

预聚-酶催化缩聚法合成超支化聚酯及其结构表征

林智健¹, 李光吉¹, 龙俊元¹, 宗敏华²¹ 华南理工大学材料科学与工程学院, 广东广州 510640² 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640

摘要: 以丙三醇、1,6-己二醇和己二酸为共聚单体,以固定化脂肪酶Novozym 435为催化剂,尝试先进行共聚单体的预聚后在有机介质中进行酶催化直接缩聚反应合成脂肪族超支化聚酯的新途径,考察了反应介质和反应温度对酶催化缩聚反应的影响,并采用凝胶渗透色谱和核磁共振确定产物的分子量和结构.结果表明,将单体的预聚与酶催化缩聚反应相结合,可在温和的反应条件下合成超支化脂肪族聚酯;在所考察的有机介质中以甲苯的效果最佳,且在70℃时脂肪酶Novozym 435催化活性最高,所得产物的支化度为0.27,重均分子量为 1.31×10^4 .

关键词: 预聚合; 酶催化缩聚; 超支化聚酯; 支化度; 脂肪酶

中图分类号: O643

文献标识码: A

Synthesis of Hyperbranched Polyester by Combination of Prepolymerization with Enzymatic Condensation Polymerization and Its Characterization

LIN Zhijian¹, LI Guangji^{1,*}, LONG Junyuan¹, ZONG Minhua²¹College of Materials Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, Guangdong, China²College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, Guangdong, China

Abstract: A new route for hyperbranched aliphatic polyester by the prepolymerization of comonomers followed by the enzymatic condensation polymerization in organic media was developed using glycerol, 1,6-hexanediol, and adipic acid as comonomers and using immobilized lipase Novozym 435 as a biocatalyst. The organic solvents, such as isooctane, toluene, *tert*-butanol, tetrahydrofuran, and acetone, were used as the reaction medium for enzymatic condensation polymerization. The effects of reaction medium and reaction temperature on the enzymatic condensation polymerization were investigated. The molecular mass and the structure of the prepared polyesters were characterized by gel permeation chromatography and NMR. The results indicated that the hyperbranched aliphatic polyester could be successfully synthesized under the mild conditions by the combination of prepolymerization of comonomers with enzymatic condensation polymerization in organic media. Toluene was the best reaction medium among the examined ones, and the lipase Novozym 435 exhibited the highest activity at 70 °C within the temperature range from 50 to 90 °C. The polyester prepared by prepolymerization and the enzymatic condensation polymerization in toluene at 70 °C possessed the maximal molecular mass of up to 1.31×10^4 and the branching degree of about 0.27.

Key words: prepolymerization; enzymatic condensation polymerization; hyperbranched polyester; branching degree; lipase

超支化高分子具有球形或近似球形的紧凑分子结构,支化点较多,流体力学回转半径小,分子链缠结少,相对分子质量的增加对体系粘度的影响较小;其端基官能团较多,可通过分子修饰调控其物化性质,故在聚合物共混、涂料、薄膜、高分子液晶和药物控制释放体系等领域显示出诱人的应用前景.

超支化高分子的合成目前主要采用传统的化学

方法,存在着诸多不足:(1)所使用的催化剂毒性较大,如4-二甲氨基吡啶对甲苯磺酸盐(DPTS)、亚磷酸三苯酯;(2)需要对 AB_m 或 B_n 单体进行活化;(3)反应需在150℃以上进行;(4)凝胶化难以控制^[1].因此,探索温和条件下超支化高分子的绿色合成方法成为该领域的热点课题.

酶催化聚合法具有反应条件温和、高效、环境

收稿日期: 2010-06-28. 接收日期: 2010-09-27.

