

·研究简报·

## 点击化学法快速合成氨基酸功能化的环糊精聚轮烷\*

吴佳燕<sup>1,2</sup> 高超<sup>2\*\*</sup>

(<sup>1</sup>上海交通大学化学化工学院 上海 200240)

(<sup>2</sup>浙江大学高分子科学与工程学系 高分子合成与功能构造教育部重点实验室 杭州 310027)

**摘要** 通过叠氮-炔环加成点击反应制备了各种氨基酸功能化的生物相容性 $\beta$ -环糊精封端的 $\alpha$ -环糊精聚轮烷. 利用 FTIR 和氢核磁共振谱对产物的结构进行了表征. 结果证明对于空间位阻较小的分子, 点击反应能够在很短的时间(几分钟)内达到近 100% 的转化率. 点击化学为功能化聚轮烷的制备提供了快速有效的新途径.

**关键词** 聚轮烷, 环糊精, 氨基酸, 点击化学, 功能化

近年来, 超分子聚轮烷正逐渐引起人们的重视. 在 20 世纪 90 年代初, Harada<sup>[1~3]</sup> 和 Wenz<sup>[4]</sup> 等发现  $\alpha$ -环糊精( $\alpha$ -CD) 与线型聚乙二醇(PEG) 分子能够在水中自发形成包结络合物(inclusion complex, IC) 沉淀, 通过进一步封端可制备一种典型的超分子化合物——环糊精聚轮烷(polyrotaxane, PR)<sup>[5]</sup>. 目前, 这类 PR 已经广泛地被用来合成许多新颖的功能材料, 如分子管道、药物载体、分子导线、共混纤维、交联聚轮烷材料等. 在生物领域, Ooya 等制备了 PR 药物载体, 可通过封端剂的水解来控制负载药物的释放<sup>[6]</sup>. 他们还报道了胺基修饰的 PR 成功地与 DNA 复合的案例<sup>[7]</sup>.

含有氨基酸的聚合物已经广泛应用于生物医药领域<sup>[8]</sup>, 因此氨基酸功能化的 PR 将有很大的潜在应用价值. 如何将氨基酸连接到 PR 上, 到目前为止, 只有 Araki 等报道过氨基酸功能化的 PR<sup>[9]</sup>. 他们通过 *N,N'*-羰基二咪唑(*N,N'*-Carbonyldiimidazole, CDI) 酯化反应将叔丁氧羰基(*tert*-Butyloxycarbonyl, Boc) 保护的氨基酸连接到 PR 链上. 但是其反应时间长, 羟基转化率低(约 25%).

针对这一问题, 我们选择了 Cu(I) 催化的叠氮-炔环加成“点击”反应(click reaction) 作为偶联反应. 该反应具有易于操作、高产率、没有副产物等优点, 而且叠氮化物和炔烃几乎完全不与生物分子发生反应<sup>[10~12]</sup>. 如图 1 所示, Boc 保护

的甘氨酸(Boc-Gly-OH)、赖氨酸(Boc-Lys(Boc)-OH)、苯丙氨酸(Boc-Phe-OH) 通过与丙炔醇缩合而引入炔键, 再通过点击反应与叠氮化 PR(PR-N<sub>3</sub>) 偶联. FTIR 和氢核磁共振谱(<sup>1</sup>H-NMR) 的结果都表明, 除了位阻较大的 Boc-Phe-OH, 其他两种氨基酸与 PR-N<sub>3</sub> 的反应都能达到几乎 100% 的转化率, 而且反应的时间很短, 几分钟即可完成. 相应的产物, 氨基酸功能化的 PR, PR-Gly、PR-Lys、PR-Phe 能够溶于低沸点的丙酮、乙醇等溶剂, 与 PR(只能溶解于 DMSO 等强极性溶剂) 相比, 溶解性得到改善. 除了氨基酸以外, 我们也研究了其他几种含炔键的小分子与 PR-N<sub>3</sub> 的反应, 发现点击化学可方便地用于 PR 的功能化.

