

文章编号:1674-2869(2013)01-0036-05

聚酰胺胺树形分子的叶酸修饰及其表征

吴江渝,董兴梅,肖 夏

(武汉工程大学材料科学与工程学院,湖北 武汉 430074)

摘 要:聚酰胺胺(Polyamidoamine, PAMAM)树形分子是一种广泛用于药物载体和基因载体研究的合成大分子.由于肿瘤细胞表面具有大量表达的叶酸受体,在树形分子末端接枝上叶酸分子可以增强该化合物的肿瘤靶向性.通过发散法合成了 0 到 4 代乙二胺为核的聚酰胺胺树形分子并进行叶酸接枝修饰.利用红外光谱及紫外-可见光谱分析,对所得到的树形分子-叶酸化合物进行了结构表征.结果表明:以吡啶作为催化剂叶酸接枝效果较好,通过与叶酸紫外吸收标准曲线对比计算,零代树形分子-叶酸共轭化合物的平均接枝率约为 31%,一代至四代树形分子-叶酸共轭化合物的平均接枝率分别为 28%、36%、15%和 10%.

关键词:树形分子;叶酸;肿瘤靶向性;红外光谱;紫外-可见光谱;接枝率

中图分类号:0633.4

文献标识码:A

doi:10.3969/j.issn.1674-2869.2013.01.008

0 引 言

叶酸(Folic acid, FA)是一种常见的 B 族维生素,又称蝶酰谷氨酸.叶酸是人体中不可或缺的一种维生素,叶酸缺乏会引起巨红细胞贫血症,严重时甚至会引起白细胞减少症.此外,由于肿瘤细胞表面具有大量表达的叶酸受体,叶酸还具有抗肿瘤靶向的作用.树形分子由于具有纳米尺度、高水溶性、单分散性以及结构可调性,使其特别适合用作抗癌药物和成像药物的输送载体^[1-2].相比于脂质体和两性分子载体化合物,树形分子支架中的共价键提供了更稳定的载体结构,使之能够经受住生理条件的变化,并能保护药物分子不被快速地分解,保证其发生特定的药物释放,促使药物分子在肿瘤细胞中保持一定的药效浓度^[3].研究发现基于树形分子的药物控制释放体系相比于线性聚合物载体(例如 PEG)具有更优越的药物载体性能,这是由于树形分子的纳米尺寸和在溶液中紧密的球面结构所引起的^[4].

叶酸与癌细胞表面的叶酸受体的高度亲和力使得叶酸成为了一种识别肿瘤细胞的靶向分子^[5-6].叶酸分子中含有两个羧酸基团: α -羧基和 γ -羧基.研究发现利用叶酸的 γ -羧基接枝到树形大分子上得到的树形分子-叶酸化合物与细胞表面仍具有较高的亲和力^[7].利用叶酸对肿瘤

细胞的靶向作用和树形分子可以作为药物载体的特性,可向肿瘤组织靶向性输送抗癌治疗药物以及放射显影剂等.基于树形分子叶酸靶向的药物释放体系相比于非靶向树形分子和纯抗癌药物在癌细胞中表现出更高的药物积累量和更好的治疗效果^[7].

本文采用发散法合成以乙二胺为核的聚酰胺胺(Polyamidoamine, PAMAM)树形分子.将叶酸通过两个连续的反应步骤接枝到树形分子表面,得到树形分子-叶酸化合物,并对所得到的一系列树形分子-叶酸化合物进行了红外光谱以及紫外-可见光谱的表征.这种具有靶向性的树形分子药物载体材料对提高抗癌药物的有效性提供了可能.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

叶酸、醋酸、醋酸钠、浓盐酸、氢氧化钠、吡啶购自国药集团上海化学试剂公司,N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、N,N'-二环己基碳酰亚胺(DCC)、乙二胺、丙烯酸甲酯购自国药集团化学试剂有限公司,乙二胺和丙烯酸甲酯使用前重蒸.

