

原子转移自由基聚合法合成大豆分离蛋白-*g*- 聚甲基丙烯酸 2-羟乙酯*

周 华 姜 鹏 杨 成 江金强 白绘宇 陈明清 刘晓亚**

(江南大学化学与材料工程学院 无锡 214122)

摘 要 通过酰胺化反应在大豆分离蛋白(SPI)表面引入溴原子,合成了大分子引发剂 SPI-Br,以 CuCl 和 bpy 为催化体系,通过原子转移自由基聚合法(ATRP)合成了大豆分离蛋白-*g*-聚甲基丙烯酸 2-羟乙酯(SPI-*g*-PHEMA).用 FTIR、¹³C-NMR、GPC 对大分子引发剂、接枝产物和接枝物降解链进行结构表征.结果表明,得到了表面接枝聚甲基丙烯酸 2-羟乙酯长链的大豆分离蛋白接枝聚合物,用紫外分光光度计(UV)、荧光分光光度计、zeta 电位和透射电镜(TEM)表征了接枝产物的溶液性质和微观形态.

关键词 大豆分离蛋白, 甲基丙烯酸 2-羟乙酯, 原子转移自由基聚合, 2-溴异丁酰溴, 降解

大豆分离蛋白是富含氨基酸的天然蛋白质高分子,一种可生物降解的有机材料,在自然环境中可以被微生物或细菌降解.大豆资源极其丰富且再生速度快,以大豆分离蛋白制备的高分子复合物可能成为有应用价值的新型绿色高分子材料.大豆分离蛋白是一种球蛋白,等电点为 $pH \approx 4.5$,以离心沉降速度分级,可分为 2S、7S、11S 和 15S 4 组不同相对分子质量的球蛋白.纯大豆分离蛋白的某些性能难以满足需要,对其进行改性可以提高性能、拓宽应用^[1].目前,国内外学者对大豆分离蛋白改性的研究取得了一些成果,改性可以使大豆分离蛋白性能得到明显提高.如 Zhang 等通过纤维素晶须对大豆分离蛋白改性,制备大豆蛋白塑料^[2];Diftis 等利用羧甲基纤维素与大豆分离蛋白的共轭作用改善其乳化性^[3];管军军等采用微波法得到大豆分离蛋白-糖接枝物,显著改变了大豆分离蛋白的性质^[4].杨成等用亲水单体与大豆分离蛋白进行自由基接枝共聚得到了更亲水的接枝共聚物^[5].尽管大豆分离蛋白改性的方法较多,但在作者关注范围内,基于大豆分离蛋白的 ATRP 反应还鲜见报道.ATRP 反应^[6]近十年来倍受关注,目前的研究热点已由常规的均相聚合和溶液聚合转向常温聚合^[7]、界面聚合^[8,9]和水相聚合^[10,11].国内外学者已在多肽^[12]、环糊精^[13]、弹性蛋白^[14]、壳聚糖^[15]等生物分子的 ATRP 聚合上取得了一些重要成果.我们尝试以 ATRP 法在大

豆分离蛋白表面引入聚甲基丙烯酸 2-羟乙酯(PHEMA)接枝链,使大豆分离蛋白具有更良好的生物相容性^[16],为制备生物医用材料提供一种新方法.

本文以大豆分离蛋白为基,首先合成了具备引发作用的大豆分离蛋白大分子引发剂(SPI-Br),通过 ATRP 法合成了大豆分离蛋白-*g*-聚甲基丙烯酸 2-羟乙酯(SPI-*g*-PHEMA),在大豆分离蛋白这种分子量较大的生物大分子上实现了 ATRP 聚合,探索了大豆分离蛋白基接枝物的制备及性能表征. FTIR、¹³C-NMR、GPC 表征结果表明基于大豆分离蛋白的 ATRP 反应是成功的,用紫外、荧光、zeta 电位和透射电镜表征了接枝产物 SPI-*g*-PHEMA 的溶液性质和微观形态.

1 实验部分

1.1 主要试剂

大豆分离蛋白(SPI),蛋白质含量大于 90%,纯化后使用,南通光合公司;2-溴异丁酰溴,98%,ACROS ORGANICS;甲基丙烯酸 2-羟乙酯,分析纯(AR),使用前减压蒸馏除去阻聚剂;1-苯氨基萘-8-磺酸(ANS),百灵威;氯化亚铜(CuCl),2,2'-联吡啶(bpy),国药集团化学试剂公司.