### 1 实验材料和方法

1.1 试剂  $\beta$ -环糊精封端的  $\alpha$ -环糊精 PR 中, 作为轴的 PEG 的分子量为 4600; 通过 PR 的<sup>1</sup>H-NMR 谱图中 H-1 和 PEG 特征峰的积分面积比可知, 每根 PEG 链上含有大约 33 个  $\alpha$ -CD 分子. PR 上的羟基与过量的叠氮酰氯(分子式如图 1 所示) 反应. 在产物 PR-N<sub>3</sub> 的<sup>1</sup>H-NMR 谱图中, 羟基特征峰几乎完全消失, 因此我们可以认为羟基通过酰化反应全部转化为叠氮基团. 根据 GPC, PR-N<sub>3</sub> 的数均分子量约为  $1.35 \times 10^5$  ( $M_w/M_n = 1.12$ ). 详细的合成过程和表征将另外发表.

Boc-Gly-OH、Boc-Lys(Boc)-OH、Boc-Phe-OH 购自吉尔生化上海有限公司. 溴化亚铜(CuBr, 纯度为 98%, 使用前先纯化<sup>[13]</sup>) 和丙炔胺(纯度为

\* 2009-10-26 收稿, 2009-12-07 修稿; 国家重点基础研究发展计划(973 计划, 项目号 2007CB936000) 和国家自然科学基金(基金号 50773038, 20974093) 资助项目; \*\* 通讯联系人, E-mail: cgao18@gmail.com

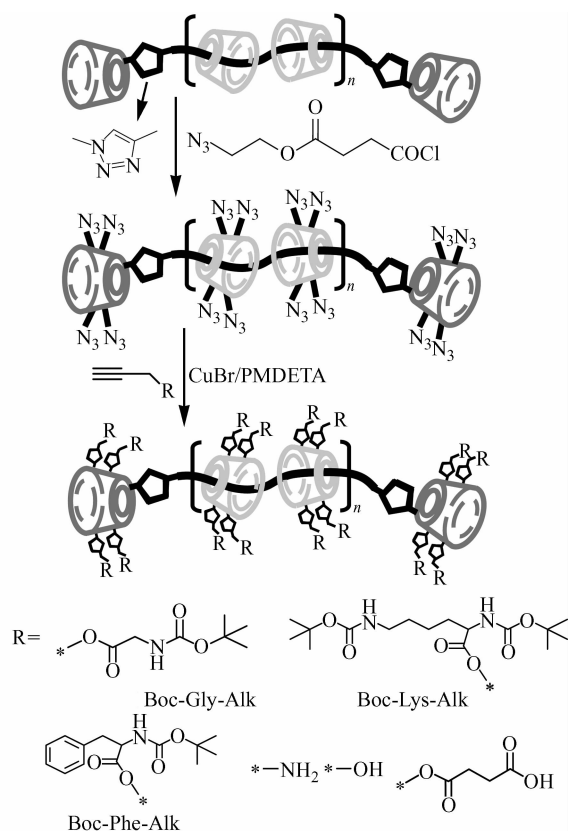


Fig. 1 Synthetic protocol of functionalized polyrotaxanes (PRs) via click chemistry

98%) 购自 Sigma-Aldrich 公司. 丙炔醇 (纯度为 99%)、1, 1, 4, 7, 7-五甲基二亚乙基三胺 (PMDETA, 纯度为 98%)、二环己基碳酰亚胺 (DCC)、4-*N*, *N*-二甲氨基吡啶 (DMAP) 从 Alfa Aesar 公司购买. 炔酸 (分子式如图 1 所示) 的合成方法与文献 [14] 报道的一致. 除非特别说明, 其它试剂和溶剂均购自中国医药集团上海化学试剂公司.

