

## 聚磷酸酯型脂质体膜材的合成\*

刘振华 曾春龙 范昌烈 卓仁禧

(武汉大学化学系 武汉 430072)

**摘要** 以 P,P-二氯磷酸 β-溴乙酯和 α-硬脂酸单甘油酯为单体,通过缩聚反应合成 聚磷酸酯,再经季铵化制备了四种新的聚磷酸酯型脂质体膜材。用逆相蒸发法制备了脂质体,并以5-氟尿嘧啶为模型药物进行包封,测定了包封率和体外释放性能。

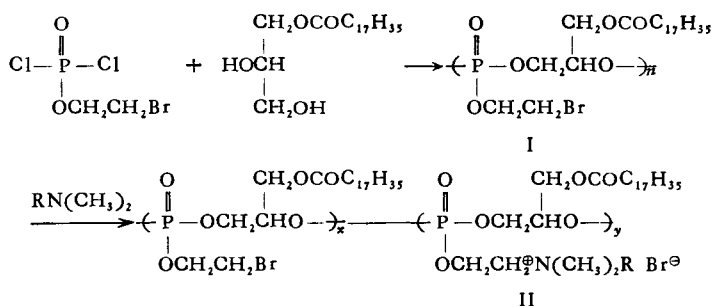
**关键词** 聚磷酸酯,脂质体,药物缓释

脂质体作为包封药物载体具有靶向控释的特点,在药物传递系统中受到了广泛的重视。然而,目前大多应用的脂质体是用天然磷脂来制备的,由于它寿命短、稳定性差,使其应用效果与范围都受到了限制<sup>[1,2]</sup>。

采用高分子膜材来制备脂质体是提高脂质体稳定性的途径之一<sup>[3,4]</sup>。近年来,高分子脂质体的研究已有许多报道<sup>[5,6]</sup>。其合成方法主要是将可聚合的官能团引入到类脂分子中,先制备成脂质体,然后在脂质体膜中使类脂分子聚合。

考虑到聚磷酸酯既有良好的生物相容性和生物可降解性,又可增强载药脂质体与细胞的亲合,提高药物靶向功能的特点,作者以 P,P-二氯磷酸 β-溴乙酯和 α-单硬脂酸甘油酯为单体,通过缩合聚合反应制备聚磷酸酯,再经季铵化反应直接获得磷脂酰胆碱型脂质体膜材。研究了用它们来制备脂质体的特点,并以 5-氟尿嘧啶 (5-Fu) 为模型药物进行包封,测定了载药脂质体的包封率和体外释放性能。

其合成路线如下所示:



II<sub>a</sub> R = CH<sub>3</sub>, II<sub>b</sub> R = n-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>, II<sub>c</sub> R = n-C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>, II<sub>d</sub> R = n-C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>

## 1 实验部分

### 1.1 原料和试剂

α-单硬脂酸甘油酯,用前重结晶, m.p.63—64℃。三氯氧磷,用前蒸馏, b. p.105—

\* 1995-03-10 收稿;国家自然科学基金资助项目

107℃. 苯, 用前金属钠丝干燥.  $\beta$ -溴乙醇、三甲胺、烷基胺等, 市售化学纯, 用前未作处理.

## 1.2 单体和叔胺的合成

1.2.1 P, P-二氯磷酸  $\beta$ -溴乙酯的合成 按文献[7]合成, b.p. 92—93℃/666.5Pa (文献值 92—93℃/666.5Pa)

1.2.2 二甲基烷基胺  $[\text{RN}(\text{CH}_3)_2]$  的合成 按文献[8]合成

$\text{R} = n\text{-C}_4\text{H}_9$ , b.p. 93—94℃ (文献值<sup>[9]</sup> 93—94℃);

$\text{R} = n\text{-C}_8\text{H}_{17}$ , b.p. 79—80℃/2132.8Pa (文献值 193℃/101033.4Pa);