1.2 SPI-Br 大分子引发剂的合成

在冰水浴中,250 mL 的圆底烧瓶中分别加入 200 mL 的四氢呋喃(THF),2.5 g 大豆分离蛋白,

2.5 mL 的三乙胺,搅拌 2 h,逐滴加入 2-溴异丁酰溴 2.0 mL,搅拌 10 h.产物用水、丙酮、二氯甲烷洗涤,循环洗涤多次,以除去未反应的 2-溴异丁酰溴,干燥,研磨成粉,得到大分子引发剂 SPI-Br.

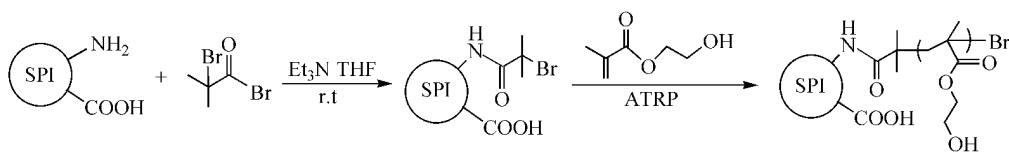
1.3 ATRP 法合成接枝聚合物

25 mL 的球形烧瓶中加入 0.60 g 大分子引发剂 SPI-Br,0.30 g 氯化亚铜(CuCl),0.15 g bpy,抽真空、通氮气,循环 3 次.在 25 mL 的烧瓶中加入 6 mL 甲基丙烯酸 2-羟乙酯、15 mL 水,抽真空,通氮气 30 min,循环 3 次.将引发剂、催化剂加到单体的反应介质中,磁力搅拌器进行搅拌,并逐渐升温至 60℃,反应 24 h.产物用 *N,N*-二甲基甲酰胺、丙酮、二氯甲烷反复洗涤,得到固体研磨成粉.产物溶于水后,过中性 Al_2O_3 色谱柱,滤液经旋转蒸发浓缩后滴至丙酮中,得到白色沉淀,离心后取沉淀物,干燥,得到接枝聚合物.

分别选用正丙醇或正丙醇/水混合溶剂代替纯水作为 ATRP 反应的介质,进行 ATRP 接枝反应.

1.4 接枝聚合物的水解

通过酸解切断大豆分离球蛋白接枝聚合物表面的 PHEMA 接枝链,纯化所得 PHEMA,用 GPC 测定其分子量,可以间接证明接枝成功.在 6 mol/L 的盐酸溶液中逐渐加入 SPI-*g*-PHEMA,搅拌使均匀分散,降解温度 60℃、降解时间 24 h,然后用旋转蒸发仪蒸发,丙酮溶解、离心分离(转速为 5000 r/min,时间为 15 min),离心、取上层清液,反复循环 3 次,最终取丙酮溶液的上层清液,干燥,即得到从 SPI-*g*-PHEMA 上切下的 PHEMA 接枝链.



Scheme 1 ATRP Synthesis of SPI-*g*-PHEMA

2.1 大豆分离蛋白大分子引发剂 SPI-Br 的表征

大豆分离蛋白大分子引发剂的合成是通过 2-溴异丁酰溴的酰溴与大豆分离蛋白上面活性氨基进行亲核取代反应,脱去 HBr 得到的.对大豆分离蛋白和大豆分离蛋白大分子引发剂作了 ^{13}C -NMR 表征(图 1),两者在化学位移 $\delta = 54$ 和 173 处都有相同的强吸收,分别归属于大豆分离蛋白上氨基酸上的叔碳和羰基碳的吸收.化学位移 $\delta = 10$

