

三(2-氨基乙基)胺核聚酰胺胺树形分子的合成

吴江渝,黄维哲,周 婷,何紫莹

(武汉工程大学材料科学与工程学院,湖北 武汉 430074)

摘 要:为了增大树形分子的表面官能团密度,降低其结构柔顺性,以三(2-氨基乙基)胺为原料合成了一种新核树形分子.通过与丙烯酸甲酯在避光条件下的迈克尔加成反应得到末端为酯基的0.5代树形分子,将得到的产物与乙二胺进行酰胺化反应制得末端为氨基的1.0代树形分子.重复以上两个反应,合成得到1.0代到4.0代以三(2-氨基乙基)胺为核的聚酰胺胺树形分子.反应过程中,运用薄层层析色谱检验以及观察红外光谱中酯基峰的消失与出现判断反应程度.每一步得到的粗产品采用柱层析分离的方法和乙醚沉降法进行分离提纯,并通过红外光谱和核磁共振氢谱对所得化合物的分子结构进行表征,证明了所得化合物即为目标化合物.三(2-氨基乙基)胺的引入使得所合成的树形分子具有较小的核单元.

关键词:聚酰胺胺;树形分子;三(2-氨基乙基)胺;结构表征

中图分类号:O633.4

文献标识码:A

doi:10.3969/j.issn.1674-2869.2014.04.010

0 引 言

21世纪以来,世界癌症的发病率一直呈逐年上升之势,已经成为威胁人类健康的头号杀手.上世纪末出现基因治疗技术,将很有可能成为人类21世纪攻克癌症的有力工具^[1].在基因治疗中,安全而有效的基因载体系统是保障外源基因在目的细胞中高效、稳定的表达以及成功开展基因治疗的重要基础.树形分子作为一种非病毒基因及药物载体,具有良好的水溶性、生物相容性和低免疫原性,因而广泛用于基因转染和药物输送研究.由于与传统大分子的聚合反应不同,树形分子一般通过逐步合成得到,因此其分子大小、形状和表面官能团数目可以得到精确控制^[2-6].

聚酰胺胺(polyamidoamine, PAMAM)树形分子是研究最早,应用最广泛的树形分子类别,传统的聚酰胺胺树形分子以乙二胺或氨为核,通过反复的迈克尔加成反应和酰胺化反应得到^[7-9].研究表明,树形分子的柔顺性及表面官能团密度会影响其在生物医药领域如基因转染和药物传递方面的生物活性及细胞毒性^[10].通过选择不同的核单元结构,可以有效控制聚酰胺胺树形分子的核单元大小,从而调节分子的结构柔顺性及其表面官能团密度.

本文以三(2-氨基乙基)胺(tri(2-aminoethyl)

amine, TAEA)为核,通过发散法利用交替的迈克尔加成和酰胺化反应合成第一代到第四代的酯基末端及氨基末端聚酰胺胺树形分子,并通过红外光谱和核磁共振氢谱对所合成的树形分子化合物进行了结构表征.与传统的氨核树形分子以及本实验室前期工作合成的树形分子化合物相比^[11-12],三(2-氨基乙基)胺结构的引入使得所合成的聚酰胺胺树形分子核单元更小,分子结构更为紧密.因此,在相同代数情况下,该系列树形分子具有较高的表面官能团密度,以及较低分子柔顺性.

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

试剂:三(2-氨基乙基)胺,乙二胺(国药集团生产,化学纯,使用前重蒸),丙烯酸甲酯(国药集团生产,化学纯,使用前重蒸),甲醇(国药集团生产,化学纯,使用前重蒸),二氯甲烷(国药集团生产,化学纯),乙酸乙酯(国药集团生产,化学纯),石油醚(国药集团生产,化学纯),无水乙醚(国药集团生产,化学纯),薄层层析硅胶板(青岛海洋化工厂,试剂级),石英砂(天津市南开化工厂,分析纯),柱层层析硅胶(青岛海洋化工厂,试剂级).

仪器:85-2型恒温磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限公司),RE-52型旋转蒸发器(上海市嘉鹏

收稿日期:2013-12-18

基金项目:国家自然科学基金(51003081)

作者简介:吴江渝(1977-),男,广东电白人,教授,博士.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、纳米二氧化硅材料的生物修饰.

