

硬脂胺-异硫氰基荧光素嫁接物的合成工艺研究及其应用评价

陈晓晓¹, 尹丽娜², 张雅雯², 周云琍¹, 王胜浩^{2*}, 梁泽华^{1*}

(1. 浙江中医药大学药学院, 杭州 310053; 2. 浙江省医学科学院, 杭州 310013)

[摘要] **目的:**探究硬脂胺-异硫氰基荧光素嫁接物的最优合成工艺,并对其进行应用评价。**方法:**以硬脂胺和异硫氰基荧光素为原料,通过偶合反应合成得到脂质材料硬脂胺-异硫氰基荧光素嫁接物,利用薄层色谱法监测反应过程;通过核磁共振对嫁接产物进行结构确证,并以溶剂、时间、温度以及投料比为考察因素,以产率为指标,得到最优合成工艺。并将合成的硬脂胺-异硫氰基荧光素嫁接物用于标记脂质纳米粒,以结扎肠循环模型考察纳米粒在小肠的吸收分布情况对其进行应用评价。**结果:**当反应溶剂为无水乙醇,硬脂胺和异硫氰基荧光素的反应摩尔比为2:1,60℃搅拌反应48h后异硫氰基荧光素与硬脂胺反应最完全,产率较高,可达(72.0±3.9)%,并能较准确地评价其标记的纳米粒在肠绒毛吸收分布情况。**结论:**优化后合成处方工艺反应完全,得率高;方法操作简单,重复性好;合成的硬脂胺-异硫氰基荧光素嫁接物可用于直观评价纳米粒的体内外情况。

[关键词] 异硫氰基荧光素;硬脂胺-异硫氰基荧光素嫁接物;薄层色谱;小肠微绒毛吸收

[中图分类号] R282.6;R289;R22 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)19-0056-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181510

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180515.1707.001.html>

[网络出版时间] 2018-05-16 15:23

Optimization of ODA-FITC Conjugate Process and Its Application

CHEN Xiao-xiao¹, YIN Li-na², ZHANG Ya-wen², ZHOU Yun-li¹, WANG Sheng-hao^{2*}, LIANG Ze-hua^{1*}

(1. College of Pharmaceutical Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China;

2. Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize the synthesis process of octadecylamine-fluorescein isothiocyanate (ODA-FITC), and evaluate its application. **Method:** ODA-FITC was synthesized by coupling reaction with ODA and FITC as raw materials, and the reaction process was monitored by thin layer chromatography. Its structure was verified by nuclear magnetic resonance spectroscopy, and the optimum synthesis process was obtained with the solvent, time, temperature and feed ratio as the investigation factors and with yield as the indicator. ODA-FITC was then used as a fluorescence marker for nanostructured lipid carriers (NLC) by solvent diffusion method. The ligated intestinal circulation model was established to observe the absorption and distribution of NLC in small intestine and evaluate its application. **Result:** The optimum reaction conditions were as follows: the molar ratio of ODA to FITC was 2:1, the solution was anhydrous ethanol, after reaction for 48 h at 60℃. Under such conditions, the yield was high, reaching (72.0±3.9)%, and the absorption and distribution of its marked nanoparticles in intestinal villus can be accurately evaluated. **Conclusion:** The synthesis method has complete reaction and high yield, with simple operation and high repeatability. Synthetic ODA-FITC can be used to intuitively evaluate the *in vitro* and *in vivo* conditions of nanoparticles.

[Key words] fluorescein isothiocyanate; ODA-FITC; TLC; absorption by intestinal microvillus

[收稿日期] 20171127(003)

[基金项目] 浙江省自然科学基金项目(LQY18H3000002);浙江省医药卫生科技计划项目

[第一作者] 陈晓晓,在读硕士,从事纳米制剂研究,E-mail:793488730@qq.com

[通信作者] *王胜浩,博士,研究员,从事创新性给药系统研究,E-mail:wshenghao@126.com;