$\text{R} = n\text{-C}_{12}\text{H}_{25}$ , b.p. 132—133℃/1066.4Pa (文献值 132—133℃/1066.4Pa)

## 1.3 脂质体膜材的合成

1.3.1 聚磷酸酯 (I) 的合成 混合 7.52g (0.021mol)  $\alpha$ -单硬脂酸甘油酸, 6.5ml 三乙胺, 0.2g 4-(N, N-二甲基)氨基吡啶和 30ml 无水苯, 搅拌下滴加溶 5.08g (0.021mol) P, P-二氯磷酸  $\beta$ -溴乙酯的 5ml 无水苯溶液, 回流反应 8h. 冷却后滤去生成的三乙胺盐酸盐, 滤液减压蒸干, 残留物用无水乙醚溶解, 滤去不溶物, 蒸去乙醚, 重复操作一次, 真空干燥, 得白色粉末 8.8g (产率 80%).

1.3.2 聚磷酸酯的季铵化反应 ( $\text{II}_{b-a}$ ) 以  $\text{II}_a$  为例, 取聚合物 (I) 3.8g 溶于氯仿-异丙醇- N, N-二甲基甲酰胺 (12ml/25ml/25ml) 混合溶液中, 加入 50ml (30%) 的三甲胺水溶液, 保持 60℃ 反应 10h, 减压蒸去溶剂, 残留物倾入丙酮中沉淀, 过滤, 用丙酮洗涤 2—3 次, 真空干燥得白色粉末状产物,  $\text{II}_{b-a}$  用相应的叔胺, 按上述类似方法季铵化得到, 但后处理时再用  $\text{CHCl}_3$  溶解, 丙酮沉淀, 并重复溶解沉淀 2—3 次.

## 1.4 脂质体的制备

参照 Szoka 的逆相蒸发法<sup>[10]</sup>制备, 称取季铵化的聚合物约 50mg, 加入 3—5ml 氯仿使溶解, 旋转蒸发使膜材成均匀薄层于瓶壁, 再加入 3ml 无水乙醚, 轻轻摇振, 加水相 1ml, 水相为  $\text{pH} = 7.4$  的磷酸盐缓冲盐水 (PBS), 水浴超声 5—6min, 旋转蒸去乙醚, 得空白脂质体, 包载药物时, 水相用 PSB 配成药物浓度  $3\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  其余操作相同, 得载药脂质体.

## 1.5 药物包封率的测定

按文献[11]方法将包载有 5-Fu 的脂质体 1ml 置于透析袋中, 以 100ml PBS 为透析液, 在 35℃ 透析 1h, 然后更换新的 PBS 透析, 重复两次以除尽未包封的药物.

然后用异丙醇 10ml (溶解不好时可采用异丙醇, 乙醚与水的混合溶剂) 将脂质体破坏, 使包封的药物完全溶出, 并以异丙醇为参比, 测定其紫外吸收 ( $A_D$ ). 同一条件测未经透析的脂质体和空白脂质体的紫外吸收分别记作  $A_{ND}$  和  $A_B$ .

## 1.6 体外释放试验

将除尽游离药物的脂质体置于 50 倍的 PBS 中透析, 保持温度 37℃, 每隔一定时间测定紫外吸收 (以 PBS 作参比) 测定后倒回原液.

# 2 结果与讨论

## 2.1 聚合物(I)的结构

聚合物的  $^1\text{H}$ NMR、IR 和元素分析数据列于表 1.

