

环糊精修饰聚酰胺-胺树状高分子的合成及其 与乳酸左氧氟沙星的作用研究*

黄 怡^{1**} 郑敏燕¹ 王 珊¹ 黄方千¹ 田 威² 范晓东² 康 琼¹

(¹咸阳师范学院化学与化工学院 咸阳 712000)

(²西北工业大学理学院应用化学系 西安 710072)

摘 要 合成了一系列以环糊精修饰的树状高分子化合物 PAMAM(G2,G4)- β -CD,用 IR,¹H-NMR 等手段表征了其结构,并采用荧光光谱法对其在缓冲溶液中与乳酸左氧氟沙星(LFL)的相互作用进行了研究.结果表明,经环糊精修饰树状高分子的增敏率远大于未修饰的和天然环糊精,且随代数和环糊精含量的增加而增大,表明其具有强于相同代数 PAMAM 的分子键合能力,这些强的键合能力源于环糊精修饰树状高分子化合物中两种结构单元的疏水作用、静电作用和氢键作用的协同效应.

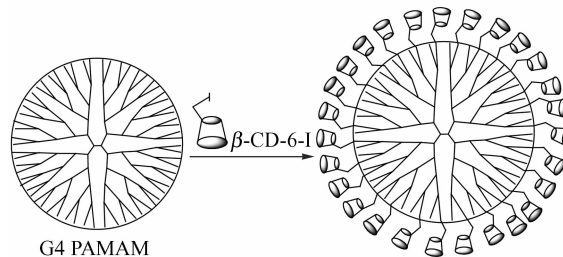
关键词 树状高分子 PAMAM, β -环糊精, 乳酸左氧氟沙星, 分子相互作用

在众多的高分子材料中,树枝状高分子是一种人工合成的新型纳米材料,以其独特的结构和性能在材料科学到生物学诸多领域中都受到了日益广泛的关注^[1~4].聚酰胺-胺(PAMAM)是一个具有三维立体球形结构的树枝状分子,由于 PAMAM 结构的特殊性,使其成为目前研究最广泛、最深入的树状大分子之一. PAMAM 树状大分子的内外部分可以复合药物小分子,其末端基团通过修饰也可连接基因和抗体等生物活性物质,并具有稳定、生物相容性高以及对生物活性剂的转运效率高等特点^[5~7].

环糊精及其衍生物已被广泛应用于生物医药、环境工程等诸多领域,尤其是环糊精聚合物除保持了母体分子所具有的特性外,还表现出独特的高分子效应,因此在分离分析技术、生物学等其它领域中取得了更加广泛的应用^[8~10].近年来,本课题组主要集中于构筑多种功能结构的主客体超分子体系环糊精高分子及其药物控释的研究,并取得了一定的研究成果^[11~15],但有关环糊精高分子为载体与药物分子的相互作用的研究还不够深入.

本文对整代树状大分子 PAMAM(G2,G4) 外围的端氨基进行修饰,得到外围为环糊精结构单元的树状高分子(见示意图 1),并通过控制反应的时间,得到环糊精含量不同的产物,该方法操作

简单,产率较高.同时以乳酸左氧氟沙星为模型分子,利用荧光法研究了这些树枝状高分子在水溶液中与该药物的相互作用,进一步探讨了这类高分子结合乳酸左氧氟沙星的作用机理,为设计和研究新型树枝状高分子药物载体提供重要的理论依据.



Scheme 1 Synthesis route to β -cyclodextrin modified dendrimer PAMAM

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

Inova 400 型核磁共振仪(D_2O 为溶剂, TMS 为内标,美国 Varian 公司); IR Prestige-21 型傅立叶红外光谱仪(试样为 KBr 压片,日本岛津); RF-5301PC 荧光分光光度计(日本岛津); PHS-3C 型精密 pH 计(上海雷磁仪器厂);透析袋(截流分子量 6000~8000,华美生物工程公司);乳酸左氧

* 2009-08-12 收稿,2009-11-26 修稿;陕西省自然科学基金研究计划(项目号 2007B16)资助项目; ** 通讯联系人, E-mail: hxgyhy@126.com

