

聚-*L*-赖氨酸的合成与表征^{*}

胡海梅, 潘仕荣, 温玉婷, 郭振寰
(中山大学附属第一医院, 广东 广州 510080)

摘 要: 以 *L*-赖氨酸为原料, 先制备 *N*^ε-苄氧羰基-*L*-赖氨酸, 光气法合成 *N*^ε-苄氧羰基-*L*-赖氨酸-*N*-羧酸酐, 并以三乙胺为引发剂, 在氯仿中引发聚合, 生成聚 (*N*^ε-苄氧羰基赖氨酸), 经无水溴化氢脱苄得到聚-*L*-赖氨酸。其聚合度由黏度法测定, 化学结构由 IR、¹H NMR 证实, 聚 (*N*^ε-苄氧羰基赖氨酸) 和聚-*L*-赖氨酸分子均以 α-螺旋构型存在。由本法制备的聚-*L*-赖氨酸可获很好的产率 (> 70%), 其相对分子质量由单体 引发剂摩尔比控制。

关键词: *L*-赖氨酸; *N*^ε-苄氧羰基-*L*-赖氨酸; 聚 (*N*^ε-苄氧羰基赖氨酸); 聚-*L*-赖氨酸; 三乙胺

中图分类号: O 623.735 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2006) 01-0064-05

聚氨基酸是一类生物降解高分子, 对生物体无毒, 无副作用, 无免疫源性, 具有良好的生物相容性, 并可通过体内的水解或酶解反应最终降解为小分子的氨基酸, 被人体吸收, 因此, 广泛应用于医药学领域如药物控释^[1, 2]、组织工程^[3-5]、基因治疗^[6, 7]等方面。聚-*L*-赖氨酸 (PLL) 是亲水性聚氨基酸, 常用作药物载体^[8], 具有许多优点: 含有较多的 ε-氨基, 载药量大, 在用药部位较易达到有效浓度; 对某些癌细胞具有亲和性, 可以通过细胞内吞作用进入细胞; 可生物降解, 在细胞内易于被胰蛋白酶降解产生释药作用; 长期使用无免疫原性; 并且 PLL 可以批量生产, 偶联物分子大小可以控制, 聚合程度也可由人工控制^[9, 10]等。本文以 *L*-赖氨酸为原料, 通过 ε-氨基保护, 光气法合成 *N*^ε-苄氧羰基-*L*-赖氨酸-*N*-羧酸酐 [Lys(Z)-NCA], 开环聚合, 脱保护等步骤合成了不同聚合度的聚-*L*-赖氨酸, 并对其化学结构进行了表征。

1 实验部分

1.1 试 剂

L-赖氨酸 (上海化学试剂有限公司, 纯度 99%)、碱式碳酸铜 (广东汕头市西陇化工厂, AR)、氯甲酸苄酯 (CBZ, 上海三鑫化工有限公司)、固体光气 (浙江上虞市盛泰生物化工有限公司)、以上试剂直接使用。四氢呋喃 (THF, 广东汕头光华试剂厂, AR)、环氧乙烷 (广州试剂二厂, AR)、三乙胺 (TEA, 广州试剂厂, AR)、氯仿 (广州试剂二厂, AR)、红磷 (广州化学试剂厂, 特定级), 以上试剂按常规方法提纯后使用。

1.2 实验方法

1.2.1 *N*^ε-苄氧羰基-*L*-赖氨酸 (ε-Z-lys) 的制备

称取 10 g (67 mmol) *L*-赖氨酸 (I) 溶于 146 mL 热水中, 加入 11.0 g (45.8 mmol) 碱式碳酸铜约, 煮沸约 10 min, 热过滤。滤液降温至 0~5 °C, 搅拌下每 10 min 一次, 分 4 批加入 9.2 g (110 mmol) NaHCO₃ 和 12.8 g (75 mmol) 氯甲酸苄酯, 搅拌 3.5 h, 过滤, 沉淀用水、乙醇、丙酮和乙醚洗涤, 干燥后得 15.6 g *N*^ε-苄氧羰基-*L*-赖氨酸铜盐络合物 (II)。将 II 悬浮于 190 mL 水中, 加入 6 mol/L 盐酸 309 mL 使其溶解, 通 H₂S 气体 1~2 h 至溶液呈无色为止。滤去黑色 CuS, 用 1 mol/L 盐酸清洗。滤液和洗液合并, 通氮气赶去 H₂S, 在冰冷条件下用浓氨水中和至 pH 6.5, 冰箱中放置 2 h, 过滤, 结晶用水、乙醇和乙醚清洗, 干燥后得 13.8 g ε-Z-lys (III) 粗品 (产率为 72%)。用 φ=50% 热乙醇溶解重结晶后, 干燥后得 12.3 g III 纯品, 产率为 64.3%, 熔点 250~255 °C。

