N-(丙烯酰氧苯甲酰氧基)丁二酰亚胺的合成 聚合及其共聚物与血清蛋白质的固定化

陆承勋 顾忠伟 冯新德 李德昌

(北京大学化学系)

(北京大学生物系)

近十年来,对于将反应性高聚物与具有生物活性物质如多肽、酶、抗原、抗体及核酸等之间通过共价偶联的反应而得到固定化酶和固定化免疫吸附剂等的研究已有较多的报道^[1-3]。在反应性高聚物中,关于分子中含有 N-丁二酰亚胺活性酯(简称 HOSu 活性酯)的烯类单体的合成及聚合报道较少。Ferruti 等^[4]首先合成了甲基丙烯酸和丙烯酸的 HOSu 活性酯单体及其聚合物,并研究了此反应性聚合物与胺化物的化学反应。Batz 等^[5]及 Winston 等^[6]分别研究了 ω -甲基丙烯酰氧氨基酸的 HOSu 活性酯类单体的合成及聚合。Batz 等还将葡萄糖氧化酶固定化至这类共聚物的载体上。我们合成了两种新的反应性烯类单体——对甲基丙烯酰氧基苯甲酸和对丙烯酰氧基苯甲酸的丁二酰亚胺的活性酯,并研究了它们的聚合以及聚合物与胺和蛋白质的固定化反应。

N-(对甲基丙烯酰氧基)丁二酰亚胺 (IVa, 简称 N-MBOSu) 及 N-(对丙烯酰氧基)丁二酰亚胺 (IVb, 简称 N-ABOSu) 是以对羟基苯甲酸 (II) 为起始原料,通过下列两步反应合成的,其步骤如下:

本文 1978 年 6 月 29 日收到。

对甲基丙烯酰氧苯甲酸 (IIIa, MBA) 及对丙烯酰氧苯甲酸 (IIIb, ABA) 的合成是参照 Amerik 等^[7]的方法, 由甲基丙烯酰氯 (Ia) 或丙烯酰氯 (Ib) 与对羟基苯甲酸 (II) 在氢氧化钠水溶液中相互反应后, 再酸化而制得的。 (III) 与 N-羟基丁二酰亚胺在 N, N'-二环己烷基碳二亚胺 (DCCI) 脱水剂存在下, 于无水四氢呋喃 (THF) 或二甲基甲酰胺 (DMF) 中反应而得相应的反应性单体 (IVa) 及 (IVb)。 产物的物理常数, 产率及元素分析列于表 1 中, 其红外吸收光谱及核磁共振谱的特征吸收峰值列于表 2 中。

表 1 N-MBOSu 及 N-ABOSu 单体的物理常数及元素分析

单 体	结晶形状	熔 点 °C	产 率 %	元 素 分 析					
				计 算 值 %			实 测 值 %		
				C	H	N	C	H	N
N-MBOS	无色针状	137—8.5	68	59.41	4.32	4.62	59.74	4.34	4.86
N-ABOS	无色透明针状	128—9.5	50	58.12	3.83	4.84	58.02	4.04	4.99

表 2 N-MBOS 及 N-ABOS 单体的 IR 及 NMR 的特征吸收峰

单 体	IR(KBr), Cm^{-1}				NMR(CDCl_3), δ (100 兆周)				
	C=O 内酰亚 胺	α, β -不 饱和酯	C=C		—CH ₃	—CH ₂ —CH ₂ —		CH ₂ =CH—	CH ₂ =C<
N-MBOS	1765	1730, 1155	1630	1600, 1500	2.11(3H)	2.94(4H)	7.29(2H) 8.21(2H)	—	5.84(1H) 6.41(1H)
N-ABOS	1770	1735, 1160	1620	1600, 1500	—	2.92(4H)	7.36(2H) 8.20(2H)	6.05(1H) 6.34(1H) 6.68(1H)	—

从 N-MBOSu 及 N-ABOSu 单体的分子结构上看, (IV) 化合物是反应性单体, 分子中既有易进行自由基聚合的碳碳双键, 又有能在较温和条件下与含有胺基 ($-\text{NH}_2$) 化合物进行反应的 HOSu 活性酯基团, 因此在不同反应条件下可使其分别进行化学反应。

(IV) 单体在 DMF 中容易进行溶液聚合, 以偶氮二异丁腈 (AIBN) 为引发剂, 在 60°C 恒温槽中聚合 24 小时后, 以氯仿-正己烷混合溶剂为沉淀剂, 则得粉末状聚合物 (Va) 或 (Vb), 两者的转化率各为 74% 及 67%。

(V)

Va, R=CH₃ [P(N-MBOSu)]

Vb, R=H [P(N-ABOSu)]

聚合物 (V) 与单体 (IV) 在红外吸收光谱上有区别处, 1, 1-二取代碳碳双键或末端基碳碳双键吸收峰基本上消失。 分析 P(N-MBOSu)、 $(\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{O}_6\text{N})_n$, 计算值%: C, 59.40; H, 4.32; N, 4.62, 实测值%: C, 59.28; H, 4.34; N, 4.95。 P(N-ABOSu)、 $(\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{O}_6\text{N})_n$, 计算

值%: C, 58.12; H, 3.83; N, 4.84. 实测值%: C, 58.33; H, 3.92; N, 4.89.

