

结肠靶向偶氮高分子的合成及其体外降解性能*

赖俊英^{1,3} 李文静² 王红军¹ 涂克华¹ 王利群^{1**}

(¹浙江大学高分子科学研究所 杭州 310027) (²浙江大学宁波理工学院 宁波 315100)

(³浙江大学建筑工程学院 杭州 310027)

摘 要 以二环己基碳酰亚胺/*N,N*-二甲基氨基吡啶为偶联剂,将结肠前体药物 5,5'-偶氮二水杨酸(奥沙拉秦)与生物相容的聚乙二醇缩聚,制备得到主链含偶氮键的聚乙二醇-奥沙拉秦(PEO-OLZ)缩聚物.研究表明,改变聚乙二醇链段的分子量,可以方便地调节偶氮缩聚合物的亲水性和生物降解性能.在动物盲肠液中所含的偶氮还原酶的作用下,PEO-OLZ 缩聚物的偶氮键发生特异性降解,同时通过酯键的水解,释放出抗结肠炎药物 5-氨基水杨酸.该类新型偶氮缩聚物可以作为结肠靶向聚合物前体药,亦可用作结肠定位控释的高分子载体.

关键词 奥沙拉秦,偶氮高分子,聚乙二醇,结肠靶向释放

近 20 年来,结肠靶向药物控释系统所具有的优势和应用前景,使该方向的研究成为药物化学和药剂学领域中的热点^[1,2].磺胺吡啶在大肠内微生物的作用下,分解出 5-氨基水杨酸(5-ASA)活性药物的发现,引发了利用偶氮高分子化合物作为结肠定位药物传输系统的研究^[3~5].迄今为止的研究表明,偶氮高分子的疏水性和降解产物的毒性是该类具有结肠定位释放性能的高分子载体系统得以应用的最大障碍^[6~8].因此,增大聚合物的亲水性以及降低降解产物的毒性是结肠靶向药物控释载体的研究方向之一.

本文将具有抗结肠炎功能的小分子药物 5-氨基水杨酸的前体药 5,5'-偶氮二水杨酸(奥沙拉秦,olsalazine,OLZ)与具有优异生物相容性的聚乙二醇缩聚,合成了一种主链上含偶氮键的新型结肠靶向高分子化合物.该缩聚物在结肠部位偶氮还原酶的特异作用下,通过偶氮键断裂还原成氨基.同时通过酯键的水解,定位释放出安全有效的 5-ASA 药物.所制备的 PEO-OLZ 缩聚物既可以作为高分子前体药,也可以用于原型药物的结肠定位控释的载体.

1 实验部分

1.1 主要原料

5,5'-偶氮二水杨酸钠(OLZ- Na_2),金华众益药业有限公司,使用前用盐酸酸化成为 OLZ.聚乙二醇

(PEO, $M_w = 400, 1000, 4000$ 和 1×10^4)、丁二酸酐、 α -D-葡萄糖、二环己基碳酰亚胺(DCC)和 *N,N'*-二甲基氨基吡啶(DMAP),Acros (Geel, Belgium) 公司.苄基紫精(BV),Aldrich 公司. PEO 和乙二醇使用前充分干燥. DCC 使用前减压蒸馏(bp 130℃/0.399 kPa). DMAP 用乙酸乙酯重结晶,干燥冷藏.丁二酸酐用乙酸酐重结晶.四氢呋喃(THF),浙江杭州双林化学试剂公司,分析纯,用钾回流除水,蒸馏后使用.三乙胺(TEA),中国医药集团化学试剂公司,分析纯,用 0.4 nm 分子筛干燥.其余试剂均为分析纯,直接使用.

