

含肽侧链仿生高分子吸附剂的合成与性能*

马建标 谢志东 王永健 王亦农 范云鸽 何炳林

(南开大学高分子化学研究所, 吸附分离功能高分子材料国家重点实验室, 天津 300071)

摘要 模拟 β -内酰胺酶结合部位的结构, 设计了一系列含肽的仿生高分子吸附剂, 用对称酸酐法以固相合成技术将肽段分步接枝在功能基化的交联聚(N, N-二甲基丙烯酰胺)载体上, 然后研究了仿生吸附剂对 β -内酰胺抗生素氨苄青霉素和头孢噻肟的吸附性能. 结果说明, 当肽段富含赖氨酸时, 相应的吸附剂具有良好的吸附性能, 而且证明静电作用和氢键作用在吸附过程中发挥着重要作用.

关键词 仿生高分子 高分子吸附剂 β -内酰胺酶 β -内酰胺抗生素

酶和药物受体能够选择性或专一性地结合其底物. 这种结合选择性或结合专一性来自酶和受体结合部位的特殊结构, 而这种特殊结构又与酶和受体的氨基酸序列(一级结构)和高级结构密切相关. 模拟酶、受体等生物大分子结合部位的结构, 有可能设计出吸附性能优越的仿生高分子吸附剂. 这类吸附剂的设计合成不仅能够机理上揭示酶或受体结合部位的结构特征, 而且在生化分离和生化检测等方面具有良好的应用前景^[1].

β -内酰胺类抗生素(包括青霉素类和头孢霉素类)通过抑制细菌细胞壁合成酶 DD-peptidase 而发挥抗菌作用. 当反复使用这些抗菌素时, 细菌会产生耐药性, 这是因为细菌内产生的多种 β -内酰胺酶能够水解破坏 β -内酰胺环结构而使抗生素失效的缘故. 研究发现 DD-peptidase 和多种类型(A 类、B 类和 C 类)的 β -内酰胺酶具有一些类似的结构特征, 通过比较分析证实了它们有 7 段相同或相似的保守序列^[2]. 其中, 序列 II 和序列 VII 对于结合和催化 β -内酰胺环裂解起着重要作用. 序列 II 为 -Ser-X-X-Lys-, 其中 Ser 的侧基(羟基)为反应性基团; 序列 VII 为 -Lys(His)-Ser(Thr)-Gly-, 其中 Lys 或 His 的碱性侧基对于结合 β -内酰胺类抗生素发挥着重要功能. 通过研究 β -内酰胺酶的晶体结构, 揭示了结合部位的结构特征^[3]. β -内酰胺类抗生素的 β -内酰胺环上羰基碳与酶保守序列 II 中的 Ser⁷⁰ 之 O_γ 接近, β -内酰胺环上羰基氧与酶的肽链酰胺链节(-CONH-)上的氢形成氢键, 而 Lys⁷³ 之氨基残基与 Glu⁶⁶ (保守序列 V) 之羧基形成盐桥, 以维持结合部位的空间形状. β -内酰胺类抗生素的羧基与保守序列 VII 的 Lys²³⁴ 之 N_ε-氨基形成离子键. 显然, Lys 残基、Ser 残基和主链酰胺键对于结合作用起着关键作用. 因此, 模拟 β -内酰胺酶结合部位的结构特征, 以亲水性的交联聚(N, N-二甲基丙烯酰胺)微球为载体, 设计了如图 1 所示的一系列含肽高分子吸附剂. 在这些吸附剂中, 在肽链上要么含有羟基氨基酸丝氨酸或苏氨酸, 如 5 和 6; 要么含有碱性氨基酸赖氨酸, 如 7~10; 要么同时含有羟基氨基

酸和赖氨酸, 如 1~3; 为了比较其性能, 还设计了由非极性氨基酸组成的含肽吸附剂 4. 按图 2 所示的路线合成出所设计的含肽仿生高分子吸附剂, 然后研究了它们对氨苄青霉素和头孢噻肟的吸附性能.