1.2.2 *N*^ε-苄氧羰基-*L*-赖氨酸-*N*-羧酸酐 [Lys(Z)-NCA] 的制备 称取 5 g III 悬浮于 40 mL THF 中, 将 2.5 g 固体光气溶于 10 mL THF 中, 然后倒入 III 悬浮液中, 50~60 °C 密闭反应, 反应物先变成为凝胶状, 8~10 min 后溶解成澄清透明或浅黄色透明液体, 反应 30 min 后停止, 排出多余光气, 反应液倒入石油醚中 (30 mL/g IV), 充分振摇至有结晶析出, 于 4~6 °C 静置 48 h, 抽滤, 室温真空干燥, 得 5 g 白色针状结晶 Lys(Z)-NCA (IV), 产率

* 收稿日期: 2005-05-17

基金项目: 广东省科技攻关基金资助项目 (2KB02902J)

作者简介: 胡海梅 (1975年生), 女, 博士生; 通讯联系人: 潘仕荣, E-mail: gzpsht@163.com

为 91.5%，熔点 98 ~ 101 °C。

1.2.3 Lys(Z)-NCA 的聚合 将新制备的 5 g IV 溶于 50 mL 氯仿中，加入计量的三乙胺 苯液 (3.62 mg mL)，IV /TEA 的摩尔比 (简称 [A] / [I]) 为 1 / 1 ~ 100 / 1。室温搅拌 72 h 反应物变成无色黏稠溶液。搅拌下倒入大量无水乙醇中，沉淀，过滤，真空干燥，得 3.8 g 白色纤维状固体聚 (*N*^ε-苄氧羰基赖氨酸) [PLL(Z)] (V)，产率为 83.0%。

1.2.4 聚-*L*赖氨酸的制备 将 3.8 g V 溶于 1 : 1 (体积比) 氯仿与环氧乙烷混合液中，浓度为 2%，溶液首先通入无水氯化氢 40 min 溶液保持澄清，然后通入无水溴化氢，10 min 后，沉淀析出，持续 60 min 停止，密闭放置 1 d 过滤，利用索氏脂肪

抽提器以丙酮为溶剂抽提 1 d 以去掉吸附的溴化氢，真空干燥，得 1.7 g 白色 PLL (VI)，产率为 70.75%。合成路线如图 1。

1.3 表 征

1.3.1 聚合度测定 使用乌氏黏度计，以双蒸水为溶剂，测定温度为 25 °C，测定 1% PLL 试样的增比黏度 η_{sp} ，并根据下式计算聚合度 $DP^{[1]}$

