

SPEKTROSKOPIA NMR W ANALIZIE PROCESU DEGRADACJI KOPOLIMERÓW LAKTYDU Z KAPROLAKTONEM

JOANNA JAWORSKA, JANUSZ KASPERCZYK, PIOTR DOBRZYŃSKI

CENTRUM MATERIAŁÓW POLIMEROWYCH I WĘGLOWYCH,
UL. M.SKŁODOWSKIEJ-CURIE 34, 41-819 ZABRZE, POLSKA

Streszczenie

W pracy zaprezentowano wyniki badań nad procesem hydrolitycznej degradacji resorbowalnych kopolimerów laktydu z kaprolaktonem otrzymanych metodą polimeryzacji w masie przy użyciu niskotoksycznego inicjatora cyrkonowego $Zr(acac)_4$. Dla porównania wpływu inicjatora na mikrostrukturę łańcucha polimerowego i w związku z tym na proces degradacji przeprowadzono również syntezę kopolimerów laktydu z kaprolaktonem wobec acetyloacetonianu glinu oraz butylolitu. Otrzymane materiały oraz produkty degradacji analizowano za pomocą wysokorozdzielczej spektroskopii NMR. Badano zmiany w mikrostrukturze łańcucha wyznaczając następujące parametry: udziały jednostek komonomerycznych, stopień bezładności łańcucha polimerowego, średnią długość bloków laktydylowych i kaproilowych na każdym etapie degradacji [1-3].

[*Inżynieria Biomateriałów, 65-66, (2007), 51-54*]

Wstęp

Alifatyczne poliestry są bioresorbowalnymi, kompatybilnymi z tkankami ludzkimi materiałami, ulegającymi hydrolitycznej i enzymatycznej degradacji w środowisku biologicznym do niskocząsteczkowych produktów, które w wyniku przemian metabolicznych są całkowicie usuwane z organizmu.

Materiały uzyskane na bazie poliestrów alifatycznych znajdują zastosowanie w przemyśle medycznym i farmaceutycznym między innymi w systemach kontrolowanego uwalniania leków, czy też w inżynierii tkankowej jako biodegradowalne podłoża do hodowli komórkowych.

Znajomość mikrostruktury łańcucha jest niezwykle istotna przy projektowaniu wspomnianych powyżej nowych postaci leku i bioresorbowalnych implantów. W systemach kontrolowanego dozowania leków substancja czynna może być umieszczona w mikrosferze lub w obrębie polimerowej matrycy, która powinna ulegać kontrolowanej degradacji w środowisku biologicznym. Podczas projektowania systemów biodegradowalnych należy wziąć pod uwagę czas degradacji polimeru jak i czas dyfuzji aktywnego składnika z materiału polimerowego. Istotna jest znajomość mikrostruktury użytego polimeru, z którego następuje uwalnianie leku, gdyż mikrostruktura łańcuchów polimerowych bezpośrednio wpływa na proces degradacji matrycy a przez to również na proces uwalniania leku. Znając przebieg zmian mikrostruktury w czasie procesu degradacji można we właściwy sposób projektować strukturę polimerowych systemów biodegradowalnych - systemów w pełni zsynchronizowanych z zaplanowanym czasem uwalniania leku. Podczas projektowania biodegradowalnych podłoży do hodowli komórkowych znajomość mikrostruktury również odgrywa kluczową rolę w przewidywaniu właściwości i sposobu degradacji.

NMR SPECTROSCOPY AS A TOOL IN ANALYSIS OF LACTIDE/ ϵ -CAPROLACTONE COPOLYMERS DEGRADATION

JOANNA JAWORSKA, JANUSZ KASPERCZYK, PIOTR DOBRZYŃSKI

CENTRE OF POLYMER AND CARBON MATERIALS,
M.SKŁODOWSKIEJ-CURIE 34 ST., 41-819 ZABRZE, POLAND

Summary

This paper presents results of degradation process investigations of resorbable lactide/ ϵ -caprolactone copolymers. Materials used in this work were synthesized by the ring opening polymerization. Polymerization was carried out in bulk using $Zr(acac)_4$ as initiator. $Al(acac)_3$ and LiBut were also used in order to compare the influence of initiator on chain microstructure and hence on hydrolytic degradation. The resulting copolymers and degradation products were characterized by high resolution NMR spectroscopy 1H and ^{13}C . Changes in chain microstructure on every stage of degradation were characterized by following values: content of comonomeric units, degree of randomness, average length of blocks and distribution of co-monomeric sequences [1-3].