**1.2 测试表征** <sup>1</sup>H-NMR 在 Varian Mercury 400 MHz 核磁共振仪上获得, 溶剂为 DMSO-*d*<sub>6</sub> 或 CDCl<sub>3</sub>. FTIR 分析采用 PE 1000 傅立叶变换红外光谱仪 (涂膜或 KBr 压片). 原子力显微镜的表征 (AFM) 采用 Digital instruments Inc. 生产的 NanoScope III a 型仪器 (敲击模式). 凝胶渗透色谱 (GPC) 采用 Perkin Elmer HP 1100 (浓度为 0.01 mol/L 的 LiBr/DMF 为流动相, RI-WAT 150CV + 为检测器, 苯乙烯为标样, 测试温度为 70℃).

**1.3 含炔键的 Boc 保护的氨基酸的合成** 以含炔键的 Boc 保护的赖氨酸 (Boc-Lys-Alk) 为例, 具体的合成方法如下. 将 DCC (9.16 g, 43.6 mmol)、丙炔醇 (2.47 g, 43.6 mmol) 与 50 mL

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 混合, 搅拌溶解后冷却至 0℃ 左右. 在氮气保护下, 加入 Boc-Lys (Boc)-OH (7.66 g, 21.8 mmol) 和 DMAP (355 mg, 2.9 mmol), 在室温下反应 24 h. 过滤除去沉淀, 滤液用 5 × 50 mL 的去离子水水洗, 无水 MgSO<sub>4</sub> 干燥后在正己烷中沉淀 2 次, 沉淀用 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 溶解后过硅胶柱, 收集淋洗液, 减压旋蒸除去溶剂后得到浅黄色产物 2.51 g, 产率为 30%.

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, δ): 1.42 (s, 18H, CH<sub>3</sub>), 1.61 ~ 1.92 (m, 6H, —CONHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>—), 2.50 (t, 1H, CH≡C—), 3.11 (m, 2H, —CONHC—H<sub>2</sub>—), 4.30 (s, 1H, —CONHCH<sub>2</sub>—), 4.54 ~ 4.85 (m, 3H, CH≡CCH<sub>2</sub>OCOCH—), 5.10 (—CHNHCO—).

**1.4 功能化聚轮烷的合成** 以 Boc-Lys-Alk 与 PR-N<sub>3</sub> 的反应为例, 产物 PR-Lys 的制备方法如下. 在 25 mL 的 Schlenk 反应瓶中加入 PR-N<sub>3</sub> (50.0 mg, 约 0.22 mmol N<sub>3</sub> 基团)、Boc-Lys-Alk (97.7 mg, 0.25 mmol)、4 mL DMF, 搅拌溶解. 在氮气保护下, 加入 CuBr (10.7 mg, 0.07 mmol) 和 PMDETA (15.9 μL, 0.07 mmol), 在室温下反应 3 h (按给定的时间取样分析). 产物在乙醚中沉淀后, 用乙醚反复洗涤. 用丙酮溶解所得沉淀, 过中性氧化铝柱除去 CuBr, 收集淋洗液, 减压旋蒸除去溶剂后得到产物 24.1 mg, 产率为 19%.

## 2 讨论

首先通过与丙炔醇的 DCC/DMAP 缩合反应制备了含炔键 Boc 保护氨基酸 Boc-Gly-Alk、Boc-Lys-Alk 和 Boc-Phe-Alk. 产物用 <sup>1</sup>H-NMR 进行了表征. 在这 3 种物质的 <sup>1</sup>H-NMR 谱图上 (图 2), δ = 2.5 (CH≡C—) 附近都能观察到明显的炔键的特征峰, 而且 δ = 4.7 附近的 CH≡CCH<sub>2</sub>O— 的质子峰也很明显. 这一结果表明炔键被引入到了 Boc 保护氨基酸上.

