, 18.16, 13.75.

2.2.5 聚合物P3和P4的降解

聚合物**P3**在pD 7.4磷酸缓冲溶液中的降解：在一核磁管中加入聚合物**P3** (23 mg)和1.8 mL pD 7.4磷酸缓冲液(0.1 M重水溶液). 用封口膜密封核磁管, 并将其置于37℃恒温水浴中, 定期取样测定核磁谱图; 另外, 同时取出100 μ L溶液, 冷冻干燥后, 用GPC测定产物的分子量.

聚合物降解百分比定义为已降解的重复单元数目占降解前重复单元数目的比例, 记为 E_d 。以图3的谱图为例, 其计算方法如下: 将2.75~1.75 ppm峰的总积分定为4, 2.05~1.75 ppm处峰为4-羟基丁酸盐的特征质子峰(2'), 积分为 $[I]_1$ 。设4-羟基丁酸盐所占比例为 y , 则 $y=[I]_1/2$ 。2.75~2.30 ppm处的特征峰为 γ -丁内酯衍生物的特征质子峰(1, 2)以及未降解聚合物的特征质子峰(a), 积分为 $[I]_2$ 。设 γ -丁内酯衍生物所占比例为 x , 则可得出 $[I]_2=3x+2(1-x-y)$, 进而推出 γ -丁内酯衍生物所占比例 $x=[I]_1+[I]_2-2$, 聚合物降解百分比 $E_d=x+y=[I]_2+3[I]_1/2-2$ 。

聚合物**P3**在pD 6.8磷酸缓冲溶液中的降解: 实验步骤与**P3**在pD 7.4磷酸缓冲溶液中的降解相同, 只是将溶液换成pD 6.8磷酸缓冲液(0.1 M重水溶液). 聚合物降解百分比的计算方法同上.

聚合物**P3**在pD 7.4磷酸缓冲溶液/丙酮中的降解:
将聚合物**P3** (23 mg)溶于1.5 mL氘代丙酮中, 转移至核磁管中, 加入300 μ L pD 7.4磷酸缓冲液, 用封口膜密封核磁管, 并将其置于37 $^{\circ}$ C恒温水浴中, 定期取样测定核磁谱图; 并取出100 μ L溶液, 旋蒸除去溶剂后用GPC测定产物的分子量。

聚合物降解的百分比(E_d)的计算方法为: 聚合物重复单元特征峰c的峰面积为 $[I]_c$, 降解产生的 γ -丁内酯衍生物特征峰(3)的峰面积为 $[I]_3$, 则 $E_d = [I]_3 / ([I]_3 + [I]_c)$.

聚合物**P4**在不同条件下的降解过程研究及降解产物表征、降解百分比的计算方法与聚合物**P3**类似.

2.2.6 模型化合物的水解实验

模型化合物**A**或**B**在水相中的水解: 在一核磁管中加入化合物**A**或**B** (8 mg)溶于0.5 mL pD 7.4磷酸缓冲液(0.1 M重水溶液), 用封口膜密封核磁管, 并将其置于37℃恒温水浴中, 定期扫描核磁谱图。

模型化合物C在pD 7.4/丙酮中的水解: 将化合物C (9.6 mg)溶于0.5 mL氘代丙酮中, 转移至核磁管中, 加入0.1 mL pD 7.4磷酸缓冲液(0.1 M重水溶液), 用封口膜密封核磁管, 并将其置于37℃恒温水浴中, 定期扫描核磁谱图。模型化合物C在其他水/丙酮混合溶液中的实验步骤与此相同。

