

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

聚離胺酸樹狀高分子的合成與奈米型態結構

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2216-E-032-003-

執行期間：92年08月01日至93年07月31日

執行單位：淡江大學化學工程與材料工程學系

計畫主持人：林達鎔

計畫參與人員：林達鎔，劉國勝，林俊良，黃郁馨，陳建仰，

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 10 月 12 日

聚離氨酸樹狀高分子的合成與奈米型態結構研究

Study of Synthesis and Nano-scale Morphology of Poly-Lysine Dendrimer

林達鎔、劉國勝

淡江大學化學工程與材料工程系

一、摘要

樹狀高分子，是一種新穎且可能展現具有奈米分子特性的材料。由於樹狀高分子可能擁有內部架構與表層官能基團的不同化學結構，因此同時展現總體的與奈米界面的特性。因為有機溶劑對離氨酸的溶解度受限制，使得樹狀聚離氨酸的合成受到相當限制。本研究選擇有機溶劑與水的混合溶液系統當作溶劑，探討影響離氨酸聚合反應的熱力學的因素與動力學的機制，例如溫度、反應時間、加入的除水反應化合物等。我們以批式的反應聚合方式來合成樹狀聚離氨酸高分子。其化學結構與反應的分析是使用紅外線光譜儀、核磁共振儀等儀器。紅外線光譜儀的結果顯示有醯胺鍵結，證明聚合反應成功。物理性質與形態結構的檢測，則利用穿透式電子顯微鏡及微差掃描式熱分析儀，穿透式電子顯微鏡所測得的顆粒大小大約在 2.5~3nm 左右；分子量則利用電灑式質譜儀來檢測，大約為 8000 左右。本研究的主要目標是要建立樹狀聚離氨酸高分子的合成技術，分子量與其分布的控制，樹狀化學結構的完整性等的探討。

關鍵詞：樹狀高分子，聚離氨酸，奈米材料，合成

Abstract

Dendrimer is a novel type of polymer that may impart nano-scale characteristics. It contains functional moieties at its outer layer structure and has both bulk and interfacial properties. Since lysine is nearly immiscible in organic solvent except water, the polymerization of lysine was not easily accessible. Therefore, we employed binary solvent mixture (DMSO and water) to study the thermodynamic and kinetic features of the polymerization of lysine. The reaction in batch process was investigated. The chemical structure was analysed by using FTIR and NMR. The result of FTIR showed the formation of amide bonding, which can proved that the polymerization was achieved. Physical properties and morphology of dendrimers were characterized by TEM and DSC. TEM found that the particle size was about 2.5~3nm. Molecular weight of dendrimers characterized by ESI-Mass is about 8000.

Key Words: Dendrimer, Poly-lysine, Nano material, synthesis

二、前言、目的與文獻探討

樹狀高分子 Poly(Dendrimer)或簡稱 Dendrimers，是一種新穎且可能展現具有奈米分子特性的材料。如以樹狀高分子與線性高分子的性質做比較，樹狀高分子具有以下特性^[1]：(1)低黏度、(2)高溶解度、(3)較多的末端官能基、(4)較高的化學反應活性。由於樹狀高分子的特殊空間結構，及其未來的應用範圍廣泛，雖然到目前為止仍然只依賴幾種較有效的合成步驟，然而，卻吸引眾多研究學者及產業界積極投入樹狀高分子的合成與分子設計及其豐富應用領域的討論。

樹狀高分子合成的第一個例子是 Vogtle 在 1978 年所發表^[2]，當時他把重複合成步驟命名為「Cascade Synthesis」，其產物為「Cascade Molecules」。直到 1985 年，Tomalia 的 PAMAM dendrimer，^[3]和 Newkome 的「Arborol」發表^[4,5]，樹狀高分子才廣泛的被重視。此時所合成的樹狀高分子都是由核心發散的方式，即由內向外逐步合成。到了 1990 年，Fréchet^[6-8]發表了以收斂(Convergent)的方式，合成芳香族聚醚型樹狀高分子，因其合成方法與之前方法比較，可以比較容易得到樹狀高分子，因此引發許多學者相繼參與研究芳香族聚醚型樹狀高分子。由於樹狀高分子的大小約為 10~20nm 左右，並且由於其分子架構的綿密性，理論上可以避免分子間的纏繞現象，因此表面物理化學性質的特殊現象，將使得樹狀高分子應用在奈米技術上，具有本質上的優異特質。近年來，樹狀高分子在生物醫學領域之應用逐漸受到各界注目，主要原因有：(1)奈米科技的迅速發展與進步，使得人們對於奈米醫學或奈米醫藥充滿無限期望，而樹狀高分子的多元性以及性使其成為進入奈米醫學之最佳利器。(2)傳統的高分子為直鏈狀，分子量與分子形態比較不容易控制，對於藥物的釋放控制與傳輸無法精確掌握；相對的，一般認為樹狀高分子有著較優異且精準的結構及形態，應該可以提供藥物傳輸上更好的掌控。

