

富含氨基的聚酰胺-胺树枝状大分子的合成与表征

徐珍霞, 孙程, 陈福生, 吴仁蔚*

(华中农业大学食品科学技术学院, 武汉 430070)

摘要:以乙二胺(EDA)和丙烯酸甲酯(MA)为原料,采用发散法合成了0.5代到3.0代聚酰胺-胺(PAMAM)树枝状大分子。分别考察了反应温度、反应时间对半代及整代PAMAM树枝状大分子合成工艺的影响,并对合成的PAMAM产物进行了傅里叶变换红外光谱(FTIR)、高效液相色谱(HPLC)表征及端基滴定分析。实验结果表明,生成PAMAM半代及整代产物的最适反应温度均为25℃,反应时间为24h;采用该方法合成的3.0G PAMAM树枝状大分子的纯度为88.22%,表面伯胺数约为16个,与理论值一致。合成的PAMAM树状分子表层富含大量的氨基基团,可以与抗体、核酸适体等功能分子结合而应用于食品安全检测和医药领域。

关键词: 树枝状大分子; 聚酰胺-胺; 合成; 表征

中图分类号: O633.22

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X(2018)04-0772-05

Synthesis and characterization of polyamidoamine dendrimers with amine groups

XU Zhenxia, SUN Cheng, CHEN Fusheng, WU Renwei

(College of Food Science & Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Abstract: Polyamidoamine (PAMAM) dendrimers were synthesized by divergent method using ethylenediamine (EDA) and methyl acrylate (MA) as raw materials. The effects of reaction temperature and reaction time on the synthesis of half-generation and full-generation PAMAM dendrimers were investigated. PAMAM was characterized by FTIR, HPLC and end-group titration analysis. The experimental results showed that the optimum reaction temperature and reaction time was 25℃ and 24 h, respectively. The purity of 3.0G PAMAM dendrimers synthesized by this method was 88.22%. And the number of primary amines of 3.0G PAMAM was about 16, which is consistent with the theoretical value. A large number of amino groups of PAMAM dendrimers can be combined with antibodies, aptamers and other functional molecules for food safety testing and medicinal field.

Key words: dendrimer; polyamidoamine; synthesis; characterization

聚酰胺-胺 (polyamidoamine, PAMAM) 树枝状大分子是一类分子结构高度支化的纳米材料^[1], 主要由中心核、分支和表面官能团组成^[2-3], 具有高正表面电荷^[4]、无免疫原性^[5]、低细胞毒性^[6]、生物兼容性^[7-8]等特性, 已被广泛地应用于食品检测、生物医药等领域, 如 Dong 等^[9]利用 PAMAM 开发的新型无标记电化学阻抗免疫传感器能检测到 5.0×10^2 CFU·mL⁻¹ 的鼠伤寒沙门氏菌; Castillo 等^[10]采用 PAMAM-适配体复合物可实现对浓度低至 (0.40 ± 0.03) nmol·L⁻¹ 黄曲霉毒素 B1 的直接电化学检测; Mollazade 等^[11]将疏水性的姜黄素包封在

PAMAM 树状分子内部可增强姜黄素对乳腺癌细胞的抗增殖作用。

PAMAM 树枝状大分子的合成主要有 3 种方法, 即发散法、收敛法和发散收敛共用法^[12]。其中, 发散法由 Michael 加成和酰胺化缩合反应组成, 该法简单直观、分子量增长迅速, 是合成 PAMAM 树状分子时应用最多的一种方法^[13-15]。1985 年, Tomalia 等^[16]首次通过发散法以氨为核合成了 PAMAM 树状大分子; 2001 年, 王俊等^[17]以乙二胺为核优化了反应时间、温度和投料比等影响因素, 为后续合成研究奠定了基础; 崔玉花等^[18]结合萃取

收稿日期: 2017-12-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(31201374)和中央高校基本科研业务费专项资金(2662015PY152)共同资助。