3 结果与讨论

3.1 单体和聚合物的合成

采用与上篇文章相同的P-3CR聚合方法(示意图5)制备了两种水溶性的聚(4-羟基丁酸)衍生物^[38,43]。首先合成了OEG-NC (图S1, 网络版补充材料), 然后利用(*E*)-4-氧杂-2-丁烯酸和OEG-NC的P-3CR反应后得到聚合物P1, 经催化氢化得到聚合物P3。采用(*E*)-4-氧杂-2-丁烯酸与等当量的OEG-NC和叔丁基异腈反应, 得到聚合物P2和P4。为保证得到高分子量聚合物, 异腈化合物的用量均过量20%。聚合物P1和P2的 M_n 分别为11200 Da ($D=1.49$)和12500 Da ($D=1.85$), 聚合物P3和P4的 M_n 均显著下降, 分别为4500 Da ($D=1.60$)和5200 Da ($D=1.75$)。可能是P1和P2主链中存在大量的反式双键结构, 聚合物链刚性大, 导致由GPC测定的分子量太

示意图 5 水溶性聚(4-羟基丁酸)衍生物的合成
Scheme 5 Synthetic route of water soluble poly(4-hydroxy butyric ester) derivatives.

于实际值; 氢化后, 聚合物主链刚性下降, 溶液中聚合物链更接近无规线团, GPC测定的分子量更接近实际分子量。另外, GPC曲线上也有少量环状低聚物的峰, 这是逐步聚合反应所不可避免的, 也与我们之前的报道一致^[38,43]。遗憾的是, 这些低聚物不能通过沉淀的方法彻底除去。

利用¹H NMR对四种聚合物的结构进行了表征(图1和2), 各质子信号峰都可得到准确归属, 且其积分比与重复单元的组成比一致, 证实了聚合物结构的正确性。另外, 利用核磁积分, 计算出在P2和P4中, OEG链和叔丁基的数目比为1.6:1, 说明OEG-NC参与P-3CR

图1 聚合物P1与P3的¹H NMR谱图。溶剂: P1为氘代丙酮, P3为CDCl₃ (网络版彩图)

Figure 1 ¹H NMR spectra of polymer P1 (in acetone-*d*₆) and P3 (in CDCl₃) (color online).

图2 聚合物P2与P4的¹H NMR谱图。溶剂: P2为氘代丙酮, P4为CDCl₃ (网络版彩图)

Figure 2 ¹H NMR spectra of polymer P2 (in acetone-*D*₆) and P4 (in CDCl₃) (color online).

的反应活性比叔丁基异腈高^[44]。聚合物P3和P4在有机溶剂如DCM、THF和水中都有良好的溶解性, 便于进行后续的水溶液降解实验。

3.2 聚合物在水溶液中的自降解

为了验证聚合物P3和P4能在水溶液中发生快速环化自降解, 首先研究了P3在生理条件(pD 7.4磷酸缓冲溶液, 37℃)下的降解过程。图3是原位测定的随时间延长P3降解体系的¹H NMR谱图。可以看到, 7 h后, 聚合物的特征信号峰(峰c)积分显著下降, 同时出现与小分子降解产物γ-丁内酯衍生物对应的质子信号峰(峰1、2、3), 此时计算得到P3的降解百分比为35%; 1 d后, 聚合物的特征信号峰已基本消失, 降解百分比达到85%, 并且出现了明显的与4-羟基丁酸盐对应的质子信号峰(峰2'和3'); 5 d后, 核磁谱图上几乎只剩下对应4-羟基丁酸盐的信号峰。我们同时利用GPC测定了聚合体系的分子量随时间的变化(图4)。发现, 随时间延长, 聚合物的分子量逐渐变小, 并伴随小分子化合物峰的出现, 其峰面积不断增大。如7 h后, 聚合物P3的分子量由4500下降为2500, 1 d后, 进一步下降为分子量约830的低聚物, 绝大部分聚合物已经转化为小分子化合物。这也说明降解过程可能不是无规水解过程,

图3 聚合物P3在pD 7.4磷酸缓冲溶液中的¹H NMR谱图随时间的变化。降解条件: 15 mg/mL, pD 7.4氘代磷酸缓冲溶液(0.1 M重水溶液), 37℃ (网络版彩图)

Figure 3 Time-dependent ¹H NMR spectra of polymer P3 in phosphate buffer solution. 15 mg/mL in pD 7.4 buffer solution, 37 °C (color online).