联系人: 李光吉. Tel/Fax: (020)87113949; E-mail: gjli@scut.edu.cn

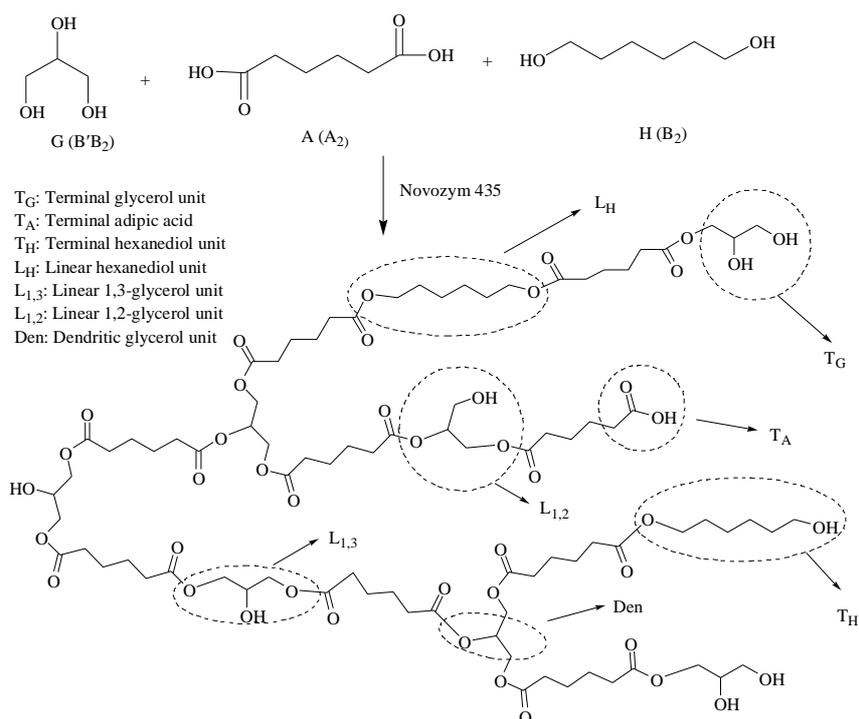
友好和工艺简单等优点, 可望解决上述传统的化学合成法存在的问题^[2,3]. Skaria 等^[4]以 ϵ -己内酯和 2,2-二羟甲基丁酸为单体, 以脂肪酶 Novozym 435 为催化剂, 在甲苯/二氧六环混合溶剂中于 85 °C 首次合成了 M_n 为 6 600, 支化度可达 0.33 的超支化聚酯. Kulshrestha 等^[5,6]以 Novozym 435 为催化剂, 在无溶剂体系中催化多元醇、二元醇和二元酸缩聚反应合成了重均分子量达 10^4 数量级, 且支化度较高的超支化聚酯.

然而, 由于无溶剂体系的粘度可能随反应的进行而增大, 导致传质、传热效率下降, 使得合成反应难以进行; 同时, 为了降低体系粘度, 须提高反应温度, 可能导致酶发生不可逆失活, 不能回收再利用. 有机溶剂体系可很好地解决传质、传热问题, 有利于提高酶的稳定性, 保持与发挥酶的催化活力. 酶催化聚合合法合成线型聚合物的研究表明, 有机溶剂中的酶催化聚合反应体系比相应的无溶剂体系更加有效^[7,8]. 在尝试酶催化聚合法制备超支化聚合物时, 使用无溶剂体系或有机溶剂体系都会遇到一些困难. 首先, 能够形成超支化聚合物的单体均含有 2 个或 2 个以上官能团, 极性较强, 其中一些在常温下呈固态. 这使得在适宜的酶催化反应温度下, 单体不能

形成液态, 导致反应体系中各组分的传质和相互作用大受影响. 因此在这种情况下, 将单体溶于有机溶剂形成溶液则是一个较好的选择. 其次, 所采用的多官能度单体往往只溶于强极性的有机溶剂, 而酶在强极性有机溶剂中的活力会大大下降, 甚至失活^[4]. 因此, 在酶催化含极性的多官能度单体的聚合反应中, 如何调节反应体系的组成和特性, 或改变酶的微环境, 使其更加有利于预期反应的发生是酶催化合成超支化共聚物研究中面临的一个非常重要的问题.