樹狀高分子結構的 Poly-Lysine Dendrimer，最早的研究為 1981 年由 Denkwalter^[9]等人發表的美國專利。其中離胺酸先與 Di(t-butyl)dicarbonate (DBC) 配製成 N,N'-Di(t-butylloxycarbonyl)Lysine (DBL)即是形成 urethane 胺酯基團，把離胺酸的氨基先行鎖住。接著把 DBL 與 Dicyclohexylcarbodiimide (DCC)及 Benzhydrylamine (BHA) 混合，使其反應行成 Amide (DBL)(BHA)。再用 Trifluoroacetic acid (TFA)把(DBL)(BHA)中的胺酯基團，還原回氨基的結構，形成 Lys(BHA)。另外，把 DBL、DCC 與 p-nitrophenol 一起反應得到 DBL-PNE 的酯類化合物。取 1 個當量的 Lys(BHA)與 2 個當量的 DBL-PNE 反應就可得到 (DBL)₂Lys(BHA)，用 TFA 把其中的胺酯基團還原回氨基的結構，產物為 Lys₂Lys(BHA)，其樹枝狀的結構末梢含有 4 個氨基。重複類似的反應方式，就可以依序得到樹枝狀的結構末梢含有 8 個氨基的分子 Lys₄Lys₂Lys(BHA)，餘此類推。

1993 年，René Roy^[10]等人發表了利用固相合成方式配製聚離胺酸的樹狀高分子，主要在於避免如前述方法的發散式或收斂式的合成方法所衍生的技術上的缺點。其最初是以丙胺酸(β -alanyl spacer)當成固相與合成的樹狀高分子之間的

間隔連接分子，先反應接在 Poly[styrene-co-4-(hydroxy methyl)phenoxy methyl] resin (Wang resin) 固體上。接著再以 2 個當量的 N^α-N^ε-di-fmoc-L-Lysine benzotriazolyl ester 的預先合成之前置體，利用 Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl (fmoc) 的化學反應特性，將第一代離胺酸接在 Wang resin 的丙胺酸上。其中使用 1-hydroxy benzotriazol (HOBt)、diisopropylcarbodiimide (DIPC) 與 N^α-N^ε-di-fmoc-L-Lysine 在 DMF 溶劑中反應合成前述之酯化的前置體化合物。接續的反應，則以 20% 的六氫吡啶 piperidine 的 DMF 溶液先移除 fmoc 使其還原回氨基，再以酯化的前置體進行第二代的鏈段成長反應。餘此類推，反應一直以在固體載體的外圍方向上，逐次進行以合成樹狀高分子。

在 1994 年，Toby M. Chapman^[11] 等人發表在液相中的樹狀高分子合成方式，配製的線性 PEO 與樹狀 Poly-Lysine 的段式共聚合體。如前述的研究選擇一種載體，由於其中的載體 Poly(ethylene oxide) (PEO)，在反應的進行過程中溶解在反應溶液裡，因此可視為均相的液態反應程序。首先以 Boc-glycine 與 PEO 行酯化反應，接著除去保護基團 Boc，在以 pentafluorophenyl N^α-N^ε-di-Boc-L-lysinate，來進行成長的反應。其中以 1:1 的 Trifluoroacetic acid (TFA) 與 CH₂Cl₂ 來移除保護基團 Boc (tert-butoxycarbonyl)。類似的方式，J. S. Choi^[12, 13] 等人研究合成含有聚離胺酸樹狀高分子的段式共聚合體，用來探討高分子與 DNA 的自行組織複合體的現象。Gaor Mezo^[14] 等人與 T. Sakthivel^[15] 等人研究以固態載體的合成方式來得到聚離胺酸樹狀高分子，而應用到藥物的控制釋放。

