

紫杉醇聚合物胶束的制备及其 pH 响应性能

杜林娇, 岳巧欣, 李真真, 臧琛, 易红, 陈燕军*

(中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的:制备以具有 pH 响应性能的聚乙二醇-聚乳酸[poly(ethylene glycol)-poly(lactic acid), PELA]-聚- β -氨基酯(PBAE)为载体的纳米胶束,提高紫杉醇在水中溶解度。方法:Michael 加成合成 PBAE 共聚物,通过核磁共振波谱法表征其结构,酸碱滴定法测定碱解离常数(dissociation constant of a base, pK_b),荧光法测定临界胶束浓度(critical micelle concentration, CMC)。采用薄膜水化法制备载紫杉醇纳米胶束,HPLC 测定载药量和包封率,激光粒度仪测定粒径及分布,透射电镜表征其形态,透析袋透析法测定纳米胶束在不同 pH 条件下的释放特性。结果:PELA 和 PBAE 的 pK_b 分别为 7.1 和 6.5, CMC 分别为 3.31, 4.79 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 载药量分别为 12.37% 和 12.05%, 包封率分别为 70.55% 和 68.53%, 且紫杉醇胶束 1 周内稳定。体外释放试验表明非 pH 响应材料随介质 pH 降低,药物释放略微增加;而 pH 敏感材料在弱酸性条件下药物释放明显加快。结论:PBAE 作为纳米载体能明显提高紫杉醇的水溶性,载药量较高且稳定,具有明显的 pH 敏感性。

[关键词] 紫杉醇; 胶束; 聚乙二醇-聚乳酸; 聚- β -氨基酯; pH 敏感性; 临界胶束浓度

[中图分类号] R283.6; R284.1; R284.2; R944.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)10-0009-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015100009

Preparation of Paclitaxel-loaded Copolymer Micelles and Its pH-responsive Properties DU Lin-jiao, YUE Qiao-xin, LI Zhen-zhen, ZANG Chen, YI Hong, CHEN Yan-jun* (Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To synthesize poly(ethylene glycol)-poly(lactic acid)-poly(β -amino ester)(PBAE) block polymer and prepare paclitaxel-loaded micelles to enhance its solubility in aqueous milieu. **Method:** PBAE was synthesized by Michael addition reaction, its structure was characterized by $^1\text{H-NMR}$, its dissociation constant of a base (pK_b) was determined by acid-base titration, critical micelle concentration (CMC) of copolymer was measured by pyrene fluorescence spectroscopy. Paclitaxel loaded copolymer micelles were prepared by membrane hydration methods. Drug loading efficiency (DL) and entrapment efficiency (EE) of micelles were evaluated by high-performance liquid chromatography (HPLC). The size and size distribution of micelles were determined by nanoparticle size analyzer. The structure of micelles was manifested by transmission electron microscopy. *In vitro* release was performed in phosphate buffered saline at different pH values. **Result:** CMC of PELA and PBAE were 3.31, 4.79 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, pK_b values of them were 7.1 and 6.5, their DL were 12.37% and 12.05%, EE were 70.55% and 68.53%, respectively. Paclitaxel loaded micelles were stable up to one week at 4 $^{\circ}\text{C}$. *In vitro* release study showed that drug release from PELA micelles increased slightly with decrease of pH. However, drug release accelerated obviously upon acidic environment (pH 6.5 and 5.5) from pH responsive polymer micelles. **Conclusion:** PBAE shows high performance in increasing paclitaxel solubility, high drug loading and long stability, as well as pH controlled drug release from micelles.

[Key words] paclitaxel; micelles; poly(ethylene glycol)-poly(lactic acid); poly(β -amino esters); pH-responsive; critical micelle concentration

聚乙二醇-聚乳酸[poly(ethylene glycol)-poly(lactic acid), PELA]是人工合成的可生物降解的高

[收稿日期] 20150129(011)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2014ZX09304307001-002-005);北京市自然科学基金项目(2152036)