$$\log DP = 0.79 \log \eta_{sp} + 2.46$$

1.3.2 IR 测定 样品采用 KBr 压片法制样，在 Nicolet Nexus 670 型红外光谱仪上测定。

1.3.3 ¹H NMR 测定 以 D₂O 和 CDCl₃ 为溶剂，内标为 TMS 室温下使用 INOVA-500 型核磁共振谱仪测定。

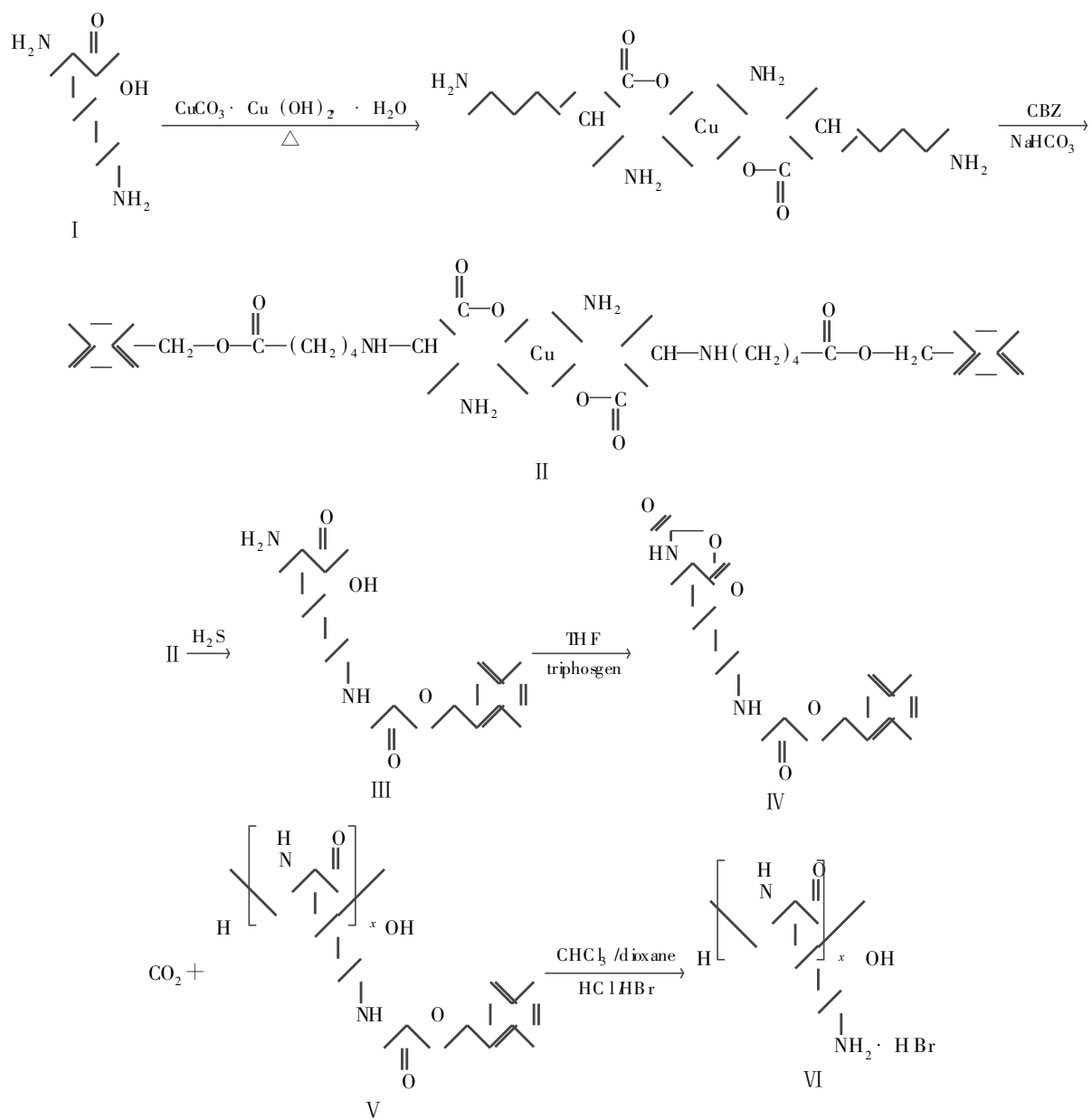


图 1 聚-*L*赖氨酸的合成路线

Fig 1 Synthesis procedure of poly-*L*-lysine

2 结果与讨论

2.1 聚合反应

2.1.1 *L*-赖氨酸铜盐络合物的生成 *L*-赖氨酸是碱性氨基酸, 含有 2 个氨基和 1 个羧基, ϵ -氨基较活泼, 在成环反应之前必须将 ϵ -氨基进行保护。本研究采用先将 α -氨基和羧基与碱式碳酸铜作用形成赖氨酸铜盐络合物, 这样可实现只对 ϵ -氨基的保护反应, 之后络合物在温和的酸解条件下脱去 Cu^{2+} 。

2.1.2 ϵ -Z-lys 的合成 ϵ -氨基保护的方法有多种, 如苄氧羰基 (Z)、4,4-二甲基-2,6-二氧代环己叉基 (Dde)、叔丁氧羰基 (Boc) 等, 在这些保护基中, 苄氧羰基作为保护基的导入比较容易; 与氨基酸形成 *N*-苄氧羰基氨基酸比较稳定, 易于结晶; 并能用多种方法选择性的脱去。 ϵ -Z-lys 在合成过程中受到

