

聚(3-丙烯酰胺基苯硼酸-*N,N*-二甲基 丙烯酰胺-丙烯酰胺)凝胶的 合成和糖敏感性

李波, 滕大勇, 王 瑱, 李朝兴

(南开大学功能高分子化学研究所, 高分子材料教育部重点实验室, 天津 300071)

摘要 用自由基引发3-丙烯酰胺基苯硼酸(AAPBA)、*N,N*-二甲基丙烯酰胺(DMAA)和丙烯酰胺(AAm)共聚交联制得新型三嵌段水凝胶P(AAPBA-co-DMAA-co-AAm), 与传统的两嵌段聚合物相比, 该凝胶具有良好的糖敏感特性, 在质量浓度200 mg/dL以上有较高的糖响应特性, 这一数值接近糖尿病病人的血糖阈值, 其溶胀度达10倍以上, 同时糖响应时间缩短到2~3 h. 振荡实验结果表明, 所得凝胶对糖呈现出良好的刺激-响应特性.

关键词 苯基硼酸; 糖敏感; 凝胶; 溶胀; 响应

中图分类号 O631

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2007)02-0376-06

糖尿病是一种以高血糖特别是以餐后血糖升高为主要特征的代谢性疾病, 降低血糖是目前治疗糖尿病的主要方法. 由于血糖升高与进餐密切相关, 而目前的给药方式难以达到同步和适量, 临床上经常出现降糖效果不理想或低血糖反应, 因此, 寻找一种糖敏感材料作为糖尿病智能给药系统的载体显得尤为重要. 人们一直在寻找能够满足上述要求的糖敏感材料, 迄今为止, 已发现载有葡萄糖氧化酶的体系^[1,2]、载有植物外源性凝集素的体系^[3,4]及带有苯基硼酸基团的体系都具有糖敏感特性. 其中, 以苯基硼酸材料最受人们关注. 由于硼酸基团可以与糖络合, 该类材料已经被应用到传感器^[5~7]、糖分离^[8]、淋巴细胞的分裂促进剂^[9]和治疗肿瘤的靶向给药系统^[10]. 含有苯基硼酸基团的聚合物都具有糖敏感特性^[11~14], 但糖敏感响应区间(300 mg/dL)远远高于糖尿病病人的血糖浓度, 糖敏感的响应时间也长达15 h^[15], 不符合糖尿病病人餐后2 h血糖达到峰值的生理要求.

本文合成了新型的聚(3-丙烯酰胺基苯硼酸-co-*N,N*-二甲基丙烯酰胺-co-丙烯酰胺)共聚物水凝胶, 系统地考察了各单体对溶胀率的影响, 采用SEM方法分析凝胶溶胀前后的变化, 以格列奇特为药物模型研究了其在生理条件下的葡萄糖敏感度和刺激-响应时间.

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

间氨基苯基硼酸(MAPBA), 北京金奥利维科技发展有限公司; 丙烯酰胺(AAm), 天津市化学试剂研究所; *N,N*-二甲基丙烯酰胺(DMAA), 上海海曲化工有限公司, 参照文献[16]方法纯化; *N,N*-亚甲基双丙烯酰胺(BIS), 天津市科密欧化学试剂开发中心; 偶氮二异丁腈(AIBN), 天津市科汇达化工有限公司; 丙烯酰氯(自制); 格列奇特, 天津市新新药业公司. 其余试剂均为分析纯.

核磁共振谱仪(Varian UNITY plus-400), 扫描电镜(日本 Hitachi S 3500 N), 紫外分光光度计(日本, 岛津 2550), ICP-9000(N+M)(美国, Thermo Jarrell-Ash Corp.), 元素分析仪(德国, Elementar vario EL), HL-2 恒流泵(上海市沪西仪器厂).

收稿日期: 2006-04-17.

联系人简介: 李朝兴(1957年出生), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事药物化学及高分子化学方面的研究.

