

温度敏感性 PNIPAM-*b*-PZLL-*b*-mPEG 三嵌段共聚物的 合成与自组装研究*

赵长稳^{1,2} 庄秀丽¹ 陈学思^{1**} 景遐斌¹

(¹ 中国科学院长春应用化学研究所 高分子物理与化学国家重点实验室 长春 130022) (² 中国科学院研究生院 北京 100039)

摘 要 通过大分子引发剂引发 ϵ -苄氧羰基-L-赖氨酸-*N*-羧酸酐(Lys-NCA)开环聚合和大分子缩合的方法合成了聚(*N*-异丙基丙烯酰胺)-*b*-聚(ϵ -苄氧羰基-L-赖氨酸)-*b*-聚乙二醇单甲醚三嵌段共聚物(PNIPAM-*b*-PZLL-*b*-mPEG). 用 GPC 和 ¹H-NMR 对其结构进行了表征. 用荧光探针法证明了该三嵌段聚合物形成胶束的性质并测定了临界胶束浓度(CMC). 动态光散射(DLS)研究表明,在固定 PNIPAM-*b*-PZLL 链段长度的情况下,mPEG 分子量为 2000 时,胶束在温度高于临界溶解温度(LCST)时发生聚集,mPEG 分子量为 5000 时,胶束在 LCST 以上没有发生聚集.

关键词 聚(*N*-异丙基丙烯酰胺), 聚(ϵ -苄氧羰基-L-赖氨酸), 聚乙二醇单甲醚, 温度敏感性, 胶束

智能型高分子自组装体系由于在生物医用材料领域具有良好的应用前景受到广泛的关注. 聚(*N*-异丙基丙烯酰胺)(PNIPAM)是研究最广泛的温敏性智能高分子,在水溶液中最低临界溶解温度为 32℃(LCST)左右,此时发生从溶液到沉淀的可逆相转变,使其共聚物能在水中实现可控的自组装^[1-3]. 含氨基酸嵌段和亲水的嵌段共聚物的胶束行为也是近年来的研究热点^[4-7],这是因为聚氨基酸与生物体具有良好的相容性,同时,由于聚肽中存在 α -螺旋、 β -折叠等次级结构,聚肽能自组装成高度精确有序且具有特殊生物功能的纳米材料. 聚乙二醇(PEG)作为水溶性高分子,具有无毒,无免疫反应的特点,另外,PEG 也能够起到最小化蛋白吸附和降低细胞的非特异性吸附的作用,是常用的生物医用材料^[8]. 本文以端氨基的 PNIPAM 引发苄氧羰基保护的赖氨酸内酯开环聚合,得到聚(*N*-异丙基丙烯酰胺)-*b*-聚(ϵ -苄氧羰基-L-赖氨酸)两嵌段共聚物(PNIPAM-PZLL). 然后再与端基羧化的聚乙二醇单甲醚缩合,得到聚(*N*-异丙基丙烯酰胺)-*b*-聚(ϵ -苄氧羰基-L-赖氨酸)-*b*-聚乙二醇单甲醚三嵌段共聚(PNIPAM-*b*-PZLL-*b*-mPEG). 并对该嵌段共聚物的自组装行为进行了表征.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

ϵ -苄氧羰基-L-赖氨酸-*N*-羧酸酐(Z-Lys-NCA)

参考文献[9]合成; 巯基乙胺盐酸盐(Aldrich 公司), 单甲氧基聚乙二醇(mPEG, $M_n = 2000, 5000$, Aldrich 公司); *N*-异丙基丙烯酰胺(NIPAM, Acros Organics 公司, 用前用正己烷重结晶 3 次); 4-二甲氨基吡啶(DMAP, Aldrich 公司), *N,N'*-二环己基碳二亚胺(DCC, 吉尔生化有限公司); 2,2'-偶氮二异丁腈(AIBN)和丁二酸酐(国药集团化学试剂有限公司); 四氢呋喃用 CaH_2 处理后再用金属钠回流干燥, 常压蒸馏收集. 三乙胺, 石油醚和三氯甲烷用 CaH_2 干燥处理, 常压蒸馏收集. *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)无水硫酸镁干燥后减压蒸馏收集.