诸多因素的影响, 如 pH、温度、水分、纯度等因素。纯度对反应是很关键的, 本研究采用 50% 的热乙醇溶液重结晶, 产率和纯度均较高, 可直接用于聚合反应。

2.1.3 Lys(Z)-NCA 的制备 采用三光气与 ϵ -Z-lys 反应合成的 Lys(Z)-NCA, 对水分极其敏感, 即使在不外加任何引发剂的情况下, 它也能吸收空气中的水分而迅速聚合, 因此反应须在无水条件下进行。由于三光气在 50~60 °C 下定量分解产生三分子光气, 在密闭体系下进行, 可以准确定量, 减少对空气的污染。

2.1.4 Lys(Z)-NCA 的聚合反应 Lys(Z)-NCA 的聚合作用在氯仿溶剂中进行, 以三乙胺为引发剂, 引发 NCA 开环聚合, 该反应是阴离子聚合反应, 其反应机理如图 2。

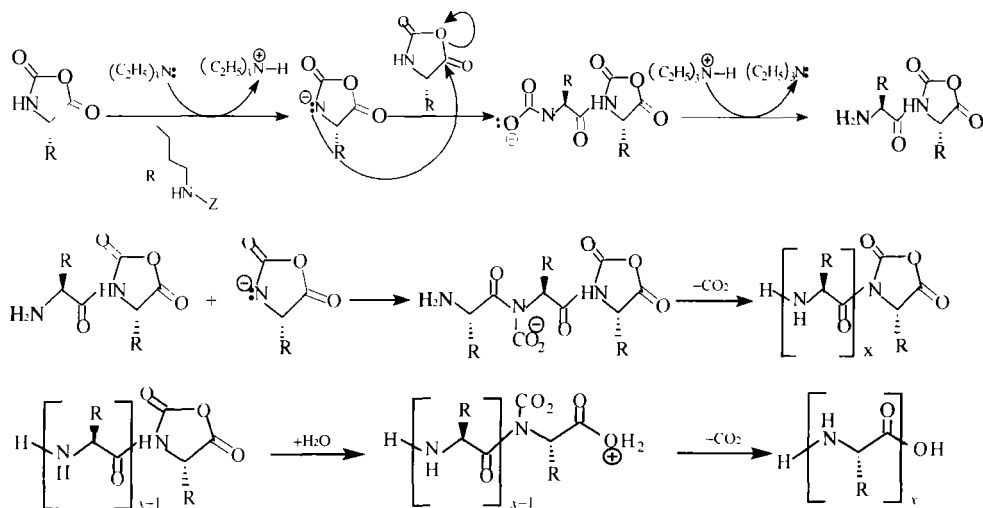


图 2 Lys(Z)-NCA 聚合反应的机理

Fig. 2 Mechanism for Lys(Z)-NCA polymerization

三乙胺是碱性亲核试剂, 其 N 上有未共用的电子对; NCA 是很活泼的单体, 显示了活性单体机制, 碱性基团使 NCA 脱质子, 产生 NCA 阴离子, 即成为所谓的“活性单体”, 与体系中的另外 NCA 分子反应, 形成新的 NCA 阴离子, 原 NCA 开环实现链的增长。极微量的三乙胺能引发 NCA 聚生成均聚物, 而水、氧等易使阴离子终止反应, 因此反应要严格的除水, 使反应在惰性的环境下进行, 阴离子聚合反应的特点是快引发, 慢增长, 无终止, 增长反应一直到单体消耗完毕。

2.1.4 PLL(Z) 的脱保护基反应 各种溶剂被用于聚合物脱去保护基 (Z) 反应, 研究发现, 乙酸-氢溴酸溶剂更适合较低相对分子质量 PLL(Z) 脱保护基, 对较高相对分子质量 PLL(Z) 的脱保护基反应并不完全或有肽键断裂发生。以氯仿和环氧乙烷作

溶剂并通入无水氯化氢和溴化氢, 则可得较为满意的结果。如果不先通入氯化氢, 溶液成为有色并且产物可能被降解。加入氯仿是为防止在脱保护基完成前, 聚合物沉淀过早析出。采用丙酮抽提, 目的是除去过量的溴化氢, 使含有溴化氢和溴的聚合物由桔黄变为白色, 所得产品纯度和产率较高。

