

以 β -环糊精-聚丙烯酸-聚甲基丙烯酸甲酯-聚乙烯吡咯烷酮聚合物为载体制备胶束的可行性研究[△]

佃少娜^{1*}, 李桃¹, 余彩萍², 黄淑玲², 杨帆^{2#} (1.广东省人民医院/广东省医学科学院, 广州 510080; 2.广东药学院, 广州 510006)

中图分类号 R95 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)29-2737-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.29.16

摘要 目的: 研究两亲性共聚物 β -环糊精-聚丙烯酸-聚甲基丙烯酸甲酯-聚乙烯吡咯烷酮聚合物(β -CD-PPP)作为载体制备胶束的可行性。方法: 以长春西汀为模型药物、 β -CD-PPP为载体, 采用溶剂挥发法制备长春西汀载药胶束, 考察其粒径分布、临界胶束浓度、红外表征、形态特征和在不同pH释放介质中的体外释放度。结果: 制得的载药胶束载药量为 $(21.41 \pm 0.43)\%$, 包封率为 $(54.50 \pm 1.38)\%$, 平均粒径为86.2 nm, 单分散性分布, 临界胶束浓度为 2.66×10^{-8} g/L, 大部分药物被包裹在胶束中, 胶束离子均表现出较良好的圆形, 在pH 1.0、4.2、6.8、7的释放介质中累积释放度分别为99%(96 h)、96%(216 h)、81%(216 h)、76%(216 h)。结论: β -CD-PPP具有较低的临界胶束浓度和较高的载药量, 且能缓慢释放药物, 具有pH依赖性, 可作为新型给药载体。

关键词 β -环糊精; 聚丙烯酸; 聚甲基丙烯酸甲酯; 聚乙烯吡咯烷酮; 聚合物; 长春西汀; 药物载体

Feasibility Study on the Preparation of Micelles Using β -CD-PAA-PMMA-PVP Polymer as Carrier

DIAN Shao-na¹, LI Tao¹, YU Cai-ping², HUANG Shu-ling², YANG Fan² (1. Guangdong Provincial People's Hospital/Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China; 2. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the feasibility of the preparation of micelles using amphiphilic polymer β -cyclodextrin PAA-PMMA-PVP (β -CD-PPP) as carrier. METHODS: The vinpocetine micelles were prepared by solvent evaporation method using vinpocetine (VP) as model material and β -CD-PPP as carrier. The distribution of particle size, the concentration of critical micelle, IR characterization, morphological character and release rate *in vitro* of micelles in medium with different pH were all investigated. RESULTS: Drug-loading amount of prepared micelles was $(21.41 \pm 0.43)\%$, and entrapment efficiency was $(54.50 \pm 1.38)\%$; average particle size was 86.2 nm, and the particle was distributed dispersively; the concentration of critical micelle was 2.66×10^{-8} g/L, and most of drugs were coated with micelle and micelle ion was round in shape; accumulative release rates of micelle were 99% (96 h), 96% (216 h), 81% (216 h) and 76% (216 h) in medium with pH 1.0, 4.2, 6.8 and 7, respectively. CONCLUSIONS: β -CD-PPP with low concentration of critical micelle and high drug-loading amount can releases drug slowly in pH dependant manner and can be considered as drug delivery carrier.

KEYWORDS β -cyclodextrin; PAA; PMMA; Micelles; PVP; Polymer; Vinpocetine; Drug carrier

β -环糊精(β -CD)是环状低聚糖化合物, 具有疏水性的内腔和亲水性的外壁, 能够包合一定大小的疏水性客体分子^[1-2]。但由于其在水中溶解度小和对药物包合能力有限, 在一定程度上限制了其应用^[3]。因此本试验将 β -CD与两亲性嵌段聚合物结合, 通过可逆加成-断裂链转移聚合(RAFT)方法将亲水性的聚乙烯吡咯烷酮(PVP)和疏水性的聚丙烯酸(PAA)、聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)引入 β -CD母体环上, 从而得到具有两亲性星形结构的 β -CD-PAA-PMMA-PVP聚合物(β -CD-PPP)。由其自组装形成的胶束具有可包载疏水性药物的胶束内核与

