

## Синтез и охарактеризиране на линеен амфифилен (BAB) триблоков макроинициатор поли(D,L-лактид)-блок-ПЕГ-блок-поли(D,L-лактид), за получаване на звездовидни (AB)<sub>2</sub>C блокови съполимери

Емилия Иванова, Ивайло Димитров, Севдалина Турманова

**Synthesis and characterization of linear amphiphilic (BAB) triblock macroinitiator poly(D,L-lactide)-block-PEG-block-poly(D,L-lactide) for preparation of star-shaped (AB)<sub>2</sub>C block copolymers:** The paper describes a method for the preparation of functional macroinitiator for controlled polymerization of ZL-lysine NCA. Initially, a trifunctional PEG-macroinitiator containing terminal hydroxyl groups and a tertiary amine group located in the middle of the polyether chain was synthesized. In the next step it was used as a precursor for the synthesis of an amphiphilic triblock copolymer via controlled, metal-free ring-opening polymerization of D,L-lactide initiated by the terminal hydroxyl groups. Finally, the amphiphilic triblock copolymer was transformed into a macroinitiator through a chemical modification of its tertiary group.

**Key words:** Macroinitiator, Synthesis, Properties, Poly(D,L-lactide)-block-PEG-block-poly(D,L-lactide).

### ВЪВЕДЕНИЕ

В последните години дизайнът на блокови съполимери с нелинейна архитектура привлича вниманието на различни изследователски колективи с възможностите за придаване на уникални свойства и функции на новите полимерни материали. Установено е например, че активни субстанции – лекарствени вещества или ензими са по-добре защитени и запазват функциите си, ако са свързани в средата на ПЕГ-верига, като образуват разклонена структура, в сравнение със съответните им линейни аналози [1]. Комбинирането на ПЕГ и полилактидни вериги, при което се получават амфифилни блокови съполимери, отдавна привлича вниманието на изследователите с цел потенциални биомедицински приложения поради биосъвместимостта и биоразградимостта на полиестерната верига [2,3].

В настоящата работа е представено синтезирането на нови макроинициатори за полимеризация на N-карбоксианхидрид (NCA) на ZL-лизин (ZLLys), съдържащи биосъвместими и биоразградими блокове, които да бъдат използвани за получаване на предварително проектирани хибридни съполимери с нелинейна архитектура. Предложеният от авторите оригинален синтетичен подход включва последователни контролирани полимеризации с отваряне на пръстена на циклични мономери, последвани от химична модификация. Полимеризационната схема включва следните етапи:

- получаване на трифункционален ПЕГ-макроинициатор, съдържащ третична аминогрупа в средата на веригата и крайни хидроксилни групи;
- свободна от метали полимеризацията на D,L-лактид, иницирана от крайните хидроксилни групи на ПЕГ-макроинициатора;
- функционализиране на амфифилния триблоков съполимер със странична амониева група в средата на полиестерната верига.

### ЕКСПЕРИМЕНТ

#### Използвани материали и реактиви

Диетиловият (Fluka, Switzerland) етер е сушен с натриев сулфат. N,N-Диметилформамидът (ДМФ, 99.8%, Sigma- Aldrich, USA) е сушен с двуфосфорен пентаоксид и отдестилиран под вакуум. Тетрахидрофуранът (ТХФ, Sigma-Aldrich, USA) е двукратно отдестилиран – първо с натриева основа и впоследствие след сушене с калиево-натриева сплав. Метанолът (Sigma – Aldrich, USA), ацетонът (Prolabo) и изопропанолът (Sigma-Aldrich, USA) са използвани без допълнителна обработка. N-Метилдиетаноламинът (Sigma-Aldrich, USA) е дестилиран при понижено налягане. Етиленовият оксид (оксиран) – (ЕО, “Неохим” Димитровград) е

отдестилиран при понижена температура преди употреба. D,L-3,6-Диметил-1,4-диоксан-2,5-дионът (D,L-лактид) – (LA, Sigma – Aldrich, USA) е прекристализиран от толуен. Бромоетиламин хидробромидът (BEA, Sigma–Aldrich, USA) и 4-диметиламинопиридинът (DMAP, Sigma–Aldrich, USA) са използвани без допълнителна обработка.

