

(聚酰胺-胺)树状大分子对甲氨蝶呤的复合和释放研究*

叶 玲^{1**} 杨 华¹ 何满林¹ 唐亚娟¹ 陈双玲¹ 原 阳¹ 恽榴红²

(¹首都医科大学生物学与药学院 北京 100054) (²军事医学科学院毒物药物研究所 北京 100850)

摘 要 以甲氨蝶呤(MTX)为模型药物,研究了 PAMAM 与 MTX 的复合及体外释放。¹H-、¹³C-NMR 数据表明 MTX 与 PAMAM 树状大分子形成复合物是由于 MTX 羧基和 PAMAM 树状大分子外端氨基之间的相互作用。该复合物在 pH = 7.4, 10 mmol/L Tris-HCl 中非常稳定,表现出明显的缓释效果。当溶液中的离子强度增加时,会破坏 PAMAM-MTX 复合物的稳定性,缓释作用部分或全部失去,说明 PAMAM 树状大分子与 MTX 之间的相互作用属于静电作用。UV 测得每个 G5.0 PAMAM、G4.0 PAMAM 树状大分子分别能复合 27、14 个 MTX 分子。

关键词 PAMAM 树状大分子, 甲氨蝶呤, 复合, 释放

聚酰胺-胺型(PAMAM)树状大分子是一类球形、高度分枝的纳米级高分子化合物(见示意图1),由于其大小、代数(G)由 Michael 加成和酰胺化反应的重复次数控制,因此具有确定分子量、分子形状和尺寸^[1-3]。PAMAM 树状大分子亦可看作是反相单分子胶束^[4],较高代的 PAMAM 不仅具有能够容纳客体分子的腔,而且含有可结合客体分子或可被进一步修饰的大量端氨基官能团,因此 PAMAM 树状大分子转运客体分子的效率较高。更为重要的是,一般的胶束类载体通常在临界胶束浓度以下会解离成自由链而导致药物的突释,而 PAMAM 单分子胶束本身是共价键结合的,这就避免了转运营体在到达靶点前就崩解的问题。这些特点加上生化惰性、无免疫原性^[5]和商品化等优点使 PAMAM 在药物转运体系应用方面极具潜力^[6]。

抗肿瘤药物在杀伤癌细胞的同时,也杀伤正常细胞。采取少量持续给药方式将有助于降低药物对人体的毒副作用,改善治疗效果。尽管 PAMAM 树状大分子研究小组在药物缓释领域已经取得以下研究进展,Twyman 等^[7,8]用 PAMAM 树状大分子在甲醇溶液复合脂溶性分子苯甲酸,其复合物在 pH = 7.0, 0.1 mol/L PBS 中几周内仍保持稳定;Kolhe 等^[9]发现在 RPMI 1640 的培养基中, G4.0 PAMAM 树状大分子对布洛芬的缓释时间达 9h; Zhuo 等^[10]的研究表明, 5-氟尿嘧啶与环状核的 PAMAM 树状大分子共价结合后在 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲盐水(PBS)中缓释可长达一星期。但氨基端的 PAMAM 树状大分子用作抗癌药

物甲氨蝶呤(MTX)的缓释研究,则少见文献报道。本文研究了 G4.0、G5.0 PAMAM 树状大分子与 PAMAM 的复合和在不同的三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(tris-HCl)缓冲溶液的释放,并探讨了二者复合机理。

1 实验部分

1.1 试剂

G4.0 PAMAM 树状大分子($M_w = 14200$ g/mol, 末端氨基数 64)、G5.0 PAMAM 树状大分子($M_w = 28800$ g/mol, 末端氨基数 128)、SnakeSkin 透析袋(MWCO = 3500 Da)、Supor Acrodisc 13(0.2 μ m)针筒式过滤器均购自 Sigma-Aldrich 公司(美国)。MTX 购自中国药品生物制品检定所。其它试剂均购自北京化学试剂公司,未经纯化处理。

