

mPEG-PCL 聚合物囊泡的制备 及 INS-mPEG₁₁₄-PCL₁₅₂ 囊泡体外释放特性考察

李伟炜¹, 王颐婷¹, 沈梅², 曾庆冰^{1*}

(1. 南方医科大学 药学院, 广州 510515;

2. 南方医科大学 公共卫生与热带医学学院卫生检测中心, 广州 510515)

[摘要] 目的:合成聚乙二醇单甲醚-聚己内酯(mPEG-PCL)嵌段聚合物,制备聚合物囊泡并考察胰岛素(INS)-mPEG₁₁₄-PCL₁₅₂的体外释药行为。方法:利用开环反应制备不同相对分子质量的 mPEG-PCL 聚合物并对其结构进行表征确定。采用薄膜水化法制备聚合物囊泡,激光散射法测定粒径,透射电镜考察表观形态,芘荧光探针法测定临界聚集浓度值(CAC)。利用 Bradford 法测定 INS-mPEG₁₁₄-PCL₁₅₂的载药情况及其体外释放行为。结果:空白囊泡粒径约 200 nm,CAC 均较小。20% 投药比例制备的载药囊泡模型药物 INS-mPEG₁₁₄-PCL₁₅₂利用度最大,包封率(62.80 ± 2.14)%,载药量(11.10 ± 0.34)%;体外释药考察前 2 h 突释 19.28%,48 h 后累积释药 55.05%,符合 Higuchi 模型。结论:mPEG-PCL 共聚物囊泡粒径适中,抗稀释能力强。INS-mPEG₁₁₄-PCL₁₅₂具有较明显突释效应,随着表面结合的 INS 的解离,逐渐呈良好缓释作用。

[关键词] 聚乙二醇单甲醚-聚己内酯;胰岛素;聚合物囊泡;载药量;体外释药特性

[中图分类号] R283.6;R914.5;R944.9;R917 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)23-0015-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014230015

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20141027.1527.009.html>

[网络出版时间] 2014-10-27 15:27

Preparation of mPEG-PCL Polymersomes and *in Vitro* Release Investigation of Insulin-loaded mPEG₁₁₄-PCL₁₅₂ Polymersomes

LI Wei-wei¹, WANG Yi-ting¹, SHEN Mei², ZENG Qing-bing^{1*}

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China;

2. Hygiene Detection Center, School of Public Health and Tropical Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare mPEG-PCL copolymer and polymersomes, then investigate *in vitro* release of INS-mPEG₁₁₄-PCL₁₅₂ polymersomes. **Method:** mPEG-PCL block copolymer was synthesized by ring-opening polymerization method, chemical structure of these polymers were characterized by FT-IR and ¹H-NMR. Polymersomes were prepared by film hydration method, particle size and apparent morphology were examined by dynamic light scattering and transmission electron microscope, respectively; critical aggregation concentration (CAC) was detected by fluorescence techniques with pyrene as a probe. Encapsulation efficiency, drug loading and *in vitro* release characteristic of INS-mPEG₁₁₄-PCL₁₅₂ polymersomes were determined by Bradford method. **Result:** Average particle sizes of blank polymersomes were about 200 nm, CAC were all low value. These prepared INS-mPEG₁₁₄-PCL₁₅₂ with 20% drug-copolymer ratio had maximize utilization ratio, average encapsulation efficiency (62.80 ± 2.14)% as well as drug loading (11.10 ± 0.34)%. *In vitro* cumulative release of INS-

[收稿日期] 20140719(006)

[基金项目] 广州市科技计划项目(12C32121550)

[第一作者] 李伟炜,在读硕士,从事药用生物材料的研究,Tel:15625065086,E-mail:1009721786@qq.com

[通讯作者] *曾庆冰,教授,博士生导师,从事药用生物材料研究,Tel:020-62789462,E-mail:zengqb@smu.edu.cn

mPEG₁₁₄-PCL₁₅₂ polymersomes in 48 h was about 55.05% , with relatively significant burst release at initial 2 h about 19.28% . **Conclusion:** These polymersomes have uniform particle size with a great anti-dilution capability. INS-mPEG₁₁₄-PCL₁₅₂ polymersomes show a significant burst release at initial stage and then a good sustained-release property with dissociation of surface model drug.