Tab. 1 FT-IR,  $^1\text{H}$ -NMR spectra, and elemental analyses of polyphosphate I

| FT-IR( $\nu$ , $\text{cm}^{-1}$ ) <sup>a)</sup> | $^1\text{H}$ -NMR( $\delta$ ) <sup>b)</sup> | Elemental analyses(%) <sup>c)</sup> |
|-------------------------------------------------|---------------------------------------------|-------------------------------------|
| 2917, 2849s CH <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub>   | 0.9 3H                                      | C 53.76(52.37)                      |
| 1739s C=O                                       | 1.0—1.7 30H                                 | H 8.49(8.35)                        |
| 1237sbr P=O                                     | 2.2—2.8 2H                                  | P 5.52(5.88)                        |
| 1175sbr P—C—O                                   | 3.5—5.0 9H                                  |                                     |
| 1098s O—C—O—C                                   |                                             |                                     |
| 675m C—Br                                       |                                             |                                     |

a: KBr plate b: Solvent: CCl<sub>4</sub> c: The calculated data are in parentheses

从表 1 中的 IR 数据可以看出, 在  $1237\text{cm}^{-1}$ ,  $1175\text{cm}^{-1}$  处有  $\text{V}_{\text{P=O}}$  和  $\text{V}_{\text{P-O-C}}$  的特征吸收, 表明磷酸酯键形成。在  $1098\text{cm}^{-1}$  处有脂肪酸酯的特征吸收和在  $675\text{cm}^{-1}$  处有  $\text{V}_{\text{C-Br}}$  的特征吸收。另外, 从表 1 中  $^1\text{H}$  NMR 数据也进一步得到证实, 元素分析数据相符。用 VPO 法 (DMF,  $95^\circ\text{C}$ ) 测定数均分子量为  $2.3 \times 10^3$ 。以上结果表明, 该聚合物具有预期的化学结构。

## 2.2 季铵化率

聚合物(I)季铵化后通过元素分析测定其氮含量(见表 2), 表明季铵化反应发生, 按下式计算出季铵化率:

$$\text{N\%} = \frac{14y}{yM_1 + (1-y)M_2} \times 100\%$$

式中,  $M_1, M_2$  分别为聚合物中不同链节的式量。计算结果表明, 聚合物 II<sub>1</sub> 有一半的链节发生了季铵化反应。随着烷基胺中烷基链的碳原子数的增加, 季铵化率减小, 它们的趋势是  $\text{II}_1 > \text{II}_2 > \text{II}_3 > \text{II}_4$  (见表 2)。这可能是由于烷基链的增长, 而增大了空阻, 导致大分子反应不完全的缘故。

## 2.3 脂质体特征

经试验, 季铵化后的四种聚合物膜材均能形成脂质体, 图 1 所示为聚合物 II<sub>1</sub> 制备的脂质体在偏光显微镜下的形态照片。可以看到脂质体亮区呈十字消光形, 其大小约为

Fig. 1 Polarized optical micrograph of blank liposome ( $\times 200$ )

Tab. 2 Nitrogen content and compn. of II

|                         | II <sub>1</sub> | II <sub>2</sub> | II <sub>3</sub> | II <sub>4</sub> |
|-------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| N(%)                    | 1.24            | 1.10            | 0.93            | 0.73            |
| Compn.                  | $x = 0.50$      | $x = 0.55$      | $x = 0.61$      | $x = 0.69$      |
| ( $x, y$ ) <sup>a</sup> | $y = 0.50$      | $y = 0.45$      | $y = 0.39$      | $y = 0.31$      |

a. Calculated from N%

104nm。从合成的四种膜材制得的脂质体来看, II<sub>a</sub> 最小, II<sub>d</sub> 最大, 这与极性头部的烷基链长的顺序相一致。

## 2.4 模型药物的包封与体外释放

包封率测定的紫外吸收列于表 3, 并按下式进行计算:

$$\text{EN}\% = \frac{A_D - A_B}{A_{ND} - A_B} \times 100\%$$

Tab. 3 UV absorption of 5-Fu( $\lambda = 266\text{nm}$ )

|           |   | $A_D$ | $A_{ND}$ | $A_B$ | EN(%) |
|-----------|---|-------|----------|-------|-------|
| $A_{bs.}$ | 1 | 0.053 | 0.184    | 0.002 | 28    |
|           | 2 | 0.054 | 0.210    | 0.002 | 25    |
|           | 3 | 0.058 | 0.173    | 0.003 | 32    |