1.2 MTX 最大复合量评估

Shimadzu UV-2201 紫外分光光度计(日本)用来测量 MTX 的浓度。MTX 在 Tris-HCl 缓冲溶液(pH = 7.4, 10 mmol/L)的最大吸收波长(λ_{max})为 302 nm,此波长下的 MTX 标准曲线 $A(\text{吸光度}) = 51.3 c(\text{浓度}) - 0.0165$ 在 0.005 ~ 0.025 mg/mL 浓度范围内呈线性。PAMAM 树状大分子在此波长下没有吸收,与 PAMAM 复合的 MTX 的最大吸收波长没有改变。故所有测量均在 302 nm 进行。

用双蒸馏水配制浓度分别为 5.38 mg/mL、5.77 mg/mL 的 G5.0 PAMAM 树状大分子和 G4.0 PAMAM 树状大分子水溶液,再分别逐渐加入

* 2004-08-03 收稿, 2004-09-13 修稿;北京市科技新星(项目号 954812000)和北京市教委科技发展计划(项目号 00KJ-107)资助项目;

** 通讯联系人, E-mail: yelingw@sina.com

MTX 直至有不溶 MTX 出现.避光搅拌 2 h 后仍有 MTX 沉淀时用针筒式过滤器过滤,取 0.05 mL 滤液,10 mL 容量瓶定容,在 302 nm 处测量 MTX 吸光度并计算其实际浓度,此即为与 PAMAM 复合的最大 MTX 浓度,再根据 PAMAM 树状大分子的浓度则可确定 MTX 复合 G4.0PAMAM 和 G5.0PAMAM 的最大量.

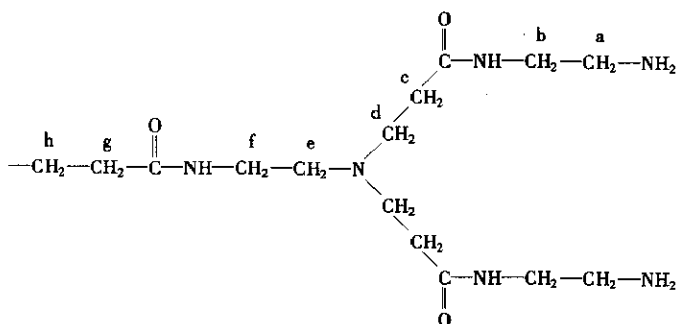
1.3 PAMAM-MTX 复合物的表征

将 1.2 中的部分滤液进行冷冻干燥,得固体 PAMAM-MTX 复合物,并用 ^1H -、 ^{13}C -NMR 对其进行表征.

核磁共振分析在 JNM-ECA-400 (日本)上进行.G5.0 PAMAM 树状大分子的 ^1H -NMR (D_2O , δ) (见图 1), 2.32 ~ 2.45 (br, $\text{H}_c + \text{H}_g$), 2.6 (br, H_e),

2.70 ~ 2.83 (br, $\text{H}_a + \text{H}_b + \text{H}_d$), 3.20 ~ 3.30 (br, $\text{H}_b + \text{H}_f$). G5.0 PAMAM 树状大分子与 MTX 复合物的 ^1H -NMR (D_2O , δ) (见图 2), 2.28 ~ 2.52 (br, $\text{H}_c + \text{H}_g$), 2.57 (br, H_e), 2.68 ~ 2.94 (br, $\text{H}_a + \text{H}_b + \text{H}_d$), 3.01 (s, H_f), 3.18 ~ 3.37 (br, $\text{H}_b + \text{H}_f$), 3.41 (s, H_b). δ 为 3.15 及 4.0 以上的 5 组峰归属为 MTX.

G5.0 PAMAM 树状大分子的碳谱 ^{13}C -NMR (D_2O , δ): 33.19, 37.13, 40.11, 41.34, 49.48, 51.71, 174.76, 175.28; G5.0 PAMAM 树状大分子与 MTX 复合物的碳谱 ^{13}C -NMR (D_2O , δ), 28.88, 32.87, 34.74, 36.93, 39.06, 39.73, 49.23, 49.33, 51.55, 55.14, 56.17, 174.61, 175.47, 179.23, 182.22.



