

# 聚[(甲氧基乙氧基乙氧基)<sub>1.0</sub>(乙氧基吡咯烷酮)<sub>1.0</sub>] 膦腈的合成及性能研究

殷跃凡<sup>1</sup>, 李艳梅<sup>1</sup>, 资彦楠<sup>1</sup>, 周轶平<sup>2</sup>, 毕韵梅<sup>1</sup>

(1. 云南师范大学化学化工学院, 昆明 650092; 2. 昆明医学院云南省天然药物药理重点实验室, 昆明 650031)

**摘要** 用三氯化铝催化六氯三聚膦腈开环聚合制得线性聚二氯膦腈(PDCP), 通过 PDCP 磷原子上的亲核取代反应, 合成了新的水溶性高分子聚[(甲氧基乙氧基乙氧基)<sub>1.0</sub>(乙氧基吡咯烷酮)<sub>1.0</sub>]膦腈(P3), 用 <sup>31</sup>P NMR, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR 和 IR 对其结构进行了确证, 用 DSC 测定了其玻璃化转变温度  $T_g$  和熔融温度  $T_m$ , 用蒸汽压渗透法(VPO)测定了其数均分子量. 改进了聚二(乙氧基吡咯烷酮)膦腈(P2)的合成方法. 体外降解实验表明, P3 具有和 P2 类似的 pH 响应性降解行为, 降解速率在 pH = 5.0 时最快, 而在 pH = 7.4 和 8.0 时较慢. P3 在所测试的 3 个 pH 缓冲溶液中均比 P2 降解慢. 用 <sup>31</sup>P NMR、薄层色谱(TLC)和滴定法对降解产物进行了检测, 初步推断了 P3 在不同 pH 介质中的水解机理, 其在 pH = 5.0 的缓冲溶液中的降解, 除侧链断裂外, 聚膦腈的骨架也裂解; 而在 pH = 7.4 和 8.0 时的降解仅为侧链的断裂. 用噻唑蓝(MTT)比色法进行的体外细胞毒性评价实验表明, P3 及其在 pH = 5.0 的缓冲溶液中降解 49 d 后的产物均对细胞表现出了很好的生物相容性, 而且其降解产物在浓度为 800 μg/mL 时还表现出一定的促进细胞增殖作用.

**关键词** 聚膦腈; 乙氧基吡咯烷酮; 甲氧基乙氧基乙氧基; pH 响应性降解; 水解机理; 体外细胞毒性

中图分类号 O631

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2009)06-1245-08

聚乙烯基吡咯烷酮(PVP)是一种性能优异的水溶性高分子, 具有良好的生物相容性, 广泛应用于医药、化妆品、食品、饮料、卫生、材料等诸多领域<sup>[1]</sup>. 然而, PVP 是非生物降解的高聚物, 作为药物载体长期使用会在体内聚集引起副作用; 而且 PVP 在生理条件下不能成型, 通常的交联方法不能降解, 在一定程度上限制了其应用范围<sup>[2]</sup>. 可生物降解聚膦腈是一系列由氮磷原子以单双键交替构成, 主链和侧链是一种或几种水解敏感的有机基团构成的高分子化合物, 降解产物通常为无毒的磷酸盐、氨和相应的侧基. 降解的速率和材料的理化性能都可以通过侧链的设计进行改变, 合成的大多数可生物降解聚膦腈有望在生物医药上得到应用<sup>[3]</sup>. 将吡咯烷酮引入聚膦腈的侧链, 可获得 pH 响应性可生物降解水溶性高分子<sup>[4]</sup>, 具有乙氧基吡咯烷酮侧基聚膦腈在酸性条件下比在中性和碱性条件下降解速率更快, 这一特性使其在基因传递和抗癌药物的靶向释放方面具有潜在的应用价值, 例如, 可以用此类 pH 响应性聚膦腈设计一个在细胞外液(正常 pH 值为 7.4)中稳定, 而在核内体(pH 值约为 5.5)<sup>[5]</sup>可以降解的药物控制释放系统, 将基因或药物主动靶向病变组织, 避免网状内皮系统的清除<sup>[6]</sup>. 此外, 由于肿瘤附近的 pH 值比周围正常组织低, 利用 pH 响应性载体载药可靶向释放到这些部位. 因此, 具有乙氧基吡咯烷酮侧基的聚膦腈是一类值得深入研究的高聚物.

本文合成了新的水溶性高分子聚[(甲氧基乙氧基乙氧基)<sub>1.0</sub>(乙氧基吡咯烷酮)<sub>1.0</sub>]膦腈, 引入不降解且辐射敏感的甲氧基乙氧基乙氧基基团不但可以调节聚合物的降解速率, 而且可望用辐射交联方法产生交联网络<sup>[7]</sup>, 为此类线性高聚物的交联提供位点. 作为对照, 合成了聚二(乙氧基吡咯烷酮)膦腈, 并改进了其合成方法. 对所合成聚膦腈的热性能、降解性能和降解产物进行了研究, 对新聚膦腈在不同 pH 介质中的水解机理进行了推测, 采用噻唑蓝(MTT)比色法评价了新聚膦腈及其降解产物的生物相容性.

收稿日期: 2008-08-25.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 20364002)和云南省自然科学基金(批准号: 2005B0027M)资助.