三、研究方法

一、實驗材料

1. 離胺酸(L-2,6-Diaminohexanoic Acid)
2. 二甲亞砜(DMSO)
3. 氫化鈣(Calcium Hydride)
4. 蒸餾去離子水 (H₂O)，自備

二、實驗方法

本實驗以二成份的有機溶液(DMSO 及水)將離胺酸溶解，在適當的溶液環境，將離胺酸上的羧酸基與氨基聚合成醯胺基。促使離胺酸單體上的兩個氨基及一個羧酸基的有效聚合，以使之合成為樹狀高分子。由於反應條件與狀況與文獻上不同，本實驗將探討反應條件中的反應時間、溫度、濃度、反應物添加步驟等，及分離純化。因此，目標以能較為精確的控制分子量，來合成出聚離胺酸樹狀高分子，並加以建立鑑定與檢測的基本技術。期望能夠達成免去複雜及耗時的化學合成聚離胺酸樹狀高分子之程序，進而創新開發新的合成技術。

由於離胺酸(Lysine)具有一個羧酸基與兩個氨基，常溫下為結晶形態的分子。對大部分的單一有機溶劑的溶解度都非常小，幾乎僅溶解於水。在聚合的過

程中，縮合反應會產生水分子，因此溶劑的水含量越低越好。另外，也要避開具有羧酸基與氨基的溶劑。我們在實驗中已經找到適合能與水混合的有機溶劑的溶液溶劑系統，如 DMSO。在這種適當的溶液環境中溶解離胺酸，雖然其溶解度也相當有限，不過實驗結果已證實為可行的系統。所以，在本實驗中，我們將選擇 DMSO 作為溶劑系統，進行較為完整深入的探討。

首先我們利用前述的溶液反應系統，以最簡化的批式(batch)方式，將離胺酸上的羧酸基與氨基聚合成醯胺基，實驗中將探討反應條件中的各個步驟的反應時間、溫度、濃度、酸鹼值等，以及分離純化。

在聚合反應促進的除水的步驟中，除去水分子的方式可以用物理方式的移除如真空抽除；或者用化學方式的除水反應物，如氫化鈣(CaH₂)。目標以能較為精確的控制分子量大小，促使離胺酸單體上的兩個氨基及一個羧酸基的有效的聚合，來合成出聚離胺酸樹狀高分子，並加以建立鑑定與檢測的基本技術。其中對於反應的分析與樹狀聚離胺酸高分子的化學結構特性，FTIR 與 NMR 的 H 與 ¹³C 光譜為基本的檢測。由於線性的聚離胺酸具有結晶特性，而相反的，樹狀聚離胺酸高分子為非結晶性，因此 DSC 可當成為輔助的檢測。其他如 ESI-Mass、TEM 等用來分析樹狀聚離胺酸高分子的分子量的大小與分佈的情況。

三、實驗設備與分析儀器

1. 夾套式反應器
2. 電灑式質譜儀(Electrospray mass spectrometry, ESI-MS)
3. 穿透式電子顯微鏡(Transmitting Electron Microscope, TEM)
4. 傅立葉轉換紅外線光譜儀(Fourier Transform Infrared Spectrometer, FTIR)
5. 核磁共振光譜儀(Nuclear Magnetic Responses, NMR)
6. 微差掃描式熱分析儀 (Differential Scanning Calorimeter, DSC)

四、結果與討論

1. 電灑式質譜儀(ESI-Mass)

從電灑式質譜儀我們可以依據所測得的帶電荷數乘上 m ($z=1$ 時所對應的值) 反推求得實際 sample 的分子量。其中 m 為分子量、 z 為電荷數，而電荷數之值可由同位素峰的間距判斷。Sample T1C2-2 所測得的分子量為 8,287，由 64 個離胺酸單體組成，有 65 個末段官能基，為樹狀聚離胺酸高分子的第五代。另外 Sample T3C2-2 所測得的分子量為 8,288，同樣是由 64 個離胺酸單體組成，有 65 個末段官能基，為樹狀聚離胺酸高分子的第五代（可見圖 1-1 及圖 1-2）。

