

三分枝六聚乙二醇接枝十二胺共聚物的合成及其性能研究

聂凡茹^{1,2}, 艾汝经², 周欣欣^{1,2}, 郭一飞², 韩美华², 王向涛^{1,2*}

1. 哈尔滨商业大学 生命科学与环境科学研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076

2. 中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所, 北京 100193

摘要: **目的** 合成以三分枝六聚乙二醇为亲水部分、以十二胺为疏水部分的新型两亲性分子三分枝六聚乙二醇接枝十二胺共聚物 (PGDA), 并对其理化性质进行考察。**方法** 通过苯磺酰化、取代反应、还原反应、酯化后形成酰胺 5 步反应合成了 PGDA。使用核磁和质谱确定其结构和相对分子质量; 荧光探针法测量其临界胶束浓度; 并考察 PGDA 在水溶液中的形态、37 °C 稳定性。**结果** 两亲性分子 PGDA 被成功合成。质谱实测相对分子质量与理论相对分子质量 1 171.69 吻合; 该两亲性分子在水中很容易自组装成胶束, 临界胶束浓度为 75 mg/L; PGDA 胶束 37 °C 孵育 24 h 粒径无明显变化、稳定性良好。**结论** 成功合成了三分枝六聚乙二醇为亲水部分和以十二胺为疏水部分的两亲性分子 PGDA, 其在水溶液中具有优良的胶束化行为, 有望能作为一种药用辅料在难溶性药物的胶束等制剂中得到应用。

关键词: 三分枝六聚乙二醇接枝十二胺共聚物 (PGDA); 合成工艺; 临界胶束浓度; 稳定性

中图分类号: R914.2; R966 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2018)01-0005-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2018.01.002

Synthesis of branched polyethylene glycol-co-dodecylamine and its properties

NIE Fan-ru^{1,2}, AI Ru-jing², ZHOU Xin-xin^{1,2}, GUO Yi-fei², HAN Mei-hua², WANG Xiang-tao^{1,2}

1. Life Sciences and Environmental Sciences Center, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

Abstract: **Objective** To synthesize a novel amphiphilic molecule branched polyethylene glycol-co-dodecylamine (PGDA) with branched hexa polyethylene glycol being as the hydrophilic segment while dodecylamine as the hydrophobic segment, and study its physicochemical property. **Methods** PGDA was successfully synthesized through acylation, substitution reaction, reduction reaction and esterification. The chemical structure was verified by NMR and MS analysis. The critical micelle concentrations (CMC) of PGDA were determined by pyrene fluorescence probe spectrometry. The morphology of PGDA in water was examined by transmission electron microscopy and the size of PGDA micelles at 37 °C was monitored to assess the stability. **Results** The amphiphilic molecule was successfully synthesized. MS proved the molecular weight of the obtained PGDA was in accordance with the theoretical molecular weight of 1 171.69. PGDA could easily self-assemble into micelles in aqueous solution with critical micelle concentrations of 75 mg/L. The resultant micelles were quite stable after incubation at 37 °C with constant particle size. **Conclusion** The novel amphiphilic molecule PGDA is successfully synthesized, and its ability to easily self-assemble in aqueous solution which suggested that the resultant amphiphilic PGDA may be used as a pharmaceutical adjuvant, especially in micelles preparation for insoluble drugs.

Key words: branched polyethylene glycol-co-dodecylamine (PGDA); synthesis; critical micelle concentration; stability

聚乙二醇 (PEG) 为乙二醇聚合而形成的药用聚合物, 具有良好的溶解性, 无毒, 无免疫原活性, 且被美国 FDA 批准为可注射的药用辅料^[1-2]。大量研究证明, PEG 在增加溶解度、提高药物生物利用

度、改善药物释放药动学等方面具有明显的效果。目前研究较多的为线性 PEG, 而分枝 PEG 与等相对分子质量的线性 PEG 相比, 可以更有效地保护药物不被体内的水解酶水解和不易被免疫系统识别,

收稿日期: 2017-08-11

基金项目: 国家自然科学基金-广东联合基金资助项目 (U1401223)