β -CD内腔两个载药区域, 有望提高材料的载药能力, 成为良好的药物载体。本文以长春西汀(VP)为模型药物、 β -CD-PPP为载体, 制备VP载药胶束, 并对其理化性质和体外释药行为进行考察, 研究其可行性。

1 材料

1.1 仪器

UV-1750 紫外分光光度计、RF5301 PC 荧光分光光度计(日本岛津公司); 库尔特激光粒度分析仪(美国贝克曼库尔特公司)。

1.2 药品与试剂

VP原料药(东北制药集团股份有限公司, 批号: 20071210, 纯度: >99%); 甲醇、丙酮(天津市科密欧化学试剂有限公司); 苊(上海阿拉丁试剂有限公司); 十二烷基硫酸钠(SDS, 天津市福晨化学试剂厂); β -CD-PPP(广东药学院自制); 水为去离子水, 其他试剂均为分析纯。

[△] 基金项目: 广东省科技计划项目(No.2010B030700019); 广东省医学科研基金立项课题(No.A2012043)

* 副主任药师。研究方向: 医院药学。电话: 020-83827812-60231。E-mail: dianshaona@126.com

通信作者: 教授。研究方向: 药物新剂型与新技术。电话: 020-39352125。E-mail: gzyangfan@hotmail.com

2 方法与结果

2.1 VP胶束溶液的制备

采用溶剂挥发法,精密称取40.0 mg β -CD-PPP和10.0 mg VP,放入250 ml的干燥圆底烧瓶中,加入甲醇,溶解制成有机相溶液;某反应温度下磁力搅拌,将去离子水缓慢滴加入烧瓶的有机相溶液中,继续搅拌反应,减压旋蒸除去有机溶剂,用0.45 μ m微孔滤膜滤过除去未包裹的药物,得VP胶束溶液。

2.2 包封率和载药量的测定

配制系列浓度的VP甲醇溶液,采用紫外分光光度法在274 nm波长处测定VP吸光度。以吸光度(A)为纵坐标、质量浓度(c)为横坐标进行线性回归,得回归方程为 $A=0.0279c+0.0098$ ($r=0.9998$),VP检测质量浓度的线性范围为5.0~70.0 μ g/ml。精密量取制得的VP胶束溶液,以甲醇为溶剂破坏胶束释放出VP,适当稀释后测定VP的吸光度,代入回归方程计算胶束中的VP质量。根据公式计算VP胶束的包封率和载药量:包封率=胶束中的VP质量/VP加入量 \times 100%;载药量=胶束中的VP质量/(材料量+胶束中的VP质量) \times 100%。

2.3 VP胶束制备工艺的单因素考察

2.3.1 VP加入量。改变处方中VP的加入量为5.0、10.0、15.0、20.0、30.0、35.0 mg,其他条件同“2.1”项,分别测定所制胶束的包封率和载药量。结果所制胶束的包封率分别为31.45%、58.33%、39.41%、48.32%、23.22%、14.56%,载药量为3.78%、12.73%、12.87%、19.46%、14.41%、11.30%。当无VP析出时,随着VP加入量的增加,胶束的包封率和载药量呈上升趋势;有VP析出时,随着VP加入量的增加,析出VP越来越多,胶束的包封率和载药量呈下降趋势,综合考察上述问题,VP加入量在10.0%~30.0%。

2.3.2 甲醇-水体积比。改变处方中甲醇-水(去离子水)的体积比为1:1、2:1、3:1,其他条件同“2.1”项,分别测定所制胶束的包封率和载药量。结果所制胶束的包封率分别为16.10%、55.48%、43.72%,载药量为7.45%、21.71%、17.94%。表明甲醇-水的体积比对VP胶束的包封率和载药量有明显影响,具体取值有待进一步研究。

2.3.3 反应温度。分别在25、30、35、45 $^{\circ}$ C反应温度下,其他条件同“2.1”项,制备VP胶束,测定所制胶束的包封率和载药量。结果所制胶束的包封率分别为46.21%、54.26%、53.25%、43.79%,载药量为19.39%、21.34%、21.03%、17.96%。表明在不同温度下制备的胶束的包封率和载药量差异不大,但反应温度不能过高,温度过高会使溶剂挥发过快,不利于胶束的形成和VP包裹。因此,选择反应温度30 $^{\circ}$ C来制备载药胶束。