本文以脂肪酶 Novozym 435 为催化剂, 丙三醇 ($B'B_2$ 型单体)、1,6-己二酸 (B_2 型单体) 和 1,6-己二醇 (A_2 型单体) 为共聚单体, 针对上述问题, 首先在相对较高的温度下使共聚单体进行预聚合, 使得底物极性大大降低, 从而增强了它在有机介质中的溶解性; 然后, 在适宜的有机介质中进行酶催化直接缩聚反应, 以期探索一种温和高效的超支化高分子的合成方法.

超支化聚酯的合成路线示于图式 1, $B'B_2$ 型单体丙三醇 (G)、 B_2 型单体 1,6-己二醇 (H) 和 A_2 型单体己二酸 (A) 在酶催化下直接缩聚生成超支化聚酯. 显然, 要形成超支化的高分子, 应尽量使单体 G 的



图式 1 超支化聚酯的合成路线

Scheme 1. Synthetic route for hyperbranched polyesters.

三个官能团均发生反应,生成尽可能多的 Den 型和 T 型 (T_G , T_A 和 T_H) 结构单元。

1 实验部分

1.1 预聚-酶催化缩聚法合成超支化聚酯

将脂肪酶 Novozym 435 (比活约 10 000 PLU/g, *Candida antarctica*, Novozymes 公司) 置于放有 P_2O_5 的真空干燥器内,在 65 Pa 真空下于室温干燥 24 h 后使用。

在 50 ml 圆底烧瓶中加入丙三醇 0.92 g (10 mmol)、己二酸 2.92 g (20 mmol) 和 1,6-己二醇 1.18 g (10 mmol, AR, 国药集团化学试剂有限公司),密封瓶口后放入油浴中,加热至 120 °C,在搅拌速率为 180 r/min 的磁力搅拌下预聚 3 h 后终止反应。

完成预聚后,将温度降至设定的酶催化反应温度,使用循环水式真空泵真空除水约 30 min; 然后分别加入 10.0 ml 有机溶剂、0.5 g (单体总量的 10%) 经预处理的 Novozym 435 和 5.0 g 的 4A 分子筛(天津市科密欧化学试剂开发中心),密封瓶口; 在恒定的搅拌速率和温度下反应 45 h。加入氯仿(AR, 广州市东红化工厂)终止反应,用 3G 砂芯漏斗减压过滤以除去固定化脂肪酶和分子筛,再经减压蒸馏除去溶剂后即得到粗产物。

将粗产物溶于适量氯仿中,再加入 10 倍量的正己烷(AR, 广州市东红化工厂),搅拌均匀,于 -18 °C 下静置 24 h,将沉淀产物放在真空烘箱中于 60 °C 真空干燥 24 h,以除去萃取剂氯仿和正己烷,从而得到纯化产物,可用于测试及表征。

分别以异辛烷、甲苯、叔丁醇、四氢呋喃和丙酮(AR, 广州市东红化工厂)为酶催化反应的有机介质,于 60 °C 进行酶催化缩聚反应以确定较适宜的有机介质,在此基础上再评价温度对该反应的影响。

1.2 产物的表征

缩聚反应产物的结构通过 1H NMR 和反门控 ^{13}C NMR 谱表征,谱图在 Bruker 公司 AVANCE Digital 400 MHz 核磁共振谱仪上测得,溶剂为 CD_3Cl 。

产物的相对分子量采用凝胶渗透色谱法(GPC)测定。GPC 系统主要组成为 Waters 2410 折光率检测器、Waters 515 高效液相色谱泵和 Waters bus SAT/IN 处理模块。仪器通过线性聚苯乙烯标样进行