2.2 聚合物的表征

2.2.1 聚合度的测定 由表 1 可看出聚合物的黏度随着 $[A]/[I]$ ($r(\text{Lys(Z)-NCA})/r(\text{TEA})$) 的增大而逐渐增大, 即聚合物的相对分子质量由 $[A]/[I]$ 比所决定。 $[A]/[I]$ 越大, 引发剂比例越小, 引发中心越少, 每个活性中心增长的单体链节越多相对分子质量就越大。

2.2.2 IR 的测定 ϵ -Z-lys PLL(Z)、PLL 的 IR 曲线分别见图 3。对于图 3(a) 线, 在 3345 cm^{-1} 处有

表 1 PLL均聚物的聚合度

Tab. 1 Degree of polymerization (DP) of PLL homopolymer

[A] : [I]	η_{sp}	DP	$M^{1)}$
1 : 1	0.4759	160	23360
12.5 : 1	0.4841	163	23798
25 : 1	0.828	248	36208
50 : 1	0.8491	253	36938
75 : 1	1.6247	423	61758
100 : 1	1.9168	482	70372

1) $M = 146(\text{PLL单体的相对分子质量}) \times \text{DP}$

强的 NH /OH 吸收峰， $3\,064\text{ cm}^{-1}$ 处为苯环的 C—H 伸缩振动吸收峰， $1\,691\text{ cm}^{-1}$ 处出现了苯氧羰基中的 C=O 处为苯环的 C—H 面外变形振动吸收峰， $1\,271\text{ cm}^{-1}$ 处为苯环的 C—H 面内弯曲振动吸收峰，说明赖氨酸的侧链上已接上 Z 保护基。(b) 线与 (a) 线相比， $3\,345\text{ }3\,064\text{ }1\,698\text{ }747\text{ }697\text{ cm}^{-1}$ 均存在，只是峰强度与峰宽增加，同时出现了明显的 $1\,651\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\,540\text{ cm}^{-1}$ 的酰胺 I 峰和酰胺 II 峰，表明聚合反应发生和 PLL(Z) 的生成。(c) 线与 (b) 线相比， $1\,651$ 和 $1\,538\text{ cm}^{-1}$ 处的酰胺 I 和酰胺 II 峰仍然存在， $1\,698\text{ cm}^{-1}$ 处苯氧羰基中的 C=O 吸收峰消失， $747\text{ }697\text{ }1\,271\text{ cm}^{-1}$ 的处苯环的变形振动吸收峰也消失， $3\,429\text{ cm}^{-1}$ 处出现强而宽的 OH /NH 吸收峰，说明 PLL(Z) 经脱苄生成了 PLL，并且脱苄完全。在 (b) 线和 (c) 线中， $1\,651$ 和 $1\,540\text{ cm}^{-1}$ 的酰胺 I 和酰胺 II 峰均为单峰，这是 α -螺旋形聚氨基酸的一个重要标志^[12]。可以证明所合成的 PLL(Z) 和 PLL 均具有 α -螺旋结构。

2.2.3 $^1\text{H-NMR}$ 的测定 $\epsilon\text{-Z-lys}$ ，pLL(z)，pLL 的 ^1H NMR 测定结果见图 4 各峰的归属如下：图 4(a) (D_2O 溶剂中)， δ 7.45(m; $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2$; 5H)，5.10(s; $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2$; 2H)，4.07(t; $\alpha\text{-CH}$)，3.13(t; $\epsilon\text{-CH}_2$)，1.95(m; $\beta\text{-CH}_2$)，1.56 ~ 1.39(m; $\gamma\text{-CH}_2$ 和 $\delta\text{-CH}_2$)。说明 *L* 赖氨酸的 ϵ -氨基已被 Z 保护；图 4(b) (CDCl_3 溶剂)， δ 1.24 ~ 1.98(m; $-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{Z}$)，3.10(m; $\epsilon\text{-CH}_2$)，3.8(s; $\alpha\text{-CH}$)，5.43(s; $-\text{CO}-\text{CH}-\text{NH}-$)，7.23(m; $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2$; 5H)，5.05(s; $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2$; 2H)，8.20(s; $-\text{NH}-\text{Z}$)，5.43 出现了酰胺峰，表明聚合反应发生和 PLL(Z) 的生成。图 4(c) (D_2O 溶剂)， δ 4.35(t; $\alpha\text{-CH}$)，3.05(t; $\epsilon\text{-CH}_2$)，1.83 ~ 1.68(m; $\beta\text{-CH}_2$ 和 $\delta\text{-CH}_2$)，1.49(m; $\gamma\text{-CH}_2$)，(c) 图中未见苯环上 H 的吸收峰，因此可推断，PLL(Z) 中的苯氧羰基基本上被脱除并生成了 PLL。

