

含双疏水侧链聚磷酸酯脂质体膜材的合成*

刘振华 曾春龙 范昌烈 卓仁禧

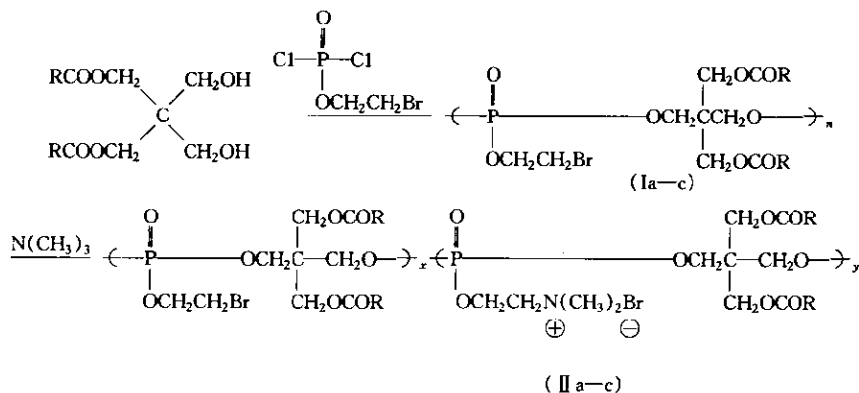
(武汉大学化学系 武汉 430072)

摘 要 以季戊四醇二脂肪酸酯和 P, P-二氯磷酸 β-溴乙酯为单体, 通过溶液缩聚反应合成聚磷酸酯, 再经季铵化反应得到三种新的含双疏水侧链的磷脂酰胆碱型聚磷酸酯脂质体膜材. 采用逆相蒸发法制备脂质体. 电镜观察表明, 所有聚合物都能形成脂质体, 其直径为 2~6 μm. 还研究了对抗肿瘤药物 5-氟脲嘧啶的包封, 其包封率为 30%.

关键词 聚磷酸酯, 脂质体, 药物缓释

70 年代初, Rahman 和 Gregoriadis 等^[1,2]将酶及药物包封在脂质体中, 开创了应用脂质体作为药物载体的先例. 此后, 人们相继将激素、抗菌素、抗肿瘤药物、免疫佐剂和某些针对重金属蓄积的螯合剂包入脂质体中制成靶向控释给药系统, 受到药剂、药理学界以及临床方面的广泛重视^[3,4].

在前篇文章中^[5], 我们报道聚磷酸酯脂质体膜材的合成, 并用它们制备载药脂质体, 以克服采用天然磷脂制备脂质体的不稳定性. 考虑到天然磷脂通常是双疏水链的两亲性化合物, 为获得更接近天然磷脂特性的脂质体膜材, 本工作以季戊四醇二脂肪酸酯和 P, P-二氯磷酸 β-溴乙酯为单体, 通过溶液缩合聚合反应合成聚磷酸酯 (I_{a-c}), 再经季铵化反应制得含双疏水侧链的磷脂酰胆碱型聚磷酸酯脂质体膜材 (II_{a-c}). 其合成路线如下:



其中: I_a, II_a, R = n-C₁₁H₂₃ I_b, II_b, R = n-C₁₅H₃₁ I_c, II_c, R = n-C₁₇H₃₅

1 实验部分

1.1 原料与试剂

季戊四醇 C. p. 苯甲醛 C. p. 用前蒸馏 b. p. 178~179℃. 三氯氧磷 C. P. 重蒸 b. P. 105

~107℃. 苯, 金属钠丝干燥. 吡啶精制干燥. 草酰氯 C.p., 重蒸 b.p. 63~64℃. 亚硫酰氯 C.p. 重蒸 b.p. 68~69℃, 月桂酸、棕榈酸、硬脂酸均为化学纯, 其他试剂均为市售化学纯或分析纯.

1.2 脂肪酰氯和单体合成

1.2.1 脂肪酰氯的合成 按文献[6]方法合成, 0.1 mol 脂肪酸与 0.2 mol 草酰氯加入反应瓶中, 温热 20~30 min 后使成溶液, 然后升温回流反应 2 h. 蒸去过量草酰氯, 减压蒸馏收集所得馏分.