*梁泽华,博士,副教授,从事中药炮制及质量研究,E-mail:1046698407@qq.com

异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 是一种在细胞生物学、免疫学、药物研究领域常用的荧光染色剂,因呈现明亮的黄绿色荧光,已被广泛应用于纳米粒的体外细胞摄取和体内分布情况研究^[1-2]。有报道将 FITC 和葡聚糖的嫁接物以及荧光物质包裹在纳米粒中,用于纳米粒的体内外研究^[3]。然而,上述的荧光物质载体在细胞转运过程中存在荧光物质泄露的问题^[4],从而影响实验结果。而硬脂胺(octadecylamine, ODA)是一种阳离子型脂类化合物,将其与 FITC 嫁接后得硬脂胺-异硫氰基荧光素荧光探针(ODA-FITC),所具有的 18 碳疏水链与脂质材料性质相似,亲和力强,这使 ODA 和 FITC 两者在纳米粒形成过程中能够非常紧密的结合,不易发生分离和泄露,较物理包裹荧光素的脂质纳米载体更稳定,具有更高的精确性^[5],被业界广泛接受。

ODA-FITC 虽然现阶段在纳米粒体内外研究中应用广泛、标记效果明显^[6],但目前关于合成 ODA-FITC 的方法研究却较为滞后,仅有少量报道^[6-9],且现研究中均未对反应条件进行系统化的考察优化,存在反应不完全、效率低等现象。而薄层色谱法(TLC)在监测荧光物质的合成反应上具有方法简单、测量结果准确、适用范围广等优点^[10]。

因此本研究采用薄层色谱法对 ODA-FITC 反应过程进行检测,并通过单因素试验等对合成工艺进行系统的考察,得到最佳反应条件,并用合成的 ODA-FITC 标记脂质纳米粒,进行直观、准确地评价纳米粒在小肠微绒毛的吸收情况,这将为 ODA-FITC 进一步的研究应用提供一定的参考,具有一定的实际意义。

1 材料

硬脂胺(阿拉丁试剂有限公司,纯度 > 90%,批号 20140620),异硫氰基荧光素(阿拉丁试剂有限公司,纯度 > 90%,批号 20150411), α -单硬脂酸甘油酯(杭州油脂有限公司,纯度 > 99.9%,批号 20160912),聚乙二醇(PEG2000-SA, Japan Tokyo Chemical Industry);甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

AL104 型电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司],JJ-1A 型恒温磁力搅拌浴(江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司),USC-502 型超声波清洗器(上海波龙电子设备有限公司),LSM710 型激光共聚焦显微镜(Zeiss),Anke GL-20G-II 型冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂),DRX400 型核磁共振

仪(Germany Bunker Biospin),硅胶板(青岛海洋化工厂分厂)。

2 方法

2.1 TLC 方法的建立 采用 TLC 对反应过程进行监测,在文献[11]的基础上对展开剂种类(二氯甲烷与甲醇、二氯甲烷与乙醇、三氯甲烷与甲醇)及比例(7.5:2.5,7:3,8:2,9:1)进行考察,采用紫外灯观察产物的洗脱情况,计算比移值(Rf 值),得出最优 TLC 条件。

2.2 ODA-FITC 合成 通过 TLC 监测反应过程,以溶剂、时间、温度以及投料比为考察因素,产率为指标,得到最优合成工艺。产率计算公式如下:

$$\text{产率} = \frac{\text{实际产量}}{\text{理论产量}} \times 100\% = \frac{m_3 \times M_2}{m_2 \times M_3} \times 100\%$$

式中 m_3 为 ODA-FITC 的实际产量; M_2 为 FITC 的摩尔质量; m_2 为 FITC 的质量; M_3 为 ODA-FITC 的摩尔质量。

2.2.1 反应溶剂的选择 在恒温 50 °C 条件下,固定反应时间为 48 h,ODA 和 FITC 的摩尔比为 1:1,溶剂分别为无水乙醇,*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF),考察反应溶剂对 ODA-FITC 合成的影响,根据 FITC 原料斑点消失确定反应的终点。