[*Engineering of Biomaterials, 65-66, (2007), 51-54*]

Introduction

Aliphatic polyesters belongs to bioresorbable and compatible with human tissues materials which undergo hydrolytic and enzymatic degradation in biological environment. Their hydrolysis in physiological media gives lactic and glycolic acids, nontoxic components that are eliminated via the Crebs cycle.

Aliphatic polyesters are considered in a variety of medical and pharmaceutical applications in controlled drug delivery systems, in tissue engineering as biodegradable scaffolds.

Well defined microstructure of devices used in mentioned applications is extremely important because it directly influences the way of degradation. In controlled drug delivery systems therapeutic agents are incorporated into a polymeric matrix, which undergo hydrolytic degradation within biological environment. Modelling of drug release from biodegradable systems requires consideration of the relative rates of polymer degradation and drug diffusion. It is of vital importance to have defined microstructure of devices that drugs are released from. It influences the way of degradation, way of releasing particular drugs. Knowing how the polymer microstructure changes during degradation will let us design biodegradable systems properly - systems which will be well connected with desired time of drug release. In designing biodegradable scaffolds knowledge of this kind seems to be also necessary.

Generally, on the basis of changes in chain microstructure during degradation process it is possible to choose appropriate copolymer or terpolymer to desired application. Lactide and caprolactone homopolymers belong to the group of polyesters which undergo hydrolytic degradation in a longer period of time comparing to polyglycolide and PLAGA copolymers. However the degradation rate of lactide/ ϵ -caprolactone copolymers is much higher.

Na podstawie znajomości zmian mikrostruktury podczas procesu degradacji można dobrać odpowiedni rodzaj kopolimeru czy terpolimeru do odpowiedniego zastosowania tak aby sterując strukturą łańcucha polimerowego wpływać na mechanizm i czas degradacji materiału. Inżynieria tkankowa wykorzystująca biodegradowalne podłoża do hodowli komórkowych ma na celu odtworzenie brakującego lub uszkodzonego fragmentu tkanki. Inne właściwości musi posiadać materiał do uzyskania implantów do regeneracji skóry lub naczyń krwionośnych, a inne do regeneracji tkanki kostnej. Homopolimery laktydu i kaprolaktanu są poliestrami, które degradują znacznie wolniej niż poliglikolid czy kopolimery PLAGA. Jednakże kopolimery otrzymane z laktydu i ϵ -kaprolaktanu degradują już znacznie szybciej, a sterowanie czasem i mechanizmem degradacji jest możliwe poprzez odpowiednią zmianę rozkład jednostek komonomerycznych w łańcuchu kopolimerowym, co przedstawiamy w niniejszej pracy.

Metody

Kopolimery laktydu z kaprolaktonem otrzymano metodą polimerizacji w masie i w roztworze stosując następujące inicjatory reakcji: $Zr(acac)_4$, $Al(acac)_3$, LiBut (stosunek molowy inicjatora do monomerów - 1:800). Temperatura reakcji wynosiła odpowiednio: 150°C, 110°C-135°C, 25°C. Kopolimerom nadano postać folii, wycięto kwadraty o grubości 0,5mm i w takiej postaci poddano degradacji. Degradację prowadzono zgodnie z procedurą przedstawioną dla kopolimerów glikolidu z kaprolaktonem [1] w roztworze buforu fosforanowego pH=7,4 w temperaturze 37°C przez 25 tygodni. Otrzymane produkty degradacji charakteryzowano technikami 1H i ^{13}C NMR (pomiarów dokonano przy użyciu spektrometru Varian Unity Nova 300MHz stosując $CDCl_3$ jako rozpuszczalnik oraz tetrametylosilan TMS jako wzorec wewnętrzny. Liczba przejść dla pomiaru 1H to 32, długość impulsu 7 μ s a czas akwizycji 3.74s. Liczba przejść dla pomiaru ^{13}C NMR to 16 000, długość impulsu 9 μ s a czas akwizycji 1,8s). Ciężary cząsteczkowe oraz stopień polidywersji badano przy użyciu GPC (Spectra-Physics 8800, eluent: THF, prędkość przepływu: 1ml/min). Badano również ubytek masy podczas procesu degradacji

Dyskusja

Otrzymano kopolimery L,L-laktydu z ϵ -kaprolaktonem o następujących udziałach jednostek komonomerycznych: laktydylowych LL i kaproilowych C (22%mol. LL/78%mol. C, 50%mol. LL /50%mol. C, 73%mol. LL /27%mol. C).