2.3.4 搅拌速度。处方中其他条件同“2.1”项,改变搅拌转速分别为800、1300、1800、2300 r/min制备VP胶束,测定所制胶束的包封率和载药量。结果所制胶束的包封率分别为50.64%、48.32%、56.84%、69.79%,载药量为20.2%、19.46%、22.13%、25.87%。表明随着搅拌速度的增大,VP胶束的包封率和载药量呈增加趋势,搅拌转速应控制在1300~2300 r/min。

2.3.5 减压旋蒸温度。处方中其他条件同“2.1”项,分别以30、40、50 $^{\circ}$ C为减压旋蒸温度制备VP胶束,测定所制胶束的包封率和载药量。结果所制胶束的包封率分别为46.37%、53.28%、26.91%,载药量为18.82%、21.2%、11.86%。表明随着减压旋蒸温度的升高,胶束的包封率和载药量明显下降,具体取值有待进一步研究。

2.3.6 搅拌时间。处方中其他条件同“2.1”项,改变搅拌时间为3、4、5、7 h制备VP胶束,测定所制胶束的包封率和载药量。结果所制胶束的包封率分别为49.73%、50.5%、52.75%、52.95%,载药量为19.91%、20.16%、20.87%、20.93%。表明搅拌时间对VP胶束的包封率和载药量的影响不大,故选择搅拌时间为4 h。

2.4 VP胶束制备工艺正交试验

根据“2.3”项下结果,选择VP加入量(A)、甲醇-水的体积比(B)、搅拌速度(C)、减压旋蒸温度(D)为正交设计因素,以载药量为评价指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验优化制备工艺处方。正交设计因素与取值见表1,试验结果及极差结果见表2,方差分析结果见表3。

表1 正交设计因素与取值

Tab 1 Factors and levels of orthogonal test

水平	因素			
	A,mg	B	C,r/min	D, $^{\circ}$ C
1	10.0	1:1	1300	30
2	20.0	2:1	1800	40
3	30.0	3:1	2300	50

表2 正交设计结果及极差分析

Tab 2 Orthogonal design and visual analysis

序号	因素				载药量,%
	A,mg	B	C,r/min	D, $^{\circ}$ C	
1	10.0	1:1	1300	30	6.67
2	10.0	2:1	1800	40	13.24
3	10.0	3:1	2300	50	9.97
4	20.0	1:1	1800	50	6.57
5	20.0	2:1	2300	30	9.31
6	20.0	3:1	1300	40	16.44
7	30.0	1:1	2300	40	6.09
8	30.0	2:1	1300	50	2.04
9	30.0	3:1	1800	30	13.92
K_1	9.960	6.443	8.383	9.967	
K_2	10.773	8.197	11.243	11.923	
K_3	7.350	13.443	8.457	6.193	
极差	3.423	7.000	2.860	5.730	

表3 正交设计结果的方差分析

Tab 3 Variance analysis of orthogonal test

误差来源	偏差平方和	自由度	F	P
A	19.193	2	1.448	
B	79.602	2	24.907	<0.05
D	50.899	2	10.184	
误差(C)	15.95	2		

由表2和表3结果可知,影响因素对载药量的影响顺序为 $B>D>A>C$,各因素水平的最优组合为 $A_3B_2C_2D_2$,即投药量为10.0 mg,甲醇-水的体积比为3:1,搅拌速度为1800 r/min,减压旋蒸温度为40 $^{\circ}$ C。以最优组合处方制备3批VP胶束,结果包封率为 $(54.50 \pm 1.38)\%$,载药量为 $(21.41 \pm 0.43)\%$ 。

2.5 VP胶束的表征

2.5.1 粒径及分布。采用库尔特激光粒度仪测定VP胶束的粒径,结果胶束的平均粒径为86.2 nm,多分散系数(PDI)为0.279,符合单分散性分布,表明其粒径分布较为均匀。VP胶束的粒径分布图见图1。