1.5 产物表征

对大豆分离蛋白、大豆分离蛋白大分子引发剂、大豆分离蛋白接枝聚合物、降解的接枝链进行红外表征, KBr 研磨压片,加拿大 ABB 公司 FTLA 2000-104 型傅里叶变换红外光谱仪,测试波数范围 4000 ~ 500 cm^{-1} .用日本电子公司 JNM-MY60FT 型核磁共振谱仪表征大豆分离蛋白、大豆分离蛋白引发剂的固体 ^{13}C -NMR.降解的接枝链溶于 DMF,用 HP-1100 型凝胶渗透色谱(GPC)表征分子量,以 DMF 为流动相,PSI 为标准样^[7],温度 35℃,流动速度为 0.6 mL/min.用英国 Malvern 公司 zeta-sizer 2000 型的 zeta 电位测定仪进行 zeta 电位表征.用紫外分光光度计(北京普析通用公司的 TU-1901 型紫外-可见光分光光度计)表征溶解性(蛋白质清液在 280 nm 吸光度占总蛋白质溶液吸光度百分比).用荧光光谱仪(日本岛津公司 RF5301PC 型荧光分光光度计),以的 1-苯氨基萘-8-磺酸(ANS)为荧光探针^[17],激发波长为 390 nm,测定发射峰强,表征 SPI-*g*-PHEMA 表面疏水性.采用 Hitachi 7000A 透射电子显微镜(TEM)对产物微观形态进行表征.

2 结果与讨论

大豆分离蛋白-*g*-聚甲基丙烯酸 2-羟乙酯的合成路线如示意式 1 所示,首先大豆分离蛋白与 2-溴异丁酰溴在 SPI 球蛋白表面进行酰胺化反应,接上具有引发作用的溴原子,得到 ATRP 的大分子引发剂 SPI-Br.然后,在水相体系中,加入亲水性单体 HEMA,引发体系为 SPI-Br、氯化亚铜、bpy,进行 ATRP 聚合.

左右的尖峰,可归属于与 SPI-Br 溴碳原子相连的两个甲基碳,证明已合成了 SPI 大分子引发剂.图 2 所示为 SPI-Br 与 SPI 的红外谱图,SPI-Br 在 620 cm^{-1} 处的强吸收,归属于 SPI-Br 上 C—Br 的伸缩振动;1116 cm^{-1} 处 C—H 的面外弯曲振动峰明显加强,也可以证明已合成了大豆分离蛋白引发剂.

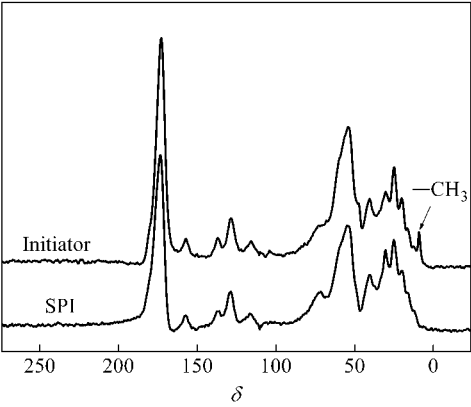


Fig. 1 The ¹³C-NMR spectra of SPI and SPI-Br initiator

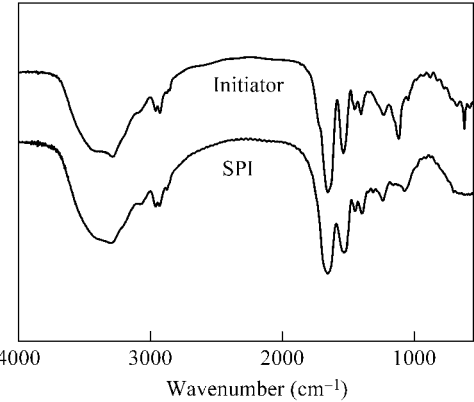


Fig. 2 The FTIR spectra of SPI and SPI-Br initiator

2.2 ATRP 法合成接枝聚合物 SPI-g-PHEMA 的表征

图 3 是 SPI、接枝聚合物 SPI-g-PHEMA 的红外图谱,在 3000 cm⁻¹ 以上的强吸收可归属于 SPI 的 O—H 和 N—H 的伸缩振动峰,SPI-g-PHEMA 在 3442 cm⁻¹ 有较强吸收峰,是由 PHEMA 上—OH 产生的. SPI-g-PHEMA 在 1730 cm⁻¹ 处有较强吸收,可归属于接枝物上酯羰基的 C=O 伸缩振动.在 1670 cm⁻¹ 处的吸收归属于酰胺 I 带,来自于蛋白质中酰胺键的 C=O 伸缩振动吸收;在 1530 cm⁻¹ 处的吸收归属于特征的酰胺 II 带,来自于 N—H 弯曲振动.在 1240 cm⁻¹ 处的吸收归属于酰胺 III 带,来自于 C—N 伸缩振动吸收.在 1160 cm⁻¹ 和 1080 cm⁻¹ 处, SPI-g-PHEMA 有较强的吸收,可归属于 PHEMA 的 C—O 伸缩振动. SPI-g-PHEMA 中 620 cm⁻¹ 处的 C—Br 伸缩振动很弱,可能是由于 PHEMA 链键接到大豆分离蛋白上, PHEMA 链在大豆分离蛋白表面富集的缘故. 红外表征结果证明接枝反应是成功的.