E-mail: lcx@nankai.edu.cn

1.2 聚(*N,N*-二甲基丙烯酰胺-co-苯基硼酸-co-丙烯酰胺) [P(DMAA-co-AAPBA-co-AAm)] 共聚物水凝胶的合成

1.2.1 3-丙烯酰胺基苯基硼酸(AAPBA)的合成 参照 Lee 等^[7]报道的方法并进行必要的改进. 将 3-氨基苯基硼酸(10 g, 64.4 mmol)和 2 mol/L NaOH(5.16 g, 129.04 mmol, 50 mL)的冷溶液逐滴加入到丙烯酰氯(10 mL, 123.8 mmol)中, 滴加时间超过 30 min. 在冰盐浴冷却下搅拌 30 min. 然后升至室温再搅拌 2 h. 所得混合物溶液用 HCl(1 mol/L)调至 pH = 8, 过滤沉淀物, 用 50 mL 冷水洗涤 5 次, 于空气中干燥. 将干燥后的粉末溶解到热的体积分数 5% 的乙醇水溶液中(约 150 mL), 用滤纸过滤. 滤液在 4 °C 静置 12 h, 得到褐色针状晶体, 过滤, 冷冻干燥(7.11 g, 产率 51%). 化合物 ¹H NMR (DMSO-d₆)数据, δ: 5.8, 6.2(2H, CH₂), 6.4(1H, CH), 7.3, 7.5, 7.8, 7.9(4H, Ar—H), 8.1[2H, B(OH)₂], 10.1(1H, NH).

1.2.2 P(DMAA-co-AAPBA-co-AAm)共聚物的制备和纯化 在氮气保护下, 将 DMAA, AAPBA, AAm 和 BIS 加入到 8 mL DMSO 中, 以 AIBN(1 mg/mL)为自由基聚合的引发剂, 于 60 °C 反应 10 h. 将形成的凝胶切成直径为 15 mm 的圆片, 然后依次用不同的 V(DMSO)/V(水)比(100/0, 75/25, 50/50, 25/75 和 0/100)的混合溶液浸泡 24 h, 以除去未反应的单体, 然后将其冷冻干燥.

1.2.3 包埋格列奇特的聚(*N,N*-二甲基丙烯酰胺-co-苯基硼酸-co-丙烯酰胺) [P(DMAA-co-AAPBA-co-AAm)] 共聚物水凝胶的制备和纯化 在氮气保护下, 将格列奇特、DMAA、AAPBA、AAm 和 BIS 加入到 8 mL DMSO 中, AIBN(1 mg/mL)为自由基聚合的引发剂, 于 60 °C 反应 10 h. 将形成的凝胶用水浸泡, 每 12 h 换一次水, 以除去未反应的单体及溶剂, 直到浸泡液的紫外吸收在 226.50 nm 处相对恒定, 将其冷冻干燥.

1.3 表 征

将冷冻干燥后的凝胶样品 N17 用 DMSO-d₆ 溶解, 测定 ¹H NMR 谱, 并进行 C, H, N, B 的元素分析; 取干态和充分溶胀后的凝胶样品 N12, 表面经喷金处理后, 用扫描电子显微镜(SEM)观察其膨胀前后的形态变化.

1.4 凝胶的膨胀性能测定

1.4.1 凝胶的膨胀性能 称取一定量的干燥凝胶(W_0), 将其浸入到不同浓度葡萄糖的磷酸缓冲溶液(pH = 7.4)中, 于 37 °C 使其充分溶胀, 称量湿重(W_1), 按下式计算凝胶的溶胀率:

$$SR = (W_1 - W_0) / W_0$$

1.4.2 凝胶的糖敏感释药行为 称取 3 份等质量的干燥凝胶(W_0), 分别置于透析袋中, 加入各自的浸入液, 两端扎紧, 分别将其浸入到不同浓度的葡萄糖磷酸缓冲溶液(pH = 7.4)中, 于 37 °C 将其充分溶胀, 每隔一定时间测定 226.50 nm 波长处溶液的吸光度 A , 按标准方程 $A = 0.02142 + 0.01576c$ [c 为格列奇特在 pH = 7.4 的磷酸缓冲溶液中的质量浓度($\mu\text{g/mL}$), $\gamma = 0.99937$], $A = 0.00117 + 0.03697c$ [c 为格列奇特在 pH = 7.4, 2.0 g/L 的葡萄糖水溶液中的质量浓度($\mu\text{g/mL}$), $\gamma = 0.99999$] 和 $A = 0.00359 + 0.0363c$ [c 为格列奇特在 pH = 7.4, 3.0 g/L 的葡萄糖水溶液中的质量浓度($\mu\text{g/mL}$), $\gamma = 0.99998$] 计算吸光度 A .