标定,THF 为流动相(1.0 ml/min)。

超支化聚合物支化的程度可用支化度(DB)表示,其计算公式如下^[9]:

$$DB = (\sum D + \sum T) / (\sum D + \sum T + \sum L) \quad (1)$$

其中, $\sum D$ 为树枝状结构单元 Den 的数目或相对含量; $\sum T$ 是端基结构单元 (T_G , T_A 和 T_H) 的数目或相对含量; $\sum L$ 是线性结构单元 $L_{1,2}$, $L_{1,3}$ 和 L_H 的数目或相对含量。各结构单元的数目或相对含量可通过 ^{13}C NMR 去除原子核的 Overhauser 效应分析的吸收峰面积而获得。

2 结果与讨论

2.1 产物分子的结构

2.1.1 NMR 谱结果

图 1 为聚合产物的 1H NMR 谱。由图可见,产物分子各质子 H 所对应的谱峰为: 丙三醇单元 $-CH_2O(C=O)-$ 上的质子 g 表现为 $\delta = 4.07 \sim 4.25$ 区域的宽峰; $L_{1,2}$ 结构的线性丙三醇单元 $-CH-O(C=O)-$ 上的质子 h' 表现为 $\delta = 5.18$ 处的单峰; T_G 结构的丙三醇端基单元 $-CH_2-OH$ 上的质子 g' 对应于 $\delta = 3.53 \sim 3.86$ 处有复杂多重峰; $L_{1,3}$ 结构的线性 $-CH-OH$ 的质子 h 对应于 $\delta = 5.03$ 处的宽峰^[5,10];

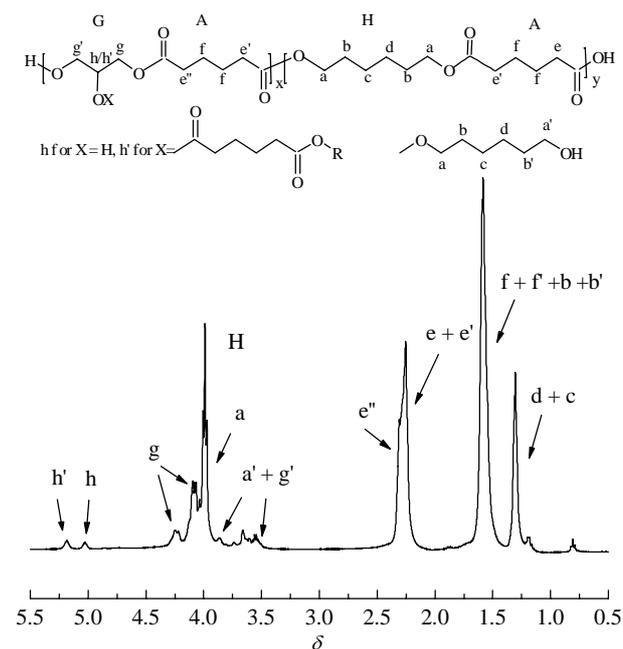


图 1 预聚-酶催化缩聚法合成的聚酯产物的 1H NMR 谱
Fig. 1. 1H NMR spectrum of polyester product synthesized by combination of prepolymerization with enzymatic condensation polymerization.

T_H 结构的己二醇端基 $-\text{CH}_2-\text{OH}$ 上的质子 a' 对应于 $\delta = 3.86$ 处的宽峰^[5].

然而, 要鉴定所合成的聚酯产物是否具有超支化结构以及支化的程度, 还要借助于该产物的 ^{13}C NMR 谱, 结果如图 2 所示. 由图 2(a) 可见, 在 $\delta = 172\sim 173.5$ 间出现 3 个峰, 分别归属于三种不同酯基结构的羰基碳原子的峰: $\delta = 172.3$ 处峰归属于己二酸与 1,6-己二醇酯化后生成的羰基碳原子^[11]; 在 $\delta = 172.7$ 处峰为丙三醇的仲羟基发生酯化反应后生成的羰基碳原子^[10]; 而 $\delta = 173.3$ 处峰对应于丙三醇单元中伯羟基酯化后生成的羰基碳原子^[10]. 在 $\delta = 175\sim 177$ 间没有出现己二酸端基单元 T_A 上羰基碳原子的共振峰. 这可能是由于样品中羧基基本反应完全, 末端基主要为羟基的缘故.

