

·研究简报·

N-异丙基丙烯酰胺类共聚物温敏性研究*

刘文博 王国明 蔡 晴** 金日光

(北京化工大学材料科学与工程学院 北京市高分子材料制备与加工重点实验室 北京 100029)

摘 要 制备了 *N*-异丙基丙烯酰胺(NIPAAm)与 *N,N*-二甲基丙烯酰胺(DMAAm)和/或甲基丙烯酸羟乙酯(HEMA)的二元及三元共聚物,研究了组成和链转移剂用量对共聚物温敏性的影响,并在上述三元共聚物上接枝聚己内酯(PCL)得到温敏性两亲聚合物.结果表明,随着 DMAAm 增加、HEMA 减少或共聚物分子量降低,共聚物的最低临界溶解温度升高,且 PCL 链段的接枝度和长度对聚合物的温敏性影响明显.

关键词 *N*-异丙基丙烯酰胺共聚物,温敏性,最低临界溶解温度(LCST)

聚 *N*-异丙基丙烯酰胺(PNIPAAm)是一种具有最低临界溶解温度(LCST, 32℃)的温敏性聚合物,与其他亲或疏水单体共聚可得具不同 LCST 的高分子^[1,2],其与疏水高分子的嵌段共聚物常被用来制备胶束药物载体^[3,4].将 NIPAAm 与 *N,N*-二甲基丙烯酰胺(DMAAm)共聚,可使共聚物的 LCST 达到 37℃ 甚至更高^[4,5],将其与脂肪族聚酯嵌段共聚后并制备成载药胶束,结合局部过热处理方法可实现对肿瘤组织的温敏控制释放^[6],在胶束表面结合具有特殊靶向性的配体还可提高对病灶部位的主动靶向性^[7,8].但文献中所报道的该类温敏性胶束的表面常缺乏可反应官能团^[3~5],对结合配体分子不利,且少见由 NIPAAm 共聚物接枝聚酯共聚物制备成胶束用于前述目的的报道^[9].本文利用 NIPAAm、DMAAm 和甲基丙烯酸羟乙酯(HEMA)的自由基共聚制备了带侧羟基的温敏共聚物,调节三者比例使共聚物的 LCST 到 40℃ 附近,将其与生物可降解聚酯共聚制备亲水段带有官能团的两嵌段或接枝型两亲共聚物,最终拟将由它们所形成的载药胶束用于对肿瘤部位的热致靶向释放研究.

1 试剂与仪器

NIPAAm (Wako, 纯度 99%), 正己烷重结晶. DMAAm (瑞博龙, 纯度 98%), 减压蒸馏(80℃/2.67 kPa). HEMA (天津化学试剂研究所, 纯度 98%), 减压蒸馏(58℃/0.67 kPa). 三甲基氯硅烷(Me_3SiCl , 国药化学试剂公司, 纯度 98%), 蒸馏提

纯(56℃). 偶氮二异丁腈(AIBN, 皓辰化工), 乙醇重结晶. 巯基乙醇(Amresco, 99%). 其他试剂均按常规方法干燥纯化.

Bruker 公司 AV600 核磁共振仪, 上海光学仪器厂 752 型可见光/紫外分光光度计, 美国 Waters 公司 GPC (515-2410 System, 流动相 THF, 流速 1 mL/min, 以聚苯乙烯为标样).

2 NIPAAm 类共聚物的合成

2.1 甲基丙烯酸(2-三甲基硅氧基)乙酯(TMSEMA) 按文献[10]合成, 产物无色透明, 产率 42.5%.

2.2 NIPAAm-DMAAm 共聚物 100 mL 三口瓶中按一定比例加入 NIPAAm、DMAAm、AIBN (单体总量的 0.54 mol%)、巯基乙醇(单体总量的 1.1 mol%)和溶剂 DMF. 氩气保护下于 70℃ 反应 16 h. 旋蒸除去大部分 DMF 后, 用乙醚沉淀, 粗产物溶于 DMF 再用乙醚沉淀 1 次, 室温真空干燥得白色粉末状固体. 所得聚合物的组成和产率见表 1.

2.3 NIPAAm-HEMA 共聚物 NIPAAm-TMSEMA 共聚物, 向 100 mL 三口瓶中加入一定量的 NIPAAm、TMSEMA、AIBN、巯基乙醇和 DMF, 操作同 2.2 节.

三甲基硅保护基脱除是称取 0.2 g NIPAAm-TMSEMA 共聚物, 加入 10 mL 甲醇磁力搅拌下反应 48 h, 除去甲醇后, 得白色粉末状固体. 所得聚合物的组成和产率具体见表 1.

