

聚乙二醇-聚苯乙烯接枝共聚物的合成 及其接肽反应性能*

李 赫 梁 逊**

(南开大学化学系 天津, 300071)

摘 要

本文应用环氧乙烷在羟乙基树脂上的开环聚合方法, 合成了凝胶和大孔型聚乙二醇-聚苯乙烯接枝共聚物(简称 PEG 树脂)。对不同类型载体的接肽反应动力学性能研究表明, 在 PEG 树脂载体上的反应速度是在氯甲基化树脂上的三倍, 与在溶液中进行的接肽反应速率相当。此外, 还对载体性能与树脂交联度、骨架结构之间的关系进行了初步探索。

关键词 固相多肽合成、羟乙基树脂、PEG 树脂、开环聚合、Boc 甘氨酸对硝基苯酯

固相多肽合成常用的载体是氯甲基化交联聚苯乙烯, 因为这种聚合物载体在多肽合成过程中的非均相特性, 其反应功能基是不均一的。由于缩合反应不完全, 有大量难于分离的副产物形成。以聚乙二醇为可溶性载体的液相多肽合成, 其脱保护和缩合反应都在均相条件下进行, 避免了固相多肽合成中的一些问题, 但是, 分离过量试剂和副产物的多次沉淀和超过滤等操作耗费大量时间和精力。如果将聚乙二醇 (Polyethylene Glycol) 接枝于交联聚苯乙烯骨架上, 得到聚乙二醇(简称 PEG) 树脂。这种载体将固相法和液相法的优点集于一体, 是一种比较理想的多肽合成载体。

由于聚乙二醇链有极好的亲水性能和类似冠醚的结构, 在七十年代中期, 其固载化后的聚合物就应用于三相催化和某些金属的络合和分离提取。制备方法一般是使用一定分子量的聚乙二醇与交联的聚苯乙烯之间的反应进行的。Becker 和 Hellermann^[1,2] 等人以氢氧化钠为试剂, 将一定分子量 (MW 400 或 600) 的聚乙二醇接枝于氯甲基化聚苯乙烯上, 得到 PEG 树脂。并用其合成一些模型肽。蒋英^[3] 等人使用浓 NaOH 溶液方法, 将聚乙二醇固载化到聚苯乙烯载体上, 并对其接肽动力学性能进行了研究。以上合成 PEG 树脂过程中, 在聚乙二醇分子量较高时, 反应缓慢, 环化反应严重^[4]。Bayer^[5-7] 等人用氢氧化钠先将环氧乙烷以四聚体形式接枝到树脂上, 再在金属钾作用下, 引发环氧乙烷进行阴离子开环聚合, 得到有较高 PEG 分子量的树脂。

* 本工作系国家自然科学基金资助课题; 本刊于 1989 年 6 月 20 日收到;

** 通讯联系人。

上述几种方法均以氯甲基化聚苯乙烯为起始反应物进行的, 由于反应不完全, 树脂上残余的氯甲基会在多肽合成过程中引起许多副反应。本工作以制备羟乙基树脂, 在其上引发环氧乙烷的开环接枝聚合的合成路线, 合成了不同交联度的凝胶型和大孔型 PEG 树脂。分别以合成的 PEG 树脂及氯甲基树脂做固相载体, 采用活化酯法对接肽反应动力学进行测定和比较, 证实了 PEG 树脂的优越性。

实 验 部 分

1. 羟乙基树脂的制备

(1) 自制凝胶型和大孔型交联聚苯乙烯, 筛出 100—160 目大小的珠体用于羟乙基树脂的制备。凝胶型聚苯乙烯交联度为 1% 和 2%, 大孔型聚苯乙烯交联度分别为 8%, 10% 和 25%。

(2) 正丁基锂/正己烷溶液锂化交联聚苯乙烯, 得到锂化树脂, 再同环氧乙烷反应得到羟乙基树脂^[8,9]。

(3) 将聚苯乙烯悬浮于二氯甲烷, 在氮气保护、冰水浴下, 与催化剂 (AlCl_3) 混合, 仔细加入用二氯甲烷稀释的环氧乙烷, 在 0—5℃ 进行反应, 反应后用稀盐酸溶液、水洗涤, 得羟乙基树脂。