作者简介: 聂凡茹 (1993—), 女, 黑龙江牡丹江人, 硕士研究生, 研究方向为药物新剂型。Tel: 18813120800 E-mail: 421661055@qq.com

*通信作者 王向涛 (1973—), 男, 河南洛阳人, 研究员, 博士, 主要从事药物新剂型研究。Tel: (010)57833266 E-mail: xtaowang@163.com

延长体内循环时间,也利于实现药物的缓控释放。分枝 PEG 作为蛋白类药物修饰剂的研究颇多,而作为药用辅料的研究较少^[3]。聚山梨酯是具有分枝的 PEG 聚合物,也是目前使用最广泛的药用辅料之一。聚山梨酯 80 (吐温 80) 结构中有 20 个乙二醇单元,但这 20 个单元在 4 个位置无固定分布,这一点为其纯化、精制、鉴别、含量测定带来诸多不便。纯度不高的聚山梨酯 80 已经给中药注射剂带来了

很大的安全隐患,故寻找安全性高、相对分子质量明确、纯化方便的聚山梨酯类似物很有意义^[4-5]。本实验拟将三分枝六聚乙二醇与含十二胺个碳的脂肪链共价偶联,合成了一种新型两亲性分子三分枝六聚乙二醇接枝十二胺共聚物 (branched polyethylene glycol-co-dodecylamine, PGDA, 图 1), 在水相中很易自组装成小粒径的胶束,可以作为药用载体制备高载药量的纳米给药系统。