联系人简介: 毕韵梅, 女, 博士, 教授, 从事功能高分子合成和性能研究. E-mail: yunmeibi@hotmail.com

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

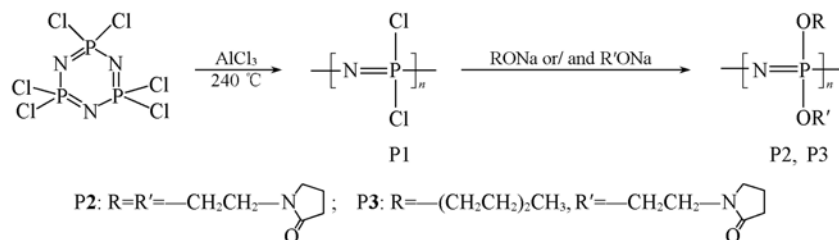
六氯三聚磷腈(HCCP, 纯度 $\geq 98\%$ , 国产), 经石油醚(60~90 °C)重结晶2次, 减压升华2次, 得到白色晶体, m. p. 110~113 °C; NaH(Sigma); 甲氧基乙氧基乙醇(Aldrich), 使用前重蒸; 四氢呋喃(THF)、甲醇(A. R. 级)、二氧六环(A. R. 级)均为国产试剂, 使用前作除水处理; 无水三氯化铝(A. R., 国产)氮气氛中研磨成粉末状, 烘干后真空保存备用;  $\gamma$ -丁内酯、乙醇胺、18-冠-6、硼酸、硼砂、醋酸、醋酸钠、十二烷基硫酸钠(SDS)、异丁醇均为国产分析纯试剂. 3-(4,5-二甲基噻唑) 2,5-二苯基四氮唑盐(噻唑蓝, MTT, Sigma); 人肝癌细胞株 HEPG2 由昆明医学院云南省天然药物重点实验室提供; RPMI 1640 培养基(Gibco); 10%小牛血清(杭州四季清生物工程材料有限公司).

Bruker DRX-500 核磁共振仪(Bruker, 瑞士),  $^{31}\text{P}$  NMR 谱以 85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  为外标,  $^1\text{H}$  NMR 和  $^{13}\text{C}$  NMR 以 TMS 为内标,  $\text{D}_2\text{O}$  为溶剂; PE-1640 型傅里叶红外光谱仪(美国), KBr 压片; DSC 200PC 热分析仪(德国 Netzsch 公司); 升温速率 10 °C/min, 升温范围为 -100~200 °C, 低温用液氮冷却控制; K-7000 型蒸汽压渗透仪(VPO, 德国 Knauer 公司), 八乙酰蔗糖为标样, 甲醇为溶剂; 内径 0.5~0.6 mm 的乌氏黏度计(国产)3支, 分别固定测定不同 pH 缓冲溶液的黏度; 酶标仪(Bio-rad), 测试波长 570 和 630 nm.

所有合成使用真空线技术控制完成.

### 1.2 聚二(乙氧基吡咯烷酮)磷腈(P2)的合成

聚二(乙氧基吡咯烷酮)磷腈的合成路线见 Scheme 1.



Scheme 1 Synthetic route of polymers P1—P3

参照文献[8]方法合成聚二氯磷腈(PDCP, P1), 并溶于 THF 至澄清后备用. 参照文献[9,10]方法合成 *N*-羟乙基-2-吡咯烷酮, 经多次减压蒸馏后, 用分子筛干燥保存. 将 100 mL 含有 6.15 g(47.67 mmol) *N*-羟乙基-2-吡咯烷酮的二氧六环溶液缓慢滴加到 100 mL 含 1.14 g(47.67 mmol) NaH 的二氧六环悬浮液中, 常温搅拌过夜制得钠盐溶液. 将其滴加到 100 mL 含 1.00 g(8.62 mmol) P1 的 THF 溶液中, 同时按照羟乙基吡咯烷酮钠盐与 18-冠-6 的摩尔比为 1:0.05 加入相转移催化剂 18-冠-6. 室温反应 24 h 后,  $^{31}\text{P}$  NMR 谱监测反应完成. 产物浓缩后, 用石油醚沉淀, 沉淀用甲醇溶解, 用石油醚反复沉淀 3 次, 得到浅黄色固体聚合物(P2)1.80 g, 产率 69.2%.

### 1.3 聚[(甲氧基乙氧基乙氧基) $_{1.0}$ (乙氧基吡咯烷酮) $_{1.0}$ ]磷腈(P3)的合成

分别用甲氧基乙氧基乙醇、羟乙基吡咯烷酮和 NaH 反应制得 200 mL 含 2.69 g(17.7 mmol) 甲氧基乙氧基乙醇钠的 THF 溶液以及 200 mL 含 2.86 g(19.0 mmol) 羟乙基吡咯烷酮钠盐的二氧六环溶液. 按一定顺序将上述钠盐分别滴加到 200 mL 含 2.00 g(17.2 mmol) P1 的 THF 溶液中. 滴加顺序为: 甲氧基乙氧基乙醇钠的 THF 溶液、吡咯烷酮钠盐的二氧六环溶液及催化剂量的 18-冠-6, 且每加一步钠盐后均常温搅拌 48 h,  $^{31}\text{P}$  NMR 谱监测反应完成. 产物浓缩后, 用石油醚沉淀, 沉淀用甲醇溶解, 用石油醚反复沉淀 3 次, 得到浅黄色固体聚合物(P3)1.78 g, 产率 70.6%.

### 1.4 体外降解实验

由于需要测定降解产物的  $^{31}\text{P}$  NMR 谱, 故选择无磷缓冲溶液作为降解介质. pH = 5.0 时为醋酸/醋酸钠缓冲溶液(0.1 mol/L), pH = 7.4 和 8.0 条件下为硼酸/硼砂缓冲溶液(0.1 mol/L). 将 0.2 g 聚合物溶解在 25 mL 不同 pH 缓冲溶液中, 充分搅拌 24 h, 滤出不溶物, 用乌氏黏度计测量其特性黏度.

再将聚合物的缓冲溶液放入恒温振荡器中, 于 37 ℃, 振摇, 按一定的时间间隔从中取出部分溶液, 测定黏度, 观察黏度变化. 根据特性黏度的变化, 观测聚合物的降解行为. 用下列公式计算聚合物黏度的变化值<sup>[11]</sup>:

$$\text{Intrinsic viscosity loss (\%)} = \{([\eta]_0 - [\eta]_t) / [\eta]_0\} \times 100\%$$

式中,  $[\eta]_t$  为降解一定时间( $t$ )后的黏度,  $[\eta]_0$  为降解前溶液的黏度, 为聚合物的特性黏度.