2. 穿透式電子顯微鏡(TEM)

由穿透式電子顯微鏡同樣可觀察聚合物大小的分布情形，這可以幫助我們更清楚的瞭解單體在聚合的過程中所形成聚合物相形態性質的變化，更可直接提供證明，顯示在溶液中逐步聚合反應的效果並提供實驗修正的方向。由於合成物本

身在尺度上是屬於奈米級結構，所以我們必須經過染色後才可以辨別聚離胺酸的顆粒大小。圖 2-1 為離胺酸單體結晶顆粒，直徑大約為 70~80nm 左右；而 Sample T1C2 (圖 2-2) 所測得的結果大部份分布約為 2~3.5nm 左右。若以表 2-1 對樹狀聚離胺酸高分子分子量的測量，2~3.5nm 大小的樹狀聚離胺酸高分子顆粒其分子量約為 5000~10000 左右；Sample T3C2 (圖 2-3) 所測得的結果則約為 2.5~4nm 左右大小的樹狀聚離胺酸高分子顆粒，其中分布最廣的為 2.5~3nm 左右。因此由文獻上對於樹狀聚離胺酸高分子的分子量以 SAXS 所測得相對應顆粒的大小，我們預測所合成的 Polylysine dendrimer 分子量約為 5~10K 左右。然而此結果可以 ESI 質譜的分析加以驗證，我們所合成的 Sample T1C2 以及 Sample T3C2 的分子量為 8290 左右。

3. 傅立葉轉換紅外線光譜儀(FTIR)

首先我們發現 Sample T1C2 系列在純化前後在 IR 的吸收上有一些變化 (圖 3-1)，首先看到 1015 cm^{-1} 位置在純化前有很強的吸收，但是經過純化後幾乎完全消失，這是因為 DMSO 殘留在純化前的樣品內所造成 S=O 雙鍵振動的結果。Sample T3C2 的情況也差不多，除了 1015 cm^{-1} 位置上的吸收有明顯變化外，其他幾乎所有的吸收峰在純化前後都沒有變化 (圖 3-2)。若以 Sample T1C2 及 Sample T3C2 做比較，在純化過後兩個 Sample 的 IR 吸收其實也是很一致的。這結果同時告訴我們純化的過程及方法有效的將有機溶劑、金屬離子或無機鹽類順利的移除。最後我們分析離胺酸單體以及 Sample 的差異性。在胺基的吸收峰上，單體為 NH_3^+ 的吸收 (3157 cm^{-1})；而 Sample 為 NH_2 的吸收 (3357 cm^{-1})。在醯胺鍵結上的吸收的位置上(約 $1630\sim 1680\text{ cm}^{-1}$)，Sample T1C2-3 與 Sample T3C2-3 與離胺酸單體有著明顯差異，因為離胺酸單體在此位置上並沒有任何吸收，但是 Sample T1C2-2 與 T3C2-2 在 1635 cm^{-1} 左右卻有明顯的吸收峰，此吸收為 C=O 雙鍵的振動，一般稱為 Amide I。另外在 1510 cm^{-1} 左右還有一個明顯吸收峰，這是醯胺鍵結上 C-N 的振動，一般稱為 Amide II。由圖 3-3 可以明顯判別其中差異。這是因為醯胺鍵結所造成的結果，而醯胺鍵結 Amide I 及 Amide II 的出現也證明了單體與單體之間有聚合的效果。因此藉由 FT-IR 的結果我們推論 Sample T1C2 與 Sample T3C2 應該有非常好的聚合效果。

4. 核磁共振光譜儀(NMR)

在離胺酸單體方面所測得的光譜與資料庫光譜的化學位移有一些偏移，但是都很一致的往高磁場方向偏移 0.2ppm 左右，這有可能是樣品所在的環境例如酸鹼值的不同所造成的影響，因為在配製樣品時並未針對其濃度及酸鹼值做控制。產物的光譜方面，Sample T1C2-2 以及 T3C2-2 與原來離胺酸單體在氫譜中有一些化學位移不一樣 (圖 4-1)，Sample T1C2-2 以及 T3C2-2 在 2.59ppm 的地方都有很強的化學位移而單體卻沒有。這有可能是因為其他雜質或殘留的 DMSO 所造成的影響，而其他位置上的訊號仍然存在。這種情況同樣發生在碳譜 C^{13} 的量