PB-10 pH 计(Sartorius 公司)、85-2 型恒温磁力搅拌器(上海市易友仪器有限公司)、RE-52 型旋转蒸发器(上海市嘉鹏科技有限公司)、TU

收稿日期:2012-10-22

基金项目:国家自然科学基金(No. 51003081);武汉市青年科技晨光计划项目(200950431195)

作者简介:吴江渝(1977-),男,湖北武汉人,教授,硕士研究生导师.研究方向:树形分子合成及应用,丙烯酸系聚合物合成及应用,纳米材料制备.

—1900 双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)、Nicolet is10 红外光谱仪(美国 Nicolet 公司)。

1.2 实验方案

在实验的过程中,乙二胺为核的 PAMAM 树形分子采用经典的发散合成法制得。树形分子—叶酸化合物的实验步骤如图 1 所示。

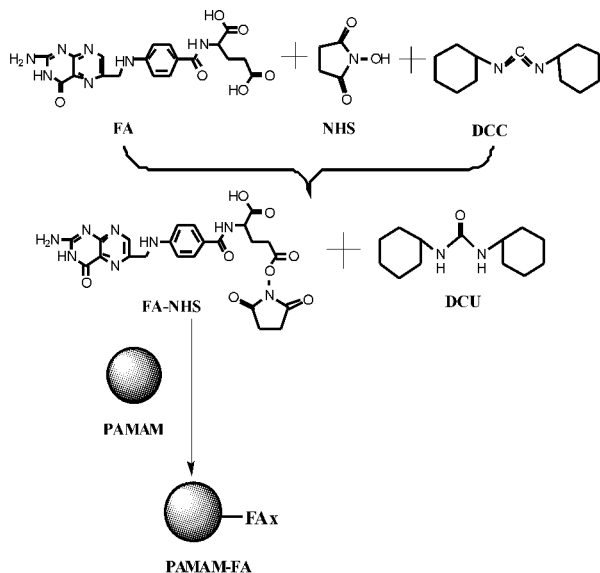


图1 PAMAM-FA 合成路线图

Fig.1 Synthesis of PAMAM-FA

1.2.1 叶酸标准曲线实验 量取冰醋酸 5.7 g 加入 1 000 mL 容量瓶中,向其加入 91 g 醋酸钠,加入蒸馏水定容至刻度线。震荡至其完全溶解。即配成了质量浓度为 0.1 mol/L 且 pH=5.8 的醋酸—醋酸钠缓冲溶液。以此缓冲液为溶剂配制质量浓度分别为 0.001、0.002 5、0.005 0、0.007 5、0.010、0.015、0.020、0.025、0.030 mg/mL 的叶酸标准溶液,并测定其在吸收波长 $\lambda=280$ nm 处的吸光度。

1.2.2 PAMAM 树形分子的合成 PAMAM 树形分子的合成通过两步反应得到:迈克尔加成反应和酰胺化反应。首先,以乙二胺为核与过量的丙烯酸甲酯反应,伯胺基与双键加成得到末端为酯基的半代树形分子。半代树形分子与过量的乙二胺反应得到末端为伯胺基的整代树形分子。如此交替重复反应得到高代树形分子^[8]。实验得到 0 至 4 代的树形分子(G0-PAMAM 末端含 4 个氨基,G1-PAMAM 末端含 8 个氨基,依此类推)。

1.2.3 叶酸活化酯的制备 称取 2.512 g 叶酸于 100 mL 圆底烧瓶中,加入 70 mL DMSO 搅拌使其完全溶解。向其中加入 1.175 g 的 DCC 和 715 mg 的 NHS。25 °C 下剧烈搅拌反应 5 h,停止反应。将反应液过滤除去白色固体副产物 DCU,