### **Синтез на макроинициатор за получаване на звездовиден хибриден (AB)<sub>2</sub>C блоков съполимер [поли(D,L-лактид)-блок-ПЕГ]<sub>2</sub>-поли(ZL-лизин) (H)<sub>Y</sub>**

**Получаване на трифункционален полиоксиетиленов макроинициатор, съдържащ третична аминогрупа в средата на полиетерната верига и крайни хидроксилни групи (E<sub>22</sub>NE<sub>22</sub>)**

Макроинициаторът се получава чрез “жива” анионна полимеризация на етиленов оксид следвайки процедурата, описана от Димитров и Берлинова [4]. Накратко, анионната полимеризация на ЕО (1.77 mol, 78 g) се иницира от калиев диалкохолат на N-метилдиетаноламина (0.039 mol, 4.67 g) и протича в ТХФ (550 ml) при 40°C за 60 h в инертна среда под налягане от 1 atm. “Живите” краищата на полимерната верига се “убиват” чрез добавяне на метанол, при което се формират двете крайни хидроксилни групи. Полимерът се утаява в диетилов етер и се пречиства чрез няколкократно преутаяване от дихлорметан/диетилов етер. Добив: 71 g (91%). <sup>1</sup>H ЯМР (CDCl<sub>3</sub>, δ, ppm): δ 3.63 (O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O + CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); δ 2.62 (CH<sub>2</sub>-N-CH<sub>2</sub>); δ 2.29 (CH<sub>3</sub>-N). ГПХ във вода (спрямо ПЕГ стандарти): M<sub>n</sub> = 2 000 g/mol, M<sub>w</sub>/M<sub>n</sub> = 1.13. M<sub>n</sub> (ЯМР) = 2 020 g/mol.

**Провеждане на свободна от метали полимеризация с отваряне на пръстена на (D,L-лактид) за получаване на линеен триблоков съполимер (PLA–E<sub>22</sub>NE<sub>22</sub>–PLA)**

Към 1.0 g (0.495 mmol) от предварително изсушен чрез лиофилизация от бензен макроинициатор E<sub>22</sub>NE<sub>22</sub> се прибавят 1.43 g (9.9 mmol) (D,L-лактид) и 0.3 g (1.98 mmol) DMAP. Реагентите се вакуумират в продължение на 90 min, след което се създава инертна среда чрез пропускане на Ar през реакционната колба. Реакцията протича при 125°C в продължение на 2 h при постоянно разбъркване в инертна среда. Продуктът се екстрахира при стайна температура с изопропанол в продължение на 48 h. Разтворимата фракция се отдекантира и полимерът се суши последователно на водна и маслена помпа при 60°C. Добив: 1.77 g (73%). <sup>1</sup>H ЯМР (CDCl<sub>3</sub>, δ, ppm.): 5.14 (CH-(CH<sub>3</sub>)-O), 4.33 (O=C-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O + CH-(CH<sub>3</sub>)-OH), 3.63 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O + CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.78 (CH<sub>2</sub>-N-CH<sub>2</sub>), 2.42 (CH<sub>3</sub>-N), 1.57 (CH-(CH<sub>3</sub>)-O). ГПХ в ДМФ (спрямо PMMA стандарти): M<sub>w</sub>/M<sub>n</sub> = 1.21.