科技有限公司),JA3003N 电子天平(上海精密科学仪器有限公司天平仪器厂),循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司),2XZ-4 型旋片式真空泵(临海市谭氏真空设备有限公司),Nicolet6700 型傅里叶红外光谱仪(美国 Thermo Electron 公司),Agilent 400MR 型核磁共振波谱仪(美国 Agilent 公司)。

1.2 合成方法

以三(2-氨基乙基)胺为出发点,通过与过量的

丙烯酸甲酯反应得到末端为酯基的 0.5 代聚酰胺胺树形分子 G0.5-PAMAM。G0.5-PAMAM 树形分子再与过量的乙二胺反应,得到末端为氨基的 1 代树形分子 G1.0-PAMAM。重复以上步骤,可分别得到酯基末端的 G1.5-PAMAM、G2.5-PAMAM、G3.5-PAMAM 以及氨基末端的 G2.0-PAMAM、G3.0-PAMAM、G4.0-PAMAM 树形分子。由于丙烯酸甲酯和乙二胺化学性质活泼,本实验可在常温下进行,无需升温处理。合成路线如图 1 所示。

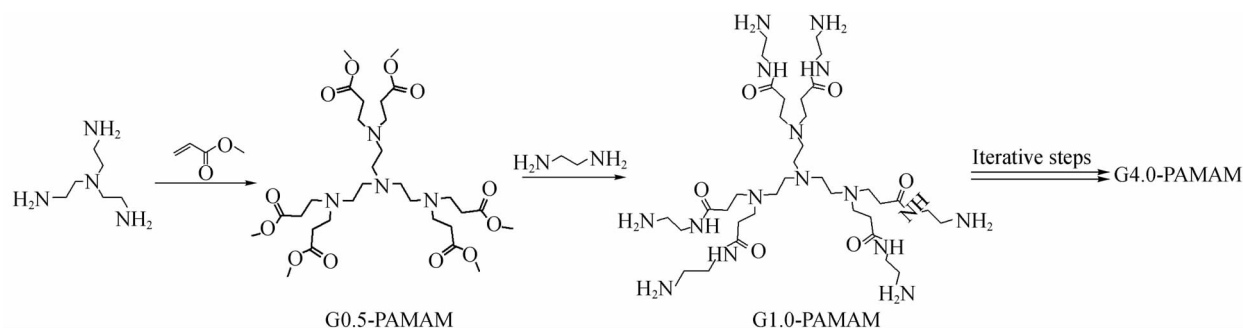


图 1 三(2-氨基乙基)胺核聚酰胺胺树形分子的合成

Fig. 1 Synthesis of PAMAM dendrimers with TEAE core

具体合成步骤如下:

a. G0.5-PAMAM 树形分子的合成:

将过量的新蒸丙烯酸甲酯溶于 10 mL 甲醇中,搅拌状态下向其中滴加适量的三(2-氨基乙基)胺,在氮气保护的状态下避光反应 36 h。采用甲醇作展开剂,经薄层层析色谱(TLC)检验证明三(2-氨基乙基)胺已反应完全。停止反应,旋蒸除去溶剂甲醇及过量的丙烯酸甲酯,得到淡黄色黏稠状粗产物。采用甲醇:二氯甲烷=1:20(体积比)作淋洗剂,通过柱层析分离提纯得到淡黄色黏稠状液体 G0.5-PAMAM,产率为 75%。

b. G1.0-PAMAM 树形分子的合成:

将过量的新蒸乙二胺溶于 12 mL 甲醇中,搅拌状态下向其中滴加适量的 G0.5-PAMAM,在氮气保护的状态下反应 24 h。采用甲醇:二氯甲烷=1:20(体积比)作展开剂,经 TLC 检验和红外光谱分析证明 G0.5-PAMAM 已反应完全。停止反应,旋蒸除去溶剂甲醇及大部分过量的乙二胺,得到淡黄色黏稠状粗产物。将粗产物溶于少量甲醇,250 mL 乙醚反复沉降 3 次,油泵减压抽除残余的乙二胺,直至 TLC 检验无乙二胺为止,得到淡黄色黏稠状液体 G1.0-PAMAM,产率为 92%。

c. G1.5-PAMAM 树形分子的合成:

将过量的新蒸丙烯酸甲酯溶于 15 mL 甲醇中,搅拌状态下向其中滴加适量的 G1.0-PAMAM,在氮气保护的状态下避光反应 36 h。采用甲醇作展

开剂,经 TLC 检验证明 G1.0-PAMAM 已反应完全。停止反应,旋蒸除去溶剂甲醇及过量的丙烯酸甲酯,得到淡黄色黏稠状粗产物。采用甲醇:二氯甲烷=10:1(体积比)作淋洗剂,通过柱层析分离提纯得到淡黄色黏稠状液体 G1.5-PAMAM,产率为 76%。

d. G2.0-PAMAM 树形分子的合成:

将过量的新蒸乙二胺溶于 15 mL 甲醇中,搅拌状态下向其中滴加适量的 G1.5-PAMAM,在氮气保护的状态下反应 24 h。采用甲醇作展开剂,经 TLC 检验和红外光谱分析证明 G1.5-PAMAM 已反应完全。停止反应,旋蒸除去溶剂甲醇及大部分过量的乙二胺,得到淡黄色黏稠状粗产物。将粗产物溶于少量甲醇,250 mL 乙醚反复沉降 3 次,油泵减压抽除残余的乙二胺,直至 TLC 检验无乙二胺为止,得到淡黄色黏稠状液体 G2.0-PAMAM,产率为 95%。

重复以上步骤,即得到 G2.5-PAMAM 至 G4.0-PAMAM 各代树形分子。

2 结果与讨论

2.1 红外表征(IR)