1.4.3 凝胶的振荡试验 取冷冻干燥的包药凝胶, 将其浸在 pH = 7.4 磷酸缓冲液中, 充分溶胀后, 将其转入带有玻璃毛的交换柱中, 用恒流泵向其中加入一定浓度的葡萄糖溶液(pH = 7.4), 同时以相同的流出速度将溶液倒出, 用恒温水浴(39 °C)保持流入溶液的温度, 保证溶液流出温度为 37 °C, 随着时间的增长改变流入溶液的糖浓度, 每隔一定时间测定 226.50 nm 波长处瞬时流出液的吸光度 A , 按上述标准方程计算释药量.

2 结果与讨论

2.1 凝胶的合成

为了考察不同单体含量对凝胶形成和溶胀率的影响, 合成了一系列凝胶样品(见表 1). 由表 1 可见: 如果加入的 BIS 量太少, 不能形成凝胶; 加入的 BIS 量太多, 则会导致材料机械强度增大, 也不能

形成凝胶. 结果表明, BIS 的摩尔含量在 0.0088 ~ 0.0291 之间可以形成凝胶. 同样, 其它组分形成凝胶的条件区间分别为 AAPBA: 0.044 ~ 0.3114, AAm: 0.097 ~ 0.3502, DMAA: 0.5059 ~ 0.7684. AIBN 作为活性聚合引发剂广泛应用于油相烯基聚合反应. 本文中, 加入引发剂立即发生反应, 凝胶在 30 min 内形成, 且均匀透明, 说明在聚合交联过程中没有发生相分离. 关于 AAPBA 的二组分聚合物早有报道, 目前尚未发现该三组分凝胶的报道.

Table 1 Composition and the sample codes of the porous hydrogels^{*}

Sample	$w(\text{AAPBA})/$ mg	$w(\text{AAm})/$ mg	$V(\text{DMAA})/$ mL	$w(\text{BIS})/$ mg	Sample	$w(\text{AAPBA})/$ mg	$w(\text{AAm})/$ mg	$V(\text{DMAA})/$ mL	$w(\text{BIS})/$ mg
N1	62.3	88.9	0.600	24.1	N12	191	88.9	0.240	14.9
N2	127.0	88.9	0.600	25.2	N13	191	88.9	0.300	18.8
N3	191.0	88.9	0.600	26.3	N14	191	88.9	0.400	19.9
N4	260.0	88.9	0.600	27.4	N15	191	88.9	0.500	23.1
N5	382.0	88.9	0.600	29.5	N16	191	88.9	0.770	31.6
N6	612.0	88.9	0.600	33.4	N17	191	88.9	0.600	11.0
N7	191.0	53.3	0.600	24.6	N18	191	88.9	0.600	15.6
N8	191.0	116.0	0.600	27.5	N19	191	88.9	0.600	21.2
N9	191.0	161.0	0.600	29.6	N20	191	88.9	0.600	32.4
N10	191.0	209.0	0.600	31.7	N21	191	88.9	0.600	36.2
N11	191.0	262.0	0.600	34.2					

* $n(\text{BIS}):n(\text{Monomer}) = 0.0206$, except N17—N21.

聚合物的 ^1H NMR 谱(图 1)定性表征了聚合物的组成, 由元素分析结果计算所得到的各物质的摩尔比为 $n(\text{AAPBA}):n(\text{DMAA}):n(\text{AAm}):n(\text{BIS}) = 1:5.491:1.302:0.071$, 与实验的投料比接近, 在误差允许的范围内可以认为竞争反应很少, 这可归因于反应的单体都是酰胺类的缘故.