**Кватернизирание на PLA–E<sub>22</sub>NE<sub>22</sub>–PLA и превръщането му в макроинициатор за полимеризация на ZLLys–NCA**

Приготвя се разтвор на 1.25 g (0.23 mmol) от PLA–E<sub>22</sub>NE<sub>22</sub>–PLA и 0.12 g (0.57 mmol) BEA в 1.0 mL ДМФ. Реакцията на кватернизирание протича при 60°C в инертна среда и постоянно разбъркване в продължение на 72 h. Разтворът се разрежда с вода и се диализира през мембрана (M<sub>w</sub> cut-off 1 000 Da) в дестилирана вода. Продуктът се изолира след лиофилизация. Добив: 1.1 g (80.3%). <sup>1</sup>H ЯМР (CDCl<sub>3</sub>, δ, ppm.): 5.16 (CH-(CH<sub>3</sub>)-O), 4.34 (O=C-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O + CH-(CH<sub>3</sub>)-OH), 3.80 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 3.65-3.40 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O + N<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>3</sub><sup>+</sup> + CH<sub>2</sub>-N<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>), 3.12 (CH<sub>3</sub>-N<sup>+</sup>), 1.56 (CH-(CH<sub>3</sub>)-O). ГПХ в ДМФ (спрямо PMMA стандарти): M<sub>w</sub>/M<sub>n</sub> = 1.22.

### **Методи за анализ**

#### **Ядрено магнитен резонанс (ЯМР)**

ЯМР-спектрите на анализираниите образци са регистрирани на апарат Bruker (Germany), Avance II, 600 MHz чрез разтваряне в съответен деутериран разтворител. Като вътрешен стандарт е използван остатъчният сигнал на разтворителя.

#### Геловопроникваща хроматография

Молекулномасовото разпределение на синтезираните макроинициатори и на блоковете съполимери е определено в ДМФ на система, свързана с рефрактометричен и УВ детектори:

HLC-8320GPC от Tosoh Corporation Bioscience Division, състояща се от три PFG-микроколони (100 Å, 1000 Å и 4000 Å) от Polymer Standards Service (PSS), калибрирана с полиметилметакрилатни стандарти. Системата работи в ДМФ (+ 5 mM LiCl) при 50°C и скорост 0.3 mL min<sup>-1</sup>.

Молекулната маса и молекулномасовото разпределение на функционалния ПЕГ се определя на водна система, състояща се от of CATSEC (Eprogen Inc., USA, and Eichrom Techn. Inc., USA) колони 100, 300, 1 000, and 4 000 Å, калибрирана с ПЕГ-стандарти. Подвижната фаза е 0.2 M CH<sub>3</sub>COOLi, 0.2 M CH<sub>3</sub>COOH с pH~4.6, скорост 0.25 mL min<sup>-1</sup> и температура 40°C на колоните и на рефрактометричния детектор.

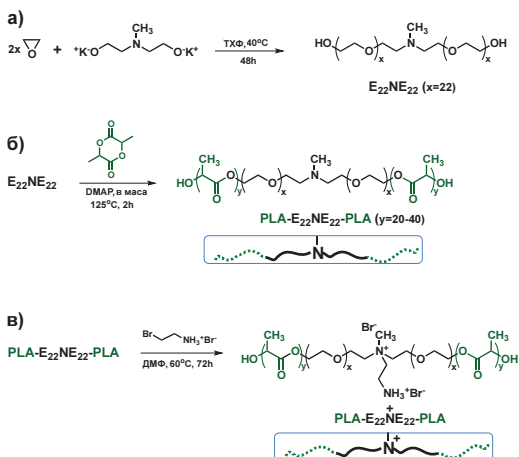
#### РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

На първия етап е проведена „жива“ анионна полимеризация с отваряне на пръстена на оксиран, иницирана от дикалиев алкохолат на N-метилдиетаноламина. По този начин е получен трифункционален макроинициатор – полиоксиетилен с крайни хидроксилни групи и третична аминогрупа, разположена по средата на полиетерната верига (E<sub>22</sub>NE<sub>22</sub>) (Фиг. 1а). Прилагането на метода на „живата“ анионна полимеризация позволява пълен контрол върху молекулномасовите характеристики и функционалността на получените полимер. Средната степен на полимеризация на EO (DP<sub>x</sub> = 2 x 22) е определена с <sup>1</sup>H ЯМР спектроскопия (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz) от отношението на интензитетите на сигналите за протоните от повтарящите се оксиетиленови мономерни звена при 3.63 ppm към тези при 2.29 ppm от метиловата група, разположена в средата на полиетерната верига (Фиг 2а).

