

生物高分子聚苹果酸及其衍生物的合成与应用前景

丁锐, 李光吉*

(华南理工大学高分子材料科学与工程系, 广州 510640)

摘要: 生物高分子对生命过程十分重要, 它们表现出了卓越的特性和潜在的应用前景, 因而一直是国内外学者的一个新的研究热点。聚苹果酸及其衍生物作为一类新型的生物高分子同样具有一些独特的性质。本文介绍了聚苹果酸及其衍生物的结构和性能特点, 全面综述了它们的合成与制备方法研究的进展, 展示了它们作为生物医用材料在药物释放体系、组织工程等领域中的应用前景。

关键词: 生物高分子; 聚苹果酸; 衍生物; 药物载体

前言

可生物降解聚酯的合成研究始于上世纪 60 年代。那时, 人们认识到由乙交酯和丙交酯制备的对水敏感的脂肪族聚酯可能在一些治疗过程中非常有用, 因为这些材料的降解速度与生物体内受伤的软、硬组织的生长速度同步。最早商品化的可生物降解聚酯是用作手术缝合线的聚乙交酯和乙交酯/丙交酯共聚物。随后的几十年中, 各国学者相继报道了多种可生物降解的聚酯如聚羟基烷酸酯、聚酸酐、聚原酸酯等的合成、结构表征、性能和应用方面的研究结果。1979 年, Vert 等^[1]首次合成了一种水溶性脂肪族聚酯——聚苹果酸, 其重复结构单元是苹果酸。苹果酸及聚苹果酸的结构如图 1 所示^[1~3]。

显然, α -聚苹果酸是由苹果酸分子的非对称碳原子上的羧基和另一分子的非对称碳原子上的羟基缩合而成; β -聚苹果酸则由苹果酸分子的非对称碳原子上的羟基和另一分子的位于不同碳原子上的羧基缩合而成; γ -聚苹果酸则是混合型结构的聚苹果酸, 含有 α -聚苹果酸和 β -聚苹果酸的结构单元。在 α 、 β 、 γ 三种聚苹果酸中, 以 β -聚苹果酸最常见, 也研究得相对较多。

作为聚苹果酸单体的苹果酸广泛存在于各种生物体中, 目前可通过化学法或生物法制备。苹果酸含有一个非对称碳原子, 因而具有左旋(L)、右旋(D)和内消旋(DL)三种构型。与之相对应地, 聚苹果酸因其结构中的非对称碳原子, 也可具有不同的构型。

通常, β -聚苹果酸及其衍生物用通式 $\text{PMLA}^x\text{H}_y\text{R}_{(100-y)}$ 表示^[4], 其中 x 表示左旋苹果酸酯单元的百分比 ($0 \leq x \leq 100$); y 表示悬挂羧基的百分比 ($0 \leq y \leq 100$); R 表示悬挂羧基上氢的取代基; $(100-y)$ 则表示这一取代基的百分比。按照这一通式, 外消旋 β -聚苹果酸可表示为 $\text{PMLA}^{50}\text{H}_{100}$, 一般简称为 PMLA。

聚苹果酸是一种特殊的脂肪族聚酯, 它除了具有良好的水溶性、可生物降解性、生物相容性和生物可吸收性之外, 还具有两个显著的优点: (1) 易代谢性。由于 L -苹果酸是生物体内克雷伯氏三羧酸循环 (Krebs TCA) 的中间体, β -聚苹果酸容易在生物体内通过正常的三羧酸循环代谢途径除去^[1,6]; (2) 易修饰性。聚苹果酸具有悬挂羧基, 容易与其它官能团反应而制得聚苹果酸衍生物, 或引入功能基团或小分子

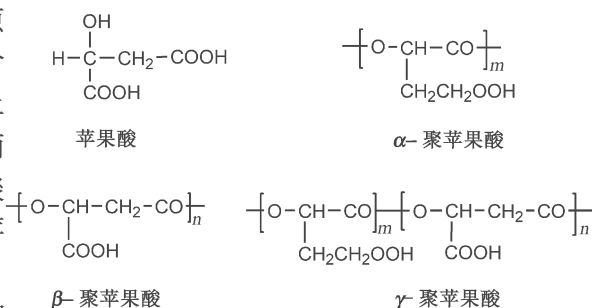


图 1 苹果酸及聚苹果酸的结构

Figure 1 The structure of malic acid and poly(malic acid)

作者简介: 丁锐(1979-), 男, 材料学硕士研究生, 从事生物技术在高分子合成与改性中的应用的研究。

* 通讯联系人. E-mail: guangjili@hotmail.com

药物,从而制得许多具有特殊功能的产物^[4,7-9]。因此,聚苹果酸及其衍生物可望作为手术缝合线、组织工程支架材料、药物控制释放体系等在生物医药领域获得重要的应用。此外,聚苹果酸及其衍生物的重叠结构单元上非对称碳原子的存在,提供了研究手性对它们生物活性的影响的机会。迄今为止,以 Vert、Cammis 和 Kajiyama 等为代表的国外学者已对聚苹果酸的合成、性能和应用做了较深入的研究;国内直到近年来才有几位学者对聚苹果酸以及苹果酸/乳酸共聚物的合成与性能做了一些基础研究。尽管目前聚苹果酸及其衍生物的研究远不如对其它羟基羧酸酯的研究那样深入,研究结果仍充分展示了这种新型的功能性脂肪族聚酯在生物医药、生物材料等领域的巨大应用前景。

本文将介绍新型功能聚酯聚苹果酸及其衍生物的结构与性能特点,全面综述它们的合成、制备方法及其最新研究进展,并展示它们作为生物医用材料在药物释放体系、组织工程等领域中的广阔的应用前景。

1 聚苹果酸的合成

1969 年,研究圆弧青霉菌(*Penicillium cyclopium*)的微生物学家 Shimada 和 Matsushima 等^[11~14]就推测其中可能存在含苹果酸结构单元的聚合物。随后,化学家尝试通过化学途径合成聚苹果酸。近几年来,生物学家用生物发酵法也制得了聚苹果酸。然而,化学合成方法仍然是目前合成聚苹果酸的主要途径。