Table 1 Compositions,yields and LCST date of the copolymers synthesized in this study

Copolymer	Feed (molar ratio)	Yield (%)	Found (molar ratio) ^a	Ratio of	LCST (℃)
	NIPAAm/DMAAm/HEMA		NIPAAm/DMAAm/HEMA	NIPAAm/DMAAm ^a	
PNIPAAm	100/0/0	80.0	100/0/0		32.0
1	90/10/0	85.0			36.2
2	80/20/0	73.3	78.2/21.8/0	3.59	39.9
3	75/25/0	85.6	69.1/30.9/0	2.24	47.0
4 ^b	75/0/25	74.1	86.7/0/13.3		26.9
5 ^c	75/0/25		86.7/0/13.3		28.0
6 ^b	78/19.5/2.5	70.6	68.5/28.4/3.1	2.41	42.6
7 ^c	78/19.5/2.5		68.5/28.4/3.1	2.41	43.6
8	78/19.5/2.5	75.0	68.3/29/2.7	2.36	43.7
9	80/17.5/2.5	88.0			42.0
10	82.9/14.6/2.5	82.0			39.2
11	76/19/5	87.0	67/29/4	2.31	40

^aCalculated from ¹H-NMR ; ^b Compositions of these two copolymers are NIPAAm,DMAAm and TMSEMA ; ^c Copolymer 5 and copolymer 7 are the deprotection products of copolymer 4 and copolymer 6 treated with methanol for 48 h, respectively.

2.4 NIPAAm-DMAAm-HEMA (或 TMSEMA) 共聚物
向 100 mL 三口瓶中加入一定量的 NIPAAm、DMMAm、HEMA (或 TMSEMA)、AIBN、巯基乙醇和 DMF,反应条件及聚合物纯化同 2.2 节. 三甲基硅保护基的脱除同 2.3 节. 所得聚合物的组成和产率具体见表 1.

2.5 共聚物 LCST 测定 制备 0.5 wt% 共聚物水溶液,每升高 1℃ 恒温 5 min 后,用紫外可见分光光度计于 450 nm 测溶液的透光率.将透光率变化 50% 时的温度定为 LCST.

3 共聚物组成及结构分析

图 1 给出 2 种二元 NIPAAm 共聚物和一种三

元共聚物的¹H-NMR 图,可清楚分辨各结构单元的特征质子峰,δ = 3.99 (NIPAAm,—NHCH(CH₃)₂) 和 1.13 (NIPAAm,—NHCH(CH₃)₂),2.87 和 2.94 (DMAAm,—N(CH₃)₂),3.83 (HEMA,—COOCH₂CH₂OH) 及 4.16 (HEMA,—COOCH₂CH₂OH).根据它们的面积比计算的各共聚物的组成见表 1.

不同链转移剂用量下合成 NIPAAm-DMAAm-HEMA 共聚物的 GPC 结果表明(表 2),所得谱图没有出现双峰或多峰,聚合物的分子量分布系数略大于 2,说明所得产物为共聚物.