[**Key words**] polyethylene glycol monomethyl ether-polycaprolactone; insulin; polymersomes; drug loading; *in vitro* release characteristics

蛋白多肽类物质临床使用时存在体内代谢消除快速、组织渗透性较差和生物利用度较低等缺陷^[1]。胰岛素(insulin,INS)作为糖尿病患者的首选药物,生物利用度低且体内代谢失活快速,常选择注射给药且给药频繁较高,致使患者的顺应性差。聚乳酸(poly lactic acid,PLA)、聚己内酯(polycaprolactone,PCL)、聚乳酸-羟基乙酸共聚物[poly(lactic-co-glycolic acid),PLGA]等聚酯类材料作为递送载体,虽可以有效保护INS,具有一定缓释作用,但载药量较低,体内易被内质网吞噬消除,如PLGA-INS微囊^[2],PCL-INS和甲基丙烯酸酯共聚物(eudragit)-INS纳米粒^[3]等。随着两亲性聚合物的出现,载药粒子逐步克服了体内被内质网吞噬消除的弊端,具有一定长循环作用,如热敏性的PLA-聚乙二醇(polyethylene glycol,PEG)-PLA聚合物,载INS后体外释放长达数月,体内注射给药相容性良好,可作为INS注射剂的有效递送载体^[4];Mohsen等^[5]制备了载INS的PLGA-PEG纳米胶束,该载药体系虽呈现了良好缓释作用,但载药量仅3.9%;Sanal^[6]等利用PEG和PCL制备了可生物降解的INS注射凝胶,该凝胶剂中INS的释放可随温度的变化呈现脉冲式释放给药。本实验通过开环聚合反应合成了两亲性的聚乙二醇单甲醚-聚己内酯(mPEG-PCL)聚合物,其中亲水链段PEG因其独特的无毒性和无免疫原性而被广泛使用,PCL作为一类具有优异可降解性和生物相容性的聚酯材料而逐渐成为研究热点,该聚合物在特定的亲水-疏水链段体积比和溶剂体系中可自组装形成聚合物囊泡。

聚合物囊泡是一类由两亲性聚合物分散在水中时,通过自组装行为形成的具有类脂质体双分子层和亲水性内腔的球体结构,具有多重载药性^[7]。聚合物囊泡因其较大体积的亲水性内腔,对亲水性药物会有更好的包埋能力;而且双层膜结构也使得其更加稳定,体内给药时其亲水性外膜能有效避开内质网的吞噬,延长循环时间,提高被动靶向的能力^[8-10]。由于聚合物mPEG-PCL的独特结构和性质,赋予其聚合物囊泡具有优越的理化性质:①通过

调节聚合物分子的嵌段长度和数量,改变该聚合物囊泡的性质;②粒子粒径的可调控性;③双层子层结构可用于包埋不同极性的药物;④与脂质体和表面活性剂等小分子囊泡相比,具有更强的囊泡强度和稳定性,载药能力更大。

本实验选择INS为模型药物,采用薄膜水化法制备mPEG-PCL载INS聚合物囊泡,以最大限度避免了有机溶剂与INS的接触,并对该囊泡进行表征和体外释放情况考察。INS是亲水性多肽类物质,与囊泡的亲水性内腔极性相同,可随水化过程进入囊泡内腔中。囊泡粒子不仅对INS产生保护作用,减慢其在体内的降解失活,而且随着结构的崩解,内涵的INS会缓慢释放,达到良好缓释效果。

1 材料

3000Hs型光子相关光谱仪(英国Malvern公司),FA2204B型电子分析天平(上海佑科仪表有限公司),Nicolet6700型傅里叶红外光谱仪(美国赛默飞世尔公司),Avance II 400型核磁共振波谱仪(德国布鲁克公司),H-7650型透射电子显微镜(日本Hitachi公司),RF-5301PC型荧光检测仪(日本岛津)。

ϵ -己内酯(ϵ -CL,纯度99%)、聚乙二醇单甲醚(mPEG5000)、辛酸亚锡、苊均购自阿拉丁公司,胰岛素(INS)原料药(江苏万邦,批号1306A04),考马斯亮蓝G-250(美国MYM公司),试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 mPEG-PCL共聚物的合成与表征

2.1.1 mPEG-PCL共聚物的合成 采用开环聚合法。按设计的3种不同相对分子质量的共聚物,分别精密称取5 kDa的mPEG和 ϵ -CL适量,置于50 mL干燥圆底烧瓶中,加入适量甲苯作为分散溶剂,以1% ϵ -CL摩尔质量的辛酸亚锡作为催化剂,抽真空并通入N₂保护,135℃油浴加热搅拌24 h,减压旋蒸除去甲苯。粗产物用适量二氯甲烷溶解,用冰乙醚析出沉淀,抽滤收集产物。重复上述操作2次,产物最终在40℃条件下真空干燥至恒重。

2.1.2 FT-IR表征 取适量干燥后mPEG-PCL共

聚合物样品,利用溴化钾压片法进行压片处理,扫描 400 ~ 4 000 cm^{-1} 吸收光谱。图 1 为不同相对分子质量 mPEG-PCL 嵌段共聚物的红外吸收光谱,1 107 cm^{-1} 和 1 244 cm^{-1} 分别是 mPEG 链段中 C-O-C 和 C(=O)-O 的伸缩振动峰;1 725 cm^{-1} 是 PCL 链段 C=O 的伸缩振动峰及亚甲基 C-H 在 2 800 ~ 3 000 cm^{-1} 的吸收峰。通过红外图谱可初步证明该聚合物是由 mPEG 和 PCL 聚合生成。