測上。以 Lysine 單體為例，羧酸基上碳的化學位移一般較其他位置上碳的化學位移來的弱，另外五個碳位置的化學位移強度都在伯仲之間；然而 Sample T1C2-2 以及 T3C2-2 在 41.6ppm 位置的化學位移卻特別明顯（圖 4-2），一般在 41.6ppm 位置的化學位移大部分為亞甲基或甲基等集團，所以判斷那是 DMSO 的殘留所造成的影響。若由單體與產物來做比較，我們發現產物整體的化學位移吸收有變粗胖的感覺，理論上這是分子量增加的關係所影響的。

5. 微差掃描式熱分析儀 (DSC)

由於離胺酸（不含鹽酸）單體本身在熔點下為結晶形態的分子，由熔點儀測試的結果離胺酸單體分子的熔點為 210°C 左右，但是由文獻上得知樹狀高分子為非結晶形態，而且會有較明顯的玻璃轉化溫度(T_g)。因此我們藉由微差掃描式熱分析儀來測量聚離胺酸的玻璃轉化溫度(T_g)及其他的熱性質分析。

由結果顯示 Sample T1C2-2 所測出之玻璃轉化溫度(T_g)約在 16°C 左右（圖 5-1）；而 Sample T3C2-2 所測出之玻璃轉化溫度(T_g)約在 11°C 左右（圖 5-2）。另外我們還發現 Sample T3C2-2 在 100°C 左右會有一些很小的吸熱峰或是一些雜訊。這有可能是樣品純化的程度還不足所造成的。由於文獻上對樹狀高分子的玻璃轉化溫度並未深入探討，因此只能猜測這兩個 Sample 所測得不同的結果有可能是因為樹狀結構的大小或不完整所造成的影響，若樹狀結構是非常整齊且完美的話，其玻璃轉化溫度應該會比較固定，由於我們的聚合方式是自由且隨機的，所以合成物並不會有固定形狀或結構，也因此會出現不同的玻璃轉化溫度。

五、結論

綜觀上述之實驗結果，我們發現大部份有機溶劑都不能溶解 Lysine 單體，導致溶劑的尋找花費許多時間。然而我們最後發現 DMSO 在 Lysine 的量很少的時候（約 0.5% 於總重量）會有完全溶解的現象。但由於溶解度太低，所以反應生成產物的量也有所局限。

在產物的化學性質分析上，我們發現無論在 FT-IR 光譜或 NMR 光譜上都符合此研究的目的；而在產物的物理性質分析上，無論是在 DSC、ESI-Mass 及 TEM 上都明顯的看出合成後產物與離胺酸單體的物性變化，而且也符合當初的構想。而在分子量的控制上仍未達到精準控制的目的，所以此部份將在往後的實驗上作更多的改善。

從以上的分析結果，我們相信此化學合成 Poly-Lysine 的方法是可行的，至於其他如分子量及純度的問題我們將在往後的研究中繼續探討。

六、參考文獻

1. S. Zhu and W. Shi, International Conference on New Trends in Functional Polymers, May 8th-13th Huangshan China, P. 295 (2000).