¹H-NMR 用 Bruker AV300 核磁共振仪测量,以 CDCl_3 为溶剂. 分子量及分布在 35℃ 下用装有 Waters Styragel HT6E 柱子和折射检测器的 Waters 410 GPC 仪测量, 溶剂为 THF, 流速为 1.0 mL/min, 分子量是以 PS 为标准物. 在室温下, 用 Perkin-Elmer LS50B 荧光光谱仪测量荧光光谱, 激发光谱的检测波长 λ_{em} 设为 391 nm, 狭缝宽度为 5 nm. 胶束粒径分布用动态光散射(DLS)测定, 散射角为 90°, 恒温条件下, 垂直偏振氩-氦激光(DAWN EOS, Wyatt Technology).

1.2 两嵌段共聚物 PNIPAM-*b*-PZLL 的合成

氨基的温度敏感的聚(*N*-异丙基丙烯酰胺)均聚物(PNIPAM-NH₂)按文献[10]的方法合

* 2008-02-02 收稿, 2008-03-25 修稿. 国家自然科学基金(基金号 50573078)、杰出青年基金(基金号 50425309)、重点基金(基金号 50733003)和科技部国际合作重大项目(项目号 2007DFR5020)资助项目; ** 通讯联系人, E-mail: xschen@ciac.jl.cn

成,以 AIBN 为引发剂,巯基乙胺为链转移剂. PNIPAM-*b*-PZLL 的合成是将一定量的 PNIPAM-NH₂ 和 Z-Lys-NCA 共同溶于新蒸的 DMF 中,25℃ 氩气保护下反应 3 天后用乙醚沉出,并用氯仿/乙醚反复沉淀,真空干燥得到白色固体,产率为 82%.

1.3 PNIPAM-*b*-PZLL-*b*-mPEG 的合成

端羧基的聚乙二醇单甲醚合成方法参照文献 [11]. 三嵌段共聚物的合成是向干燥的安瓶中加入一定量的 PNIPAM-*b*-PZLL 两嵌段共聚物和摩尔数为其 1.2 倍的端羧基 mPEG,用氩气换气 3 次后加入新蒸的 DMF,溶解完全后加入与 mPEG 等摩尔的 DCC 和 DMAP,换气后,反应 3 天减压蒸去溶剂,氯仿/乙醚沉淀 3 次后室温真空干燥. 将得到的产物用 DMF 溶解后置于透析袋(截留分子量为 3500 或 5000)中,用二次水透析 48 h(每隔 6 h 换一次水),冷冻干燥后得 PNIPAM-*b*-PZLL-*b*-mPEG 三嵌段共聚物,产率 62%.

1.4 PNIPAM-*b*-PZLL-*b*-mPEG 三嵌段共聚物胶束溶液的制备和 CMC 的测定

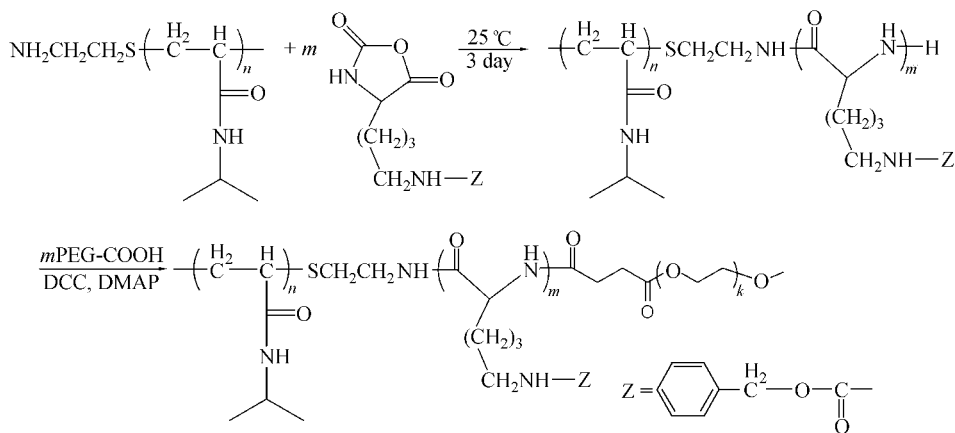
先将 10 mg 的三嵌段共聚物溶于 10 mL 的 THF 溶液中,分 3 次在搅拌下向上述溶液中慢慢

滴加 15 mL 蒸馏水,然后在 25℃ 下用旋转蒸发仪除掉 THF,定容至 50 mL. 临界胶束浓度(CMC)以芘为探针用荧光仪测定. 0.1 mg/L 芘的丙酮溶液加入一系列容量瓶中,使得各个容量瓶中芘在定容后的最终浓度为 6.0×10^{-7} mol/L(这是芘 22℃ 时在水溶液的溶解度),真空干燥完全除去容量瓶中的丙酮. 然后加入聚合物的胶束溶液,并用二次水定容得到聚合物浓度从 8×10^{-4} 到 0.4 mg/mL 一系列胶束溶液,测其荧光谱图,从而得到 CMC 数值.