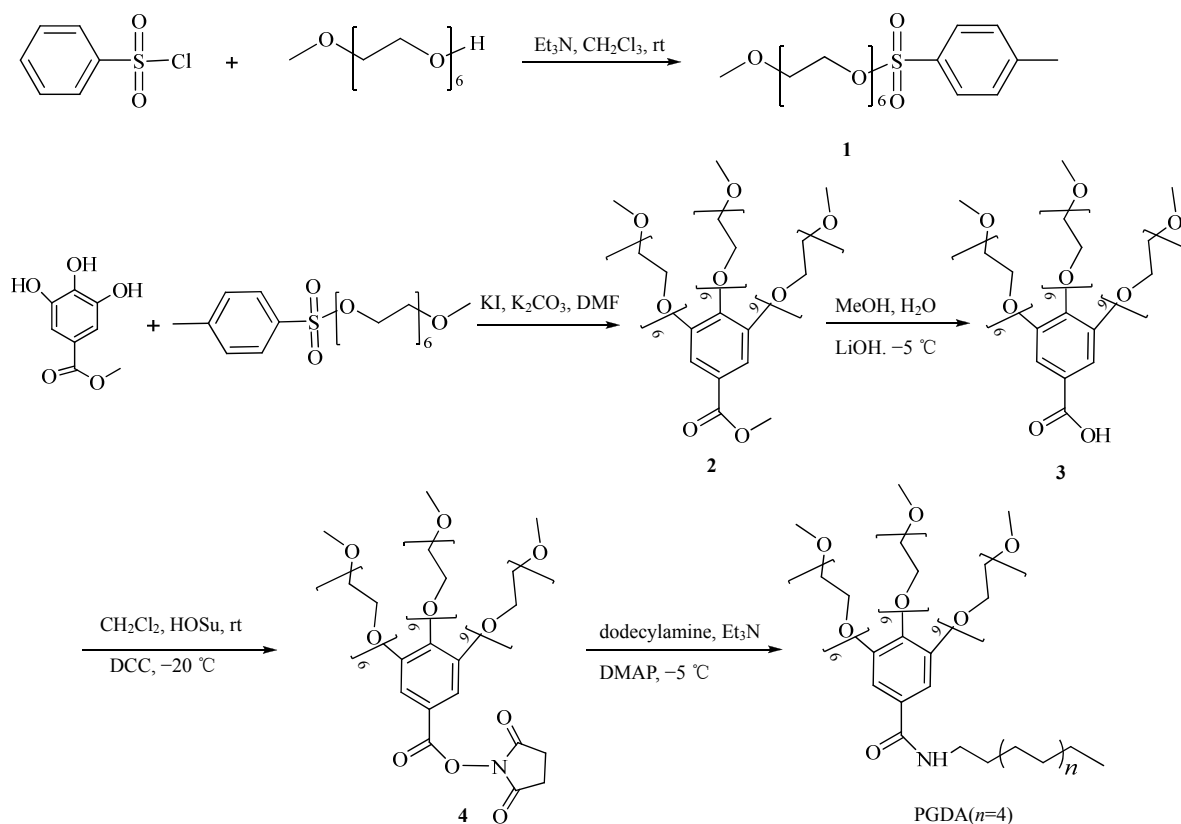


图 1 PGDA 的合成路线

Fig. 1 Synthetic route of PGDA

1 仪器和材料

SCQ3201 超声波清洗器 (上海声彦超声仪器有限公司); F-4500 荧光分光光度计 (日本 Hitachi); Nano-ZS90 马尔文粒度仪 (英国马尔文设备公司); CLJB-03 (85-2) 恒温磁力搅拌器 (湖北省科学器材公司); AL204 电子天平 (梅特勒-托利多仪器上海有限公司); Buchi R-3 旋转蒸发仪 (瑞士 Buchi); Bruker AV 300 核磁共振仪, 以 CDCl_3 为溶剂, 在室温测得, 化学位移以四甲基硅烷为参照, 以 δ 表示。

六乙二醇单甲醚 (Me-PEG6, 分析纯, 嘉兴博美生物技术有限公司); 无水二氯甲烷 (DCM) 由分析纯二氯甲烷加入氢化钙回流干燥而得; 乙腈和

甲醇 (赛默飞世尔科技有限公司) 为色谱级, 其余试剂均为分析纯。

2 方法和结果

2.1 化合物的合成

2.1.1 化合物 1 的合成 将 Me-PEG6 (3.99 g, 13.48 mmol) 与对甲基苯磺酰氯 (Ts-Cl, 9.07 g, 47.60 mmol)、三乙胺 (6.61 g, 65.40 mmol) 溶于 100 mL 无水二氯甲烷中搅拌下反应。TLC 检识, 待 Me-PEG6 消耗殆尽时结束反应, 真空蒸干溶剂, 残留物用 DCM 溶解, 有机相用饱和 NaHCO_3 和饱和食盐水洗涤, 无水 MgSO_4 干燥, 柱色谱分离, 石油醚-醋酸乙酯 (1:3) 洗脱, 得无色透明液体化合

物 **1** (6.07 g, 产率 82%)。 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 2.45 (s, 3H, CH_3), 3.51 (s, 3H, CH_3), 3.54~3.70 (m, 22H, CH_2), 4.14~4.17 (m, 2H, CH_2), 7.26~7.35 (dd, 2H, CH), 7.78~7.81 (dd, 2H, CH) [6]。

2.1.2 化合物 2 的合成 把没食子酸甲酯 (0.54 g, 2.94 mmol)、化合物 **1** (5.3 g, 11.8 mmol)、KI (0.39 g, 2.36 mmol)、 K_2CO_3 (4.06 g, 29.40 mmol) 溶于 50 mL 干燥的 DMF, 80 $^\circ\text{C}$ 下搅拌 24 h, 真空蒸干 DMF, 残留物用 DCM 溶解。有机相用饱和 NaHCO_3 和饱和食盐水洗涤, 无水 MgSO_4 干燥, 柱色谱分离, 先用石油醚-醋酸乙酯 (1:5) 洗脱, 再用 DCM-MeOH (20:1) 洗脱, 得淡黄色透明液体化合物 **2** (2.4 g, 产率 80%)。 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 3.37~3.38 (s, 9H, CH_3), 3.52~3.56 (m, 6H, CH_2), 3.61~3.72 (m, 54H, CH_2), 3.78 (t, 2H, CH_2), 3.84~3.88 (m, 7H, $\text{CH}_2 + \text{CH}_3$), 4.17~4.18 (t, 6H, CH_2), 7.27~7.29 (s, 2H, CH) [7]。