得到叶酸活化酯溶液。

1.2.4 树形分子—叶酸化合物的制备 分别称取 G0-PAMAM 120 mg、G1-PAMAM 130 mg、G2-PAMAM 118 mg、G3-PAMAM 80 mg、G4-PAMAM 106 mg 溶于 5 mL DMSO 中,搅拌状态下分别向其逐滴加入叶酸活化酯溶液 7、9、12、15、16 mL。加入两滴新蒸吡啶做催化剂。剧烈搅拌反应两天。将 0 代和 1 代反应粗产物用乙醚沉降,得到鹅黄色絮状沉淀,冷冻干燥即得到黄褐色固体粉末 G0-PAMAM-FA、G1-PAMAM-FA。将 2、3、4 代反应粗产物用截留分子量 3 500 的透析袋透析提纯。冷冻干燥得到黄褐色固体粉末 G2-PAMAM-FA、G3-PAMAM-FA 和 G4-PAMAM-FA。

2 结果与讨论

2.1 叶酸紫外吸收标准曲线的绘制

测定不同浓度叶酸标准溶液在吸收波长 $\lambda=280$ nm 处的吸光度,绘制出吸光度随浓度变化的紫外吸收叶酸标准曲线,如图 2。

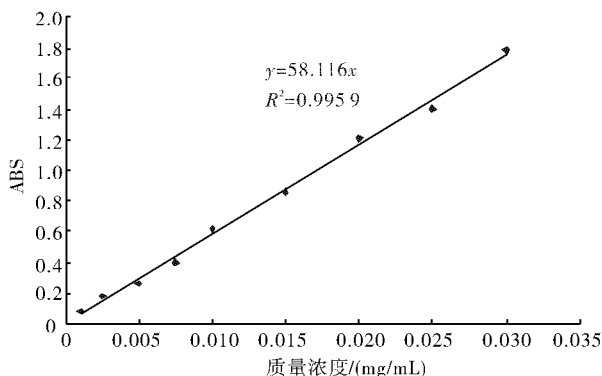


图2 叶酸标准曲线

Fig.2 Standard absorption curve of folic acid

2.2 催化剂的选择

在叶酸的活化反应中,尝试了两种催化剂方案:一种是采用 NHS/EDC 作为催化剂,反应过程中副反应比较少,几乎没有副产物生成,但是反应后处理不易。另一种是采用 NHS/DCC 做催化剂。反应过程迅速,有少量白色不溶副产物 DCU 生成,但易分离。因此实验中选择 NHS/DCC 作为叶酸活化反应的催化剂。叶酸活化酯与树形分子的反应是一种酰胺化反应,反应中常用的催化剂有吡啶和三乙胺。实验发现吡啶在实验进程中催化活性明显高于三乙胺,故选择吡啶作为反应的催化剂。

2.3 红外表征(IR)

图 3 为 0 代到 4 代树形分子—叶酸化合物的红外光谱图。根据分析可以发现,在 3 300~3 500 cm^{-1} 处为 N—H 的伸缩振动吸收峰。在 3 000 ~ 3 100 cm^{-1} 处为叶酸分子中苯环中 C—H 伸缩振

动吸收峰. 由于该峰较弱, 它常被附近的强吸收峰所覆盖. 在波数为 $1\,600 \sim 1\,450\text{ cm}^{-1}$ 之间的吸收峰是苯环骨架上 $\text{C}=\text{C}$ 的伸缩振动, 说明存在明显的苯环结构. $1\,700\text{ cm}^{-1}$ 附近的吸收峰为 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动峰. 在 819 cm^{-1} 和 641 cm^{-1} 出现叶酸中苯环和杂环 $-\text{CH}$ 的面外弯曲振动吸收特征峰. 通过判断这些基团的存在, 可以推知叶酸分子已经和 PAMAM 树形分子反应, 叶酸分子成功接枝到树形分子上.