图4 聚合物P3在pD 7.4磷酸缓冲溶液中降解过程的GPC谱图随时间的变化. 降解条件: 15 mg/mL, pD 7.4氘代磷酸缓冲溶液(0.1 M重水溶液), 37°C (网络版彩图)

Figure 4 Overlay of GPC traces of polymer P3 after it was degraded in phosphate buffer solution for different time. 15 mg/mL in pD 7.4 buffer solution, 37 °C (color online).

否则, 聚合物的分子量在最初就会发生显著降低. 与前面报道的结果对比, 基本过程类似, 但降解速率显著加快^[38].

然而, 仔细分析图3所示的¹H NMR谱图, 发现在降解7 h后得到的小分子化合物中, 不仅存在γ-丁内酯衍生物的特征质子信号峰(峰3), 还有少量与4-羟基丁酸盐对应的特征质子信号峰(峰3'), 且随着降解时间的延长, 峰3'相对于峰3的积分比逐渐增大, 表明γ-丁内酯衍生物相对4-羟基丁酸盐的比例逐渐下降. 5 d后, 峰3基本消失, 几乎只存在峰3'. 为此, 我们认为, 聚合物P3的降解可能发生了顺序进行的两种反应: 聚合物先发生从头到尾的内环化降解生成γ-丁内酯衍生物, 随后该化合物通过水解反应开环转化为4-羟基丁酸盐. 更多的证据在后面模型化合物部分给出.

上述结果表明, 聚合物P3在pD 7.4磷酸缓冲溶液中的降解显著快于叔丁基取代的聚(4-羟基丁酸)在pD 7.4磷酸缓冲溶液/丙酮混合溶液中的降解速率^[38], 其原因可能有两点: (1) 从热力学因素来说, 取代基由叔丁基改为OEG可能改变了降解过程中内环化反应的驱动力; (2) 纯磷酸缓冲溶液的极性比与丙酮的混合溶液大. 为此, 我们设计合成了含两种取代基的聚合物P4, 并利用¹H NMR研究了其在相同条件下的降解过程(图S2), 其基本现象与聚合物P3的降解类似, 聚合物P4在1 d内也降解了87%, 与P3没有明显区别. 具体而言, 7 h后, 除了聚合物P4的特征质子信号峰(峰c)外, 出

现了与两种γ-丁内酯衍生物对应的特征质子信号峰(峰3和4); 1 d后, 聚合物的特征质子信号峰(峰c)基本消失, 出现了明显的4-羟基丁酸盐的质子信号峰(峰3'和4'); 5 d后, 主要信号峰为4-羟基丁酸盐的质子信号峰. 因此, 取代基的改变不是聚合物P3自降解速率加快的原因.

随后, 我们又对照研究了聚合物P3和P4在pD 7.4磷酸缓冲溶液/丙酮混合溶液中的降解. 如图5所示, 聚合物P3的降解明显变慢, 2 d后, 仅有13%聚合物降解, 12 d后才达到42%. 值得注意的是, 我们观察到γ-丁内酯衍生物是唯一的降解产物, 它并没有进一步水解转化为4-羟基丁酸盐. 聚合物P4的降解与P3类似(图S3), 与pD 7.4磷酸缓冲溶液中的降解相比, 降解速度变慢, 整个降解过程中没有观察到酯键水解的产物, 持续降解12 d后, 仍有聚合物P4存在. 在此条件下, 两种聚合物的降解速率及产物均与叔丁基取代的聚(4-羟基丁酸)衍生物(P0)在相同条件下的降解基本一致(图S4). 因此, 聚合物P3和P4在pD 7.4磷酸缓冲溶液环化降解速率增加的原因主要是聚合物水溶性增加, 磷酸缓冲溶液的极性比丙酮混合溶液的极性更大, 使生成γ-丁内酯衍生物的内环化反应加速, 这也与文献报道的其他小分子体系类似^[45].