[第一作者] 杜林娇,在读硕士,从事中药药剂研究, Tel:010-84036059, E-mail:dulinjiao0603@126.com

[通讯作者] * 陈燕军,博士,研究员,从事中药新型给药系统的研究, Tel:010-84036059, E-mail:yjchen@icmm.ac.cn

分子聚合物,由亲水性聚乙二醇(PEG)嵌段和疏水性聚乳酸(PLA)嵌段链接而成。PLA 在体内的最终代谢产物为水和二氧化碳,PEG 可避免其被网状内皮系统的识别与吞噬,PELA 作为新型纳米载体,在增加载药量、降低突释效应、延长药物体内滞留时间等方面均具有独特优势^[1]。PELA-聚-β-氨基酯 [poly(β-amino ester)] (PBAE)作为一种新型的三嵌段阳离子 pH 响应可降解聚合物,在水相环境中可自组装形成稳定疏水性内核-亲水性外壳的纳米微粒,并对肿瘤局部 pH 变化产生响应,选择性释放药物^[2]。其可作为疏水性肿瘤药物的纳米载体,提高药物的溶解度和生物利用度^[3]。

紫杉醇是乳腺癌治疗中使用最为广泛的抗微管药物,能促使微管蛋白聚合成微管,并抑制微管的解聚,抑制细胞分裂和增殖,导致细胞死亡。但紫杉醇极难溶于水,使用聚氧乙烯蓖麻油-无水乙醇(50:50)混合液为助溶剂的紫杉醇注射剂,由于聚氧乙烯蓖麻油在人体内降解时会释放组胺,在用药前给予预处理的情况下患者仍会产生不同程度过敏反应、骨髓抑制和神经毒性等毒副作用^[4]。市场上紫杉醇的剂型包括乳剂、包合物、脂质体、纳米粒、植入剂和药物释放支架等,其中脂质体研究较多。但脂质体的稳定性、包封率等因素限制了其推广,与传统注射剂相比,紫杉醇脂质体的成本较高,加重了病人的经济负担^[5]。本实验以 PBAE 为载体,选择紫杉醇为模型药,制备包载紫杉醇的聚合物胶束,并对聚合物的临界胶束浓度、载药能力、体外释药行为进行系统研究,提高紫杉醇在水中的溶解度,并实现其在肿瘤弱酸性条件下靶向释放。

1 材料

FE20 型数显 pH 计(瑞士梅特勒-托利多集团),DL-20A 型高效液相色谱仪(日本岛津),F-2000 型荧光分光光度计和 H-7650 型透射电子显微镜(日本日立),NanoZS90 型纳米激光粒度测定仪(德国马尔文公司)。聚乙二醇-聚乳酸(PELA)和 PELA-聚-β-氨基酯(PBAE)均为自制,苾(美国西格玛奥德里奇公司),紫杉醇(瑞士阿达马斯公司,批号 P1086434),水为去离子水,试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 PELA 表征 将 PELA 丙烯酰化得中间产物丙烯酰化聚乙二醇-聚乳酸(PELA-A),加入 4-氨基苯甲酸乙酯和 1,9-壬二醇二丙烯酸酯,合成 PBAE。

2.1.1 核磁表征^[5-6] 运用核磁共振波谱法(nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR)对

PELA 和 PBAE 进行表征,考察化合物的结构,见图 1。结果显示 PELA 中 CH₂ 的峰在 δ 分别为 3.8, 1.6, 5.3 处,PELA-A 具有 PELA 的峰,a,b,c 分别为丙烯酰根结构中的 3 个 H,合成 PBAE 后 a,b,c 峰均消失,在 δ 2~3 处出现了 d 峰,为 1,9-壬二醇二丙烯酸酯的特征峰,证明已接上聚-β-氨基酯^[7]。

