

多指标正交试验优选葛根素聚乙二醇衍生化合成工艺

刘新义¹, 李建荣², 张陆勇¹, 杜 丰³, 王乃婕³, 叶祖光^{1,2*}

1. 中国药科大学 新药筛选中心, 江苏 南京 210009

2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100070

3. 中药复方新药开发国家工程研究中心, 北京 100075

摘要: 目的 优选葛根素聚乙二醇(PEG-PUE)衍生化的合成工艺条件。方法 以PEG-PUE的质量分数、载药量、收率为评价指标, 采用HPLC法对PEG-PUE衍生化过程中PEG与PUE物质的量的比例、催化剂DMAP的用量、反应时间进行优选。结果 PEG-PUE衍生化的最佳合成工艺条件是PEG-EDC-PUE-DMAP物质的量的比例为1:1.2:1.2:0.3, 反应时间为12 h。结论 优选的PEG-PUE衍生化合成工艺条件合理, 操作可行。

关键词: 葛根素-聚乙二醇(PEG-PUE)衍生物; 葛根素; 正交试验; 高效液相色谱; 多指标评价

中图分类号: R284.3; R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)08-1528-04

Optimization of synthetic process of PEGylated puerarin by orthogonal test with multi-index

LIU Xin-yi¹, LI Jian-rong², ZHANG Lu-yong¹, DU Feng³, WANG Nai-jie³, YE Zu-guang^{1,2}

1. Jiangsu Center for Drug Screening, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

3. National Engineering Research Center for R&D of Traditional Chinese Medicine Multi-ingredient Drugs, Beijing 100075, China

Abstract: Objective To optimize the synthesis of PEGylated puerarin (PEG-PUE) by orthogonal test with multi-index evaluation.

Methods The research has focused on the optimized interacting factors of the synthetic process of PEG-PUE by HPLC, such as ratio of PEG and PUE, catalyst DMAP dosage, and reaction time, using the purity, drug loading, and yield of PEG-PUE as evaluation indexes. **Results** The optimum synthesis conditions of PEG-PUE were as follows, PEG-EDC-PUE-DMAP (1:1.2:1.2:0.3) and reaction time 12 h. **Conclusion** The optimum synthesis condition of PEG-PUE is reasonable, as well as feasible.

Key words: PEGylated puerarin (PEG-PUE); puerarin (PUE); orthogonal test; HPLC; multi-index evaluation

葛根素(puerarin, PUE)是从豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 或甘葛藤 *Pueraria thomsonii* Benth. 干燥根中提取的单体。由于葛根素具有扩张冠状动脉和脑血管、降低心肌耗氧量、改善微循环和抗血小板聚集的作用^[1-4], 因此临床上常用葛根素注射剂治疗和预防冠心病、心绞痛、心肌梗死等多种心脑血管疾病^[5-6]。虽然其临床应用十分广阔, 但存在水溶性差、半衰期短、急性血管内溶血等系列问题^[7]。大生产过程中常采用50%丙二醇增加葛根素溶解度, 采用聚乙二醇(PEG)衍生化

技术修饰葛根素, 可使葛根素在水中的溶解度提高近10倍, 半衰期延长5.2倍, 尤其对红细胞溶血等不良反应也有很大程度的改善^[8-9]。目前采用PEG衍生化技术修饰小分子药物尚处于探索性研究阶段, 葛根素聚乙二醇(PEG-PUE)衍生化方法为首次报道^[10], 本实验对PEG-PUE衍生化优选过程进行了研究。

1 仪器与材料

Agilent 1200 HPLC, JA1003 电子分析天平(厦门中村光学仪器厂), 汉纳磁性微型搅拌机(Avogadro

收稿日期: 2010-11-20

基金项目: 科技部重大新药创制专项(2009ZX09502-007)

作者简介: 刘新义(1979—), 男, 湖南人, 博士研究生, 主要研究方向为聚乙二醇衍生化技术。

Tel: (025)83271257 18716343570 E-mail: liuxinyi128@126.com

*通讯作者 叶祖光 Tel: (010)64014411 E-mail: yezuguang@sina.com

实验室), DZX—6090B 真空干燥箱 (上海市金鹏分析仪器有限公司)。

mPEG-COOH (PEG, 相对分子质量 4 700, 北京凯正生物工程发展有限责任公司), PUE (批号 090307, 质量分数 99.2%, 青岛金峰药业有限公司), 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC·HCl, 浙江普康化工有限公司), 4-二甲氨基吡啶 (DMAP, 上海共价化学科技有限公司), *N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF, 北京化学试剂公司), 乙腈为色谱纯, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 PEG 修饰葛根素的合成工艺^[11-13]

