中国科学(B辑)
第32卷 第6期 SCIENCE IN CHINA (Series B) 2002年12月

聚(碳酸酯-co-磷酸酯)的酶促合成及性能*

冯 俊 卓仁禧** 贺 枫
(武汉大学化学系生物医用高分子实验室, 武汉 430072)

摘要 以猪胰脂肪酶或假丝酵母皱褶酶为催化剂, 100℃下通过本体聚合成功地合成了三亚甲基碳酸酯(TMC)和 2-乙氧基-2-氧-1,3-二氧磷杂环戊烷(EEP)的无规共聚物(poly(TMC-co-EEP)). 研究了酶浓度, 聚合反应时间以及共聚单体投料比等因素对共聚物分子量和产率的影响. 随着酶(PPL 或 CL)浓度的增加, 共聚物分子量降低. 同时, 随着 EEP 投料比的增加, 共聚物的分子量也降低. 共聚物数均分子量最大可达到 10200. 随着共聚单体投料摩尔比(EEP/TMC)从 0 增加到 5∶10, 共聚物的玻璃化温度从–28℃降低到–41.7℃. 体外降解实验表明: 共聚物中磷酸酯含量越高, 降解速率越快.

关键词 酶促聚合 聚(磷酸酯-co-碳酸酯) 聚碳酸酯 聚磷酸酯 脂肪酶

过去 10 年里, 生物可降解高分子材料的研究及其在生物医药方面的应用引起人们越来越多的重视. 脂肪族聚碳酸酯是一类表面浸蚀地生物可降解高分子材料, 具有良好的生物相容性和机械加工性能[1,2], 但其亲水性和吸水率一般较低, 降解速率较慢, 较大地限制了其在医学方面的广泛运用. 生物可降解聚磷酸酯由于其结构类似于生物体内核酸和磷壁质酸等天然含磷聚合物, 生物相容性好, 具有较强的细胞亲饮能力和细胞膜的通透能力, 而且其结构可变性大, 已用于生物医用领域, 特别是基因工程和神经导管修复, 也是一类较为理想的药物控制释放材料[3~5]; 但其降解速率较快、机械性能较差. 设计合成脂肪族碳酸酯和磷酸酯的共聚物, 其中, 聚碳酸酯链段赋予材料较强的疏水性和良好的机械性能[6], 聚磷酸酯链段赋予材料较强的亲水性和柔性, 通过改变两者在共聚物中的比例, 达到对共聚物材料性能的调控, 以满足不同应用的需要.

生物可降解高分子材料的合成方法有多种, 其中开环聚合由于更易获得高分子量和性能优越的高分子材料而得到更为广泛的应用, 如生物可降解聚酯、聚碳酸酯、聚磷酸酯及其共聚物的合成. 但是, 传统的开环聚合一般采用金属催化剂, 往往要求十分苛刻的反应条件(如: 无水、无氧以及高纯的单体等), 而且聚合物中残留的金属催化剂必须在反应后彻底清除; 否则, 不仅影响高分子材料的理化性能, 而且对于生物医用高分子材料, 其可能造成的毒副作用会直接影响材料的生物相容性和使用安全性.

酶促开环聚合的方法是近年来发展起来的新的聚合方法, 由于它克服了以上金属催化剂的缺点, 越来越受到广泛的关注, 也是当前生物医用高分子材料领域的一个研究热点[7~11]. 目

2002-06-17 收稿, 2002-08-20 收修改稿
* 国家自然科学基金(批准号: 20104005)、"九七三"计划(批准号: G1999064703)、湖北省自然科学基金(批准号: 2001B053)和武汉青年科技晨光计划(批准号: 20015005041)资助项目
** 联系人, bmplab@public.wh.hb.cn

前酶促聚合主要是研究脂肪族聚酯和聚碳酸酯的开环均聚, 我们实验室也首次报道了磷酸酯的酶促开环聚合[9,10]. 但酶促开环共聚合研究还较少, 到目前为止, 仅有聚(碳酸酯-co-酯)和聚酯的酶促开环共聚的报道[12,13]. 本研究用酶促开环共聚的方法, 合成了碳酸酯和磷酸酯的共聚物, 以期获得具有良好生物相容性和使用安全性、性能可调的生物可降解医用高分子材料.

