

大环碳酸酯的 Novozym-435 酶促开环聚合*

冯 俊 王华芬 李双凤 卓仁禧**

(武汉大学生物医用高分子教育部重点实验室 武汉大学化学系 武汉 430072)

摘 要 研究了 14 元环的碳酸丁二酯二聚体在固定化脂肪酶 Novozym-435 催化下的开环聚合反应制备聚碳酸丁二酯. 聚合在常压, 75℃ 的甲苯溶液中进行, 反应条件温和. 详细探讨了反应条件诸如单体浓度, 酶浓度对于聚合的影响. 结果显示 Novozym-435 具有与异辛酸亚锡可比拟的高催化活性, 同时可以回收重复使用. 聚合动力学研究表明碳酸丁二酯的酶促甲苯溶液开环聚合和环状内酯的酶促甲苯溶液聚合有所不同, 没有表现出活性聚合的特征.

关键词 酶促开环聚合, 脂肪族聚碳酸酯, 聚碳酸丁二酯, 固定化酶 Novozym-435

一些脂肪族聚碳酸酯具有良好的生物相容性, 生物可降解性和物理机械性能, 已经在手术缝合线、骨固定材料以及药物控制释放等方面得到广泛的研究和应用^[1-3]. 其中, 研究最多的是聚碳酸丙二酯 (poly(TMC)), 碳酸丙二酯和乙交酯的共聚物 Maxon 已经商品化并用于临床. 目前, 开环聚合是制备医用级脂肪族聚碳酸酯的通用方法, 常采用的催化剂是异辛酸亚锡 $\text{Sn}(\text{Oct})_2$, 它也是经美国食品和药物管理局 (FDA) 核准的可用于制取医用级高分子材料的金属催化剂.

酶是一种生物催化剂, 其优势在于无毒、高选择性及温和的反应条件^[4,5]. 近 10 年来, 酶在合成生物可降解化合物 (如聚酯) 方面取得了长足的进步. 迄今, 已知的环状内酯从 β -丁内酯到 17 元环的内酯都有酶促开环聚合的报道^[6]. 研究表明酶促聚合对于内酯开环具有较高的催化能力, 特别是对环张力比较小的大环内酯从产物的分子量和反应速率考虑都要大大优于传统的金属催化剂^[6,7]. 与之比较, 开环聚合碳酸酯的研究则大部分局限于碳酸丙二酯或其六元环衍生物^[5,6,8], 这对于系统的研究环状碳酸酯的酶促开环聚合是远远不够的. 再者, 由于六元环碳酸酯的热不稳定性, 容易自发热聚合^[9], 也使得不少研究工作者对于环状碳酸酯在酶存在下的聚合到底是否由酶催化产生质疑, 或者是在判断酶对环状碳酸酯开环聚合的活性时无法排除热聚合的因素, 因此研究其他环状碳酸酯单体的酶促聚合对于明确碳酸酯酶促开环聚合机理是非常必要的.

与 TMC 的初始原料 1,3-丙二醇相比, 1,4-丁二醇便宜易得, 从商品化生产角度来看制备相应的聚碳酸酯材料前景应该更为广阔. Endo 和 Kricheldorf 研究小组在利用传统的催化剂开环聚合其对应的碳酸丁二酯七元环单体 (TeMC) 以及其十四元环状二聚体 $(\text{TeMC})_2$ 方面做了大量的工作^[10-14]. 结果显示, TeMC 和 TMC 一样容易自引发热聚合, $(\text{TeMC})_2$ 性质稳定且容易制备纯化. 异辛酸亚锡催化 $(\text{TeMC})_2$ 开环聚合虽然能够得到高转化率和高分子量产物, 但其聚合反应须在高真空, 高温 (高于 180℃) 条件下进行. 且由于高温下的快速降解, 聚合反应过程较难控制. 因此对于制备聚碳酸丁二酯 (PTeMC) 而言, 寻求一种更为温和合适的催化系统有助于其以后更为广泛的应用.

本实验室曾经报道脂肪酶或其固定化酶在酶促开环聚合六元环碳酸酯时具有较高的催化活性^[8,15]. 本文尝试利用猪胰脂肪酶 (PPL), 假丝酵母皱褶酶 (AYS) 和固定化脂肪酶 Novozym-435 3 种常见的商品化酶作为催化剂来催化 $(\text{TeMC})_2$ 开环聚合, 并详细研究了反应条件对于聚合反应的影响 (图 1).