### 1.5 聚合物降解产物分析

将在不同 pH 缓冲溶液中振摇 49 d 后的降解产物浓缩, 主链降解产物磷酸根用 <sup>31</sup>P NMR 和 1.0 mol/L ZrOCl<sub>2</sub> 溶液检测, 侧链降解产物用薄层色谱(TLC)分析, 用羟乙基吡咯烷酮和甲氧基乙氧基乙醇作对比, 观测降解产物, 对比化合物的  $R_f$  值, 展开剂分别为  $V(\text{乙酸乙酯}):V(\text{丙酮}) = 1:1$  和  $6:1$ .

### 1.6 聚合物 P3 和降解产物的体外细胞毒性试验

参照文献[12]方法, 将 P3 用无菌生理盐水配成浓度为 8 mg/mL 的母液过滤保存, 用无菌生理盐水分别将母液和 P3 在 pH = 5.0 的缓冲溶液中降解 49 d 后的产物(浓度为 8 mg/mL)稀释为 800, 160, 32, 6.4 和 1.3 μg/mL 的样品. pH = 5.0 的醋酸/醋酸钠缓冲溶液(0.1 mol/L)用无菌生理盐水稀释 1/10, 1/50, 1/250, 1/1250 和 1/6250 倍.

试验组: 取对数生长期的 HEPG2 细胞, 用 RPMI 1640 培养液调整成密度为  $4 \times 10^4$  cell/mL 的细胞悬液, 接种于 96 孔培养板(90 μL/孔), 待细胞着床后加入 10 μL 不同浓度的样品, 放入 37 ℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 48 h 后, 加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液(10 μL/孔). 继续培养 4 h 后, 每孔加入 100 μL 三联液[10% SDS-5% 异丁醇-0.012 mol/L HCl]. 对照组: 细胞着床后, P3 和 pH = 5.0 的醋酸/醋酸钠缓冲溶液的阴性对照为加入 10 μL 无菌生理盐水; 降解产物的阴性对照为加入 10 μL 按上述比例稀释的 pH = 5.0 缓冲溶液. 试验组和对照组放置过夜后, 分别用酶标仪在双波长 570 和 630 nm 下测定各孔的光密度(OD)值. 用下式计算细胞存活率:

$$\text{细胞存活率} = (\text{加样孔的 OD 值} / \text{阴性对照孔的 OD 值}) \times 100\%$$

## 2 结果与讨论

### 2.1 聚合物的合成

用 AlCl<sub>3</sub> 催化六氯三聚膦腈(HCCP)开环聚合合成的聚二氯膦腈(PDCP, P1)可溶于 THF 而成为澄清的黏稠溶液, 其<sup>31</sup>P NMR 谱, 在化学位移 -17.18 处出现一个单峰, 与文献[13]报道的一致, 表明 HCCP 已经完全转化为线型 PDCP, 产物中没有交联体和小分子三聚体( $\delta$  20.3 处<sup>[3]</sup>无峰).

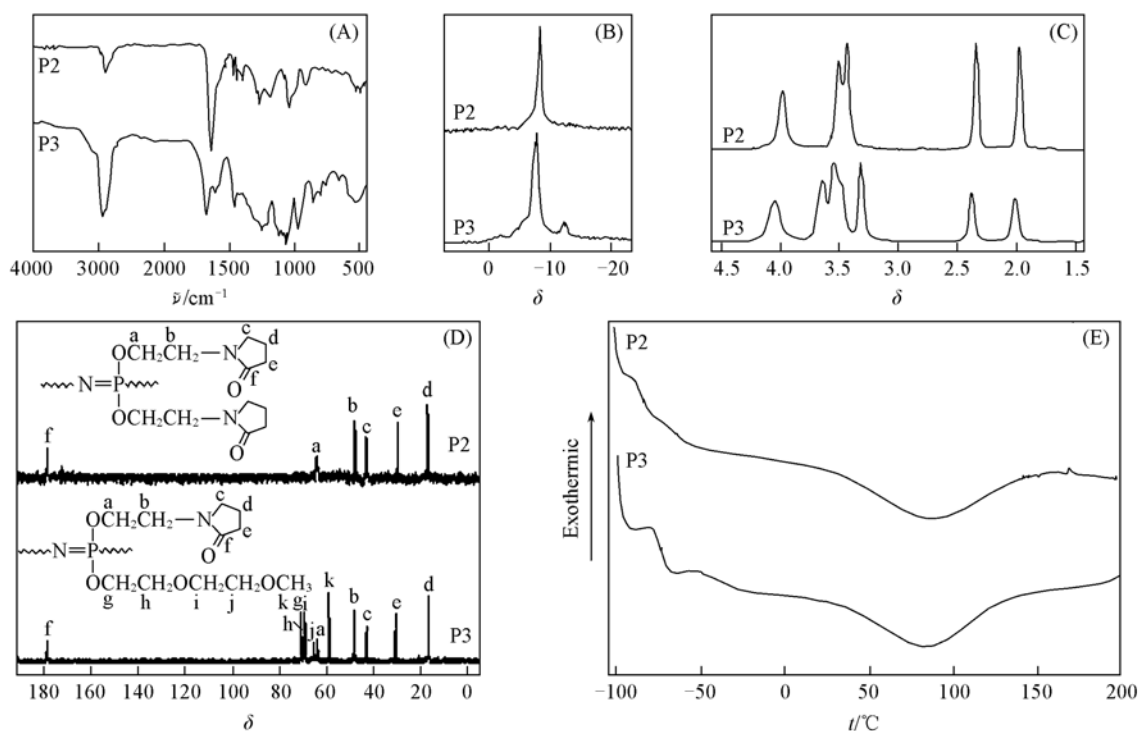
在聚二(乙氧基吡咯烷酮)膦腈(P2)的合成中, 羟乙基吡咯烷酮的钠盐在 THF 中溶解性较差, 为白色固体不溶物. 文献[4]报道的是将该钠盐溶解在大过量的二氧六环溶剂中, 充分稀释, 并且需要提高反应温度到 50 ℃. 本文使用相转移催化剂 18-冠-6, 以常规剂量的二氧六环来溶解羟乙基吡咯烷酮的钠盐, 在常温下反应就可以得到目标产物, 减少了溶剂的使用量, 降低了反应温度.