丙三醇缩合反应而生成的各产物的特征碳原子的共振峰在 $60.0\sim 74.0$ ^[10]. 因此, 图 2(b) 给出了产物的 ^{13}C NMR 谱中在该范围的放大图谱^[5].

从数学角度上, 丙三醇可能会发生 5 种缩合反应; 而由图式 1 可知, 它只会发生其中的 4 种缩合反应, 分别产生 T_G , $L_{1,2}$, $L_{1,3}$ 和 Den 四种结构. 这是因为丙三醇上伯羟基活性比仲羟基的强, 且酶催化酯化反应对伯羟基的选择性也要强一些, 故不会出现丙三醇 2 位单取代的 T_G 结构. 图 2(b) 中丙三醇缩合产物各碳原子归属为: $\delta = 70.0$ 处峰为丙三醇端基单元 T_G 上连接仲羟基的碳原子 A; 72.1 和 67.8 处的峰分别为线性单元结构 $L_{1,2}$ 和 $L_{1,3}$ 的碳原子 B 和 C^[5,10]; 而 $\delta = 68.9$ 处峰则是树枝状丙三醇单元结构 Den 上碳原子 D. 另外, 在 $\delta = 62.5$ 处峰

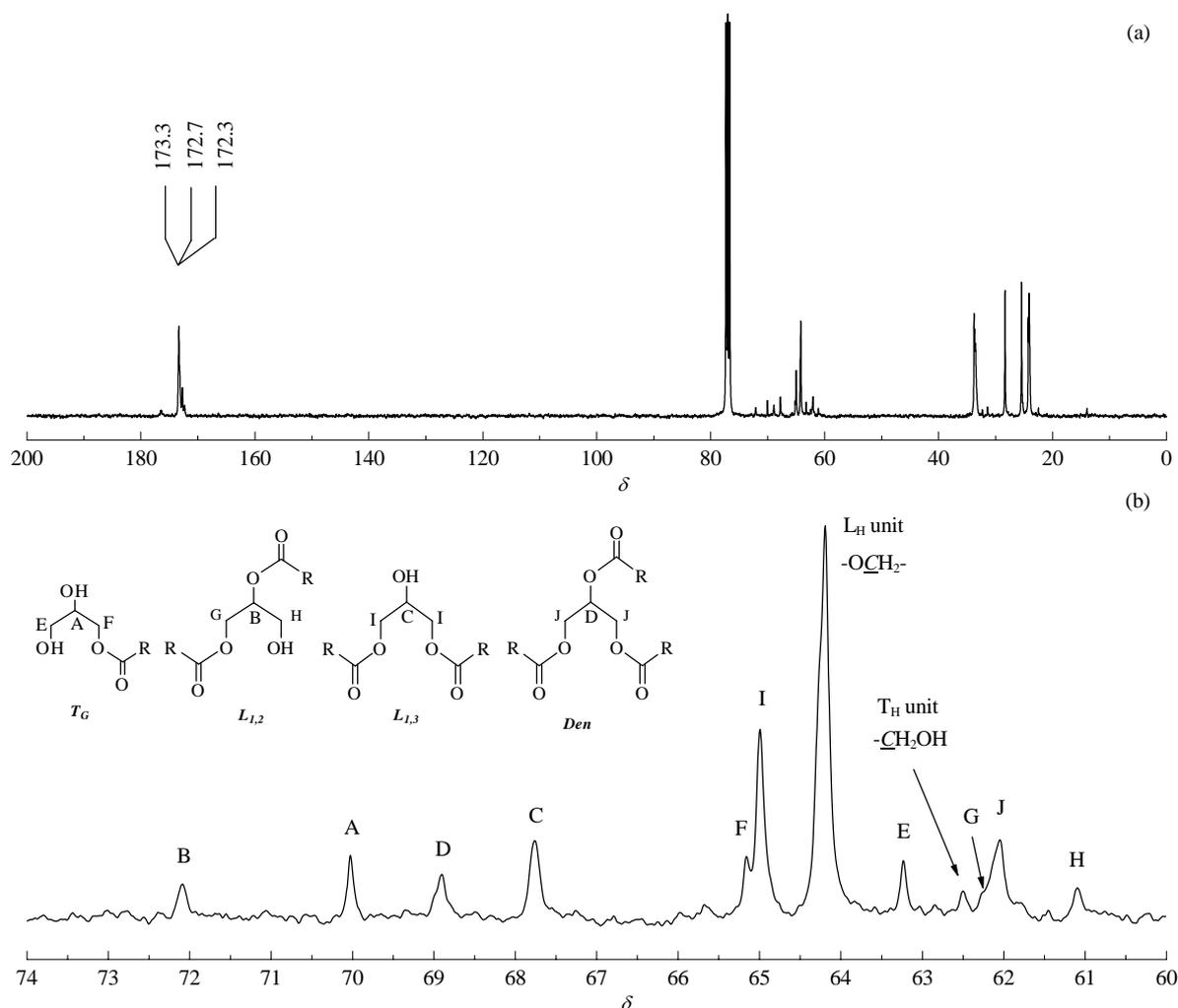


图 2 预聚-酶催化缩聚法合成的聚酯产物的 ^{13}C NMR 谱与局部放大谱图

Fig. 2. Inverse gated ^{13}C NMR spectrum (a) and its locally scaled-up ($\delta = 60.0\sim 74.0$) of the polyester product synthesized by combination of pre-polymerization with enzymatic condensation polymerization.