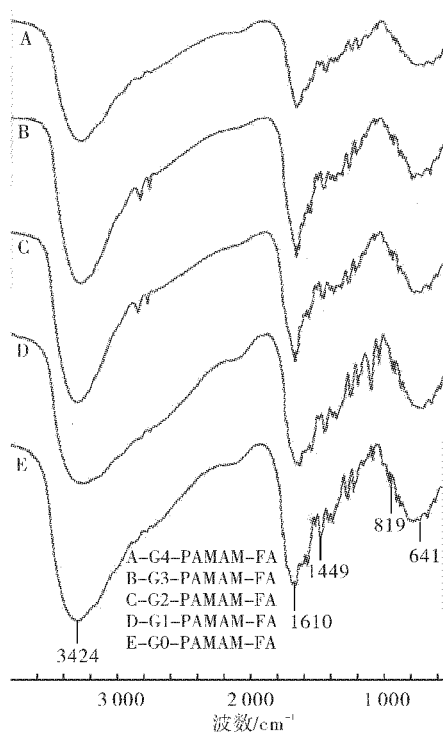


图 3 各代 PAMAM-FA 化合物的红外光谱图

Fig. 3 FT-IR spectra of PAMAM-FA compounds

2.4 紫外光谱表征

用 pH 值为 5.8 的醋酸-醋酸钠缓冲液作为溶剂分别配制质量浓度为 0.2、0.1、0.05、0.025、0.0125、0.00625、0.003125 mg/mL 的 G0-PAMAM-FA、G1-PAMAM-FA、G2-PAMAM-FA、G3-PAMAM-FA、G4-PAMAM-FA 溶液, 并用紫外分光光度计测定其紫外吸收光谱. 图 4 至图 8 为不同浓度的各代树形分子-叶酸化合物的紫外吸收光谱图. 从图中可以发现, 树形分子-叶酸化合物在 285 nm 处的吸收值随着该化合物的浓度的增加而增加. 通过对照叶酸标准曲线可以计算出相应溶液中的叶酸浓度, 从而进一步计算出各代树形分子与叶酸的接枝率. 计算可得平均每个 G0-PAMAM 树形分子接枝约 1.25 个叶酸分子, G0-PAMAM 表面有 4 个末端氨基, 因此 G0-PAMAM-FA 的平均接枝率约为 31%.