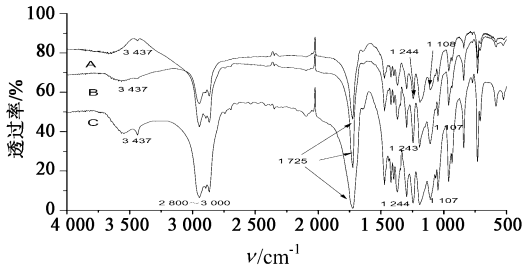


图 1 mPEG₁₁₄-PCL₈₅ (A) mPEG₁₁₄-PCL₁₂₄ (B) mPEG₁₁₄-PCL₁₅₂ (C) 的 IR

2.1.3 ¹H-NMR 表征 取适量聚合物溶于 CDCl₃ 中[以四甲基硅烷(TMS)为内标物]进行¹H-NMR 光谱测定(400 MHz)。以 mPEG₁₁₄-PCL₁₅₂ 的¹H-NMR 图谱为例,见图 2, g 峰(1.38 × 10⁻⁶), f 峰(1.65 × 10⁻⁶), e 峰(4.06 × 10⁻⁶) 归属于 PCL 链段, a 峰

(3.38 × 10⁻⁶) 和 b 峰(3.64 × 10⁻⁶) 则归属于 mPEG 链段。赵辉鹏等^[11] 认为疏水链段 PCL 中 h 峰(4.06 ppm)受其他峰干扰最小,可利用其与亲水链段 mPEG 中较大强度 b 峰(3.64 ppm)的积分面积计算 mPEG-PCL 聚合物的数均相对分子质量,公式为 $\bar{M}_n = M_{\text{mPEG}} + [(M_{\text{mPEG}} - M_{\text{OCH}_3})/44] \times 2 \times A_h/A_b \times 114$, 式中 M_{mPEG} 为 mPEG 相对分子质量(5 000), M_{OCH_3} 为甲氧基相对分子质量(31), 44 和 114 分别为 PEG 和 PCL 重复单元的摩尔质量, A_h/A_b 为 h 峰与 b 峰的积分面积比。计算得 3 个聚合物相对分子质量分别为 14 665, 19 130, 22 350, 与理论计算值接近,其聚合物结构单元分别为 mPEG₁₁₄-PCL₈₅, mPEG₁₁₄-PCL₁₂₄ 和 mPEG₁₁₄-PCL₁₅₂, 见表 1。

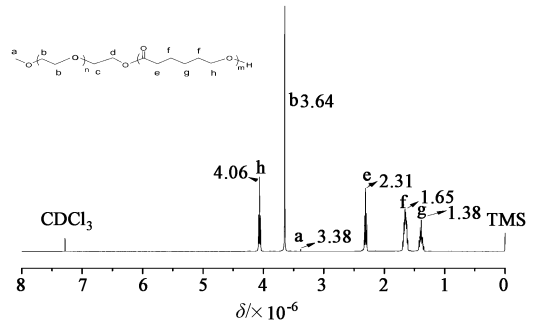


图 2 mPEG₁₁₄-PCL₁₅₂ 的¹H-NMR

表 1 mPEG-PCL 聚合物及囊泡的表征

共聚物	理论相对分子质量/ $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$	测得相对分子质量/ $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$	聚合物分子式	$f_{(\text{eo})}$	粒径($\bar{x} \pm s$)/nm	PDI	临界聚集浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
mPEG5k-PCL10k	15 000	14 665	mPEG ₁₁₄ -PCL ₈₅	0.342	204 ± 30	0.390	5.12 × 10 ⁻⁴
mPEG5k-PCL15k	20 000	19 130	mPEG ₁₁₄ -PCL ₁₂₄	0.262	202.8 ± 5.2	0.306	5.01 × 10 ⁻⁴
mPEG5k-PCL20k	25 000	22 350	mPEG ₁₁₄ -PCL ₁₅₂	0.225	182.4 ± 9.7	0.202	4.07 × 10 ⁻⁴

2.2 聚合物囊泡的制备与表征 采用薄膜水化法制备囊泡粒子。分别称取不同相对分子质量的聚合物 5 mg 置于 50 mL 圆底烧瓶中,加入二氯甲烷 2 mL 使溶解后过夜,减压旋蒸除去有机溶剂至瓶壁上形成一层均匀薄膜。将烧瓶置于 40 °C 真空干燥箱中干燥处理 8 h,除去残余有机溶剂。向烧瓶中加入 PBS 缓冲液 5 mL,置于 60 °C 水浴中搅拌水化 6 h,得 1 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 空白囊泡溶液。利用马尔文激光粒度仪和透射电子显微镜分别对囊泡粒子的粒径、多分散指数(polydispersity, PDI) 和表观形态进行考察。

