

叶酸修饰pH敏感聚酰胺-胺多柔比星复合物的合成及表征^Δ

胡青^{1*}, 季鹏¹, 黄发珍¹, 朱亚勤¹, 程亮¹, 程丽芳¹, 陈大为^{1,2#} (1. 苏州大学药学院, 江苏苏州 215123; 2. 沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016)

中图分类号 R979.1⁴;R944 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)25-2350-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.25.17

摘要 目的:合成及表征叶酸(FA)修饰的pH敏感聚酰胺-胺(PAMAM)多柔比星(DOX)复合物。方法:FA、聚乙二醇(PEG)及DOX通过酰胺、酯的胍解反应连接到PAMAM的外周。采用薄层色谱(TLC)、红外光谱(IR)、氢核磁共振(¹H-NMR)表征合成产物,考察复合物的载药量、粒径、Zeta电位、形态以及DOX的体外释放行为。结果:合成的复合物连接了8个FA及10个DOX分子,TLC、IR、¹H-NMR均证实了复合物为目标化合物。复合物粒径为(75.2±0.25) nm,Zeta电位为(7.04±0.11) mV,呈类球形。48 h内复合物中DOX在pH 4.5、5.5、7.4的释放介质中累积释放百分率分别为40%、29%、13%。结论:成功合成了FA修饰的pH敏感复合物,该复合物体外释放呈现pH依赖性。

关键词 多柔比星;聚酰胺-胺;pH敏感;叶酸;合成;体外释放

Synthesis and Characterization of FA Modified pH-sensitive PAMAM Doxorubicin Conjugates

HU Qing¹, JI Peng¹, HUANG Fa-zhen¹, ZHU Ya-qin¹, CHENG Liang¹, CHENG Li-fang¹, CHEN Da-wei^{1,2} (1. School of Pharmacy, Soochow University, Jiangsu Suzhou 215123, China; 2. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To synthesize and characterize folic acid (FA) modified pH-sensitive PAMAM doxorubicin conjugates. METHODS: FA, PEG and DOX were connected to PAMAM by amidation and hydrazinolysis reaction of ester. The polymer was characterized by TLC, IR and ¹H-NMR, respectively. Drug-loading amount, particle size, Zeta potential, shape and morphology of conjugates were investigated, and the dissolution behavior of DOX *in vitro* was also investigated. RESULTS: 8 FA and 10 DOX were bonded on the periphery of PAMAM-DOX. The structure of conjugates was firm as the target conjugates by TLC, IR and ¹H-NMR successfully. The particle size and Zeta potential for conjugates were (75.2±0.25) nm and (7.04±0.11) mV, respectively. The morphology of the conjugates was regularly spherical shape. 40% of DOX of conjugates was released at pH 4.5, 29% of DOX was released at pH 5.5 and 13% of DOX was released at pH 7.4 during 48 h. CONCLUSIONS: FA-modified pH-sensitive conjugates are successfully synthesized, which release in pH dependent manner *in vitro*.

KEY WORDS Doxorubicin; PAMAM; pH-sensitive; Folic acid; Synthesis; Release *in vitro*

多柔比星(DOX)是一种广谱抗癌药物,广泛用于临床肿瘤治疗,然而严重的毒副作用限制了其进一步应用^[1]。聚酰胺-胺(PAMAM)是球形、高度枝化的单分散大分子,内部的疏水空腔可包裹小分子药物,外围的胺基可用于共价连接各类靶分子、药物以及一些增溶基团,有助实现包载药物的靶向递送^[2-3]。叶酸(FA)受体在多种肿瘤细胞表面均有过度表达,纳米载体经FA分子修饰后可促进肿瘤细胞对纳米载体的摄取^[4]。笔者以FA分子为复合物的靶头,以脲键(hyd)作为连接臂,以DOX为模型药物,通过酰胺、酯的胍解反应合成FA修饰的具有pH敏感释药特性的PAMAM树状大分子复合物,并对复合物的结构、形态及体外药物释放特征等进行研究。

1 材料

Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81173004);大学生创新性实验计划资助项目(No.11cxsj028)