1　实验部分

1.1　试剂

猪胰脂肪酶(PPL, 54 unit/mg 蛋白)和假丝酵母皱褶酶(CL, 2470 unit/mg 蛋白), Sigma 公司; 三亚甲基碳酸酯(TMC)参照文献[7]的方法合成; 2-乙氧基-2-氧-1,3-二氧磷杂环戊烷(EEP)按文献[9]的方法合成; 所用气体经五氧化磷干燥; 所有溶剂用前均需无水处理.

1.2　仪器

红外分析使用 Perkin Elmer 1 型光谱仪. 共聚物的分子量及其分布由 GPC(Waters millennium32 HPLC2690 分离系统, Shodex K803 凝胶柱)测定, 以聚苯乙烯为标样, 三氯甲烷为流动相(1.0 mL/min). 共聚物的核磁分析用 Varian Mercury-VX 300 apparatus 测定. DSC 分析使用 Perkin Elmer Pyris 1 热分析仪测定, 氮气保护, 升温速度为 20℃/min.

1.3　酶促共聚反应

氩气保护下, 以猪胰脂肪酶或假丝酵母皱褶酶为催化剂, 100℃本体聚合得到 TMC 和 EEP 的共聚物, 反应如图 1 所示. 其主要制备步骤如下: 一定量的 TMC, EEP 和脂肪酶依次放入清洁干燥的反应管中, 抽空后充入氩气, 如此反复多次后封管; 磁力搅拌下, 100℃恒温反应一定时间后取出. 将产物溶解在二氯甲烷中,过滤除去不溶的酶, 浓缩滤液, 乙醚中沉淀得到共聚物(poly(TMC-co-EEP)). 如此重沉淀 2 次后, 共聚物在真空下干燥至恒重.

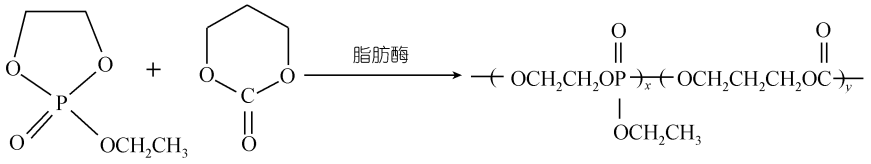

图 1　三亚甲基碳酸酯(TMC)和 2-乙氧基-2-氧-1,3-二氧磷杂环戊烷(EEP)的酶促共聚

1.4　降解实验

约 100 mg 共聚物在压片机上压片, 置于 37℃恒温下的 pH = 7.4 的磷酸缓冲溶液中, 缓冲溶液每天更换一次, 按设定时间后取出, 测量共聚物的失重率及其分子量.

2　结果与讨论

2.1　三亚甲基碳酸酯和 2-乙氧基-2-氧-1,3-二氧磷杂环戊烷的酶促开环共聚合反应

分别以猪胰脂肪酶或假丝酵母皱褶酶为催化剂, 100℃下通过本体聚合, 合成了 TMC 和 EEP 的无规共聚物(poly(TMC-co-EEP)). 研究了酶的种类及浓度、共聚单体投料比和反应时间等因素对共聚物分子量和产率的影响. 结果如表 1 所示.

表 1 三亚甲基碳酸酯和环状磷酸乙酯的酶促本体聚合(100℃)

样品编号[a)]	酶	酶浓度(mg/12 mmol)	投料比(TMC/EEP)	时间/d	产率/%	M_n	M_w/M_n
1	PPL	10	10∶2	2	68.9	9300	2.31
2	PPL	25	10∶2	2	36.5	6200	2.43
3	PPL	50	10∶2	2	53.2	5400	1.99
4	CL	10	10∶2	2	58.3	6500	2.27
5	CL	25	10∶2	2	57.6	6500	1.87
6	CL	50	10∶2	2	60.2	5300	1.81
7	PPL	10	10∶2	1	56.2	6000	2.47
8	PPL	10	10∶2	3	72.3	4000	1.91
9	PPL	10	10∶2	4	65.2	3400	2.75
10	CL	10	10∶2	1	50.2	6800	1.99
11	CL	10	10∶2	3	57.0	6000	2.97
12	CL	10	10∶2	4	60.2	5700	2.63
13	PPL	10	10∶1	2	82.8	10200	1.71
14	PPL	10	10∶3	2	60.1	8000	1.66
15	PPL	10	10∶5	2	19.8	3200	2.18
16	CL	10	10∶1	2	75.6	7900	2.23
17	CL	10	10∶3	2	62.0	6400	1.83
18	CL	10	10∶5	2	42.1	6400	1.69
19	–	–	10∶1	2	–	<500	–
20	–	–	10∶5	2	–	<500	–