Молекулномасовото разпределение на полимера е определено с геловопроникваща хроматография във водна среда и в ДМФ – и двете системи показват степен на полидисперсност M<sub>w</sub>/M<sub>n</sub> ~ 1.1. Водната система за ГПХ е калибрирана с ПЕГ-стандарти, което позволява определянето и на средната бройна молекулна маса на функционалния ПЕГ-макроинициатор - M<sub>n</sub> = 2 000 g/mol. Полученият резултат е в пълно съответствие с изчислената молекулна маса на E<sub>22</sub>NE<sub>22</sub> от ЯМР-спектъра на продукта (M<sub>n</sub> ~ 2 000 g/mol).

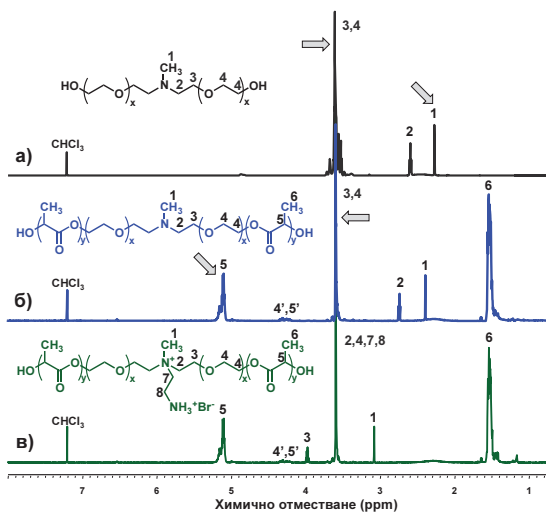
Следващият етап включва използването на крайните хидроксилни групи на E<sub>22</sub>NE<sub>22</sub> за инициране на контролирана полимеризация с отваряне на пръстена на D,L-лактид. Повечето от най-широко използваните инициаторно-каталитични системи за полимеризация на LA съдържат метали [5]. Присъствието на метални нечистотвания в полимерните продукти обаче е силно нежелано при потенциалните им биомедицински приложения. През 2001 г. Недерберг и сътр. представят първата, катализирана от органични съединения полимеризация с отваряне на пръстена на LA, при която се получават несъдържащи метални нечистотвания полимери [6]. Те използват амини – Люисови бази като 4-(1-пиролдинил)пиридин и 4-диметиламинопиридин (DMAP). По-късно е показано, че DMAP ефективно катализира полимеризация на LA, иницирана от макроинициатори с разнообразна архитектура [7,8].

В нашия случай амфибилни триблокови съполимери със среден ПЕГ-блок и крайни полилактидни блокове са получени чрез свободна от метали полимеризация на LA, иницирана от синтезираният трифункционален E<sub>22</sub>NE<sub>22</sub> в присъствието на DMAP (Фиг. 1б). Полимеризацията се извършва без разтворител (в маса) при висока температура (125°C) за 2 часа. Варирайки отношението [мономер]/[макроинициатор] са получени блокови съполимери с различна дължина на полиестерните блокове.