按照图 1 的设计路线, 含有炔键的 Boc 保护氨基酸通过点击反应连接到 PR 链上. 采用 FTIR 对点击反应的过程进行了跟踪. 如图 3 所示, PR-N<sub>3</sub> 与 Boc-Gly-Alk、Boc-Lys-Alk 的点击反应效率都很高, 2110 cm<sup>-1</sup> 处的叠氮特征峰在 3 min 内完全消失. 考虑到叠氮峰在红外光谱上的高灵敏特征, 可以认为转化率已接近 100%. 而对于含有苯环的 Boc-Phe-Alk, 体积位阻较大, 因此即使将反应时间延长至 3 h, 点击反应也很难达到 100% 的转化率, FRIR 谱图上仍有少量叠氮峰残留. 在 PR-

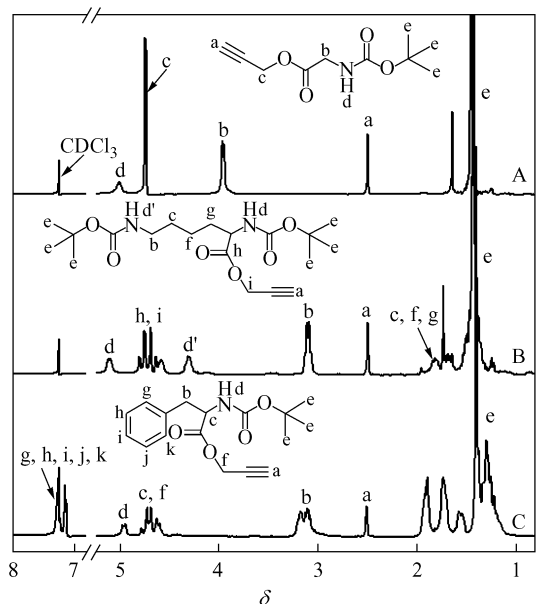


Fig. 2  $^1\text{H-NMR}$  spectra of (A) Boc-Gly-Alk, (B) Boc-Lys-Alk and (C) Boc-Phe-Alk in  $\text{CDCl}_3$

Gly, PR-Lys 和 PR-Phe 的 FTIR 谱图上,除了  $1730\text{ cm}^{-1}$  处的酯键特征峰,在  $1700\text{ cm}^{-1}$  附近还可以观察到酰胺键的特征峰,进一步说明了氨基酸被成功地连接到 PR 分子上。

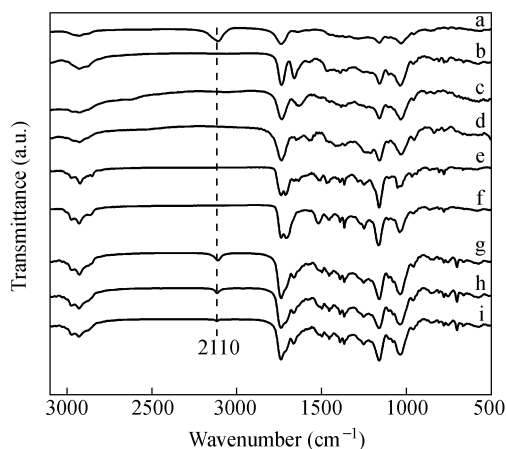


Fig. 3 FTIR spectra of (a)  $\text{PR-N}_3$ , (b)  $\text{PR-OH}$ , (c)  $\text{PR-NH}_2$ , (d)  $\text{PR-COOH}$ , (e)  $\text{PR-Gly}$  (the coupling reaction time was 3 min), (f)  $\text{PR-Lys}$  (the coupling reaction time was 3 min), and the samples taken from click coupling reaction of  $\text{PR-N}_3$  with Boc-Phe-Alk at given time: (g) 3 min, (h) 10 min and (i) 3 h after the addition of alkyne reagent

氨基酸功能化的 PR 的化学结构用  $^1\text{H-NMR}$  进行了表征. 如图 4 所示,在 PR-Gly, PR-Lys 的核磁谱图上,可以清楚地看到  $\delta = 8.1$  附近的三唑环上的质子峰和  $\delta = 7.2$  附近的  $-\text{CONH}-$  的质子

峰,以及  $\delta = 1.3$  附近的归属于 Boc 基团的质子峰. 此外,在 PR-Phe 的谱图上,除了上述 3 个峰以外, $\delta = 7.18$  处还有明显的苯环特征峰.  $^1\text{H-NMR}$  积分面积也可以用来计算叠氮基团的转化率. 以 PR-Lys 为例,在  $\delta = 3.77 \sim 5.32$  区域内的质子峰与  $\delta = 8.18$  处三唑环上质子峰的积分面积比为 9.06,对应的叠氮转化率约为 97%,与 FTIR 结果基本一致.  $^1\text{H-NMR}$  和红外谱图的分析结果都表明,点击反应是一种高效的制备功能化 PR 的方法.