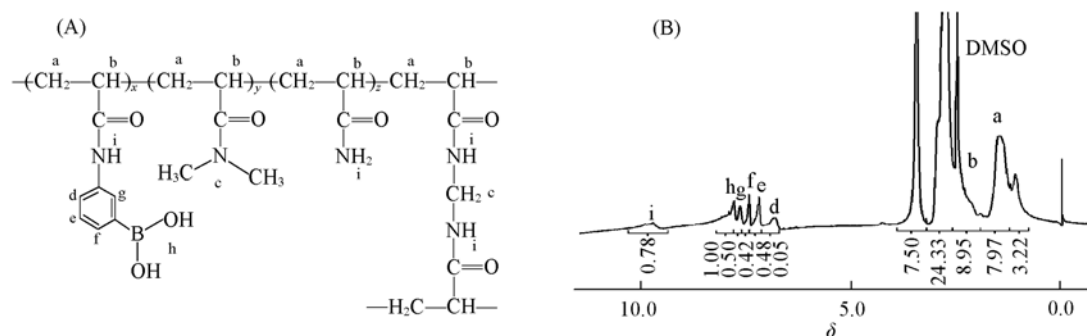


Fig. 1 Structure (A) and ^1H NMR spectrum(B) of the hydrogel

凝胶溶胀前后的 SEM 图见图 2, 由于凝胶的吸水膨胀导致网络内部的孔径变大, 从而呈现出如图 2(B)所示的截面多孔状.

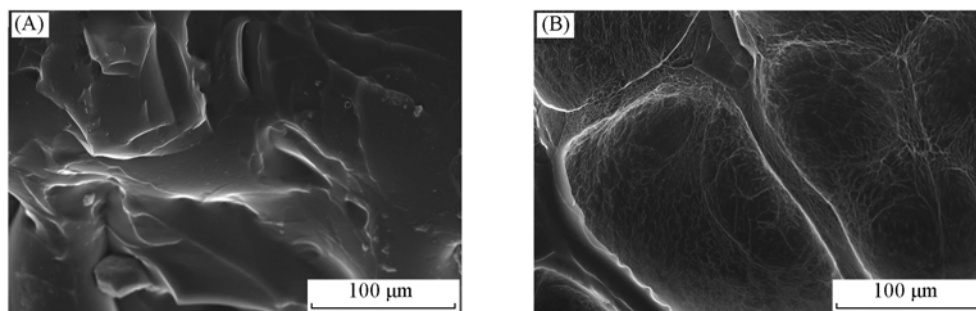


Fig. 2 SEM images of the dry(A) and swelling(B) porous hydrogels

2.2 水凝胶的溶胀率

图 3 为凝胶在不同浓度的葡萄糖缓冲液中的溶胀率. 由图 3 可以看出, 在 200 mg/dL 时凝胶溶胀率有变化, 高于 300 mg/dL 时溶胀率明显增大, 主要是因为糖浓度的增大, 使糖能够快速与苯硼酸结

合,使凝胶的亲水基团迅速增多,水溶性增大,溶胀率也相应增大.同时,凝胶的响应时间缩短到2 h,与以往的报道^[16]相比,缩小到原来的13%.我们认为加入的水溶性单体丙烯酰胺稀释了苯硼酸与N,N-二甲基丙烯酰胺的密集排列,使高分子链段的柔性提高,也减小了糖与硼酸结合的空间位阻,同时兼顾硼氮的电子互补和水溶性变化过程的加快,从而使响应时间缩短.

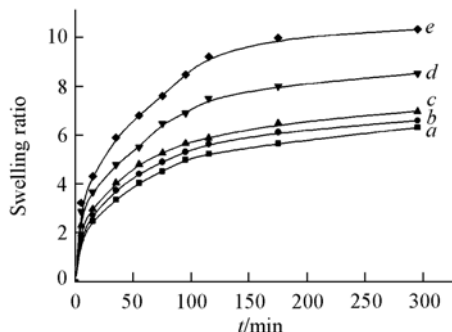


Fig. 3 Swelling ratios dependence of different mass concentrations of glucose

$\rho(\text{glucose})/(\text{mg} \cdot \text{dL}^{-1})$: a. 0; b. 100; c. 200; d. 300; e. 500.

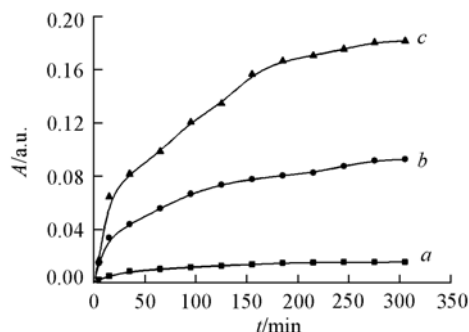


Fig. 4 UV absorbance dependence of different mass concentrations of glucose

$\rho(\text{glucose})/(\text{mg} \cdot \text{dL}^{-1})$: a. 0; b. 2; c. 3.