在聚[(甲氧基乙氧基乙氧基)<sub>1.0</sub>(乙氧基吡咯烷酮)<sub>1.0</sub>]膦腈(P3)的合成中, 本文采用了先引入甲氧基乙氧基乙氧基侧基, 再引入乙氧基吡咯烷酮侧基的方法. 对于这 2 种侧基, 可能由于溶解性的原因, 甲氧基乙氧基乙氧基部分比较容易取代 P1 上的氯原子, 使得高分子更稳定, 然后再加入乙氧基吡咯烷酮部分. 甲氧基乙氧基乙氧基为 2 个氯原子的 0.55 倍, 乙氧基吡咯烷酮为 2 个氯原子的 1 倍, 在取代完成时, 对产物进行的<sup>31</sup>P NMR[图 1(B)]分析结果表明, 原料 P1 分子中的 Cl 原子已经被完全取代.

### 2.2 聚合物的表征

聚合物 P2 的 IR 谱[图 1(A)]中, 2958.4 cm<sup>-1</sup> 为饱和 C—H 键吸收峰, 1654.2 cm<sup>-1</sup> 为典型的酰胺 C=O 键吸收峰, 1064.6 cm<sup>-1</sup> 为 P—O—C 键的特征吸收峰, 1290.6 cm<sup>-1</sup> 为 P=N 键的伸缩振动吸收峰. P2 的<sup>31</sup>P NMR[图 1(B)], <sup>1</sup>H NMR[图 1(C)]和<sup>13</sup>C NMR 谱[图 1(D)]与文献[4]报道的数据一致. 由 VPO 法测得 P2 的数均分子量  $M_n$  为 5614. 以上分析表明 P2 确为聚二(乙氧基吡咯烷酮)膦腈.

P3 的<sup>31</sup>P NMR 谱[图 1(B)]中,  $\delta_p$  -6.70 处吸收峰与聚二(甲氧基乙氧基乙氧基)膦腈(MEEP,  $\delta_p$



**Fig. 1** FTIR (A),  $^{31}\text{P}$  NMR (B),  $^1\text{H}$  NMR (C),  $^{13}\text{C}$  NMR spectra (D) and DSC curves (E) of polymers P2 and P3. P2 ( $\delta_{\text{p}} - 7.06$ )<sup>[14]</sup>和 P3 ( $\delta_{\text{p}} - 7.01$ )中磷的化学位移相近, 应为侧链连有相同取代基的链节 I 和 II (图 2) 产生的吸收峰, 而且 MEEP 和 P3 中磷的化学位移值很接近, 导致了 P3 的  $^{31}\text{P}$  NMR 谱中相近化学位移值吸收峰的重叠<sup>[15, 4]</sup>,  $\delta_{\text{p}} - 12.51$  应为侧链连有不同取代基的链节 (III) 产生的吸收峰, 所以, Scheme 1 中 P3 的结构式较为简化, P3 分子存在图 2 所示的 3 种链节; P3 的  $^{31}\text{P}$  NMR 谱中, 没有低于  $\delta_{\text{p}} - 13.00$  的吸收峰, 表明 P1 上的氯原子已经被全部取代. 与 P2 的 IR 谱[图 1(A)]相比, P3 在  $2926.4\text{ cm}^{-1}$  的饱和 C—H 键和  $1241.3, 1107.8\text{ cm}^{-1}$  的 C—O—C 键吸收峰明显增强, 这是由于引入了具有  $\text{CH}_3\text{O}$  和较多 C—O—C 键的甲氧基乙氧基乙氧基侧基所致;  $1666.8\text{ cm}^{-1}$  为酰胺 C=O 键吸收峰,  $965.6$  和  $1056.5\text{ cm}^{-1}$  为 P—O—C 的特征吸收峰; P3 的  $^1\text{H}$  NMR 谱[图 1(C)]中, 既出现了甲氧基乙氧基乙氧基上各质子的吸收峰, 又出现了乙氧基吡咯烷酮上各质子的吸收峰, 2 个侧链基团上  $\text{OCH}_2$  产生的吸收峰由于化学位移值相近而重叠呈现宽峰;  $\delta_{\text{H}} 3.41$  为甲氧基乙氧基乙氧基中的  $\text{OCH}_3$  质子产生的吸收峰,  $\delta_{\text{H}} 2.09$  为内酰胺中的  $\text{CH}_2$  质子产生的吸收峰, 通过积分面积计算 2 个侧链甲氧基乙氧基乙氧基和乙氧基吡咯烷酮的比例, 为  $(2.849/3):(1.899/2) \approx 1.0:1.0$ , 与通过控制加入有关试剂用量预期的比例一致. 在  $^{13}\text{C}$  NMR 谱中出现 10 个碳原子信号, 其归属见图 1(D). 由 VPO 法测定得 P3 的数均分子量  $M_n$  为 5705. 以上分析表明, P3 确为预期产物聚[(甲氧基乙氧基乙氧基)<sub>1.0</sub>(乙氧基吡咯烷酮)<sub>1.0</sub>] 磷腈.