a) 样品 19, 20 为空白实验

文献中曾报道 TMC 在 100℃下可以自发热聚合[12]. 我们在共聚反应的研究中发现, 无酶催化下只得到了少量的寡聚体, 而酶存在下得到共聚物的分子量和产率都远远高于前者, 说明脂肪酶确实对共聚反应起到了催化作用. 共聚物溶于二氯甲烷而不溶于乙醚, EEP 投料比的增大导致了共聚物在甲醇中溶解度的增加, 磷酸酯链段的引入明显改善了聚合物的溶解性能.

我们分别采用 PPL 和 CL 为催化剂, 研究了聚合时间对共聚物分子量的影响. 当投料摩尔比 TMC∶EEP = 10∶2, 酶的使用浓度为 10 mg/12 mmol 单体时, 反应了 2 d 后, PPL 或 CL 催化得到的共聚物分子量都达到各自的最大值(Entry 1 和 10). 这可能是因为酶不仅可以催化聚合反应的发生, 而且同时也能够催化共聚物的降解. 酶的浓度对共聚反应也有较大的影响: 在相同的反应条件下(单体投料摩尔比 TMC∶EEP = 10∶2, 100℃下反应 2 d), 随着酶(PPL 或 CL)浓度的增加, 共聚物分子量降低. 共聚物分子量和单体投料摩尔比之间同样存在很大关系, 随着 EEP 投料比的增加, 共聚物的分子量降低, 原因可能是 PPL 和 CL 催化下 EEP 具有较 TMC 低的反应活性.

2.2 表征

红外谱图显示出聚碳酸酯链段的羰基峰($V_{c=o}$ = 1267 cm^{-1})和聚磷酸酯明显的特征峰($V_{p=o}$ = 1273 cm^{-1}, V_{p-o-c} = 1046 和 999 cm^{-1}). 核磁氢谱(^{1}H NMR): δ = 1.2~1.4(m; OCH_2CH_3), 2~2.1(m; $OCH_2CH_2CH_2O$), 3.7~3.8(m;OCH_2CH_3), 4.1~4.3(m; $OCH_2CH_2CH_2O$), 4.3~4.4(m; OCH_2CH_2O). 核磁碳谱 ^{13}C NMR: δ = 28.018($OCH_2CH_2CH_2O$), 29.537 和 29.448 (OCH_2CH_3), 52.35(OCH_2CH_3), 64.345, 64.138 和 64.596($OCH_2CH_2CH_2O$), 63.789, 65.201, 65.426, 66.426 和 66.510(OCH_2CH_2O), 155.218, 155. 105 和 154.961(C == O). 共聚物的碳谱和其两个均聚物的碳

谱比较, 明显出现了一些新的特征峰, 文献报道羰基峰可较好的体现共聚物的结构[14]. 化学位移δ = 154.961, 155.105, 155.218 分别属于共聚物中 C == O 基团的三种排列(TMC-TMC-TMC, TMC-TMC-EEP 和 EEP-TMC-EEP), 如图 2 所示. 另外, 聚合物的 GPC 图谱也仅显示出一个单分散峰, 这些都表明得到的聚合物并非聚碳酸酯和聚磷酸酯的混合物, 而是 EEP 和 TMC 共聚物.

2.3　共聚物热学性质

我们用 DSC 测定了共聚物的玻璃化温度 T_g, 并分析了 T_g 与共聚物投料比的关系(图 3). DSC 谱图上只出现一个 T_g 峰, 表明聚合物为无定型态和均向的无规共聚物. T_g 值随着单体投料摩尔比(EEP/TMC)的增加而线性降低, EEP 重复单元的引入增加了共聚物的流动性.