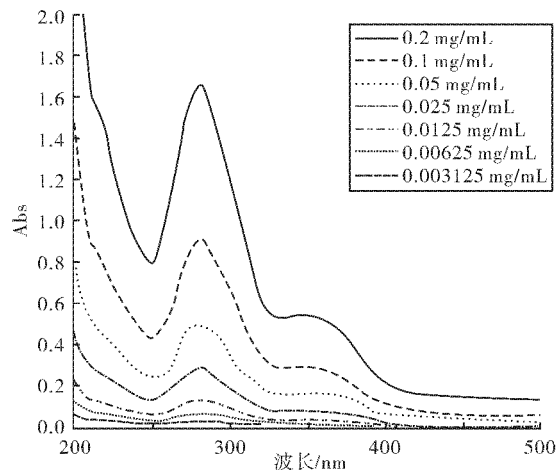


图 4 G0-PAMAM-FA 化合物的紫外吸收谱图

Fig. 4 UV-spectra of G0-PAMAM-FA at different concentrations

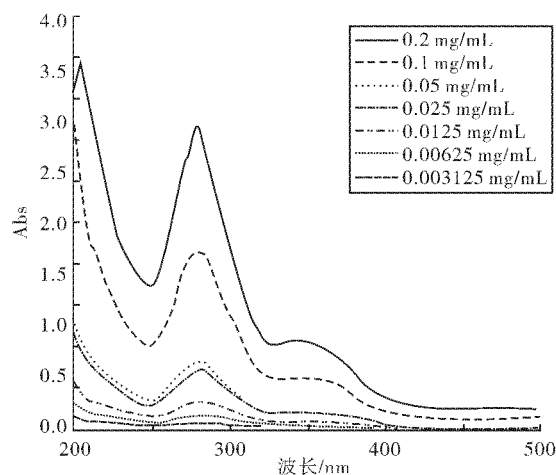


图 5 G1-PAMAM-FA 化合物的紫外吸收谱图

Fig. 5 UV-spectra of G1-PAMAM-FA at different concentrations

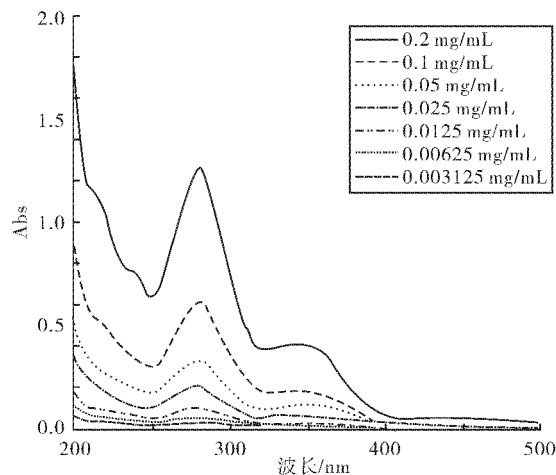


图 6 G2-PAMAM-FA 化合物的紫外吸收谱图

Fig. 6 UV-spectra of G2-PAMAM-FA at different concentrations

依此类推计算可知, G1-PAMAM-FA 的平均接枝率约为 28%, G2-PAMAM-FA 的平均接枝率

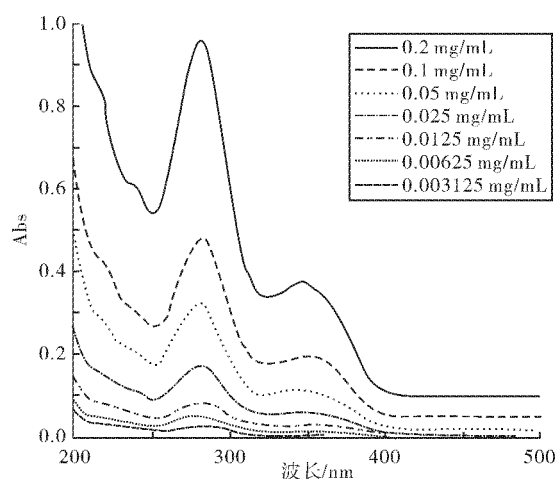


图 7 G3-PAMAM-FA 化合物的紫外吸收谱图

Fig. 7 UV-spectra of G3-PAMAM-FA at different concentrations

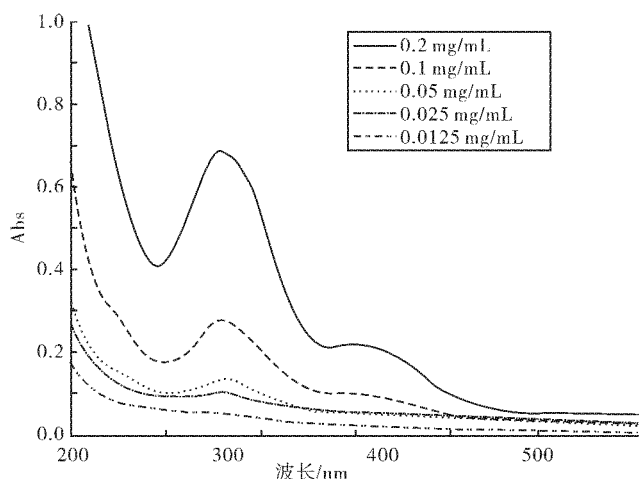


图 8 G4-PAMAM-FA 化合物的紫外吸收谱图

Fig. 8 UV-spectra of G4-PAMAM-FA at different concentrations

约为 36%, G3-PAMAM-FA 的接枝率约为 15%, 而 G4-PAMAM-FA 的接枝率大约为 10%。第 3 代和 4 代树形分子的叶酸接枝率较低的原因可能是由于树形分子表面基团增多, 空间位阻增大, 同时接上部分叶酸分子后空间位阻效应进一步变大, 阻碍了其他氨基与叶酸分子的反应。