2.5.2 临界胶束浓度。采用稳态荧光探针法^[4],以芘为荧光探

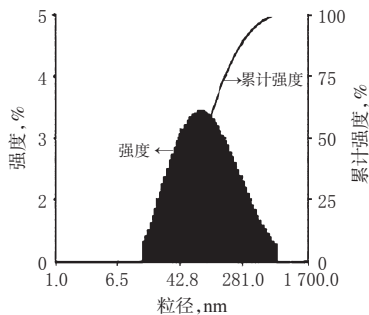


图1 VP胶束的粒径分布图

Fig 1 Particle size distribution of VP micelles

针,测定 β -CD-PPP的临界胶束浓度。称取 β -CD-PPP 15.0 mg,用去离子水溶解于100 ml量瓶中得空白胶束溶液。将空白胶束溶液用去离子水依次稀释成系列浓度溶液并定容于含 3×10^{-7} mol/L 芘的量瓶中,超声处理30 min,60 °C水浴2 h,放置过夜后分别测定各溶液的荧光光谱。设定固定发射波长为390.0 nm,激发波长扫描范围为300.0~350.0 nm,狭缝宽度为5 nm,扫描速度为中速。以338 nm和333 nm处的激发光强度之比(I_{338}/I_{333})对聚合物浓度的对数(lgc)作图,由2条直线的交点算出 β -CD-PPP的临界胶束浓度为 2.66×10^{-8} g/L。

2.5.3 红外表征。采用溴化钾压片法对VP胶束进行红外图谱的测定,光谱图见图2。

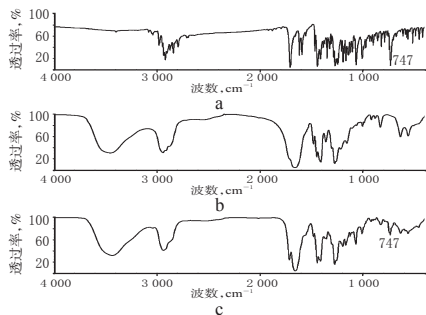


图2 红外光谱图

a. VP粉末;b. β -CD-PPP空白胶束冻干粉;c. VP胶束冻干粉

Fig 2 Infrared spectrum

a. VP powder; b. β -CD-PPP blank micelles freeze dried powder; c. VP micelles freeze dried powder

由图2可看出,VP的特征峰在 747 cm^{-1} ,苯环的芳氢面外弯曲振动峰($\gamma=C-H$),为强吸收峰; β -CD-PPP空白胶束的红外吸收光谱上无此特征峰;VP胶束的红外光谱中,与VP相对应的位置有一弱吸收峰,此峰强度较弱。此吸收峰的降低说明了大部分的VP已被包裹在胶束里面,但在冷冻干燥过程中,VP胶束发生了少量药物的泄漏。

2.5.4 形态。采用透射电镜,分别将合适浓度的VP胶束滴于铜网支持膜上,干燥,滴加2%磷钨酸于铜网上进行染色,2 min后用滤纸吸去多余液体,室温下自然干燥,观察胶束的形态,得到胶束的形态图见图3。

由图3中可看出,经磷钨酸染色后,能较好地透射电镜图中展现出胶束粒子的外观形貌,图中所显示区域内的胶束粒子均表现出较良好的圆形。

2.6 VP胶束的体外释放试验

为了确定VP在不同释放介质中的吸收峰,扫描了VP在0.1 mol/L盐酸溶液(pH 1.0)、含0.5% SDS的柠檬酸盐缓冲液

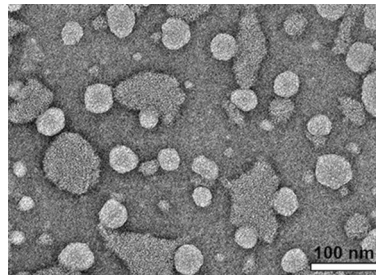


图3 VP胶束的透射电镜图

Fig 3 TEM of VP micelles

(pH 4.2)、含0.5% SDS的磷酸盐缓冲液(pH 6.8)和0.5% SDS水溶液(pH 7.0)中的紫外吸收,结果VP在4种释放介质中的最大吸收峰均为269 nm,且不被干扰。