月桂酰氯 [$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COCl}$], b.p. 149~150℃/2932.6 Pa (文献值, 150℃/2932.6 Pa), 产率 95%.

棕榈酰氯 [$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COCl}$], b.p. 194~195℃/2266.1 Pa (文献值, 194.5℃/2266.1 Pa), 产率 92%.

硬脂酰氯 [$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COCl}$], b.p. 174~178℃/266.6 Pa, 产率 90%.

1.2.2 季戊四醇二脂肪酸酯的合成

1.2.2.1 单季戊四醇缩苯甲醛 按文献[7]将 68 g (0.5 mol) 季戊四醇溶于温热水中使成清亮溶液, 加入 53 g (0.5 mol) 苯甲醛和 2.5 ml 浓盐酸, 室温下搅拌反应 5 h, 放置过夜, 过滤收集白色固体, 水洗, 再用 700 ml 水 (水中含少量 Na_2CO_3) 热溶解, 冷却结晶, 得白色固体, 干燥后用甲苯重结晶, 真空干燥, 得单季戊四醇缩苯甲醛 87 g, 产率 80%, m.p. 132~133℃ (文献值 133.5℃).

1.2.2.2 季戊四醇缩苯甲醛二脂肪酸酯 将 0.03 mol 单季戊四醇缩苯甲醛溶于 180 ml 无水苯中, 加入 17 ml 无水吡啶, 慢慢滴加 0.061 mol 脂肪酰氯, 滴加完后回流反应 1 h. 自然冷却至室温继续搅拌过夜, 反应混合物移至分液漏斗中, 水洗, 分去水后用无水硫酸钠干燥, 蒸去溶剂苯, 得白色固体, 用乙醇重结晶, 得单季戊四醇缩苯甲醛二脂肪酸酯.

季戊四醇缩苯甲醛二月桂酸酯: m.p. 42~43℃, 产率 87%;

季戊四醇缩苯甲醛二棕榈酸酯: m.p. 60~61℃, 产率 85%;

季戊四醇缩苯甲醛二硬脂酸酯: m.p. 68~69℃, 产率 84%.

1.2.2.3 季戊四醇二脂肪酸酯 将 0.01 mol 季戊四醇缩苯甲醛二脂肪酸酯溶于 100 ml 绝对无水乙醇中, 加入 0.6~0.8 g 钨黑催化剂 (自制), 通入氢气, 保持 35℃ 左右反应 4~5 h, 滤去催化剂, 用少量热乙醇洗涤数次, 蒸去溶剂, 得白色固体, 用无水乙醇或甲醇重结晶, 得到季戊四醇二脂肪酸酯单体.

季戊四醇二月桂酸酯 (Ma) 产率 96%, m.p. 51~52℃, $^1\text{H-NMR}$ δ 0.8~0.9 (6H), 1.0~1.5 (36H), 2.2~2.6 (4H), 3.3~3.5 (4H), 4.0~4.2 (4H), (60 MHz).

季戊四醇二棕榈酸酯 (Mb) 产率 92%, m.p. 69~70℃, $^1\text{H-NMR}$ δ 0.73~0.95 (6 H), 1.20~1.38 (48 H), 1.40~1.80 (4 H), 2.20~2.40 (4 H), 2.54~2.80 (2 H), 4.04~4.12 (4 H), (90 MHz).

季戊四醇二硬脂酸酯 (Mc) 产率 85%, m.p. 74~75℃, $^1\text{H-NMR}$ δ 0.8~0.9 (6 H), 1.0~1.7 (60 H), 2.1~2.5 (4 H), 3.4~3.8 (4 H), 3.9~4.3 (4H), (60 MHz).