Scheme 1 Outer layer structure of PAMAM dendrimer

1.4 PAMAM-MTX 复合物的体外释放研究

用 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲溶液 (pH = 7.4) 溶解一定量的 PAMAM-MTX 复合物,溶解后迅速取 2 mL 转移至透析袋中,再将透析袋放入含 40 mL 同一 tris-HCl 缓冲溶液 (外相) 的具塞广口瓶中.释放实验在 TH2-C 恒温旋转式振荡器 (江苏太仓,中国) 中进行.气浴温度为 37℃,振荡频率为 100r/min.在一定的时间间隔对外相取样,用 UV-Vis 在 302 nm 处测 MTX 的吸光度并计算 MTX 释放百分率.G5.0-PAMAM-MTX 复合物在 100 mmol/L tris-HCl、含 0.2 mol/L NaCl 的 10 mmol/L tris-HCl、含 0.02 mol/L NaCl 的 10 mmol/L tris-HCl 以及 G4.0-PAMAM-MTX 在 10 mmol/L tris-HCl 复合物缓冲溶液中的释放及游离 MTX 释放对照实验均按照此法进行.

2 结果和讨论

2.1 PAMAM 树状大分子对 MTX 的最大复合量评估

MTX 几乎不溶于水,故可忽略其在水中的溶

解度,因此,UV 测得的 MTX 可近似认为是那些仅与 PAMAM 树状大分子复合的 MTX.用 UV-Vis 测定实验部分 1.2 所述的滤液 (浓度分别为 5.38 mg/mL 的 G5.0 PAMAM 树状大分子和 5.77 mg/mL G4.0 PAMAM 树状大分子水溶液中溶有最大量的 MTX 时),得到 MTX 的吸光度 (A) 分别为 0.567 或 0.643.由 MTX 的标准曲线计算得到其在对应的 PAMAM 溶液中溶解度分别为 2.26 mg/mL 或 2.57 mg/mL.据此计算得每个 G5.0 PAMAM 树状大分子能复合 27 个 MTX 分子,而 G4.0 PAMAM 树状大分子能复合 14 个 MTX 分子.随着 PAMAM 代数的增加,所复合的 MTX 量也随之增加,这显然是由于高代 PAMAM 树状大分子拥有更多数量的端氨基官能团.

2.2 G5.0 PAMAM 与 MTX 复合机理初步探讨

PAMAM 树状大分子与脂溶性弱酸性药物之间的复合机理已有一些研究报道.Kojima^[11] 用 PEG 链修饰了 G4.0-PAMAM 树状大分子的末端氨基后可包裹 26 个 MTX,由于末端氨基全部被 PEG

化,因此他认为包裹是内部的三级氨基与 MTX 的羧基静电作用造成的.而 Kolhe^[9]发现 G4.0PAMAM 树状大分子对布洛芬既能外表面复合,又能内部包裹.复合的原因是静电作用,但对包裹没有给出解释. Kleinman^[12]用荧光研究 PAMAM 树状大分子与 2-萘酚相互作用时则发现,当 pH 在 6~9 范围时, PAMAM 树状大分子外端氨基可全部质子化,而内部氨基均未质子化.这表明,羧酸类化合物只能与外表面的端氨基复合.由于本研究中 PAMAM 对 MTX 的复合和释放均在 pH 为 7.4 条件下进行,羧基在该 pH 值范围内呈负离子,故理论上 PAMAM 树状大分子与 MTX 的复合应主要源于端氨基正离子而不是

内部氨基与 MTX 负离子之间的静电作用.为了确认与 MTX 作用的到底是 PAMAM 内部三级氨基还是表面一级氨基,我们首先研究了 G5.0 PAMAM 树状大分子 ¹H-NMR (见图 1) 和 G5.0 PAMAM-MTX 复合物的 ¹H-NMR (见图 2).