Sample	Lactidyl units content [%]	Initiator	Temp. [°C]	R
A1	50	$Zr(acac)_4$	150	0,80
A2	73	$Zr(acac)_4$	150	0,79
A3	22	$Zr(acac)_4$	150	0,85
B1	80	$Al(acac)_3$	110-135	0,75
B2	94	$Al(acac)_3$	110-135	0,61
B3	38	$Al(acac)_3$	110-135	0,50
C1	48	LiBut	25	0,00
C2	18	LiBut	25	0,00
C3	70	LiBut	25	0,00

TABELA 1. Charakterystyka otrzymanych materiałów.
TABLE 1. Characterization of obtained materials.

Control of degradation time and degradation mechanism is possible by the changes in comonomeric units distribution in polymeric chain and this is what we would like to present in this study.

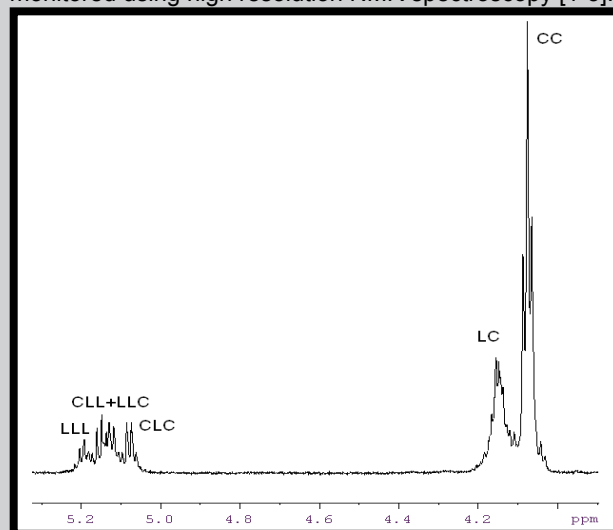
Methods

Copolymers of lactide and ϵ -caprolactone were obtained by the ring opening polymerization using $Zr(acac)_4$, $Al(acac)_3$, LiBut as initiators. Temperatures of reaction were 150°C, 110°C-135°C, 25°C respectively. The molar ratio of comonomers/initiator was 800:1. Polymerization was carried out in bulk. The copolymers were manufactured in a form of foil by solvent casting. Square specimens with 0,5 mm thick were then cut from the films. The resulting form of copolymers was submitted to degradation in phosphate buffer pH=7,4 at 37°C for 25 weeks. The resulting copolymers and degradation process were characterized by 1H i ^{13}C NMR. Resonance spectra were recorded with a Varian Unity Inova spectrometer operating at 300MHz, using $CDCl_3$ as solvent. Chemical shifts (δ) were given in ppm using tetramethylsilane (TMS) as an internal reference. The spectra were obtained with 32 scans, 7 μ s pulse width and 3.74s acquisition time for 1H NMR and 16 000 scans, 9 μ s pulse width, delay between pulses 3s and 1.8s acquisition time for ^{13}C NMR. Molecular weights and polydispersity were monitored by GPC (Spectra-Physics 8800, eluent: THF, flow rate: 1ml/min). Weight loss profiles were also measured.

Discussion

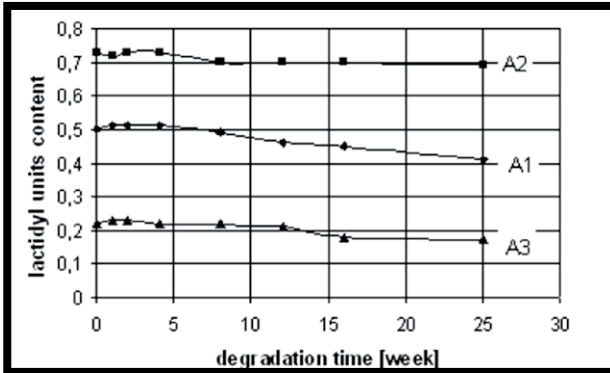
Copolymers samples with various chain microstructure (diblock, semiblocks and random) were obtained changing the feed mole fraction of comonomers (22%mol. LL/78%mol. C, 50%mol. LL /50%mol. C, 73%mol. LL /27%mol. C)

Variation of the co-monomeric units content (lactidyl NLL and caproyl NC) average lengths of blocks (lactidyl LLL and caproyl LC), degree of randomness during degradation were monitored using high resolution NMR spectroscopy [1-3].