两性性聚合物在水化过程中通过自组装形成粒子形态的差异,主要取决于组装系数(p), $p = v/a_0 l_c$ (v 为疏水链段体积, l_c 为疏水链段链长, a 为界面面积)^[12-13]。当 $p \leq 1/3$, 形成球状胶束; $1/3 < p \leq 1/2$,

形成蠕虫状胶束; $1/2 < p \leq 1$, 形成囊泡, 见图 3^[14]。亦可通过亲水链段体积所占聚合物分子总体积的百分系数 $f_{(\text{eo})}$ 确定聚合物自组装形成的粒子形态, 当 $0.2 < f_{(\text{eo})} \leq 0.42$ 时可形成囊泡结构, 可通过 PEG 和 PCL 的熔化密度(melt densities, MD) 及其相对分子质量分别计算二者的体积, 进而计算亲水链段 PEG 的体积百分系数^[15], MD_{PEG} 和 MD_{PCL} 分别为 1.13, 1.14 $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ 。

由表 1 可知, 设计的 3 个不同相对分子质量 mPEG-PCL 的 $f_{(\text{eo})}$ 均在 0.20 ~ 0.42, 说明可自组装形成囊泡。在水化过程当中, 亲水性链段保持不变, 随着疏水性 PCL 链段的生长, 聚合物自组装膨胀受到水化介质的排斥力逐渐增大, 所形成粒子结构更

加紧密,故粒径和 PDI 减小,性状更加均一。

图 3 为 mPEG₁₁₄-PCL₁₅₂ 的透射扫描电镜图,制备的样品囊泡溶液质量浓度 1 g·L⁻¹。由图 3a 可看出粒子呈类圆形,粒径均一,粒子大部分紧密相连挨靠,呈片状分布;部分分散开的明显可见圆形双层膜结构,见图 3b 所示,双层膜宽(*d*)约 5~6 nm。

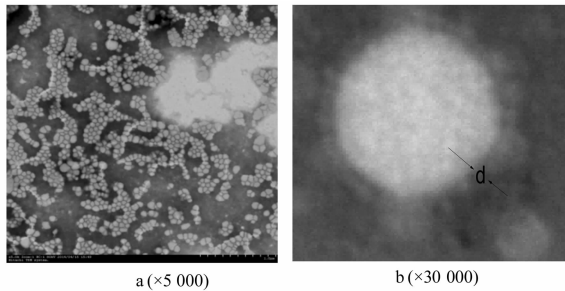


图 3 mPEG₁₁₄-PCL₁₅₂ 聚合物囊泡 TEM

2.3 临界聚集浓度的测定 采用苾荧光探针法测定空白囊泡溶液的临界聚集浓度 (critical aggregation concentration, CAC)。以 1 g·L⁻¹ 空白囊泡液为母液稀释配置 0.1~1×10⁻⁵ g·L⁻¹ 共 9 个不同质量浓度的溶液,加入适量苾-丙酮溶液,使得每管中苾的质量浓度 5.93×10⁻⁷ mol·L⁻¹,50℃鼓风干燥除尽丙酮后,65℃恒温水浴 3 h,使苾增溶进入胶束后冷却放置过夜,待测。在发射波长 393 nm,激发狭缝宽度和发射狭缝宽度均为 3 nm 条件下扫描 300~370 nm,记录不同质量浓度下苾的荧光光谱图,以 log*C* 与苾在 334 nm 和 337 nm 处强度比值 (*I*₃₃₇/*I*₃₃₄) 作图,低质量浓度与高质量浓度所成直线拐点即为该囊泡溶液的 CAC,见图 4。

由图 4A 可知,随着质量浓度的增大最大吸收峰的波长出现了红移,由低质量浓度时的 334 nm 红移至 337 nm。利用 *I*₃₃₇/*I*₃₃₄ 比值对质量浓度的对数作图,结果发现低质量浓度时比值基本保持不变,当质量浓度达一定值后,比值急剧增大,拐点对应的质量浓度可视为该共聚物囊泡溶液的 CAC。图 4B 中对应的 mPEG₁₁₄-PCL₈₅, mPEG₁₁₄-PCL₁₂₄, mPEG₁₁₄-PCL₁₅₂ 的 CAC 分别为 5.12×10⁻⁴, 5.02×10⁻⁴, 4.07×10⁻⁴ g·L⁻¹,比小分子表面活性剂的 CAC 低若干个数量级,抗稀释能力极强。另外,随着 PCL 链段的递增,CAC 呈现递减趋势,但当 PCL 链段相对分子质量较小时,这一递减趋势更加突出^[16]。由于 PCL 增长引起的排斥力增大会使得囊泡粒子的结构更趋于稳定状态。当囊泡溶液的质量浓度小于 CAC 时,粒子结构会发生崩解;反之,只有当溶液质量浓度达到 CAC 时,分散的链段才能自发聚集形成