2. E. Buchlein, W. Wehner, and F. Vogtle, *Synthesis*, P. 155 (1978).
3. D. A. Tomalia, H. Bakere, J. R. Dewald, M. Hall, G. Kallos, S. Martin, J. Roeck, J. Ryder, and P. Smith, *Polym, J.*, 17, P. 117 (1985).
4. G. R. Newkome, Z.-Q. Yao, G. R. Baker, and K. Gupta., *J. Org. Chem.*, 50, (1985) 2003.
5. G. R. Newkome, Z.-Q. Yao, G. R. Baker, V. K. Gupta, P. S. Russo, M. J. Saunders, *J. Am. Chem. Soc.* 108 (1986) 849.
6. C. J. Hawder and J. M. J. Fréchet, *Am. Chem. Soc.* 112 (1990) 7638-7647.
7. K. L. Wooley, C. J. Hawker and J. M. J. Fréchet, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* (1991) 1059-1076.
8. C. J. Hawker and J. M. J. Fréchet, *J. Am Chem. Soc.* 114 (1992) 8405-8413.
9. R. G. Denkwalter, J. Kloc, W. J. Lukasavage, U.S. Patent 4,289,872, Sept. 15, 1981.
10. Rene Roy, Diana Zanini, Serge J. Meunier and Anna Romanowska, *A.J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1993) 1869-1872.
11. Toby M.Chapman, Gregory L. Hillyer, Eric J. Mahan, and Katherine A. Shaffer. *J. Am Chem. Soc.* 116 (1994), 11195-11196.
12. Joon Sig Choi, Eun Jung Lee, Young Hun Choi, Yong Joo Jeong, and Jong Sang Park, *Bioconjugate Chem.* 1999, 10, 62-65.
13. Joon Sig Choi, Dong Kyoon Joo, Chang Hwan Kim, and Jong Sang Park, *J. Am. Chem. Soc.* 2000, 122, 474-480
14. Gaor Mezo, Judit Remenyi, Judit Kajtar, Krisztina Barna, Dezso Gaal, Ferenc Hudecz, . *Control. Release* 63 (2000) 81-95.
15. T. Sakhivel, Istvan Toth, and Alexander T. Florence, *Pharm. Res.* 15 (1998) 776-782.

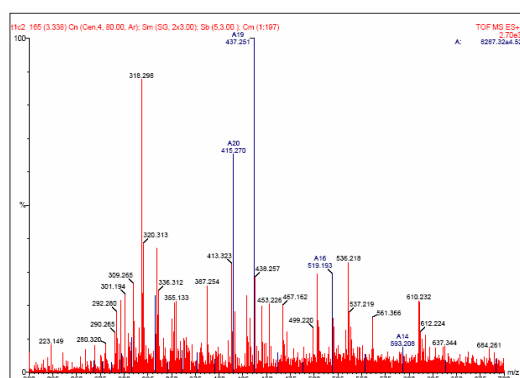


圖 1-1 Sample T1C2-2 之 ESI-Mass

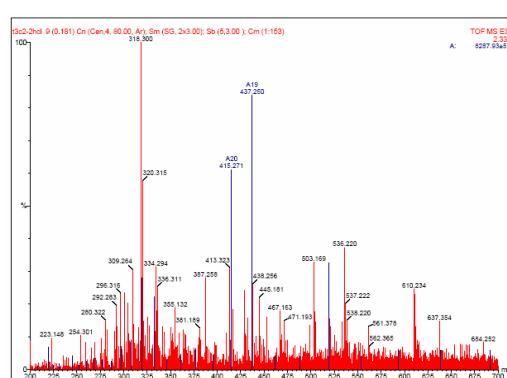


圖 1-2 Sample T3C2-2 之 ESI-Mass

表 2.1 樹狀聚離胺酸成長世代對應其分子量、單體數量及末段官能基數量的關係

Generation	M_r	Monomer units	Terminal groups
0	146	1	2
1	402	3	4
2	914	7	8
3	1,938	15	16
4	3,986	31	32
5	8,082	63	64
6	16,274	127	128
7	32,658	255	256
8	65,426	511	512
9	130,962	1,023	1,024