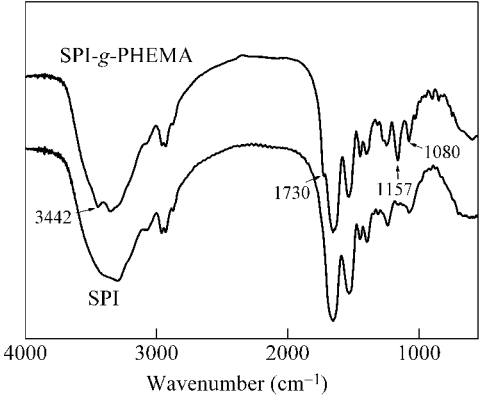


Fig. 3 The FTIR spectra of SPI and SPI-g-PHEMA

2.3 接枝链表征

设计对比实验,以 AIBN 为引发剂,本体聚合得到 PHEMA 均聚物.用红外表征 PHEMA 均聚物和经水解切下的 PHEMA 接枝链,进行比较.结果如图 4 示, SPI-g-PHEMA 降解的接枝链 PHEMA 与均聚物 PHEMA 的红外谱图几乎一致,1750 cm⁻¹ 左右的—C=O 伸缩振动峰,1160 cm⁻¹ 和 1080 cm⁻¹ 左右的—C—O—伸缩振动峰,以及 3000 cm⁻¹ 以上—O—H 伸缩振动峰等吸收峰都对应的较好,可以间接证明 ATRP 法合成 SPI-g-PHEMA 的成功.

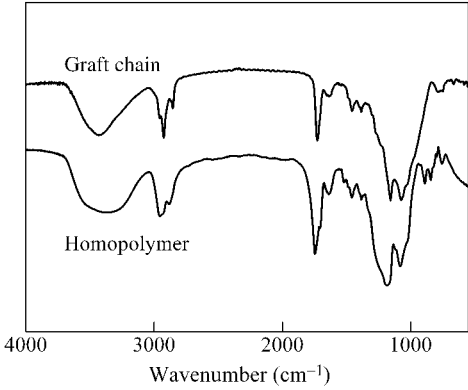


Fig. 4 The FTIR spectra of grafted chain and PHEMA homopolymer

2.4 反应介质对 SPI-g-PHEMA 接枝链 PHEMA 分子量及接枝率的影响

SPI-g-PHEMA 的性质受其结构的影响,与 SPI 基、接枝链长度和接枝率有关,而接枝链长度与其分子量大小有关.分别以水、水/正丙醇(50:50, V/V)、正丙醇作为反应介质进行 ATRP 反应,用 GPC 表征不同反应介质得到 SPI-g-PHEMA 接枝链的分子量,结果见表 1. 反应介质对 ATRP 反应影响

较大,水相体系得到的接枝聚合物的接枝链较长,有较高的接枝率,以醇/水或醇为反应介质的接枝聚合物的接枝链较短.在水溶液中,SPI 具有较好的溶解性,利于 ATRP 聚合的进行,得到的产物有较长的接枝链;SPI 在醇中溶解性较差,ATRP 聚合比较困难,产物接枝链较短.实验中用于表征 SPI-g-PHEMA 溶液性质和形态所用的样品都为水相体系的接枝产物.