1.2 PEO-OLZ 缩聚物的合成

1.2.1 5,5'-偶氮二水杨酸乙二酯(I)的合成

根据文献[9],[10],[11],用 DCC/DMAP 体系进行缩合酯化反应.将奥沙拉秦(0.60 g, 2 mmol)和过量乙二醇溶解在 40 mL 无水 THF 中,依次加入 DMAP(0.07 g, 0.6 mmol)及 DCC(1.03 g, 5 mmol),通干燥氮气 0.5 h 后,无水条件下,室温反应 24 h.反应结束后,过滤除去固体二环己基脲(DCU).滤液用甲苯沉淀,过滤,烘干.

1.2.2 二丁二酸聚乙二醇酯(II)的合成 据 Zalipsky 等^[12]及 Bea 等^[13]的方法,合成了二丁二酸聚乙二醇酯.将干燥的聚乙二醇($M_w = 1000$, 10.00 g, 10 mmol)溶解在 50 mL 无水 THF 中,加入丁二酸酐(2.50 g, 25 mmol)、DMAP(2.44 g, 20 mmol)、及三乙胺(20 mmol).在无水条件下室温搅

拌 24 h 后,将 THF 旋转蒸发,固体用四氯化碳溶解,除去过量的丁二酸酐.滤液用 4℃ 冷乙醚沉淀.过滤,干燥.依此方法合成了不同分子量的二丁二酸聚乙二醇酯($M_w = 400, 4000, 1 \times 10^4$).

1.2.3 PEO-OLZ 偶氮缩聚物(Ⅲ)的合成 将 1 mmol 的 I (0.338 g) 与等摩尔的 II ($M_w = 1322$, 1.322 g) 溶解在新蒸馏的 THF 中,加入 DMAP (0.024 g, 0.2 mmol). 搅拌下滴加溶解于 THF 的 DCC (0.453 g, 2.2 mmol). 无水条件下室温搅拌反应 3 天.反应结束后过滤除去 DCU,滤液用 4℃ 冷乙醚沉淀,过滤,干燥.

1.3 偶氮缩聚物亲水性的测定

将 PEO-OLZ 缩聚物的四氢呋喃溶液倒于聚四氟乙烯板上,室温下干燥成膜.待膜在略高于室温下完全烘燥后,放置于恒温恒湿箱中(37℃,相对湿度 82%).恒重后取出称重,计算聚合物的吸水率.公式为 $(W_s - W_d)/W_d$,其中 W_s 和 W_d 分别为吸湿后和干燥膜的重量.另外将制好的干燥的膜置于蒸馏水中,设定时间内取出、烘干、称重,计算膜在水中的溶失度.

1.4 偶氮缩聚物的体外降解

大鼠盲肠内容物中全细胞偶氮还原酶提取物的分离是根据文献[1],[4],[5]的方法,提取大鼠盲肠液中的偶氮还原酶.5 只 Sprague-Dawley 雄性大鼠(200 ~ 250 g)用过量乙醚处死,在无氧条件下,取出盲肠内容物悬浮于 0.1 mol/L 的 pH = 6.8 的磷酸缓冲溶液中(1.0 g/25 mL(内容物/缓冲液)),剧烈振荡.过滤,滤液分装于 1.0 mL 的离心管中,于 -26℃ 下保存.

体外酶解实验是取出冷冻的酶液解冻,加入 α -D-葡萄糖,在 37℃ 的无氧条件下培养.14 h 后,加入偶氮缩聚物溶液及苜蓿紫精继续培养.酶解实验的溶液中各物质的浓度分别为全细胞酶液浓度为 0.025 g/mL,偶氮浓度为 0.1 mmol/L,苜蓿紫精为 6.25×10^{-5} mol/L, α -D-葡萄糖为 1.25 mg/mL.在培养特定时间后取出酶液,高速离心,用紫外光谱仪检测其中偶氮含量的变化,用高效液相色谱仪检测降解产物和 5-氨基水杨酸的释放.