1.1 化学合成途径

1.1.1 直接缩聚法 苹果酸是羟基丁二酸,理论上可通过直接缩聚制备聚苹果酸。Fujino 等^[5]曾对此进行了尝试。然而,在没有保护两个羧基中的一个的情况下,这种有三个官能团的羟基二元酸容易发生分子内脱水等副反应,只能制得低聚物。Nakashima^[19]尝试了苹果酸苄基酯的缩聚反应,但同样只能制得低聚物。在此后相当长的时间内,直接缩聚制备聚苹果酸的研究停滞不前,直到近期才取得了一些进展。

Kaliyama 等^[6,17~19]以 *L*-苹果酸为单体,系统地探讨了反应温度和催化剂对它在无溶剂体系和有机溶剂体系中的直接缩聚反应及其产物的影响。研究表明,在 110~140℃之间,以 Sn 为催化剂时,无论溶剂存在与否,反应产率均随反应温度升高而下降;在无溶剂体系中,产物的 $M_w = 5,300$, $M_w/M_n = 1.2 \sim 1.9$ 。含 Sn^{2+} 催化剂的存在对反应会产生一定的影响。对反应产物和沉析液所含化合物的 NMR 和 GPC 分析表明产物是无规的 γ -聚苹果酸^[17];反应中存在单体分子内脱水生成富马酸的副反应,也存在发生解聚的可能性。

对苹果酸在无溶剂体系中的直接缩聚反应的进一步研究表明^[18,19]:随着反应的延续,产物的分子量和产率有一个最大值;反应温度越高,这一最大值出现得越早。这证明该反应过程中存在着解聚反应。对缩聚产物 γ -聚苹果酸的端基结构和副反应产物的分析发现,富马酸型烯烃结构产物的比率随着反应温度的提高和反应的进行而增加;而端羟基结构产物的比率变化趋势恰好相反。在 110℃反应时,主要副产物是未反应的 *L*-苹果酸,其比率随着反应的延续而减少;在 130℃反应时,主要副产物则是富马酸,其比率随着反应的延续而增加,同时反应转化率降低。这些研究使人们对直接缩聚反应的影响因素和可能的反应机理有了更深的认识,对于改进直接缩聚法制备高分子量的或具有理想结构的聚苹果酸是非常有意义的。

1.1.2 开环聚合法 1979 年,在 Vert 等^[1]首次通过阴离子开环聚合制备 PMLA 时,是以外消旋的溴代丁二酸为起始物的。如图 2 左边合成途径 1 所示。这一起始物与乙酰氯反应,转化为溴代丁二酸酐,再与苄基醇反应得到两种苄基溴代丁二酸的混合物。其中只有 β -溴代衍生物才能在 Na_2CO_3 存在下环化闭合而得到苹果酸苄基酯(MIABz),其结构上的苄基起保护基团作用。这一新单体在引发剂作用下发生阴离子开环聚合而得到聚苹果酸苄基酯(PMLABz),再通过催化氢解脱除苄基得到 PMLA。这一方法制得的 PMLA 分子量较低。

在以 *L*-天冬氨酸或 *L*-溴代丁二酸为起始物的情况下,如以三乙胺为引发剂,并利用三氟乙酸酐(TFAA)抑制由溴代丁二酸转化为溴代丁二酸酐时的消旋化反应(如图 2 左边途径 2),则改进了这一途径,制得具有光学活性的 PMLA 和 PMLABz^[3,20,21]。进一步的改进是将引发剂三乙胺改为四丁基铵盐。

并重复纯化起始物和 MLABz 中间体^[2], 现在已经合成 $M_w=174,000$ 的 PMLA。

也可以通过其它途径合成 MLABz 单体。Arnold 等^[23] 以苹果酸为起始反应物, 首先采用甲磺酰基 (Ms) 取代羟基上的活泼氢, 通过图 2 右边的途径 A 所示的一系列反应合成了 MLABz。但这一途径太复杂。而后, Cammas 等^[24] 用苹果酸在偶氮二羧酸二异丙酯 (DIAA) 和三苯基膦 (TPP) 作用下在四氢呋喃 (THF) 中合成了 MLABz 单体(图 2 中间的途径 B)。这一方法能使 *L*-(*S*)-苹果酸转化为含 *L*-苹果酸单元的 PMLABz。