本实验所用的产品均为液态,红外光谱的测定采用涂膜法。图 2 为酯基末端树形分子的红外光谱图,图 3 为氨基末端树形分子的红外光谱图。

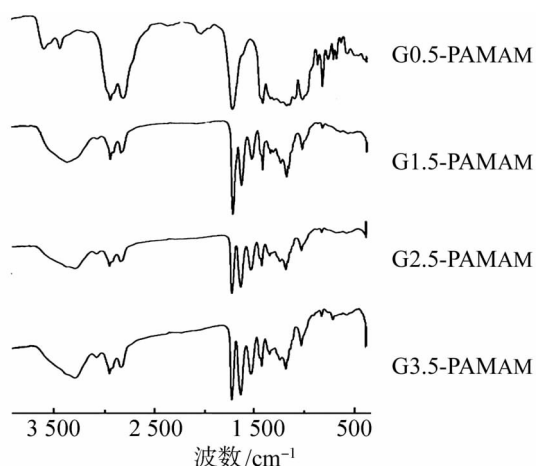


图2 酯基末端树形分子的红外光谱图

Fig. 2 IR spectra of ester-terminating PAMAM dendrimers

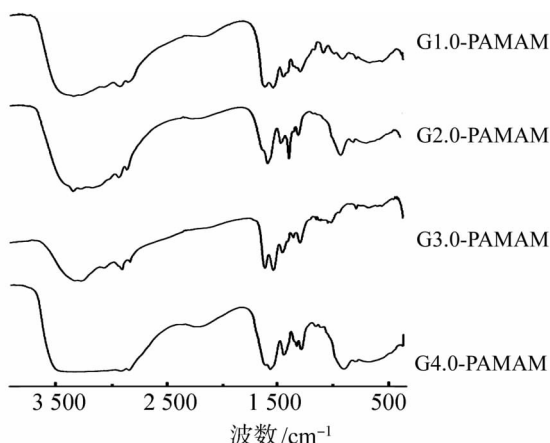


图3 氨基末端树形分子的红外光谱图

Fig. 3 IR spectra of amino-terminating PAMAM dendrimers

由图可知,在 $3\ 300\sim 3\ 500\ \text{cm}^{-1}$ 处出现的峰为 N—H 的伸缩振动吸收峰,在 $2\ 943\ \text{cm}^{-1}$ 附近出现的为亚甲基的 C—H 伸缩吸收峰, $1\ 440\ \text{cm}^{-1}$ 附近的峰为亚甲基的 C—H 的弯曲振动吸收峰. $1\ 560\ \text{cm}^{-1}$ 附近为酰胺羰基的 N—H 和 C—N 的弯曲振动吸收峰, $1\ 650\ \text{cm}^{-1}$ 附近为酰胺羰基中 —CO— 的伸缩振动吸收峰,两个连续的吸收峰能证明分子中含有一 CONH— 结构. 酯基末端树形分子和氨基末端树形分子最明显的区别在于 $1\ 730\ \text{cm}^{-1}$ 附近的酯羰基伸缩振动的特征吸收峰. 对于 G0. 5-PAMAM, G1. 5-PAMAM, G2. 5-PAMAM, G3. 5-PAMAM, 由于其末端基团为酯基, 因此其在 $1\ 730\ \text{cm}^{-1}$ 附近的酯羰基伸缩振动吸收峰能明显观察到(见图 2). 对于 G1. 0-PAMAM, G2. 0-PAMAM, G3. 0-PAMAM, G4. 0-PAMAM, 由于其末端基团为氨基, 结构中不存在酯基, 因此其在 $1\ 730\ \text{cm}^{-1}$ 附近不存在吸收峰(见图 3). 通过观察酯羰基伸缩振动吸收峰的出现和消失, 可验

证酯基是否与胺基完全反应. 这些特征峰的存在能定性地表征化合物中特征集团的存在, 同时能进一步反映反应的进程和产物的结构.

2.2 核磁表征 ($^1\text{H-NMR}$)

为进一步证实目标产物的分子结构, 我们对所合成的各代树形分子化合物进行了核磁共振氢谱表征. 对于酯基末端的树形分子, 所用核磁溶剂为 CDCl_3 ; 对于氨基末端的树形分子, 所用核磁溶剂为 D_2O . 由于分子中不同化学环境的氢原子能在核磁共振氢谱中表现出不同的化学位移, 因此通过观察核磁谱图中氢原子共振吸收峰的化学位移及吸收峰面积, 可以推断所合成化合物的分子结构.

对于 G0. 5-PAMAM(图 4), 测试数据如下, $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$: 3. 67 (18H, OCH_3), 2. 75 (12H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{COO}$), 2. 51 (12H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2. 46 (12H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{COO}$). 根据化学位移将其氢原子划分为 3 类(化学位移分别在 3. 6~3. 8, 2. 7~2. 9, 2. 4~2. 6 之间的吸收峰对应不同种类的氢原子), 3 种氢原子的个数比为 3:2:4, 其对应的吸收峰的积分面积之比约为 24. 5:16. 7:32. 4, 这与氢原子的个数比吻合, 故证明所得产物为纯净的 G0. 5-PAMAM.

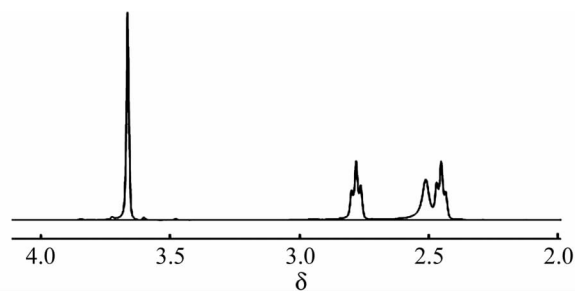


图4 G0. 5-PAMAM 树形分子核磁共振氢谱

Fig. 4 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of G0. 5-PAMAM dendrimer

对于 G1. 0-PAMAM(图 5), 测试数据如下, $^1\text{H-NMR}(\text{D}_2\text{O})\delta$: 3. 12 (12H, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2. 70 (12H, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2. 64 (12H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 2. 46 (12H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2. 27 (12H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$). 根据化学位移将其氢原子划分为 4 类(化学位移分别在在 3. 0~3. 25, 2. 55~2. 8, 2. 4~2. 55, 2. 2~2. 35 的吸收峰对应的不同种类的氢原子), 4 种氢原子的个数比为 1:2:1:1, 其对应的吸收峰的积分面积之比约为 1. 09:1. 98:0. 98:1. 00, 这与氢原子的个数比基本吻合, 故证明所得产物为纯净的 G1. 0-PAMAM.

对于 G1. 5-PAMAM(图 6), 与 G0. 5-PAMAM 类似, 根据化学位移将其氢原子划分为 3 类(化学位移分别在在 3. 50~4. 00, 3. 50~3. 00, 3. 00~2. 40

的吸收峰对应的不同种类的氢原子), 3 种氢原子的个数比为 3:1:8, 其对应的吸收峰的积分面积之比约为 5.88:2.34:17.04, 这与氢原子的个数比基本吻合, 故证明所得产物为纯净的 G1.5-PAMAM.