根据大豆分离蛋白及大分子引发剂的¹³C-NMR 图谱和元素分析(大豆分离蛋白中 N、C 元素所占的质量分数为 14.33%、48.31%)的结果计算,得到大分子引发剂上具有引发作用的溴原子含量为 0.15 mmol/g(即每克大豆分离蛋白上溴原子的数目约为 0.15 mmol).大豆分离蛋白接枝物的接枝率(GP)为接枝支链占大豆分离蛋白基质的质量百分比,单体的接枝效率(GE)为参与接枝反应消耗的 HEMA 占接枝前体系中单体总量的质量百分数.由表 1 可见,SPI 的 ATRP 接枝反应接枝率较高,但接枝效率偏低.我们还设计了另一个对比实验,采用 2-溴异丁酰溴作为引发剂,直接在水介质中加入 HEMA 进行 ATRP 聚合,所得 PHEMA 分子量略高于 SPI 体系接枝聚合物的 PHEMA 接枝链,分子量分布接近,说明 SPI-Br 的引发能力与小分子引发剂 2-溴异丁酰溴相比没有因为明显的下降,证明用大豆分离蛋白引发剂 SPI-Br,以水为介质,进行 ATRP 法合成 SPI-g-PHEMA 是可行的^[12].

Table 1 Molecular weight of graft chain					
Medium	$M_n (\times 10^3)$	$M_w (\times 10^3)$	M_w/M_n	GP(%)	GE(%)
H ₂ O	11.6	13.0	1.12	174	17.0
H ₂ O/C ₃ H ₇ OH	4.81	5.19	1.14	72.2	6.9
C ₃ H ₇ OH	4.74	5.65	1.19	71.1	6.8

2.5 SPI 和 SPI-g-PHEMA 溶解性和疏水性表征

蛋白质的溶解性是蛋白质水化作用的重要体现,与其持水性、乳化性、起泡性、泡沫稳定性等直接有关.如图 5 所示,SPI 和 SPI-g-PHEMA 的溶解性均随着 pH 上升而增加,SPI-g-PHEMA 表面引入了更多的亲水链 PHEMA 使其溶解性优于大豆分离蛋白.用表征疏水微区的荧光素 ANS 作为荧光探针,荧光强度与疏水微区数量成正比.图 6 是在不同 pH 下大豆分离蛋白和大豆分离蛋白接枝聚合物的表面疏水性,随着 pH 上升,疏水性性下降,亲水性增强.蛋白质内部是由疏水作用维系的疏水链和氢键维系的极性基团组成;外部为较多

极性基团.随着 pH 上升,碱性条件下 SPI 表面的羧酸更易电离,与水的亲和性更好.氢键相互作用下降,结构较舒展,更多的亲水基团暴露,亲水性增加,疏水性下降,SPI-g-PHEMA 表现的较 SPI 更亲水.

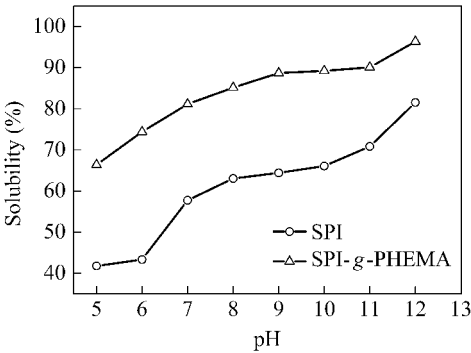


Fig. 5 The effects of pH on the solubility of SPI and SPI-g-PHEMA

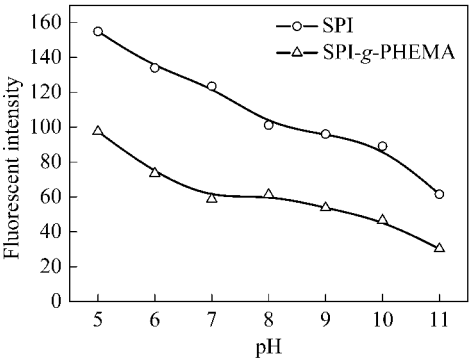


Fig. 6 The effects of pH on the hydrophobicity of SPI and SPI-g-PHEMA

2.6 zeta 电位的表征

常用 zeta 电位研究溶液分散体系的稳定性,测量粒子的表面净电荷和界面的电压分布,是描述分散体系性质的一个重要参数.大豆分离蛋白是典型的两性聚电解质,大豆分离蛋白的许多优良功能都与其所带的电荷有关,如溶解性、乳化性、粘性等.随着 pH 值的上升,大豆分离蛋白 zeta 电位的电负性呈增加的趋势,原因是随着 pH 值的增加,SPI 分子中羧基的电离程度增加,分子表面带有更多的负电荷所致.在 SPI 表面接上 PHEMA 链,会阻碍部分羧基的电离,并使 SPI 的体积增大,电泳能力下降,导致 SPI-g-PHEMA 的 zeta 电位高于 SPI(见图 7).