1.5 仪器测试

红外(IR)光谱用傅立叶红外仪(BRUKER VECTOR 22)测定.核磁(NMR)用 AVANCE DMX 500 WB(500 MHz,TMS 为内标)测定.聚合物的热性能由 Pyris1 型的 DSC 表征,升温速度为 10

K/min,样品量约 10 mg.聚合物的分子量及分子量分布用凝胶渗透色谱(GPC)(WATERS-2410,THF 为流动相,聚苯乙烯作为标准物)测定.偶氮含量的变化用紫外光谱仪(Carry 100Bio)测定.降解产物由高效液相色谱测定.色谱仪为日本 LC-10AD 高效液相色谱系统,双泵,SDP-10AVP 紫外检测器,N2000 色谱数据处理软件.色谱柱为 Diamonsil™ C₁₈(250 mm × 4.6 mm,5 μ m),柱温为室温,进样量为 20 μ L.

2 结果与讨论

2.1 PEO-OLZ 缩聚物的合成及表征

按示意式 1 所示路线,合成了 PEO-OLZ 缩聚物.改变 PEO 的分子量可得到一系列不同结构与性能的 PEO-OLZ 缩聚物.表 1 列出了该系列偶氮缩聚物分子量的参数.图 1 为不同分子量的 PEO 和 PEO-OLZ 缩聚物在 GPC 中的保留时间图.分子量分布的数值显示出典型的缩聚反应特征.

Table 1 Molecular weight of the resulted PEO-OLZ condensation polymers^a

Azo polymer	$M_n (\times 10^3)$	$M_w (\times 10^3)$	PDI ^b	DP ^c
PEO ₄₀₀ -OLZ	5.1	7.3	1.43	12.0
PEO ₁₀₀₀ -OLZ	9.9	20.5	2.08	9.0
PEO ₄₀₀₀ -OLZ	23.1	33.6	1.46	6.0
PEO ₁₀₀₀₀ -OLZ	46.8	61.8	1.32	4.5

^a Determined by GPC using polystyrene as standard and THF as eluent ;
^b Polydispersity index determined by GPC ; The degree of polymerization

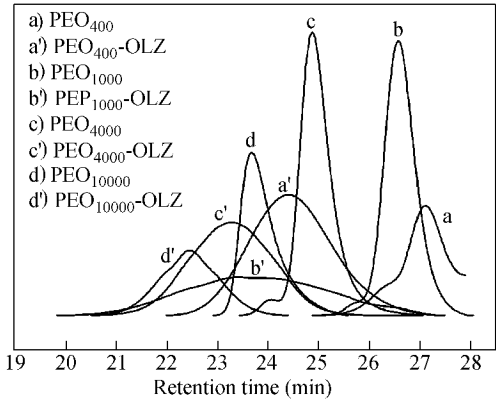


Fig. 1 The retention time of dicarboxylated PEO and PEO-OLZ condensation polymers determined by GPC using polystyrene as standard and THF as eluent

图 2 为 5,5'-偶氮二水杨酸乙二酯(Ⅰ)、二丁二酸聚乙二醇酯(Ⅱ)和 PEO-OLZ 偶氮缩聚物(Ⅲ)的红外光谱.在Ⅰ中,由于酯基与邻位酚羟基的分子内氢键作用,其红外谱图中的酯基特征吸