作者简介: 徐珍霞, 硕士研究生。E-mail: xzx1106954014@qq.com

* 通信作者: 吴仁蔚, 博士, 副教授。E-mail: wurenwei@mail.hzau.edu.cn

分离与旋转蒸发对 PAMAM 树状分子进行分离提纯以提高产物纯度。

本研究以乙二胺为初始核, 采用发散法通过 Michael 加成和酰胺化缩合两步重复的反应步骤逐代合成 0.5G 到 3.0G PAMAM 树枝状大分子, 每步合成反应后均经过多次旋转蒸馏对产物分子进行纯化以减少结构缺陷物的存在, 并首次通过红外光谱分析、高效液相色谱和端基滴定 3 种技术同步实时监测合成产物的支化度及表面官能团种类和数量, 确保其结构的完整性, 为 PAMAM 树枝状聚合物的合成及应用提供技术支持。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

乙二胺 (EDA)、丙烯酸甲酯 (MA)、无水甲醇 购自国药集团化学试剂有限公司, 均为分析纯。DF-101S 集热式磁力搅拌器, 武汉科尔仪器设备有限公司; RE-52AA 旋转蒸发器, 郑州长城科工贸有限公司; Nexus 470 傅里叶红外光谱仪, 美国 Nicolet 公司; 岛津 LC-20A 型高效液相色谱仪, 日本岛津公司; PY-ASI 型 pH 计, 赛多利斯 (上海) 贸易有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 0.5G PAMAM 的合成 将 9.0 g (150 mmol) EDA 和 32 g (1.0 mol) 甲醇加入到 250 mL 圆底三口烧瓶中, 于磁力搅拌器在冰盐浴条件下搅拌均匀; 通 N_2 除氧, 用恒压滴液漏斗逐滴滴加 103.2 g (1.2 mol) MA, 控制滴加速度 $1 \text{ 滴} \cdot \text{s}^{-1}$; 滴加完成后, 冰盐浴条件下继续匀速搅拌 30 min; 升温使反应体系温度分别保持在 25、35 和 45 $^{\circ}\text{C}$, 磁力搅拌反应时间分别为 12、24、36 和 48 h。反应完成后, 将所得产物在 58 $^{\circ}\text{C}$ 、真空度 0.098 Mpa 的条件下进行多次减压旋转蒸馏提纯, 除去溶剂甲醇和过量的原料 MA 等至恒重, 得到淡黄色透明液体, 即为 0.5G PAMAM。

按比例逐渐增加 MA 的用量, 采用 1.2.1 的方法即可逐代合成 1.5G 和 2.5G PAMAM 树枝状大分子。

1.2.2 1.0G PAMAM 的合成 将 20.2 g (50 mmol) 0.5G PAMAM 和 64 g (2.0 mol) 甲醇加入到 250 mL 圆底三口烧瓶中, 于磁力搅拌器在冰盐浴条件下搅拌均匀; 通 N_2 除氧, 用恒压滴液漏斗逐滴滴加 72 g (1.2 mol) EDA, 控制滴加速度 $1 \text{ 滴} \cdot \text{s}^{-1}$; 滴加完成后, 冰盐浴条件下继续匀速搅拌 30 min; 升温使反应体系温度分别保持在 25、35 和 45 $^{\circ}\text{C}$, 磁力搅拌

反应时间分别为 12、24、36 和 48 h。反应完成后, 将所得产物在 72 $^{\circ}\text{C}$ 、真空度 0.098 Mpa 的条件下进行多次减压旋转蒸馏除去溶剂甲醇和过量的原料 EDA 等, 待无馏分流出后继续减压旋蒸 1 h, 得到淡黄色粘稠状液体, 即为 1.0G PAMAM。