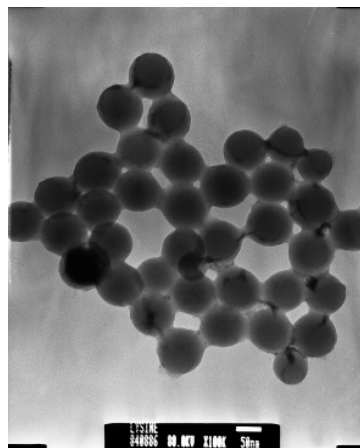


圖 2-1 Lysine monomer 之 TEM 圖

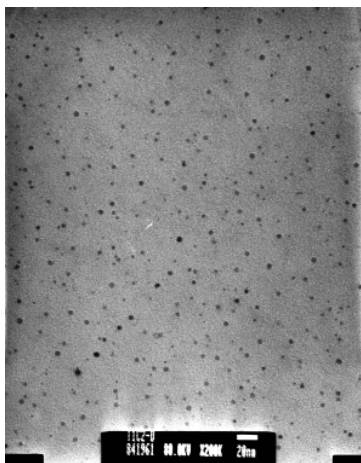


圖 2-2 Sample T1C2 之 TEM 圖

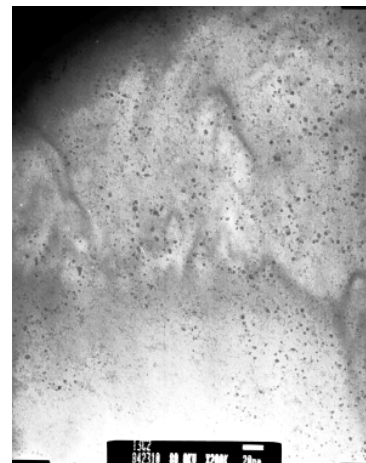


圖 2-3 Sample T3C2 之 TEM 圖

表 3-1 離胺酸的主要官能基與相對應 IR 的吸收位置

Region (cm ⁻¹)	Functional groups	Comments
3200~3000	-NH ₃ ⁺	asym -NH ₃ ⁺ str vib
2935~2915	-CH ₂ -	asym str vib
2860~2840	-CH ₂ -	sym str vib
1470~1450	C-CH ₂	sym bending vib
1400~1000	C-N	C-N str
1380~1280	-COOH	def vib
1305~1295	-(CH ₂) _n -	Twisting vib
1100~1050	-CH ₂ -NH ₂	C-N str
1005~930	CCCC	CCCC sym str
960~875	-COOH	O-H...O out of plane def vib
900~650	-NH ₂	Br N-H out of plane bending vib
750~720	-(CH ₂) _n -	Rocking vib

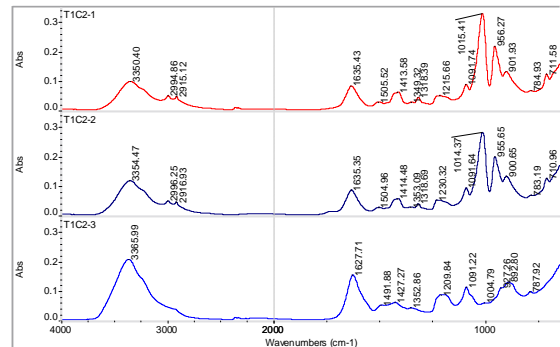
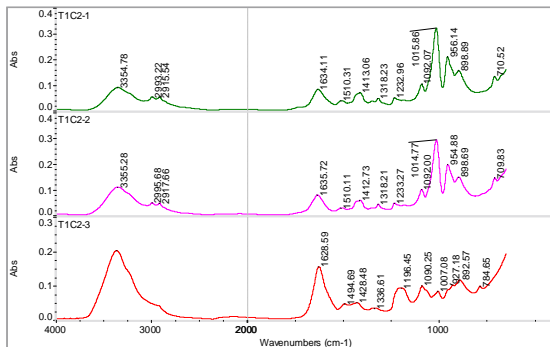


圖 3-1 Sample T1C2 系列之 IR 圖 (ATR)

圖 3-2 Sample T3C2 系列之 IR 圖 (ATR)