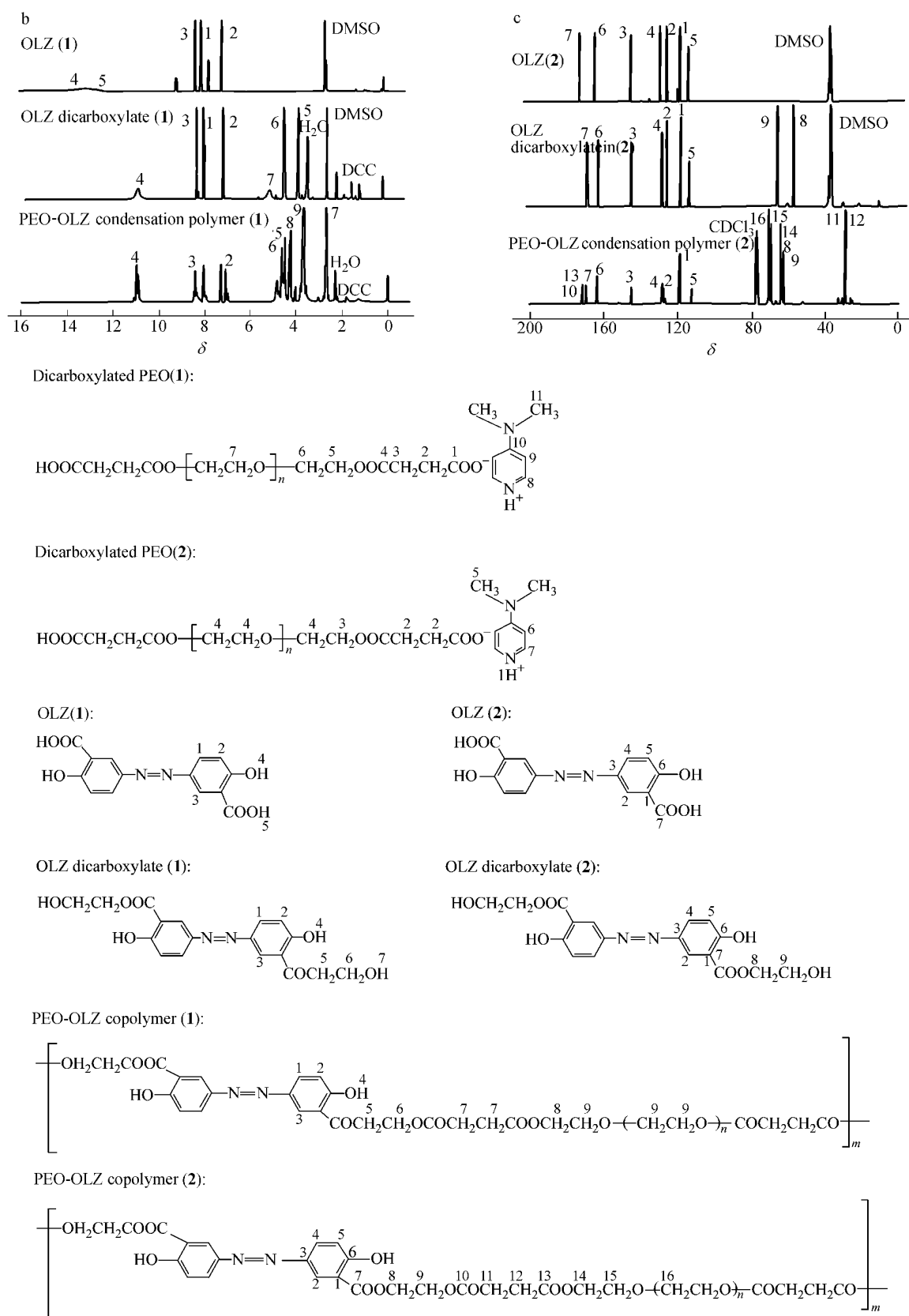


Fig. 3 NMR spectra of dicarboxylated PEO, OLZ, OLZ dicarboxylate and OLZ-PEO condensation polymer

a) ¹H-NMR and ¹³C-NMR spectra of dicarboxylated PEO in CDCl₃; b) ¹H-NMR spectra of OLZ, OLZ dicarboxylate in d₆-DMSO and PEO-OLZ condensation polymer in CDCl₃; c) ¹³C-MR spectra of OLZ, OLZ dicarboxylate in d₆-DMSO and PEO-OLZ condensation copolymer in CDCl₃

2.2 PEO-OLZ 偶氮缩聚物的热性能和亲水性

DSC 的结果(图 4)表明,缩聚物中 PEO 链段仍能够进行有效排列,形成结晶相,但是其熔融温度明显地低于相对应的 PEO 均聚物.本文的 PEO-OLZ 缩聚物具有良好的溶解性能,易溶于如氯仿、四氢呋喃、二甲亚砆等有机溶剂中.因此,室温左右的熔融性和良好的溶剂溶解性能,为 PEO-OLZ 缩聚物在生物材料领域的应用提供了极大的便利.