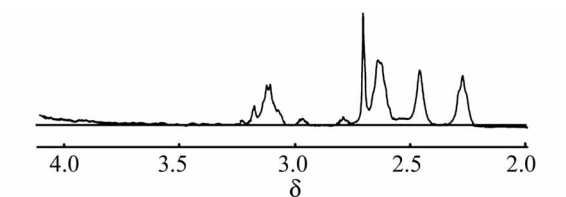


图 5 G1.0-PAMAM 树形分子核磁共振氢谱

Fig. 5 ^1H -NMR spectrum of G1.0-PAMAM dendrimer

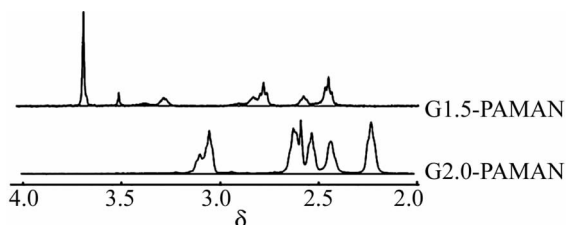


图 6 G1.0-PAMAM 和 G1.5-PAMAM 树形分子核磁共振氢谱

Fig. 6 ^1H -NMR spectra of G1.5-PAMAM and G2.0-PAMAM dendrimers

对于 G2.0-PAMAM(图 6), 与 G1.0-PAMAM 类似, 根据化学位移将其氢原子划分为 3 类(化学位移分别在在 3.30~3.46, 2.4~3.2.20 的吸收峰对应的不同种类的氢原子), 3 种氢原子的个数比为 3:7:3, 其对应的吸收峰的积分面积之比约为 11.3:27.5:11, 这与氢原子的个数比基本吻合, 故证明所得产物为纯净的 G2-PAMAM.

所合成的其它代数化合物, 即 G2.5-PAMAM, G3.0-PAMAM, G3.5-PAMAM, G4.0-PAMAM 树形分子的核磁共振氢谱如图 7 所示, 与前文讨论类似, 通过吸收峰的化学位移和积分面积分析, 均能证明所得产物即为目标树形分子.

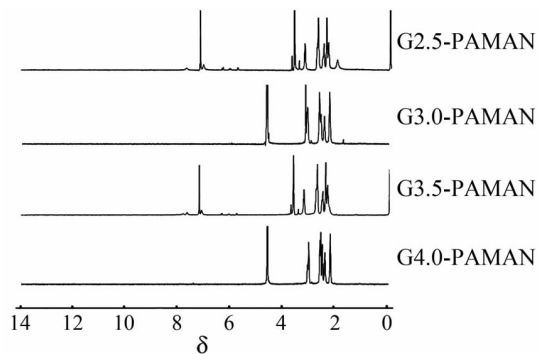


图 7 G2.5-PAMAM、G3.0-PAMAM、G3.5-PAMAM、G4.0-PAMAM 的核磁共振氢谱

Fig. 7 ^1H -NMR spectra of G2.5-PAMAM, G3.0-PAMAM, G3.5-PAMAM and G4.0-PAMAM dendrimers

3 结 语

聚酰胺胺树形分子作为一种潜在的基因及药物载体材料而广泛用于基因治疗研究, 其生物活性和细胞毒性与其分子的结构柔顺性和表面官能团密度密切相关. 本文以三(2-氨基乙基)胺为核出发, 采用交替的迈克尔加成反应和酰胺化反应合成得到从 0.5 代到 4 代酯基末端和氨基末端的树形分子, 并通过红外光谱和核磁共振氢谱分析证实了目标化合物的结构. 与传统的氨核以及本实验室合成的其他聚酰胺胺树形分子相比, 该系列聚酰胺胺树形分子的核单元更紧凑, 从而使分子的柔顺性降低, 表面官能团密度增大. 其结构上的改变能影响树形分子在基因转染和药物传递中的生物活性, 对安全高效的树形分子载体试剂开发具有重要意义.

致 谢

本研究得到国家自然科学基金委员会提供的资金资助, 特表感谢!