按比例逐渐增加 EDA 的用量, 采用 1.2.2 的方法即可逐代合成 2.0G 和 3.0G PAMAM 树枝状大分子。

1.2.3 PAMAM 树枝状大分子的表征分析 产率计算: 采用称重法, 通过计算所得 PAMAM 树枝状大分子的实际质量与理论质量的比值即可得到其产率。

傅里叶红外光谱分析: 采用液膜法制片, 扫描波数范围为 $400 \sim 4\,000 \text{ cm}^{-1}$ 。

高效液相色谱分析: 色谱条件: UV-100 可变波长紫外检测器, $\lambda = 210 \text{ nm}$, 流动相 $V(\text{甲醇}):V(\text{水}) = 60:40$, 流速 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 进样体积 $20 \mu\text{L}$ 。PAMAM 树状分子的纯度可通过 HPLC 峰面积归一化法进行定量分析, 色谱图中的主峰与纯的单一树状分子相对应, 因此主峰在色谱图中所占面积的百分数即可定义为该物质的纯度。

端基滴定分析: 整代 PAMAM 树状分子中伯胺和叔胺的 pKa 值差异很大, 分别为 4~5 和 9~10, 采用酸碱滴定法可以很好地表征其表面胺基数量, 因此参照陈胜福等^[19-20]的方法对整代 PAMAM 树状分子进行端基滴定分析, 并对其叔胺及伯胺数进行计算。

2 结果与分析

2.1 PAMAM 树枝状大分子合成条件的优化

由于该合成反应由 Michael 加成和酰胺化反应两步重复的反应过程组成, 因此本研究仅考虑反应温度和反应时间对 0.5G 和 1.0G 两代 PAMAM 树枝状大分子合成的影响。

2.1.1 反应温度 从表 1 可以看出, 对于 0.5G PAMAM 树枝状大分子, 当反应温度为 25 $^{\circ}\text{C}$ 时其产率可达 97.5%, 纯度为 90.6%, 但当温度进一步升高时, 其产率和纯度均有所降低, 可能的原因为: 此 Michael 加成反应属放热反应, 随着温度升高反应放热较快不能及时散热, 从而引发了副反应的产生, 如原料 MA 易发生自身的双键热聚合, 生成聚丙烯酸甲酯副产物; 所得产物发生分子内的酰胺化环化、分子间的桥联及逆 Michael 加成反应等^[21]。这些副反应会破坏树枝状大分子特有的规整度及单分散性, 造成 PAMAM 树枝状大分子的分子结构缺

陷,使所需产物的产率和纯度较低。因此,合成半代产物的最适反应温度为 25℃。

表 1 反应温度对 0.5G 和 1.0G PAMAM 树枝状大分子产率和纯度的影响

Table 1 Effects of reaction temperature on yield and purity of 0.5G and 1.0G PAMAM dendrimers

PAMAM 树枝状大分子 PAMAM dendrimers	温度/℃ Temperature	产率/% Yield	纯度/% Purity
0.5G	25	97.5	90.6
	35	93.9	88.7
	45	83.7	86.0
1.0G	25	99.3	98.8
	35	84.9	99.1
	45	83.2	99.6

对于 1.0G PAMAM 树枝状大分子而言,25、35 和 45℃ 3 个温度下所得产物的纯度差别不大,但 25℃ 反应产物的产率明显高于 35 和 45℃ 反应产物,由此可见,该酰胺化缩合反应适合在较低的温度下进行,故合成整代产物的反应温度选择为 25℃。

2.1.2 反应时间 0.5G PAMAM 树枝状大分子的产率在 24 h 时最高,在反应初始的前 12 h EDA 与 MA 的 Michael 加成反应较为迅速,到 24 h 时加成反应基本完成,产率达到了 97.5%,之后随着反应时间的继续延长产率有所降低,并随之由于副反应的进行,产物纯度降低,因此综合考虑产物产率和纯度,0.5G PAMAM 树枝状大分子的最佳反应时间为 24 h。

合成 1.0G PAMAM 树枝状大分子,在反应之初,随着反应时间增加,0.5G PAMAM 的 4 个酯基的氨解反应进行得比较完全,PAMAM 树枝状大分子的产率也随之增加,但继续增加反应时间其产率降低。由此表明,适当地延长反应时间有利于产物