2.2.2 反应时间的选择 在恒温 50 °C 条件下,固定 ODA 与 FITC 的摩尔比为 1:1,溶剂为无水乙醇,分别于反应 0,6,12,24,36,42,48 h 取样检测,考察反应时间对 ODA-FITC 合成的影响,根据 FITC 原料斑点消失确定反应终点。

2.2.3 反应温度的选择 固定反应时间为 48 h,ODA 与 FITC 的摩尔比为 1:1,溶剂为无水乙醇,反应温度分别为 50,60 °C,考察温度对 ODA-FITC 合成的影响,根据 FITC 原料斑点消失确定反应终点。

2.2.4 投料比的选择 在恒温 50 °C 条件下,固定反应时间为 48 h,溶剂为无水乙醇,ODA 与 FITC 的反应摩尔比分别为 1:1,2:1,5:1,考察不同投料比对 ODA-FITC 合成的影响,根据 FITC 原料斑点消失确定反应终点。

2.3 结构确证 分别取适量 ODA, FITC, ODA-FITC 溶解于 CDCl₃,采用核磁共振氢谱对 ODA-FITC 进行结构确认, MestreNova 软件分析处理。

2.4 ODA-FITC 标记纳米结构脂质载体的体内肠道吸收考察

2.4.1 ODA-FITC 标记纳米结构脂质载体的合成 以单硬脂酸甘油酯与油酸为脂质材料,按照文献[12]方法制备荧光标记 PEG 修饰纳米脂质结构载

体(p-NLC)和未修饰的纳米脂质结构载体(NLC)。即精密称取油酸 10 mg,单硬脂酸甘油酯 40 mg,适量 PEG 及 ODA-FITC,溶于无水乙醇 3 mL,70 °C 水浴下加至同温度水中,500 r·min⁻¹ 机械搅拌 5 min 后,得带乳光的纳米分散液。该分散液经减压浓缩、冻干,可得荧光标记的纳米粒(NLC 与 p-NLC)。

2.4.2 纳米结构脂质载体的体内肠道吸收考察

采用结扎肠循环模型^[12]研究不同种类纳米结构脂质载体的在体小肠吸收情况。取自然饮水条件下禁食 12 h 的雄性 SD 大鼠腹腔注射戊巴比妥钠溶液麻醉(40 mg·kg⁻¹),背位固定,沿腹中线打开腹腔,小心分离出空肠段,用 37 °C Krebs-Ringer 溶液冲洗肠内容物,分别注入荧光标记的纳米结构脂质载体(NLC, p-NLC),将肠管两端结扎,放回大鼠腹腔,2 h 后将大鼠处死,取出相应的肠段,冲洗肠段内容物及未被吸收的药物。肠段经冷冻包埋液包埋,冷冻切片及 DAPI 染色后,用激光共聚焦显微镜观察纳米粒在大鼠小肠的分布情况。

3 结果

3.1 TLC 方法的建立

在文献基础上对 TLC 进行优化,结果显示,当展开剂为二氯甲烷-甲醇、二氯甲烷-乙醇时,ODA-FITC 的 R_f 值均 > 0.8,且拖尾现象严重;当展开剂为三氯甲烷-甲醇(7:3)时,R_f 值适宜(0.65),在此溶剂体系条件下可清晰分辨产物和 FITC 的斑点(图 1),因此选择三氯甲烷-甲醇(7:3)作为 TLC 展开条件,在 365 nm 紫外下观察荧光显色。



1. FITC; 2. 产物(图 4 同)

图 1 FITC 及产物的 TLC 荧光

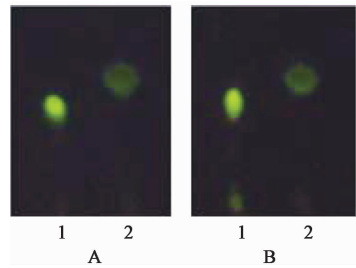
Fig.1 TLC of fluorogram of FITC and product

3.2 反应溶剂的考察

分别以无水乙醇,DMF 作为溶剂,反应 48 h,结果显示,产物斑点无明显差别(图 2),得率分别为 54.5% ,55.6% ,说明不同溶剂对 ODA-FITC 的反应程度影响较小,考虑到溶剂的毒副作用,选择无水乙醇作为反应溶剂。