药物释放机理是由药物扩散和载体材料的降解过程同时控制的,但本载药材料的降解缓慢,因此,药物扩散机理控制起决定作用.图4是凝胶在不同质量浓度的葡萄糖缓冲液中的释药曲线.由图4可以看出,在不含葡萄糖的缓冲液中,药物基本不释放;在葡萄糖质量浓度为200 mg/dL时凝胶有少量释药;质量浓度高于300 mg/dL时释药量明显增大,这主要是因为糖浓度的增大,使糖能够快速与苯硼酸结合,从而凝胶的亲水基团迅速增多,水溶性增大,膨胀率也相应增大,即凝胶的网络增大,药物从中扩散出来.同时,凝胶的响应时间缩短到3 h,比前面的膨胀时间增加了1 h,这主要是由于凝胶的膨胀平衡先于药物的扩散平衡所致.

2.3 水凝胶的振荡实验

凝胶的刺激-响应特性如图5所示.前2 h是水溶胀平衡的凝胶在300 mg/dL的葡萄糖缓冲溶液中的释药行为,接下来2 h是在200 mg/dL的葡萄糖缓冲溶液中的释药行为,其后的2 h是300 mg/dL葡萄糖缓冲液的释药行为,随后的6 h每隔2 h改变一次糖浓度(见图5).可以看出,有糖存在时,苯硼酸与糖结合,使其变为水溶性基团,膨胀率增大,药物浓度较大;在高浓度糖中溶胀后放入低糖环境后由于苯硼酸上结合的糖部分解离出来游离到水中,使得凝胶的水溶性减弱,膨胀率降低,宏观表现为药物浓度减小.由此可知,凝胶的刺激-响应特性较好.

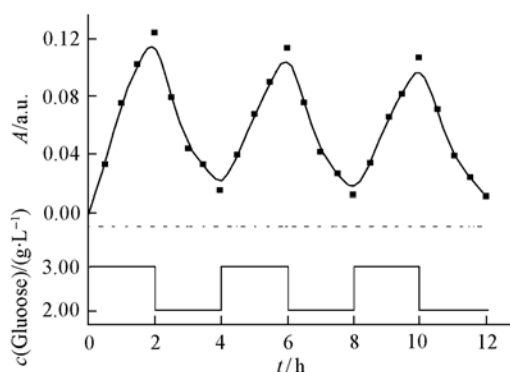


Fig. 5 Oscillating swelling-deswelling of hydrogel at different mass concentrations of glucose

2.4 单体含量对溶胀率的影响

高分子凝胶的溶胀特性与溶质和溶剂的性质、温度、压力以及网络的交联度有关,渗透压是凝胶溶胀的推动力.其定量关系可用Flory-Huggins渗透压公式^[17]表示:

$$\Pi = -RT/V_c [\varphi + \ln(1 + \varphi) + \chi\varphi^2] + VRT[1/2(\varphi/\varphi_0) - (\varphi/\varphi_0)^{1/3}] + RT(N_{\text{gel}} - N_{\text{sol}})$$

式中, R 为气体常数, T 为绝对温度, V_c 为溶剂的摩尔体积, χ 为高聚物和水(溶剂)的相互作用常数, φ_0 为凝胶网络的体积分数, φ 表示无规线团聚合物链的体积分数, N_{gel} 和 N_{sol} 分别为凝胶和溶液中离子的总浓度, V 是 $\varphi = \varphi_0$ 时单体体积组成链的数目.上式表明, χ 越大即水溶性基团越多, φ_0 越小即交联剂的含量越小,渗透压 Π 越大,从而导致凝胶的溶胀率越大.水凝胶的体积相转变是由聚合物网络中

的疏水-亲水基团共同作用的结果,当组成凝胶的网络中含有较高的亲水基团时,它能与更多的水结合,宏观上表现出较高的溶胀率.