氟沙星(纯度 99%,武汉市合中生生化制造有限公司);其它试剂和溶剂均为分析纯,除 β -环糊精外,用前未做任何处理。 β -环糊精(上海山浦化工有限公司),使用前用蒸馏水重结晶 3 次后,在 100 ~ 110°C (1.3 kPa) 干燥 8 h;配制测试溶液的水为二次蒸馏水。

1.2 实验过程

1.2.1 PAMAM- β -CD 的合成 取 4G PAMAM (参照文献[16]的方法合成) 0.25 g (1.76×10^{-5} mol) 溶于 DMF 中,再加入 1.7 g (1.37×10^{-3} mol) β -CD-6-I(参照文献[17]的方法合成),氮气保护,恒温 75°C 反应一定时间.反应结束后,将溶液装入透析袋中,透析 1 周后,将溶液冷冻干燥,得产物 PAMAM(G4)- β -CD.以不同反应时间控制环糊精的含量(见表 1).类似的方法得 PAMAM(G2)- β -CD. $^1\text{H-NMR}$ (D_2O , PAMAM(G2,G4)- β -CD, δ): 4.97 (H1, β -CD), 3.95 ~ 3.62 (H3, H5, H6, β -CD), 3.62 ~ 3.38 (H2, H4, β -CD), 3.38 ~ 3.09 ($-\text{CH}_2-$, PAMAM), 2.99 ~ 2.60 ($-\text{CH}_2-$, PAMAM), 2.60 ~ 2.48 ($-\text{CH}_2-$, PAMAM), 2.48 ~ 2.20 ($-\text{CH}_2-$, PAMAM); IR (KBr 压片, PAMAM(G2, G4)- β -CD, cm^{-1}), 3342, 2935, 1651, 1554, 1437, 1035.

Table 1 The data of reaction time and β -CD/PAMAM average molar ratios

Sample	Reaction time (h)	β -CD/ PAMAM (G2, G4) ^a (mol/mol)	Yields (%)
PAMAM(G2)- β -CD	20	6.2:1	20.5
PAMAM(G4)- β -CD-I	15	11.9:1	17.8
PAMAM(G4)- β -CD-II	20	19.7:1	17.1
PAMAM(G4)- β -CD-III	25	26.4:1	16.3

^aThe average molar ratios of β -CD and PAMAM were calculated from $^1\text{H-NMR}$ spectra of the PAMAM(G2, G4)- β -CD.

1.2.2 荧光法研究 PAMAM- β -CD 与乳酸左氧氟沙星的相互作用 将 LFL 溶于 pH = 7.4 的磷酸盐缓冲溶液中配成浓度为 5.02×10^{-6} mol/L 的溶液,室温下测定其荧光光谱.激发波长为 310 nm,发射波长为 400 ~ 550 nm.狭缝宽度分别为 10 和 5 nm.向 LFL 溶液中分别加入不同浓度 ($0.04 \sim 1.5 \times 10^{-4}$ mol/L) 的 β -CD 和各类树枝状高分子的磷酸盐缓冲溶液 (pH = 7.4),同样条件

下测定其荧光光谱.

2 结果与讨论

2.1 各类树状高分子/乳酸左氧氟沙星体系的荧光光谱

乳酸左氧氟沙星(levofloxacin lactate)是第 3 代氟喹诺酮类抗菌素药物.它的主要作用机制为抑制细菌 DNA 复制.具有抗菌谱广、毒副作用小等特点而被临床广泛应用.乳酸左氧氟沙星的分子结构式如图 1 所示.

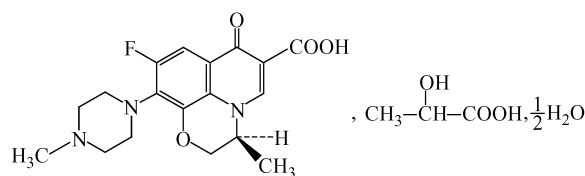


Fig. 1 Molecular structure of the levofloxacin lactate

图 2 是在不同浓度的各类树状高分子 PAMAM(G2, G4)、PAMAM(G2)-CD 和 PAMAM(G4)-CD-I ~ III 存在下,乳酸左氧氟沙星的荧光光谱图.从图 2 可以看到 LFL 的在缓冲溶液中随树状高分子的加入荧光强度增大,且随代数和环糊精含量的增多而增大.