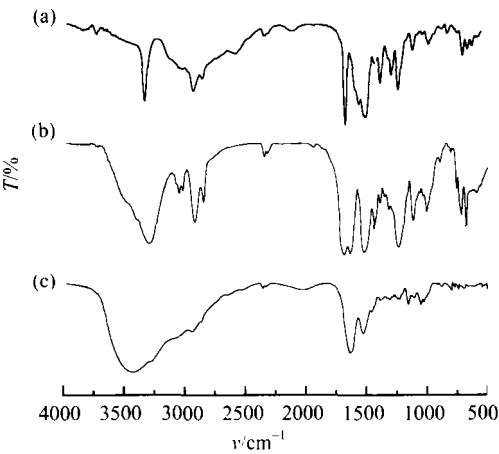


图 3 $\epsilon\text{-Z-lys}$ (a)、PLL(Z) (b)、PLL (c) 的 IR 曲线
Fig. 3 IR spectra of (a) $\epsilon\text{-Z-lys}$ (b) poly-*L*-lysine(Z) [PLL(Z)] and (c) poly-*L*-lysine(PLL)

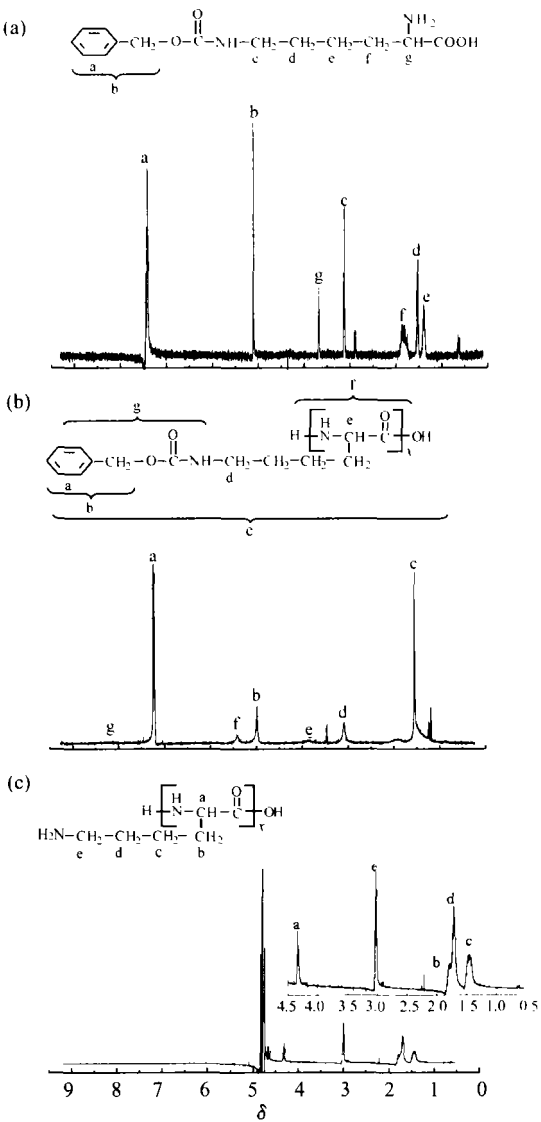


图 4 $\epsilon\text{-Z-lys}$ (a)、PLL(Z) (b) 和 PLL (c) 的 ^1H NMR 谱图
Fig. 4 ^1H NMR spectra of (a) $\epsilon\text{-Z-lys}$ (b) poly-*L*-lysine(Z) [PLL(Z)] and (c) poly-*L*-lysine(PLL)