2. 环氧乙烷开环接枝聚合

(1) 试剂的精制 环氧乙烷: 在氮气保护下, 将环氧乙烷与金属钠接触数小时, 蒸馏环氧乙烷, 再经氢化钙柱子进一步干燥^[10]。

四氢呋喃: 先用 KOH 回流 24 小时, 再用金属钠回流, 然后重蒸。

(2) PEG 树脂的制备 将干燥的羟乙基树脂放入四氢呋喃中溶胀, 再与过量的萘钾/四氢呋喃溶液反应, 过滤树脂, 用干燥四氢呋喃洗涤, 得到红色醇钾树脂。在体系密封、冰水浴下, 醇钾树脂引发上述精制的环氧乙烷开环聚合, 反应 24 小时。反应过程中, 体系颜色加深, 粘度加大, 最后变成灰色块状物。用水终止、多次洗涤。用氢呋喃抽提 48 小时。晾干, 真空干燥, 得到有粘弹性的 PEG 树脂。

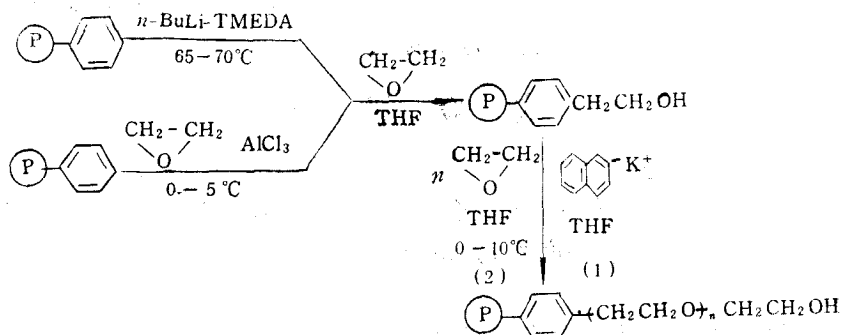
3. 不同载体缩合反应动力学的测定

(1) 各种不同甘氨酸酯载体的制备 在二甲基甲酰胺中, 氯甲基树脂先进行溶胀, 并与过量 1.5 倍的 Boc-甘氨酸铯盐在 50℃ 下反应过夜, 得到 Boc 甘氨酸氯甲基树脂^[11]。在二氯甲烷和二甲基甲酰胺混合溶剂中, PEG 树脂与羟基含量 2.5 倍的 Boc 甘氨酸、催化剂 DMAP 和缩合剂 DCC 作用, 在 30℃ 反应 24 小时, 得到 Boc 甘氨酸 PEG 树脂。上述两种 Boc 甘氨酸酯载体分别与 4N 盐酸/二氧六环反应, 脱除 Boc 保护基。树脂上的自由氨基含量采用水杨醛方法测定^[12]。

(2) 不同载体甘氨酸酯与 Boc 甘氨酸对硝基苯酯 (Boc-Gly-ONP)^[13] 反应的动力学测定^[14] 分别准确称量 0.2mmol 氨基含量的甘氨酸酯载体和 Boc-Gly-ONP, 放入一定量的三氯甲烷中, 在 25℃ 下振荡反应 20 分钟后, 加入 0.24mmol 的三乙胺, 开始计时。每隔一段时间取 0.1ml 的反应液, 用 0.012M 的三乙胺/三氯甲烷溶液稀释至 10ml, 测其在紫外 315nm 处的光密度值。以未接甘氨酸的同类载体配成与上相同的悬浮液做为空白体系进行测定。

结 果 和 讨 论

本文采用的合成 PEG 树脂路线如下:



TMEDA N,N,N',N'-四甲基乙二胺

1. PEG 树脂的合成

(1) 羟乙基树脂的制备

(a) 锂化法 锂化法制备羟乙基树脂是引入羟乙基的比较成熟的方法, 合成结果如表 1. 在比较剧烈的反应条件下, 大孔型聚苯乙烯也很难得到较高功能基含量的羟乙基树脂. 红外光谱分析表明羟乙基的引入. 树脂上的羟基含量用 3, 5-二硝基苯甲酰氯方法测定^[15].

表 1 锂化法制备羟乙基树脂

编号	树脂类型	聚苯乙烯量 (mmol)	n-BuLi-TMEDA (mmol)	反应条件	羟乙基含量 (mmol/g)
1	G-1%	96.2	100.0	65°C; 2h.	1.01
2	G-2%	35.6	38.2	65°C; 3h.	1.48
3	M-10%	65.4	72.0	80°C; 48h.	0.23
4	M-25%	77.0	79.2	80°C; 48h.	0.40

G 代表凝胶型, M 为大孔型聚苯乙烯. 百分数代表树脂交联度.