3.3 反应温度的考察

分别考察 50,60 °C 不同反

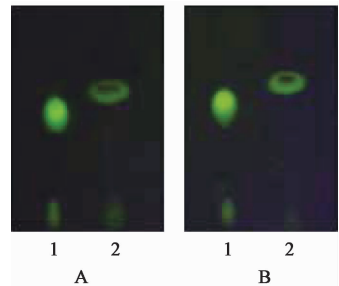


A. 无水乙醇; B. DMF; 1. FITC; 2. 产物

图 2 FITC 及不同溶剂的反应产物 TLC 荧光

Fig.2 TLC of fluorogram of FITC and product in different solvent systems

应温度下荧光产物。TLC 结果显示(图 3),50,60 °C 的得率分别为 54.5% ,61.4% ;60 °C 反应 48 h 后,ODA-FITC 的斑点更清晰明显,表明 60 °C 条件下,ODA 与 FITC 反应更完全,得率更高。



A. 50 °C; B. 60 °C; 1. FITC; 2. 产物

图 3 FITC 及不同温度的反应产物 TLC 荧光

Fig.3 TLC of fluorogram of FITC and product at different temperature

3.4 反应时间的考察

随着反应时间增长,FITC 斑点逐步消失,反应产物的斑点逐渐加深,反应 48 h 后,FITC 斑点基本消失,说明 FITC 与 ODA 已基本完全反应(图 4)。

3.5 投料比的考察

当 ODA 与 FITC 摩尔比分别为 1:1 和 2:1 时,反应 48 h 后,FITC 斑点均基本消失,2:1 反应产物斑点较 1:1 更明显;当 ODA 与 FITC 摩尔比为 5:1 时,反应 48 h 后仍有 FITC 斑点存在,且得率仅为 20.6% ,说明该比例下 FITC 未完全反应,推测原因可能是 ODA 用量过大反而抑制了反应的进行;ODA 与 FITC 摩尔比为 2:1 时反应得率达到 68.5% ,明显高于 1:1 (51.4%),表明投料比为 2:1 反应更完全(图 5)。

根据以上实验结果,确定 ODA-FITC 最佳合成工艺为 ODA 和 FITC 按摩尔比 2:1 投料,60 °C 条件下,无水乙醇中磁力搅拌反应 48 h,即精密称取 ODA 40 mg,加入无水乙醇 5 mL 超声溶解,另取 FITC 28 mg 加入上述溶液中,混合均匀 60 °C 水浴搅

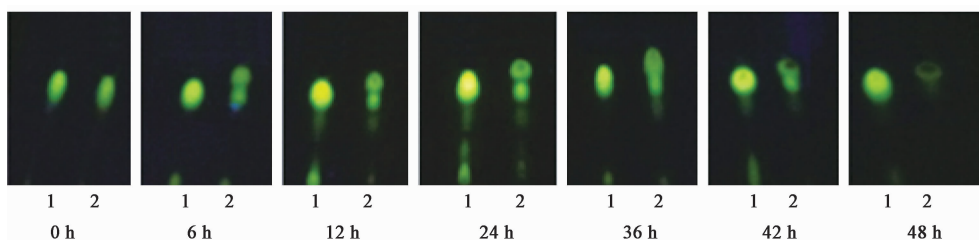
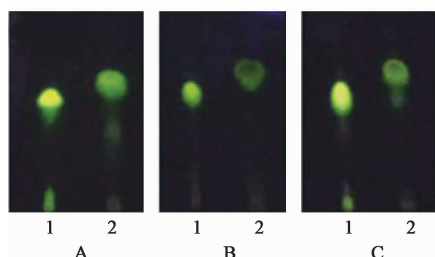