图5 聚合物P3在pD 7.4磷酸缓冲溶液/丙酮混合溶液中降解过程的¹H NMR谱图随时间的变化. 降解条件: 15 mg/mL, pD 7.4氘代磷酸缓冲溶液(0.1 M重水溶液)/氘代丙酮=1:5, 37°C (网络版彩图)

Figure 5 Time-dependent ¹H NMR spectra of polymer P3 in a mixture of phosphate buffer solution and acetone-*d*₆ (1:5, v/v): 15 mg/mL, 37 °C (color online).

为了确定水溶液的pH对降解过程也有影响, 我们进一步测定了聚合物**P3**在pD 6.8磷酸缓冲溶液中的自降解(图S5和S6). 降解过程及降解产物与pD 7.4磷酸缓冲溶液中的降解类似, 但降解明显变慢, 5 d后, 只有72%的聚合物降解, GPC谱图上仍然显示大量低聚物的存在(图S6). 另外, 将聚合物**P3**置于D₂O中, 相同温度下放置2 d, 未发现**P3**的降解. 因此, 水溶液的pH也显著影响聚合物**P3**的降解速率, pH越高, 末端羟基去质子化的比例越高, 其向酯键分子内亲核进攻的能力越强, 相应的内环化反应速率加快(图S7). 这一结果与文献中所报道的4-羟基丁酸内环化速率的pH依赖性类似^[46].

3.3 水溶性自降解聚(4-羟基丁酸)衍生物的自降解机理

上述结果表明, 聚合物**P3**和**P4**在磷酸缓冲溶液中均可自降解生成 γ -丁内酯衍生物和内酯键开环水解的4-羟基丁酸盐, 随降解时间延长, 4-羟基丁酸盐的含量逐渐增加, 最后成为唯一产物. 这一结果似乎暗示聚合物首先发生从头到尾的内环化降解生成 γ -丁内酯衍生物, 随后内酯逐渐开环水解, 形成相应的开环产物. 但由于该产物也可能来自于聚合物主链中酯键的直接无规水解. 为进一步确定聚合物的自降解机理, 我们设计合成了三种模型小分子化合物(**A**、**B**和**C**), 在与聚合物降解相同的实验条件下做了水解对照实验. 利用(*E*)-4-氧杂-2-丁烯酸乙酯、乙酸和OEG-NC的P-3CR反应得到化合物**1**, 经催化氢化得到化合物**A** (示意图3), 其结构经过¹H NMR谱图得到确认(图S8). 图6是化合物**A**在pD 7.4磷酸缓冲溶液中的¹H NMR谱图随时间的变化. 在前7 h内, 化合物**A**中的酯键没有发生水解, 2 d后, 也只观察到极少量的乙酸盐的特征质子峰(a'). 因此, 在此条件下, 酯键的水解几乎可忽略不计, 间接证明聚合物**P3**中的酯键至少在2 d内是稳定的, 主链聚酯的无规水解降解可以忽略, 聚合物**P3**自降解的原因是从头到尾的分子内环化, 生成 γ -丁内酯衍生物.

为了进一步证明 γ -丁内酯衍生物会缓慢水解开环形成4-羟基丁酸盐, 将化合物**A**在酸性条件下水解得到了与降解产物结构类似的 γ -丁内酯衍生物**B** (图S9), 并对比研究了化合物**B**在磷酸缓冲液中的水解情况(图S10~S12). 在此条件下, 化合物**B**确实发生了缓慢的水解开环生成相应的羟基酸盐. 对比4-羟基丁酸盐的特征质子峰(峰b')与内酯衍生物的特征质子峰(峰b)的积

图6 模型化合物**A**在pD 7.4磷酸缓冲溶液中降解过程的¹H NMR谱图随时间的变化. 降解条件: 16 mg/mL, pD 7.4氘代磷酸缓冲溶液(0.1 M重水溶液), 37 °C (网络版彩图)

Figure 6 Time-dependent ¹H NMR spectra of compound **A** in phosphate buffer. 16 mg/mL in pD 7.4 buffer solution, 37 °C (color online).

分, 计算得到水解比例: 7 h为28%; 5 d后为85%, 这些数据与聚合物**P3**在相同条件下经5 d完全转变为4-羟基丁酸盐的结果基本一致.