图 1(E) 的 DSC 测试结果表明, P2 的玻璃化转变温度 ( $T_g$ ) 为  $-64.1\text{ }^\circ\text{C}$ , 而 P3 则有 2 个  $T_g$  分别为  $-73.7$  和  $-31.8\text{ }^\circ\text{C}$ , 前一个  $T_g$  对应于 MEEP 的  $T_g$ <sup>[14]</sup>, 而后一个  $T_g$  则比 P2 的  $T_g$  高. Stewart 等<sup>[16]</sup> 通过对具有不同比例的葡萄糖缩二丙酮和甲氧基乙氧基乙氧基侧基的混合取代聚磷腈  $T_g$  的研究表明, 具有 2 个不同侧基的混合取代聚磷腈, 可以看作三元共聚物, 一些关于共聚物的理论可以用作解释其热性能. 据此, P3 的 DSC 曲线显示双重  $T_g$  的原因可能是 P3 的结构类似于嵌段共聚物, 由于侧基乙氧基吡咯烷酮和甲氧基乙氧基乙氧基之间的极性差异, 使 P3 具有微相分离形态. P2 和 P3 的  $T_g$  均在  $0\text{ }^\circ\text{C}$  以下, 因为聚磷腈高分子主链没有形成长程共轭, 柔顺性能较好, 分子链可以围绕 N, P 骨架进行内旋转, P2 和 P3 的侧基为水溶性的乙氧基吡咯烷酮和甲氧基乙氧基乙氧基, 也使 P2 和 P3 的  $T_g$  值下降. P3 的后一个  $T_g$  比 P2 的高, 是因为 P2 的侧基为 2 个对称的乙氧基吡咯烷酮, 使高分子链间的距离增大, 相互作用力减小, 柔性增大<sup>[17]</sup>, 从而使 P2 的  $T_g$  较低; 而在 P3 的分子中, 由于甲氧基乙氧基乙氧基

基的引入, 高分子中增加了乙氧基吡咯烷酮和甲氧基乙氧基乙氧基混合取代的链节 III (图 2), 侧基的对称性被破坏, 减小了分子链的柔性, 导致  $T_g$  升高. 图 1(E) 也显示 P2 和 P3 均没有明确的熔点, 只有较宽的熔融峰, 具有高分子的特征, 熔融温度  $T_m$  (熔融的终点)<sup>[18]</sup> 分别为 135.3 和 124.9 °C.

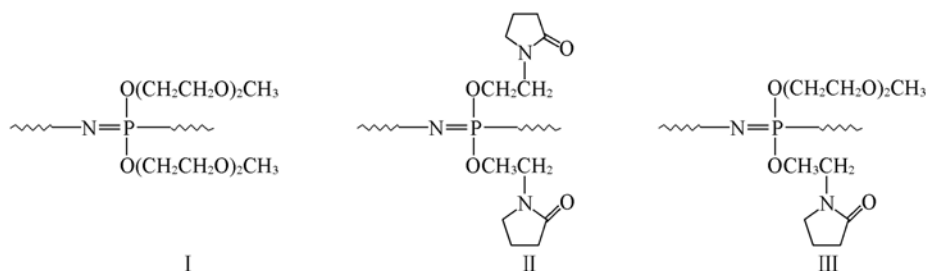


Fig. 2 Chain segments in the polymer P3

侧基甲氧基乙氧基乙氧基、乙氧基吡咯烷酮基的亲水性也导致了高分子 P2 和 P3 均可以溶解在极性较大的溶剂中, 如水、甲醇、乙醇和 DMSO 等, 而在石油醚、THF、丙酮和乙酸乙酯中溶解度较小.

尽管得到的聚合物 P2 和 P3 的分子量不大, 但这类低分子量的聚膦腈, 在溶解性和调节控制其可生物降解性方面可能更具有优势<sup>[9]</sup>.

### 2.3 聚合物的降解性能

图 3 为聚合物 P2 和 P3 在 37 °C, 不同 pH 缓冲溶液中的黏度降低百分率, 由于高分子溶液的特性黏度与其分子量成正比, 所以图 4 反映了聚合物在不同 pH 缓冲溶液中的分子量变化情况. 可以看出, 随着时间的延长, 聚合物 P2 和 P3 的特性黏度在不断减少, 前 14 d 降解速率较快, 随后黏度降低速率减缓. P2 和 P3 在 pH = 5.0 缓冲溶液中的降解速率明显比其在 pH = 7.4 和 8.0 时的降解速率快, 例如: 降解 14 d 时, 在 pH = 5.0 缓冲溶液中, 其黏度分别降低了 86.5% 和 72.7%, 而在 pH = 7.4 时, P2 和 P3 的黏度分别降低了 48.3% 和 37.0%. 这一降解趋势与聚二(乙氧基吡咯烷酮)膦腈 (PYRP) 在 55 °C 的强酸 (pH = 3.0)、强碱 (pH = 9.3) 和中性 (pH = 7.4) 介质中的降解趋势一致<sup>[4]</sup>, 但 P2 和 P3, 特别是 P3, 在 pH = 7.4 和 8.0 时的降解速率差异不大. 在所试的 3 个 pH 值的缓冲溶液中, P3 和 P2 相比, 降解速率均有所下降, 可能是因为引入了不易水解的甲氧基乙氧基乙氧基侧链, 使 P3 降解速率变慢.

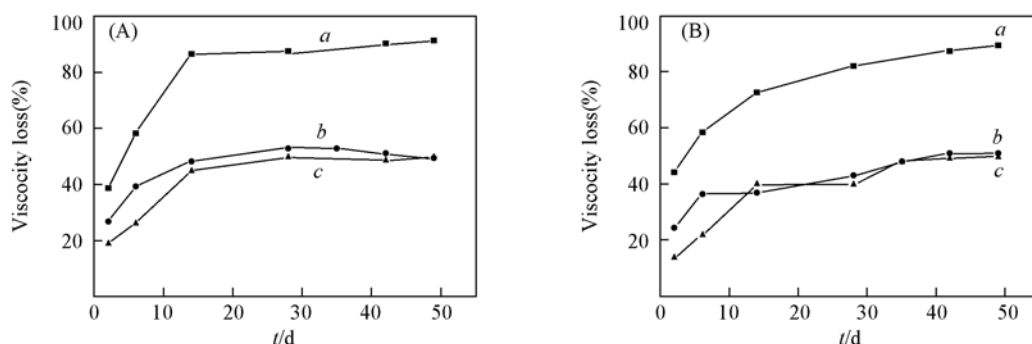


Fig. 3 Viscosity loss of polymers P3 (A) and P4 (B) during degradation in pH = 5.0 (a), 7.4 (b) and 8.0 (c) media at 37 °C