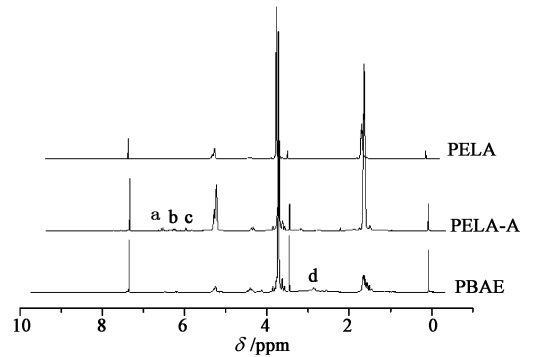


图 1 PELA,PELA-A,PBAE 的¹H-NMR
Fig. 1 ¹H-NMR spectra of PELA,PELA-A and PBAE

2.1.2 碱解离常数(pK_b)的测定^[8] 取共聚物 50 mg 溶于水(50 mL)中,用 0.1 mol·L⁻¹盐酸调节 pH 3.0~4.0。加 0.1 mol·L⁻¹氢氧化钠滴定,每次 20 μL,测定溶液 pH,绘制滴定曲线,见图 2。结果显示 PELA 和 PBAE 的 pK_b 分别为 7.1, 6.5, PBAE 在 pK_b 附近有明显突变,而 PELA 变化不明显,证明与 PELA 相比,PBAE 为 pH 响应材料。

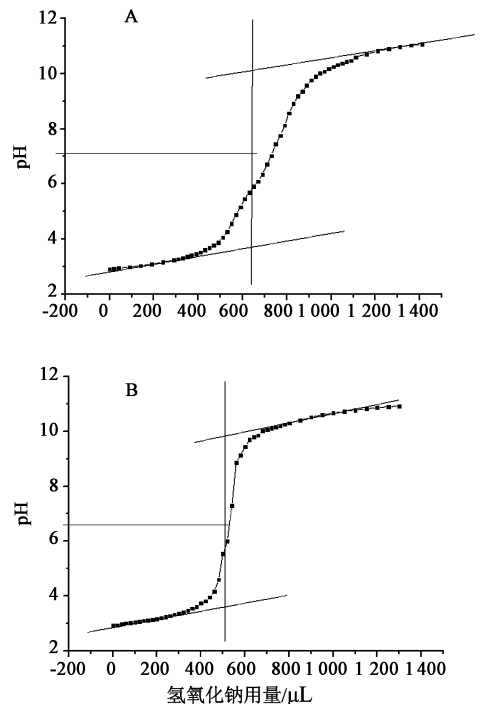


图 2 PELA(A)和 PBAE(B)的 pK_b 测定
Fig. 2 pK_b of PELA (A) and PBAE (B)

2.1.3 临界胶束浓度 (CMC) 的测定^[9] 精密称取芫适量,加丙酮溶解,得 $1 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 芫丙酮溶液。吸取芫丙酮溶液 0.1 mL 置于 10 mL 棕色量瓶中,在通风橱敞口放置 24 h 挥干丙酮,备用。精密称取适量 PBAE 溶于适量乙醇中,采用薄膜水化法制备成空白胶束,使胶束溶液中 PBAE 终质量浓度 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。向含芫的棕色量瓶中加入不同体积的 PBAE 胶束溶液,用水稀释至刻度,得 PBAE 质量浓度分别为 0.01, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 40, 50, 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的系列聚合物溶液或胶束。50 °C 水浴超声分散 2 h,室温放置过夜。固定发射

波长 390 nm,在 300 ~ 360 nm 扫描系列聚合物溶液或胶束。激发和发射的狭缝均为 50 nm。分别记录 334 nm 与 336 nm 处荧光强度为 I_{334} 和 I_{336} ,见图 3。结果显示随着溶液中共聚物质量浓度的增加,芫的激发光强度增加,激发光波长逐渐红移,当共聚物质量浓度超过 CMC 时,部分芫进入胶束中, I_{336}/I_{334} 发生明显变化^[10]。从 0.01 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 增大至 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,溶液对应的激发光波长由 334 nm 红移至 336 nm,以 $\log C$ 与 I_{336}/I_{334} 作图,曲线的拐点即为该共聚物的 CMC。同法测定 PELA 的 CMC。结果 PELA 和 PBAE 的 CMC 分别为 3.31, 4.79 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