2.2 PAMAM- β -CD 与乳酸左氧氟沙星的相互作用的协同效应

图 2 显示所有荧光体系中树状高分子对 LFL 均有增敏作用,但从图 3 可见不同代数和不同环糊精含量的树状高分子对 LFL 的增敏率不同,结果表明,当所加入的主体化合物的浓度为 3×10^{-6} mol/L 时,增敏率大小顺序为 PAMAM(4G)-CD-III (1.49) > PAMAM(4G)-CD-II (1.17) > PAMAM(4G)-CD-I (0.48) > PAMAM(2G)-CD (0.32) > PAMAM(4G) (0.06) > PAMAM(2G) (0.015) > β -CD (0.007),其中 PAMAM(4G)-CD-III 是 PAMAM(2G)-CD 的 4.66 倍,而 PAMAM(4G)-CD-III 却是 PAMAM(4G) 的 24.8 倍,是环糊精的 212.9 倍,即经环糊精修饰树状高分子的增敏率远大于未修饰的和天然环糊精,且随代数和环糊精含量的增加而增大.

对于树状高分子 PAMAM 的增敏作用,我们认为可能是由于在 pH = 7.4 的缓冲溶液中 LFL 分子中的 $-\text{COO}^-$ 与 PAMAM 的质子化的伯氨基的作用,使分子运动的自由度降低,阻止碰撞失