1.2.3 P, P-二氯磷酸 β -溴乙酯的合成 (BDCEP)^[8] 在反应瓶中放置 60 ml (0.47 mol) 三氯氧磷和 150 ml 无水甲苯, 冰盐浴冷至 -5℃ 左右, 缓慢滴加 25 ml (0.35 mol) 溴乙醇, 滴

完后在 0~5℃ 搅拌反应 3 h, 反应后蒸去甲苯和过量的三氯氧磷, 减压蒸馏, 收集 92~93℃/666.5 Pa 馏分(文献值 90℃/666.5 Pa), 产率 53%。

1.3 脂质体膜材的合成

1.3.1 聚磷酸酯的合成(I a—c) 以 I b 为例, 将 3.06 g(0.005 mol) 单体 Mb 溶于 18 ml 无水苯中, 加入 1.6 ml 三乙胺和 0.05 g(N,N-二甲基)胺基吡啶(DMAP), 然后缓慢滴加溶于 5 ml 无水苯的 1.21 g(0.05 mol) 单体 BDCP, 滴加完后升温至回流温度, 搅拌反应 15 h, 停止搅拌在室温静置过夜, 过滤, 收集滤液, 蒸去溶剂, 残留物用乙醚溶解, 滤去不溶物, 蒸去乙醚, 反复两次, 真空干燥, 得淡黄色固体 2.7 g。

聚磷酸酯 I a 和 I c 按同法合成。

聚合物 I a, $\overline{M}_n$ 为 3.83×10^3 (VPO, DMF, 95℃), 产率 78%;

聚合物 I b, $\overline{M}_n$ 为 3.56×10^3 (VPO, DMF, 95℃), 产率 68%;

聚合物 I c, $\overline{M}_n$ 为 3.67×10^3 (VPO, DMF, 95℃), 产率 60%;

1.3.2 聚磷酸酯的季铵化反应 以 II b 为例, 取 1.5 g 聚磷酸酯 I b, 溶于 26 ml CHCl_3 -i- PrOH -DMF 混合溶剂中(6/10/10 体积比), 加入 12 ml 33% 三甲胺水溶液升温至 60℃ 反应 12 h, 减压蒸去溶剂, 残留物倾入丙酮静置, 白色固体析出, 过滤, 干燥, 以少量氯仿溶解, 用丙酮沉淀, 重复一次, 过滤, 真空干燥, 得季铵化产物 II b。II a 与 II c 按同法制备。

1.4 脂质体的制备

称取季铵化的聚合物约 50 mg, 加入 3~5 ml 氯仿使溶解, 旋转蒸发使膜材成均匀薄层于瓶壁, 再加入 3 ml 无水乙醚, 轻轻摇振, 加水相 1 ml, 水相为 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 PBS 配成药物浓度 3 mmol/L, 其余操作相同, 得载药脂质体。

2 结果与讨论

2.1 聚磷酸酯的化学结构

由单体 Mb 和其相应聚合物 I b 的 $^1\text{H-NMR}$ 数据(见表 1)可知, 聚合物在 $\delta=2.54\sim 2.80$ 处的共振吸收峰消失, 而单体 Mb 在此区间有较强的吸收峰。

另外, 聚合物 II b 在 $\delta=3.8\sim 4.5$ 处出现 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}$ 基团上氢原子的共振吸收峰。从 IR 图谱上(表 1)也可以看到磷酸酯的特征吸收, 以上结果表明所合成的聚合物具有预期的化学结构。

Table 1 FT-IR and $^1\text{H-NMR}$ spectra of polyphosphate I b

FT-IR($\bar{\nu}$, cm^{-1})			$^1\text{H-NMR}(\delta)$	
2918, 2850	s	CH_3CH_2	0.73~0.95	(t, 6H CH_3)
1739	s	C=O	1.20~1.38	(s, 48H, $-\text{CH}_2-$)
1287	s	P=O	1.40~1.80	(s, 4H, C- CH_2O)
1179	s	P-C-O	2.20~2.40	(t, 4H, $-\text{OCOCH}_2-$)
1058	m	O=C-O	3.3~3.7	(4H, P- OCH_2-)
			3.8~4.5	(4H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{Br}$)

2.2 季铵化率

由元素分析得到的氮含量按计算式 $N\% = \frac{14y}{yM_y + (1-y)M_x} \times 100\%$ [式中 M_x 、 M_y

分别为未季铵化(x)和已季铵化链节(y)的式量]计算得到聚合物 II a~c 的两链节组成(见表 2)即季铵化率为 46~49%.

Table 2 Nitrogen content and component of polymers II a~c

	II a	II b	II c
N(%)	0.91	0.81	0.77
Compn	X=0.5	X=0.53	X=0.54
(X, Y)	Y=0.49	Y=0.47	Y=0.46

2.3 脂质体的形态特征与对模型药物的包封率

采用逆相蒸发法制备脂质体,结果表明所有聚合物都能形成流动性好的乳白色脂质体.电镜观察表明,脂质体呈球形(图 2 所示),图中黑色颗粒即为脂质体形态.