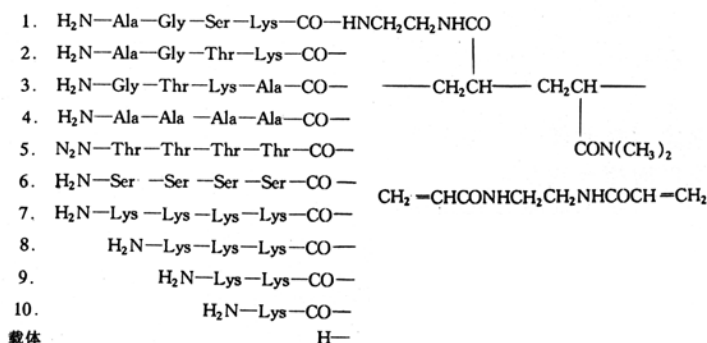


图 1 仿生高分子吸附剂的结构

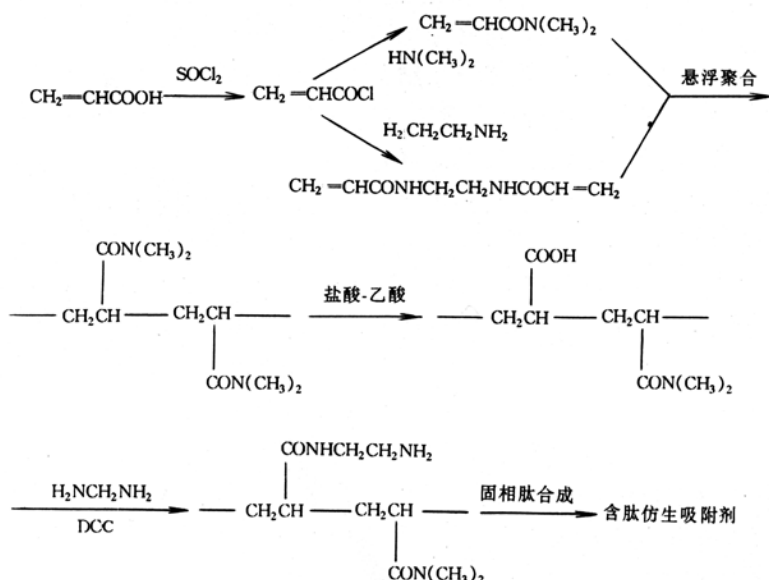


图 2 仿生高分子吸附剂的合成路线

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

N,N'-乙撑基双丙烯酰胺和 N,N-二甲基丙烯酰胺由丙烯酰氯与相应的乙二胺或二甲胺制备^[4]. 溶剂在使用前经过干燥和重新蒸馏. L-氨基酸及其带保护基的衍生物购自 Sigma 公司, 氨苄青霉素和头孢噻肟由天津市医药公司提供.

比色分析使用上海分析仪器厂生产的 751 分光光度计. 多肽固相合成使用自制的多肽合

成反应瓶,底部有砂心过滤片和塞抽滤口,上部有2或3个加料口,外壁设有加套保温层。

1.2 载体合成

1.2.1 交联聚 N,N-二甲基丙烯酰胺微球^[5]的合成 在3口瓶中加入司班-80(1.5份)和用二醋酸纤维素饱和的二氯乙烷溶液(35份)。通氮气10 min,加入由 N,N-二甲基丙烯酰胺(1份)、N,N'-乙撑基双丙烯酰胺(0.12份)、过硫酸铵(0.13份)、水(15份)、N,N'-二甲基甲酰胺(15份)组成的混合液。搅拌10 min 调节液滴至适当大小,然后加入少量助引发剂四甲基乙二胺。保持细小的通气量,在20℃下进行悬浮聚合,2 h 内完成聚合反应。过滤,用二氯乙烷、乙醇、水、乙醚洗涤,干燥,得交联聚 N,N-二甲基丙烯酰胺微球,粒度40~100 筛目。