2.7 TEM 表征

由图 8 可见,纯 SPI 的聚集形态是粒径约为

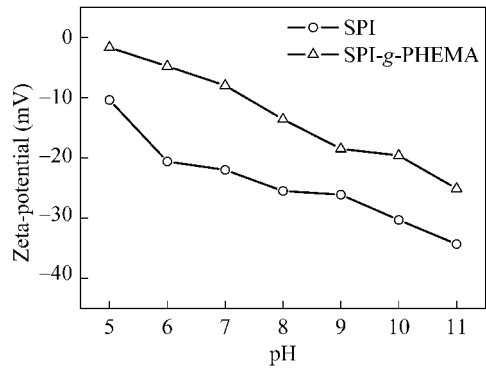


Fig. 7 The effects of pH on zeta-potentials of SPI and SPI-g-PHEMA

150 nm 左右的微球形状,接枝聚合物 SPI-g-PHEMA 的聚集形态为方形,粒径约 350 nm 左右.接枝聚合物表面带有较多的 PHEMA 链段,PHEMA 链端的一OH 与 SPI 中的一NH₂、-COOH 等基团及其本身极易产生氢键,分子内或分子间有较强的相互作用,容易形成聚集状态.SPI 表面的 PHEMA 长链的链段运动及电荷性质都较接枝前的 SPI 有较大变化,导致聚集状态发生变化,可能会形成一些定向结构,产生方形的形态.

综上所述,采用 ATRP 法合成了大豆分离蛋白-g-聚甲基丙烯酸 2-羟乙酯 (SPI-g-PHEMA),FTIR 和 ¹³C-NMR 和 GPC 表征结果证明 ATRP 反应是成功的,且有较高的接枝率.大豆分离蛋白表面

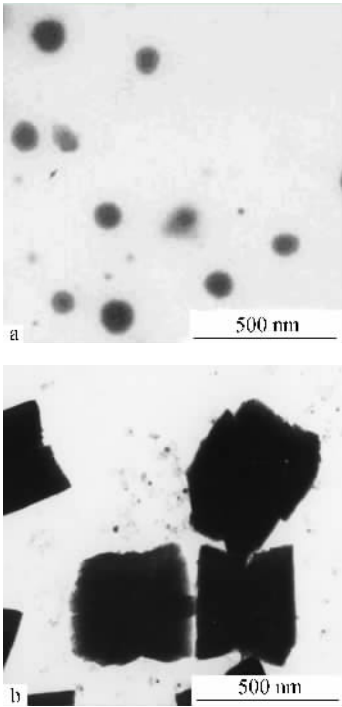


Fig. 8 The TEM images of SPI (a) and SPI-g-PHEMA (b)

接枝 PHEMA 改变了大豆分离蛋白的溶液性质和聚集形态.基于大豆分离蛋白的 ATRP 接枝聚合可以在 SPI 表面引入亲水或疏水长链,为天然大分子的可控改性提供了一条新途径.