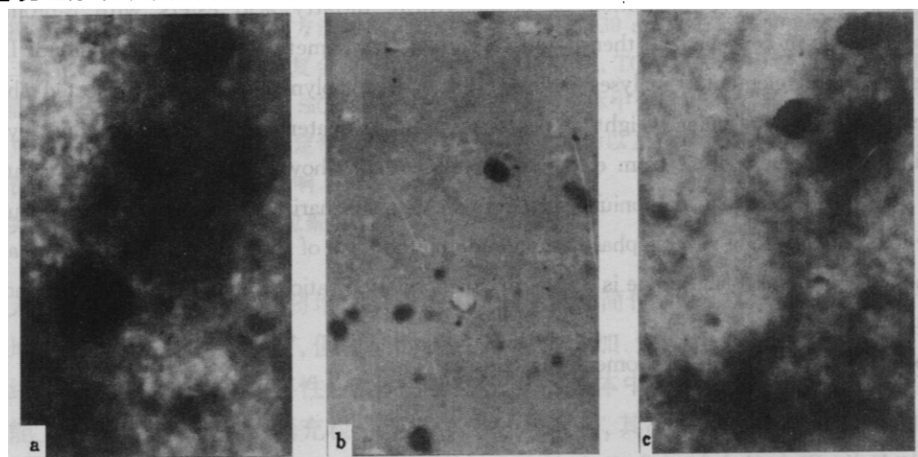


Fig. 1 Electron micrographs of Liposome II a~c

选用聚合物 II c,在药物浓度为 3 mmol/L,超声时间为 6 min 和温度为 22℃ 条件下,由逆相蒸发法制备载药脂质体,按文献[9]测得脂质体对抗肿瘤药物 5-氟脲嘧啶的包封率为 30%.

REFERENCES

- 1 Rahman Y E. Proc Soc Exp Bio Med, 1974, 146:1173
- 2 Gregoriadis G. FEBS Letter 1973, 36:292
- 3 Xie Xinghui(谢星辉). Guowai Yaoxue(Yaoxue Fence)(国外医学,药学分册), 1984, 11(1):1
- 4 Jiang Bochong(蒋伯诚)(译). Guowai Yaoxue(Hechengyao, Shenghuayao Zhijifence)(国外药学,合成、生化药剂分册), 1983, 4(4):28
- 5 Liu Zhenhua(刘振华), Zeng Chunlong(曾春龙), Fan Changlie(范昌烈), et al. Acta Polymerica Sinica(高分子学报), 1995, 4:483
- 6 Adams R Cilich L H. J Am Chem Soc, 1920, 42:599
- 7 Bograchov E. J Am Chem Soc, 1950, 72:2268
- 8 Spande T F. J Org Chem, 1980, 45(15):3081
- 9 Tong P. Acta Pharmaceutica Sinica, 1991, 27(1):15

SYNTHESES OF POLYPHOSPHATES CONTAINING TWO LONG HYDROPHOBIC SIDE CHAINS AS LIPOSOME MATERIALS

LIU Zhenhua, ZENG Chunlong, FAN Changlie, ZHUO Renxi

(*Department of Chemistry, Wuhan University, Wuhan 430072*)

Abstract Three new amphiphilic polyphosphates containing two long hydrophobic side chains were synthesized by the polycondensation of pentaerythrite di-fatty acid esters with β -bromoethyl dichorophosphate in benzene, and then by quaterisation with trimethyl amine. The results of IR, ^1H -NMR spectra and elemental analyses indicate that all the polymers have the expected chemical structures. Average molecular weight of polymers prior to quaterisation was determined by VPO method. The nitrogen content from elemental analyses data showed that the polymers containing 46% ~ 49% of quaternary ammonium side chains. All quaternarized polyphosphates were used to prepare liposome by using reverse phase evaporation method. All of them could form large unilamellar liposome. The diameter of liposome is 2 ~ 6 μm . Encapsulation ratio of liposome to 5-fluorouracil was also determined.

Key words Polyphosphate, Liposome, Drug release