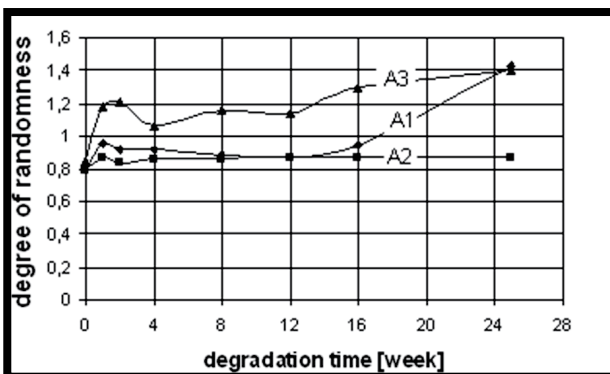


RYS.1. Widmo kopolimeru laktydu z kaprolaktonem A3. Zakres protonów metinowych jednostki laktydylowej i protonów metylenowych jednostki kaproilowej.

FIG.1. H-1 NMR ($CDCl_3$) spectrum of lactide/ ϵ -caprolactone copolymer A3. Methine proton region of lactidyl units and methylene proton region of ϵ -caproyl units.



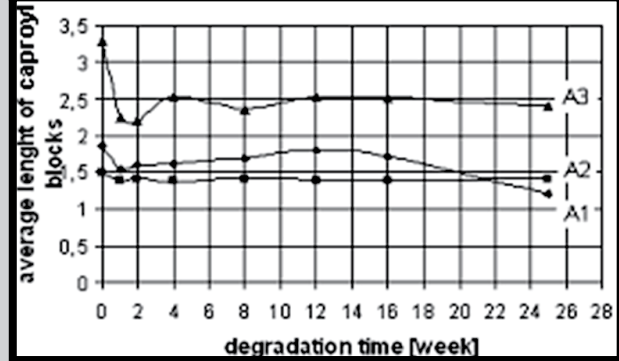
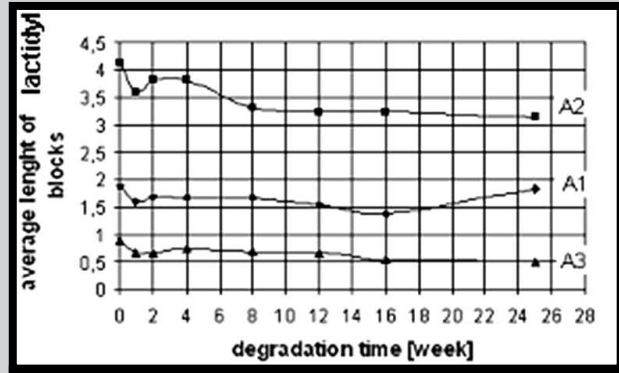
RYS.2. Zmiana udziału jednostki laktydylowej podczas degradacji kopolimerów laktydu z kaprolaktonem otrzymanych na inicjatorze $Zr(acac)_4$.
FIG.2. Changes of lactidyl units content during degradation time of lactide/ ϵ -caprolactone copolymers obtained with $Zr(acac)_4$ initiator.



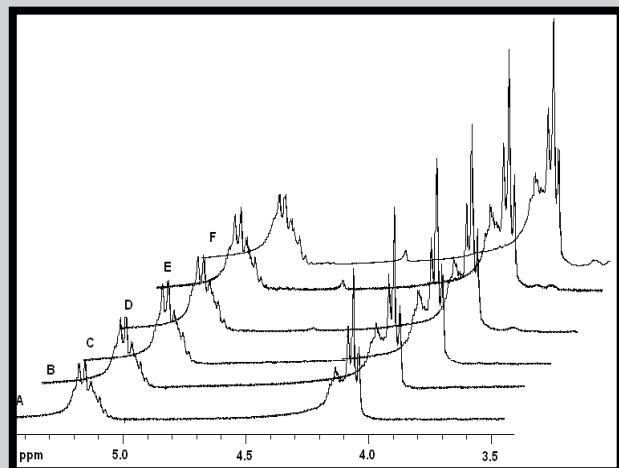
RYS.4. Zmiana stopnia bezładności w trakcie degradacji kopolimerów laktydu z kaprolaktonem otrzymanych na inicjatorze $Zr(acac)_4$.
FIG.4. Changes of degree of randomness during degradation of lactide/ ϵ -caprolactone copolymers obtained with $Zr(acac)_4$ initiator.