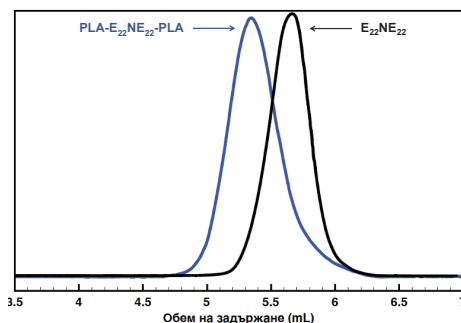
Фиг.1 Синтетичен подход за получаване на: а) трифункционален ПЕГ-макроинициатор,  $\text{E}_{22}\text{NE}_{22}$ ; б) амфифилен триблоков съполимер  $\text{PLA-E}_{22}\text{NE}_{22}\text{-PLA}$ ; в) макроинициатор за полимеризация на  $\text{ZLLys-NCA}$  ( $\text{PLA-E}_{22}\text{N}^+\text{E}_{22}\text{-PLA}$ ).

След приключване на полимеризацията продуктите се екстрахират при стайна температура с изопропанол с цел отстраняване на евентуални примеси от нереагирал макроинициатор и/или сублимиран и нереагирал мономер. Съставът на пречистените триблокови съполимери  $\text{PLA-E}_{22}\text{NE}_{22}\text{-PLA}$  е определен чрез  $^1\text{H}$  ЯМР спектроскопия в  $\text{CDCl}_3$  (Фигура 2б).



Фиг.2  $^1\text{H}$  ЯМР спектри в  $\text{CDCl}_3$  (600 MHz) на: а) трифункционален ПЕГ-макроинициатор  $\text{E}_{22}\text{NE}_{22}$ ; б) амфифилен триблоков съполимер  $\text{PLA-E}_{22}\text{NE}_{22}\text{-PLA}$  ( $\text{DP}_y = 21$ ); в) макроинициатор за полимеризация на  $\text{ZLLys-NCA}$  ( $\text{PLA-E}_{22}\text{N}^+\text{E}_{22}\text{-PLA}$ ).

Степента на полимеризация на полилактидните блокове е определена от съотношението на сигнала за протоните от метиновите групи на повтарящите се лактидни звена при 5.14 ppm и този на оксиетиленовите протони при 3.63 ppm. Така са изчислени стойностите за степента на полимеризация на крайните полиестерни блокове  $DP_y = 20-40$ , които са много близки до теоретично зададените (Таблица 1). Формирането на блокова архитектура е доказано с ГПХ в ДМФ (Фигура 3). Хроматограмите показват, че блоковите съполимери са мономодални ( $M_w/M_n = 1.2-1.3$ ) с ясно отместване към по-малки обеми на задържане, в сравнение с макроинициатора. Освен това не се наблюдават примеси от нереагирал макроинициатор в пречистените съполимери.



Фиг. 3 Геловопроникваща хроматогра-фия в *N,N*-диметилформаид на ПЕГ-макроинициатора ( $E_{22}NE_{22}$ ,  $M_w/M_n = 1.14$ ) и на триблоков съполимер  $PLA-E_{22}NE_{22}-PLA$  ( $DP_y = 21$ ,  $M_w/M_n = 1.21$ ).

Табл.1 Характеристики на синтезираните макроинициатори

Макроинициатор ( $PLA-E_{22}N^+E_{22}-PLA$ )			
проба	$DP_y^{теор}$	$DP_y^{ЯМР}$	$M_w/M_n^{ГПХ}$
1	20	21	1.21
2	30	32	1.29
3	40	40	1.25

В Таблица 1 са представени молекулномасовите характеристики на синтезираните макроинициатори