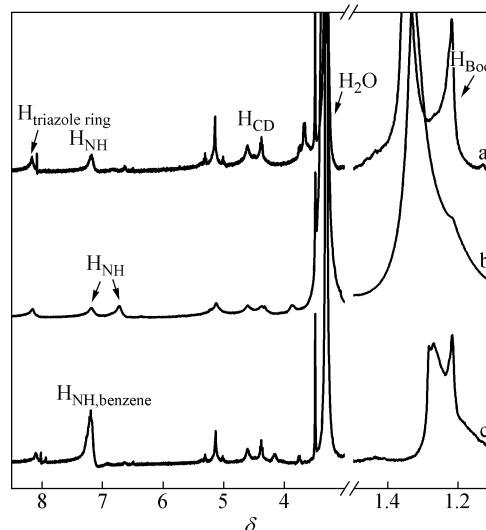


Fig. 4  $^1\text{H-NMR}$  spectra of (a)  $\text{PR-Gly}$ , (b)  $\text{PR-Lys}$ , and (c)  $\text{PR-Phe}$  in  $\text{DMSO-}d_6$

除了 FTIR 和  $^1\text{H-NMR}$  外,我们还测试了产物 PR-Lys (点击偶联反应进行了 3 min) 的分子量,其数均分子量约为  $1.66 \times 10^5$  ( $M_w/M_n = 1.57$ ),明显大于  $\text{PR-N}_3$  的分子量 ( $M_n = 135\text{ kg/mol}$ ),说明发生了改性反应. 但这一结果远小于 PR-Lys 的理论分子量 ( $3.60 \times 10^5$ ),该差别可能是由两个因素引起的,(1)氨基酸功能化 PR 具有紧密压缩的分子结构,偶联反应前后流体力学体积变化不大;(2) PR-Lys 分子结构特殊,其流体力学体积可能与分子量相近的 GPC 标样 (苯乙烯) 的流体力学体积有较大差异. 文献 [15], [16], [17] 也报道过类似的情况. 因此要通过 GPC 来获得以 PR 为骨架的接枝聚合物的准确分子量还存在一定的困难.

我们还研究了  $\text{PR-N}_3$  与其它小分子如丙炔醇、丙炔胺、炔酸的点击反应,将叠氮基转化为羟基、氨基和羧基,对应的产物简称为 PR-OH, PR-NH<sub>2</sub>, PR-COOH. 结果发现  $\text{PR-N}_3$  与丙炔醇、炔酸

的反应都能够顺利地进行(FRIR 与<sup>1</sup>H-NMR 谱图分别列在图 3 和图 5 中),而 PR-N<sub>3</sub> 与丙炔胺的点击反应则生成了不溶于 DMF 的沉淀,可能是由于铜离子与产物的胺基复合形成了络合物的原故. 针对这一沉淀现象的深入研究还在进行中. 以上的结果表明,通过点击反应来制备功能化 PR 的方法具有一定的通用性.

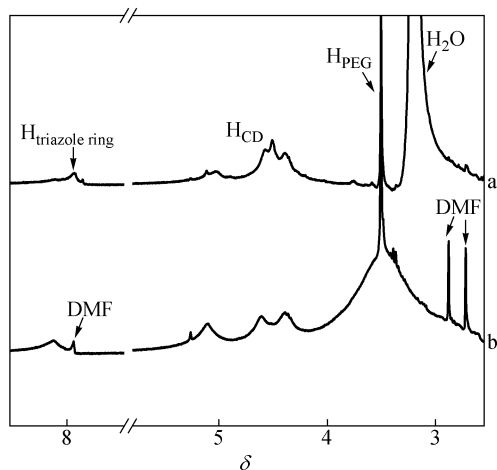


Fig. 5 <sup>1</sup>H-NMR spectra of (a) PR-OH and (b) PR-COOH in DMSO-*d*<sub>6</sub>