2 结果与讨论

2.1 PNIPAM-*b*-PZLL-*b*-mPEG 三嵌段共聚物的合成路线

通过自由基聚合得到了端氨基的聚(*N*-异丙基丙烯酰胺),得到的 PNIPAM-NH₂ 的分子量通过 ¹H-NMR 计算得出为 1800^[10],再以它为大分子引发剂引发 Z-Lys-NCA 开环聚合,得到了端氨基的两嵌段共聚物 PNIPAM-*b*-PZLL. 再将其与端羧基活化的聚乙二醇反应,即得到 PNIPAM-*b*-PZLL-*b*-mPEG 三嵌段共聚物,反应过程如示意图 1 所示.



Scheme 1 Synthesis route of triblock copolymer PNIPAM-*b*-PZLL-*b*-mPEG

在最初的文献中,通常把 PNIPAM 端氨基所带的盐酸盐用氢氧化钠中和掉^[12],但是 Schlaad 等^[13]发现带盐酸盐的氨基在引发 NCA 开环聚合时能够抑制副反应的发生,因此本文并没有对 PNIPAM 的端氨基的盐酸盐进行中和,结果表明它仍然能很好的引发 NCA 的聚合. 聚赖氨酸的链段长度可以通过调节氨基与 NCA 的比例得到控制. 大分子之间的缩合反应较小分子要难以发生,但是在分子量都不是较大的情况下也可以得到很

好的结果^[14,15]. 本文中的嵌段共聚物的分子量都在一万以下,因此缩合反应能够顺利地进行. 嵌段共聚物的分子量和分布及其组成见表 1 和图 1.

2.2 嵌段共聚物的结构表征

图 2 是 PNIPAM-*b*-PZLL 和 PNIPAM-*b*-PZLL-*b*-mPEG 的核磁谱图. $\delta = 1.16$ 处的峰为聚异丙基丙烯酰胺的 $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 的甲基质子的化学位移, 3.12 处是 PZLL 段中与 ϵ -酰胺基相连的亚甲基质子的化学位移, 5.00 和 7.24 左右是苄氧羰基的亚

甲基和苯环质子的化学位移.在谱线 B 中 3.66 左右的峰是 mPEG 主链上—OCH₂CH₂—的亚甲基质子的化学位移,3.11 处是端基—OCH₃ 质子的化学

位移.通过谱线 B 中 $\delta = 5.00$ 和 1.16 处的吸收峰面积与 3.11 处的吸收峰面积的比值确定嵌段共聚物的组成比,结果见表 1,与 GPC 的结果基本一致.

Table 1 Molecular weight and distribution of PNIPAM-PZLL-mPEG

Sample	$M_{n,th}$ of PNZL	$M_{n,exp}^a$ of PNZL	M_n^a of PNZLG	M_n^b of PNZLG	M_w/M_n^b	cmc (g/L)
P1-PEG2K	3.8×10^3	3.6×10^3	5.5×10^3	7.2×10^3	1.12	5.62×10^{-3}
P2-PEG2K	5.4×10^3	5.4×10^3	7.5×10^3	8.8×10^3	1.11	2.66×10^{-3}
P1-PEG5K	3.8×10^3	3.6×10^3	8.9×10^3	9.8×10^3	1.20	7.33×10^{-3}

PNZL = PNIPAM-*b*-PZLL, PNZLG = PNIPAM-*b*-PZLL-*b*-mPEG ;^a Calculated by NMR in CDCl₃ ;^b Determined by GPC in THF