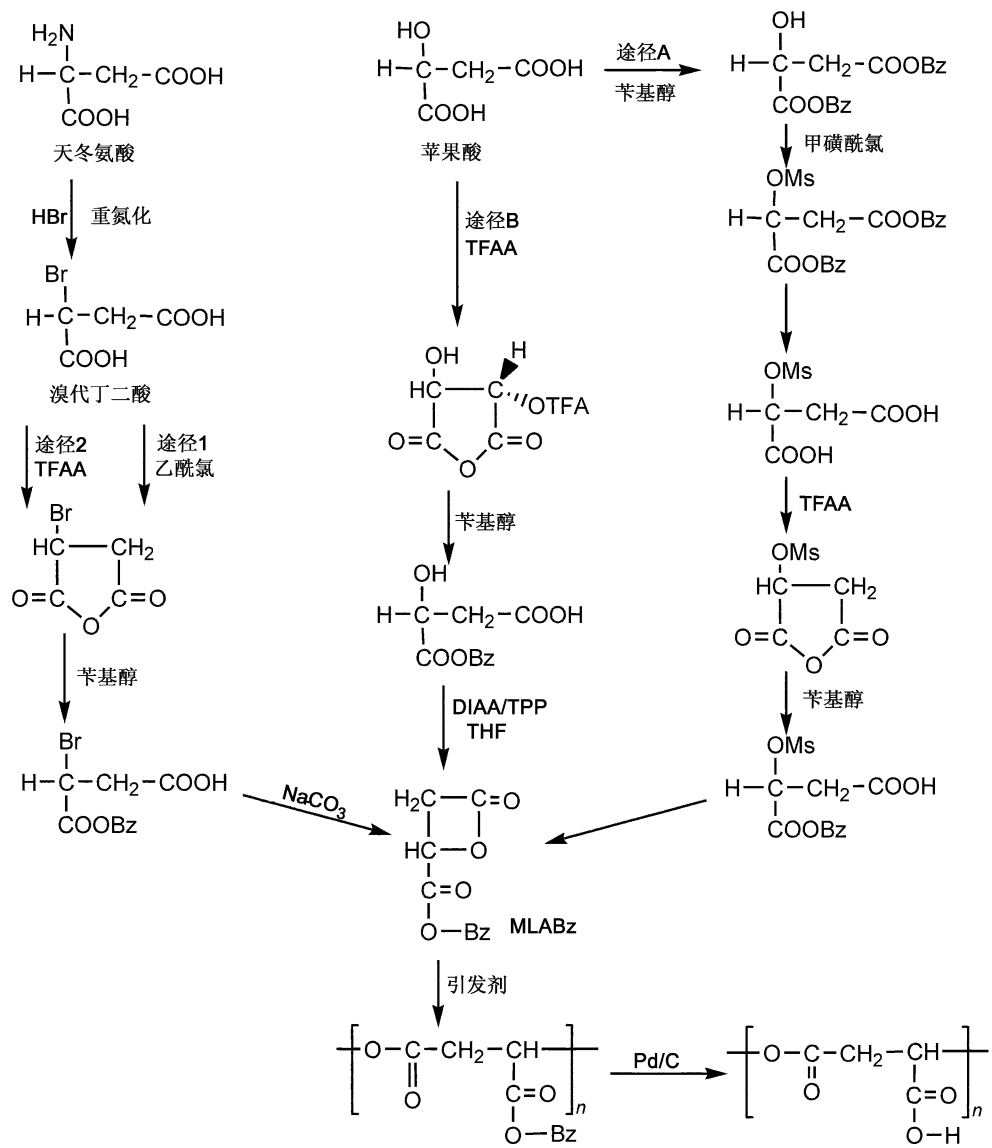


图 2 阴离子开环聚合制备聚苹果酸的途径

Figure 2 Various routes to poly(malic acid) by an anionic ring-opening polymerization

1.2 生物途径制备聚苹果酸

通过生物途径制备聚苹果酸的主要方式是微生物合成。早在 1969 年, Shimada 等^[10~13] 发现一种以苹果酸为结构单元的聚合物能够抑制圆弧青霉菌的酸性蛋白酶活性, 最终证实是 PMLA; 这一发现激励研究者去探索生物合成聚苹果酸的途径以及聚苹果酸的结构与性质。1989 年, Fischer 等^[25] 从黏菌 (Physarum Polycephalum) 细胞中分离出聚苹果酸, 并发现它是 DNA 聚合酶 α 的抑制剂。研究表明, 在黏菌细胞生长的一定阶段才会产生聚苹果酸。利用其它微生物如短梗霉属 (Aurobasidium) 的酵母状细胞^[5, 26~31] 和黏菌变形体^[32] 的细胞也能合成聚苹果酸。这些菌株已被优化培养以提高聚苹果酸的产率。出芽短梗霉属菌株可利用 *D*-葡萄糖、蔗糖、果糖、葡萄糖醇和琥珀酸为碳源^[26, 19], 所合成的聚苹果酸是以聚苹果酸-葡萄糖

糖结合体的形式分泌的。利用聚苹果酸在丙酮中的高溶解性除去连接的葡萄糖,便可得到聚苹果酸。此外,还有一些被培养液中的酶分解为分子量 5,000~11,000 的自由聚苹果酸。黏菌变形体则对营养要求苛刻^[32],只能以 D 葡萄糖为碳源,所合成的产物以纯聚苹果酸的形式分泌出来,分子量为 50,000~300,000。

不同的微生物合成聚苹果酸的产率不同。目前,以出芽短梗霉属菌株合成的聚苹果酸的产率较高。随菌株的不同,产率在 12g/L^[29]~60g/L^[26] 的聚苹果酸钠盐或钙盐的范围内变化。黏菌生产聚苹果酸的产率则只得到 3.3g/L^[32]。为了降低生物量和提高产率,有研究者尝试采用非生长型培养来生产聚苹果酸^[27,33]。

聚苹果酸在出芽短梗霉菌株和黏菌中的合成途径和调节机制已被阐明。出芽短梗霉属菌株中聚苹果酸合成的研究^[29]表明聚苹果酸的生物合成与生物体内柠檬酸的循环有关,且涉及苹果酸合成酶和异柠檬裂合酶的作用;对黏菌中聚苹果酸合成的研究也发现了同样的相关性^[33~35]。与主要作为碳源和能源储存物的聚羟基脂肪酸酯不同,聚苹果酸在巨大多核的黏菌变形体中可能是核蛋白的储存和运输分子^[25,36,37]。对体外生物合成聚苹果酸的尝试还未获成功,因为在细胞裂解的同时,聚苹果酸合酶的活性被破坏了^[38]。

综上所述,可以对聚苹果酸的化学途径和生物合成途径的优缺点进行比较和分析,如表 1 所示。

表 1 聚苹果酸的合成途径的比较

Table 1 Comparison of synthetic routes to poly(malic acid)

	化学途径		生物途径
	直接缩聚法	阴离子开环聚合法	
优点	◆一步反应,直接简单 ◆产物分离提纯容易 ◆产率高	◆分子量高 ◆产物以 β-聚苹果酸为主 ◆反应温度较低	◆分子量高 ◆产物较纯 ◆合成条件温和
缺点	◆分子量低 ◆反应温度高 ◆产物构型混杂,规整性差	◆步骤多,产率低 ◆中间产物分离提纯繁琐	◆产率低 ◆目前只能合成 β-聚苹果酸