用于药物控释的偶氮类高分子的亲水性对其生物降解和药物释放性能起着至关重要的作用^[7,14].在同类高聚物中,亲水性强的高聚物在水中的溶解度大,导致其降解速度变快,药物释放的速度也加快.图 5 是 4 种含不同分子量 PEO 的缩聚物于 37℃ 时,在水中的溶解失重性能(溶失性).从图中可看出,缩聚物在水中的溶解性(亦即其亲水性)随着 PEO 分子量的增大而增大.这显然与 PEO 分子量增大时,缩聚物重复单元中亲水的 EO 链段的比例增加有关.因此,PEO-OLZ 缩聚物亲水性可以方便地通过结合的 PEO 链段的分子量加以调控.

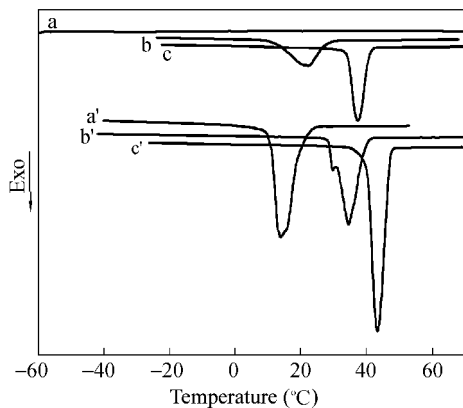


Fig. 4 DSC thermograms of PEO and PEO-OLZ condensation polymers

a) PEO₁₀₀₀-OLZ; a') PEO₁₀₀₀; b) PEO₄₀₀₀-OLZ; b') PEO₄₀₀₀; c) PEO₁₀₀₀₀-OLZ; c') PEO₁₀₀₀₀

2.3 PEO-OLZ 缩聚物的体外生物降解性能

由于偶氮键可以被仅存在于结肠部位的偶氮还原酶特异性降解,因此,偶氮高分子化合物成为结肠定位药物传输中一个重要的系统.本文比较了 PEO₄₀₀₀-OLZ、PEO₁₀₀₀₀-OLZ 缩聚物和 OLZ 原料药在含大鼠盲肠内容物提取液中的体外生物降解性能.图 6 中(a)~(c)分别为 OLZ 与缩聚物在预培养 14 h 的酶液及加入苜蓿紫精的降解曲线;

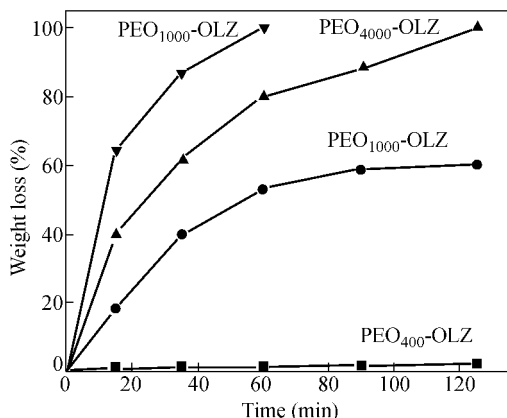


Fig. 5 The weight loss of PEO-OLZ condensation polymers in water at 37℃

(d)~(f)为 OLZ 与缩聚物在未经培养的酶液及加入苜蓿紫精的降解曲线;(g)~(i)为未加酶液或未加苜蓿紫精的降解曲线.由图可见,酶液未培养时,偶氮化合物的降解速度在 13 h 左右开始变快,而在此之前几乎没有降解.对未加酶液或未加苜蓿紫精的体系,偶氮含量没有减少或减少很小,表明在未加酶液下,单独的苜蓿紫精对偶氮键无还原作用.未加苜蓿紫精的酶液的降解速率也很低.即使培养 25 h,其中偶氮键的含量也仅降低 20% 左右,说明在偶氮还原酶降解体系中,苜蓿紫精起着电子转移剂的作用,可加快偶氮键的还原