### 2.4 聚合物的水解降解机理探讨

为了探讨 P2 和 P3 的降解机理, 对两种聚合物在不同 pH 缓冲溶液中振摇 49 d 后的水解产物进行了 <sup>31</sup>P NMR 分析 (表 1). 结果表明, P2 和 P3 在 pH = 5.0 时, 降解产物在  $\delta_p$ : -15.00 ~ 5.00 的区域内出现多个吸收峰, 其中,  $\delta_p$ : -3.17 (P2) 和 -3.43 (P3) 应为水解后的 P—OH 吸收峰<sup>[4]</sup>,  $\delta_p$ : -7.91 和 -7.36 处则分别对应于未水解残留的链节 II 和链节 I 及 II (图 2).  $\delta_p$ : -0.03 和 -0.06 附近的吸收峰应为降解后磷酸根产生的共振信号 (本文所涉及的 <sup>31</sup>P NMR 均以 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 的化学位移为 0), 说明 P2 和 P3 在 pH = 5.0 缓冲溶液中水解后, 不仅侧链基团羟乙基吡咯烷酮水解脱离聚膦腈主链, 而且聚膦腈的氮磷骨架也已经断裂.

**Table 1** Identification of the hydrolytic products of polymers P2 and P3 after incubation for 49 d at 37 °C

	P2			P3		
	pH = 5.0	pH = 7.4	pH = 8.0	pH = 5.0	pH = 7.4	pH = 8.0
<sup>31</sup> P NMR, $\delta$	2.14, -0.03, -1.60, -3.17, -5.30, -7.91, -12.20	1.91, -0.07, -3.16, -4.12, -6.51	-3.68, -5.03, -6.89	3.55, 2.24, 1.03, -0.06, -3.43, -7.36	1.56, -3.46, -4.15, -6.30	1.83, -3.87, -6.86
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> <sup>a</sup>	+	+	-	+	-	-
PyrOH <sup>b</sup>	+	+	+	+	+	+
Mec <sup>c</sup>	-	-	-	-	-	-

*a.* Phosphates were detected with the use of zirconyl chloride (ZrOCl<sub>2</sub>). +: Formation of a white precipitate of zirconyl phosphate; -: no precipitate. *b, c.* 1-(2-hydroxyethyl)-2-pyrrolidone and ethyl 4-hydroxybenzoate were detected by Co-thin layer chromatography (TLC) with authentic samples, +: spot with identical R<sub>f</sub> value to the authentic sample; -: no spot.

此外, P2 和 P3 在 pH = 5.0 条件下降解产物的<sup>31</sup>P NMR 谱也表现出二者在降解速率上的差异, 在 P3 的<sup>31</sup>P NMR 谱中,  $\delta_p$  -7.36 处由链节 I 和 II 产生的共振信号最强, 而在 P2 的<sup>31</sup>P NMR 谱中, 则是  $\delta_p$ : -0.03 附近由磷酸根产生的共振信号最强, 说明 P2 聚磷腈氮磷骨架断裂的程度比 P3 的大, 进一步证明 pH = 5.0 时 P2 比 P3 降解速度快。

P2 和 P3 在 pH = 8.0 缓冲溶液中降解产物的<sup>31</sup>P NMR 谱, 除分别在  $\delta_p$ : -6.89 和 -6.86 处出现由链节 II 和链节 I 及 II 产生的共振信号较强外, 只在  $\delta_p$  -3.68 和 -3.87 (水解后的 P—OH 吸收峰) 以及 -5.03 等处出现了几个小的吸收峰, 而在  $\delta_p$  附近均无吸收峰, 说明 P2 和 P3 的降解只是侧基的水解, 而没有涉及聚磷腈氮磷骨架的断裂。进一步证明 P2 和 P3 在 pH = 8.0 缓冲溶液中水解缓慢。

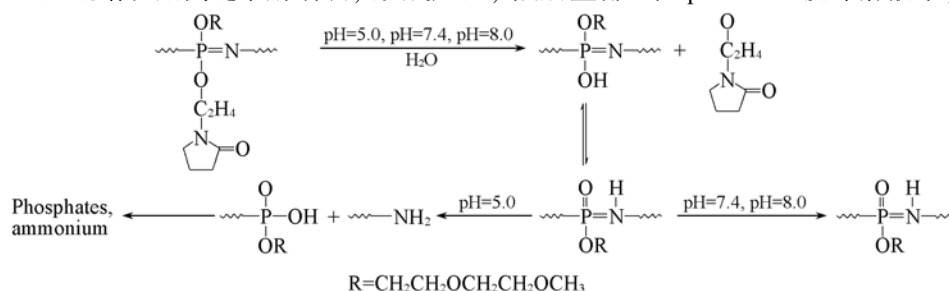
P2 在 pH = 7.4 时与其在 pH = 8.0 时降解产物的<sup>31</sup>P NMR 谱较为相似, 但在  $\delta_p$ : -0.07 附近出现了由磷酸根产生的共振信号。P3 在 pH = 7.4 时与其在 pH = 8.0 时降解产物的<sup>31</sup>P NMR 谱几乎相同, 在  $\delta_p$  0 处无吸收峰。说明聚合物 P2 和 P3 在中性条件下的降解, 主要还是侧基的水解, 只是在 P2 的降解过程中, 可能有少量的聚磷腈氮磷骨架断裂, 也进一步证明了中性条件下 P2 比 P3 降解速度快。

在 P2 和 P3 于不同 pH 缓冲溶液中振摇 49 d 后的水解产物中, 滴入 1.0 mol/L ZrOCl<sub>2</sub> 溶液, 检验主链降解产物磷酸根的存在, 结果(表 1)表明, 滴入 ZrOCl<sub>2</sub> 溶液后, P2 和 P3 在 pH = 5.0 缓冲溶液中的降解产物以及 P2 在 pH = 7.4 缓冲溶液中的降解产物产生白色沉淀, 说明这些降解已引起聚磷腈氮磷骨架的断裂, 而其余降解产物则无沉淀生成, 说明 P2 和 P3 在 pH = 8.0 时的降解和 P3 在 pH = 7.4 缓冲溶液中的降解均未涉及到主链的断裂, 与上述用<sup>31</sup>P NMR 谱分析得出的结论一致。