2.1.3 化合物 3 的合成 化合物 **2** (0.34 g, 0.33 mmol) 溶于 20 mL 甲醇和 6 mL 水的混合溶剂中, -5°C 条件下加入 $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (56.2 mg, 1.34 mmol), 反应 12 h 后, 蒸出有机溶剂, 用 10% KHSO_4 水溶液将体系 pH 值调至 5~6, 用二氯甲烷萃取 3 次, 有机相用饱和食盐水洗涤, 无水 MgSO_4 干燥, 得化合物 **3** (0.32 g, 产率 95%)。

2.1.4 化合物 4 的合成 化合物 **3** (1.40 g, 1.39 mmol) 溶于干燥的二氯甲烷 (50 mL) 中, 室温下加入琥珀酰亚胺 (HOSu , 0.27 g, 2.34 mmol), 搅拌 15 min 后, 在 -20°C 下加入二环己基碳二亚胺 (DCC , 25.5 mg), 自然升温至室温, 搅拌过夜, 滤除生成的沉淀, 滤液用饱和 NaHCO_3 和饱和食盐水洗涤, 有机层用无水 MgSO_4 干燥, 得化合物 **4** (1.38 g, 产率 90%)。

2.1.5 PGDA 的合成 在氮气保护下, 将十二胺 (0.64 g, 3.45 mmol)、三乙胺 (0.52 g, 5.17 mmol) 和二甲基氨基吡啶 (DMAP , 0.07 g) 溶于 DCM (50 mL) 中, 在 -5°C 中, 将化合物 **4** (1.90 g, 1.73 mmol) 的 DCM (50 mL) 溶液滴入反应体系中, 室温反应 16 h, 反应结束, 蒸干溶剂, 用 DCM 溶解, 用饱和 NaHCO_3 和饱和食盐水洗, 有机层用 MgSO_4 干燥后, 柱色谱分离, DCM-MeOH (20:1) 洗脱, 得淡黄色透明液体 PGDA (1.62 g, 产率 80%)。 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.89 (t, 3H, CH_3), 1.24~1.33 (m,

18H, CH_2), 1.60 (m, 2H, CH_2), 3.36 (s, 9H, CH_3), 3.52 (m, 6H, CH_2), 3.60~3.72 (m, 54H, CH_2), 3.78 (t, 8H, CH_2), 4.18 (t, 6H, CH_2), 7.27 (s, 2H, CH)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ 13.95, 22.53, 26.94, 29.19, 29.25, 29.44, 29.48, 29.51, 29.61, 31.77, 40.11, 58.85, 68.99, 69.63, 70.36, 70.39, 70.42, 70.49, 70.57, 71.80, 72.22, 76.52, 76.95, 77.39, 107.27, 129.96, 141.27, 152.30, 166.75 [8-9]。ESI-MS 显示其 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 峰在 m/z 1172.75 处, 与 PGDA 理论相对分子质量 1171.69 吻合, 总收率 44.87%。

2.2 纯度检测

精确称量 PGDA, 配制 100 $\mu\text{g/mL}$ 的甲醇溶液, 在 200~400 nm 波长进行扫描, 紫外吸收图谱见图 2。其在 259、216 nm 处有两个强吸收峰, 这与化合物均具有苯环结构有关。在近紫外区存在强吸收有利于对化合物通过 HPLC 进行含量检测, 以控制制剂中的辅料。