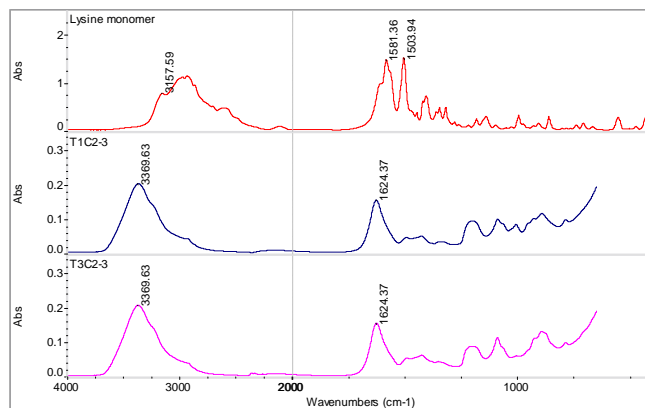


圖 3-3 Lysine monomer, Sample T1C2, T3C2 之 IR 比較圖

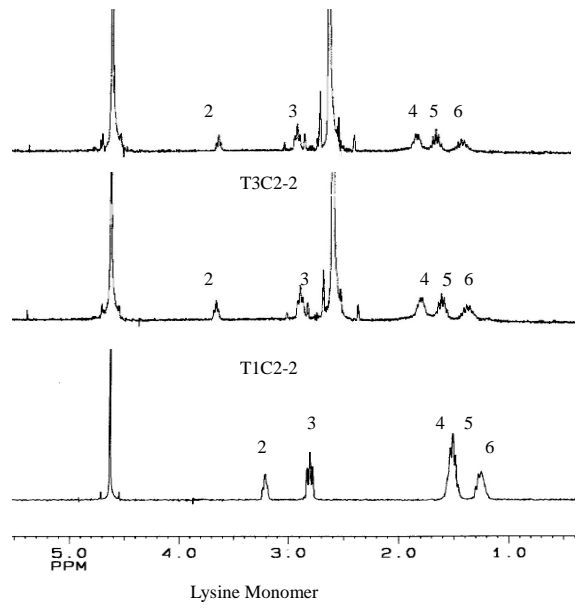


圖 4-1 Lysine monomer, Sample T1C2-2 及 Sample T3C2-2 之 H^1 NMR

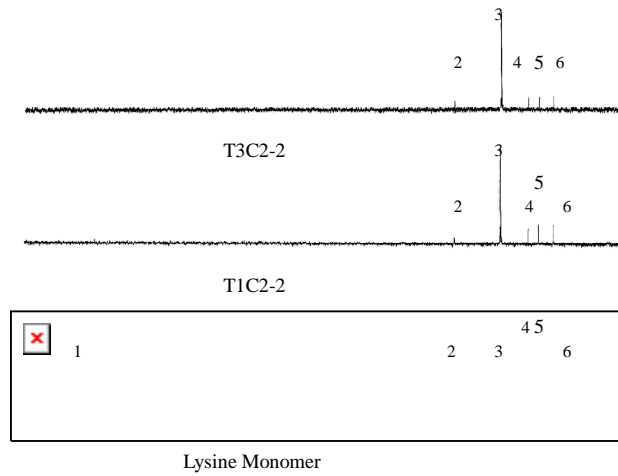


圖 4-2 Lysine monomer, Sample T1C2-2 及 Sample T3C2-2 之 C^{13} NMR

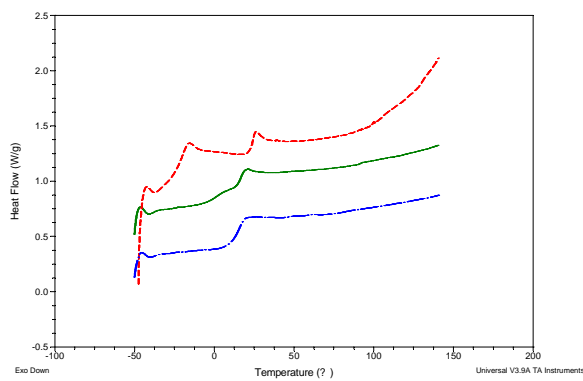


圖 5-1 Sample T1C2-2 之 DSC 圖

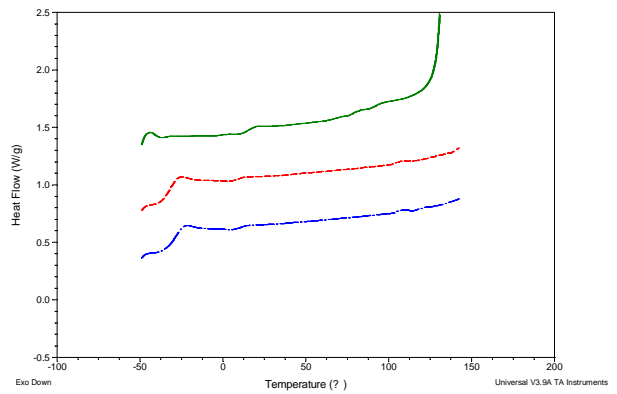


圖 5-2 Sample T3C2-2 之 DSC 圖