3 结 语

PAMAM 树形大分子作为一种优良的载体广泛用于药物控制释放, 而引入具有肿瘤靶向功能的叶酸分子作为靶向单元可以提高药物分子对肿瘤细胞的选择性。本文对乙二胺为核的 PAMAM 树形大分子进行叶酸接枝修饰研究。通过一系列的反应, 成功将叶酸分子接枝到树形大分子, 并对

所合成的系列树形分子—叶酸化合物进行了表征。我们期望这种具有靶向性的药物载体能够在癌症治疗中得到更广泛的应用。

致谢

本研究得到国家自然科学基金委员会、武汉市科学技术局提供资金资助, 同时也是在实验室全体成员的帮助下完成的。在此一并予以衷心感谢!

参考文献:

- [1] Majoros I J, Thomas T P, Mehta C B, et al. Poly (amidoamine) Dendrimer-Based Multifunctional Engineered Nanodevice for Cancer Therapy [J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2005, 48: 5892-5899.
- [2] Majoros I J, Myc A, Thomas T, et al. PAMAM Dendrimer-Based Multifunctional Conjugate for Cancer Therapy: Synthesis, Characterization, and Functionality[J]. Biomacromolecules, 2006, 7: 572-579.
- [3] Wiwattanapatapee R, Carren o-Go'mez B, Malik N, et al. Anionic PAMAM Dendrimers Rapidly Cross Adult Rat Intestine In Vitro: A Potential Oral Delivery System [J]. Pharmaceutical Research, 2000, 17(8):991-998.
- [4] Zhu S J, Hong M H, Zhang L H, et al. PEGylated PAMAM Dendrimer-Doxorubicin Conjugates: In Vitro Evaluation and In Vivo Tumor Accumulation [J]. Pharmaceutical Research, 2010, 27 (1): 161-174.
- [5] 徐海娥, 闫翠娥. 叶酸和聚乙二醇接枝作基因载体用壳聚糖的合成与表征[J]. 化学研究与应用, 2007, 19(1):60-63.
- [6] Shi X Y, Wang S H, Shen M W, et al. Multifunctional Dendrimer-Modified Multiwalled Carbon Nanotubes: Synthesis, Characterization, and In Vitro Cancer Cell Targeting and Imaging[J]. Biomacromolecules, 2009, 10: 1744-1750.
- [7] Zhang Y Q, Sun Y H, Xu X P, et al. Synthesis, Biodistribution, and Microsingle Photon Emission Computed Tomography (SPECT) Imaging Study of Technetium-99m Labeled PEGylated Dendrimer Poly (amidoamine) (PAMAM)-Folic Acid Conjugates [J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2010, 53: 3262-3272.
- [8] 姜铁坤, 吴江渝, 肖夏, 等. 微波条件下树形分子核单元的合成及优化[J]. 武汉工程大学学报, 2010, 32 (11):70-73.

Synthesis and characterization of folic acid-modified polyamidoamine dendrimers

WU Jiang-yu , DONG Xing-mei , XIAO Xia

(School of Materials Science and Engineering, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract: Polyamidoamine (PAMAM) dendrimers are synthetic molecules which are now widely used as vectors in drugs delivery and gene transfer research. Since folic acid (FA) receptor is over-expressed on the surface of tumor cells, the tumor-targeting effect of dendrimers can be improved through grafting folic acid at the terminal of the dendrimer molecules. Ethylenediamine-core PAMAM dendrimers with generation 0 through 4 were synthesized using divergent strategy, and folic acid molecules were grafted onto the dendrimer surface. The obtained dendrimer-FA compounds were characterized by FT-IR and UV-vis spectra. The results show that pyridine is a good catalyst for the folic acid grafting. The grafting ratio of G0-PAMAM-FA is about 31% and the ratios for the grafted G0-G4 PAMAM dendrimers are 28%, 36%, 15% and 10%, respectively.

Key words: dendrimer; folic acid; tumor targeting; FT-IR spectra; UV-vis spectra; grafting ratio

本文编辑: 龚晓宁