1.2.2 交联聚 N,N-二甲基丙烯酰胺的部分水解 取上述交联聚丙烯酰胺微球(1份),用冰醋酸(35份)溶胀后,加入浓盐酸(5份)。搅拌下于85℃水解7 h。用乙醇洗涤4次,乙醚逐步收缩分散,真空干燥,得到交联聚(N,N-二甲基丙烯酰胺-丙烯酸)。

1.2.3 交联聚(N,N-二甲基丙烯酰胺-丙烯酸)的乙二胺胺化 将交联聚(N,N-二甲基丙烯酰胺-丙烯酸)用 N,N-二甲基甲酰胺溶胀,加入过量二环己基碳二亚胺(DCC)。室温反应1 h 后,加过量乙二胺,继续反应24 h。反应结束后依次用 N,N-二甲基甲酰胺和乙醇洗数次,用乙醚分散,凉干后真空干燥,得到交联聚(N,N-二甲基丙烯酰胺-N-氨乙基丙烯酰胺)。水杨醛法测定产品的游离氨基含量为0.73 mmol/g。

1.3 多肽合成

以含氨基的交联聚(N,N-二甲基丙烯酰胺-N-氨乙基丙烯酰胺)为载体,采用对称酸酐法进行肽链的固相合成。将一定量含氨基载体置于多肽反应瓶中,进行预处理。在另一反应瓶中,1份 DCC 溶于尽量少的 CH_2Cl_2 中,与2份侧链保护氨基酸的 CH_2Cl_2 饱和溶液混合,析出 N,N'-二环己基脲白色沉淀,过滤,滤液减压蒸去二氯甲烷。然后,将残留的对称酸酐溶于少量 N,N-二甲基甲酰胺,再将溶液转移至上述含载体的反应瓶中。在振荡器中振荡反应,2 h 后用茚三酮自由氨基鉴定法检测反应程度。若反应完全,继续下一步反应,否则继续至反应完全。当所需氨基酸依次全部接上之后,用20% HBr/AcOH 或 HBr/Dioxane 除去 O-苄基(苏氨酸和丝氨酸的羟基保护基)和 N_ϵ -苄氧甲酰基 CBZ(赖氨酸的 N_ϵ -氨基保护基)。

每次重复操作步骤如下:

步骤	试剂和溶液	操作次数	操作时间/min
1	AcOH	1	5
2	EtCMe ₂ OH	5	2
3	DMF	10	2
4	10% Et ₃ N-DMF	2	10
5	6 倍过量对称酸酐/DMF	1	120
6	DMF	5	2
7	EtCMe ₂ OH	5	2
8	AcOH	5	2
9	1 mol/L HCl/HOAc	1	5
10	1 mol/L HCl/HOAc	1	25

1.4 仿生吸附剂的吸附性能测定

1.4.1 平衡吸附量测定 准确称取 20 mg 吸附剂于磨口锥形瓶中,加入 2.0 mL 的头孢噻肟水溶液或氨苄青霉素水溶液,放入振荡器中恒温振荡至平衡. 然后取吸附液样品,稀释后用紫外分光光度计分别于 230 nm 或 210 nm 进行比色分析,测定它们在水相中的平衡浓度,根据吸附前后的浓度变化计算吸附量.