2 聚苹果酸衍生物的合成

采用开环聚合的制备聚苹果酸时的中间产物聚苹果酸苄基酯 PMLABz 本身就是一种聚苹果酸的衍生物。因此,这一化学合成聚苹果酸的方法实质上也是一种聚苹果酸衍生物的制备方法。此外,由于聚苹果酸大分子具有较强的反应活性、苹果酸单体具有共聚倾向以及聚合反应单体的也可有多种选择等原因,还存在着若干制备聚苹果酸衍生物的途径,现归纳如下:

2.1 含苹果酸单元的大分子的化学改性

2.1.1 悬挂羧基的反应 利用聚苹果酸分子链上的羧基的化学反应活性,就能够制备具有特定结构的聚苹果酸衍生物。

Vert^[39]曾用 N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)处理 PMLAH₁₀₀,将多羧基酸大分子转化为大多数羧基以酐的形式存在的化合物。这一活化了的 PMLA 与亲核化合物如醇、胺反应,从而得到含不同侧基的聚苹果酸衍生物。反应如图 3 所示。

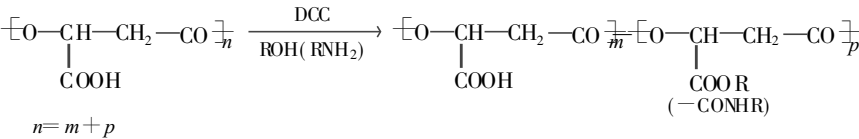


图 3 从 PMLA 通过化学偶联反应合成 PMLA 衍生物

Figure 3 Route to new polymeric derivatives of poly(β-malic acid) by chemical coupling

2.1.2 部分氢解 PMLABz 大分子的部分氢解也可以制备苹果酸和苹果酸-α-苄基酯的共聚物 PMLA[†]H₂R₁₀₀₋₂₀,这也是一类聚苹果酸衍生物。控制氢解的程度可以控制共聚物的组成。研究^[40]发现

在合成 PMLA 过程中的催化氢解程度与反应所用的有机溶剂的性质、催化剂特性和高聚物自身的性质有密切关系。故用钯催化剂脱保护基团时,可以控制保护基团的脱除比率(即 $\text{PMLA}^x\text{H}_y\text{R}_{(100-y)}$ 中的 y 值),从而调节产物中亲水基团和疏水基团的比例,改变其水溶性和降解速度。

2.1.3 聚苹果酸酯的环氧化反应 当聚苹果酸酯大分子链上的酯基具有不饱和双键时,可利用双键的环氧化反应进行改性而得到一种新型的聚苹果酸衍生物^[44]。同理,利用双键的其它反应也可得到不同的聚苹果酸衍生物。

2.2 苹果酸内酯的开环聚合

2.2.1 苹果酸内酯的制备 苹果酸内酯是开环聚合制备聚苹果酸的单体。除了前面所述的制备苹果酸苄基内酯的方法外,研究者还开创了其它制备各种苹果酸内酯的方法。

Ramiandrasoa 等^[42]以三乙胺催化乙烯酮的环加成反应(如图 4 所示),合成内酯苹果酸-β-烷基酯。这一新的途径对于苄基衍生物不适用,但能够合成一些简单的内酯苹果酸烷基酯。利用 ROH 在一定条件下与溴代苹果酸酐的反应也能够得到不饱和的苹果酸内酯^[44]。

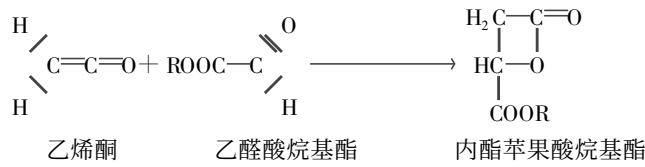


图 4 合成内酯苹果酸烷基酯的乙烯酮途径

Figure 4 The ketene route to alkyl malolactoneates

2.2.2 均聚 显然,若以一种苹果酸内酯为单体开环聚合,便可制得聚苹果酯的均聚物。Barbaud 等^[45]以天冬氨酸和苄氧基丙醇合成的苹果酸内酯为单体进行均聚反应,得到了聚(3-羟丙基-β-苹果酸酯)。这是含有亲水基团(烷羟基)和疏水基团(苄基)的两亲性的聚合物,可以明显改善或调节其水溶性。

2.2.3 共聚 将苹果酸内酯与一种或一种以上的内酯为单体进行开环共聚,就可制得含苹果酸酯结构单元的共聚型聚苹果酸酯衍生物。

Gross 等^[44]用含烷基铝的催化体系催化外消旋的 β-苹果酸苄基内酯与 β-丁基内酯的聚合,得到了含苹果酸苄基酯与羟基丁酸酯单元的共聚物 P(BM-co-HB),这一共聚物很容易通过催化氢解转化为苹果酸与羟基丁酸酯的共聚物 P(MA-co-HB)。通过离子开环聚合使含金刚烷(C₁₀H₁₆)基的苹果酸内酯与 MLABz 发生共聚,再催化氢解,便得到了既含悬挂羧基,又含疏水性侧基金刚烷基的共聚型聚苹果酸衍生物^[45]。这一共聚物是两亲性的,通过调节主链的组成结构,可调节产物的亲水/疏水平衡和降解速率。进一步的研究了这一疏水改性的共聚物在水溶液中与 β-环糊精(β-CD)的缔合作用,证实二者能形成缔合网络结构,并发现其缔合性质受两亲性共聚酯的净电荷控制^[46]。也有研究者以三种苹果酸内酯为单体共聚来制备三元共聚的聚苹果酸酯衍生物,这种三元共聚物可以吸附肝素,使之具有生物活性^[17,47]。

Coulember 等^[48]采用了包含了三个步骤(开环聚合、配位-一插入开环聚合以及选择性脱除苄基保护基团)的合成方法制备出结构清晰的苹果酸与 ε-己内酯的二嵌段共聚物。将 MLABz 与 L-丙交酯共聚和催化氢解得到了乳酸-苹果酸共聚物^[49~51]。通过改变其组成能够调节共聚物的形态、水溶性和热性能。