Последният етап при получаването на макроинициатор за полимеризация на  $ZLLys-NCA$  е модификация на триблоковия съполимер  $PLA-E_{22}NE_{22}-PLA$ . Това става чрез кватернизирание на третичната аминогрупа, разположена в средата на триблоковата архитектура с 2-бромоетиламониев бромид. Реакцията протича в ДМФ при 70°C (Фиг. 1в). Продуктът се пречиства старателно от излишъка на кватернизирания реагент чрез диализа във вода. Количественото кватернизирание на аминогрупите в полимера е доказано с  $^1H$  ЯМР спектроскопия (Фигура 2б и в). Сигналят при 2.4 ppm, характерен за  $CH_3-N$  протоните в триблоковия  $PLA-E_{22}NE_{22}-PLA$  съполимер (Фиг. 2б) напълно изчезва в спектъра на кватернизирания продукт ( $PLA-E_{22}N^+E_{22}-PLA$ ), където се появява нов сигнал при 3.12 ppm за кватернизирани  $CH_3-N^+$  протони (Фиг. 2в).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получен е линеен хибриден (ВАВ) триблоков макроинициатор поли(D,L-лактид)-блок-ПЕГ-блок-поли(D,L-лактид) чрез оригинална синтетична процедура. Функционалният макроинициатор ще бъде използван за образуване на С-блока на  $(AB)_2C$  блокови съполимери, с потенциална приложимост в наномедицината.

### ЛИТЕРАТУРА

- [1] Pasut, G., F.Veronese. Polymer-drug conjugation, recent achievements and general strategies. Prog. Polym. Sci., 2007, 32, 933–961.
- [2] Rashkov, I., N. Manolova, S. Li, J. Espartero, M.Vert. Synthesis, Characterization, and Hydrolytic Degradation of PLA/PEO/PLA Triblock Copolymers with Short Poly(l-lactic acid) Chains. Macromolecules, 1996, 29, 50–56.

[3] Li, S., I. Rashkov, J. Espartero, N. Manolova, M. Vert. Synthesis, Characterization, and Hydrolytic Degradation of PLA/PEO/PLA Triblock Copolymers with Long Poly(L-lactic acid) Blocks. *Macromolecules*, 1996, 29, 57–62.

[4] Dimitrov, I., I. Berlinova. Synthesis of Poly(ethylene oxide)s Bearing Functional Groups along the Chain. *Macromol. Rapid Commun.*, 2003, 24, 551–555.

[5] Dijkstra, P., H. Du, J. Feijen. Single site catalysts for stereoselective ring-opening polymerization of lactides. *Polym. Chem.*, 2011, 2, 520–527.

[6] Nederberg, F., Connor E, Möller M, Glauser T, Hedrick J. New Paradigms for Organic Catalysts: The First Organocatalytic Living Polymerization. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2001, 40, 2712–2715.

[7] Li, Y., Q. Li, F. Li, H. Zhang, L. Jia, J. Yu, Q. Fang, A. Cao. Amphiphilic Poly(l-lactide)-b-dendritic Poly(l-lysine)s Synthesized with A Metal-Free Catalyst and New Dendron Initiators: Chemical Preparation and Characterization. *Biomacromolecules*, 2006, 7, 224–231.

[8] Dimitrov, I., I. Berlinova, V. Michailova. Synthesis of multifunctional poly(D,L-lactide)-poly(oxyethylene)-poly(D,L-lactide) triblock copolymers. *Polym. J.* 2013, 45, 457–461.

**За контакти:**

Доц. д-р Севдалина Турманова, Катедра “Технология на материалите и материалознание”, Университет „Проф. д-р Асен Златаров” – гр. Бургас, e-mail: [sturmanova@btu.bg](mailto:sturmanova@btu.bg)

Доц. д-р Ивайло Димитров, Институт по Полимери, Българска академия на науките “Технология на материалите и материалознание”, Университет „Проф. д-р Асен Златаров” – гр. Бургас, e-mail: [dimitrov@polymer.bas.bg](mailto:dimitrov@polymer.bas.bg)

Докторант инж. Емилия Иванова, Катедра “Технология на материалите и материалознание”, Университет „Проф. д-р Асен Златаров” – гр. Бургас, e-mail: [e.d.ivanova@abv.bg](mailto:e.d.ivanova@abv.bg)

**Докладът е рецензиран**