* 硕士研究生。研究方向:药剂学。E-mail: qinghu2010@163.com

通信作者:教授,博士研究生导师。研究方向:药剂学。电话:0512-65884729。E-mail: chendawei@sypu.edu.cn

紫外-可见分光光度计、高效液相色谱仪(日本岛津公司);纳米粒径电位仪(美国Nicomp公司);冷冻干燥机(德国Martin Christ公司);红外光谱(IR)仪(美国Thermo公司);核磁共振(NMR)波谱仪(美国Varian公司);透射电子显微镜(TEM,日本日立公司)。

DOX(盐酸盐,北京华丰联合技术有限公司,批号:HF100622,纯度:99.5%);PAMAM(第4代,美国Sigma-Aldrich公司,批号:412449);两端氨基聚乙二醇5000[PEG5000-(NH₂)₂,批号:ZZ112P018,纯度:≥95%];甲氧基-聚乙二醇5000-N-羟基琥珀酰亚胺(CH₃O-PEG5000-NHS,批号:ZZ109P113,纯度:≥95%)均购自北京键凯科技有限公司;FA(批号:F20111118,纯度:97%)、对二甲胺基吡啶(DMAP,批号:T20110629,纯度:99%)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS,批号:41052,纯度:98%)、N,N-二环己基碳二亚胺(DCC,批号:20110311,纯度:99%)均购于国药集团化学试剂有限公司;双琥珀酰亚胺辛二酸酯(DSS,美国Sigma-Aldrich公司,批号:SH0719,纯度:99%);氯甲酸对硝基苯酯(萨恩化学技术有限公司,批号:S1885,纯度:98%);其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 FA-PEG-NHS的合成及表征

根据参考文献^[5],取FA(0.048 mmol)和三乙胺(0.313 mmol)溶解在二甲基亚砜(DMSO)中,加入DCC(0.06 mmol)和NHS(0.06 mmol),氮气保护,避光室温搅拌过夜。活化后的FA反应液加入到PEG5000-(NH₂)₂(0.04 mmol)的DMSO溶液中,避光室温搅拌反应24 h后过滤,透析,冷冻干燥得黄色固体FA-PEG-NH₂。在FA-PEG-NH₂的DMSO溶液中,加入10倍量的DSS,搅拌过夜,干燥得淡黄色固体FA-PEG-NHS,产率为42.5%。

通过薄层色谱(TLC)、IR、氢核磁共振(¹H-NMR)表征合成产物。TLC展开剂为甲醇/氯仿(1:3),产物FA-PEG-NH₂紫外灯下照射,有荧光,说明结构中含FA相应基团;茚三酮显红色,表明结构中含有胺基,可初步判断此产物的生成。FA-PEG-NH₂与DSS反应得FA-PEG-NHS,茚三酮显色不明显,证明-NH₂已大部分转换为-NHS。

对FA-PEG-NHS进行IR表征,结果如图1a,¹H-NMR(DMSO-*d*₆)表征结果如图2a所示。

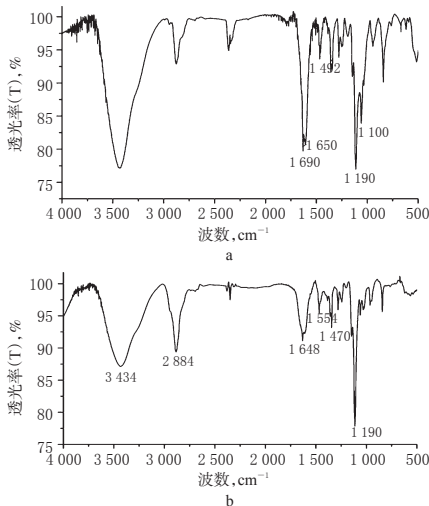


图1 红外光谱图

a.FA-PEG-NHS;b.PEG-PAMAM

Fig 1 IR spectras

a.FA-PEG-NHS;b.PEG-PAMAM

1 492 cm⁻¹为FA上苯环的特征峰;1 690 cm⁻¹ν_{C=O}为酰胺键的特征峰;1 190 cm⁻¹处有1个中强ν_{C-N}胺基的吸收峰;1 650 cm⁻¹ν_{C=O}为羧酸的特征峰;1 100 cm⁻¹为PEG所含基团C—O—C的吸收峰,表明FA已连接在PEG上。δ 8.62(s,C7-H),δ 7.67(d,2',6'-H),δ 6.80(d,3',5'-H) ppm是FA上相应基团的化学位移峰,δ 3.55~3.78(m,—OCH₂CH₂)为PEG的质子化学位移峰,进一步表明成功合成了FA-PEG-NHS。