为已二醇端基单元结构 T_H 上末端碳原子; $\delta = 64.2$ 处峰是己二醇线性单元结构 L_H 上与己二酸反应相连碳原子; $\delta = 63.2, 65.2, 62.2, 61.1, 65.0$ 和 61.8 处峰则分别归属于产物大分子中丙三醇的四种不同结构上碳原子 E, F, G, H, I 和 J^[5]. 综上所述, 不同位置取代的丙三醇结构单元只出现 4 种, 且峰面积的比较结果也表明 $L_{1,2}$ 结构在聚合物中的含量比 $L_{1,3}$ 结构要少得多. 这也说明丙三醇伯羟基活性比仲羟基高. 以上分析证明聚酯产物中生成了树枝状结构.

2.1.2 产物的支化度

单元 Den, T_G , T_A , T_H , $L_{1,2}$, $L_{1,3}$ 和 L_H 的相对含量可由其反门控 ^{13}C NMR 的谱峰面积获得. 表 1 列出了各结构单元谱峰面积, 再根据公式 (1) 算得产物的支化度 DB 为 0.27. 这表明本文已成功地制得超支化脂肪族聚酯.

表 1 聚酯产物的反门控 ^{13}C NMR 谱中各结构单元所对应的谱峰的化学位移及其相对积分

Table 1 The chemical shift and the relative integral value of the corresponding signal ascribed to each structural unit from the inverse gated ^{13}C NMR spectrum of the polyester product

Structural unit	Chemical shift	Relative integrity
Den	68.9	1.347
T_G	70.0	1.256
T_A	—	0
T_H	62.5	0.685
$L_{1,2}$	72.1	1.000
$L_{1,3}$	67.8	2.361
L_H	64.2	5.675

2.2 有机介质的影响

分别以异辛烷、甲苯、叔丁醇、四氢呋喃和丙酮为酶催化聚合反应的介质, 采用预聚-酶催化法进行丙三醇、己二酸和 1,6-己二醇三元反应体系的直接缩聚反应, 结果列于表 2.