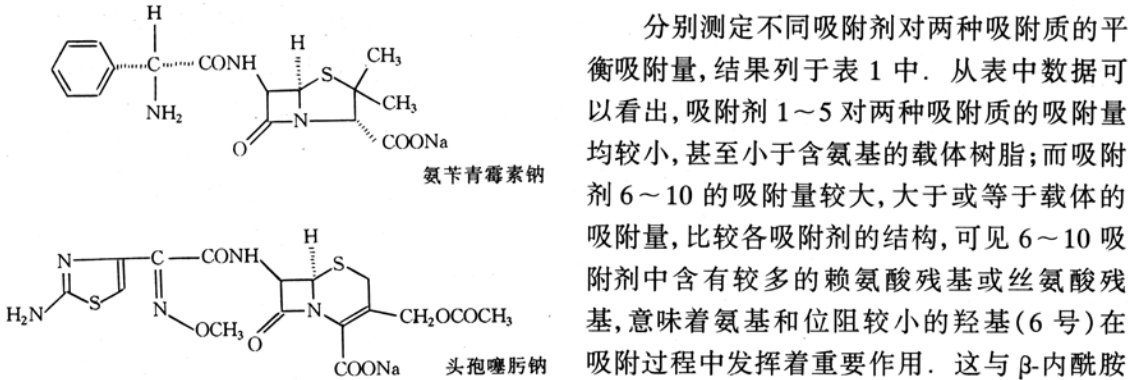
1.4.2 吸附剂对头孢噻肟的吸附动力学测定 准确称取 20 mg 吸附剂于磨口锥形瓶中,加入 2.0 mL 的头孢噻肟水溶液,于 25℃ 恒温振荡. 每隔一定时间取吸附液 0.1 mL,稀释后用紫外分光光度计于 230 nm 进行比色分析,确定当时的吸附质浓度,进而计算当时的吸附量. 由吸附量对时间作图,得吸附动力学曲线.

1.4.3 吸附剂的再生 吸附氨苄青霉素或头孢噻肟后的吸附剂在 0.5 mol/l NaOH 水溶液中浸泡 30 min,然后用大量去离子水洗涤以除去残余的 OH⁻. 吸附剂干燥后可重复使用.

2 结果与讨论

2.1 吸附剂结构对吸附性能的影响

以两种市售 β-内酰胺抗生素氨苄青霉素(氨苄青霉素钠)和头孢噻肟(头孢噻肟钠)为吸附质,系统研究了含多肽片断的仿生高分子吸附剂的吸附性能,总结出不同因素对吸附性能的影响. 氨苄青霉素与头孢噻肟钠结构式如下.



分别测定不同吸附剂对两种吸附质的平衡吸附量,结果列于表 1 中. 从表中数据可以看出,吸附剂 1~5 对两种吸附质的吸附量均较小,甚至小于含氨基的载体树脂;而吸附剂 6~10 的吸附量较大,大于或等于载体的吸附量,比较各吸附剂的结构,可见 6~10 吸附剂中含有较多的赖氨酸残基或丝氨酸残基,意味着氨基和位阻较小的羟基(6 号)在吸附过程中发挥着重要作用. 这与 β-内酰胺酶对底物的结合机理具有一定的相似性. 值得注意的是,吸附剂 7 对目标吸附质的吸附量特别大,说明富含氨基侧基的肽段有利于对吸附质的吸附. 这是由于两种吸附质均含有羧基阴离子,能够与吸附剂上这些铵基阳离子通过离子交换发生吸附作用. 比较吸附剂 7~10 对氨苄青霉素的吸附量,虽然随赖氨酸残基含量增加,对氨苄青霉素的吸附量增大,但吸附量与赖氨酸残基含量并不存在线性正比关系. 这可能是其它相互作用(如氢键、偶极-偶极相互作用等)也参与了吸附过程,并非所有吸附剂上的氨基都是通过离子交换发挥作用的.

表 1 不同吸附剂(mg/g)对氨苄青霉素和头孢噻肟的平衡吸附量^{a)}

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	载体
氨苄青霉素	0.6	1.6	3.1	2.0	0.6	4.6	22.2	16.2	3.6	2.5	2.6
头孢噻肟	1.2	1.8	0.7	0.0	0.5	2.6	17.7	-	-	2.4	2.4