(b) 付氏法 将环氧乙烷与交联聚苯乙烯进行付式反应引入羟乙基功能基. 结果如表 2. 用此法制备羟乙基树脂, 反应简便易行, 避免了金属锂化法条件苛刻、操作繁杂、原料昂贵的问题, 可以代替锂化法制备羟乙基树脂.

表 2 Friedel-Crafts 法制备羟乙基树脂*

编 号	聚苯乙烯量 (mmol)	溶剂量 (ml/g)	三氯化铝 (mmol)	环氧乙烷 (mmol)	羟乙基含量 (mmol/g)
1	96.0	15	240	1900	3.50
2	65.4	20	135	1000	1.60
3	19.2	25	38.4	200	0.40
4	19.2	25	28.6	200	0.33
5	19.2	25	28.6	100	0.26

* 反应条件: 使用聚苯乙烯均为凝胶型, 交联度为 1%. 溶剂为二氯甲烷, 反应时间 12 小时.

由表 2 看出,溶剂加入量对反应有较大影响,每增加 5ml/g 溶剂量,其羟乙基含量减少一半。溶剂量一定时,催化剂用量加大,羟乙基含量升高。环氧乙烷投入量对功能基含量也有影响。

(2) 环氧乙烷开环接枝聚合

表 3 列出了部分凝胶型和大孔型 PEG 树脂合成结果。根据 PEG 树脂所含羟基的量和接枝聚乙二醇以后 PEG 树脂的增重量,可以计算得到树脂上接枝聚乙二醇的平均分子量。在聚合条件一定时,环氧乙烷开环接枝率基本上是恒定的^[1],一般为 25% 左右。接枝率即接枝到聚苯乙烯骨架上的环氧乙烷占全部环氧乙烷投入量的百分数。接枝聚乙二醇的分子量和环氧乙烷接枝率计算公式如下:

$$MW = [(W_{\text{PEG}} - W_{\text{OH}})/N_{\text{OH}}] \times 1000$$

$$\text{接枝率} \% = [(W_{\text{PEG}} - W_{\text{OH}})/W_{\text{OX}}] \times 100\%$$

其中 MW 为聚乙二醇的分子量, N_{OH} 为 PEG 树脂中羟基的含量 (mmol/g), W_{PEG} , W_{OH} 和 W_{OX} 分别为 PEG 树脂、羟乙基树脂和投入的环氧乙烷重量。

表 3 PEG 树脂合成结果*

编号	树脂类型	羟乙基树脂 (g)	羟乙基含量 (mmol/g)	PEG 树脂 (g)	羟基含量 (mmol/g)	$\overline{MW}$
1	G-1%	3.0	1.01	13.5	0.22	3500
2	G-1%	2.0	1.01	17.5	0.12	7700
3	G-2%	1.0	1.21	4.0	0.31	2500
4	M-8%	3.0	0.20	3.2	0.12	3000
5	M-10%	2.0	0.23	4.2	0.11	4700
6	M-25%	3.0	0.40	7.0	0.15	3300

* 反应条件: G, M 分别表示凝胶和大孔型树脂,百分数代表树脂交联度。反应溶剂为四氢呋喃,聚合温度 0—10℃,聚合时间 24—48 小时。

在一定聚合条件和环氧乙烷接枝率基本恒定的条件下,环氧乙烷与羟乙基树脂投料比例越大,所得树脂上接枝聚乙二醇的分子量越大。如表 3 中 1* 与 2* PEG 树脂合成时,环氧乙烷的接枝率分别为 26% 和 27%,基本相同,而环氧乙烷与羟乙基树脂投料比分别为 14.3 和 28.7,是二倍关系,所得 PEG 树脂上接枝聚乙二醇的分子量为 3500 和 7700。因此在接枝聚合制备 PEG 树脂时,通过控制环氧乙烷与羟乙基树脂的投料比例,可以得到不同长度聚乙二醇链的树脂。本工作合成的 PEG 树脂中,最高接枝的聚乙二醇分子量为 7700,这是简单的 Williamson 醚形成法^[1,2]所无法达到的。

对 PEG 树脂进行红外光谱分析,表明有显著的聚乙二醇特征吸收峰 (1100cm⁻¹ 醚键, 3300—3600cm⁻¹ 羟基峰)。由不同方法制备的羟乙基树脂所形成的 PEG 树脂的 IR 谱图也相同。另外,扫描电镜观察表明,由于接枝上聚乙二醇使聚苯乙烯球体膨胀变大,表面呈现皱折。