的合成,但进一步地延长反应时间会促进副反应的进行。因此,综合考虑产物的产率和纯度,选择 1.0G PAMAM 树枝状大分子适宜的反应时间为 24 h。

表 2 反应时间对 0.5G 和 1.0G PAMAM 树枝状大分子产率和纯度的影响

Table 2 Effects of reaction time on yield and purity of 0.5G and 1.0G PAMAM dendrimers

PAMAM 树枝状大分子 PAMAM dendrimers	时间/h Time	产率/% Yield	纯度/% Purity
0.5G	12	93.2	89.0
	24	97.5	90.6
	36	90.0	89.9
1.0G	48	88.4	88.0
	12	82.8	99.3
	24	99.3	98.8
	36	94.7	98.4
	48	86.6	99.4

2.2 PAMAM 树枝状大分子的表征

2.2.1 傅里叶变换红外光谱分析 半代 PAMAM 树枝状大分子的红外光谱图如图 1 (A) 所示。对于 0.5G PAMAM 而言,1 724 cm^{-1} 处的强吸收峰为羰基的特征吸收峰,1 172 cm^{-1} 处为 C-O-C 的伸缩振动,这 2 组峰同时出现证实分子中存在 -COO-; 2 952 和 2 825 cm^{-1} 处的吸收峰分别为 -CH₃、-CH₂- 的伸缩振动; 1 436 和 1 350 cm^{-1} 分别为 -CH₂- 和 -CH₃ 的弯曲振动; 1 038 cm^{-1} 处为 C-N 的特征吸收。与 0.5G 的红外谱图相比,1.5G 和 2.5G 产物在 3 285、1 650 和 1 533 cm^{-1} 出现了酰胺的特征吸收峰。其中,3 285 cm^{-1} 处的吸收峰为 -NH- 的伸缩振动,1 650 和 1 533 cm^{-1} 处的吸收峰分别为酰胺基中 C=O 和 -NH- 的伸缩振动,称为酰胺 I、II 带。红外光谱图均与理论结构特征相符。