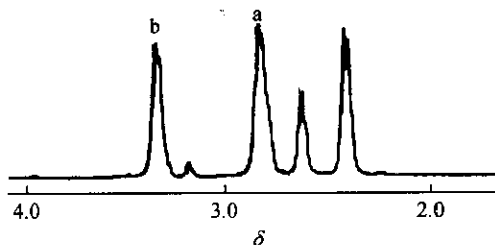


Fig. 1 ¹H-NMR spectrum of G5.0-PAMAM dendrimer

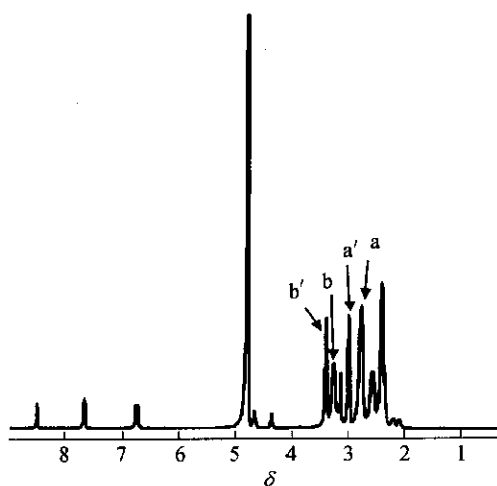


Fig. 2 ¹H-NMR spectrum of G5.0-PAMAM-MTX complex

在图 1 的 ¹H-NMR 谱图的高场中, PAMAM 树状大分子有 4 组峰, 而图 2 的 G5.0 PAMAM-MTX 复合物的 ¹H-NMR 谱图, PAMAM 树状大分子在高场的峰增加到 6 组, 这是由于 MTX 羧基负离子与

G5.0 PAMAM 树状大分子的部分氨基正离子之间发生了静电作用, 并且这种静电作用使与氨基相近的质子移向低场, 从两个新峰的位移值大小和 a、b 峰面积的减少推断是 a 和 b 质子发生了位移, 位移 3.01 和 3.41 分属新峰 a'、b'. 初步推断该作用是 MTX 的羧基负离子和树状大分子外表面的氨基正离子之间的相互作用导致的.

在 ¹H-NMR 的基础上, 我们又研究了 G5.0-PAMAM 树状大分子和 G5.0-PAMAM-MTX 复合物的 ¹³C-NMR. 与 G5.0-PAMAM 树状大分子 ¹³C-NMR 相比, PAMAM-MTX 复合物的 a 碳发生了相对明显的位移, 而其它碳原子的位移几乎不变, 证实了树状大分子的端氨基正离子与 MTX 的羧基负离子发生了静电作用. ¹³C-NMR 没有表明 MTX 包裹在树状大分子的内部, 可能是由于 MTX 与 G5.0-PAMAM 树状大分子三级氨基的作用很弱或 MTX 分子较大, 不容易滞留在树状大分子内部, 而 Kojima^[11]能将 MTX 包裹在修饰的树状大分子内部, 可能是端基的 PEG 长链增加了内腔的体积, 增加了 MTX 的停留能力.

2.3 PAMAM-MTX 复合物的体外释放研究

图 3 是 G4.0 PAMAM-MTX 复合物、G5.0 PAMAM-MTX 复合物中 MTX 及纯 MTX 在 10 mmol/L tris-HCl 缓冲溶液中的释放曲线. 图 4 是 G5.0 PAMAM-MTX 复合物在不同浓度 tris-HCl 缓冲溶液中的释放曲线. 图 5 是 G5.0 PAMAM-MTX 在含有不同 NaCl 浓度的 tris-HCl 缓冲溶液中的释放曲线.