2. PEG 树脂的接肽反应动力学性能

PEG 树脂作为较理想的固相合成载体被提出,是由于长链聚乙二醇将反应功能基远离了聚合物骨架,改善了反应功能基的微观环境,提高了其均一性。先前报道的合成的 PEG 树脂均是以低交联凝胶状聚苯乙烯为骨架进行接枝的。这些树脂中的凝胶状聚苯

乙烯链段和交联点对末端功能基存在有立体障碍。为研究骨架结构对树脂末端功能基以及载体性能的影响,我们比较了凝胶型和大孔型 PEG 树脂的接肽动力学性能的差异。同时将 PEG 树脂与氯甲基树脂,以及溶液中小分子的接肽反应动力学也进行了比较。

采用活化酯法进行接肽缩合反应较 DCC 活化法慢得多,但对溶剂以及微小的反应条件和环境的变化非常敏感,特别在固相载体上受到空间障碍的氨基酸较没有受到阻碍的氨基酸反应慢得多,表现为反应速率的降低,以及动力学曲线的线性偏离。因此此法特别适用于不同固相载体上功能基均一性的研究和比较^[12]。

多肽缩合反应式为:



上述反应为典型的二级反应,其动力学方程式为:

$$C_{ph}/C_0(C_0 - C_{ph}) = Kt$$

其中 C_0 为起始反应物浓度, C_{ph} 为 t 时刻生成物(对硝基酚)浓度。由于对硝基酚在

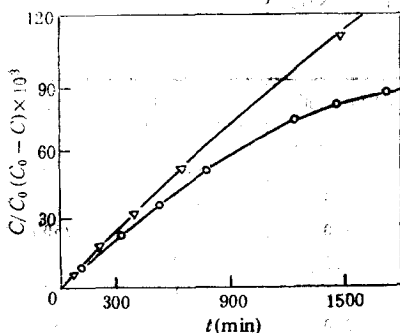


图 1 凝胶型 PEG 树脂动力学曲线

...▽... PEG-PS(1%)
...○... PEG-PS(2%)

紫外 315nm 处有最大的吸收峰,通过测定不同时刻反应液的吸光值,可以计算出相应的对硝基酚浓度,以及 $C_{ph}/C_0(C_0 - C_{ph})$ 值,做出 $C_{ph}/C_0(C_0 - C_{ph})$ 对时间 t 的动力学曲线,如图 1,2,3 所示。为了更好反映不同类型载体接肽反应的动力学性能,以反应速率的形式表示树脂上功能基的反应活性,以图中 300 分钟以后的动力学曲线的切线为斜率,计算反应速率常数,列于表 4 中。

由表 4 看出,在 PEG 树脂上进行的多肽缩合反应速率是氯甲基树脂的三倍,说明由于接枝了聚乙二醇,增加了树脂的亲水性,并且大大改善了功能基的反应环境,有利于试剂间相互接触,使

反应加速进行: PEG 树脂上的缩合反应速率与小分子(甘氨酸乙酯)的溶液反应速率相当,说明在 PEG 树脂上的反应接近于溶液状态下的反应。

表 4 不同载体上甘氨酸酯与 Boc-Gly-ONP 缩合反应速率常数

载体类型	甘氨酸酯载体	速率常数	$K(1 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1})$
氯甲基树脂	Gly-PS(1%)	0.0238	
PEG 树脂	Gly-PEG-PS(1%)	0.0757	
PEG 树脂	Gly-PEG-PS(2%)	0.0697	
PEG 树脂	Gly-PEG-PS(25%)*	0.0753	
甘氨酸乙酯	Gly-OEt	0.0725	

* 大孔型 PEG 树脂,交联度 25%

从图 1 看出,凝胶型 PEG 树脂随交联度的不同,其反应动力学曲线有较大的差别。聚乙二醇末端功能基虽然远离其连接点处的聚苯乙烯链段,但仍不能避免其他部分链段与交联点的立体阻碍影响,而且交联度愈高,影响愈大。如图 1 所示,2% 交联的 PEG 树脂反应速率较 1% 为低,其动力学曲线较早发生线性偏离。而 1% 交联的 PEG 树脂线性

偏离比较轻微,说明树脂交联度愈低,愈接近液相合成。

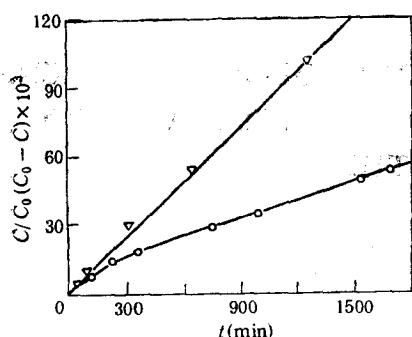


图2 大孔型 PEG 树脂及氯甲基树

脂动力学曲线

...△... PEG-PS(25%)