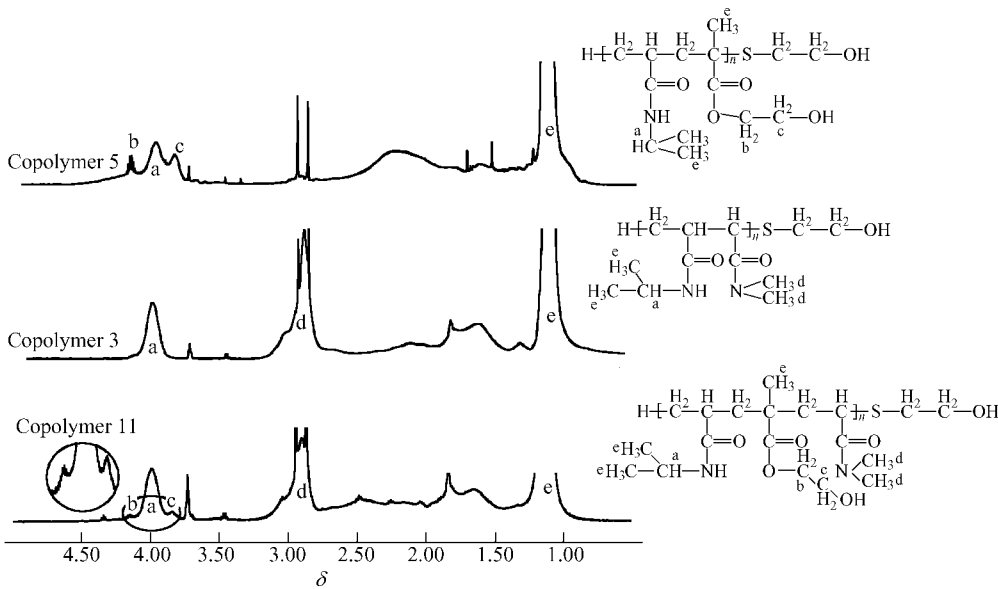


Fig. 1 ¹H-NMR spectra of copolymer 5 (upper),copolymer 3 (middle) and copolymer 11 (lower)

Table 2 Influence of molecular weight of poly(NIPAAm-co-DMAAm-co-HEMA) on their LCST

Copolymer	Feed (molar ratio)	Thioglycol/Total monomers (mole ratio)	Yield (%)	M_p^a	M_w^a	M_w/M_n^a	LCST (°C)
	NIPAAm/DMAAm/HEMA						
12	76/19/5	0.55%	85	10447	11227	2.18	39
11	76/19/5	1.1%	87	8387	9712	2.22	40
13	76/19/5	2.2%	90	7173	8322	2.38	41

^aDetermined by GPC measurement, using THF as eluent at flowing rate of 1 mL/min and polystyrene as standard

4 NIPAAm-DMAAm 共聚物的温敏行为

当温度低于 32℃ 时,是氮原子与水分子间的氢键结合使 PNIPAAm 可溶于水,当温度高于 32℃ 后,氢键被破坏,异丙基和碳碳主链的疏水相互作用增强导致 PNIPAAm 从水中析出. DMAAm 与 NIPAAm 结构相似,但因其氮上两个甲基的空间位阻和疏水性都比异丙基小,因此它们的共聚物在更高温度下才能从水中析出.由图 2 可看出,随 DMAAm 比例增加, NIPAAm-DMAAm 共聚物发生相转变温度也相应升高.利用 NIPAAm 与亲水性单体共聚是提高 LCST 的常用方法,但丙烯酸或丙烯酰胺等单体的大量引入会使共聚物对温度的敏感性明显下降,这应该是因 NIPAAm 与共聚组分与水分子间的氢键相互作用强度不等所引起的.而 NIPAAm-DMAAm 共聚物相转变对温度的响应仍十分迅速,即使当 DMAAm 比例提高到 30 mol% 后, copolymer 3 发生相转变的温度范围仍在 3℃ 以内,这也是本文选择其作为共聚组分来提高 LCST 的一个重要考虑.

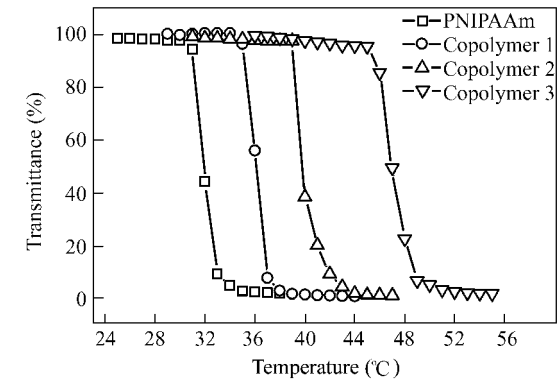


Fig. 2 Transmittance measurement of 0.5 wt% aqueous solutions of poly(NIPAAm-co-DMAAm) copolymers with different compositions at 450 nm at a heating rate of 0.2 K/min

5 NIPAAm-HEMA 共聚物的温敏行为

HEMA 同时带有羟基和不饱和双键,用它与 NIPAAm 共聚可在聚合物中引入侧羟基.本文考察了 HEMA 及 TMSEMA 对共聚物温敏行为的影响.原想 HEMA 上的羟基会使 NIPAAm-HEMA 共