3 结 论

采用 ϵ -氨基的苄氧羰基保护, 光气法制备 Lys(Z)-NCA、TEA 引发聚合, HB₁ 脱保护基的方法可制备 PLL 均聚物。PLL 聚合度可由粘度法测定, IR 和 ¹H NMR 证实 PLL(Z) 与 PLL 均以 α -螺旋结构存在。上述方法制备的 PLL 可获得好的产率 (70% 以上), 其相对分子质量可由单体 引发剂摩尔比控制。

参考文献:

- [1] COUFFIN-HOARAU A C, BOUSTTA M, VERT M. Enlarging the library of poly(*L*-lysine citranide) polyelectrolytic drug carriers[J]. J Poly Sci Part A: Poly Chem, 2001, 39: 3475–3484.
- [2] DISG BUSIG MATTIOLO A, et al Selective Delivery to the liver of antiviral nucleoside analogs coupled to a high molecular mass lactosaminated poly-*L*-lysine and administered to mice by intramuscular route [J]. BiolPhar 1995, 49(12): 1769–1775.
- [3] MASTSUZAWA M, KAZUTOSHI K, SUGIYAMA K, et al Ab incompatible interface for the geometrical guidance of central neurons *in vitro* [J]. J Colloid and Interface Sci 1998, 202: 213–221.
- [4] KRAUSE A, COWLES E A, GRONOW IZ G. Integrin mediated signaling in osteoblasts on titanium implant materials [J]. J Biomedical Materials Research, 2000, 52(4): 738–747.
- [5] 刘彦春, 王伟, 曹谊林, 等. 包埋后的聚羟基乙酸与软骨细胞体外培养实验研究 [J]. 中华显微外科杂志, 1998, 21: 36–38.
- [6] LEE H S, JEONG J H, PARK T G. PEG grafted polylysine with fusogenic peptide for gene delivery: high transfection efficiency with low cytotoxicity [J]. J Controlled Release, 2002, 79: 283–291.
- [7] DEMING T J. Methodologies for preparation of synthetic block copolypeptides: materials with future promise in drug delivery [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2002, 54: 1145–1156.
- [8] DISG BUSIG DERENZIN M, et al Conjugation of 5-fluoro-2-deoxyuridine with lactosaminated poly-*L*-lysine to reduce extrahepatic toxicity in the treatment of hepatocarcinomas [J]. Ital J Gastroenterol Hepatol, 1998, 30(2): 173–177.
- [9] WENDELMOED N E, van DIJK W, Leon van de Water et al Synthesis and characterization of poly-*L*-lysine with controlled low molecular weight [J]. Macromol Chem Phys, 1997, 198: 3893–3906.
- [10] FASMAN G D, IDELS N M, BLOUT E R. The synthesis and conformation of high molecular weight poly- ϵ -carbobenzoyloxy-*L*-lysine and poly-*L*-lysine: HCl [J]. J Am Chem Soc, 1975, 74: 38–41.
- [11] HATANO M, YONEYAMA M. Side chain effect on the helix stability of poly- α -amino acids [J]. J Am Chem Soc, 1970, March 11: 1392–1395.
- [12] 彭师奇. 多肽药物化学 [M]. 北京: 科学出版社, 1997: 127–140.

Synthesis and Characterization of Poly(*L*-Lysine)

HU Haimei PAN Shi-rong WEN Yu-ting GUO Zhen-huan

(First Affiliated Hospital Sun Yat-sen University Guangzhou 510080, China)

Abstract ϵ -Lys was prepared by a reaction of *L*-Lysine with carbobenzyloxy chloride. Lys(Z)-NCA was synthesized by a reaction of ϵ -Lys with triphosgene in THF. Poly-*L*-lysine (Z) [PLL(Z)] was polymerized by initiation of ethylamine (TEA) in chloroform. Poly-*L*-lysine (PLL) was obtained by a deprotecting reaction with anhydrous hydrogen bromide. The polymerization degree was measured by viscosimetry. The chemical structure of PLL was characterized by IR and ¹H NMR. The results demonstrated that PLL can be prepared by this procedure with good yield (more than 70%) and its molecular weight can be controlled by adjusting the molar ratio of monomer to initiator. It was showed that PLL (Z) and PLL molecules existed in α -helix polypeptide in films.

Key words *L*-lysine; N^{ϵ} -carbobenzoyloxy-*L*-lysine; poly(N^{ϵ} -carbobenzoyloxy-*L*-lysine); poly(*L*-lysine); triethylamine