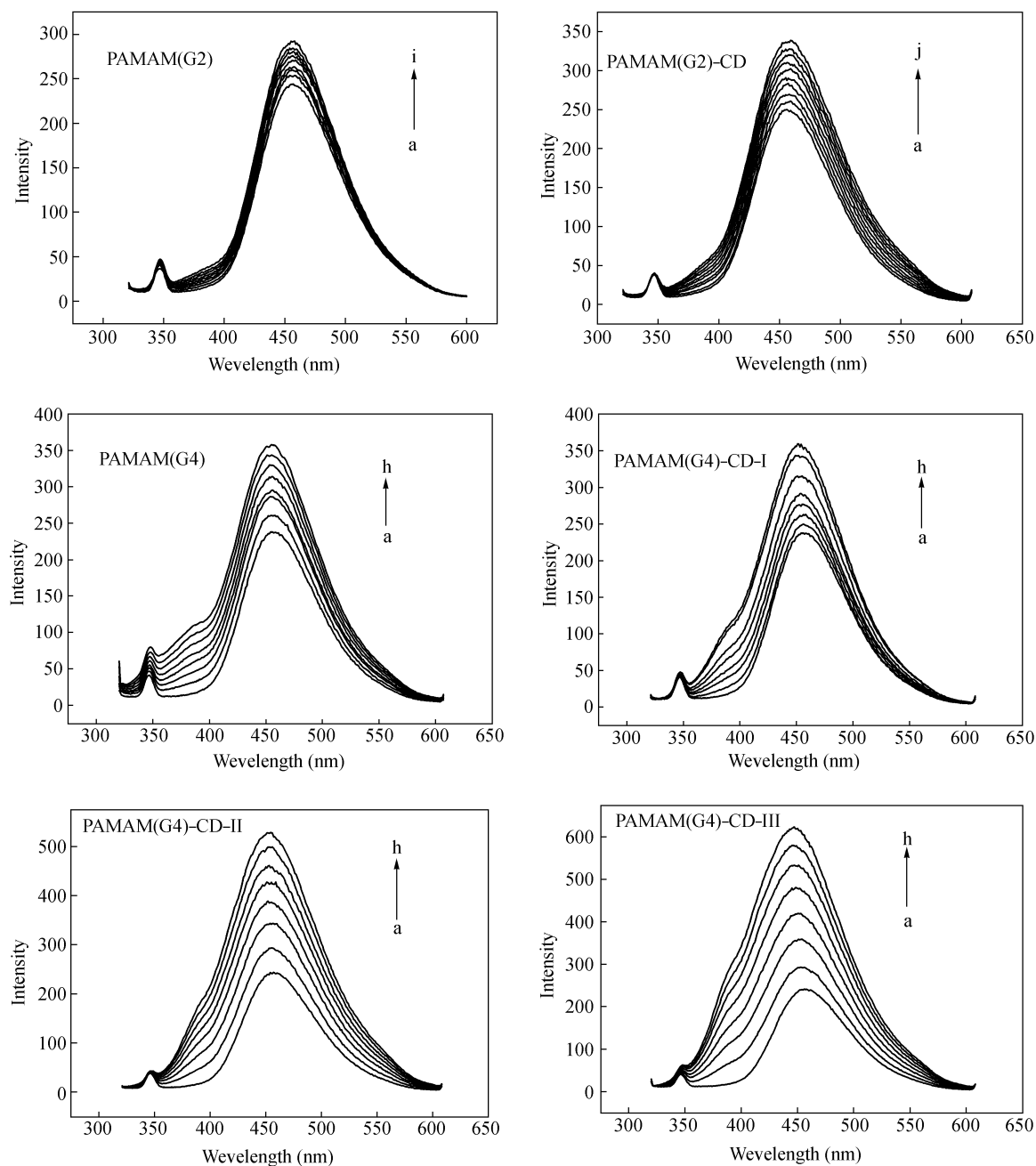


Fig. 2 The effect of dendrimers PAMAM (G2, G4) and PAMAM (G2, G4)- β -CD on fluorescence spectra of levofloxacin lactate in phosphate buffer solution (pH = 7.4)

$\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 310 \text{ nm}/455 \text{ nm}$; $c_{\text{LFL}} = 5.02 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$; $c_{\text{dendrimers}}$ from 0 to $1.5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$

活,从而使量子产率提高,荧光强度增大.而外围以环糊精修饰的树状高分子所具有的极高增敏作用,则体现了该超分子配合物分子间作用力的协同效应.

为了理解环糊精修饰树状高分子与 LFL 相互作用的机理,我们分别采用光谱法和理论计算对天然环糊精与 LFL 的分子间作用行为进行了

研究,实验表明,虽然 β -CD 对 LFL 也具有增敏作用,但很弱以至于无法用荧光光谱滴定法测得其包结配位常数,说明两者存在较弱的分子间作用力.为了证实这一结果,用半经验方法 PM3 计算环糊精分子与药物分子之间分子间相互作用.计算在量化计算软件 Gaussian 03 中完成,由于体系过大,计算机配置有限,用半经验方法 PM3 计算