进一步设计合成了模型化合物**C**, 通过其分子内内环化反应可以模拟聚合物**P3**和**P4**环化自降解形成 γ -丁内酯衍生物的基元反应. 通过三步合成反应得到化合物**C** (示意图4, 图S9)^[47], 利用¹H NMR研究了其在不同条件下的分子内环化过程(图S13). 可以看到, 在pD 7.4磷酸缓冲溶液/丙酮混合溶液中, 12 h后, 环化产物 γ -丁内酯衍生物的特征质子信号峰变得明显, 24 h后, 4-羟基丁酸盐的比例逐渐增加, 72 h后几乎完全转化为内酯和4-羟基丁酸盐. 根据以上结果, 我们确定了聚合物**P3**和**P4**在磷酸缓冲溶液中快速自降解的机理, 如示意图6所示: 在水溶中, 位于聚合物一端的羟基分子内亲核进攻相邻的酯键, 脱除 γ -丁内酯, 聚合物的端基同时转化为另一种羟基, 顺序分子内环化, 从头到尾发生降解生成 γ -丁内酯衍生物; 随后, 该内酯化合物缓慢发生水解开环, 生成4-羟基丁酸盐. 在最近报道的侧基含羟基的聚碳酸酯降解中, 也观察到类似的降解行为^[48].

4 结论

通过P-3CR反应设计合成了两种水溶性聚(4-羟基丁酸)衍生物, 它们均可在生理条件下(pD 7.4磷酸缓冲

示意图 6 聚合物P3的降解机理(网络版彩图)

Scheme 6 Degradation mechanism of polymer P3 (color online).

溶液, 37°C)发生快速自降解. 通过对比实验, 证明这种自降解速率的提高主要是由于降解环境(溶剂极性)的增加, 酰胺上取代基的改变对聚合物的内环化降解没有明显的影响, 降解过程没有发生酯键的无规断裂, 是从头到尾的内环化解聚合; 随着溶液pH的增加, 降解速率进一步加快. 进一步通过三种模型化合物的水解实验证明了聚合物的降解机理是首先发生从头到尾连续的内环化解聚合, 生成 γ -丁内酯衍生物, 随后该内酯化合物缓慢发生水解开环, 生成4-羟基丁酸盐. 这是目前为止报道的第一例在生理条件下可快速自降解的聚酯体系. 鉴于这类聚酯所独有的降解行为, 我们正在采用不同的刺激响应性封端剂对聚合物进行封端, 以建立具有刺激响应自牺牲性质的聚酯体系, 并探讨其在生物体系如药物载体等方面的实际应用.

补充材料

本文的补充材料见网络版chemcn.scichina.com. 补充材料为作者提供的原始数据, 作者对其学术质量和内容负责.

致谢 感谢北京大学化学与分子工程学院分析测试中心在分析测试上提供的支持.

参考文献

- Albertsson AC, Varma IK. *Biomacromolecules*, 2003, 4: 1466–1486
- Nair LS, Laurencin CT. *Prog Polym Sci*, 2007, 32: 762–798
- Place ES, George JH, Williams CK, Stevens MM. *Chem Soc Rev*, 2009, 38: 1139–1151
- Tian H, Tang Z, Zhuang X, Chen X, Jing X. *Prog Polym Sci*, 2012, 37: 237–280
- Tyler B, Gullotti D, Mangraviti A, Utsuki T, Brem H. *Adv Drug Deliver Rev*, 2016, 107: 163–175
- Kamaly N, Yameen B, Wu J, Farokhzad OC. *Chem Rev*, 2016, 116: 2602–2663
- Li S. *J Biomed Mater Res*, 1999, 48: 342–353
- Grizzi I, Garreau H, Li S, Vert M. *Biomaterials*, 1995, 16: 305–311
- Seyednejad H, Ghassemi AH, van Nostrum CF, Vermonden T, Hennink WE. *J Control Release*, 2011, 152: 168–176
- Leemhuis M, Kruijtz JAW, van Nostrum CF, Hennink WE. *Biomacromolecules*, 2007, 8: 2943–2949
- Samadi N, van Nostrum CF, Vermonden T, Amidi M, Hennink WE. *Biomacromolecules*, 2013, 14: 1044–1053
- Bigg DM. *Adv Polym Technol*, 2005, 24: 69–82
- Slager J, Domb AJ. *Adv Drug Deliver Rev*, 2003, 55: 549–583
- Arias V, Olsén P, Odelius K, Höglund A, Albertsson AC. *Polym Chem*, 2015, 6: 3271–3282
- Li J, Stayshich RM, Meyer TY. *J Am Chem Soc*, 2011, 133: 6910–6913
- Li J, Rothstein SN, Little SR, Edenborn HM, Meyer TY. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 16352–16359
- Ding AG, Schwendeman SP. *Pharm Res*, 2008, 25: 2041–2052
- Fu K, Pack DW, Klibanov AM, Langer R. *Pharmaceutical Res*, 2000, 17: 100–106
- van de Weert M, Hennink WE, Jiskoot W. *Pharm Res*, 2000, 17: 1159–1167
- Ye M, Kim S, Park K. *J Control Release*, 2010, 146: 241–260