REFERENCES

1 John E K. J Am Oil Chem Soc,1979,56 242 ~ 258
2 Wang Y X,Cao X D,Zhang L N. Macromolecular Bioscience,2006,6 524 ~ 531
3 Diftis N,Kiosseoglou V. Food Chemistry,2003,81 1 ~ 6
4 Guan J J,Qiu A Y,Liu X Y,Hua Y F,Ma Y H. Food Chemistry,2006,97 577 ~ 585
5 Yang C,Song X Q,Sun C,Chen M Q,Xu Y L,Liu X Y. J Appl Polym Sci,2004,102(4) 4023 ~ 4029
6 Wang J S,Matyjaszewski K. J Am Chem Soc,1995,117 5614 ~ 5615
7 Wang X S,Armes S P. Macromolecules,2000,33 6640 ~ 6647
8 Chen Y W,Liu D M,Deng Q L,He X H,Wang X F. J Polym Sci Part A Polymer Chemistry,2006,44 3434 ~ 3443
9 Lee S B,Koepsel R R,Morley S W,Matyjaszewski K,Sun Y J,Russell A J. Biomacromolecules,2004,5 877 ~ 882
10 Xu F J,Kang E T,Neoh K G. Biomaterials,2006,27 2787 ~ 2797
11 Ashford E J,Naldi V,O'Dell R,Billingham N C,Armes S P. Chem Commun,1999,1285 ~ 1286
12 Mei Y,Beers K L,VanderHart D L,Washburn N R. J Am Chem Soc,2004,126 3472 ~ 3476
13 Hu Hui(胡晖),Fan Xiaodong(范晓东),Huang Yi(黄怡). Acta Polymerica Sinica(高分子学报),2004,(6) 805 ~ 811
14 Wang Xiaoli(王晓丽),Gan Tianian(甘甜甜),Zhang Min(张敏),Hou Xin(侯信),Yao Kangde(姚康德). Chemical Journal of Chinese Universities(高等学校化学学报),2007,28 789 ~ 793
15 Guo Baolin(郭保林),Yuan Jinfang(袁金芳),Zhang Xiaoli(张晓丽),Gao Qingyu(高青雨). Modern Chemical Industry(现代化工),2006,26(10) 49 ~ 53
16 Lee K Y,Mooney D J. Chem Rev,2001,101,(7) 1869 ~ 1879
17 Cardamone M,Puri N K. Biochem J,1992,282 589 ~ 593

GRAFT POLYMERIZATION OF 2-HYDROXYETHYL METHACRYLATE ON SOY PROTEIN ISOLATE *via* ATOM TRANSFER RADICAL POLYMERIZATION

ZHOU Hua, JIANG Peng, YANG Cheng, JIANG Jinqiang, BAI Huiyu, CHEN Mingqing, LIU Xiaoya

(School of Chemical and Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122)

Abstract The synthesis of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) grafted soy protein isolates (SPI-*g*-PHEMA) using atom transfer radical polymerization (ATRP) was described. Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (PHEMA) is one of most extensively studied biocompatible polymer, which has been used for applications such as contact lenses. The scheme of the work was that the soy protein isolate macroinitiator (SPI-Br) was synthesized first by condensation reaction of the active amino groups and 2-bromoisobutyryl bromide, and the resulting secondary bromide could be used as initiator for HEMA monomer in atom transfer radical polymerization to prepare SPI-*g*-PHEMA. FTIR and ¹³C-NMR spectra confirmed the conversion from SPI sequence to SPI-Br.

Atom transfer radical polymerization of 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) on SPI was carried out in aqueous solutions using SPI-Br as initiator, copper chloride/bipyridine (CuCl/bpy) as catalyst. FTIR spectrum was used to characterize the successful polymerization of HEMA onto SPI globulin. The graft chain was cleaved from SPI-*g*-PHEMA by degradation of hydrochloric acid for purpose of the measurement of molecular weight of graft chain by GPC. The changes in the spectra of SPI, SPI-Br, SPI-*g*-PHEMA and grafted chain confirmed successive steps in the synthesis of SPI-*g*-PHEMA hybrids. A series of comparative experiments were taken with different reaction mediums (H₂O, H₂O/*n*-propanol, *n*-propanol), and higher molecular weight result was gained in aqueous solutions by ATRP. The number average molecular weight was about 1.16×10^4 , and a polydispersity was about 1.12, so the water medium system was chosen for further study. The molecule weight and the polydispersity of graft chain cleaved from SPI-*g*-PHEMA prepared *via* ATRP initiated by soy protein isolate macroinitiator were similar to those of PHEMA prepared by normal ATRP using 2-bromoisobutyryl bromide without SPI in solution under similar reaction conditions.

The solution properties of SPI-*g*-PHEMA were characterized by UV and fluorescent spectrophotometer. The results indicated that with increasing of pH value, the solubility of SPI and SPI-*g*-PHEMA increased, and the hydrophobicity decreased. The zeta-potential of SPI and SPI-*g*-PHEMA solutions were also studied by zeta-potentiometer. The static charges on the surface of SPI molecules increased clearly after graft modification, and the values of the zeta potential of SPI and SPI-*g*-PHEMA solutions decreased with the increase of pH values. The TEM images showed that the diameter of SPI-*g*-PHEMA was beyond that of SPI, and the morphologies of SPI and SPI-*g*-PHEMA were different.

Keywords Soy protein isolate, HEMA, ATRP, 2-Bromopropionyl bromide, Degradation