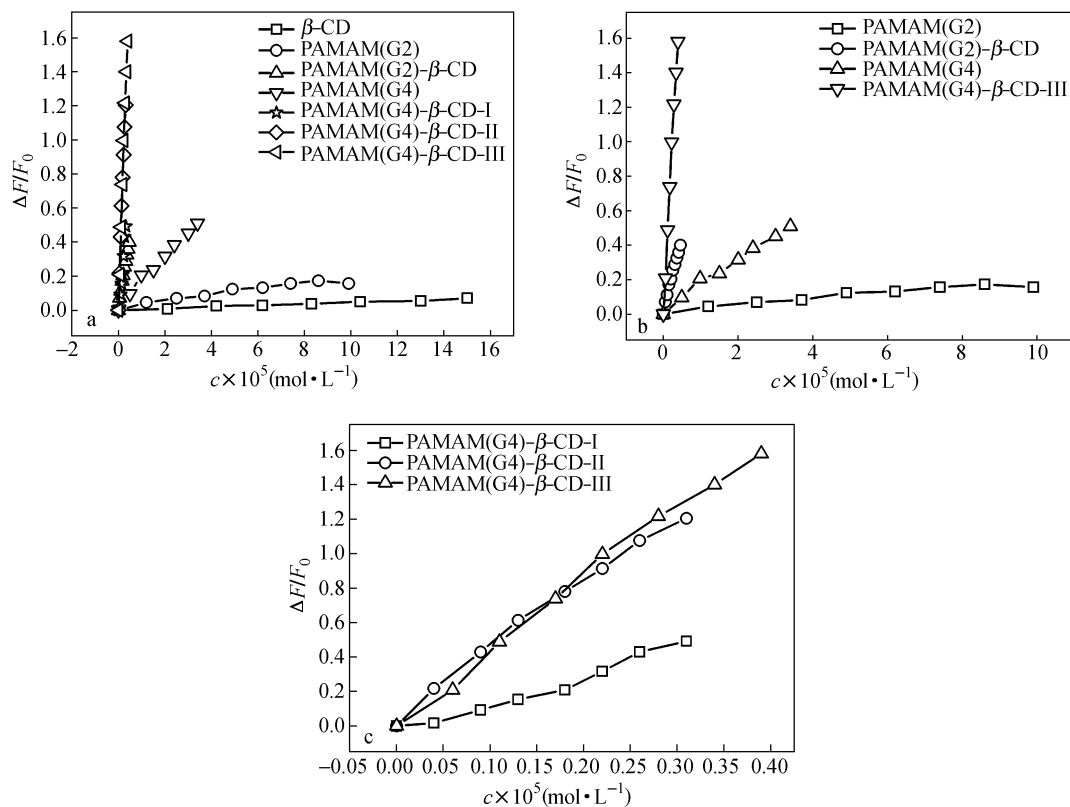


Fig. 3 Profiles of $\Delta F/F_0$ - $c_{\text{dendrimer}}$ for (a) natural β -CD and various dendrimers; (b) dendrimers modified and non-modified by β -CD; (c) PAMAM (G4) dendrimers with different amounts β -CD

环糊精分子与药物分子之间分子间相互作用,得到无虚频稳定复合物 5 个,结构见图 4,能量见表 2, E 为总能量,单位为原子单位,ZPE 为零点能, ΔE 为相互作用能, $\Delta E'$ 为经零点能校正后的相互作用能.从结构参数和相互作用来看,属于分子间弱相互作用,这与实验结果相符.

Table 2 Total energy E and interaction energy ΔE , $\Delta E'$ for β -cyclodextrin/levofloxacin lactate complex

Species	E (a. u.)	ZPE	ΔZPE	ΔE	$\Delta E'$
LFL	-0.26268173	959.7844	—	—	—
β -CD	-2.28646782	3128.1087	—	—	—
1	-2.58192229	4069.8316	18.1	-86.0	-67.9
2	-2.58964664	4070.5238	17.4	-106.0	-88.6
3	-2.58736943	4077.8227	10.1	-100.3	-90.2
4	-2.59544624	4078.7578	9.1	-121.5	-112.4
5	-2.58833280	4070.7139	17.2	-102.8	-85.6

为了进一步了解这种分子间相互作用的协同效应,我们测试了树状高分子 PAMAM- β -CD 与乳

酸左氧氟沙星体系的核磁共振谱(图 5),首先观察 PAMAM- β -CD 与 LFL 的混合体系(PAMAM-CD + LFL)的核磁共振氢谱,从树状高分子(PAMAM-CD)中的两个结构单元 PAMAM 和环糊精结构单元质子的化学位移的变化情况可见,PAMAM 结构单元质子以及环糊精腔内质子 H3 和 H5 的化学位移基本没有变化,而环糊精腔外质子 H2 和 H4 的化学位移却发生了较大幅度的位移($\Delta\delta = 0.19$),由此推断乳酸左氧氟沙星分子没有进入到 PAMAM 结构链段中,两者的相互作用只是发生在端氨基与外围的环糊精分子间,形成如图 6 所示的超分子配合物,另外,在该体系中,乳酸左氧氟沙星分子的 H5、H8 质子的化学位移也发生了不同程度的变化,H5 由于受羧基负离子的影响,化学位移移向高场($\Delta\delta = 0.12$),H8 则受 F 原子与环糊精羟基形成氢键的影响,其化学位移向低场移动($\Delta\delta = 0.18$),由此可见,LFL 分子中的羧基负离子与质子化端氨基的静电作用以及 LFL 与环糊精分子间的氢键作用是形成该配合物的主要驱动力.