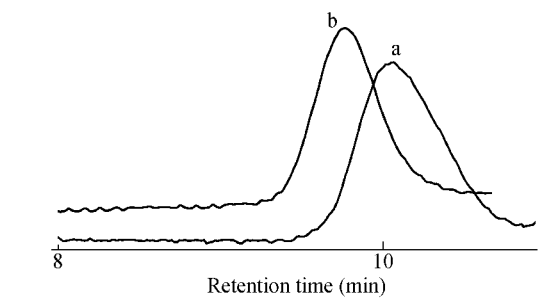


Fig. 1 GPC trace for PNIPAM-*b*-PZLL (A,P2) and PNIPAM-*b*-PZLL-*b*-mPEG (B,P2-PEG2K) in THF

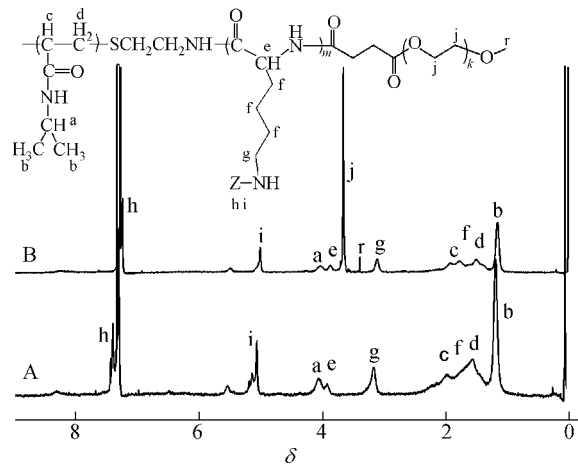


Fig. 2 ¹H-NMR spectra of PNIPAM-PZLL (A, P2) and mPEG-*b*-PZLL-*b*-PNIPAM (B, P2-PEG2K)

2.3 嵌段共聚物的胶束化研究

双亲性嵌段共聚物能在合适的条件下自组装形成胶束.最近含氨基酸的共聚物胶束受到了越来越多的关注,这包括聚赖氨酸、聚天冬氨酸和聚(γ-苄基-谷氨酸).本文以中间段为憎水段的聚(ε-苄氧羰基-L-赖氨酸),两端为亲水段的 PEG 和温度敏感性的 PNIPAM 在水溶液中自组装形成胶束.共聚物的胶束首先用芘作探针荧光技术表征,在 PNIPAM-*b*-PZLL-*b*-mPEG 的各个浓度下芘的激发图谱见图 3,随着聚合物浓度的提高,可观察到

从 333 nm 到 335 nm 的红移,这是由于芘分子优先进入胶束的憎水核内,从而改变了它的光物理性质,证实了聚合物在水溶液中形成了胶束.胶束的产生和 CMC 也可以通过荧光的发射光谱研究得到.对聚合物 PNIPAM-*b*-PZLL-*b*-mPEG,333 nm 和 338 nm 选为芘分别完全存在水中和完全在胶束憎水核中的荧光激发的峰值.图 4 是荧光在 338 nm 和 333 nm 强度的比值对嵌段共聚物浓度的对数值作图,在浓度低于某个值时,荧光强度的比值为常数.超过这一值后,荧光强度随着浓度的对数值增大而增大并最终达到一个平台.在图中,可以通过荧光强度的基线和迅速增加的曲线做切线相交得到临界胶束浓度为 5.62×10^{-3} mg/mL.通过 3 个共聚物的 CMC 数值可以看出,当聚乙二醇段相同时,聚(ε-苄氧羰基-L-赖氨酸)段越长,聚合物的疏水性越强,CMC 越小.当聚(ε-苄氧羰基-L-赖氨酸)相同时,聚乙二醇段的长度越长,聚合物的亲水性越强,CMC 越大.

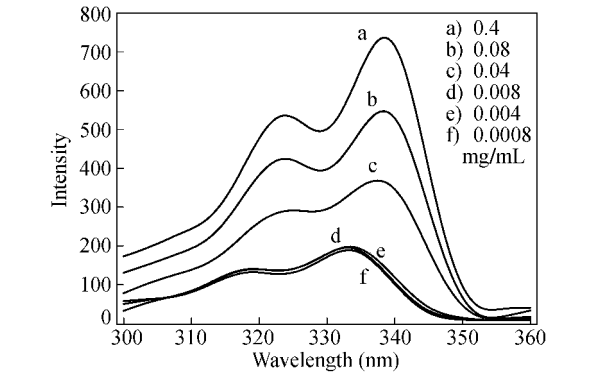


Fig. 3 Fluorescence excitation spectra of pyrene in aqueous P1-PEG2K solution

PNIPAM 是一种典型的温度敏感型高分子,在 LCST 以下聚合物具有良好的亲水性,能以单分子无规线团的形式存在于水中,当温度高于 LCST 时,因 PNIPAM 与水分子间的氢键被破坏,