囊泡结构,即 CAC 越小,结构越稳定的囊泡粒子其抗稀释能力更强。聚合物纳米粒子的 CAC 不仅与疏水链段有关,也与亲水链段相关,当疏水链段链长保持不变时,其 CAC 随着亲水链段链长的增大而增大,形成的纳米粒子抗稀释能力减弱^[17]。

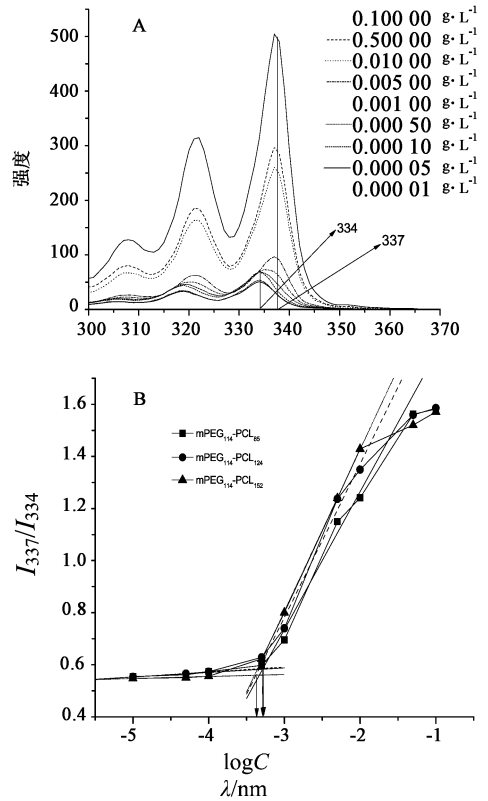


图 4 不同 mPEG-PCL 聚合物囊泡的
荧光激发光谱 (a) 及其临界聚集浓度

2.4 INS-mPEG₁₁₄-PCL₁₅₂ 囊泡的制备及其包封率、载药量的测定

2.4.1 载药囊泡的制备 综合考虑囊泡粒子的粒径,PDI 及 CAC,发现在符合亲水链段 *f*_(eo) 0.20~0.42 时,制备的 3 个不同相对分子质量囊泡中,以 mPEG₁₁₄-PCL₁₅₂ 聚合物囊泡粒径最小,分散度均一,抗稀释能力最强,性状最佳,故选择其作为 INS 载体,通过薄膜水化法制备 INS-mPEG₁₁₄-PCL₁₅₂ 囊泡。称取 mPEG₁₁₄-PCL₁₅₂ 聚合物 5 mg,共 9 份,按 40%,20%,10% 质量分数投药比例依次加入 1 g·L⁻¹ INS 溶液 (pH 5.3) 2,1,0.5 mL 和适量 pH 5.3 的 PBS 缓冲液,制备方法同 2.2 项。mPEG-PCL 聚合物链段在溶液体系中呈电中性,INS 的等电点 5.3,故保持水化体系 pH 为 5.3 可使 INS 显电中性,INS 随水化介质包埋进入囊泡内腔的行为不受电荷性影响。

2.4.2 包封率及载药量的测定 水化反应结束后,

以 $12\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 高速离心处理样品 25 min, 取上清液, 采用考马斯亮蓝 G-250 染色法 (Bradford 法) 测定 INS 含量^[18]。上清液中加入考马斯亮蓝 G-250 染色液, 静置 20 min, 于 595 nm 处测定吸光度 (A), 计算包封率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$) 分别为 $(33.75 \pm 1.62)\%$, $(62.80 \pm 2.14)\%$, $(42.90 \pm 0.57)\%$, 载药量 ($\bar{x} \pm s, n = 3$) 依次为 $(11.90 \pm 0.50)\%$, $(11.10 \pm 0.34)\%$, $(4.11 \pm 0.05)\%$ 。结果表明当以 20% 和 40% 投料时, 载药量约 11%, 因为形成囊泡的粒子粒径和载药内腔大小相近, 故载药能力相似; 但当以 10% 投料时, 理论上模型药物 0.5 mg 应极大部分载入到囊泡内腔中, 但实际测得得包封率和载药量相对较低, 因为采用水化法制备囊泡时, 亲水性 INS 均匀分散在溶剂当中, 在聚合物自组装过程中, INS 随分散溶剂部分包封进入囊泡内腔, 少量可吸附结合在囊泡表面, 但水化体系始终保持均一, 故不能完全对药物进行包埋。

2.4.3 标准曲线的建立 以 $0.1\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ INS 标准母液分别配制 $20 \sim 100\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 共 7 个质量浓度的待测溶液, 按 2.4.2 项下方法测定 A , 以 INS 质量浓度 (C) 为横坐标, A 为纵坐标, 得回归方程 $A = 0.004\ 8C + 0.159\ 6 (r = 0.995\ 9)$ 。