聚合物 P3 在 pH = 5.0, 7.4 和 8.0 缓冲溶液降解产物的<sup>31</sup>P NMR 谱中, 侧基为不同种基团链节 III 的吸收峰( $\delta_p$ : 12.51)均消失; 通过 TLC 检测到 P2 和 P3 在上述 3 个 pH 缓冲溶液的水解产物中均有羟乙基吡咯烷酮存在(表 1), 进一步证明了降解为侧链先水解。

Andrianov 等<sup>[4]</sup>根据聚二(乙氧基吡咯烷酮)磷腈(PYRP)的降解产物中, 只有羟乙基吡咯烷酮, 而没有其开环产物, 提出 PYRP 可能的降解机理为侧链先水解断裂, 释放出羟乙基吡咯烷酮, 生成羟基聚磷腈, 生成物不稳定, 发生重排, 然后再与水反应生成磷酸根和氨。但未讨论介质的酸碱性对 PYRP 降解机理的影响。在此基础上, 我们对聚合物 P3 的 pH 响应性降解机理进行了推测(图 4)。

首先, 羟乙基吡咯烷酮侧链水解断裂, 形成羟基, 然后重排。在 pH = 5.0 缓冲溶液中, 重排产物

**Fig. 4** Hydrolytic mechanism of polymer P3 in pH = 5.0, 7.4 and 8.0 media

进一步发生主链断裂, 得到产物羟乙基吡咯烷酮、磷酸根和氨. 而在 pH = 7.4 和 8.0 缓冲溶液中, 降解反应仅停留在重排的一步, 而没有发生主链的断裂, 因此, 降解产物中只有羟乙基吡咯烷酮, 而没有磷酸根.

## 2.5 P3 及其降解产物的体外细胞毒性

用 MTT 法评价 P3 及其降解产物的体外细胞毒性试验结果见图 5 (A), 在所测试的浓度范围 (1.3 ~ 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 内, HEPG2 细胞在 P3 的生理盐水溶液中在 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 48 h 后的存活率在 96.4% 以上; 该细胞在 P3 降解 49 d 后产物的 pH = 5.0 缓冲溶液中, 同样培养条件下的存活率在 101.2% 以上, 说明 P3 及其降解产物没有细胞毒性, 而且 P3 在 pH = 5.0 缓冲溶液中降解 49 d 后的产物在浓度为 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时仍具有一定的促进细胞增殖作用(细胞存活率为 168.5%). 图 5(B) 表明, pH = 5.0 的醋酸/醋酸钠缓冲溶液 (0.1 mol/L) 用生理盐水稀释 10 倍后, 对 HEPG2 细胞有一定的抑制作用(细胞存活率为 57.52%), 但再稀释 50 倍后则无细胞毒性, 说明此缓冲溶液在一定浓度范围内对细胞增殖有抑制作用, 在进行降解产物的体外细胞毒性试验时, 应以相应浓度的缓冲溶液为阴性对照.

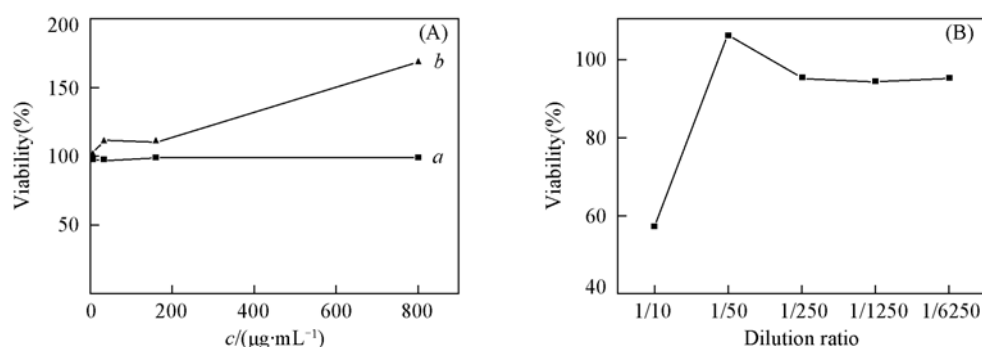


Fig. 5 Cell viability as a function of polymer(a), hydrolysis(b) products(A) or acetate buffer of pH = 5 (B) concentration

## 3 结 论

在  $\text{AlCl}_3$  催化下, 由六氯三聚膦腈的热开环聚合反应, 得到聚二氯膦腈 (PDCP). 通过 PDCP 的亲核取代反应, 合成了不同侧基取代的新高分子聚[(甲氧基乙氧基乙氧基)<sub>1.0</sub>(乙氧基吡咯烷酮)<sub>1.0</sub>]膦腈, 改进了合成聚[二(乙氧基吡咯烷酮)]膦腈的方法, 用  $^{31}\text{P}$  NMR,  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR 和 IR 对 2 个聚合物的结构进行了确证. 体外降解实验和对降解产物的分析结果表明, 2 个聚合物均表现出强烈的 pH 响应性降解行为, 降解速率在 pH = 5.0 最快, 降解后侧链和主链均断裂; 而在 pH = 7.4 和 8.0 较慢, 降解仅为侧链的断裂. 体外细胞毒性试验结果表明, 在浓度范围为 1.3 ~ 800 mg/L 范围内, 新高分子及其在 pH = 5.0 的缓冲溶液中降解 49 d 后的产物没有细胞毒性, 而且降解产物在浓度为 800 mg/L 时, 还有促进细胞增殖作用. 新高分子在基因传递和抗癌药物的靶向释放方面具有潜在的应用价值.