...○... PS(1%)

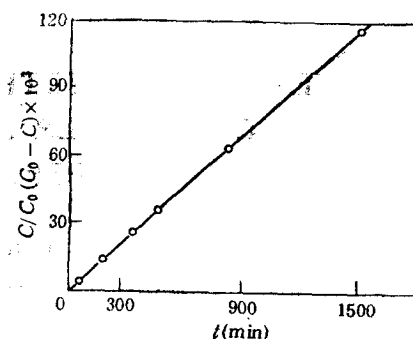


图3 甘氨酸乙酯 (Gly-OEt)

的反应动力学曲线

大孔 PEG 树脂中,聚乙二醇伸展于大孔树脂孔道中,聚苯乙烯链段及交联点对其空间阻碍影响较小,其末端功能基的反应活性比较均一。如图 2 所示,大孔 PEG 树脂的动力学曲线在测定范围内是线性的,与甘氨酸乙酯反应情况近似(图 3)。体现了液相合成中均相反应特点。

参 考 文 献

- [1] Becker, H., Lucas, H. W., Maul, J., Pillai, V. N. R., Anzinger, H., Mutter, M., *Makromol., Chem. Rapid Commun.*, **1982**, 3, 217—223.
- [2] Hellermann, H., Lucas, H. W., Maul, J., Pillai, V. N. R., Mutter, M., *Makromol. Chem.*, **1983**, 184, 2603—2617.
- [3] 蒋英、梁逊、陈伟珠、何炳林, *化学学报*, **1987**, 45, 1112.
- [4] Warshawsky, A., Kalir, R., Deske, A., Berkovitz, H., & Patchornik, A., *J. Am. Chem. Soc.*, **1979**, 101, 4249—4258.
- [5] Bayer, E., Dengler, M., and Hemmasi, B., *Int. J. Peptide Protein Res.*, **1985**, 25, 178—186.
- [6] Bayer, E., Hemmasi, B., Albert, K., Rapp, W., & Dengler, M., *Peptide: Structure and Function, Proceedings of the Eighth American peptide Symposium* (Hruby, V. J. & Rich, D. H., eds.), **1983**, p. 87—90.
- [7] Bayer, E., Rapp, W., *Ger. Offen. DE 3500180 A1*, **1985**.
- [8] Fyles, T. M., and Leznoff, C. C., *Can. J. Chem.*, **1976**, 54, 935.
- [9] Farrall, M. J., and Frechet, J. M. J., *J. Org. Chem.*, **1976**, 41, 3877.
- [10] Cabasso, I., and Zilkha, A., *J. Macromol. Sci-Chem.*, **A8**(8), **1974**, pp. 1313—1324.
- [11] Gisin, B. F., *Helvetica Chimica Acta*, **1973**, 56, 1476.
- [12] 邹永水、钱肖贞, *生物化学与生物物理进展*, **1978**, 4, 12.
- [13] 黄惟德、陈长庆, *《多肽合成》科学出版社*, **1985**, 124.
- [14] Andreatta, R. H., and Rink, H., *Helvetica Chimica Acta*, **1973**, 56, 120.
- [15] Erickson, B. W., and Merrifield, R. B., "The Proteins", Academic Press, **1976**, p. 348.

SYNTHESIS OF POLYETHYLENE GLYCOL-POLYSTYRENE GRAFT COPOLYMER AND STUDY OF ITS PROPERTY IN PEPTIDE SYNTHESIS

LI He and LIANG Xun*

(*Department of Chemistry, Nankai University, Tianjin, 300071*)

ABSTRACT

The gelatinous and macroporous polyethylene glycol polystyrene graft copolymer (PEG-Resin) were synthesized by mean of ring opening polymerization of ethylene oxide on hydroxyethyl resin. The kinetic behavior for coupling of Boc-Gly-ONP with glycine anchored to PEG-Resin, chloromethylated resin and glycine acetate in solution were determined. The experimental results showed that reaction on PEG-Resin support proceeded three times faster than that on chloromethylated resin and as fast as that reaction in solution. The kinetic character of gelatinous PEG-Resin was influenced by the degree of crosslinking of the copolymer.

Key words Solid phase peptide synthesis, Hydroxyethyl resin, PEG-Resin, Ring opening polymerization, Boc-Gly-ONP