2.2 PEG-PAMAM及其复合物的合成及表征

2.2.1 PEG-PAMAM的合成及表征。精密称取CH₃O-PEG5000-NHS(5.63 μmol)和PAMAM(0.35 μmol),溶于磷酸盐缓冲液(pH 8.2)中,室温避光搅拌24 h,TLC跟踪反应进程。反应结束后,超滤,冷冻干燥,得白色固体,产率为85.9%。IR、¹H-NMR表征合成产物。PEG-PAMAM的IR特征峰如图1b所示:PAMAM伯氨基的吸收峰为3 434 cm⁻¹;2 884 cm⁻¹为PEG和PAMAM结构中的—CH₂特征峰;1 648、1 554 cm⁻¹分别为酰胺

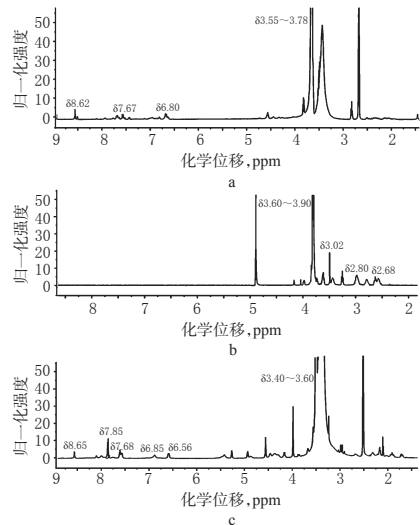


图2 ¹H-NMR图

a.FA-PEG-NHS;b.PEG-PAMAM;c.FA-PEG-PAMAM-hyd-DOX

Fig 2 ¹H-NMR spectras

a.FA-PEG-NHS;b.PEG-PAMAM;c.FA-PEG-PAMAM-hyd-DOX

键中ν_{C=O}和ν_{NH}+ν_{CN}的特征谱带;1 190 cm⁻¹是PEG结构中C—O—C的特征峰,表明PEG已成功连接在PAMAM的外端。¹H-NMR(D₂O)结果如图2b所示:PAMAM的特征质子峰δ 2.68、2.80、3.02 ppm,δ 3.60~3.90 ppm为PEG(—OCH₂CH₂)的质子化学位移峰,进一步证实PEG-PAMAM的合成。采用峰面积归一化法,代入公式 $PEG/PAMAM = \frac{S_{\delta(3.60\sim3.90)}/455}{S_{\delta(2.68\sim2.80)}/248}$,得PEG连接个数约为14。

2.2.2 PEG-PAMAM-hyd-DOX的合成。依据参考文献^[6],合成方法为:取PEG-PAMAM(0.60 μmol)溶于无水CH₂Cl₂后置于冰浴中,迅速加入氯甲酸对硝基苯酯(14.2 μmol)和催化量的DMAP,氮气保护,室温搅拌反应24 h。冰乙醚沉淀产物,得中间产物1。将产物1溶于N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中,加入85%水合肼(28.5 μmol),70 °C加热回流24 h。透析,冷冻干燥得中间产物2。进一步将产物2溶于DMF(含4 μl 三乙胺)中,然后加入DOX(28.5 μmol),氮气保护下60 °C避光回流24 h。反应结束后透析、冷冻干燥,产物-20 °C保存。合成路线如图3所示。