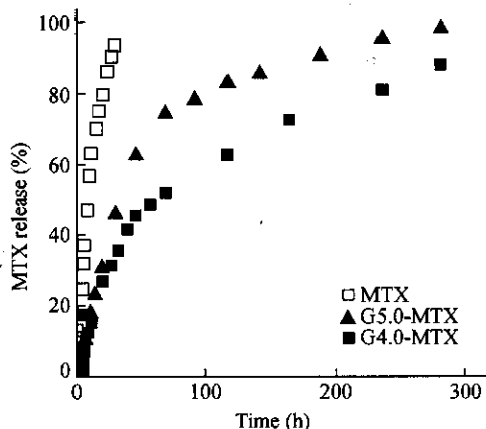


Fig. 3 Release profile of G4.0-PAMAM-MTX, G5.0-PAMAM-MTX and MTX in 10 mmol/L tris-HCl buffer (pH = 7.4)

从图 3 看出, 纯 MTX 释放 80% 需 20 h, G4.0-PAMAM-MTX 复合物中 MTX 释放同样百分数则需

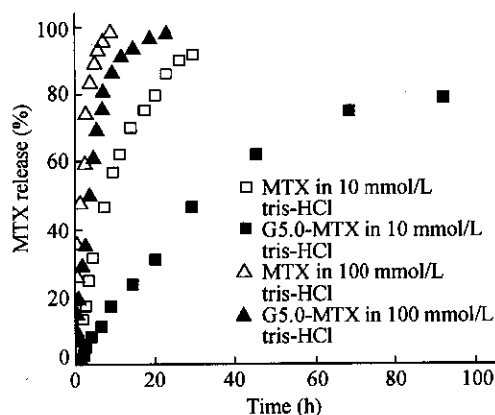


Fig. 4 Release profile of G5.0-PAMAM-MTX and MTX in 10 mmol/L, 100 mmol/L tris-HCl buffer (pH = 7.4)

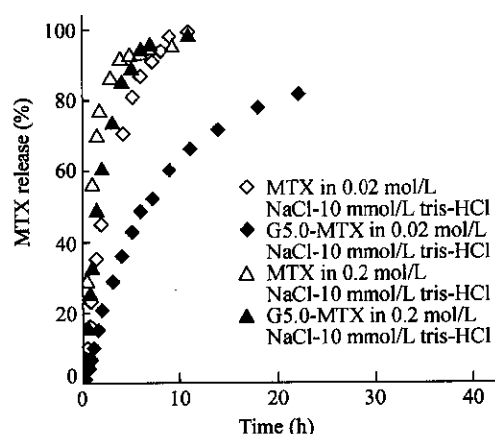


Fig. 5 Release profile of G5.0-PAMAM-MTX and MTX in 10 mmol/L tris-HCl buffer with 0.02 mol/L, 0.2 mol/L NaCl (pH = 7.4)

200 h, G5.0 PAMAM-MTX 复合物需 100 h, 说明 PAMAM 树状大分子与 MTX 之间存在相互作用, 因而使 MTX 的释放速率明显减缓. 从该图还可以看到, G4.0 PAMAM-MTX 和 G5.0 PAMAM-MTX 复合物中释放的 MTX 量不同. PAMAM 树状大分子代数越高, 释放的 MTX 量也越大, Zhuo 等^[10]对 5-Fu 的释放研究也得到类似的结论, 这可能是高代

PAMAM 能够结合更多的 MTX 的缘故.

PAMAM-MTX 复合物的稳定性通过在不同浓度的 tris-HCl 缓冲溶液和不同浓度 NaCl 的 10 mmol/L tris-HCl 缓冲溶液中的体外释放研究确定. 从图 4 可以看出, 外相 tris-HCl 缓冲液浓度增加时, 复合物中 MTX 的释放速率发生了明显变化. tris-HCl 缓冲溶液浓度从 10 mmol/L 增加至 100 mmol/L, 以 MTX 释放 80% 为比较标准, 释放时间从 90 h 缩短至 7 h, 增加离子强度破坏了 PAMAM-MTX 复合物的稳定性, 加快了 MTX 从复合物中的释放. 为了进一步探讨离子强度对 PAMAM-MTX 复合物稳定性的影响, 我们在 10 mmol/L tris-HCl 缓冲溶液中加入不同浓度的强电解质 NaCl, 由图 5 可以看出, 当 NaCl 浓度从 0.02 mol/L 增至 0.2 mol/L 时, MTX 释放 80% 的时间从 19 h 缩短至 4 h, 表明 PAMAM-MTX 复合物在离子强度增加到一定程度时, 缓释现象几乎完全消失, 这证明端氨基正离子与 MTX 羧基负离子之间的相互作用属于静电作用.