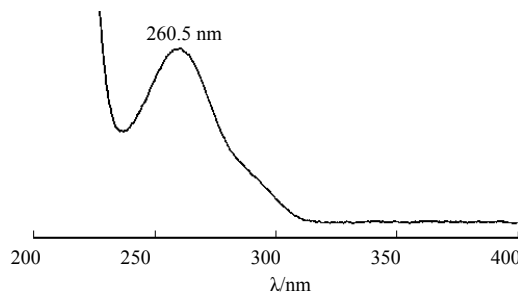


图2 PGDA在紫外区200~400 nm图谱

Fig. 2 UV chromatogram of PGDA in 200 — 400 nm

将一定量的 PGDA 溶解在乙腈中, 配制成质量浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液, 采用 HPLC 法测定其质量分数。色谱条件: Waters Symmetry C_{18} 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm), 流动相乙腈-水 (30:70), 体积流量 1 mL/min, 检测波长 260 nm, 进样体积 20 μL , 柱温 30 $^\circ\text{C}$ 。采用面积归一化法计算 PGDA 的质量分数为 (99.32 $\pm$ 0.005)%, 在 15.08 min 出峰。

2.3 临界胶束浓度的测定

采用芘荧光探针法测定了 PGDA 的临界胶束浓度 (CMC)。芘溶液的荧光发射光谱有 5 个荧光峰, 分别在 373、379、384、394、480 nm 附近。芘在水中的溶解度非常小, 两亲性物质对芘有增溶作用, 在超过 CMC 值后, 两亲性物质的增溶能力会有一个突变, 此时芘荧光强度 I_{374}/I_{383} 随着浓度的变化曲

线有一突变,此突变点时的浓度即为两亲性物质的CMC^[6]。实验测定不同质量浓度的表面活性剂溶液中芘的荧光光谱来确定溶液的CMC。

精密称取3.0 mg 芘,置于250 mL 量瓶中,用丙酮溶解并加至刻度,即得浓度为60 nmol/L,1:100 稀释后使用。精密称取24.2 mg PGDA,置于5 mL 量瓶中,用去离子水将其溶解并加至刻度。分别取适量的溶液,使用去离子水将其稀释成4.84~2.36 $\mu\text{g/mL}$ 的一系列物质浓度。取20 μL 芘溶液于若干2 mL 量瓶中,开口放置,丙酮完全挥发后(约6 h),加入不同浓度 PGDA 溶液至刻度,超声处理15 min 保证均匀混合。使用荧光分光光度计固定激发波长为334 nm,测定发射波长分别为383、374 nm 处的荧光强度,通过 I_{374}/I_{383} 对 PGDA 的浓度 $\lg$ 值做图,见图3。可知拐点为75 $\mu\text{g/mL}$,即为 PGDA 的CMC 值。

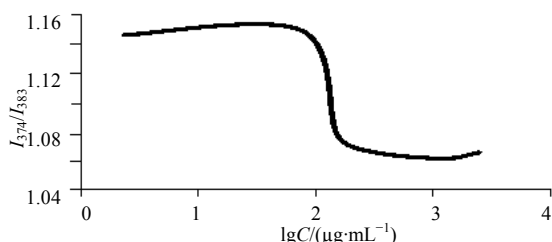


图3 I_{374}/I_{383} 随 PGDA 的浓度变化图

Fig. 3 Emission spectra of pyrene I_{374}/I_{383} intensity ratios vs concentration for PGDA

2.4 自组装及其胶束的稳定性

取适量 PGDA 加入到适量去离子水中,制得10 mg/mL。振荡(必要时超声辅助),观察其分散情况,测量粒径和粒度分布,然后置于37 $^{\circ}\text{C}$ 水中孵育,0.5、1、2、4、8、12、24 h 测定粒径变化。PGDA 在水中易分散,并自组装成澄清透明的胶束,平均粒径在8 nm 左右(图4),在37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育至24 h,粒径没有明显变化,稳定性良好。