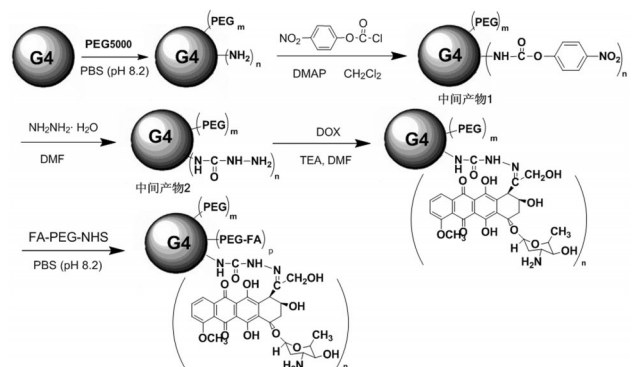


图3 FA-PEG-PAMAM-hyd-DOX的合成路线图

Fig 3 The synthetic route of FA-PEG-PAMAM-hyd-DOX

2.2.3 紫外分光光度法定量复合物中DOX的分子个数。将DOX的水溶液、PAMAM、PEG-PAMAM-hyd-DOX分别在

200~600 nm波长范围内进行紫外扫描,结果见图4。

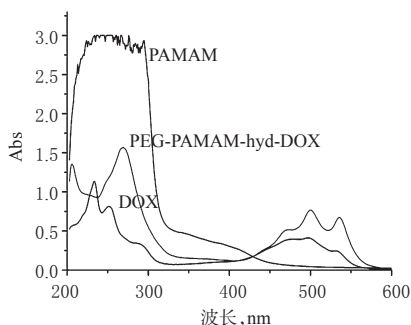


图4 紫外光谱图
Fig 4 UV spectra

通过公式 $DOX\% (wt.\%) = 543.5 \times n / (n \times M_r(DOX + hyd) + M_r(PEG-PAMAM))$ 计算产物中每个PEG-PAMAM共价结合的DOX分子个数(wt.%表示DOX的质量分数, n 表示共价结合的DOX分子个数, M_r 表示相对分子质量)。

DOX的最大吸收波长为490 nm,以吸光度(A)对质量浓度(c , 2、10、20、30、40、50 mg/L)作线性回归,得标准曲线方程 $A = 0.01989c + 0.00668$ ($r = 0.9998$),可知DOX质量浓度在2.0~50.0 mg/L范围内与吸光度呈良好的线性关系。计算得 $DOX\% = 6.11\%$,共价结合DOX的分子个数为10。

2.3 FA-PEG-PAMAM-hyd-DOX的合成及表征

2.3.1 FA-PEG-PAMAM-hyd-DOX的合成及纯化。合成路线如图3所示。取FA-PEG-NHS(12.32 μ mol)和PEG-PAMAM-hyd-DOX(0.77 μ mol)溶于PBS缓冲液(pH 8.2)中,室温避光搅拌24 h。反应结束后,透析,冷冻干燥,得红色固体,产率为64.5%。¹H-NMR(DMSO- d_6)表征合成产物,结果如图2c所示; δ 8.65、7.68、6.56 ppm是FA上相应基团的化学位移峰, δ 3.40~3.60 ppm为PEG(—OCH₂CH₂)的质子化学位移峰, δ 6.50~8.51 ppm是DOX相关基团的化学位移峰,表明FA-PEG-NHS连接到PEG-PAMAM-hyd-DOX。采用峰面积归一化法,计算得PEG总数约为22个。

2.3.2 粒径、Zeta电位测定及形态表征。将FA-PEG-PAMAM-hyd-DOX溶于超纯水中,0.45 μ m滤膜过滤,收集续滤液,粒径仪测定复合物的粒径分布及Zeta电位,每种样品平行操作3份。结果,平均粒径为(75.2 \pm 0.25) nm;Zeta电位为(7.04 \pm 0.11) mV。另取少量复合物溶液滴加在铜网上,待溶液挥干后通过TEM观察其形态,结果见图5。

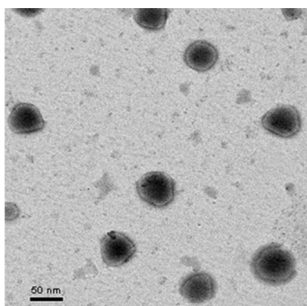


图5 FA-PEG-PAMAM-hyd-DOX的TEM图

2.4 体外释放试验
2.4.1 色谱条件和系统适应性试验。色谱柱:

Promosil ODS C₁₈(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m);流动相:乙腈-0.01 mol/L磷酸二氢铵(65:35),流速1.0 ml/min;柱温:30 $^{\circ}$ C;

检测波长:490 nm;进样量:20 μ l。配制100 mg/L的DOX贮备液,取适量,以双蒸水稀释成1 L含DOX 40 mg的标准液,备用。结果,DOX的保留时间为4.5 min左右,空白流动相、不同pH的体外释放介质对测定无干扰。