2.3 化学-酶法合成聚苹果酸衍生物

Bear 等^[52]以具有两个非对称碳中心的甲基天冬氨酸为起始物,利用酶的选择性催化作用将它转化为 3-甲基-苹果酸苄基酯;然后以这一内酯为单体,通过开环聚合和催化脱除苄基保护基团,从而得到了一种新型的具有光学活性的聚甲基苹果酸。这一聚苹果酸衍生物可水解,具有良好的生物相容性。

3 聚苹果酸及其衍生物的结构与性能

3.1 大分子的结构、形态与物理化学性质

对天然聚苹果酸结构的¹H 和¹³C NMR 测定^[53,54]发现天然聚苹果酸是高度规整的聚(β-L-苹果酸),是属于聚(3-羟基酸)型的脂肪族聚酯。从黏菌得到的聚苹果酸及其钠盐是五色玻璃状无定形粉末。高度

纯化的聚苹果酸是不易吸水易碎的晶体类似物, 在 192 °C 时融解, 高于 200 °C 时分解^[30]。而从短梗霉属菌株得到的聚苹果酸带有支链, 在分解温度以下未测得 T_g 和 T_m ^[54]; 它具有吸湿性, 在 95 ~ 100 °C 变软, 在 170 °C 时分解^[26]。天然聚苹果酸无论分子量高低, 它的盐和自由酸形式都是高度水溶性的。黏菌来源的自由聚苹果酸易溶于温热的丙酮、*N*-甲基吡喃酮、四氢呋喃和吡啶; 而短梗霉属来源的低分子量聚苹果酸在丙酮中不溶, 而溶于二甲基亚砷^[29]。对聚苹果酸溶液的研究发现其粘度随溶液浓度的减少不成线性关系, 而具有聚电解质的特性^[5]。

Fujishige^[59] 将 DSC 与 FTIR 联用, 分析了分子量约为 10, 000 的部分结晶固态聚(β -*L* 苹果酸) 的热分解过程。测试表明: 这一聚苹果酸在 46 ~ 60 °C 之间熔融; 在约 185 °C 时开始分解, 有气态产物释放出; 在 240 °C 下分解时, 产物不是 *L* 苹果酸或其二聚体, 而是富马酸、马来酸和马来酸酐。这是由于相邻重复单元之间脱水所致。有人曾借助 TOF SIMS 和 XPS 研究了聚苹果酸及其酯衍生物的表面化学结构和断链方式, 定量分析表明其结构组成与理论分析结构是吻合的^[57]。通过调节含苹果酸结构单元的聚苹果酸酯的组成和结构, 其形态和热性能均会发生相应的改变, 如表 2^[48] 和表 3^[51] 所示。

此外, 对具有两个非对称中心的聚苹果酸酯的结构与性能分析表明^[58~60], 大分子链的立体构型对其结晶性能、 T_g 和 T_m 均有明显影响, 因此通过引入非对称中心来改变其立体构型, 可调控聚苹果酸酯的形态和物理化学性能。

表 2 几种聚苹果酸酯的热转变
Table 2 Thermal transitions in a few poly(malicacid)esters

聚酯	M_n	$T_g / ^\circ\text{C}$	$T_m / ^\circ\text{C}$	形态
PMLABz	7900	29. 6	—	无定形态
PCI	10000	—58	57. 5	结晶态
P(MIABz- <i>b</i> -Cl)	7900- <i>b</i> -11500	11. 2	53	半晶态
P(MLA- <i>b</i> -Cl)	3300- <i>b</i> -11500	6. 4	51. 2	半晶态

表 3 具有不同组成和结构的 *L*-乳酸 β -苄基苹果酸共聚物的热性质
Table 3 Thermal properties of the copolymers of *L*-lactide and RS- β -benzyl malolactonate(MA) with different composition

共聚物中 MA 含量 (mol %)	$T_g / ^\circ\text{C}$		$T_m / ^\circ\text{C}$		$\Delta H_m / (\text{J} \cdot \text{g}^{-1})$		形态
	a	b	a	b	a	b	
0	59	59	165	165	—17. 3	—17. 3	结晶态
4	57	61	161	163	—10. 5	—14. 7	半晶态
8	56	63	157	160	—7. 4	—10. 8	半晶态
14	53	64	150	155	—1. 3	—6. 4	半晶态
20	49	64	—	—	—	—	无定形态
27	46	66	—	—	—	—	无定形态
35	43	73	—	—	—	—	无定形态

注: a—苄基取代的共聚物; b—脱去保护基团苄基的共聚物。

3.2 化学性质

3.2.1 化学反应性 由短梗霉属菌株合成的聚苹果酸的 2%(wt) 水溶液的 pH 为 2. 0, 酸性比聚丙烯酸强^[26]。聚(β -*L*-苹果酸) 的羧基可与碱中和形成一种高度水溶性的聚阴离子。聚苹果酸与多价阳离子如质子化的精胺、聚乙烯亚胺、聚 *L* 赖氨酸、庆大霉素、组蛋白等^[23, 35~37] 结合成具有高亲和力的复合物。这些复合物容易形成聚合盐沉淀^[55], 加入一定浓度的 NaCl 后复合物会很快离解。聚 β -*L*-苹果酸的 α -羧基在水中或聚苹果酸的 α -羧基在有机溶剂中能够高效地与亲核试剂[特别是一级胺, 如荧光 *N*-(1 萘基) 乙二胺] 发生偶联反应^[61, 62]。

3.2.2 降解和可生物降解性能 聚苹果酸及其衍生物的降解和可生物降解性也是其重要的化学性质之

一。天然聚(β-L-苹果酸)在浓度为0.13mol/L的磷酸盐缓冲溶液(pH=7.4)中,在37℃发生水解降解时,半衰期为10h^[59]。Braud等^[54,63,64]通过空间排阻色谱(SEC)追踪溶液中PMLA降解产生的小分子和低聚物,研究PMLA体外非酶促水解降解机理。结果表明,在中性pH溶液中聚苹果酸酯先水解成低聚中间体,而后进一步水解断链,最终得到降解产物是苹果酸或者二聚体。通过检测降解过程中的分子量变化,得到了PMLA分子量变化与时间、温度、pH值之间的关系^[2,20,26,54,64,65]。在溶液中的聚苹果酸及其衍生物的水解降解受温度和介质的pH影响很大。提高温度会加速水解;在碱性和酸性溶液中,水解也会加快。PMLA在溶液中降解的起始阶段,降解服从一级动力学规律,最终的降解产物是苹果酸。