2.5 INS-mPEG₁₁₄-PCL₁₅₂囊泡的体外释药考察 选取 20% 这一投药比例所制备的载药囊泡进行体外释药研究。量取以 20% 投药比例制备的载药囊泡溶液 1 mL, 共 3 份, 溶于共计 10 mL 的 PBS ($0.01\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 5.3) 缓冲液中, 转移至 50 mL 离心管中, $37\ ^\circ\text{C}$ 恒温水浴, 于 $70\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 匀速搅拌, 保持漏槽条件。在规定的时间内取出样品, $12\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 高速离心处理 25 min, 取上清液进行 INS 含量测定, 并补充相同体积温度的新鲜介质至 50 mL 离心管中继续释药考察, 计算规定时间内累积释放量。以释放时间为横坐标, 累积释放率为纵坐标, 绘制 INS-mPEG₁₁₄-PCL₁₅₂ 的体外释放曲线, 见图 5。结果显示载药囊泡的体外释放有较明显的突释效应, 因为采用薄膜水化法制备该载药粒子, 所以 INS 分散在水化介质中, 随着自组装过程的进行, 亲水性 INS 可能

通过氢键或其他结合力被部分结合在囊泡的亲水性表面, 故在释放初期, 表面结合的 INS 首先被解离释放出来, 形成突释效应。试验常以 2 h 内的释放量考察载药粒子的突释行为, 该载药囊泡 2 h 内释药 19.28%; 随后 48 h 内累积释药率 55.05%, 释放后期具有良好的缓释性能, 因为随着表面结合药物的释放, 囊泡粒子也逐渐开始崩解, 药物从内腔中缓慢释放出来, 随着考察时间的延长, 囊泡内 INS 药物浓度开始逐渐减少, 内外渗透压逐渐降低, 故后期的释放会越来越缓慢。

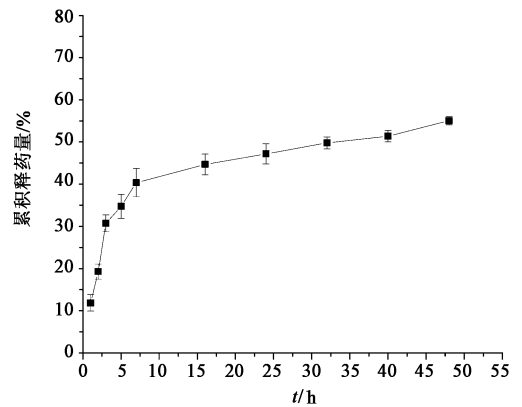


图 5 INS-mPEG₁₁₄-PCL₁₅₂ 的体外释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.6 体外释放的拟合方程 模型药物从载药系统中释放出来是一个复杂的过程, 其释放行为受到很多因素的影响, 如聚合物的降解行为、亲水链段/疏水链段的性质、药物与聚合物间的相互作用等^[19]。采用体外释放曲线模型对数据进行方程拟合, 考察粒子的体外释药行为, 分别采用零级动力学模型、一级动力学模型和 Higuchi 模型^[20] 对 INS-mPEG₁₁₄-PCL₁₅₂ 的体外释药情况进行拟合, 见表 2。结果显示在 0 ~ 48 h 释药拟合方程中, 三者的拟合相关系数 (r) 均较低, 可能是因为前 2 h 的突释效应对整体释放行为的拟合造成了较大影响。为了更加直观地考察药物的释放模型, 扣除前 2 h 的累积释放后对 3 ~ 48 h 的累积释放率进行重新拟合, 得三者的 r 较 0 ~ 48 h 拟合方程增大很多, 其中以 Higuchi 模型所得 r 最大, 故认为 INS-mPEG₁₁₄-PCL₁₅₂ 的缓释释药行

表 2 INS-mPEG₁₁₄-PCL₁₅₂ 的体外释药拟合方程

模型	0 ~ 48 h	3 ~ 48 h
零级动力学	$Q = 0.007t + 0.260\ 1 (r = 0.847\ 9)$	$Q = 0.004\ 7t + 0.340\ 1 (r = 0.944\ 6)$
一级动力学	$\ln(1 - Q) = -0.011\ 5t - 0.304\ 4 (r = 0.891\ 9)$	$\ln(1 - Q) = -0.008\ 4t - 0.409\ 8 (r = 0.961\ 3)$
Higuchi	$Q = 0.060\ 2t^{1/2} + 0.161\ 9 (r = 0.918\ 8)$	$Q = 0.041\ 9t^{1/2} + 0.262\ 1 (r = 0.976\ 4)$