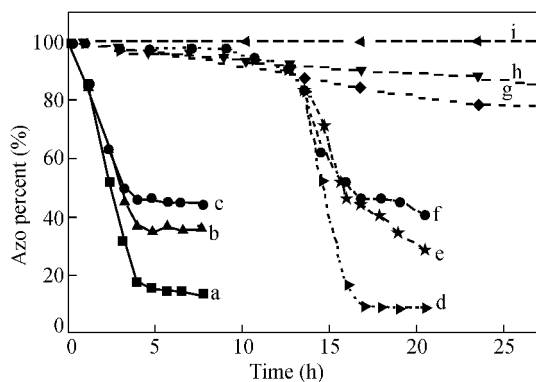


Fig. 6 Diminishing of azo bonds in OLZ and the condensation polymers in rat cecum contents (whole cell) in the present of benzyl viologen and α -D-glucose

Biodegradation with rat cecum contents (14 h preincubation) and with BV: (a) OLZ, (b) PEO₁₀₀₀-OLZ and (c) PEO₄₀₀₀-OLZ; with rat cecum contents (without preincubation) and BV: (d) OLZ, (e) PEO₁₀₀₀-OLZ and (f) PEO₄₀₀₀-OLZ; with rat cecum contents (14 h preincubation) and without BV: (g) PEO₁₀₀₀-OLZ, (h) PEO₄₀₀₀-OLZ and (i) biodegradation of OLZ with BV and without rat cecum contents (control)

降解反应

由图 6 的结果还可见,尽管缩聚物的偶氮还原率低于 OLZ,但是亲水性大的 PEO_{10000} -OLZ 的降解速度明显地高于亲水性较低的 PEO_{4000} -OLZ 缩聚物.因此,可以通过改变 PEO 链段的分子量,调控 PEO-OLZ 偶氮缩聚物的生物降解性能.

图 7 为 5-ASA 和体外降解液各物质在 HPLC 中的保留时间图.其中流动相为乙腈-0.1 mol/L 乙酸缓冲溶液(乙酸溶液用 0.4% 三乙胺调节 pH 至 4.3),体积比为 8:92,流速为 1.0 mL/min 时,5-ASA 的保留时间为 4.07 min.结果表明,在无氧条件下,OLZ 在大鼠盲肠内容物提取液中的偶氮还原酶作用下,最终释放出 5-ASA 药物.因此,PEO-OLZ 缩聚物中的偶氮键在偶氮还原酶作用下被还原成氨基,同时,聚合物中的酯键在酶液中水解,在这两个降解过程的共同作用下,PEO-OLZ 偶氮缩聚物被特异地降解,释放出 5-ASA.因此,

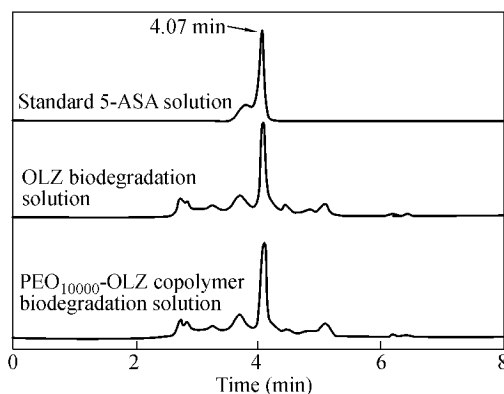


Fig. 7 HPLC elution of the biodegraded products of OLZ and PEO-OLZ condensation polymer

PEO-OLZ 缩聚物可作为 5-ASA 的高分子前体药.同时,由于 PEO-OLZ 缩聚物具有良好的成膜性能,它还可以作为其它药物的结肠靶向控释的载体.