PR-Lys 的纳米结构和表面形态用 AFM 进行了观察. 扫描隧道显微镜(scanning tunneling microscopy, STM)<sup>[18]</sup>是目前唯一成熟的观测 PR 分子结构的手段,但 STM 也有扫描范围小、操作复杂等缺点,因此我们尝试采用更常见的 AFM 来观察 PR-Lys 的形貌,这一手段只有极少数的科学家使用过<sup>[19]</sup>. 从 AFM 图中,可以观察到许多蠕虫状的结构互相缠绕在一起(图 6),形成高度约为 0.6 nm 的膜. 这一高度显然比预期的单根 PR 的高度(大约 1.4 nm)要低,这是由于 PEG 链没有被 α-CD 完全覆盖,探针所检测到的高度是 α-CD 环和 PEG 轴的平均高度<sup>[20]</sup>. 由于 CD 分子间强烈

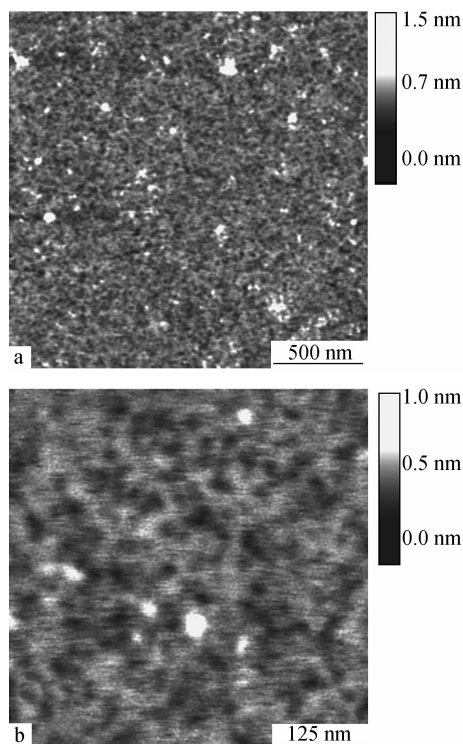


Fig. 6 Height AFM images of PR-Lys on a mica wafer ( $4 \times 10^{-3}$  mg/mL)

的氢键相互作用和仪器本身分辨率的限制,很难通过 AFM 观测到单根的 PR-Lys,该方法仍需进一步的研究来完善.

### 3 结论

初步建立了通过点击反应合成功能化 PR 的通用方法,含叠氮的 PR 与含炔键的 Boc 保护氨基酸通过点击偶联反应合成了氨基酸功能化的 PR. 该方法具有快速和高转化率的特点,为 PR 在生物领域的应用打下了良好的基础. 在酸性溶液中脱去 Boc 保护基团后,氨基酸功能化的 PR 有望作为载体与 DNA 等生物分子复合,相关研究仍在进行之中.

## REFERENCES

- 1 Harada A, Kamachi M. *Macromolecules*, 1990, 23:2821 ~ 2823
- 2 Harada A, Li J, Kamachi M. *Nature*, 1992, 356:325 ~ 327
- 3 Harada A, Li J, Kamachi M. *J Am Chem Soc*, 1994, 116:3192 ~ 3196
- 4 Wenz G, Keller B. *Angew Chem Int Ed Engl*, 1992, 31:197 ~ 199
- 5 Wenz G, Han B H, Müller A. *Chem Rev*, 2006, 106:782 ~ 817
- 6 Ooya T, Yui N. *J Controlled Release*, 2002, 80:219 ~ 228
- 7 Ooya T, Choi H S, Yamashita A, Yui N, Sugaya Y, Kano A, Maruyama A, Akita H, Ito R, Kogure K, Harashima H. *J Am Chem Soc*, 2006, 128:3852 ~ 3853