为与 Higuchi 模型较相近。

3 讨论

本文以 mPEG 和 PCL 为两亲性嵌段合成聚合物 mPEG-PCL, 共聚物结构经 FT-IR 和 $^1\text{H-NMR}$ 表征确定, 所得聚合物亲水链段体积分数符合 $f_{\text{co}} = 0.20 - 0.42$, 可自发组装形成具有亲水性内腔的囊泡结构。根据有关文献报道, mPEG-PCL 形成的粒子如胶束, 微球等, 很多是应用于疏水性药物的包埋^[21]。因此, 聚合物囊泡的制备也为更多亲水性药物的包埋提供了更加适宜的选择。另一方面, 我们也可以利用 mPEG-PCL 做为基础链段, 与某些具有特殊生物性能的物质聚合生成具有更高优异性能的聚合物材料, 如朱亚明等^[22] 可控合成了 mPEG-PCL-PDMAEMA, 以 mPEG-PCL 为基础链段, 聚合了具有 PH 和温度双重响应性的共聚物; Liu^[23] 合成三嵌段共聚物 mPEG-PCL-PDEA, 该共聚物因聚电解质 PDEA 与多肽类物质的电性作用, 具有很高的包埋能力, 同时因为 mPEG-PCL 嵌段的缓慢降解, 也具有出色的缓释作用。

聚合物囊泡的制备方法有直接溶解法, 溶剂挥发法, 薄膜水化法, 透析法等, 本文以薄膜水化法制备囊泡粒子, 水化过程中水化介质通过共聚物分子间隙进入内层, 使得共聚物膨胀隆起自组装形成囊泡结构。薄膜水化法所制备囊泡具有较广泛的粒度分布, 但是该方法操作简单, 条件温和, 可以最大限度的减少有机溶剂的用量, 适用于蛋白多肽类药物载药粒子的制备。

INS-mPEG₁₁₄-PCL₁₅₂ 纳米囊泡的包封率和载药量相对较高, 该载药囊泡体外释药考察虽然有较明显突释行为, 与粒子表面亲水层结合药物的首先解离有关, 适当的突释效应可以让药物的血药浓度迅速升高, 起到治疗作用; 随后, 该载药粒子呈现缓慢释放, 具有良好缓释作用。我们也希望在今后的研究中, 可以通过对制备工艺的进一步改进, 以获得更加满意的囊泡制备工艺, 并能更加深入探讨该载药囊泡的体内作用与降解机制。

[参考文献]

[1] Torchilin V P, Lukyanov A N. Peptide and protein drug delivery to and into tumors: challenges and solutions [J]. Drug Discov Today, 2003, 8(6) : 259.
[2] Yamaguchi Y, Takenaga M, Kitagawa A, et al. Insulin-loaded biodegradable PLGA microcapsules: initial burst release controlled by hydrophilic additives [J]. J Control

Release, 2002, 81(3) : 235.
[3] Damgé C, Maincent P, Ubrich N. Oral delivery of insulin associated to polymeric nanoparticles in diabetic rats [J]. J Control Release, 2007, 117(2) : 163.
[4] Al-Tahami K, Oak M, Mandke R, et al. Basal level insulin delivery: *in vitro* release, stability, biocompatibility, and *in vivo* absorption from thermosensitive triblock copolymers [J]. J Pharm Sci, 2011, 100(11) : 4790.
[5] Ashjari M, Khoee S, Mahdavian A R, et al. Self-assembled nanomicelles using PLGA-PEG amphiphilic block copolymer for insulin delivery: a physicochemical investigation and determination of CMC values [J]. J Mater Sci Mater Med, 2012, 23(4) : 943.
[6] Payyappilly S, Dhara S, Chattopadhyay S. Thermoresponsive biodegradable PEG-PCL-PEG based injectable hydrogel for pulsatile insulin delivery [J]. J Biomed Mater Res Part A, 2014, 102(5) : 1500.
[7] Lee J S, Feijen J. Polymersomes for drug delivery: design, formation and characterization [J]. J Control Release, 2012, 161(2) : 473.
[8] Discher D E, Eisenberg A. Polymer vesicles [J]. Science, 2002, 297(5583) : 967.
[9] Photos P J, Bacakova L, Discher B, et al. Polymer vesicles *in vivo*: correlations with PEG molecular weight [J]. J Control Release, 2003, 90(3) : 323.
[10] Discher B M, Won Y Y, Ege D S, et al. Polymersomes: tough vesicles made from diblock copolymers [J]. Science, 1999, 284(5417) : 1143.
[11] 赵辉鹏, 张悦, 查刘生, 等. 用 NMR 分析可生物降解的两亲性嵌段共聚物的相对分子质量和组成 [J]. 分析测试学报, 2006, 25(4) : 6.
[12] Motornov M, Roiter Y, Tokarev I, et al. Stimuli-responsive nanoparticles, nanogels and capsules for integrated multifunctional intelligent systems [J]. Prog Polym Sci, 2010, 35(1/2) : 174.
[13] Discher D E, Ortiz V, Klein M L, et al. Emerging applications of polymersomes in delivery: From molecular dynamics to shrinkage of tumors [J]. Prog Polym Sci, 2007, 32(8/9) : 838.
[14] Blanz A, Armes S P, Ryan A J. Self-assembled block copolymer aggregates: from micelles to vesicles and their biological applications [J]. Macromol Rapid Commun, 2009, 30(4/5) : 267.
[15] Ahmed F, Discher D E. Self-porating polymersomes of PEG-PLA and PEG-PCL: hydrolysis-triggered controlled release vesicles [J]. J Control Release, 2004, 96(1) : 37.