精密称取设计量的 PEG, 溶解于规定量的无水二氯甲烷中, 然后将设计量的 EDC·HCl 和 DMAP 加入其中, 搅拌均匀, 于 4 °C 反应 0.5 h。再将设计量的 PUE 溶解于规定量的 DMF, 加入上述反应体系中, 搅拌过夜。于预定的时间点取出反应产物, 减压浓缩至一定体积, 迅速加入定量的无水乙醚, 轻微振荡, 冰浴 5 h, 可见白色絮状沉淀, 用胶头滴管吸取上层乙醚并弃去。再以规定量的异丙醇, 反复洗涤沉淀物, 最后将沉淀物于 30~40 °C 真空干燥, 称定质量, 即得 PEG-PUE, 结构式见图 1。

2.2 合成工艺的优化

根据文献报道^[8,10]及预试验结果, 本实验选择 PEG 衍生物的质量分数、载药量和收率为评价指标, 对 PEG-EDC-PUE 的比例(A)、DMAP 用量(B)、

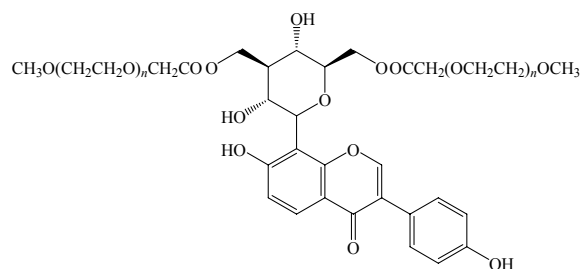


图 1 PEG-PUE 化学结构

Fig. 1 Chemical structure of PEG-PUE

反应时间(C) 3 个因素进行考察。正交试验设计及结果见表 1。

2.3 指标的测定

2.3.1 PEG-PUE 的质量分数 色谱柱为 CAPCELL PAK C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5.0 μm, 日本); 流动相为 0.2% 磷酸水溶液(A)-乙腈(B), 线性梯度洗脱: 0~6 min, 87% A; 6~7 min, 87%~60% A; 7~12 min, 60%~40% A; 12~14 min, 40%~87% A; 14~17 min, 87% A; 柱温 40 °C; 检测波长 250 nm; 体积流量 1 mL/min。

精密称取 PEG-PUE 适量, 以丙二醇-醋酸缓冲液 (pH 4.8) (1:1) 溶解, 按上述色谱条件进样测定, 记录色谱图。5 个色谱峰与相邻峰分离度良好, 经 HPLC-DAD 检测, 各峰纯度均高于阈值 0.99, 保留时间分别为 6.3、11.8、12.4、12.9、13.8 min, 其中保留时间在 6.3、12.4 min 的色谱峰分别为 PUE、

表 1 正交试验设计及结果

Table 1 Orthogonal test design and results

试验号	A	B/mmol	C/min	D (空白)	质量分数/%	载药量/%	收率/%	综合评分
1	1:1.2:0.6 (1)	0.1 (1)	12 (1)	(1)	71.14	3.17	88.12	79.12
2	1:1.2:0.6 (1)	0.3 (2)	16 (2)	(2)	65.01	3.29	92.45	76.69
3	1:1.2:0.6 (1)	0.5 (3)	20 (3)	(3)	61.91	2.85	91.24	72.39
4	1:1.2:1.2 (2)	0.1 (1)	16 (2)	(3)	92.15	4.07	93.80	97.98
5	1:1.2:1.2 (2)	0.3 (2)	20 (3)	(1)	91.59	4.12	93.86	97.87
6	1:1.2:1.2 (2)	0.5 (3)	12 (1)	(2)	92.20	4.15	91.69	97.94
7	1:1.2:2.4 (3)	0.1 (1)	20 (3)	(2)	88.01	3.92	86.58	93.09
8	1:1.2:2.4 (3)	0.3 (2)	12 (1)	(3)	93.89	4.25	85.39	98.15
9	1:1.2:2.4 (3)	0.5 (3)	16 (2)	(1)	86.79	4.26	85.40	93.66
K ₁	228.20	270.20	275.21	270.65				
K ₂	293.80	272.71	268.33	267.73				
K ₃	284.90	263.99	263.35	268.52				
R	65.60	8.72	11.86	2.93				

PEG-PUE, 其余峰的紫外扫描图谱与 PEG-PUE 相似, 最大吸收波长约为 250 nm, 为不同 PEG 单元与葛根素的链接产物。采用面积归一化法计算 PEG-PUE 的质量分数, 结果见表 1。

2.3.2 PEG-PUE 的载药量^[9]

对照品溶液的制备: 精密称取 PUE 对照品适量, 甲醇溶解, 再稀释成 10 μg/mL 的溶液, 即得。

供试品溶液的制备: 称取 PEG-PUE 约 10 mg, 精密称定, 溶解于 10 mL 1 mol/L NaOH 溶液中, 40 °C 水浴水解 0.5 h^[14]; 再精密吸取水解液 1 mL 置 10 mL 量瓶中, 加丙二醇-醋酸缓冲液 (pH 4.8) (1:1) 稀释至刻度, 摇匀, 即得。