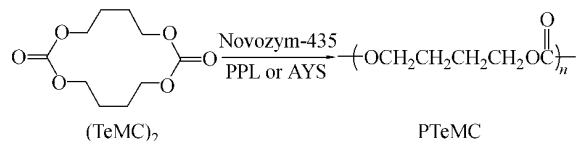


图 1 Lipase-catalyzed ring-opening polymerization of $(\text{TeMC})_2$

* 纪念何炳林院士逝世 1 周年约稿 2008-03-14 收稿, 2008-04-01 修稿 国家重点基础研究发展计划 (973 计划, 项目号 2005CB62390) 和自然科学基金 (基金号 20304010) 资助项目; ** 通讯联系人, E-mail: bmp_lab@hotmail.com

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

猪胰脂肪酶(PPL),假丝酵母皱褶酶(AYS)和固定化脂肪酶 Novozym-435 均购自 Sigma 公司. 甲苯在钠的存在下回流 8 h,经蒸馏使用;所用试剂均经重蒸处理. 红外光谱分析使用 Perkin Elmer I 型光谱仪;聚合物的分子量及其分布由 GPC (Waters Millennium 32 HPLC2690 分离系统,Shodex K803 凝胶柱)测定,以聚苯乙烯为标样,三氯甲烷为流动相(110 mL/min). 核磁共振用 Varian Mercury 2VX 300 Apparatus 测定.

1.2 单体的制备

十四元环状二聚体(TeMC)₂的合成参照文献[13],裂解后产品用少量冷甲醇洗涤,然后重结晶 3 次. 产物熔点 170~172℃.

1.3 酶促聚合反应

在氩气保护下,以 PPL,AYS 或 Novozym-435 为催化剂本体聚合制备聚碳酸丁二酯. 聚合管事先用硅烷化试剂处理. 以 Novozym-435 催化聚合反应为例,将一定量的单体和 Novozym-435 依次放入 5 mL 磨口反应管中,加入预定体积甲苯,塞上磨口塞,固体石蜡熔融密封,在磁力搅拌及设定的温度下恒温反应一定时间. 产物用二氯甲烷溶解,过滤除去不溶的 Novozym-435,浓缩滤液,产物真空干燥后进行 GPC 测试. 用于¹H-NMR 测试的聚合物样品可溶于少量二氯甲烷,在大量甲醇中沉淀. 如此重复沉淀 2 次后,将聚合物在真空下干燥至恒重进行¹H-NMR 测试.

2 结果与讨论

碳酸丙二酯在本体或溶液中的酶促开环聚合均有报道^[5,6,8,15]. 在本实验中,由于单体(TeMC)₂的熔点为 170℃,考虑到酶在此高温下的热稳定性,我们选择在 75℃ 下,甲苯中进行溶液聚合,3 种商品化脂肪酶 PPL,AYS,Novozym-435 分别被用来作为催化剂. 结果显示,尽管这 3 种脂肪酶在催化六元环碳酸丙二酯的开环聚合中都显示出较高的活性^[7],但是对于(TeMC)₂的催化活性明显不同. 其中,Novozym-435 催化聚合单体转化率可接近 100%,获得了高分子量的聚合产物. 而 PPL 和 AYS 催化基本得不到聚合产物. 造成这种现象的原因来自于 3 种酶对于底物活化的能力有所不同,在(TeMC)₂具有比 TMC 低得多的环张力的情

况下,酶对底物的选择性差异得到突出的体现. 同时,空白对比实验表明,在不加酶的条件下,没有任何聚合现象发生. 从而在排除热引发自聚过程参与的前提下,间接地证明了脂肪酶确实具有催化环状碳酸酯开环聚合的能力. 异辛酸亚锡是一种公认的环状碳酸酯开环聚合的高效催化剂,从最终产物的分子量角度考虑,Novozym-435 具有与其可以比拟的催化活性,同时避免了高温催化环境下的反应后期快速降解问题,是一种更为温和的制备途径^[14].

聚合物的核磁氢谱如图 2 所示,除了聚合物的特征峰以外,在 $\delta = 3.6$ 附近还出现了新的三重峰,和已报道环状内酯酶促开环聚合中所出现的新特征峰位置一致,应该归属于聚合物末端和羟基相连的亚甲基的特征峰. 表明了环状碳酸酯的酶促催化机理有可能和环状内酯的酶促开环机理极为相似,都是由反应体系中的微量水分作为引发剂引发聚合反应发生^[16,17].