- 21 Liu Y, Ghassemi AH, Hennink WE, Schwendeman SP. *Biomaterials*, 2012, 33: 7584–7593
- 22 Sagi A, Weinstain R, Karton N, Shabat D. *J Am Chem Soc*, 2008, 130: 5434–5435
- 23 Roth ME, Green O, Gnaim S, Shabat D. *Chem Rev*, 2016, 116: 1309–1352
- 24 Yardley RE, Kenaree AR, Gillies ER. *Macromolecules*, 2019, 52: 6342–6360
- 25 Liu G, Wang X, Hu J, Zhang G, Liu S. *J Am Chem Soc*, 2014, 136: 7492–7497
- 26 Liu G, Zhang G, Hu J, Wang X, Zhu M, Liu S. *J Am Chem Soc*, 2015, 137: 11645–11655
- 27 Ding Z, Cen J, Wu Y, Zhong K, Liu G, Hu J, Liu S. *Giant*, 2020, 1: 100012
- 28 Fomina N, McFearin C, Sermakdi M, Edigin O, Almutairi A. *J Am Chem Soc*, 2010, 132: 9540–9542
- 29 de Gracia Lux C, Almutairi A. *ACS Macro Lett*, 2013, 2: 432–435
- 30 Zhang Y, Ma L, Deng X, Cheng J. *Polym Chem*, 2013, 4: 224–228
- 31 Zhang Y, Yin Q, Yin L, Ma L, Tang L, Cheng J. *Angew Chem Int Ed*, 2013, 52: 6435–6439
- 32 Mejia JS, Gillies ER. *Polym Chem*, 2013, 4: 1969–1982
- 33 Hsu PH, Arboleda C, Stubelius A, Li LW, Olejniczak J, Almutairi A. *Biomater Sci*, 2020, 8: 2394–2397
- 34 Gambles MT, Fan B, Borecki A, Gillies ER. *ACS Omega*, 2018, 3: 5002–5011
- 35 Blake TR, Ho WC, Turlington CR, Zang X, Huttner MA, Wender PA, Waymouth RM. *Chem Sci*, 2020, 11: 2951–2966
- 36 Hong M, Chen EYX. *Nat Chem*, 2016, 8: 42–49
- 37 Yuan PJ, Hong M. *Acta Polym Sin*, 2019, 50: 327–337 (in Chinese) [袁鹏俊, 洪繆. 高分子学报, 2019, 50: 327–337]
- 38 Zhang LJ, Deng XX, Du FS, Li ZC. *Macromolecules*, 2013, 46: 9554–9562
- 39 Dahlhauser SD, Escamilla PR, VandeWalle AN, York JT, Rapagnani RM, Shei JS, Glass SA, Coronado JN, Moor SR, Saunders DP, Anslyn EV. *J Am Chem Soc*, 2020, 142: 2744–2749
- 40 Joo W, Wang W, Mesch R, Matsuzawa K, Liu D, Willson CG. *J Am Chem Soc*, 2019, 141: 14736–14741
- 41 Yuan J, Xiong W, Zhou X, Zhang Y, Shi D, Li Z, Lu H. *J Am Chem Soc*, 2019, 141: 4928–4935
- 42 Xiong W, Chang W, Shi D, Yang L, Tian Z, Wang H, Zhang Z, Zhou X, Chen EQ, Lu H. *Chem*, 2020, 6: 1831–1843
- 43 Zhang J, Zhang M, Du FS, Li ZC. *Macromolecules*, 2016, 49: 2592–2600
- 44 Gulevich AV, Zhdanko AG, Orru RVA, Nenajdenko VG. *Chem Rev*, 2010, 110: 5235–5331
- 45 DeWit MA, Gillies ER. *Org Biomol Chem*, 2011, 9: 1846–1854
- 46 Bundgaard H, Larsen C. *Int J Pharm*, 1980, 7: 169–176
- 47 Sravan Kumar J, Jonnalagadda SC, Mereddy VR. *Tetrahedron Lett*, 2010, 51: 779–782
- 48 Chen F, Qi R, Huyer LD, Amsden BG. *Polym Degrad Stabil*, 2018, 158: 83–91