a) 氨苄青霉素水溶液初始浓度为 0.216 mg/mL. 头孢噻肟水溶液初始浓度为 0.20 mg/mL, 吸附时间 3 h, 温度 25℃

在设计仿生高分子吸附剂时,采用的载体交联聚(N, N-二甲基丙烯酰胺)是亲水的,而且

不含有活泼氢，一方面是为了便于进行固相肽合成，另一方面是为了防止载体像通常的吸附剂那样通过疏水作用或作为氢键供体吸附目标物质。表 1 数据显示，功能基化的载体交联聚(N,N-二甲基丙烯酰胺-N-氨乙基丙烯酰胺)对两种吸附质有微弱吸附，这可能是引入氨乙基的缘故。值得思考的是，某些含肽的高分子吸附剂(例如 1, 2, 4, 5 等)的吸附量小于功能基化载体。其原因推测有：(1)肽侧链末端氨基有可能与肽链上同一氨基酸残基的酰胺羰基形成五元环分子内氢键，使肽链与吸附质形成离子键和氢键的能力减弱；(2)这些氨基酸的空间构型或构象也许难以与吸附质匹配，使吸附剂对吸附质的总体吸附能力降低。这也说明了含肽吸附剂与多官能团吸附质之间吸附作用的复杂性。

2.2 离子强度对吸附的影响

为考察离子强度对吸附的影响，改用 0.025 mol/L 磷酸盐缓冲溶液代替水配制氨苄青霉素钠和头孢噻肟溶液，然后测定一些吸附剂的吸附性能。从表 2 结果可以看出，离子强度对吸附剂的吸附作用有明显影响。首先，在离子强度较大的情况下，吸附剂 7 对两种吸附质的吸附量均显著下降，说明离子交换作用在该吸附剂对吸附质的吸附中起关键作用。因为离子强度较高时，溶液中的无机阴离子与吸附剂上的阳离子发生竞争性离子交换反应，从而抑制了吸附剂对有机吸附质的吸附，所以吸附量降低。其次，对于其它吸附剂(1, 4, 6 和载体)，在离子强度升高时，对氨苄青霉素的吸附量下降。而对头孢噻肟的吸附量增加，其原因在于两种吸附质的性质差异。与氨苄青霉素相比，头孢噻肟上氨基的碱性较弱、离子化程度较低，头孢噻肟的疏水性可能大于氨苄青霉素，因而在离子强度增大时，头孢噻肟的溶解度下降程度较大，受到的从液相向吸附剂相转移的驱动力较大，结果增加了头孢噻肟通过非离子交换作用在吸附剂上的吸附。这种现象在有机分子的吸附过程中经常遇到。

表 2 离子强度对吸附剂吸附量(mg/g)的影响^{a)}

吸附液溶剂	去离子水					0.025 mol/L 磷酸盐缓冲溶液				
吸附剂编号	1	4	6	7	载体	1	4	6	7	载体
氨苄青霉素	0.6	2.0	4.6	22.2	2.6	0.1	0.3	1.3	0.5	0.1
头孢噻肟	1.2	0.0	2.6	17.7	2.4	3.3	2.0	4.9	5.9	3.4

a)条件同表 1

2.3 含肽吸附剂 7 对头孢噻肟的吸附动力学

由于吸附剂 7 呈现出良好的吸附性能，故进一步研究它对头孢噻肟的吸附动力学。从图 3 可以看出，在第 1 小时内吸附量增加较快，此后渐缓，吸附在 2 h 已基本达到平衡。由于该吸附剂极性较大，在水溶液中很快溶胀，而且表面水化程度高，利于头孢噻肟从水相到吸附剂相的传质，所以吸附实验开始阶段呈现出较快的吸附速度。但是，头孢噻肟分子量较大，一旦表面吸附饱和后，其向吸附剂孔内的传质具有一定的位阻，以致于吸附速率有所下降。总的说来，该吸附剂的吸附速度是快的，能够满足微量 β -内酰胺类抗生素的分离、检测要求，在药学和医学研究中具有良好的应用前景。

2.4 吸附剂 7 对头孢噻肟的吸附等温线

准确称取一组重量相同的吸附剂 7，测定它们对不同浓度的头孢噻肟钠的吸附量，以吸附量对头孢噻肟钠的浓度作图，得到吸附等温线(图 4)。吸附剂对头孢噻肟钠的吸附量随后者浓度的增加而增大，吸附等温线的形状类似于 BET 吸附模型。在单层吸附达到饱和时，吸附