综上所述, PAMAM 树状大分子与 MTX 能形成复合物. 每个 G5.0 PAMAM、G4.0 PAMAM 树状大分子分别能复合 27、14 个 MTX 分子. ¹H-, ¹³C-NMR 表明 MTX 的羧基主要与 PAMAM 树状大分子的表面氨基而非内部氨基发生相互作用而形成 PAMAM-MTX 复合物. 该复合物在 pH = 7.4、10 mmol/L tris-HCl 中相当稳定, 其释放明显慢于对照组的纯 MTX 的释放. 但随着缓冲溶液或盐的浓度增加, 缓释作用减缓. 当盐浓度增加到一定值, 缓释作用消失, 说明 PAMAM 树状大分子端氨基阳离子与 MTX 羧基阴离子之间的作用属于静电作用, 这种静电作用导致 PAMAM 树状大分子对 MTX 的缓释.

REFERENCES

- Tomalia D A, Baker H, Dewald J, Hall M, Kallos G, Martin S, Roeck J, Ryder J, Smith P. *Polym J*, 1985, 17: 117 ~ 132
- Esfand R, Tomalia D A. *Drug Discov Today*, 2001, 6: 427 ~ 436
- Wang Bingbing (王冰冰), Luo Yufei (罗宇飞), Jia Xinru (贾欣茹). *Acta Polymerica Sinica (高分子学报)*, 2004, (2): 304 ~ 308
- Patri A K, Majoros I J, Baker J R. *Curr Opin Chem Bio*, 2002, 6: 466 ~ 471
- Roberts J C, Bhalgat M K, Zera R T. *J Biomed Mater Res*, 1996, 30: 53 ~ 65
- Stiriba S, Frey H, Haag R. *Angew Chem Int Ed*, 2002, 41: 1329 ~ 1334
- Twyman L J, Beezer A E, Esfand R, Hardy M J, Mitchell J C. *Tetrahedron Lett*, 1999, 40: 1743 ~ 1746
- Beezer A E, King A S H, Martin I K, Mitchell J C, Twyman L J, Wain C F. *Tetrahedron*, 2003, 59: 3873 ~ 3880
- Kolhe P, Misra E, Kannana R M. *Int J Pharm*, 2003, 259: 143 ~ 160

- 10 Zhuo R X, Du B, Lu Z R. *J Controlled Release*, 1999, 57: 279 ~ 257
11 Kojima C, Kono K. *Bioconj Chem*, 2000, 11: 910 ~ 917
12 Kleinman M H, Flory J H, Tomalia D A. *J Phys Chem B*, 2000, 104: 11472 ~ 11479

INVESTIGATION OF PAMAM DENDRIMER-MTX COMPLEX: FORMATION AND *in vitro* RELEASE

YE Ling¹, YANG Hua¹, HE Manlin¹, TANG Yajuan¹, CHEN Shuangling¹, YUAN Yang¹, YUN Liuhong²

(¹ Capital University of Medical Sciences, Beijing 100054) (² Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850)

Abstract The mechanism of formation of polyamidoamine (PAMAM) dendrimer-methotrexate (MTX) complex and the release behaviors of MTX from the complex have been investigated. ¹H-, ¹³C-NMR data confirmed that the formation of PAMAM-MTX complex was due to the interaction between PAMAM external amino groups and the MTX carboxyl groups. The PAMAM-MTX complex was stable in 10 mmol/L, pH 7.4 tris-HCl buffer solution. However, with increasing the ionic strength in the buffer solution, it was easier for MTX to escape from the complex, which suggested that the interaction between PAMAM and MTX was electrostatic in nature. UV results demonstrated that the higher the generation of PAMAM, the greater its capacity to carry MTX molecules, *e. g.* G.5.0 PAMAM and G4.0 PAMAM could load 27 and 14 MTX molecules, respectively.

Key words PAMAM dendrimer, Methotrexate (MTX), Complex, Release