分别精密量取2 ml VP胶束溶液,置于4个处理好的透析袋中(截留分子质量为7 000)中,两端夹紧,分别放于装有100 ml不同释放介质的带盖瓶子中,恒温(37.0 ± 0.5) °C、转速为100 r/min。于一定的间隔时间分别取样10 ml,同时补充等体积同温相对应的释放介质。以释放介质为空白对照,于269 nm处测定其吸光度,计算VP的含量。VP胶束的体外释放曲线见图4。

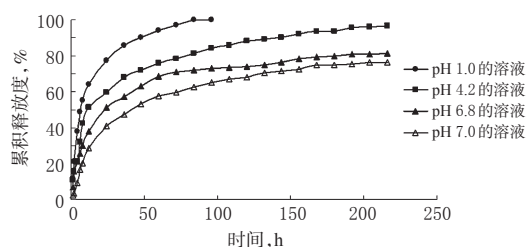


图4 VP胶束的体外释放曲线

Fig 4 Drug release of VP micelles in vitro

由图4可知,在pH 1.0的盐酸溶液中,VP胶束在96 h后累积释放度达99%,药物基本释放完毕;在pH 4.2、6.8的缓冲液和pH 7.0的水溶液中,VP胶束在216 h的累积释放度分别为96%、81%和76%,说明VP胶束具有一定的缓释效果。另外,释放介质的pH对VP胶束的体外释药行为有较大影响,在pH 1.0的介质中VP从胶束中释放的速度要明显快于在pH 4.2、6.8和7.0的介质中。这可能是因为VP为生物碱,其释放度呈现pH依赖性^[9]。

3 讨论

常规的溶剂挥发法制备胶束是先有机溶剂溶解药物和载体材料形成有机相,再缓慢滴加于搅拌的水相中,然后挥去有机溶剂即得^[9]。而本文中所用的 β -CD-PPP材料是具有星形结构的两亲性嵌段共聚物,在水中和与水互溶的有机溶剂中都有很好的溶解性,能够自发形成胶束溶液,所以在制备过程中,先将药物与材料一起溶于有机溶剂中,并在搅拌条件下缓慢滴加蒸馏水。把水相反滴到有机相中,能促使疏水性药物在形成胶束的同时进入胶束的内核,实现对药物的包载。

适当的甲醇用量能使药物与材料充分混合均匀,提高药物与材料之间的相互作用,有利于吸引药物进入胶束内核,从而提高载药胶束的载药量和包封率。另外,在减压旋蒸除去有机溶剂过程中,适当升高温度,有利于胶束的形成;但如果温度过高,体系中甲醇易沸腾且挥发速度过快,而胶束形成过

叶酸偶联壳聚糖载多西他赛纳米粒的制备^Δ

汪小乐^{1*}, 简晓顺¹, 庞廷媛¹, 程国华^{2#} (1. 广州医科大学附属肿瘤医院, 广州 510095; 2. 暨南大学药学院, 广州 510632)

中图分类号 R943 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)29-2740-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.29.17

摘要 目的:探索靶向叶酸受体的多西他赛(DTX)纳米粒的制备方法。方法:利用叶酸活性酯与壳聚糖分子上的氨基反应,制得叶酸偶联壳聚糖(FA-CTS);再通过离子交联法,将DTX作为模型药物,制备叶酸偶联壳聚糖载DTX(FA-CTS/DTX)纳米粒。以载药量、包封率、粒径和跨距为指标,采用星点设计-效应面法优化搅拌速率、DTX加入量、壳聚糖-三聚磷酸钠(CTS-STPP)的质量比,并进行验证。利用激光粒度分析仪测定纳米粒粒径大小及分布,在磷酸盐缓冲液中对载药纳米粒进行体外释药试验。结果:最优处方(处方量为2.5 mg)为搅拌速率为1 300 r/min、DTX加入量为0.58 μg,CTS-STPP的质量比为5.55。所制备的FA-CTS/DTX纳米粒平均粒径为(232.8±0.43) nm,包封率为(86.74±0.60)%、载药量为(25.29±3.21)%、跨距为0.039±1.02;30 min内累积释药40.22%,随后缓慢释放,24 h内累积释药80.25%。结论:成功制备具有缓释作用的FA-CTS/DTX纳米粒。