结果表明, 在药物浓度为  $3\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  时该脂质体对 5-Fu 的包封率为 25—32%。

Tab. 4 UV absorption of 5-Fu in dialysis solution at different time ( $\lambda = 266\text{nm}$ )

| $t(\text{h})$ | 1     | 3     | 6     | 9     | 12    | 25    | 30    | 50    | 55    | 59    |
|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| $A_{bs.}$     | 0.047 | 0.086 | 0.105 | 0.201 | 0.250 | 0.795 | 1.047 | 1.202 | 1.246 | 1.250 |

载药脂质体体外释放不同时间测得的紫外吸收列于表 4。从表 4 中不同时间的消光值作图, 得到体外释放曲线(图 2 所示)。从图 2 可见, 开始释放速度较快, 25h 后, 速度减慢, 最后趋于平衡(约 60h)。结果表明, 我们合成的高分子脂质体膜材, 若作为药物缓释材料, 在 60h 内有很好的缓释效果。

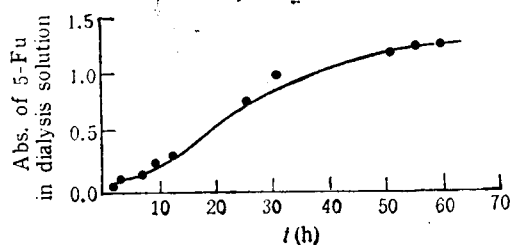


Fig. 2 Release curve of 5-Fu from liposome (II<sub>a</sub>) at 37°C

## 参 考 文 献

- [1] 谢星辉. 国外医学(药学分册), 1984, 11(1): 1
- [2] 顾学裘. 医药工业, 1980, (10): 21
- [3] 蒋伯诚(译). 国外药学(合成、生化药、制剂分册), 1983, 4(4): 28
- [4] Ringsdorf H, Schlarb B, Venzmer J. *Angew Chem Int Ed Engl*, 1988, 27: 113
- [5] Scher D S. *Immunology Today*, 1982, (7): 22
- [6] Tomoi M, Kimura Y. *Reactive Polymers*, 1991, 15: 63
- [7] Spande T F. *J Org Chem*, 1980, 45(15): 3081
- [8] Stepanenko B N, Ulitina T S, Zelenkova V V. *Khim-Farm Zh*, 1974, 8(10): 21

- [9] Gautier J A, Rabiant J. *Bull Soc Chim France*, 1957, 1014  
[10] Szoka F J, Papahadjopoulos D. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1978, 75: 4194  
[11] Tong P, Hou X P, Shao S, et al. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 1991, 27(1): 15

## SYNTHESES OF NEW POLYPHOSPHATES AS LIPOSOMAL MATERIALS

LIU Zhenhua, ZENG Chunlong, FAN Changlie, ZHUO Renxi

(Department of Chemistry, Wuhan University, Wuhan 430072)

**Abstract** Polyphosphates as liposome preparing materials were synthesized. These new amphiphilic polyphosphates were synthesized by polycondensation of  $\beta$ -bromoethyl dichlorophosphate and  $\alpha$ -monostearin in benzene, and then by quaterisation with alkyldimethyl amine. Their chemical structures were confirmed by IR,  $^1\text{H}$ NMR spectra and elemental analyses. Average molecular weight of polymer prior to quaterisation was determined by VPO method. The nitrogen content from elemental analyses showed that the quaterized polymers containing different content of quaternary ammonium side chain (50—31%). These polyphosphates were used to prepare liposome by using Reverse phase evaporation method. All quaterized polyphosphates could form large unilamellar liposomes. The diameter of liposome from polyphosphate II<sub>1</sub> is 104nm. All the experimental data showed that these amphiphilic polyphosphates are good materials for preparing liposomes. The encapsulation ratio of 5-Fluorouracil (5-Fu) was determined. Encapsulation ratio of 5-Fu is in the range of 25% to 32%. Release rate of 5-Fu from liposome was also studied.

**Key words** Polyphosphate, Liposome, Drug release