聚物具有高于 PNIPAAm 的 LCST.但从表 1 看到,因三甲基硅基团的强疏水性, copolymer 4 的 LCST 降至 26.9℃,脱除保护基后, copolymer 5 的 LCST 也只有 28℃.经查阅,发现丙烯酸羟乙酯与 NIPAAm 的共聚物^[11]和甲基丙烯酸(*N*, *N*-二甲基)氨乙酯与 *N*-乙基丙烯酰胺^[12]的共聚物也都存在这种 LCST 下降的现象.认为是因(甲基)丙烯酸羟乙酯的羟基或甲基丙烯酸(*N*, *N*-二甲基)氨乙酯的氨基都不是直接与羰基相连,中间都有一小段碳链隔开,利于它们接近 *N*-烷基丙烯酰胺单体的氮原子形成氢键,使之与水之间的相互作用减弱,致使共聚物水溶性下降所致^[13].

6 NIPAAm-DMAAm-HEMA (或 TMSEMA) 共聚物的温敏行为

如表 1 和表 2 所示,调节 3 种组分比例,可得到一系列 LCST 在 40℃ 附近的 NIPAAm-DMAAm-HEMA 共聚物.但比较 PNIPAAm 和 copolymer 5 以及 copolymer 3、8 和 11 的 LCST,发现 HEMA 对二元共聚物温敏性的影响相对较小,HEMA 高达 13.3 mol% 也只使聚合物 LCST 从 32℃ 降到 28℃;但对于三元共聚物,2.7 mol% 和 4 mol% 的 HEMA 就使共聚物 LCST 从相应二元共聚物的 47℃ 分别降至 43.7℃ 和 40℃.推测是因 HEMA 与更为亲水 DMAAm 之间的氢键相互作用,对共聚物水溶性及其 LCST 所产生的影响更为明显.

用 TMSEMA 合成的 copolymer 6 在用甲醇脱保护时,随反应时间延长,所得产物的相转变曲线逐渐向 copolymer 8 靠近(图 3),约 48 h 后,脱保护产物 copolymer 7 表现出与 copolymer 8 相似的 LCST,说明脱保护反应已经完成,¹H-NMR 检测也显示位于 $\delta = 0.13$ 归属于三甲基硅基团上的质子峰已经消失. copolymer 7 和 8 两者间温敏性的微弱差别,源于自由基共聚时,HEMA 和 TMSEMA 的竞聚率差别所引起的单体在聚合物链上的分布不同.

7 链转移剂对温敏性的影响

增加巯基乙醇的用量使 NIPAAm-DMAAm-HEMA 共聚物的分子量下降,其 LCST 随之有所升

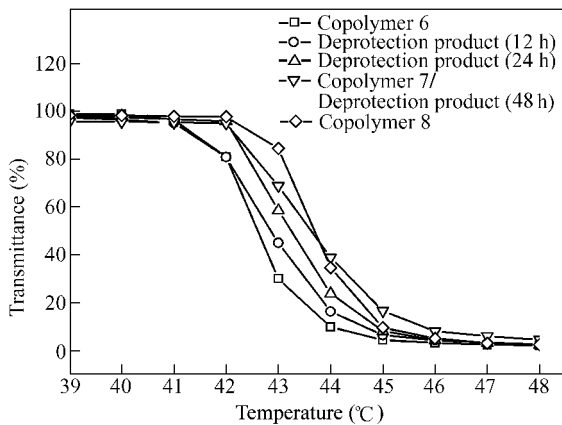


Fig. 3 Change of phase transition behavior of copolymer 6 with the treating time in methanol and in comparison with that of copolymer 8. Transmittance of 0.5 wt% aqueous polymeric solutions was measured at 450 nm at a heating rate of 0.2 K/min.

高(表 2). 这是因为亲水性端羟基的比例随分子量下降而显著增加, 提高了共聚物的亲水性所致.