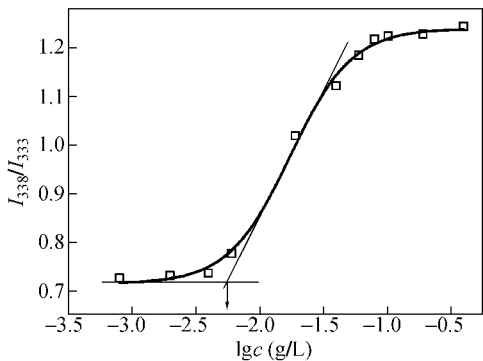


图 4 Plot of I_{338}/I_{333} versus $\lg c$ for P1-PEG2K in deionized water

从水中沉淀出来. 这一特性使它可以发生可逆的亲水-疏水转变, 从而在智能自组装体系中应用广泛. 图5是在 25 ℃ 和 45 ℃ 下 P1-PEG 2 K 和 P1-

PEG5K 浓度都为 0.08 mg/mL 时 DLS 测得胶束粒径和分布图. 从图 5 (a_1) 和 (a_2) 可以看出, 当共聚物中的 PEG 分子量为 2000 时, 在 25 ℃ 时胶束的疏水段为 PZLL, 平均粒径为 46 nm. 当温度升至 45 ℃ 时, PNIPAM 段发生由无规线团到卷曲球的转变^[16], 表现为疏水性, 此时 PEG 的含量还不足以阻止胶束之间的疏水作用, 胶束之间发生聚集, 粒径分布变宽. 这在以前的文献中也有报道^[11]. 当共聚物中的 PEG 分子量为 5000 时(图 5 b_1 和 b_2), 胶束在 25 ℃ 时的平均粒径为 99 nm, 随着温度的升高, PNIPAM 段疏水性增强, 平均粒径变为 71 nm. 是由于胶束的亲水性足以阻止胶束之间的疏水作用, 胶束并没有发生聚集, 此时粒径减小, 具体原因正在研究中, 将另文发表.