研究表明^[7,12], 低极性的甲苯和异辛烷是较佳

的酶催化聚合反应介质. 然而, 本文所用的 3 种共聚单体在甲苯与异辛烷中不溶, 且己二酸的熔点为 $153\text{ }^\circ\text{C}$, 因而该体系在适宜的酶催化反应温度下不会形成液态. 为了尽可能地避免使用可能导致酶失活的极性共溶剂, 本文首先在较高温度下让共聚单体在己二酸的自催化作用下发生预聚合, 转化为极性较低的低聚物, 而后者呈粘稠液态. 另外, 极少量未反应的单体可溶于低聚物中. 然后在相对较低的适宜温度下于有机介质中进行酶催化缩聚反应. 可见, 预聚合不仅改善了反应底物在低极性有机介质中的溶解性, 也降低了反应体系的酸性, 有利于酶发挥催化作用, 且酶不易失活, 为酶的循环使用提供了可能^[12].

由表可见, 以甲苯为反应介质时, 聚合产物的分子量最高 (达 11.20×10^3); 其次, 是异辛烷 (为 8.25×10^3); 而以叔丁醇、四氢呋喃或丙酮为反应介质时, 产物分子量都较低. 此外, 分子量高的产物, 其分子量分布 PDI 值也较高. 这也是超支化高分子的典型特征.

表 2 还列出了所用有机溶剂的溶解度参数 δ , 疏水性参数 $\log P$, 偶极距 μ 和介电常数 ϵ . $\log P$ 越大, 溶剂的疏水性越强. 可以看出, 这 5 种溶剂的 $\log P$ 在 $-0.23 \sim 4.5$ 间, 当 $\log P \geq 2.5$ 时, 聚合产物的分子量较高; 当 $\log P < 1.0$ 时, 聚合产物的分子量较低. 这表明产物的分子量与 $\log P$ 有关, 而与 δ 的关系不太明显. 在 μ 和 ϵ 较大的有机介质中, 聚合产物的分子量较低; 反之亦然. 这是因为疏水性强的有机介质容易夺取酶分子表面维持酶催化活力的水分子, 导致酶失活. 另外, 极性较强的溶剂会与酶蛋白发生相互作用, 使酶分子构象改变, 不利于酶的活性中心与底物之间结合^[13]. 在不同有机介质中 No-vozym 435 催化葡甘聚糖的转酯化反应^[14]及 L-苹果

表 2 所用有机溶剂的物化参数及其所得产物的分子量特征

Table 2 The physicochemical parameters of the organic solvents used as the reaction media and the characteristics involving the molecular mass of the products prepared in each medium

Sample	Reaction medium	Physicochemical parameters of a solvent				$M_w/10^3$	PDI
		$\delta/(\text{J}/\text{cm}^3)^{0.5}$	$\log P$	$\mu/(10^{-30} \text{ C}\cdot\text{m})$	ϵ		
H-S1	isooctane	15.4	4.50	0	1.95	8.25	3.64
H-S2	toluene	18.2	2.50	1.23	2.24	11.20	4.67
H-S3	<i>tert</i> -butanol	23.9	0.83	5.54	11.40	4.08	3.20
H-S4	tetrahydrofuran	20.0	0.49	5.70	7.58	2.73	2.27
H-S5	acetone	20.4	-0.23	8.97	20.70	2.34	2.11

Reaction temperature: $60\text{ }^\circ\text{C}$. PDI—Polydispersity index.

酸、二元醇与二元酸的缩聚反应的实验结果也证实了这一点^[12].