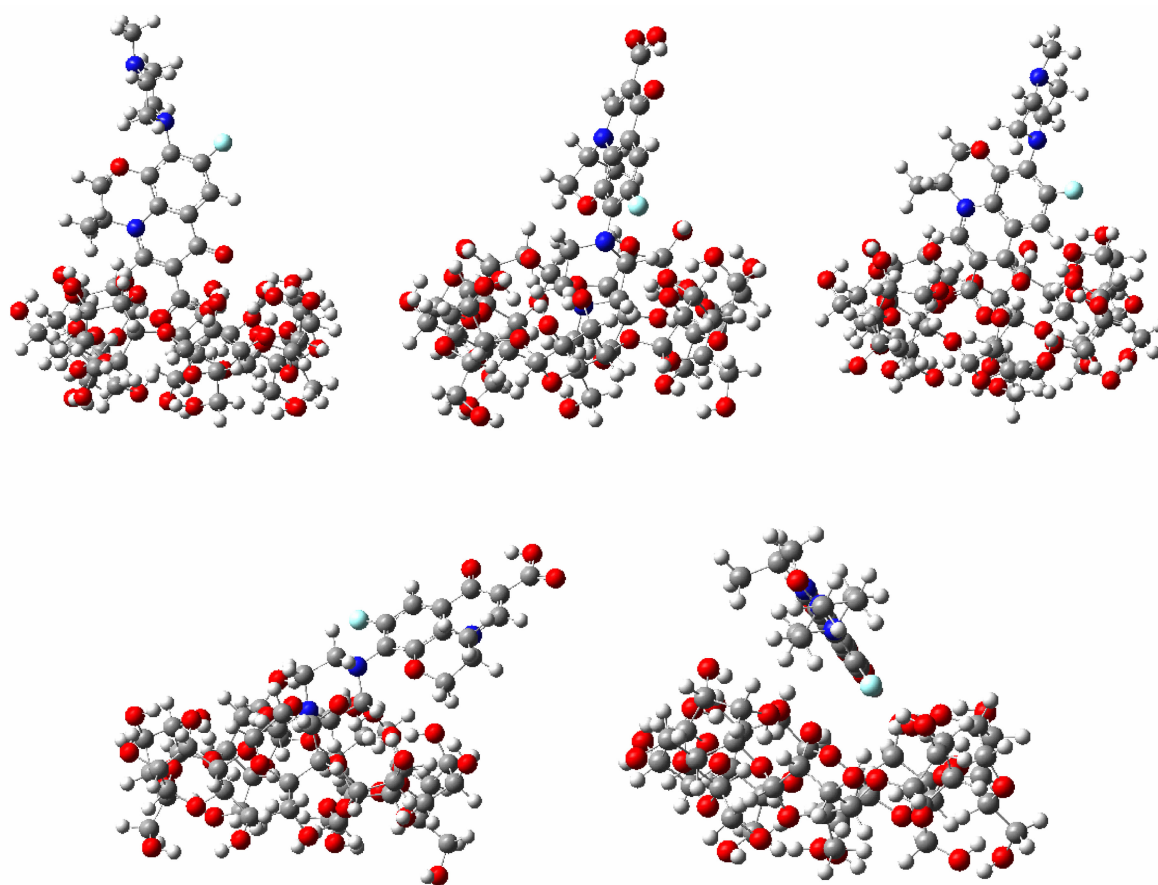


Fig. 4 The optimized structures of β -cyclodextrin/levofloxacin lactate complex

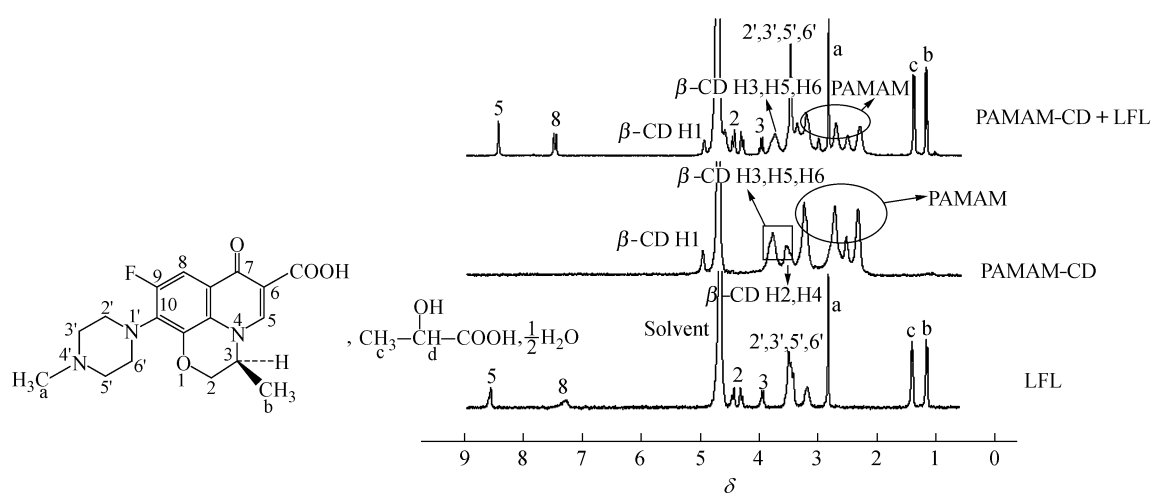


Fig. 5 $^1\text{H-NMR}$ spectra of LFL, PAMAM-CD and PAMAM-CD + LFL in D_2O

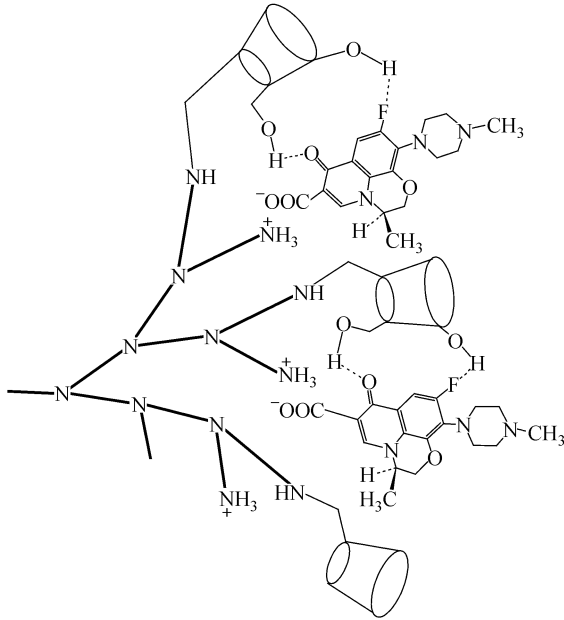


Fig. 6 Possible interaction mechanism between PAMAM-CD and LFL in H₂O

3 结论

以上结果表明,环糊精修饰 PAMAM 树状高分子对乳酸左氧氟沙星荧光分子的增敏作用,不是 PAMAM 和环糊精两种结构单元的简单叠加,而是树状高分子 PAMAM- β -CD 作为主体与客体分子间相互作用的协同效应的体现. 这些实验结果有助于帮助我们理解主客体超分子作用行为,为设计具有多种功能结构的主客体超分子体系的功能材料提供参考.