聚苹果酸及其衍生物的降解性能与其组成有很大关系。PMLAB_yH_(100-y)(0≤y≤100)中的酸性链节断降解得比苄基链节快,因此该聚合物的酸性链节含量越高,降解也就越快。在苹果酸共聚物中,由于自身的酸催化 and 扩散反应的影响,降解还会通过单体间酯键的水解来进行,从而发生非均匀的降解^[66,67]。

生物体内的微生物如真菌^[31]、黏菌^[62,68~70]、细菌和食酸丛毛单胞菌^[71]细胞中的水解酶(解聚酶)把聚β-L-苹果酸作为营养源加以分解利用,从聚β-L-苹果酸的链端释放出L-苹果酸。

3.3 生理学性质

通过对黏菌中聚(β-L-苹果酸)的生理作用的研究,发现聚β-L-苹果酸有不同于作为能源和碳源存储物质的功能。聚(β-L-苹果酸)与DNA复制型聚合酶、组蛋白以及其它还没鉴定的核蛋白结合,因而促进多蛋白复合体的形成^[25,37,72,73]。研究者们为了探索聚(β-L-苹果酸)的生理功能,已研究了其细胞特异性、细胞内的分配情况、它的体外反应以及显微注射对变形体的影响^[25,35,37,74],根据研究结果推测,聚β-L-苹果酸的功能是作为分子载体和存储装置来分配足够数量的蛋白以满足细胞核增殖的需要。

对小鼠进行PMLA的静脉注射试验,结果表明静脉注射量可高达1.5 mol/L(以体重计,相当于1.63g/kg);高浓度的注射会由于高渗透压而导致不良影响^[75,76]。用合成聚(β-DL-苹果酸)对小鼠做腹腔注射时,注射量可达0.3 mol/L(以体重计,相当于1.63 g/kg)而不产生生理影响。然而,部分苄基化的聚(β-DL-苹果酸)的注射量就要小一些^[59]。对合成PMLA的羟基末端或重复单元进行元素标记,进行体内的药物动力学研究,结果表明,PMLA在体内各种器官中停留的时间各不相同;约70%的PMLA在1h内通过尿液排出;约90%的PMLA在6h内通过尿液排出^[75,76]。

对聚苹果酸及其衍生物的免疫学的研究表明它们无免疫原性。共聚的聚苹果酸酯通过化学修饰产生了包含羰基、磺酸基和2-丁基的衍生物,这些聚苹果酸衍生物对HepG2细胞无毒性,而且可以刺激小鼠肌肉伤口的愈合^[9]。试验还发现聚苹果酸酯的降解产物对巨噬细胞J774的毒性非常小^[61]。当低分子量的聚合物快速降解时,细胞毒性比缓慢降解时大。这是因为降解过快,所产生的降解产物将会对细胞附近的介质和生长环境在短时期内产生较大冲击,从而影响细胞活性。

4 聚苹果酸及其衍生物潜在应用

聚苹果酸及其衍生物具有良好的水溶性、可生物降解性、生物相容性和生物可吸收性,是一种极具应用前景的功能性脂肪族聚酯。它们的潜在应用主要集中在生物医药和生物材料领域,可望作为药物释放系统、手术缝合线、组织工程支架材料等;此外,还可望用于制备具有生物活性的高分子胶束、纳米微胶囊、渗析袋以及用于体内受损骨骼的修复。

4.1 在药物载体和高分子药物方面的应用

1975年,Ringsdorf^[77]首次提出用具有药理活性基团的大分子作为药物的概念。这种高分子药物体系的性能很大程度上决定于所用的大分子,故可在较宽的范围内进行调控;而小分子药物则会因结构变化而失活。一般认为可用作药物载体的高分子必须是无毒性、可生物降解性、免疫惰性、可控释放性以及窄分布的高分子^[77,78]。研究已证实天然聚苹果酸具有这些特性。此外,由于天然聚苹果酸在生理条件下的相对高溶解性、高自发降解速率和免疫惰性使得它优于多糖和多肽类生物高分子^[1,9]。通过共聚或悬挂羧基的反应调节,用作药物载体的聚苹果酸及其衍生物大分子链的结构或组成,就可实现可控释放。它们被认为是一种可用于体内非肠胃部分的药物可控释放的高分子载体材料^[63,79]。脂质体是由磷脂组

成的选择性渗透生物膜, 具有 pH 敏感特性。Osanai 等^[80] 通过络合把脂质体接到 PMLA 的烷基衍生物上, 使之具有 pH 敏感性, 从而改善大分子所吸附的药理性物质的在特定环境下的释放性能, 做到一定程度的控制释放。

Ouchi 等^[81] 曾合成了一种聚 α -苹果酸酯和氟尿嘧啶的结合体, 并证明这是一种有效的高分子原药; Yoncheva 等^[82] 把抗凝聚特性的潘生丁(冠状动脉扩张药物) 接入聚苹果酸酯中, 在体外降解实验表明, 这一高分子药物体系可以持续给药 38 天, 有效地抗血小板的凝聚。

4.2 在其它方面的应用

聚苹果酸及其衍生物可以制备成为具有生物活性的大分子胶束、表面活性剂或乳化剂^[83]、固体药物外包装、纳米微胶囊、渗析袋、医疗器械附加高分子涂层、手术缝合线、组织工程的支架材料^[49~51] 以及用于骨外科中的骨骼修复^[47]。例如, 一种含苹果酸单元的三元共聚物可与具有生物活性的肝素络合, 从而与具有羟甲基苄胺磺化葡萄糖(CMDBS) 相似的特性, 能在生物体内引发刺激新骨的生长, 修复受损骨骼^[47]。最近, *L*-苹果酸已被首次用于制备一类新的聚酯酰胺^[84]。