Za pomocą spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego badano zmiany następujących wielkości w trakcie procesu degradacji: udział jednostek komonomerycznych N_{LL} (laktydylowych) i N_C (kaproilowych), średnią długość bloków L_{LL} (laktydylowych) i L_C (kaproilowych), stopień bezładności R [1-2,3].

Kopolimery uzyskane przy użyciu inicjatora cyrkonowego wykazują typ budowy charakterystyczny dla kopolimerów statystycznych. Zmiany udziału jednostki laktydylowej N_{LL} , średniej długości bloków laktydylowych L_{LL} oraz kaproilowych L_C , współczynnika randomizacji R są niewielkie i przebiegają równomiernie - jedynie w początkowym okresie (do 2 tygodni) można zaobserwować bardziej intensywne zmiany. Natomiast ubytek masy jest duży w porównaniu z kopolimerami uzyskanymi przy użyciu inicjatora glinowego i litowego, szczególnie w przypadku kopolimeru o 25% zawartości jednostki laktydylowej. Jednakże spadek masy zauważalny w trakcie procesu degradacji nie wiąże się ze znaczącymi zmianami w mikrostrukturze łańcucha polimerowego. Udział jednostki laktydylowej jest prawie niezmienny w trakcie całego badanego procesu degradacji. Spadek średniej długości bloków laktydylowych w początkowym etapie degradacji jest najbardziej widoczny w przypadku kopolimeru o 25% zawartości jednostki laktydylowej.



RYS.3. Zmiana średniej długości bloków podczas degradacji kopolimerów laktydu z kaprolaktonem otrzymanych na inicjatorze $Zr(acac)_4$.
FIG.3. Changes of average length of blocks during degradation of lactide/ ϵ -caprolactone copolymers obtained with $Zr(acac)_4$ initiator.



RYS.5. Widma kopolimeru laktydu z kaprolaktonem B3. Zakres protonów metinowych jednostki laktydylowej i protonów metylenowych jednostki kaproilowej (A - przed degradacją, B - 1 tydz. degr., C - 2 tydz. degr., D - 4 tydz. degr., E - 8 tydz. degr., F - 12 tydz. degr.).
FIG.5. H-1 NMR ($CDCl_3$) spectra of lactide/ ϵ -caprolactone copolymer B3. Methine proton region of lactidyl units and methylene proton region of ϵ -caproyl units (A - before degradation, B - 1 week degradation, C - 2 weeks' degradation, D - 4 weeks' degradation, E - 8 weeks' degradation, F - 12 weeks' degradation).

W celu porównania wpływu inicjatora na mikrostrukturę łańcucha polimerowego i w związku z tym na proces degradacji przeprowadzono również syntezę kopolimerów laktydu z kaprolaktonem wykorzystując jako inicjator acetyloacetonian glinu oraz butyloolit.

Dla kopolimerów otrzymanych przy użyciu inicjatora glinowego zmiany N_{LL} , L_{LL} , L_C , R są niewielkie i przebiegają równomiernie. W początkowej fazie degradacji (do 2 tygodni) współczynnik randomizacji rośnie a następnie osiąga stały poziom. Zmiany średniej długości bloków laktydylowych są niewielkie.

Kopolimery otrzymane przy użyciu inicjatora litowego posiadają budowę diblokową. Degradacja następuje poprzez powolny ubytek jednostek laktydylowych z kopolimeru. Kopolimer ten charakteryzuje się bardzo długim czasem degradacji.

Wnioski

Otrzymano kopolimery laktydu z kaprolaktonem o różnej mikrostrukturze łańcucha (diblokowej, semiblokowej, statystycznej) różniące się ponadto zawartością jednostek komonomerycznych. Stosowano glinowe, litowe, cyrkonowe inicjatory reakcji w celu uzyskania różnorodnej mikrostruktury łańcucha polimerowego. Strukturę uzyskanych kopolimerów badano metodą magnetycznego rezonansu jądrowego. Kopolimery uzyskane przy użyciu inicjatora cyrkonowego posiadały budowę charakterystyczną dla kopolimeru statystycznego, kopolimery uzyskane przy użyciu inicjatora glinowego posiadały bardziej uporządkowaną strukturę, dłuższe średnie długości bloków i brak transestryfikacji II rodzaju, natomiast kopolimery uzyskane przy użyciu inicjatora litowego posiadały budowę diblokową. Degradacja kopolimerów otrzymanych przy użyciu inicjatora $Zr(acac)_4$ przebiegała najszybciej gdyż posiadały one amorficzną budowę o wysokiej bezładności łańcuchów kopolimerowych. Bardzo długim czasem degradacji charakteryzowały się natomiast kopolimery otrzymane przy użyciu inicjatora litowego, gdyż posiadały strukturę diblokową i częściowo krystaliczną.