样品测定: 分别精密吸取对照品溶液 10 μL, 供试品溶液 20 μL, 注入液相色谱仪, 依法测定, 按下述公式计算 PEG-PUE 中 PUE 的载药量, 结果见表 1。

$$\text{载药量} = m_{\text{PUE}} / m_{\text{PEG-PUE}}$$

m_{PUE} 、 $m_{\text{PEG-PUE}}$ 分别为 PEG-PUE 中 PUE 的质量和 PEG-PUE 的质量

2.3.3 PEG-PUE 的收率 按公式计算 PEG-PUE 的收率, 结果见表 1。

$$\text{收率} = m_{\text{PEG-PUE}} / (m_{\text{PEG}} + m_{\text{PUE}})$$

$m_{\text{PEG-PUE}}$ 、 m_{PEG} 、 m_{PUE} 分别为 PEG-PUE、PEG、PUE 的质量

2.4 结果分析

参照文献报道^[10-11], 综合考虑 PEG-PUE 的质量分数、载药量和收率 3 个评价指标的主次关系, 本实验采用主观权重和客观权重相结合的方式, 对各评价指标进行赋权综合评分, 满分为 100 分。其中质量分数占 60%, 以最高者为满分 (60 分); 载药量占 20%, 以最高者为满分 (20 分); 收率占 20%, 以最高者为满分 (20 分)。综合评分结果见表 1, 方差分析见表 2。

综合上述分析, 由表 1 中极差 R 值大小可知各因素对综合评分的影响程度依次为 $A > C > B$, 其中 A 有极显著影响 ($P < 0.01$), B 、 C 无显著影响, 以

$A_2B_2C_1$ 组合为优。因实验中发现 PEG 与 PUE 的物质的量的比例对实验产生非常显著影响, 本实验只将 PEG 和 PUE 的物质的量的比例设定为 1:1.2, 所以很有必要进一步对 PEG 与 PUE 的物质的量的比例进行考察。实验进一步将这两者的比例设计为 1:1、1:1.4、1:1.6, DMAP 的用量和反应时间均采用实验优化的最佳条件, 结果 PEG-PUE 的质量分数分别为 89.41%、88.53%、86.91%, 载药量约在 4% 左右, 表明 PEG-PUE 的质量分数不再增加, 因此筛选出最佳的 PEG-PUE 衍生化工艺条件为 $A_2B_2C_1$, 即 PEG-EDC-PUE-DMAP 的物质的量的比例为 1:1.2:1.2:0.3, 反应时间为 12 h。

按照正交试验优选的工艺进行验证, 3 批 PEG-PUE 的质量分数分别为 94.8%、95.1%、95.2%, 载药量分别为 4.10%、4.11%、4.12%, 收率分别为 94.4%、94.6%、94.5%, 明显高于正交设计表中的结果。

3 讨论

葛根素葡萄糖苷上有 4 个醇羟基, 黄酮母核上两个酚羟基, 由于酚羟基与苯环已形成了共轭体系, 很难像醇羟基一样发生亲核取代的酯化反应, 故酚羟基上链接 PEG 的可能性较小。从葡萄糖苷上的 4 个醇羟基位置分析, $C_6''\text{-OH}$ 位于环外, 且为伯羟基, 比其他位置上的仲羟基要活泼, 故优先被结合上; 从实验过程中发现, 葡萄糖环上的 $C_3''\text{-OH}$ 处于 $C_6''\text{-OH}$ 的对位, 空间阻力小, 链接 PEG 的几率也很高, 经 $^1\text{H-NMR}$ 、 FT-IR 等结构鉴定, 发现 PEG 修饰 PUE 位点为位于葡萄糖苷上的 $C_6''\text{-OH}$ 和 $C_3''\text{-OH}$ ^[4]。

从 PEG-PUE HPLC 图谱分析, 当 PEG 物质的量高于 PUE 时, PUE 上可链接不同数目的 PEG 单元, 其 HPLC 图谱中出现了除 PUE 峰之外的其他 4 个色谱峰, 保留时间分别为 11.8、12.4、12.9、13.8 min, 其紫外扫描图谱与 PUE 小分子相似。由于 PEG 本身为长链状大分子特殊结构, 在色谱柱里类似“蚯蚓”移动, 一般按照相对分子质量大小先后出峰^[6], 所以推测这 4 个色谱峰可能分别为 PUE 上链接 1、2、3、4 个 PEG 单元的衍生物的色谱峰。当 PEG 物质的量少于 PUE 时, PEG-PUE 的质量分数明显提高, 但随着 PUE 用量的增多, 纯化过程中出现了少量 PUE 残留, 故合成过程中需严格控制 PUE 用量。另外, PEG-PUE 衍生化过程中添加的催化剂 DMAP 的量需控制在 PEG 物质的量的 1/3 左右为