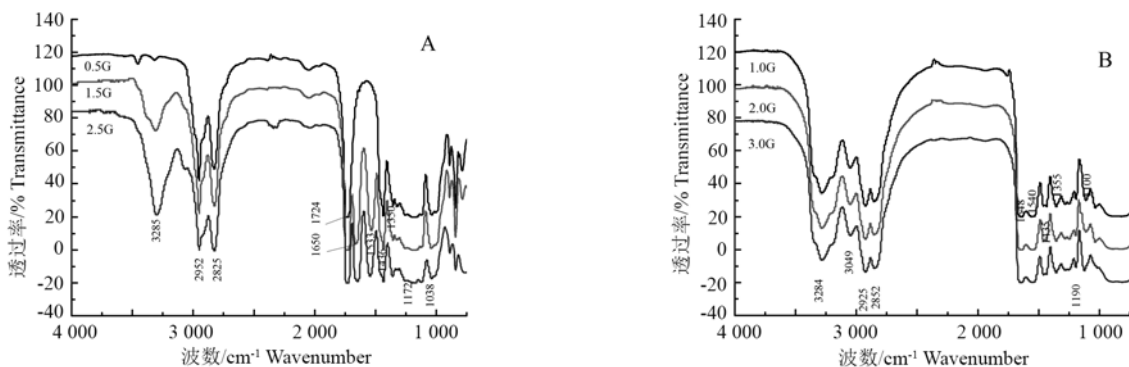


图 1 半代 (A) 与整代 (B) PAMAM 树枝状大分子的红外光谱

Figure 1 FTIR of half-generations (A) and full-generations (B) PAMAM dendrimers

整代 PAMAM 树枝状大分子的红外光谱图如图 1 (B) 所示。由于 2.0G、3.0G PAMAM 产物与 1.0G

PAMAM 产物所含官能团的种类相同,只是其支化度不同,因此它们具有相似的峰形。3 284 和 3 049

cm^{-1} 处的峰分别是缔合 N-H 与自由 N-H 的伸缩振动吸收峰; $2\ 925$ 和 $2\ 852\ \text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰分别是 $-\text{CH}_2-$ 的不对称和对称伸缩振动峰; $1\ 648$ 和 $1\ 540\ \text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰分别对应于酰胺键中 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动和 $-\text{NH}-$ 弯曲振动, 分别为酰胺 I 和 II 带; $1\ 435\ \text{cm}^{-1}$ 是 $-\text{CH}_2-$ 的弯曲振动; $1\ 190$ 和 $1\ 100\ \text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰分别为伯胺和叔胺中 $\text{C}-\text{N}$ 的伸缩振动。 $1\ 724\ \text{cm}^{-1}$ 处羰基的伸缩振动吸收峰消失, 说明整代 PAMAM 是氨基封端的。此结果也与其理论结构特征相符。

2.2.2 高效液相色谱分析 按上述方法合成的 PAMAM 树枝状大分子用 HPLC 面积归一化法测得

0.5G 纯度为 90.6%, 1.0G 纯度为 98.8%, 1.5G 纯度为 90.59%, 2.0G 纯度为 99.24%, 2.5G 纯度为 89.91%, 3.0G 纯度为 88.22%。从液相图 (图 2) 分析结果可知, 随着代数增加, 产物纯度有所降低, 可能的原因是: 高代树状分子具有更大的内部空腔, 空腔内包含过量的乙二胺分子作为新的引发核生成的树枝状聚合物低聚体 (二聚体, 三聚体等)、拖尾代树枝状聚合物, 或残留的原料乙二胺和丙烯酸甲酯^[22-23], 其很难通过旋转蒸发、萃取除去, 造成产物不纯。