Na podstawie przedstawionych wyników stwierdzono decydujący wpływ mikrostruktury łańcuchów kopolimerów laktydu z kaprolaktonem na mechanizm i czas degradacji oraz ubytek masy. Z drugiej strony wraz z postępem degradacji parametry opisujące strukturę łańcuchów ulegają jedynie niewielkim zmianom.

Podziękowania

Badania finansowane z projektu badawczego MNiSW nr. N51800731/0433 oraz z Regionalnego Fundusz Stypendiów Doktoranckich RFSD.

Piśmiennictwo

- [1] Li, S.; Dobrzyński, P.; Kasperczyk, J.; Bero, M.; Braud, C.; Vert, M.: Structure-property relationships of copolymers obtained by ring-opening polymerization of glycolide and ϵ -caprolactone. Part 2. Influence of composition and chain microstructure on hydrolytic degradation, *Biomacromolecules*, 6, (2005), 489-497
- [2] Dobrzyński, P.; Li, S.; Kasperczyk, J.; Bero, M.; Gasc, F.; Vert, M.: Structure-property relationships of copolymers obtained by ring-opening polymerization of glycolide and ϵ -caprolactone. Part 1. Synthesis and characterization, *Biomacromolecules*, 6, (2005), 483-488

Copolymers obtained with $Zr(acac)_4$ initiator is characterized by randomized chain microstructure. Changes of lactidyl units content N_{LL} , average length of blocks L_{LL} and L_C , degree of randomness R are slow and even, only during beginning period of time (2 weeks' degradation) more significant changes are noticeable. Weight loss is quite high in comparison with copolymers obtained with $Al(acac)_3$ and LiBut especially in the case of copolymer A3. However weight loss observable during degradation is not connected with significant changes in polymeric chain microstructure. Lactidyl units content is almost constant during whole measured period of time. Decrease of average length of lactidyl blocks during degradation in the beginning period of time is the most observable in the case of A3.

$Al(acac)_3$ and LiBut were also used in order to compare the influence of initiator on chain microstructure and hence on hydrolytic degradation:

In the case of copolymers obtained with $Al(acac)_3$ changes of N_{LL} , L_{LL} , L_C , R are small and even. During beginning period of time (2 weeks' degradation) the R value increases and later maintains on the same level. Changes of average length of lactidyl blocks are insignificant.

Copolymers obtained with LiBut initiator possess diblock chain microstructure. Degradation proceeds by slow release of lactyl units. The whole degradation time is very long.

Conclusions

Copolymers samples with various chain microstructure (diblock, semiblocks and random) were obtained changing the feed mole fraction of comonomers and kind of initiators. The resulting copolymers were characterized by high resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy. Copolymers obtained with $Zr(acac)_4$ initiator are characterized by random chain microstructure, with $Al(acac)_3$ less random with longer average length of blocks. Copolymers obtained with LiBut initiator have diblock chain microstructure. Degradation of copolymers obtained with $Zr(acac)_4$ initiator exhibit the shortest degradation time what is connected with randomized microstructure. Degradation time of copolymers obtained with LiBut initiator is very long what is connected with ordered chain microstructure.

On the basis of presented results it is possible to claim that chain microstructure of lactide/ ϵ -caprolactone copolymer exhibits significant influence on degradation time and mechanism as well as on weight loss. On the other hand changes of chain microstructure parameters during the degradation process are very small.

Acknowledgements

Researches were conducted with financial support from grant no. N51800731/0433 MNiSW and also from Regional Scholarship Fund for PhD students RFSD.

References

- [3] Janusz Kasperczyk, Maciej Bero "The role of transesterification in the copolymerization of L,L-lactide and ϵ -caprolactone Part I" *Macromol. Chem.* 194, (1993), 913-925
- [4] J. Maciejowska, J. Kasperczyk, P. Dobrzyński, M. Bero "The influence of chain microstructure on hydrolytic degradation of glycolide/lactide copolymers used in drug delivery systems" *Journal of Controlled Release*, 116, 2, (2006), e6-e8.