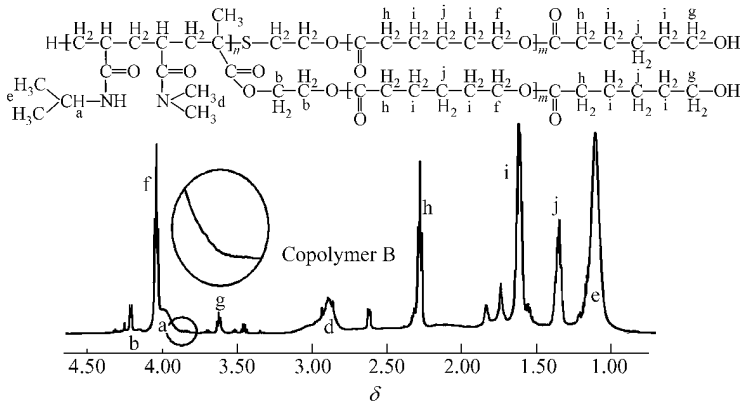


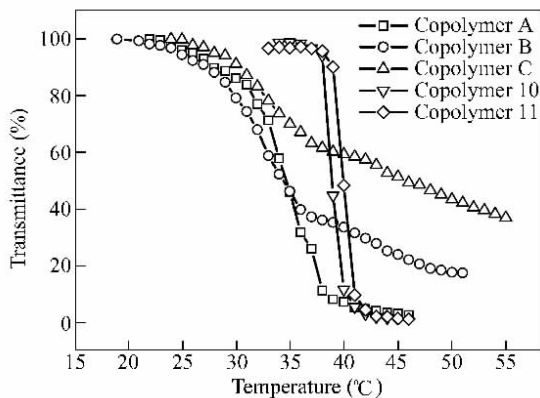
Fig. 4 ^1H -NMR spectrum of poly(NIPAAm-co-DMAAm-co-HEMA)-*g*-PCL copolymer (copolymer B)

($\delta = 2.29$, 峰 h) 的积分面积比, 计算 copolymer A、B 和 C 中 PCL 链段的分子量分别为 1500、1500 和 2500.

PCL 链段的接入明显降低聚合物的 LCST, 且随 PCL 接枝率和长度的增加, 相转变对温度的敏感性显著变差(图 5). 有文献^[5]研究了 NIPAAm-DMAAm 共聚物-*b*-脂肪族聚酯嵌段共聚物的温敏行为, 认为疏水段使共聚物 LCST 降低是因为亲水段末端羟基被取代的缘故, 疏水段本身对亲水段的温敏性影响不大. 但本研究显示, 疏水性侧链对亲水性主链的温敏性有显著影响, 但一些问题还有待深入研究, 例如 HEMA 中的羟基在引发 CL 聚合后, 位于 PCL 链末端的羟基是否会同样有降低主链 LCST 的作用, 以及影响程度与 PCL 链段

8 NIPAAm-DMAAm-HEMA 共聚物接枝聚己内酯共聚物的合成及温敏行为初步研究

用表 1 中的 copolymer 10 或 11, 在 0.05 wt% 异辛酸亚锡催化下, 利用其侧羟基引发己内酯 (CL) 聚合得到两亲性接枝共聚物 copolymer A (来自 copolymer 10), copolymer B 和 C (来自 copolymer 11). 所有产物的 GPC 检测结果为单峰, 分子量分布与起始三元共聚物相近, 说明接枝共聚物中没有未反应的起始聚合物或均聚 PCL. copolymer B 的 ^1H -NMR 结果见图 4, 可清楚观察到 CL 单元的质子信号峰 ($\delta = 1.37$ 、1.63、2.29 和 4.04), 与 copolymer 11(图 1)相比, 发现接枝 PCL 后, 位于 $\delta = 3.83$ 的 HEMA 羟乙基上靠近羟基的亚甲基质子峰(峰 c)已完全消失, 而峰 b($\delta = 4.20$)强度明显增加, 证明 HEMA 的羟基引发 CL 聚合形成了酯键. 据 CL 单元中与端羟基相邻亚甲基($\delta = 3.63$, 峰 g)和 PCL 链中与酯键碳相邻的亚甲基峰



5 Change of LCST after introducing the poly ϵ -caprolactones graft chain on copolymer 10 and 11

Transmittance of 0.1 wt% aqueous polymeric solutions was measured at 450 nm at a heating rate of 0.2 K/min.

长度的关系等.从理论上分析,提高温敏性亲水主链的 LCST 和增加其分子量,通过调控疏水性侧链的接枝率和长度,可使两亲性接枝共聚物的 LCST 高于 40℃,并在 3~5℃内完成相转变.而文献[6]指出,结合局部过热处理(42~45℃),这样的温敏性药物载体可实现对肿瘤部位热致靶向给药.

9 结论

利用 NIPAAm、DMAAm 和 HEMA 的共聚,可获得 LCST 在 40℃甚至更高并具有活泼羟基的温敏性亲水聚合物,以其为起始物制备两亲性接枝或嵌段共聚物,用来制备侧链型胶束或表面带有可反应官能团的胶束,可用于对肿瘤部位的靶向释放治疗.更多的研究工作正在进行中.