图 6(A)为 BIS 摩尔含量对溶胀率的影响.由图 6(A)可以看出,随着交联剂含量的增大,溶胀率急剧降低.这是因为化学交联的水凝胶是高分子链的互相缠结,交联度增大,必然引起交联点增多,交联点间距变小,凝胶的交联密度变大,即凝胶的网络空间变小,凝胶中的自由水减少,从而导致溶胀率降低.同时,交联度的增大,必然导致材料向固相转变,不利于凝胶相的形成,这会引引起溶胀率急剧降低.

图 6(B)为 AAPBA 含量对溶胀率的影响.由图 6(B)可以看出,随着 AAPBA 含量的增加,溶胀率有所增大,当含量达到 13% 左右时又开始降低,这主要是因为凝胶中的苯硼酸官能团在 $\text{pH} = 7.4$ 时只有部分成为硼酸阴离子(亲水),剩余部分是不电离的(疏水),而电离是一个平衡过程,硼酸和糖的结合必然使平衡向电离方向移动,但这种结合的效率不高,导致在一定范围内增大 AAPBA 基团的含量会增大溶胀率;超过一定值后,由于空间位阻效应, AAPBA 基团就不能和葡萄糖高效地结合以提高凝胶的水溶性,所以含量过高会造成疏水基团的增大,凝胶的溶胀率大幅降低.这与 Kataoka 等^[18]报道的结果基本一致.

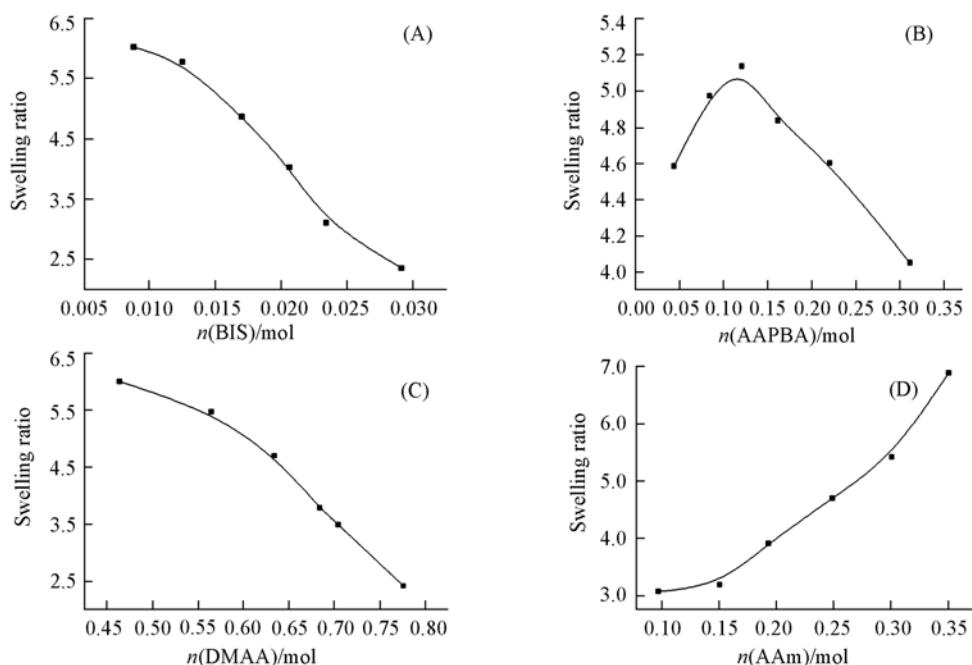


Fig. 6 Swelling ratios dependence of the contents of different monomers

(A) BIS; (B) AAPBA; (C) DMAA; (D) AAm.

图 6(C)为 DMAA 含量对膨胀率的影响.由图 6(C)可以看出,随着 DMAA 含量的增大,凝胶的膨胀率急剧下降,据文献^[18]报道, DMAA 基团的主要作用是对缺电子原子 B 提供电子,以稳定电离形成的阴离子,同时 DMAA 是疏水的,是形成凝胶的必要条件,因此 DMAA 含量与 AAPBA 基团是相关的.增大 DMAA 基团的含量相当于水溶性基团的增大,使得凝胶的溶胀率降低.

图 6(D)为 AAm 含量对溶胀率的影响.由图 6(D)可以看出,随着 AAm 含量的增加,硼酸的溶胀率急剧增大,主要是 AAm 为亲水基团,含量增大会引起凝胶水溶性的显著增大,同时增大 AAm 也会使凝胶的孔径变大,其内部空间容纳的水会更多,从而使凝胶的溶胀率显著增大.