Poly(4-hydroxybutyric acid) derivatives with rapid self-degradation *via* intramolecular cyclization under physiological conditions

Xiao-Wei Kan, Li-Jing Zhang, Zhao-Yue Li, Fu-Sheng Du^{*}, Zi-Chen Li^{*}

Beijing National Laboratory for Molecular Sciences, Key Laboratory of Polymer Chemistry and Physics of Ministry of Education, College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Beijing 100871, China

^{*}Corresponding authors (email: fsdu@pku.edu.cn; zcli@pku.edu.cn)

Abstract: Biodegradable aliphatic polyesters have been widely used in biomedical fields owing to their good biocompatibility. One big challenge is to precisely modulate their degradation rate and degradation products under physiological conditions. In this work, we designed and synthesized two types of poly(4-hydroxybutyric acid) derivatives that can quickly depolymerize *via* intramolecular cyclization into corresponding γ -butyrolactone derivatives under physiological conditions. The polymers were synthesized by the Passerini multicomponent polymerization of **OEG-NC** and ethyl (*E*)-4-oxo-but-2-enoate, followed by hydrogenation. Nuclear magnetic resonance (NMR) and gel permeation chromatography (GPC) were used to follow the degradation of these polyesters under physiological conditions (pD 7.4 buffer solution, 37 °C). It was demonstrated that the molar mass of the polyester gradually decreased with time together with the increase of the amount of corresponding γ -butyrolactone derivatives as the only degradation product. After 1 d, 85% of the polyester was degraded. When the pH of the buffer was decreased to 6.8 or a mixture of buffer and acetone was used as the degradation media, the degradation was slowed down, but γ -butyrolactone derivatives are still the only degradation products, implying that increase of the medium polarity and pH can accelerate the degradation. Three small model molecules that mimic the polymer repeating unit, end group, and degradation product were synthesized and their hydrolysis were investigated under identical conditions. Based on these results, we confirm that under physiological conditions, no random degradation *via* hydrolysis of the polyester backbone occurred. The degradation mechanism was thus elucidated. The first step is the fast head-to-tail depolymerization of the polyester *via* intramolecular cyclization, forming γ -butyrolactone derivatives as the only products. Then, slow hydrolysis of γ -butyrolactone derivatives into 4-hydroxy butyrate occurred. This type of polyester is the first reported depolymerizable polyester with simple structure under physiological conditions. Our current efforts are end-capping these polymers with various stimuli-responsive functional groups to develop new self-immolative polymers that can be used in biomedical fields as drug carriers.

Keywords: poly(4-hydroxybutyric acid) derivative, Passerini multicomponent polymerization, depolymerization, γ -butyrolactone derivative, physiological conditions

doi: [10.1360/SSC-2020-0131](https://doi.org/10.1360/SSC-2020-0131)