2.3 反应温度的影响

在甲苯中于不同温度下进行脂肪酶催化聚合反应, 所得聚合产物分子量与反应温度的关系示于图 3. 可以看出, 随着反应温度的升高, 产物的分子量先增大后减小, 在 60~70 °C 时产物的分子量最大. 这是因为随反应温度的升高, 底物分子的反应活性升高, 同时反应体系的粘度也随之下降, 传质阻力减小, 有利于提高酶催化缩聚反应的速率, 从而使产物分子量增大. 另一方面, 在较高的反应温度下, 酶蛋白容易变性而使酶催化活力下降甚至失活, 从而导致酶催化缩聚反应的速率减小.

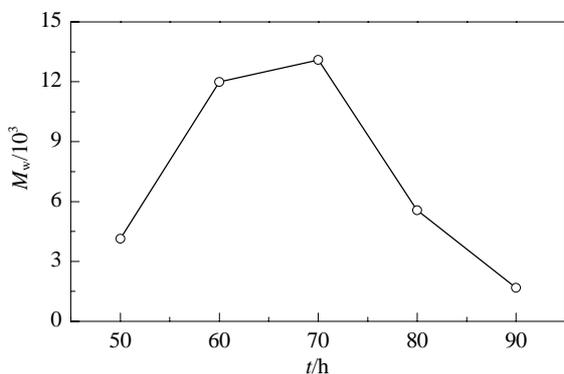


图 3 在甲苯介质中反应温度对脂肪酶催化合成超支化聚酯分子量的影响

Fig. 3. Influence of reaction temperature on the product molecular mass for lipase-catalyzed synthesis of hyperbranched polyester in toluene medium.

3 结论

以丙三醇、1,6-己二醇和己二酸为共聚单体, 以脂肪酶 Novozym 435 为催化剂, 采用预聚-酶催化缩

聚法成功制得以丙三醇为支化结构的超支化聚酯. 自催化的预聚过程将共聚单体转化成粘稠状的液态低聚物, 从而可避免使用大量极性有机溶剂, 并有利于维持酶的催化活性; 在随后的酶催化缩聚反应中, 只要加入少量的有机介质就能改善反应体系的传质、传热效率. 该方法对反应底物会对酶的微环境产生不利影响的聚合反应具有一定的普遍意义. 低极性疏水的甲苯与异辛烷是较佳的反应介质; 70 °C 时在甲苯中脂肪酶 Novozym 435 催化活性最高, 所得产物的支化度为 0.27, 重均分子量为 1.31×10^4 , 分子量分散度为 4.67.

参 考 文 献

- 1 Albertsson A C, Srivastava R K. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, **60**: 1077
- 2 Uyama H, Kobayashi S. *Adv Polym Sci*, 2006, **194**: 133
- 3 Kobayashi S. *Macromol Rapid Commun*, 2009, **30**: 237
- 4 Skaria S, Smet M, Frey H. *Macromol Rapid Commun*, 2002, **23**: 292
- 5 Kulshrestha A S, Gao W, Gross R A. *Macromolecules*, 2005, **38**: 3193
- 6 Kulshrestha A S, Gao W, Fu H, Gross R A. *Biomacromolecules*, 2007, **8**: 1794
- 7 Kumar A, Gross R A. *Biomacromolecules*, 2000, **1**: 133
- 8 Mahapatro A, Kalra B, Kumar A, Gross R A. *Biomacromolecules*, 2003, **4**: 544
- 9 Hawker C J, Lee R, Frechet J M J. *J Am Chem Soc*, 1991, **113**: 4583
- 10 Halldorsson A, Magnusson C D, Haraldsson G G. *Tetrahedron*, 2003, **59**: 9101
- 11 Zhang S B, Cheng L B, Hu J Z. *J Appl Polym Sci*, 2003, **90**: 257
- 12 Yao D H, Li G J, Zong M H. *Chem Lett*, 2007, **36**: 574
- 13 Halling P J. *Enzyme Microb Technol*, 1994, **16**: 178
- 14 Chen Z G, Zong M H, Li G J. *Process Biochem*, 2006, **41**: 1514