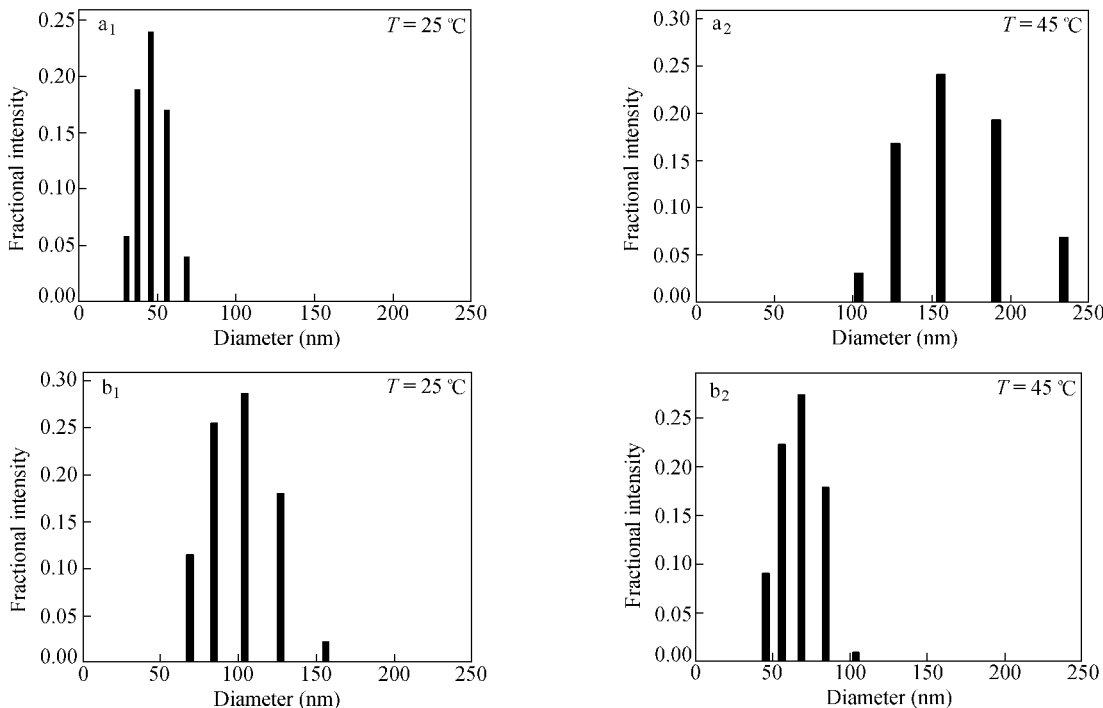


Fig. 5 Size distribution of P1-PEG2K (a_1 , a_2) and P1-PEG5K (b_1 , b_2) micelles

3 结论

通过大分子引发剂引发 NCA 开环聚合和大分子缩合的方法合成了聚(*N*-异丙基丙烯酰胺)-*b*-聚(ϵ -苄氧羰基-L-赖氨酸)-*b*-聚乙二醇单甲醚三嵌段共聚物(PNIPAM-*b*-PZLL-*b*-mPEG). GPC 结果表明, 嵌段共聚物分子量可控且分布较窄, 由 $^1\text{H-NMR}$ 确定了聚合物的结构. 通过荧光探针法

得到了聚合物的 CMC. 结果表明在其他两段相同的情况下, 聚赖氨酸段越长, CMC 越小; 聚乙二醇段越长 CMC 越大. 并且 DLS 结果表明在 PEG 的分子量为 2000 时, 升高温度会发生胶束之间的聚集. 但是当 PEG 的链段长度足够长时, 即使温度高于 PNIPAM 的 LCST, 胶束之间也不会发生聚集.

REFERENCES

- Schilli C M, Zhang M F, Rizzardo E, Thang S H, Chong Y K, Edwards K, Karlsson G, Muller A H E. *Macromolecules*, 2004, 37(21) : 7861 ~ 7866
- Zhang Youwei(张幼维), Jiang Ming(江明), Zhao Jiongxin(赵炯新), Wang Jiaye(汪佳烨). *Acta Polymerica Sinica(高分子学报)*, 2007, (2) : 136 ~ 143
- He C L, Zhao C W, Chen X S, Guo Z J, Zhuang X L, Jing X B. *Macromolecular Rapid Communications*, 2008, 29 : 490 ~ 497
- Sun J, Deng C, Chen X S, Yu H J, Tian H Y, Sun J R, Jing X B. *Biomacromolecules*, 2007, 8(3) : 1013 ~ 1017
- Lubbert A, Castelletto V, Hamley I W, Nuhn H, Scholl M, Bourdillon L, Wandrey C, Klok H A. *Langmuir*, 2005, 21(14) : 6582 ~ 6589
- Cho J Y, Sohn Y S, Gutowska A, Jeong B. *Macromolecular Rapid Communications*, 2004, 25(9) : 964 ~ 967
- Rao J Y, Luo Z F, Ge Z S, Liu H, Liu S Y. *Biomacromolecules*, 2007, 8(12) : 3871 ~ 3878
- Gref R, Minamitake Y, Peracchia M T, Trubetskoy V, Torchilin V, Langer R. *Science*, 1994, 263(5153) : 1600 ~ 1603
- Daly W H, Poche D. *Tetrahedron Lett*, 1988, 29(46) : 5859 ~ 5862
- Zhang R S. *Polymer*, 2005, 46(8) : 2443 ~ 2451
- Zalipsky S, Gilon C, Zilkha A. *Eur Polym J*, 1983, 19(12) : 1177 ~ 1183
- Cheon J B, Jeong Y I, Cho C S. *Polymer*, 1999, 40(8) : 2041 ~ 2050
- Dimitrov I, Schlaad H. *Chemical Communications*, 2003, 2944 ~ 2945
- Konak C, Oupicky D, Chytrý V, Ulbrich K, Helmstedt M. *Macromolecules*, 2000, 33(15) : 5318 ~ 5320
- Maglio G, Nese G, Nuzzo M, Palumbo R. *Macromol Rapid Commun*, 2004, 25(12) : 1139 ~ 1144
- Tu Y F, Wan X H, Zhang D, Zhou Q F, Wu C. *J Am Chem Soc*, 2000, 122 : 10201 ~ 10205