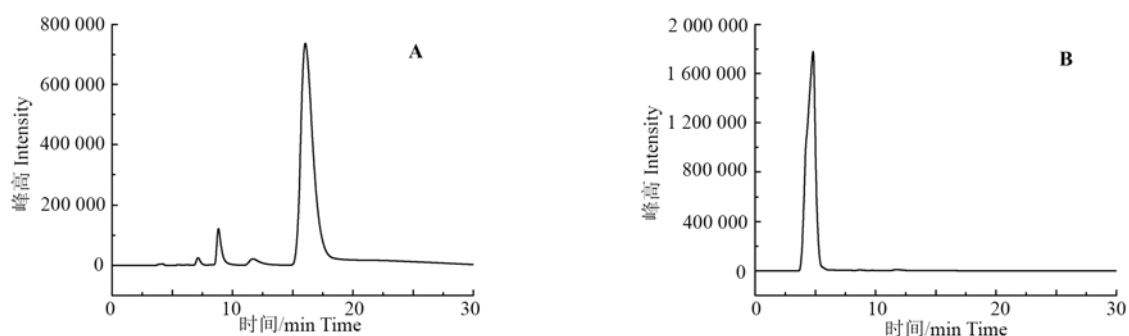


图 2 0.5G (A) 和 1.0G (B) PAMAM 树枝状大分子的高效液相色谱

Figure 2 HPLC of 0.5G (A) and 1.0G (B) PAMAM dendrimers

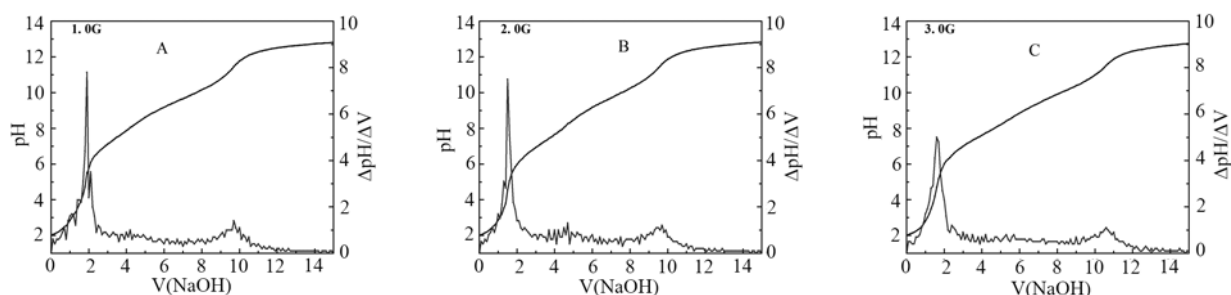


图 3 1.0G~3.0G PAMAM 树枝状大分子的电位滴定及差分曲线

Figure 3 Potentiometric titration and differential curves of 1.0G-3.0G PAMAM dendrimers

2.2.3 端基滴定 从图 3 的滴定曲线可以看出, 滴定时, 当滴加的 NaOH 用量与过量的 HCl 刚好发生完全中和时, pH 值产生第一次突跃; 继续滴加, 由于伯胺的碱性比叔胺强, 故叔胺首先释放出游离的胺与 NaOH 反应, 反应完毕, pH 值产生第 2 次突跃; 继续滴加, NaOH 与伯胺的氢离子发生中和, 反应完毕后 pH 值产生第 3 次突跃^[24]。根据 3 次 pH 突变点, 即可推测出整代 PAMAM 中所含伯胺和叔胺的数量。

对于 1.0G、2.0G 和 3.0G PAMAM 树状分子, 实验所测聚合物表面的伯胺数分别为 4、8 和 16 个, 结果与理论值一致, 说明采用此方法较好地合成了

树状分子。

3 讨论与结论

采用发散法合成了 0.5G~3.0G PAMAM 树枝状大分子, 优化了反应温度、反应时间对合成产物的影响, 确定生成半代及整代产物的反应温度为 $25\ ^\circ\text{C}$, 反应时间为 24 h, 每代产物的产率均可达 95% 以上, 但高代产物纯度明显降低, 需对其纯化方法进行探究以提高产品的纯度; 聚合物表面携带较多的官能团, 可对其进行修饰改性, 为连接功能分子提供基础, 从而使树枝状大分子能更高效地应用于食品检测和医药方面。

参考文献:

- [1] KAUR I, BHATI P, KUMAR S. Synthesis, characterization and metal ion uptake studies of PAMAM dendrimers on solid support[J]. Res Rev Polymer, 2015, 6(1):32-41.
- [2] KHAMBETE H, JAIN N P, JAIN C P. Optimization and evaluation of process variables for synthesis of PAMAM dendrimer[J]. Int J Pharm Life Sci, 2017, 8(2): 5483- 5490.
- [3] KAUR D, JAIN K, MEHRA N K, et al. A review on comparative study of PPI and PAMAM dendrimers[J]. J Nanopart Res, 2016, 18(6): 1-14.
- [4] YABBAROV N G, NIKOLSKAYA E D, ZHUNINA O A, et al. Polyamidoamine dendrimers with different surface charge as carriers in anticancer drug delivery[J]. Russ J Bioorg Chem, 2017, 43(2): 155-162.
- [5] AZAR N T P, MUTLU P, KHODADUST R, et al. Poly (amidoamine)(PAMAM) nanoparticles: synthesis and biomedical applications[J]. J Biol Chem, 2013, 41(3): 289-299.
- [6] GUO L J, WANG C H, YANG C P, et al. Morpholino-terminated dendrimer shows enhanced tumor pH-triggered cellular uptake, prolonged circulation time, and low cytotoxicity[J]. Polymer, 2016, 84: 189-197.
- [7] MARKOWICZ-PIASECKA M, LUCZAK E, CHALUBIŃSKI M, et al. Studies towards biocompatibility of PAMAM dendrimers: Overall hemostasis potential and integrity of the human aortic endothelial barrier[J]. Int J Pharm, 2014, 473(1/2): 158-169.
- [8] NGUYEN C K, TRAN N Q, NGUYEN T P, et al. Biocompatible nanomaterials based on dendrimers, hydrogels and hydrogel nanocomposites for use in biomedicine[J]. Adv Nat Sci-Nanosci, 2017, 8(1): 015001.
- [9] DONG J, ZHAO H, XU M R, et al. A label-free electrochemical impedance immunosensor based on AuNPs/PAMAM-MWCNT-CHI nanocomposite modified glassy carbon electrode for detection of *Salmonella typhimurium* in milk[J]. Food Chem, 2013, 141(3): 1980- 1986.
- [10] CASTILLO G, SPINELLA K, POTURNAYOVÁ A, et al. Detection of aflatoxin B1 by aptamer-based biosensor using PAMAM dendrimers as immobilization platform[J]. Food Control, 2015, 52: 9-18.
- [11] MOLLAZADE M, NEJATI-KOSHKI K, AKBARZADEH A, et al. PAMAM dendrimers augment inhibitory effects of curcumin on cancer cell proliferation: possible inhibition of telomerase[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2013, 14(11): 6925-6928.
- [12] TAGHAVI POURIANAZAR N, MUTLU P, GUNDUZ U. Bioapplications of poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers in nanomedicine[J]. J Nanopart Res, 2014, 16(4): 1-38.
- [13] 周雪梅, 张伟禄, 史小妮. 4.0G-PAMAM(树状聚酰胺-胺)的合成和表征[J]. 辽宁化工, 2011, 40(2): 130-131.
- [14] ERTÜRK A S, TULÜ M, BOZDOĞAN A E, et al. Microwave assisted synthesis of Jeffamine cored PAMAM dendrimers[J]. Eur Polym J, 2014, 52: 218-226.
- [15] ABBASI E, AVAL S F, AKBARZADEH A, et al. Dendrimers: synthesis, applications, and properties [J]. Nano-scale Res Lett, 2014, 9(1): 247.
- [16] TOMALIA D A, BAKER H, DEWALD J, et al. A new class of polymers: starburst-dendritic macromolecules[J]. Polym J, 1985, 17(1): 117-132.
- [17] 王俊, 杨锦宗, 陈红侠, 等. 发散法合成树枝状高分子聚酰胺-胺[J]. 合成化学, 2001, 9(1): 62-64.
- [18] 崔玉花, 杨金红, 崔玉, 等. 高纯度树状大分子聚酰胺-胺的合成与表征[J]. 应用化学, 2012, 29(5): 498-503.
- [19] NIU Y H, SUN L, CROOKS R M. Determination of the intrinsic proton binding constants for poly (amidoamine) dendrimers via potentiometric pH titration[J]. Macromolecules, 2003, 36(15): 5725-5731.
- [20] 陈胜福, 黄坚, 曾涛, 等. 聚酰胺-胺的酸碱电位滴定分析[J]. 广州化学, 2007, 32(2): 57-61.
- [21] 赵莹, 梁骁男, 杨世杰, 等. 树枝状大分子聚酰胺-胺的合成[J]. 精细石油化工进展, 2014, 15(5): 29-31.
- [22] FICKER M, PAOLUCCI V, CHRISTENSEN J B. Improved large-scale synthesis and characterization of small and medium generation PAMAM dendrimers[J]. Can J Chem, 2017, 95(9): 954-964.
- [23] MULLEN D G, DESAI A, VAN DONGEN M A, et al. Best practices for purification and characterization of PAMAM dendrimer[J]. Macromolecules, 2012, 45(12): 5316-5320.
- [24] LIU Y, BRYANTSEV V S, DIALLO M S, et al. PAMAM dendrimers undergo pH responsive conformational changes without swelling[J]. J Am Chem Soc, 2009, 131(8): 2798-2799.