聚合物(V)是一个反应性高聚物,其侧链上的 HOSu 活性酯在室温下极易与正丁胺反应生成相应的具有酰胺基团的高聚物(VI). 聚合物(VI)与反应性高聚物(V)在 IR 光谱上有区别处是内酰亚胺的羰基特征吸收峰消失,而在 1645 厘米⁻¹(第一吸收),1550 厘米⁻¹处呈现强的 -CONHR 基的羰基特征吸收峰.

单体(IV)能与单体(III)很好地进行共聚合,从而得到具有一个足够长的、较为坚硬的(由苯环的骨架引起)“手臂”式高聚物(VIII)

(VIII) 共聚物是一个较好的亲水性载体,在室温下,其侧链上的 HOSu 活性酯极易与蛋白质上的氨基发生偶联反应,生成相应的固定化蛋白质的高聚物(IX).

当用(VIIIa)共聚物(含氮量为 2.34%,在此共聚物的大分子链上 N-MBOSu 与 MBA 的链节单元克分子比为 2.3 比 1)与正常人 A. B. O. 型混合血清于室温,在碱性条件下偶联 24 小时后,就可将 A. B. O. 混合血清固定化在高聚物上而成为一个具有(IXa)结构的固定化蛋白质的高聚物. 它是一个较好的固定化免疫吸附剂,能吸附兔抗人胃癌血清中的抗正常人血清

的抗体,以达到纯化抗胃癌血清的目的。这是经对流免疫电泳实验所证实,即偶联前后免疫沉淀线的深度发生了明显的变化。

关于本工作的详细内容将另文发表。

实 验 部 份

N-(对甲基丙烯酰氧苯甲酰氧基)丁二酰亚胺 (IVa, N-MBOSu)

在三口瓶中加入 5.8 克(0.05 克分子)N-羟基丁二酰亚胺, 10.3 克(0.05 克分子)对甲基丙烯酰氧基苯甲酸和 150 毫升无水四氢呋喃,搅拌使其成为均相溶液后,用冰盐浴冷却使内温至 0—3℃,再加入 10.3 克(0.05 克分子)N, N'-二环己烷基脒二亚胺。先在 0—3℃,后在室温下各反应 2 小时。反应完后,吸滤,除去 N, N'-二环己烷基脒的结晶物。将滤液倒至 600 毫升的正庚烷中,则析出无色细微的粉末状物。经真空减压干燥后,得熔点为 132—134℃ 的粗产物,重 12.6 克。在甲苯和正庚烷的混合溶剂中重结晶后,则可得熔点为 137—138.5℃ 的无色针状结晶物,重 10.3 克,产率 68%。元素分析及其 IR, NMR 的特征吸收峰值见表 1 及表 2 所示。

N-(对丙烯酰氧苯甲酰氧基)丁二酰亚胺 (IVb, N-ABOSu)

按合成 (IVa) 相类似的方法。用 9.6 克(0.05 克分子)对丙烯酰氧基苯甲酸及 100 毫升无水 DMF,其余物均相同。反应完毕后,先过滤再真空蒸馏除去大部分 DMF,随着将剩余物倒至氯仿及正己烷的混合溶剂中。所得无色粉末状物重 10.0 克,熔点为 104—120℃。在氯仿和正庚烷混合溶剂中重结晶后,则得熔点为 128—129.5℃ 的无色透明针状结晶物,重 7.3 克,产率 50%。元素分析及其 IR, NMR 的特征吸收峰值见表 1 及表 2 所示。

致谢: 红外吸收光谱承北京大学化学系王显仑同志测定。核磁共振谱承中国科学院感光研究所俞偲、孙智育以及北京化工研究院沈其丰、罗广荣等同志测定,均此致谢。

参 考 文 献

- [1] Dunlap, R. B., *Immobilized Biochemicals and Affinity Chromatography*, Plenum Press, New York, 1974.
- [2] Hixon, Jr. H. F. & Goldberg, E. P. Eds., *Polymer Crafts in Biochemistry*, Marcel Dekker Inc., New York, 1974.
- [3] Salmons, M., Saronio, C. & Garattini, S. Eds., *Insolubilized Enzymes*, Raven Press, New York, 1974.
- [4] Ferruti, P. et al., *Polymer*, 13(1972), 462.
- [5] Batz, Hans-Georg, & Koldhoff, J., *Macromol. Chem.*, 177(1976), 683.
- [6] Winston, A. & Kirchner, D., *J. Polymer Sci. Chem.*, 14(1976), 2155.
- [7] Amerik, Yu. B. et al., *J. Polymer Sci., Part C*, No. 23, (1968), 231.