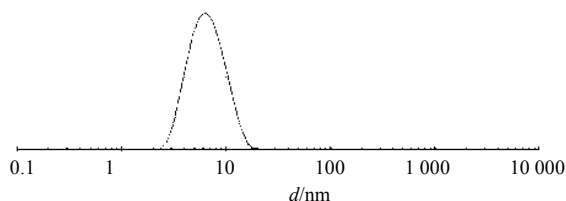


图4 PGDA 胶束在水中的粒径分布

Fig. 4 Particle size distribution of PGDA micelles in water

3 讨论

PEG 是制剂中常用的聚合物材料,具有良好的亲水性、生物相容性,无毒、无免疫原性,已被FDA 批准可用于静脉注射给药。然而由于自由基聚合的特点,常规 PEG 即便是标注了某个相对分子质量值,也不是具有精确相对分子质量的产物,而是一个混合物,其相对分子质量是以标注相对分子质量为平均值的正态分布。这一特点不利于 PEG 相关聚合物的分子结构的准确确定和质量控制。如在制剂中广泛应用的聚山梨酯,就是以3个低聚乙二醇链为亲水部分、脂肪链为疏水部分的两亲性辅料,3条亲水链中乙二醇单元数目不固定,合计平均含20个乙二醇单元,是一系列化合物的混合物,其所含的杂质给中药注射带来巨大的安全隐患。故本研究参照聚山梨酯80 的结构合成具有单一相对分子质量和明确化学结构的类似聚合物辅料,希望在这方面有所作为。

本研究通过苯磺酰化、取代反应、还原反应、酯化后形成酰胺5步反应成功合成以三分枝六聚乙二醇为亲水部分、十二胺为疏水部分的两亲性分子 PGDA,通过核磁和质谱进行了结构确证,芘荧光探针测定显示其临界胶束质量浓度为75 mg/L,37 $^{\circ}\text{C}$ 自组装胶束稳定性良好。

PGDA 亲水部分的乙二醇链段增长,在第一步六聚乙二醇单甲醚参与的苯磺酰化反应中,反应溶剂由原来的四氢呋喃和水的混合溶剂更换为二氯甲烷,使之反应在均一有机相的反应体系中进行,这样可以显著增加反应产率(提高约1倍),缩短反应时间。柱色谱分离提纯过程较为费时,但每步反应产率均在80%以上。具有较长亲水部位的 PGDA 在37 $^{\circ}\text{C}$ 能稳定存在,为作为药物载体在37 $^{\circ}\text{C}$ 时的稳定性奠定了基础。因此本研究合成的 PGDA 有望成为难溶性药物的一种优良载体,帮助解决这些药物的难溶和给药问题,并可能基于纳米效应提高疗效,为临床注射给药提供了一种可行的给药方案。

参考文献

- [1] 陈春燕,徐萍,袁弘.口服聚乙二醇修饰固体脂质纳米粒的组织分布及抗肿瘤药效学研究[J].中国现代应用药学,2016,33(5):586-592.
- [2] 刘敏.几种聚乙二醇药用材料的合成研究[D].上海:华东师范大学,2016.
- [3] 孙健.聚乙二醇在药物制剂中的应用[J].中兽医学杂志,2013,(6):53-55.

- [4] 马鸿雁, 李霞, 张海燕, 等. 中药注射剂增溶辅料吐温-80 物理化学性能研究进展 [J]. 中国药事, 2010, 24(6): 594-596.
- [5] 吴毅, 金少鸿. 药用辅料吐温 80 的药理、药动学及分析方法研究进展 [J]. 中国药事, 2008, 22(8): 717-720.
- [6] 陆国庆, 郑江, 郑新川, 等. 芘荧光探针法结合曲线拟合研究胆盐-磷脂混合纳米胶束的聚集行为 [J]. 中国药业, 2011, 20(10): 21-23.
- [7] Guo Y, Zhao Y, Zhao J, *et al.* Codendrimer from polyamidoamine (PAMAM) and oligoethylene dendron as a thermosensitive drug carrier [J]. *Bioconjug Chem*, 2014, 25(1): 24-31.
- [8] Xuan W, Ruiyi L, Zaijun L, *et al.* Synthesis of dodecylamine-functionalized graphene quantum dots and their application as stabilizers in an emulsion polymerization of styrene [J]. *J Colloid Interface Sci*, 2017, 505: 847-857.
- [9] Zhao Y, Guo Y, Li R, *et al.* Methotrexate nanoparticles prepared with codendrimer from polyamidoamine (PAMAM) and oligoethylene glycols (OEG) dendrons: antitumor efficacy *in vitro* and *in vivo* [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 28983.