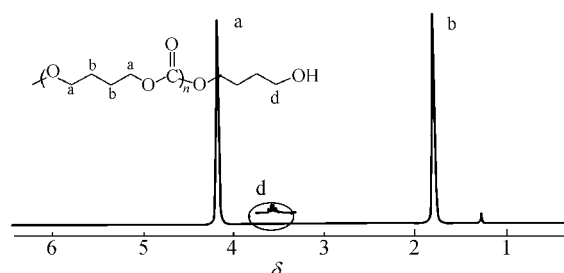


Fig. 2 ¹H-NMR spectrum of the PTeMC

2.1 单体投料浓度对于(TeMC)₂开环聚合的影响

对于溶液聚合而言,反应介质起着非常重要的作用. 在固定其他反应条件的前提下,本文探讨了溶剂体积,也就是单体浓度对于反应的影响(表 1). 平行反应都在 75℃ 条件下反应 48 h,投料每 0.1 g 单体 1 mg Novozym-435,甲苯的初始体积分别控制在 0(空白),0.05,0.1,0.2,0.4,0.8 mL. 在不添加任何溶剂时,由于单体的熔点远远高于聚合温度,整个反应体系最初都处于固相. 出乎我们的意料,GPC 检测结果显示单体转化率达到 10%,分子量为 6000. 也就是说此时的酶促聚合反应实际上是一个固相聚合反应,可能的解释是尽管反应初期由于缺乏溶剂化,反应体系处于固相,分子运动受阻,反应速率非常慢,但由于生成的低聚物熔点较低($T_m = 62 \sim 67^\circ\text{C}$),对单体有溶解作用,使得反应体系逐步向固-液共存体系过渡,从

而一定程度上加速了反应的进程.

Table 1 Ring-opening polymerization of $(\text{TeMC})_2$ with different monomer concentrations^a

Entry	$(\text{TeMC})_2/\text{Toluene}$ (g/mL) ^b	M_n	M_w/M_n	Conversion (%)
1	0.1/Blank	6000	1.3	10
2	0.1/0.05	9400	1.4	22
3	0.1/0.1	29200	1.5	50
4	0.1/0.2	28300	1.7	80
5	0.1/0.4	32400	1.5	93
6	0.1/0.8	22400	1.6	88

^a All polymerizations were carried out during 48 h under fixed enzyme concentration of 10 mg/g ($\text{Novozym-435}/(\text{TeMC})_2$)

和无溶剂的情况比较,在其他条件不变的情况下,逐步提高甲苯初始加入体积,由于单体和相应聚合物的溶剂化作用,反应体系的粘度相对较低,分子运动速率快,反应速率明显提高.比如加入 0.4 mL 甲苯反应 48 h,单体的转化率已经接近 100%.但是此后继续增加甲苯的初始体积,反应速率开始呈现下降的趋势.这是因为尽管反应体系的粘度更低,分子运动更加容易,但是由于体系的过度稀释,聚合分子链活性末端周围的单体浓度下降因素的影响更为突出,反而使得反应速率呈现下降的趋势.总的来说,甲苯的添加量存在一个最佳区域,可以获得聚合最佳反应速率.

在环状内酯的酶促甲苯溶液聚合中,据报道增加甲苯的初始投料体积,稀释的环境能够有效的抑制酯交换反应,从而使得聚合物产物的分子量分布呈现下降趋势^[18].但是在 $(\text{TeMC})_2$ 的酶促甲苯溶液聚合中,分子量分布并没有发生明显的趋势变化.这种情况发生的原因可能是相对于内酯而言,甲苯对于聚碳酸丁二酯的溶解能力差得多,致使溶剂的影响作用在这方面不是那么明显.