REFERENCES

- 1 Kaneko Y, Yoshida R, Sakai K, Sakurai Y, Okano T. *J Membr Sci*, 1995, 101: 13~22
- 2 Chung J E, Yokoyama M, Aoyagi T, Sakurai Y, Okano T. *J Control Release*, 1998, 53: 119~130
- 3 Wei H, Zhang X Z, Cheng C, Cheng S X, Zhuo R X. *Biomaterials*, 2007, 28: 99~107
- 4 Liu S Q, Tong Y W, Yang Y Y. *Biomaterials*, 2005, 26: 5064~5074
- 5 Masamichi N, Teruo O, Takanari M, Fukashi K, Kiyotaka S, Masayuki Y. *J Control Release*, 2006, 115: 46~56
- 6 Chilkoti A, Dreher M R, Meyer D E, Raucher D. *Adv Drug Deliv Rev*, 2002, 54: 613~630
- 7 Lukyanov A N, Gao Z G, Tochilin V P. *J Control Release*, 2003, 91: 97~102
- 8 Rosler A, Vandermeulen G W M, Klok H-A. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 53: 95~108
- 9 Lo C L, Huang C K, Lin K M, Hsiue G. *Biomaterials*, 2007, 28: 1225~1235
- 10 Beers K L, Gaynor S G, Matyjaszewski K. *Macromolecules*, 1998, 31: 9413~9415
- 11 Fundueanu G, Constantin M, Bortolotti F, Ascenzi P, Cortesi R, Menegatti E. *Macromol Biosci*, 2005, 5: 955~964
- 12 Kim E J, Cho S H, Yuk S H. *Biomaterials*, 2001, 22: 2495~2499
- 13 Fundueanu G, Constantin M, Bortolotti F, Cortesi R, Ascenzi P, Menegatti E. *Eur Polym J*, 2007, 43: 3500~3509

STUDIES ON THERMAL TRANSITION OF *N*-ISOPROPYLACRYLAMIDE COPOLYMERS

LIU Wenbo, WANG Guoming, CAI Qing, JIN Riguang

(Key Laboratory of Beijing City on Preparation and Processing of Novel Polymer Materials, College of Materials Science & Engineering, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029)

Abstract Poly(*N*-isopropylacrylamide-*co-N*, *N*-dimethylacrylamide) (poly(NIPAAm-*co*-DMAAm)), poly(*N*-isopropylacrylamide-*co*-2-hydroxyethyl methacrylate) (poly(NIPAAm-*co*-HEMA)) and poly(NIPAAm-*co*-DMAAm-*co*-HEMA) were synthesized by free radical solution copolymerization using thioglycol as chain transfer agent. Their compositions, molecular weights and thermal transitions were determined by ¹H-NMR, GPC analysis and lower critical solution temperature (LCST) determination. Poly(NIPAAm-*co*-DMAAm) showed markedly increase in LCST with incorporation of hydrophilic DMAAm, while the LCST of poly(NIPAAm-*co*-HEMA) moved to lower temperature in comparison with polyNIPAAm, although HEMA is also a hydrophilic comonomer. It was suggested that the formation of hydrogen bonds between the nitrogen atoms in NIPAAm and the hydroxyls in HEMA invoked the phenomenon. Accordingly, a series of poly(NIPAAm-*co*-DMAAm-*co*-HEMA) with LCST of *ca.* 40℃ were prepared in a similar way. These copolymers containing side hydroxyl groups had been used to initiate the ring opening polymerization of caprolactone (CL) and poly(NIPAAm-*co*-DMAAm-*co*-HEMA) grafted PCL copolymers were obtained. Preliminary studies showed that LCST of the grafted amphiphilic copolymers shifted to lower values with the introduction of hydrophobic PCL chains onto the hydrophilic backbone. Their thermal sensitivity decreased with the amount and length of side PCL chains being increased. Ideally, thermal sensitive micelles prepared from these amphiphilic copolymers would be good candidates for target or “smart” drug controlled delivery to treat diseases, such as solid tumor in combination with local hyperthermia therapy.

Keywords *N*-isopropylacrylamide copolymer, Temperature-sensitive, Lower critical solution temperature (LCST)