2.4.2 含量测定方法学考察。按规定方法进行试验,得回归方程为 $A = 13030.4c - 1253.5174$ ($r = 0.9995$),DOX检测质量浓度在1~40 mg/L范围内。高、中、低浓度水平的平均回收率分别为100.43% (RSD=0.20%, $n=3$)、99.54% (RSD=0.50%, $n=3$)、100.36% (RSD=0.70%, $n=3$)。日内RSD分别为0.20%、0.35%、0.24% ($n=6$);日间RSD分别为0.45%、0.39%、0.54% ($n=6$)。

2.4.3 体外释放试验。采用透析袋法考察DOX的体外释放行为。精密称取等量的FA-PEG-PAMAM-hyd-DOX分别溶于2 ml磷酸盐缓冲液(pH 7.4)、醋酸盐缓冲液(pH 5.5和pH 4.5)中,然后转移至透析袋(截留分子量3500),以25 ml相同pH的缓冲液作为外液,于37 $^{\circ}$ C恒温振荡水浴(100 r/min)孵育,在1、3、6、12、24、36、48 h分别取样1 ml,并补充1 ml新鲜介质,高效液相色谱法测定外液中DOX的质量浓度,并计算累积释放百分率。结果48 h内,在3种不同pH释放介质中,DOX的累积释放百分率分别为40%、29%和13%。上述结果表明药物从复合物中的释放呈现明显的pH依赖性,详见图6。

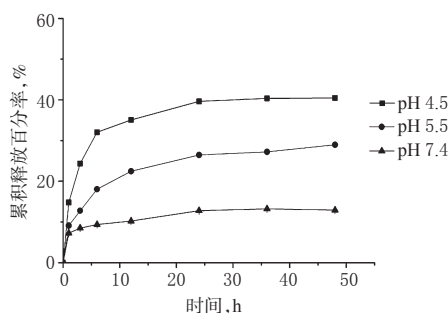


图6 FA-PEG-PAMAM-hyd-DOX体外释放曲线

Fig 6 In vitro release curves of FA-PEG-PAMAM-hyd-DOX

3 讨论

本研究中FA修饰的pH敏感PAMAM-DOX复合物的合成思路是先合成部分PEG化的PAMAM,然后采用hyd连接DOX和PEG-PAMAM,最后FA-PEG-NHS通过酰胺键连接到PEG-PAMAM-hyd-DOX上得到最终产物。选用这种连接顺序的理由是,试验初期发现PAMAM直接与DOX偶联会降低整个载药系统的水溶性,无法进行下一步操作;而将PAMAM部分PEG化后再偶联DOX,所得产物依旧具有很好的水溶性。另外,hyd偶联DOX的反应条件较剧烈,可能会导致FA结构破坏,因此在hyd偶联DOX后再连接FA-PEG-NHS。

由于FA相关基团在¹H-NMR图上的质子化学位移峰信号比较弱,故选用间接法表征FA连接的数目,即复合物中PEG总个数与PEG-PAMAM中PEG个数之差即为FA数目,本试验所得FA靶头数目为8个(22 \uparrow -14 \uparrow),与大多数文献中靶头连接的数目相符。笔者选择hyd作为酸敏感连接臂,是由于hyd的pH敏感性要优于顺乌头酸酐键,并且相对于甘氨酸-丙氨酸-亮氨酸-甘氨酸(GFLG)蛋白酶敏感间隔段的合成更省时省力。体外释放试验中,复合物在pH 4.5的醋酸盐缓冲溶液中48 h内累积释放百分率超过40%,其释药量是pH 7.4的醋酸盐缓冲溶液中的近4倍,充分证明本研究合成的复合物具有

正交试验优选阿魏酸钠片粉末直压处方

刘春平^{1,2*}, 向飞军^{1,2}, 王超¹, 全向阳¹, 刘再强¹(1.广东康美药物研究院有限公司, 广州 510006; 2.康美药业股份有限公司, 广东普宁 515300)

中图分类号 R944.4;R972 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)25-2353-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.25.18