超滤法去除生脉注射液中细菌内毒素的应用分析

支兴蕾, 李存玉, 陈颖, 彭国平*
(南京中医药大学药学院, 南京 210023)

[摘要] 目的:考察超滤技术应用于去除生脉注射液中细菌内毒素的可行性,为该制剂的临床用药安全提供参考。方法:采用不同材质和截留相对分子质量的超滤膜对生脉药液中间体进行超滤,利用HPLC和动态浊度法分别检测超滤前后药液中有有效成分(人参皂苷Rg₁, Re, Rb₁及五味子醇甲)和细菌内毒素含量的变化,流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0~30 min, 0~10% A; 30~40 min, 10%~23% A; 40~50 min, 23% A; 50~85 min, 23%~60% A; 85~95 min, 60%~100% A),检测波长203 nm,优选生脉注射液的超滤工艺。结果:经不同孔径、材质的超滤膜超滤后,生脉药液中间体各有效成分的透过率存在明显差异;100 kDa复合材质超滤膜对各有效成分的透过率均>99%,对细菌内毒素去除率达97.79%,明显优于相同孔径的聚醚砜超滤膜。结论:使用100 kDa复合材质超滤膜超滤生脉注射液的适用性良好,超滤技术在保证有效成分透过率的同时可有效去除细菌内毒素,为生脉注射液制备工艺的改进提供实验依据。

[关键词] 生脉注射液; 细菌内毒素; 超滤; 人参皂苷类成分; 五味子醇甲

[中图分类号] R283.6; R284.1; R286.0 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)23-0021-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014230021

Research on Application of Removing Bacterial Endotoxin in Shengmai Injections by Ultrafiltration

ZHI Xing-lei, LI Cun-yu, CHEN Ying, PENG Guo-ping*

(Schol of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

[收稿日期] 20140505(013)

[基金项目] 江苏省高校自然科学基金项目(12KJB360009)

[第一作者] 支兴蕾, 讲师, 博士, 从事中药化学分析研究, Tel:13601588491, E-mail:12317231@qq.com

[通讯作者] * 彭国平, 研究员, 博士, 从事中药化学研究, Tel:02586798186, E-mail:guopingpeng@sohu.com

- [16] Xie W H, Zhu W P, Shen Z Q. Synthesis, isothermal crystallization and micellization of mPEG-PCL diblock copolymers catalyzed by yttrium complex[J]. Polymer, 2007, 48(23):6791.
- [17] Lee H, Zeng F Q, Dunne M, et al. Methoxy poly(ethylene glycol)-block-poly(delta-valerolactone) copolymer micelles for formulation of hydrophobic drugs[J]. Biomacromolecules, 2005, 6(6):3119.
- [18] 王孝平, 刑树礼. 考马斯亮蓝法测定蛋白质含量的研究[J]. 天津化工, 2009, 23(3):40.
- [19] Gu C H, Le V, Lang M D, et al. Preparation of polysaccharide derivates chitosan-graft-poly(epsilon-caprolactone) amphiphilic copolymer micelles for 5-fluorouracil drug delivery[J]. Colloid Surface B, 2014, 116:745.
- [20] Wang Y J, Chien Y C, Wu C H, et al. Magnolol-loaded core-shell hydrogel nanoparticles: drug release, intracellular uptake, and controlled cytotoxicity for the inhibition of migration of vascular smooth muscle cells[J]. Mol Pharm, 2011, 8(6):2339.
- [21] Dong P W, Wang X H, Gu Y C, et al. Self-assembled biodegradable micelles based on star-shaped PCL-b-PEG copolymers for chemotherapeutic drug delivery[J]. Colloid Surface A, 2010, 358(1/3):128.
- [22] 朱亚明, 张琰, 刘子路, 等. MePEG-b-PCL-b-PDMAEMA的可控合成及性能研究[J]. 化学学报, 2010, 68(23):2449.
- [23] Liu G J, Ma S, Li S, et al. The highly efficient delivery of exogenous proteins into cells mediated by biodegradable chimaeric polymersomes[J]. Biomaterials, 2010, 31(29):7575.

[责任编辑 刘德文]