2.2 酶浓度对于 $(\text{TeMC})_2$ 开环聚合的影响

在固定其他反应条件的前提下,探讨了酶浓度对于聚合反应的影响.所有的平行反应都在 75℃ 条件下反应 48 h,投料每 0.4 mL 甲苯 0.1 g 单体,同时 Novozym-435 的投料量分别为 0.5,1,2,4,8 mg(表 2).结果显示在相同的反应时间内,酶的初始浓度越高,相同反应时间内单体的转化率越高,聚合反应速率越快.但是分子量却显示出相反的趋势.酶的投料量从 2 mg 上升到 8 mg,在转化率基本相同的情况下,分子量从 35500 下降到 24900.由于碳酸酯酶促开环机理类似于内酯开环,因此很容易理解由于酶中含有必要的微量水

分,随着酶的初始投料量增加,反应体系的引发剂-水含量相应增加,使得聚合链数目增加,产物分子量降低.

Table 2 Ring-opening polymerization of $(\text{TeMC})_2$ with different lipase concentrations^a

Entry	Enzyme concentration (mg/g) ^b	M_n	M_w/M_n	Conversion (%)
1	0.5/0.1	15400	1.5	60
2	1/0.1	32400	1.5	93
3	2/0.1	35500	1.5	96
4	4/0.1	31800	1.4	97
5	8/0.1	24900	1.6	99

^a All polymerizations were carried out during 48 h under fixed $(\text{TeMC})_2/\text{toluene}$ ratio of 0.25 g/mL ;^b $\text{Novozym-435}/(\text{TeMC})_2$

2.3 $(\text{TeMC})_2$ 的开环聚合反应动力学研究

选取 0.2 g 单体,2 mg Novozym-435 ,4 mL 甲苯在 75℃ 聚合 96 h,一定的时间间隔取样,从产物分子量和单体转化率的角度观察了 $(\text{TeMC})_2$ 开环聚合的历程变化.反应体系之所以选择如此稀的浓度,是为了在反应初始阶段 $(\text{TeMC})_2$ 能够全部溶解,保证最终测试结果的准确性.在观察区间内,分子量和转化率都保持单向增长.但是即使在反应 96 h 后,单体转化率也只能达到 80%,这也证明了我们前面提到过的过分稀释导致了聚合反应速率的急剧降低(图 3).

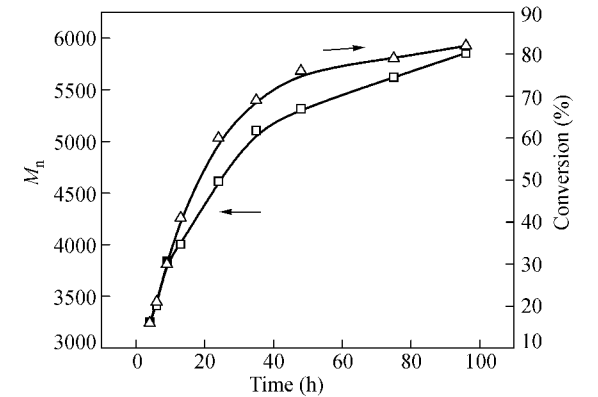


Fig. 3 Polymerization of $(\text{TeMC})_2$ in toluene catalyzed by Novozym-435
[$(\text{TeMC})_2$] = 0.05 g/mL, [Novozym-435] = 0.5 mg/mL ; $\triangle$ Conversion, $\square$ M_n

文献报道在相同环境下的 ϵ -己内酯酶促溶液聚合具有活性聚合的特征^[19].为了比较两者差别,分别研究了 $\ln[M_0]/[M_t]$ 数值的时间函数曲线以及聚合产物分子量和对应的单体转化率之间的关系(图 4).图 4(a)表明 $\ln[M_0]/[M_t]$ 数值的时间

函数曲线并非像 ϵ -己内酯酶促溶液聚合一样,显示出很好的线性对应关系.这应该归因于在反应过程后期活性末端周围极稀的单体浓度造成了部分假终止现象.图 4(b)中,聚合产物分子量和对应的单体转化率也没有出现线性关系.这可能和引发速率要远远低于链增长速率或者是聚合过程中出现了酯交换反应有关.后者可以从继续延长反应时间到 6 天,单体转化率接近 100%,分子量下降,表现出酯交换反应造成的降解得到证明.结合分析结果,我们认为 $(\text{TeMC})_2$ 的酶促甲苯溶液聚合和 ϵ -己内酯酶促溶液活性聚合不同,并不符合一级反应动力学过程,不是一个活性聚合过程.