摘要 目的: 优选阿魏酸钠片粉末直接压片法处方, 解决主药含量下降、片面易变色等湿法制粒工艺常见的问题。方法: 采用粉末直接压片法制备阿魏酸钠片, 用正交试验设计方法, 以休止角、脆碎度及溶出度为指标筛选处方中乳糖、低取代羟丙基纤维素、硬脂酸镁的所占比例, 并考察所得样品的片重差异、含量均匀度等相关指标及稳定性。结果: 最佳制备处方中乳糖、低取代羟丙基纤维素、硬脂酸镁的所占比例分别为10.0%、3.0%、0.2%。3批样品的休止角分别为38.2°、39.7°、38.4°, 脆碎度均为0.2%, 溶出度分别为96.4%、96.7%、96.1%。所筛选处方粉末流动性好, 片重差异、含量均匀度等指标均符合2010年版《中国药典》的相关规定。样品经6个月加速试验和室温长期留样考察, 外观、含量、有关物质及溶出度均未发生明显变化。结论: 优选的处方经济、操作简便, 制备的阿魏酸钠片质量稳定、稳定性良好, 适合工业化生产。

关键词 阿魏酸钠; 粉末直接压片; 正交试验; 稳定性; 溶出度

Formulation Optimization of Sodium Ferulate Powder Directly-compressed Tablets by Orthogonal Experiment

LIU Chun-ping^{1,2}, XIANG Fei-jun^{1,2}, WANG Chao¹, QUAN Xiang-yang¹, LIU Zai-qiang¹(1.Guangdong Kangmei Pharmaceutical Research Institute Co., Ltd., Guangzhou 510006, China; 2.Kangmei Pharmaceutical Co., Ltd., Guangdong Puning 515300, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the formulation of sodium ferulate powder directly-compressed tablets, and to deal with the common problems of wet granulation process, such as declining in the main drug content and the surface color of the tablet changing easily. METHODS: Sodium ferulate tablets were prepared by direct powder compression method. By orthogonal experimental design method, the proportion of lactose, low-substituted hydroxypropyl cellulose, magnesium stearate were screened with the angle of repose, friability and dissolution as indicators, and the piece weight variation of sample, content uniformity and other indicators were investigated. RESULTS: The optimal formulation included proportion of lactose, low-substituted hydroxypropyl cellulose, magnesium stearate were 10.0%, 3.0%, 0.2%. The angle of repose for 3 batches of samples were 38.2°, 39.7°, 38.4°; friability was 0.2%; dissolution were 96.4%, 96.7% and 96.1%, respectively. Screened formulation powder had good fluidity, and tablet weight differences, content uniformity degree and other indicators were in line with *Chinese Pharmacopoeia* (2010 edition). After 6 months of accelerated test and room temperature retention samples investigation, appearance, content, related substances and dissolution degrees were not changed significantly. CONCLUSIONS: The preferred formulation is economical and simple in operation, and prepared sodium ferulate tablets are stable in quality with good stability, which are suitable for industrial production.

KEY WORDS Sodium ferulate; Powder directly compression; Orthogonal experiment; Stability; Dissolution

较好的pH敏感释药性能。综上所述, 本研究成功合成了FA修饰pH敏感释药的PAMAM-DOX复合物, 为下一步体内外细胞学评价奠定了基础。

参考文献

- [1] 赵正煜, 杨平, 徐峰, 等. 天芝草胶囊对阿霉素的减毒作用研究[J]. 中国药房, 2010, 21(7): 598.
- [2] Lee CC, MacKay JA, Frechet JMJ, et al. Designing dendrimers for biological applications[J]. *Nat Biotech*, 2005, 23(12): 1 517.
- [3] 郑畅, 乔明曦, 鄢璐, 等. 树状大分子作为新型药物载体的

研究进展[J]. 药学学报, 2007, 42(9): 924.

- [4] Wang Y, Cao X, Guo R, et al. Targeted delivery of doxorubicin into cancer cells using a folic acid-dendrimer conjugate[J]. *Polymer Chemistry*, 2011, 2(8): 1 754.
- [5] Singh P, Gupta U, Asthana A, et al. Folate and folate-PEG-PAMAM dendrimers: synthesis, characterization, and targeted anticancer drug delivery potential in tumor bearing mice[J]. *Biocojug Chem*, 2008, 19(11): 2 239.
- [6] 夏可嘉, 盛瑞隆, 朱英丹, 等. 新型结合阿霉素的聚乙二醇嵌段共聚树枝状聚赖氨酸的合成及其药物缓释行为的研究[J]. 化学学报, 2010, 68(11): 1 130.

(收稿日期: 2012-10-10 修回日期: 2012-11-28)

* 工程师。研究方向: 药物制剂开发。电话: 020-39389796。E-mail: webmaster669@126.com