## 参 考 文 献

- [1] D'Souza A. J. M., Schowen R. L., Topp E. M. J. Control. Rel. [J], 2004, **94**(1): 91—100
- [2] JIAO Yan-Peng(焦延鹏), HUANG Jing-Wen(黄静雯), LI Li-Hua(李立华), *et al.*. Chinese J. Mat. Res. (材料研究学报) [J], 2004, **18**(5): 511—516
- [3] WANG Hong-Xia(王洪霞), GAO Chang-You(高长有). Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报) [J], 2007, **28**(10): 1984—1989
- [4] Andrianov A. K., Marin A., Peterson P. Macromolecules [J], 2005, **38**(19): 7972—7976
- [5] HUANG Shi-Wen(黄世文), ZHUO Ren-Xi(卓仁禧). Chinese Sci. Bull. (科学通报) [J], 2003, **48**(5): 405—409
- [6] Lutin L., van Steenis J. H., van Someren R., *et al.*. J. Control. Rel. [J], 2003, **89**(3): 483—497
- [7] Allcock H. R., Gebura M., Kwon S., *et al.*. Biomaterials [J], 1988, **19**(6): 500—506
- [8] Sohn Y. S., Cho Y. H., Baek H., *et al.*. Macromolecules [J], 1995, **28**(22): 7566—7568
- [9] Eugen V. H. Process for the Purification of 2-Hydroxyethylpyrrolidone, US 3875184 [P], 1975-04-01

- [10] Eugen V. H. . Process for the Production of 2-Hydroxyethylpyrrolidone, US 3875185[P], 1975-04-01
- [11] Qian Z. H. , Li S. , He Y. , *et al.* . Polym. Degrad. Stabil. [J], 2004, **83**(1): 93—100
- [12] Vihola H. , Laukkanen A. , Valtola L. , *et al.* . Biomaterials[J], 2005, **26**(16): 3055—3064
- [13] Allcock H. R. , Kugel R. L. . J. Am. Chem. Soc. [J], 1965, **87**(18): 4216—4217
- [14] Allcock H. R. , Pucher S. R. , Turner M. L. , *et al.* . Macromolecules[J], 1992, **25**(21): 5573—5577
- [15] Allcock H. R. , Dudley G. K. . Macromolecules[J], 1996, **29**(4): 1313—1319
- [16] Stewart F. F. , Harrup M. K. , Lash R. P. , *et al.* . Polym. Int. [J], 2000, **49**(1): 57—62
- [17] CHEN Jian-Hai(陈建海). Polymeric Materials and Modern Pharmaceutics in Drug Delivery Systems(药用高分子材料与现代药剂)[M], Beijing: Science Press, 2003: 103—116
- [18] ZHU Cheng-Shen(朱诚身). Structural Analysis of Polymer(聚合物结构分析)[M], Beijing: Science Press, 2004: 182—183

## Synthesis, Characterization, *in Vitro* Degradation and Cytotoxicity of Poly { [ 2-(2-oxy-1-pyrrolidiny) ethoxy ]<sub>1.0</sub> ( methoxyethoxyethoxy )<sub>1.0</sub> } phosphazene }

YIN Yue-Fan<sup>1,2</sup>, LI Yan-Mei<sup>1</sup>, ZI Yan-Nan<sup>1</sup>, Zhou Yi-Ping<sup>3</sup>, BI Yun-Mei<sup>1\*</sup>

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Yunnan Normal University, Kunming 650092, China;

2. Yunnan Pharmacological Laboratories of Natural Products, Kunming Medical College, Kunming 650031, China)

**Abstract** Polydichlorophosphazene(PDCP) was prepared by the ring-opening polymerization of hexachlorocyclotriphosphazene in the presence of 2%AlCl<sub>3</sub>. A new mixed substituent poly(organophosphazene) bearing 2-(2-oxy-1-pyrrolidiny) ethoxy and methoxyethoxyethoxy side groups was synthesized *via* the macromolecular substitution reactions of poly(dichlorophosphazene) with the sodium salt of 1-(2-hydroxyethyl)-2-pyrrolidone and sodium methoxyethoxyethoxide. Its structure was verified by <sup>31</sup>P NMR, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, IR and DSC. Its molecular weight was determined by vapor pressure osmometry(VPO). 18-Crown-6 was used in the synthesis of poly[ di(2-oxy-1-pyrrolidiny) ethoxyphosphazene ] (PYRP) as phase transfer catalysis in order to improve its synthetic method. The new polymer and PYRP were water-soluble and their *in vitro* degradation behavior was studied at varied pH conditions. The results indicate that the degradation of poly(organophosphazenes) with (2-oxy-1-pyrrolidiny)ethoxy side groups is dependent on pH of the buffer solution. The rate of hydrolysis was more rapid at pH = 5.0 than at pH = 7.4 and pH = 8.0. It was shown that addition of methoxyethoxyethoxy side group to PYRP structure resulted in a decrease in the rate of hydrolysis. The hydrolysis products of the poly(organophosphazenes) were analyzed by <sup>31</sup>P NMR, thin layer chromatography(TLC) and titration methods. A hydrolysis pathway of the new polymer in buffer solutions with pH = 5.0, 7.4 and 8.0 was proposed. The degradation of the polymers at pH = 5.0 involved a hydrolytic cleavage of (2-oxy-1-pyrrolidiny)ethoxy from the chain followed by the degradation of the phosphorus-nitrogen backbone to form phosphate and ammonium. However, the degradation of the polymers at pH = 7.4 and pH = 8.0 was only cleavage of the side group. The MTT test for the new polymer and its hydrolysis products at pH = 5.0 in HepG2 cell revealed that an increase in polymer concentration from 1.3 to 800 μg/mL was not harmful for the cell survival. The hydrolysis products of the new polymer at 800 μg/mL were able to promote cell proliferation.

**Keywords** Polyphosphazene; 2-(2-Oxy-1-pyrrolidiny)ethoxy; Methoxyethoxyethoxy; pH-sensitive hydrolytic degradation property; Hydrolysis pathway; *In vitro* cytotoxicity

(Ed. : D, Z)