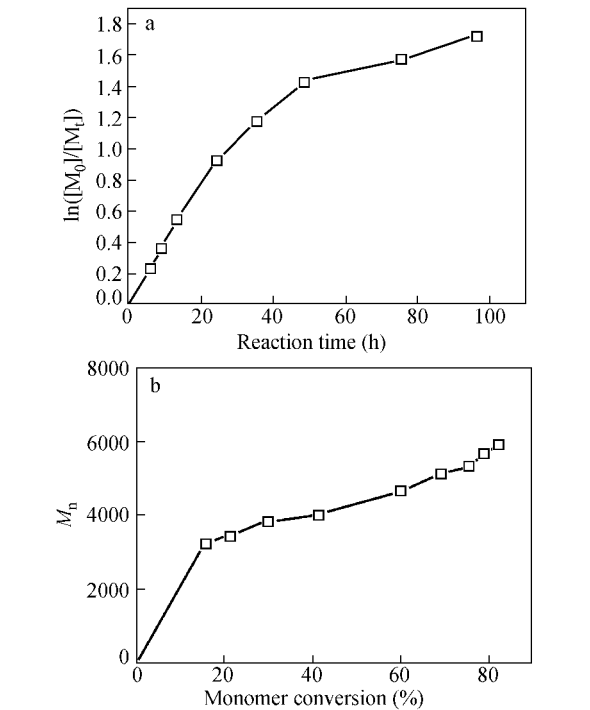


图 4 Profiles of $\ln[M_0]/[M_t]$ versus reaction time (a) and M_n versus conversion (b) for the polymerization of $(\text{TeMC})_2$ in toluene catalyzed by Novozym-435
[$(\text{TeMC})_2$] = 0.05 g/mL, [Novozym-435] = 0.5 mg/mL

2.4 固定化酶的重复使用

在某些情况下,固定化酶可以保持活性重复

使用,这对于酶促聚合降低成本,实现工业化的可能有很大的现实意义.本文对于 Novozym-435 这种固定化酶进行了回收重复使用.表 3 结果表明,在初次使用以后,尽管回收的酶的活性有所降低,但仍然保持了较高的催化活性.同时令人感兴趣的是,如果继续回收重复使用,酶的活性并没有出现持续下降的趋势,而是维持在一个基本稳定的水平.可以推测,在初次使用后,由于固定化酶的多孔结构,其表面吸附了一定量的带有羟基末端的聚合物,从而在体系中除了酶本身的结合水以外,还增加了外源性的引发剂,导致酶的表观催化活性和最终产物分子量有所降低.但是由于固定化酶的吸附量是一定的,即使重复使用多次以后,酶的催化活性反而能够保持在一个比较稳定的水平.故而在重复使用过程中,固定化酶实际上在相当程度上保持了酶的活性没有丧失.

Table 3 The polymerization of $(\text{TeMC})_2$ catalyzed by recycled Novozym-435 for several times^a

Reuse time	M_n	M_w/M_n	Conversion (%)
0	26300	2.1	93
1	14500	2.0	85
2	14100	1.8	90
3	16300	1.8	89

^a All the polymerization were carried out at 75°C for 3 days with 0.1 g $(\text{TeMC})_2$ and 2 mg Novozym-435 in 0.4 mL toluene

综上所述,在温和的反应条件下,固定化脂肪酶 Novozym-435 能够有效地催化 14 元环的碳酸丁二酯二聚体在甲苯中开环聚合,得到相应的脂肪族聚碳酸酯.从分子量和转化率的角度考虑,Novozym-435 具有与异辛酸亚锡可比拟的高催化活性,回收重复使用后仍然具有较高的催化活性.值得注意的是,在没有溶剂参与且反应温度远低于单体的熔点时,可以观察到明显的固相聚合现象发生.聚合动力学研究表明碳酸丁二酯二聚体的酶促甲苯溶液开环聚合和环状内酯的酶促甲苯溶液聚合有所不同,没有表现出活性聚合的特征.