REFERENCES

- 1 Brown J P, McGarraugh G V, Parkinson T M, Wingard J R E, Onderdonk A B. *J Med Chem*, 1983, 26: 1300 ~ 1307
- 2 Saffran M, Kumar G S, Savariar C, Burnham J C, Williams F, Neckers D C. *Science*, 1986, 23: 1081 ~ 1084
- 3 Mooter G V D, Maris B, Samyn C. *J Pharm Sci*, 1997, 86: 1321 ~ 1327
- 4 Kopeček P, Kopeček J. *Makromol Chem*, 1990, 191: 2037 ~ 2045
- 5 Kopeček P, Rath R, Takada S, Rihova B, Berenson M M, Kopeček J. *J Control Release*, 1994, 28: 211 ~ 222
- 6 Kimura Y, Kumagai Y, Yamane H, Kitao T. *Polymer*, 1992, 33(24): 5294 ~ 5299
- 7 Yamaoka T, Makita Y, Sasatani H, Kim S I, Kimura Y. *J Control Release*, 2000, 66: 187 ~ 197
- 8 Samyn C, Kalala W, Mooter G V D, Kinget R. *Int J Pharm*, 1995, 121: 211 ~ 216
- 9 Kurzer F, Douraghi-Zadeh K. *Chem Rev*, 1967, 67(2): 107 ~ 152
- 10 Joo S H, Yun Y K, Jin J I, Kim D C, Zin W C. *Macromolecules*, 2000, 33: 6704 ~ 6712
- 11 Banerjee A, Grever C, Ramakrishnan L, Jager J, Gameiro A, Breiting H-G A, Gee K R, Carpenter B K, Hess G P. *J Org Chem*, 2003, 68(22): 8363 ~ 8367
- 12 Zalipsky S, Gilon C, Zilkha A. *Eur Polym J*, 1983, 19: 1177 ~ 1183
- 13 Bea Y H, Huh K M, Kim Y, Park K H. *J Control Release*, 2000, 64: 3 ~ 13
- 14 Mooter G V D, Samyn C, Kinget R. *Pharm Res*, 1995, 12: 244 ~ 247

SYNTHESIS AND IN VITRO BIODEGRADATION OF AZO POLYMER FOR COLON-SPECIFIC DRUG DELIVERY

LAI Junying^{1,3}, LI Wenjing², WANG Hongjun¹, TU Kehua¹, WANG Liquan¹

(¹ Institute of Polymer Science, Zhejiang University, Hangzhou 310027)(² Ningbo Institute of Technology, Zhejiang University, Ningbo 315100)

(³ College of Civil Engineering & Architecture, Zhejiang University, Hangzhou 310027)

Abstract By ester coupling reaction with dicyclohexyl carbodiimide/*N,N'*-dimethyl amino pyridine as the active carboxyl group reagents, a linear azo polymer was constructed. It combines the unique biocompatibility and hydrophilicity of PEO with the biodegradability and low toxicity of 5,5'-azodisalicylic acid (Olsalazine, OLZ) used in the management of ulcerative colitis. The resultant condensation polymers were characterized by FTIR, NMR, GPC and DSC methods. It was found that changing the molecular weight of PEO blocks affected the loading ratio of OLZ and resulted in significant differences in the hydration and degradability of the condensation polymers. The therapeutically active mesalamine (5-aminosalicylic acid, 5-ASA) was released from the aqueous PEO-OLZ condensation polymer solution with cecum contents through azo-reduction and hydrolysis. The resultant azo-containing condensation polymer with azo bonds in the main chain can either be used as a polymeric prodrug for 5-ASA or as a colon specific drug delivery carrier for other bioactive substances.

Key words Olsalazine, Azo polymers, Poly(ethylene oxide), Colon-specific release