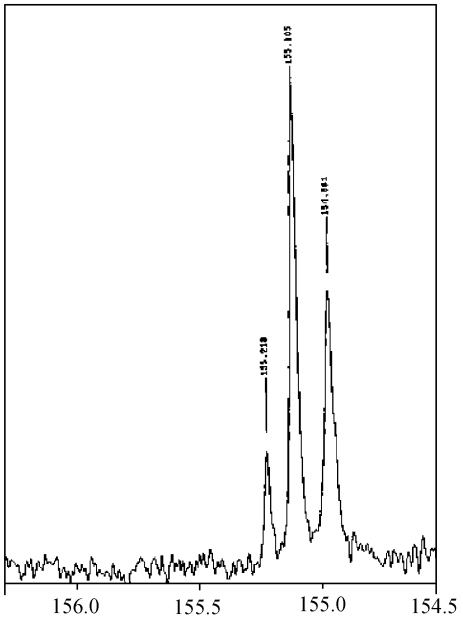

图 2　共聚物碳谱中羰基的放大图谱

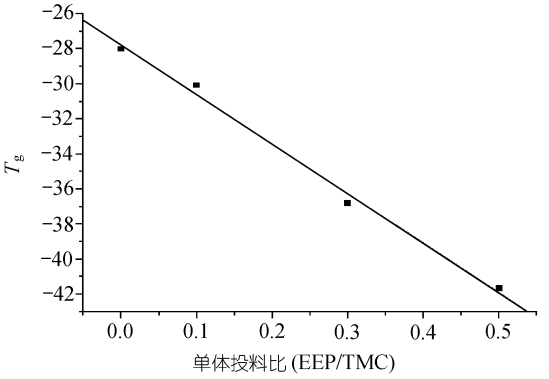

图 3　共聚物玻璃化温度 T_g 与共聚单体投料摩尔比间的关系

2.4　降解性质

共聚物的降解实验如图 4 和 5 所示. 当共聚物单体投料摩尔比为 10∶3 时, 28 d 后其失重率基本上是 100%; 而碳酸酯的均聚物在相同条件下的失重率仅为 8.76%. 磷酸酯的引入大大提高了聚碳酸酯的亲水性和降解性能, 共聚物中 EEP 链段越多, 共聚物降解速度越快. 因此可以通过调节共聚物中磷酸酯的含量, 达到对共聚物材料降解速率的调控. 共聚物分子量的变化(图 5)也反映出类似的结果.

3　结论

首次以猪胰脂肪酶或假丝酵母皱褶酶为催化剂, 100℃下通过本体聚合成功地合成了三亚甲基碳酸酯(TMC)和 2-乙氧基-2-氧-1,3-二氧磷杂环戊烷(EEP) 的共聚物(poly(TMC-co-EEP)). 共聚物数均分子量最大可达到 10200. DSC 和 NMR 数据都表明得到的聚合物是无规共聚物.

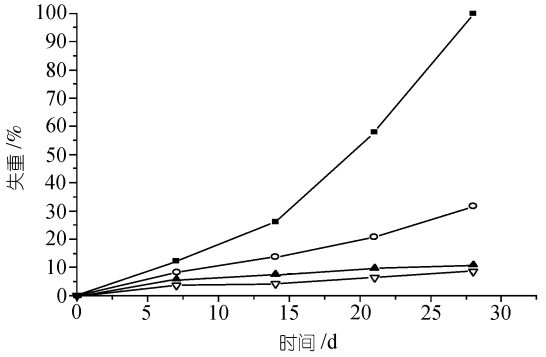

图 4 共聚物降解后的失重比(PBS pH 7.4, 37℃)