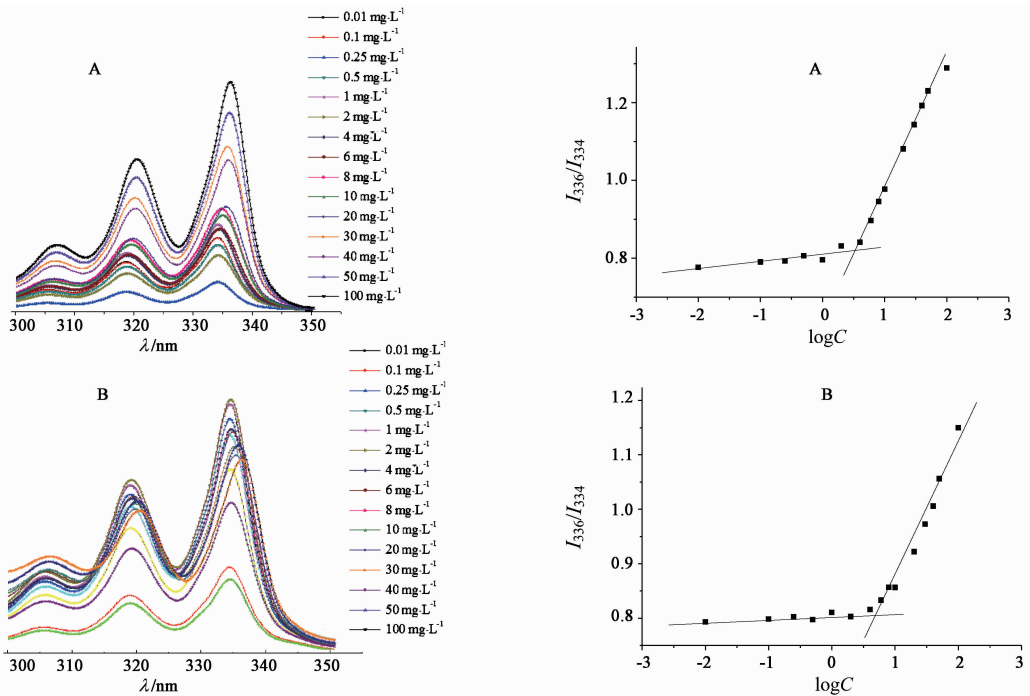


图 3 不同质量浓度 PELA (A) 和 PBAE (B) 的荧光强度 (左) 和临界胶束浓度 (右)

Fig. 3 Critical micellar concentration (the right) and fluorescence intensity (the right) of PELA (A) and PBAE (B) with different concentrations

2.2 紫杉醇胶束的制备及性质

2.2.1 紫杉醇胶束的制备 采用薄膜水化法。精密称定材料 100 mg 和不同量的紫杉醇,加乙醇溶解,50 °C 减压旋蒸去除有机溶剂,得均一透明膜,加入水 5 mL,快速涡旋,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤分装,冷冻干燥,制成冻干粉。

2.2.2 粒径与稳定性 采用激光粒度仪对胶束粒度进行表征,胶束溶液 4 °C 放置 1 周后测定粒度,观察其稳定性。结果 PELA-紫杉醇 (paclitaxel, PTX) (5:1) 胶束的粒径约 20 nm,聚合物分散指数 (polymer disperse index, PDI) 较小,仅 0.031; PBAE-PTX (5:1) 胶束的粒径约 30 nm, PDI 0.296。制剂 4 °C 放置 1 周后稳定,溶液澄清,无析出沉淀,PELA-PTX 和 PBAE-PTX 的粒径分别为 39.69, 39.72 nm,

PDI 分别为 0.277, 0.343。

2.2.3 形态 利用透射电镜观察载药纳米粒大小和形态,结果表明纳米粒粒径均一,颗粒间无粘连。

2.2.4 紫杉醇的含量测定 色谱条件为 TOSOH 色谱柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm), 柱温 30 °C, 流速 1.0 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长 227 nm, 进样量 20 μL , 流动相 甲醇-乙腈-水 (35:45:20), 空白胶束不干扰紫杉醇的测定。精密称取紫杉醇适量,配制系列质量浓度的紫杉醇对照品溶液^[11],以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程 $Y = 84\ 216X + 23\ 146$ ($R^2 = 0.999\ 9$),线性范围 1 ~ 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。日间和日内精密度 RSD 均 < 1.5%。

2.2.5 载药量和包封率的测定 精密称取冻干载药胶束,加甲醇溶解,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤,加流动

相将样品稀释至合适浓度,按 2.2.4 项下色谱条件测定紫杉醇含量,结果 PELA 载药量 12.37%,包封率 70.55%;PBAE 载药量 12.05%,包封率 68.53%。