SYNTHESIS AND SELF-ASSEMBLY OF POLY(*N*-ISOPROPYLACRYLAMIDE)-*b*-POLY(ϵ -BENZYLOXYCARBONYL-L-LYSINE)-*b*-POLY(ETHYLENE GLYCOL)

ZHAO Changwen^{1,2}, ZHUANG Xiuli¹, CHEN Xuesi¹, JING Xiabin¹

(¹ State Key Laboratory of Polymer Chemistry and Physics, Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022)

(² Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039)

Abstract A novel amphiphilic and thermosensitive triblock copolymer of poly(*N*-isopropylacrylamide)-*b*-poly(3-benzyloxycarbonyl-L-lysine)-*b*-poly(ethylene glycol) (PNIPAM-*b*-PZLL-*b*-mPEG) with designed molecular weight and narrow molecular weight distribution was prepared. Synthetic procedure included the following steps. (1) Amino-terminated PNIPAM was synthesized *via* the free radical polymerization of NIPAM in methanol using 2,2'-azobisisobutyronitrile (AIBN) and 2-aminoethanethiol hydrochloride (AET·HCl) as the initiator and chain transfer agent, respectively. Its molecular weight was calculated by the ¹H-NMR spectra in D₂O. (2) The block copolymers, PNIPAM-*b*-PZLL were synthesized by the ring-opening polymerization (ROP) of 3-benzyloxycarbonyl-L-lysine *N*-carboxyanhydride (Z-Lys-NCA) with PNIPAM-NH₂ as a macroinitiator. Their structure was confirmed by the ¹H-NMR spectra. The molecular weight and molecular weight distribution of PNIPAM-*b*-PZLL were characterized by GPC analysis in THF. The relatively narrow polydispersity of the obtained PNIPAM-*b*-PZLL could be explained by the living character of the ROP of NCAs initiated by primary amine hydrochlorides which avoided the side reaction called "active monomer" mechanism. Generally, the molecular weights could be controlled by the feed molar ratios of monomer to macroinitiator. (3) For preparing the triblock polymers, PNIPAM-*b*-PZLL-*b*-mPEG, it was necessary to convert the terminal hydroxyl group of mPEG of different molecular weight (2000 or 5000) into carboxyl group by succinic anhydride. Its ¹H-NMR spectra showed this was a high efficiency reaction. Then the triblock copolymers were obtained by the condensation reaction between carboxyl-capped mPEG and amino-capped PNIPAM-*b*-PZLL in the presence of dicyclohexylcarbodiimide (DCC) and 4-dimethylaminopyridine (DMAP). The ¹H-NMR confirmed their structure. Based on the integration ratio, their relative amount in the copolymer was calculated. And their *M_n* (NMR) agreed well with the theoretical number-average molecular weight. GPC analysis in THF revealed a

monomodal and symmetric peak which showed the successful synthesis of target copolymers. All the molecular weight distributions ($M_w/M_n = 1.11 \sim 1.20$) were relatively narrow. The triblock copolymer could self-assemble into micelles in aqueous solution with hydrophobic PZLL as the core and hydrophilic PNIPAM and mPEG as the corona. Its critical micelle concentration (CMC) was measured by a fluorescence spectra technique using pyrene as a probe. The CMC decreased with the increase of PZLL content and increased with the increase of PEG content. Dynamic light scattering (DLS) analyses of triblock copolymer micelles revealed their size of less than 100 nm and narrow size distribution. It is well-known that PNIPAM homopolymer dissolved in cold and dilute aqueous solution but gets insoluble at *ca.* 32°C due to its lower critical solution temperature (LCST) phase behavior. When the temperature was above the LCST, the PNIPAM undergoes a reversible phase transition caused by the coil-to-globule transition and becomes more hydrophobic. So changing temperature will influence the stability of micelles. As anticipated, the micelles aggregated at temperatures above LCST when the M_n of mPEG was 2000. That is probably that the mPEG2000 could not prevent the intermicellar hydrophobic interaction. However, no obvious aggregation of micelles was found at temperatures above LCST when the M_n of mPEG was 5000 because the hydrophobic interaction between the micelles was prevented by mPEG5000 effectively.

Keywords Poly(*N*-isopropylacrylamide), Poly(3-benzyloxycarbonyl-L-lysine), mPEG, Temperature sensitivity, Micelle, Self-assembly