图 4 FITC 及不同时间的反应产物 TLC 荧光

Fig. 4 TLC of fluorogram of FITC and product in different time



A. ODA-FITC (1 : 1); B. ODA-FITC (2 : 1); C. ODA-FITC (5 : 1);
1. FITC; 2. 产物

图 5 FITC 及不同投料比的反应产物 TLC 荧光

Fig. 5 TLC of fluorogram of FITC and product in different different mole ratios

拌 48 h, 反应停止后, 取出反应物于 0 °C 冰水浴下放置 2 h, 使产物呈絮状完全析出, 过滤, 滤饼依次用三氯甲烷、蒸馏水洗涤数次, 真空干燥, 称质量, 并避光保存。按照上述合成工艺合成 3 批样品计算得率为 (72.0 ± 3.9)% (n = 3)。合成路线见图 6。

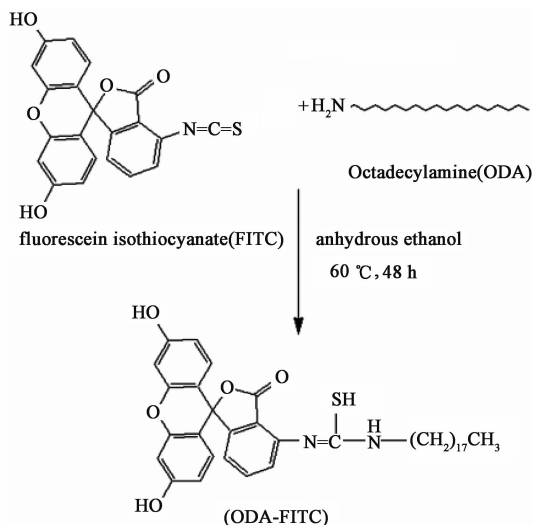


图 6 ODA-FITC 合成路线

Fig. 6 Synthesis route of ODA-FITC

3.6 结构确证 采用 ¹H-NMR 对的 ODA-FITC 进行结构分析 (图 7), 图 7 分别为 ODA, FITC, ODA-FITC 的 ¹H-NMR 谱图, 图 7A 中化学位移 δ 2.68 的

峰为 ODA 结构中氨基的质子峰, 而图 7C 中 (产物 ODA-FITC) 氨基活性 H 消失, 出现 ODA-FITC 结构中的酰胺基质子峰 (δ 3.18), 说明已成功合成 ODA-FITC。

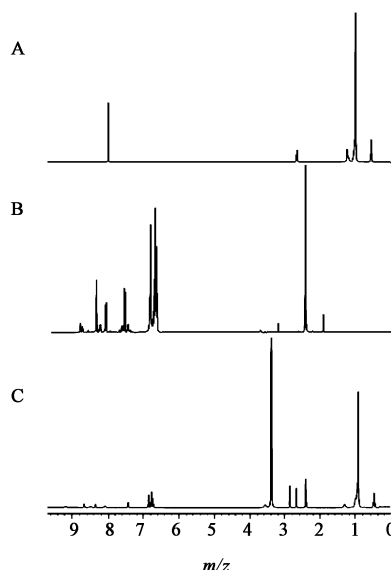
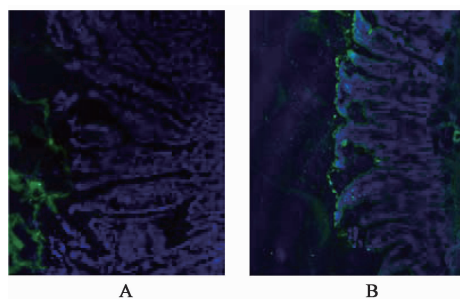


图 7 ODA (A), FITC (B) 及 ODA-FITC (C) 核磁共振氢谱

Fig. 7 ¹H-NMR spectrum of ODA (A), FITC (B) and ODA-FITC (C)