参 考 文 献

- [1] Zhang K., Wu X. Y.. J. Control. Release[J], 2002, **80**(1): 169—178
- [2] Podual K., Doyle III, Francis J., et al. . Biomaterials[J], 2000, **21**(14): 1439—1450
- [3] Kim J. J., Park K.. Pharm. Res. [J], 2001, **18**(6): 794—799

- [4] Kim J. J. , Park K. . J. Control. Release[J], 2001, **77**(1): 39—47
- [5] Kabilana S. , Alexander J. M. , Felicity K. S. , *et al.* . Biosens. Bioelectron. [J], 2005, **20**(8): 1602—1610
- [6] Kikuchi K. , Suzuki K. , Okabayashi O. , *et al.* . Anal. Chem. [J], 1996, **68**(5): 823—828
- [7] Lee Mei-Ching, Kabilan S. , Hussain A. , *et al.* . Anal. Chem. [J], 2004, **76**(19): 5748—5755
- [8] Wulff G. . Pure Appl. Chem. [J], 1982, **54**: 2093—2102
- [9] Uchimura E. , Otsuka H. , Okano T. , *et al.* . Biotechnol. Bioeng. [J], 2001, **72**(3): 307—314
- [10] Azaba A. K. , Srebniak M. , Doinere V. , *et al.* . J. Control. Release[J], 2005, **106**(1): 14—25
- [11] Matsumoto A. , Kurata T. , Shiino D. , *et al.* . Macromolecules. [J], 2004, **37**(4): 1502—1510
- [12] Shiomori K. , Alexander E. I. , Galaev I. Y. , *et al.* . Macromol. Chem. Phys. [J], 2004, **205**(1): 27—34
- [13] Reddy R. E. , Pan Y. , Johnson D. D. , *et al.* . Bioorgan. Med. Chem. [J], 2005, **13**(10): 3467—3473
- [14] Matsumoto A. , Ikeda S. , Harada A. , *et al.* . Biomacromolecules[J], 2003, **4**(5): 1410—1416
- [15] Kataoka K. , Miyazaki H. , Bunya M. , *et al.* . J. Am. Chem. Soc. [J], 1998, **120**(48): 12694—12695
- [16] Ivanova A. E. , Larsson H. , Yu I. , *et al.* . Polymer[J], 2004, **45**(8): 2495—2505
- [17] Flory P. J. . Principles of Polymer Chemistry[M], New York : Cornell University Press, 1953
- [18] Kataoka K. , Miyazaki H. , Okano T. , *et al.* . Macromolecules[J], 1994, **27**(4): 1061—1062

Preparation of Poly(3-acrylamidophenylboronic Acid-co-*N,N*-dimethylacrylamide-co-acrylamide) hydrogels and Investigations on Their Sugar-sensitive Properties

LI Bo, TENG Da-Yong, WANG Zhen, LI Chao-Xing*

(The Key Laboratory of Functional Polymer Materials, Ministry of Education, Institute of Polymer Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract Glucose-sensitive porous poly(3-acrylamidophenylboronic acid-co-*N,N*-dimethylacrylamide-co-acrylamide) [P(AAPBA-co-DMAA-co-AAm)] hydrogels were prepared by radical copolymerization in dimethyl sulphoxide(DMSO) solution. At Physiological pH condition(pH 7.4, 37 °C), the sensitivity of the Hydrogels to the sugar-concentration was investigated, and the influence of the component on the swelling ratio was studied at the same time. At the given range, with the increase of the contents of AAPBA and AAm in the gels. Compared with conventional block polymer, this hydrogel preserved an excellent sensibility to sugar-concentration and could response when the mass concentration of glucose is above 200 mg/dL, which approaches to diabetic's threshold of blood sugar. The swelling ratio of this hydrogel reached more than 10 times. At the same time, the response time to concentration of glucose decreased to 2—3 h. The results of surging experiment show the porous hydrogel possesses an excellent stimulate-response capability to sugar. Therefore, these novel porous Hydrogels have potential for the controlled release of drugs, especially for the micro molecular drugs.

Keywords Phenylboronic acid; Sugar-sensitivity; Gel; Swelling; Responsivity

(Ed. : W, Z)