总的来讲, 聚苹果酸及其衍生物的应用研究报道较少, 基本上还局限于实验室研究阶段。随着研究的不断深入, 聚苹果酸及其衍生物的家族还会扩大, 其性能谱也将随之拓宽, 从而为它们的实际应用提供有效的途径。

5 前景与展望

天然的和人工合成的聚(β -*L*-苹果酸) 都具有无毒性 and 免疫惰性; 聚(*L*-苹果酸) 可以直接在自发降解或酶降解后被有机体重新吸收而避免浪费; 聚苹果酸特有的悬挂羧基使得它具有高质子容量、光学构象和分子可改造性; 聚苹果酸的盐形式可赋予它高的电荷密度。这些独特的性质使得它可作为一种分子基质与天然配体或合成配体发生特异相互作用。

到目前为止, 聚苹果酸还没有投入到实际应用中。部分原因是由于合成途径还没有被优化到可以较大批量制备的程度; 同时, 聚苹果酸及其衍生物良好的水溶性和过快的降解速度也限制了它的使用。不过, 适当的改性可以改善这些缺陷。目前研究者就集中在合成途径的优化, 并从分子结构和高分子聚集态与材料的性能关系出发, 制备出降解速度和组织生长速度相匹配的材料, 并实现降解的可控性。由于聚苹果酸及其衍生物自身的优异性能, 随着研究的不断深入, 现存问题将被逐步克服, 从而使它们的应用成为现实。

参考文献:

- [1] Vert M, Lenz R W. Polym Prep, 1979, 20 (1): 608~611.
- [2] Braud C, Banel C, Vert M. Polym Bull, 1985, 13: 293~299.
- [3] Gu rin Ph, Vert M, Braud C, et al. Polym Bull, 1985, 14: 187~192.
- [4] Vert M. Polym Degrad Stab, 1998, 59 (1-3): 169~175.
- [5] 刘双江, Steinbuehl A. 生物工程学报, 1997, 13 (3): 279~283.
- [6] Kajiyama T, Taguchi T, Kobayashi H, et al. Polym Degrad Stab, 2003, 81 (3): 525~530.
- [7] Cammas S, Bear M M, Gu rin Ph. Inter J Biol Macromol, 1999, 25 (1-3): 273~282.
- [8] Cammas S, Bear M M, Harada A, et al. Macromol Chem Phys, 2000, 201: 355~364.
- [9] Jeanbat M V, Barraud C, Cammas S, et al. J Biomater Sci, Polym Ed, 2000, 11: 979~991.
- [10] Shimada K, Matsushima K. Agr. Biol Chem, 1969, 33: 544~548.
- [11] Shimada K, Matsushima K. Agr. Biol Chem, 1969, 33: 549~553.
- [12] Shimada K, Matsushima K, Fukumoto J, et al. Biochem Biophys Res Commun, 1969, 35: 619~624.
- [13] Matsushima K, Shimada K. Agr. Biol Chem, 1970, 24: 47~52.
- [14] Matsushima K. Agr. Biol Chem, 1970, 34: 1741~1744.
- [15] Fujino A, Ouchi T. Polym Prep Jpn, 1985, 35: 2330~2335.
- [16] Nakashima R, Okuda T, Ouchi T, et al. Rep Fac Eng Tottri Univ, 1977, 8: 124~127.
- [17] Kajiyama T, Taguchi T, Kobayashi H, et al. Polym Bull, 2003, 50: 169~174.