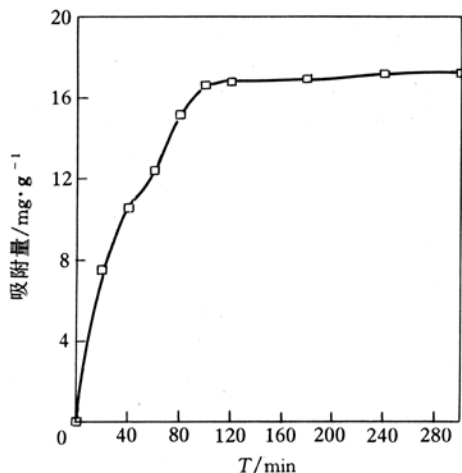


图 3 吸附剂对头孢噻肟的吸附动力学曲线
吸附剂用量 20 mg, 头孢噻肟水溶液用量 2.0 mL, 浓度
0.2 mg/mL, 温度 25℃

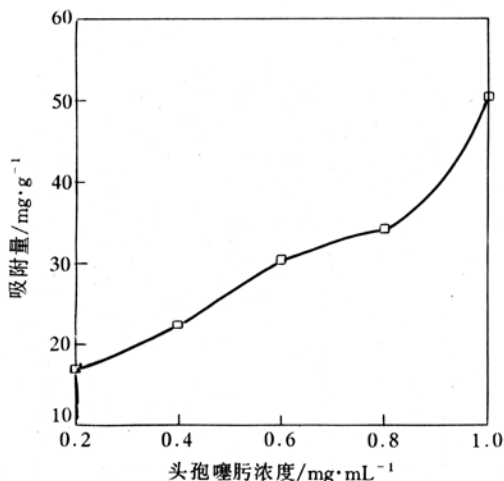


图 4 吸附剂对头孢噻肟的吸附等温线
吸附剂用量 20 mg, 头孢噻肟溶液用量 2.0 mL, 温度
25℃, 吸附时间 3 h

量为 34.0 mg/g 吸附剂, 即 71.2 $\mu\text{mol/g}$, 相当于肽链在吸附剂中含量的 1/10. 结果说明, 吸附一分子头孢噻肟需要许多-Lys-Lys-Lys-Lys-肽链参与, 这与通常的离子交换吸附剂有很大差异. 在头孢噻肟分子中, 除了羧基阴离子可以通过静电作用与吸附剂发生相互作用之外, 分子中的 $-\text{NH}_2$ 或其它含 N, O 的基团可作为氢键供体或受体与吸附剂上的羰基、氨基、酰胺基形成多个氢键; 而且头孢噻肟的分子面积较大, 需要在构象上与吸附剂上的对应基团匹配, 结果吸附一分子头孢噻肟需要占据吸附剂上不同肽链的基团. 这一结果也提示我们, 要像酶或受体那样 1 个结合点吸附一分子底物, 仅依靠短肽是难以实现的, 必须增加肽链长度.

参 考 文 献

- 1 马建标, 何炳林. 仿生高分子. 化学通报, 1992, (6): 18
- 2 Joris B, Ghuyssen J-M, Dive A, et al. The active-site-serine penicillin-recognizing enzymes as members of the streptomyces R61 DD-peptidase family. Biochem. J, 1988, 250: 313~324
- 3 Herzberg O, Moulton J. Bacterial resistance to-lactam antibiotics: crystal structure of-lactamase from staphylococcus aureus PC1 at 2.5 Å resolution. Science, 1987, 236: 694~701
- 4 Helpert J A, Sparrow J T. An improved general procedure for the Synthesis of N, N'-bisacryldiaminoalkanes. synth Commun, 1980, 10(7): 569~571
- 5 Atherton E, Clive D L J, Sheppard R C. Polyamide supports for polypeptide synthesis. J Am Chem Soc, 1975, 97(22): 6584~6585