3.7 纳米粒肠道吸收情况 将合成的 ODA-FITC 标记脂质纳米粒, 来评价不同种类纳米粒在大鼠肠道的吸收特性。本研究采用双荧光标记法, 即纳米粒用 ODA-FITC 进行标记 (绿色), 小肠细胞核以 DAPI 试剂染色 (蓝色)。图 8A 为 ODA-FITC 标记的未经 PEG 修饰的纳米粒子 (NLC) (绿色荧光部分) 在小肠肠道上的分布状况, 蓝色荧光代表小肠细胞的细胞核, 绿色荧光为脂质纳米粒, 结果显示 NLC 仅在小肠微绒毛的边缘集中出现, 几乎没有透过微绒毛; 当经过 PEG 修饰后 (p-NLC), 能较顺利通过小肠微绒毛, 在小肠的黏液纤维上、小肠细胞内部均有分布, 说明 p-NLC 在小肠部位有更强的渗透性, 能透过黏液层, 进入到细胞核内部 (图 8B)。ODA-FITC 使小肠微绒毛对纳米粒的吸收分布可视性, 能够较直观、准确地评价纳米粒在肠道吸收情

况, 这为探究微粒给药系统在肠道促吸收机制研究提供了依据。



A. NLC; B. p-NLC

图 8 NLC 及 p-NLC 在小肠微绒毛上的分布

Fig. 8 Distribution of NLC and p-NLC in intestinal microvillus

4 分析与讨论

本合成工艺条件中, ODA 与 FITC 的摩尔比为 2:1, 此时 ODA 过量, 反应结束需去除未反应的 ODA, 提高产物的纯度, 根据溶解度试验得出 ODA 极易溶于三氯甲烷, 而 ODA-FITC 难溶于三氯甲烷, 因此后处理先用三氯甲烷洗涤产物数次, 去除过量的 ODA, 再用清水洗涤数次, 去除少量残留的 FITC, 以得到高纯度的 ODA-FITC。

本研究首次运用 TLC 监测 ODA-FITC 合成, 考察了溶剂、时间、温度以及投料比对产率的影响得到最佳合成工艺为 ODA 与 FITC 摩尔比 2:1, 60 °C 条件下, 无水乙醇中避光搅拌反应 48 h; 该合成工艺操作简单、得率高、重复性好; 根据上述合成工艺, ODA-FITC 的产率(72.5%)明显高于文献[8]方法(54.5%), 纯度≥98%, 通过其标记纳米粒, 能够较直观、准确地评价其在肠道的吸收分布情况, 具有一定的实际意义。

[参考文献]

- [1] 于崧崧. 曲妥珠单抗修饰的紫杉醇脂质纳米粒的制备及其靶向性的初步研究[D]. 长春: 吉林大学, 2017.
- [2] 管庆霞, 王利萍, 刘振强, 等. 马钱子碱固体脂质纳米粒的细胞毒性及细胞摄取试验[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(5): 1-6.
- [3] Gupta A K. Effect of cellular uptake of gelatin nanoparticles on adhesion, morphology and cytoskeleton organisation of human fibroblasts[J]. J Control Rel, 2004, 95(2): 197-207.
- [4] 丁建潮, 胡富强, 袁弘, 等. A549 细胞对单硬脂酸甘油酯固体脂质纳米粒的摄取作用[J]. 药学学报, 2004, 39(11): 876-880.
- [5] 黄凌斐. 脂质纳米载体的制备与细胞转运研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2008.
- [6] 陈春燕. PEG 修饰对脂质纳米载体胃肠道转运的影响[D]. 杭州: 浙江大学, 2013.
- [7] 李茜. 拉米夫定硬脂酸酯的合成及细胞内给药系统研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2011.
- [8] 袁弘. 固体脂质纳米粒口服药物载体经胃肠道转运的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2008.
- [9] 张继明, 胡富强, 应晓英, 等. 胰岛素固体脂质纳米粒的制备及其理化性质研究[J]. 中国药学杂志, 2004, 39(8): 605-607.
- [10] 王帅, 李莹, 刘国富, 等. 薄层色谱半定量监测有机合成反应[J]. 河北联合大学学报: 自然科学版, 2012, 34(4): 48-51.
- [11] 徐长法, 丁鉴, 王镜岩, 等. 异硫氰酸荧光素的合成[J]. 北京大学学报: 自然科学版, 1977(2): 84-88.
- [12] 张雅雯, 尹丽娜, 黄夏樱, 等. PEG 化脂质纳米粒促进积雪草酸口服吸收研究[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(14): 2784-2788.

[责任编辑 顾雪竹]