REFERENCES

- Tomita S, Sato K, Anzai J I. *Mater Sci Eng: C*, 2009, 29(6): 2024 ~ 2028
- Auten B J, Lang H F, Chandler B D. *Appl Catal B: Environ*, 2008, 81: 225 ~ 235
- Casas A, Battah S, Venosa G D, Dobbin P, Rodriguez L, Fukuda H, Batlle A, MacRobert A J. *J Controlled Release*, 2009, 135: 136 ~ 143
- Yang W J, Cheng Y Y, Xu T W, Wang X Y, Wen L P. *Eur J Med Chem*, 2009, 44: 862 ~ 868
- Sweetea D M, Kolhatkar R B, Rayd A, Swaanb P, Ghandehari H. *J Controlled Release*, 2009, 138: 78 ~ 85
- Najlahl M, Freeman S, Attwood D, Emanuele A D. *Int J Pharm*, 2007, 336: 183 ~ 190
- Kihara F, Arima H, Tsutsumi T, Hirayama F, Uekama K. *Bioconjugate Chem*, 2003, 14: 342 ~ 350
- Demir S, Kahraman M V, Bora N, Apohan N K, Ogan A. *J Appl Polym Sci*, 2008, 109: 1360 ~ 1368
- Prabaharan M, Mano J F. *Macromole Biosci*, 2005, 5: 965 ~ 973
- Xia Y Y, Wan J M. *Polymers for Adv Technol*, 2008, 19: 270 ~ 275
- Huang Y, Fan X D. *J Appl Polym Sci*, 2009, 113: 3068 ~ 3077
- Huang Yi(黄怡), Fan Xiaodong(范晓东). *Acta Polymerica Sinica(高分子学报)*, 2006, (3): 505 ~ 509
- Tian W, Fan X D, Kong J, Liu T, Liu Y Y, Huang Y, Wang S J, Zhang G B. *Macromolecules*, 2009, 42: 640 ~ 651
- Tian W, Fan X D, Liu Y Y, Jiang M, Huang Y, Kong J. *J Polym Sci Part A: Polym Chem*, 2008, 46: 5036 ~ 5052
- Liu Tao(刘涛), Fan Xiaodong(范晓东), Tian Wei(田威), Huang Yi(黄怡), Jiang Min(姜敏). *Acta Polymerica Sinica(高分子学报)*, 2008, (10): 1020 ~ 1024
- Santo M, Fox M A. *J Phys Org Chem*, 1999, 12(4): 293 ~ 307
- Bonomo R P, Cucinotta V, D, Alessandro F, Impellizzeri G, Maccarrone G, Vecchio G, Rizzarelli E. *Inorg Chem*, 1991, 30: 2708 ~ 2713

SYNTHESIS OF POLYAMIDOAMINE DENDRIMERS MODIFIED BY CYCLODEXTRIN AND THEIR MOLECULAR INCLUSION INTERACTION WITH LEVOFLOXACIN LACTATE

HUANG Yi¹, ZHENG Minyan¹, WANG Shan¹, HUANG Fangqian¹,
TIAN Wei², FAN Xiaodong², KANG Qiong¹

(¹ School of Chemistry and Chemical Engineering, Xianyang Normal University, Xianyang 712000)

(² Department of Applied Chemistry, School of Science, Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072)

Abstract The polyamidoamine (PAMAM) dendrimers having different generations (G2 and G4) modified by β -cyclodextrin (β -CD), PAMAM(G2, G4)- β -CD, were synthesized using substitution reaction from mono-6-iodine- β -cyclodextrin and PAMAM dendrimers, and the molecular structures were characterized by ¹H-NMR and IR. The molecular interaction between various dendrimers and levofloxacin lactate (LFL) was determined by fluorimetry in buffer solution (pH = 7.4) at 25°C. It was found that the PAMAM(G2, G4)- β -CD possesses higher sensitizing ability than that of the corresponding parent dendrimers and natural β -CD, and it increases concomitantly with the increases of generation and content of β -CD, suggesting that the PAMAM(G2, G4)- β -CD possesses strong inclusion ability with LFL. The possible interaction mechanism between PAMAM-CD and LFL was proposed by ¹H-NMR analysis and theoretical calculation. The results showed that the LFL molecule was placed in the amino end of dendrimer molecule and between the sides of cyclodextrin cavities to form supramolecular complexes. Furthermore, the results indicate that the main driving force of the system could be attributed to the electrostatic interaction as well as hydrogen bonding between the LFL and PAMAM-CD, and fully reflects the synergistic effect of intermolecular forces.

Keywords Polyamidoamine (PAMAM) dendrimer, β -Cyclodextrin, Levofloxacin lactate, Molecular inclusion interaction