表 2 方差分析表

Table 2 Analysis of variance

变异来源	SS	自由度	MS	F 值	P 值
A	844.25	2	422.12	551.86	<0.01
B	13.45	2	6.72	8.79	
C	23.63	2	11.82	15.45	
误差	1.53	2	0.76		

$$F_{0.05}(2, 2) = 19.00 \quad F_{0.01}(2, 2) = 99.00$$

宜,反应时间也不宜太长,以免 PUE 上链接其他 PEG 分子单元,从而影响 PEG-PUE 的质量分数。

目前,PEG 衍生化小分子药物的研究尚处于初步研究阶段,一些技术性评价指标体系也未完全建立。研究发现 PEG-PUE 水溶性良好,注射进入动物体内后未发现任何明显不良反应;另外,红细胞溶血现象与葛根素注射剂等剂量条件下比较,具有明显降低的优势,与文献报道^[15]结果相似。尽管如此,PEG-PUE 的载药量约为 4%,且需-20℃冷冻保存,今后可考虑加入适宜的稳定剂将其制成冻干粉,以大输液的形式在临床上现配现用。本实验采用多指标正交试验优选 PEG-PUE 衍生化合成工艺,可为今后 PEG 修饰小分子药物的技术路线提供可借鉴的理论指导,同时也可为解决活性小分子药物的难溶性、不良反应问题提供新的研究方向。

参考文献

- [1] 于继强,高尔.葛根素对心脑血管系统药理作用研究进展[J].现代中西医结合杂志,2008,17(24):3880-3882.
- [2] 黄萍,龚永生,范小芳,等.葛根素对低氧高二氧化碳性肺动脉高压大鼠右心室 Apelin/APJ 系统的影响[J].中草药,2008,39(4):565-569.
- [3] 李娟,胡永华.葛根素对人小细胞肺癌 H446 细胞周期和相关周期蛋白表达的影响[J].中草药,2008,39(10):1535-1537.
- [4] 邓新国,胡世兴,郭向明,等.葛根素抗 rds 小鼠视网膜光感受器细胞凋亡及其机制探讨[J].中草药,2008,39(5):732-736.
- [5] 王超权.葛根素注射液对急性冠脉综合征非再灌注治疗患者血液流变学的影响[J].中草药,2011,42(3):563-565.
- [6] 周添浓,王艳,侯少贞,等.葛根素对心脑血管保护作用的实验研究[J].中西医结合心脑血管病杂志,2008,6(3):288-290.
- [7] 刘理燕.葛根素静脉滴注致急性血管内溶血死亡[J].药物不良反应杂志,2007,9(1):57-58.
- [8] Liu X Y, Yu B Y, Wang N J, et al. A validated stability-indicating HPLC method for the determination of PEGylated puerarin in aqueous solutions [J]. *J Chromatogr B*, 2010, 878(23): 2061-2066.
- [9] Liu X Y, Zhi H Y, Du F, et al. A HPLC-UV method for the determination of puerarin in rat plasma after intravenous administration of PEGylated puerarin conjugate [J]. *J Chromatogr B*, 2010, 878(31): 3297-3302.
- [10] Khandare J, Minko T. Polymer-drug conjugates: Progress in polymeric prodrugs [J]. *Prog Polym Sci*, 2006, 31(4): 359-397.
- [11] Hong M H, Zhu S J, Jiang Y Y, et al. Novel anti-tumor strategy: PEG-hydroxycamptothecin conjugate loaded transferrin-PEG-nanoparticles [J]. *J Controlled Release*, 2010, 141(1): 22-29.
- [12] Canal F, Vicent M J, Pasut G, et al. Relevance of folic acid/polymer ratio in targeted PEG-epirubicin conjugates [J]. *J Controlled Release*, 2010, 146(3): 388-399.
- [13] Navath R S, Wang B, Kannan S, et al. Stimuli-responsive star polyethylene glycol conjugates for improved intracellular delivery of N-acetyl cysteine in neuro-inflammation [J]. *J Controlled Release*, 2010, 142(3): 447-456.
- [14] Pasut G, Canal F, Via L D, et al. Antitumoral activity of PEG-gemcitabine prodrugs targeted by folic acid [J]. *J Controlled Release*, 2008, 127(3): 239-248.
- [15] Gajbhiye V, Kumar P V, Tekade R K, et al. PEGylated PPI dendritic architectures for sustained delivery of H₂ receptor antagonist [J]. *Eur J Med Chem*, 2009, 44(3): 1155-1166.

出胶片:

聚山梨酯 80-1,2-丙二醇 (2:1)

水 油 水

聚山梨酯 80-1,2-丙二醇 (2:1)

水 油 水