REFERENCES

- Asikainen A J, Noponen J, Mesimäki K, Laitinen O, Peltola J, Pelto M, Kellomäki M, Ashammakhi N, Lindqvist C, Suuronen R. J Mater Sci, Mater Med, 2005, 16(8) :753 ~ 758
- Meng F H, Engbers G H M, Feijen J. J Control Release, 2005, 101(123) :187 ~ 198
- Mao Jing(毛静), Guo Yingzhi(郭颖志), Xia Yuzheng(夏宇正), Gu Zhongwei(顾忠伟). Acta Polymerica Sinica(高分子学报), 2006, (9) :1121 ~ 1124
- Cordova A, Hult A, Hult K, Ihre H, Iversen T, Malmstrom E. J Am Chem Soc, 1998, 120 :13521 ~ 13522

- 5 Al-Azemi T F, Bisht K S. *J Polym Sci Part A Polym Chem*, 2002, 40: 1267 ~ 1274
- 6 Gross R A, Kumar A, Kalra B. *Chem Rev*, 2001, 101: 2097 ~ 2124
- 7 Nomura R, Ueno A, Endo T. *Macromolecules*, 1994, 27: 620 ~ 621
- 8 Feng J, He F, Zhuo R X. *Macromolecules*, 2002, 35(19): 7175 ~ 7177
- 9 Kricheldorf H R, Lee S R, Weegen-Schulz B. *Macromol Chem Phys*, 1995, 197: 1043 ~ 1054
- 10 Matsuo J, Sanda F, Endo T. *J Polym Sci Part A Polym Chem*, 1997, 35: 1375 ~ 1380
- 11 Matsuo J, Nakano F, Sanda F, Endo T. *J Polym Sci Part A Polym Chem*, 1998, 36: 2463 ~ 2471
- 12 Shibasaki Y, Sanda F, Endo T. *Macromolecules*, 2000, 33: 3630 ~ 3633
- 13 Shibasaki Y, Sanda F, Endo T. *Macromol Rapid Commun*, 1999, 10: 532 ~ 535
- 14 Kricheldorf H R, Mahler A. *J Polym Sci Part A Polym Chem*, 1996, 34: 2399 ~ 2406
- 15 Feng J, He F, Zhuo R X. *Macromol Symp*, 2003, 195: 237 ~ 240
- 16 Bisht K S, Henderson L A, Gross R A, Kaplan D L, Swift G. *Macromolecules*, 1997, 30: 2705 ~ 2711
- 17 Bisht K S, Svirkin Y Y, Henderson L A, Gross R A, Kaplan D L, Swift G. *Macromolecules*, 1997, 30: 7735 ~ 7742
- 18 Kumar A, Gross R A. *Biomacromolecules*, 2000, 1: 133 ~ 138
- 19 Mei Y, Kumar A, Gross R A. *Macromolecules*, 2003, 36: 5530 ~ 5536

NOVOZYM-435 CATALYZED RING-OPENING POLYMERIZATION OF A MACROCYCLIC CARBONATE

FENG Jun, WANG Huafen, LI Shuangfeng, ZHUO Renxi

(Key Laboratory of Biomedical Polymers (Ministry of Education), Chemistry Department, Wuhan University, Wuhan 430072)

Abstract Biodegradable aliphatic polycarbonates have attracted great attentions as an important kind of biomedical materials. In this study metal-free ring-opening polymerization of 14-membered dimmer, cyclobis(tetramethylene carbonate) [(TeMC)₂] was attempted at 75°C in toluene and in the presence of porcine pancreas lipase (PPL), candida rugosa lipase (Lipase AYS) or immobilized lipase Novozyme-435 to afford poly(tetramethylene carbonate). It was found that Novozyme-435 exhibited comparatively high catalytic activity with Sn(Oct)₂ while PPL and AYS exhibited no obvious activity to the polymerization of (TeMC)₂ with respect to the conversion and molecular weight. Optimal reaction conditions including monomer concentration and Novozyme-435 concentration were explored in an effort to positively influence the outcome of the ring-opening polymerization. The polymerization rate was markedly increased with increasing the enzyme concentration. A region exists around toluene/(TeMC)₂ (mL/g) ratio of 4:1 where Novozyme-435-catalyzed polymerizations could result in higher molecular weight and monomer conversion. It is interesting to point out that in the absence of toluene, the solid-phase polymerization could also occur at predetermined temperature of 75°C, which was much lower than the melting point of (TeMC)₂ ($T_m = 170 \sim 172^\circ\text{C}$). The result of kinetic studies of polymerization showed that Novozym-435-catalyzed polymerization of (TeMC)₂ did not behave living characteristics reported for that of ϵ -caprolactone. The experimental data also indicated that the immobilized lipase Novozyme-435 could be repeatedly used with high activity.

Keywords Aliphatic polycarbonate, Enzymatic ring-opening polymerization, Novozym-435, Poly(tetramethylene carbonate)