关键词 叶酸;壳聚糖;多西他赛;纳米粒;制备

Preparation of Docetaxel-loaded Folate-conjugated Chitosan Nanoparticles

WANG Xiao-le¹, JIAN Xiao-shun¹, PANG Ting-yuan¹, CHENG Guo-hua² (1. The Affiliated Tumor Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510095, China; 2. College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To explore the preparation method of Docetaxel (DTX)-loaded folate-conjugated chitosan nanoparticles. METHODS: Folate-conjugated chitosan (FA-CTS) was prepared through amino reaction of folic acid active ester and chitosan molecules; FA-CTS/DTX nanoparticles were prepared with ion cross-linking technique using DTX as model material. Using drug-loading amount, entrapment efficiency, particle size and span as index, central composite design-response surface methodology was used to optimize stir speed, adding amount of DTX, mass ratio of chitosan-sodium tripolyphosphate (CTS-STPP). The validation test was repeated. The particle size and size distribution were determined by laser scattering particle analyzer. FA-CTS/DTX nanoparticles release in phosphate buffer *in vitro* was determined. RESULTS: The optimal formulation (formulation amount of 2.5 mg) was as follows: stir speed at 1 300 r/min, 0.58 μg DTX, mass ratio of CTS-STPP was 5.55. Mean particle size of FA-CTS/DTX nanoparticles was (232.8 ± 0.43) nm, entrapment efficiency was (86.74 ± 0.60)%, drug-loading amount was (25.29 ± 3.21)% and span was 0.039 ± 1.02. 40.22% of nanoparticles were released within 30 min and then released slowly; accumulative release rate was 80.25% within 24 h. CONCLUSIONS: FA-CTS/DTX nanoparticles with the sustained release effect could be prepared successfully with the method.

KEYWORDS Folate; Chitosan; Docetaxel; Nanoparticles; Preparation

快,药物很难进入胶束的疏水性内核,导致胶束的载药量和包封率降低。

本研究显示,β-CD-PPP共聚物作为疏水性药物载体,具有较低的临界胶束浓度和较高的载药量,而且能缓慢地释放药物,作为新型给药载体具有良好的应用前景。

参考文献

[1] 赵明刚. 功能性β-环糊精衍生物的合成及应用[D]. 济南: 山东大学, 2007: 1-7.

Δ 基金项目: 广州市科技和信息化局应用基础研究专项(N0. 2011J4100055)

* 硕士研究生。研究方向: 靶向制剂。电话: 020-66673666-2010。E-mail: wangxiaole119@126.com

通信作者: 主任药师, 教授, 硕士研究生导师, 博士。研究方向: 临床药学和药物制剂。电话: 020-85223869。E-mail: ghcheng661203@126.com

[2] 廖才智. β-环糊精的应用研究进展[J]. 化工科技, 2010, 18(5): 69.

[3] 郭浩昌, 姜益光. β-环糊精衍生物的研究进展[J]. 科技与生活, 2012(10): 200.

[4] Guo B, Sun XY, Zhou YF, *et al.* Supramolecular self-assembly and controllable drug release of thermosensitive hyperbranched multiarm copolymers[J]. *Sci China: Chem*, 2010, 53(3): 487.

[5] 陈鹰, 李高, 李海平, 等. 长春西汀自微乳化释药系统的体外释药特性研究[J]. 中国药师, 2006, 9(12): 1 092.

[6] Suo A, Qian J, Yao Y, *et al.* Galactosylated poly (ethylene glycol) -b-poly (l-lactide-co-β-malic acid) block copolymer micelles for targeted drug delivery: preparation and *in vitro* characterization[J]. *Int J Nanomedicine*, 2010, doi: 10.2147/IJN.S14280.

(收稿日期: 2013-10-24 修回日期: 2014-04-18)