参考文献:

- [1] MILLER A D. Human gene therapy comes of age[J]. Nature, 1992, 357(6378): 455-460.
- [2] MAJOROS I J, THOMAS T P, MEHTA C B, et al. Poly(ami-doamine) dendrimer-based multifunctional engineered nanodevice for cancer therapy[J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2005, 48(19): 5892-5899.
- [3] MAJOROS I J, MYC A, THOMAS T, et al. PAM-AM dendrimer-based multifunctional conjugate for cancer therapy: synthesis, characterization, and functionality[J]. Biomacromolecules, 2006, 7(2): 572-579.
- [4] ZHU S, HONG M, ZHANG L, et al. PEGylated PAM-AM dendrimer-doxorubicin conjugates: in vitro evaluation and in vivo tumor accumulation[J]. Pharmaceutical Research, 2010, 27(1): 161-174.
- [5] SHI X, WANG S H, SHEN M, et al. Multifunctional dendrimer-modified multiwalled carbon nanotubes: synthesis, characterization, and in vitro cancer cell targeting and imaging[J]. Biomacromolecules, 2009, 10(7): 1744-1750.
- [6] ZHANG Y, SUN Y, XU X, et al. Synthesis, biodistribution, and microsingle photon emission computed tomography (SPECT) imaging study of technetium-99m labeled PEG ylated dendrimer poly (amidoamine)(PAMAM)- folic acid conjugates[J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2010, 53(8): 3262-3272.
- [7] DUFÈS C. Dendrimer-based drug delivery systems; from

- theory to practice[J]. Chem Med Chem, 2013, 8(2): 336-336.
- [8] DYKES G M. Dendrimers; a review of their appeal and applications[J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2001, 76(9): 903-918.
- [9] IYYAMPERUMAL R, ZHANG L, HENKELMAN G, et al. Efficient electrocatalytic oxidation of formic acid using Au@ Pt dendrimer-encapsulated nanoparticles[J]. Journal of the American Chemical Society, 2013, 135(15): 5521-5524.
- [10] LIU X X, WU J Y, YAMMINE M, et al. Structurally flexible triethanolamine core PAMAM dendrimers are effective nanovectors for DNA transfection in vitro and in vivo to the mouse thymus[J]. Bioconjugate Chemistry, 2011, 22(12): 2461-2473.
- [11] WU J Y, ZHOU J H, QU F, et al. Polycationic dendrimers interact with RNA molecules; polyamine dendrimers inhibit the catalytic activity of Candida ribozymes[J]. Chemical Communications, 2005 (3): 313-315.
- [12] 吴江渝, 徐美英, 黄维哲, 等. 新型聚酰胺胺树形分子的合成及表征[J]. 武汉工程大学学报, 2013, 35(5): 47-51.
- WU Jiang-yu, XU Mei-ying, HUANG Wei-zhe, et al. Synthesis and characterization of new type of polyamidoamine dendrimer[J]. Journal of Wuhan Institute of Technology, 2013, 35(5): 47-51. (in Chinese)

Synthesis and characterization of polyamidoamine dendrimer using tris(2-aminoethyl)amine as core

WU Jiang-yu, HUANG Wei-zhe, ZHOU Ting, HE Zi-ying

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

Abstract: To enlarge end-group density and decrease molecular flexibility, tris(2-aminoethyl)amine was used for the synthesis of new core dendrimers. Ester-terminating 0.5 generation polyamidoamine dendrimers with a tris(2-aminoethyl)amine core were synthesized through Michael addition using methyl acrylate as reactant in the dark, then they were used as reactant to synthesize amino-terminating 1.0 generation polyamidoamine dendrimers by amidation reaction; finally, generation 1.0 to generation 4.0 polyamidoamine dendrimers with a tris(2-aminoethyl)amine core were synthesized through iterative reactions. The extent of reactions was estimated through layer chromatograph and the ester peak was observed in fourier transform infrared spectra. The raw products were purified using column chromatography and sedimentation process. Fourier transform infrared and ^1H nuclear magnetic resonance spectra were used for characterization. The core units of dendrimers decrease by introducing tris(2-aminoethyl)amine.

Key words: polyamidoamine; dendrimer; tris(2-aminoethyl)amine; structural characterization

本文编辑: 龚晓宁