- [18] Kajiyama T, Taguchi T, Kobayashi H, et al. *Polym Degrad Stab*, 2004, 84 (1): 151~157.
- [19] Kajiyama T, Kobayashi H, Taguchi T, et al. *Biomacromolecules*, 2004, 5: 169~174.
- [20] Gu rin P, Vert M. *Polym Commun*, 1987, 28 (1): 11~13.
- [21] Gu rin P, Francillete J, Brand C, et al. *Macromol Symp*, 1986, 6: 305~314.
- [22] Cammas S, Renard I, Gu rin Ph. *Polymer*, 1996, 37 (18): 4215~4220.
- [23] Arnold S, Lenz R W. *Makromol Chem Macromol Symp*, 1986, 6: 285~286.
- [24] Cammas S, Renard I, Boutault K, et al. *Tetrahedron Asymmetry*, 1993, 4: 1925~1930.
- [25] Fischer H, Erdmann S, Holler E. *Biochem*, 1989, 28: 5219~5226.
- [26] Nagata N, Nakahara T, Tabuchi T. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1993, 57: 638~642.
- [27] Nakajima K T, Hirotani N, Nakahara T. *J Ferment Bioeng*. 1996, 82: 411~413.
- [28] Liu S, Steinbuchel A. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1996, 46 (3): 273~278.
- [29] Liu S, Steinbuchel A. *Biotechnol Lett*, 1997, 19 (1): 11~14.
- [30] Holler E. *Handbook of Engineering Polymeric Materials*, 1997: 93~103.
- [31] Rathberger K, Reisner H, Willbald B, et al. *Micro Res*, 1999, 103: 513~520.
- [32] Lee B S, Holler E. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, 51: 647~652.
- [33] Lee B S, Holler E. *FEMS Microbiol Lett*, 2000, 193: 69~74.
- [34] Lee B S, Maurer T, Kabitzer H, et al. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, 52: 415~420.
- [35] Holler E, Angerer B, Achhammer G et al. *FEMS Microbiol Rev*, 1992, 103: 109~118.
- [36] Holler E, Achhammer G, Angerer B, et al. *Eur J Biochem*, 1992, 206: 1~6.
- [37] Angerer B, Holler E. *Biochem*, 1995, 34: 14741~14751.
- [38] Willbald B, Bildl W, Lee B S, et al. *Eur J Biochem*, 1999, 265: 1085~1090.
- [39] Vert M. *Makromol Chem Macromol Symp*, 1986, 6: 109~122.
- [40] Caron A, Braud C, Vert M, et al. *Polymer*, 1990, 31: 1797~1802.
- [41] Durand L, Agnes M, Gu rin Ph. *Reac Func Polym*, 1996, 31 (1): 57~65.
- [42] Ramiandrasoa P, Gu rin Ph, Vert M, et al. *Polym Bull*, 1993, 30: 501~508.
- [43] Barbaud C, Cammas S, Gu rin Ph. *Polym Bull*, 1999, 43 (4~5): 297~304.
- [44] Gross R A, Yan Z, Robert W, et al. *Macromolecules*, 1988, 21 (9): 2657~2668.
- [45] Moine L, Cammas S, Amiel C, et al. *Polymer*, 1997, 38 (12): 3121~3127.
- [46] Moine L, Amiel C, Gu rin Ph. *Polym Int*, 2001, 50 (6): 663~676.
- [47] Jeanbat M V, Barbaud C, Gu rin Ph, et al. *Macromol Chem*, 1999, 2 (7~8): 393~401.
- [48] Coulembier O, Degee Ph, Cammas S, et al. *Macromolecules*, 2002, 35: 9896~9903.
- [49] He B, Bei J Z, *Polym Adv Technol*, 2003, 14: 645~652.
- [50] He B, Bei J Z, *Polymer*, 2003(44): 989~994.
- [51] He B, Bei J Z, *Biomacromolecules*, 2004, 170~174.
- [52] Bear M M, Lazarek K, Randrianahefa S, et al. *Polymer*, 1999, 40 (23): 6521~6528.
- [53] Cammas S, Gu rin Ph, Vert M, et al. *Macromolecules*, 1993, 26 (17): 4681~4684.
- [54] Nagata N, Nakahara S, Fujishige S, et al. *Polym J*, 1993, 25 (6): 585~592.
- [55] Braud C, Vert M. *Trend Polym Sci*, 1993, 3: 57~65.
- [56] Fujishige S. *J Therm Anal Cal*, 2002, 70: 861~865.
- [57] Leadly S R, Vert M, Braud C, et al. *Macromolecules*, 1997, 30: 6920~6928.
- [58] Boutault K, Cammas S, Gu rin Ph, et al. *Macromolecules*, 1995, 28 (10): 3516~3520.
- [59] Renard E, Boutault K, Gu rin Ph, et al. *Polym Bull*, 1996, 36: 585~592.
- [60] Bear M M, Randrianahefa S, Gu rin Ph, et al. *Polymer*, 2000, 41 (10): 3705~3712.
- [61] Ouchi T, Fujino A, Tanka K, et al. *J Control Release*, 1990, 12: 143~153.
- [62] Gasslmair B, Holler E. *Eur J Biochem*, 1997, 250: 308~314.
- [63] Braud C, Caron A, Vert M, et al. *Polym Prepr*, 1988, 29 (1): 600~601.
- [64] Braud C, Vert M. *Polym Bull*, 1992, 29: 177~183.
- [65] Barbosa M, Cammas S, Appel M, et al. *Biomacromolecules*, 2004, 5: 137~143.
- [66] Mauduit J, Boustta M, Vert M. *J Biomater Sci Polym Ed*, 1995, 7: 207~220.
- [67] Stohlik S, Gamett M C, Davies M C, et al. *J Mater Sci Mater In Med*, 1996, 7: 161~166.
- [68] Korheer C, Roth M, Holler E. *Can J Microbiol*, 1995, 41 (Suppl. 1): 192~199.
- [69] Karl M, Holler E. *Eur J Biochem*, 1998, 251: 405~412.

- [70] Gasslmair B, Krell C M, Seebach D, et al. Eur J Biochem, 2000, 267: 5101~5105.
- [71] Gödde C, Liebergesell M, Steinbuechel A. FEMS Microbiol Lett, 1999, 173: 365~372.
- [72] Adhammer G, Winkler A, Angerer B, et al. Curr Genet, 1995, 28: 534~545.
- [73] Doerhoefer S, Khodyreva S, Safronov I, et al. Microbiology, 1998, 144: 3181~3193.
- [74] Schmidt A, Windisch C, Holler E. Eur J Cell Biol, 1996, 70: 373~380.
- [75] Fourni Ph, Gu rin Ph, Braud C, et al. J Bioact Compa Polym, 1990, 5: 381~395.
- [76] Fourni Ph, Gu rin Ph, Braud C, et al. J Bioac Comp Polym, 1992, 7: 113~129.
- [77] Ringsdorf H. J Polym Sci, Part A: Polym Chem, 1975, 51: 135~153.
- [78] Ulbrich H, Gu rin Ph. J Bioact Comp Polym, 1991, 6: 348~357.
- [79] Vert M. Makromol Chem Macromol Symp, 1986, 6: 109~122.
- [80] Osanai S, Nakamura K. Biomaterials, 2000, 21 (9): 867~876.
- [81] Ouchi T, Fujino A. Makromol Chem Rapid Commun, 1989, 10: 1523~1530.
- [82] Yoncheva K, Miloshev S, Belcheva N, et al. Int J Pharm, 2001, 226: 31~37.
- [83] Coulembier O, Degee Ph, Gu rin Ph, et al. Langmuir, 2003, 19: 8661~8666.
- [84] Regafio C, AllaA A, Martinez de Iarduya A, et al. Macromolecules, 2004, 37: 2067~2075.

Synthesis and Application Prospects of Biopolymers Poly(malic acid) and its Derivatives

DING Rui, LI Guang-Ji^{*}

(*Department of Polymer Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China*)

Abstract: Biopolymers have been a new focus due to their fascinating properties, importance for life and potential application prospects. As a new type of biopolymers, poly(malic acid) and its derivatives also possess some unique properties. In this paper the structure and properties of poly(malic acid) and its derivatives were introduced and the development of studies on the synthesis and preparation of them was reviewed. In addition, their application prospects as biomedical materials in the areas of drug delivery system, tissue engineering, and so on, were shown and summarized.

Key words: Biopolymers; Poly(malic acid) ; Derivatives; Drug carrier