- 8 Kuboe Y, Tonegawa H, Ohkawa K, Yamamoto H. *Biomacromolecules*, 2004, 5:348 ~ 357
- 9 Araki J, Kagaya K, Ohkawa K. *Biomacromolecules*, 2009, 10:1947 ~ 1954
- 10 Rostovtsev V V, Green L G, Fokin V V, Sharpless K B. *Angew Chem Int Ed*, 2002, 41:2596 ~ 2599
- 11 Kolb H C, Finn M G, Sharpless K B. *Angew Chem Int Ed*, 2001, 40:2004 ~ 2021
- 12 Tsarevsky N V, Sumerlin B S, Matyjaszewski K. *Macromolecules*, 2005, 38:3558 ~ 3561
- 13 Gao H, Matyjaszewski K. *Macromolecules*, 2006, 39:4960 ~ 4965
- 14 Zhang Y, He H H, Gao C. *Macromolecules*, 2008, 41:9581 ~ 9594
- 15 Netopilik M, Kratochvil P. *Polymer*, 2003, 44:3431 ~ 3436
- 16 Oh J K, Matyjaszewski K. *J Polym Sci Part A Polym Chem*, 2006, 44:3787 ~ 3796
- 17 Gao H, Matyjaszewski K. *J Am Chem Soc*, 2007, 129:6633 ~ 6639
- 18 Shigekawa H, Miyake K, Sumaoka J, Harada A, Komiyama M. *J Am Chem Soc*, 2000, 122:5411 ~ 5412
- 19 Loethen S, Ooya T, Choi H S, Yui N, Thompson D H. *Biomacromolecules*, 2006, 7:2501 ~ 2506
- 20 van den Boogaard M, Bonnet G, van 't Hof P, Wang Y, Brochon C, van Hutten P, Lapp A, Hadziioannou G. *Chem Mater*, 2004, 16:4383 ~ 4385

## FACILE FUNCTIONALIZATION OF POLYROTAXANES VIA CLICK CHEMISTRY

WU Jiayan<sup>1,2</sup>, GAO Chao<sup>2</sup>

<sup>1</sup> College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240)

<sup>2</sup> Key Laboratory of Macromolecular Synthesis and Functionalization (Ministry of Education),  
Department of Polymer Science and Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027)

**Abstract** The Cu (I)-catalyzed “click” reaction of azides and alkynes was selected as the coupling reaction to prepare a novel biocompatible polyrotaxane (PR) conjugate, which was composed of azido-functionalized PR backbone ( $M_n = 1.35 \times 10^5$ ) based on  $\alpha$ -cyclodextrins ( $\alpha$ -CDs)/poly(ethylene glycol) (PEG) inclusion complex and amino acids protected by *tert*-butyloxycarbonyl (Boc) groups, that is, Boc-Gly-OH, Boc-Lys (Boc)-OH, and Boc-Phe-OH. The alkynyl groups were introduced into the aforementioned amino acids *via* *N,N*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC)/4-(dimethylamino)pyridine (DMAP) condensation with propargyl alcohol. The click coupling reaction was demonstrated to be extremely efficient, and high conversion of azido groups, approximate 100%, was achieved in a short reaction time (within several minutes) in the cases of Boc-Gly-OH and Boc-Lys(Boc)-OH. As to the bulky Boc-Phe-OH, only part of the azido groups of the backbone was converted though the coupling reaction time was prolonged (3 h). The corresponding amino acids-PR conjugates were soluble in a wide variety of organic solvents, such as *N,N*-dimethylformamide, acetone, ethanol and so forth. GPC was utilized to measure the molecular weight of Boc-Lys(Boc)-PR conjugates (PR-Lys), and the result was  $M_n = 1.66 \times 10^5$  ( $M_w/M_n = 1.57$ ), much smaller than the theoretical ones. This might be resulted from the compactly packed conformation of PR-Lys. The worm-like morphology of PR-Lys was observed via AFM. Other alkyne-functionalized compounds involving 4-(2-azidoethoxy)-4-oxobutanoic acid and propargyl alcohol were also attached to the PR backbone successfully. This click strategy would be a promising general method for the functionalization of PRs.

**Keywords** Polyrotaxane, Cyclodextrin, Amino acids, Click chemistry, Functionalization