■示 P(TMC-co-EEP)(TMC∶EEP = 10∶3); ○示 P(TMC-co-EEP)(TMC∶EEP = 10∶2); ▲示 P(TMC-co-EEP)(TMC∶EEP = 10∶1); ▽示 PTMC

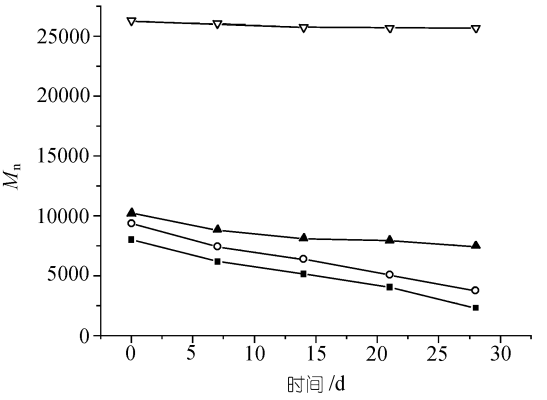

图 5 共聚物降解过程中的分子量变化

▽示 P(TMC); ▲示 P(TMC-co-EEP)(TMCEEP = 10∶1); ○示 P(TMC-co-EEP)(TMC∶EEP = 10∶2); ■示 P(TMC-co-EEP)(TMC∶EEP = 10∶3)

随着单体投料摩尔比(EEP/TMC)的增加, 共聚物 T_g 线性降低, 同时共聚物降解速率加快. 在聚碳酸酯主链上引入聚磷酸酯链段可以有效的调节聚合物的热学性能和降解性能.

参 考 文 献

1 Aceermoglu M. Biodegradable polycarbonates and their use as drug carriers. PCT INT Appl WO, 9320126, 1993-10-14 (CA 121: 18033)

2 Chiellini E, Solaro R, Bemporad L. Functional polyesters from glycidyl derivatives and cyclic anhydrides or carbon dioxide. Eur Pat Appl EP, 486437, 1992-05-20 (CA 117: 112295)

3 Wang S, Wan A C A, Xu X Y, et al. A new nerve guide conduit material composed of a biodegradable poly(phosphoester). Biomaterials, 2001,22:1157~1169

4 Wang Jun, Mao H Q, Leong K W, et al. A novel biodegradable gene carrier based on polyphosphoester. J Am Chem Sci, 2001, 123: 9480~9481

5 Wang S, Mao H Q, Leong K W, et al. Fabrication of poly(phosphoester) nerve guides by immersion precipitation and the control of porosity. Biomaterials, 2001, 22: 1147~1156

6 Wurm B, Keul H, Hocker H, et al. Dibutylmagnesium as initiator for the ring-opening polymerization of 2,2-dimethyltrimethylene carbonate and ε-caprolactone. Makromol Chem Rapid Commun, 1992, 13: 9~15

7 Bisht K S, Svirkin Y Y, Henderson L A, et al. Lipase-catalyzed ring-opening polymerization of trimethylene carbonate. Macromolecules, 1997, 30: 7735~7742

8 Matsumura S, Tsukada K, Toshima K. Enzyme-catalyzed ring-opening polymerization of 1,3-dioxan-2-one to poly(trimethylenen carbonate). Macromolecules, 1997, 30: 3122~3124

9 Wen J, Zhuo R X. Enzyme-catalyzed ring-opening polymerization of ethylene isopropyl phosphate. Macromol Chem Rapid Commun, 1998, 19: 641~642

10 He F, Zhuo R X, Liu L.J, et al. Immobilized lipase on porous silica beads: Preparation and application for enzymatic ring-opening polymerization of cyclic phosphate. React & Funct Polym, 2001, 47: 153~158

11 Nishida H, Yamashita M, Nagashima M, et al. Synthesis of metal-free poly(1,4-dioxan-2-one) by enzyme-catalyzed ring-opening polymerization. J Polym Sci, Polym Chem, 2000, 38: 1560~1567

12 Matsumura S, Tsukada K, Toshima K. Novel lipase-catalyzed ring-opening copolymerization of lactide and trimethylene carbonate forming poly(ester carbonate)a. Inter J Bio Macromol, 1999, 25: 161~162

13 Namekawa S, Uyama H, Kobayashi S. Lipase-catalyzed ring-opening polymerization and copolymerization of β-propiolactone. Polym J, 1996, 28: 730~731

14 Wen J, Zhuo R X. Preparation and characterization of poly(D,L-lactide-co-ethylene methyl phosphate). Polym Int, 1998, 47: 503~509