2.2.6 载药胶束不同 pH 条件下的释放^[12] 冻干后制剂用磷酸盐缓冲液复溶,取 1 mL 分别置于预处理过的透析袋中,两端封口,各放置于盛有含 0.5% 聚山梨酯 80 的磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 30 mL 的具塞锥形瓶中,磷酸盐缓冲液 pH 分别为 7.4, 6.5, 5.5, 密塞,于 37 °C, 100 r·min⁻¹ 条件下恒温震荡,分别在 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48 h 换新的释放介质。按 2.2.4 项下色谱条件测定紫杉醇含量,以平均累积释药率为纵坐标、时间为横坐标,绘制纳米粒的体外释药曲线,见图 4。结果显示 2 种材料 12 h 内快速释放;同一材料,磷酸盐缓冲液 pH 越低,释放速度越快,但 PELA 在 3 个 pH 条件下的释放曲线无显著性差异,而 PBAE 在 pH 6.5 和 5.5 条件下的释放曲线与 pH 7.4 相比,具有显著性差异;在同一 pH 条件下,PBAE 较 PELA 释放更快,更完全。证明 PBAE 在酸性环境下具有较高的释药性能。

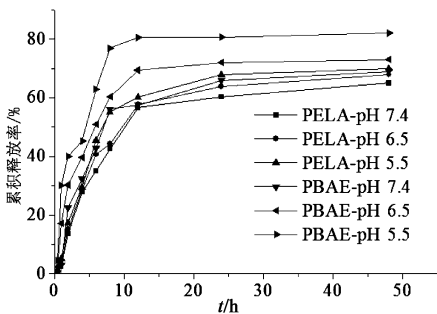


图 4 载紫杉醇胶束在不同 pH 条件下的释放曲线
Fig. 4 *In vitro* drug release profiles of paclitaxel-loaded nanoparticles at pH of 7.4, 6.5 and 5.5

3 讨论

本文通过迈克尔加成制成一种新型 pH 敏感两亲性三嵌段共聚物 PBAE,该材料在水中自组装形成以 PLA 和聚-β-氨基酯为疏水内核,PEG 为亲水外壳的球状胶束,在弱酸性环境中,侧链上氨基质子化导致胶束膨胀,使解胶束化加快,从而快速释放药物。利用薄膜水化法制得载紫杉醇聚合物胶束,该胶束的粒径小,但分布均匀、稳定性好、负载疏水性药物紫杉醇的能力强,具有明显的 pH 敏感性,载药后有部分较大粒径分布,但透射电镜未见明显聚集。模拟正常生理环境 (pH 7.4)、肿瘤组织 (pH 6.4 ~ 6.8)、肿瘤细胞内环境 (pH 5.0 ~ 6.0),结果发现聚合物胶束的释药速度在低 pH 下明显提高,证明载紫杉醇 PBAE 胶束具有良好的 pH 敏感性。聚合物的相对分子质量、聚合物浓度、载药量和 pH 敏感嵌

段的比例都对材料的 pH 敏感特性有一定影响。该材料不仅极大提高了紫杉醇的溶解度,同时特有靶向释药特性,作为新型纳米胶束载体在疏水性抗肿瘤药物的靶向传递领域有很好的研究和应用前景。

[致谢] 中国中医科学院中药研究所的杨洪军研究员和张方博博士在实验完成过程中给予的悉心指导和便利的实验条件。

[参考文献]

- [1] Mu C F, Balakrishnan P, Cui F D, et al. The effects of mixed MPEG-PLA/Pluronic copolymer micelles on the bioavailability and multidrug resistance of docetaxel[J]. *Biomaterials*, 2010, 31(8): 2371-2379.
- [2] 王江峰, 鲁莹, 钟延强. 聚氨基酯作为基因载体的研究进展[J]. *药学实践杂志*, 2011, 29(3): 165-168.
- [3] 梁润成, 黄志军, 李桃, 等. pH 响应纳米递药系统在逆转肿瘤多药耐药性方面的研究进展[J]. *中国药学杂志*, 2012, 47(20): 1609-1613.
- [4] 胡亚男, 易涛, 许岩. 载格列吡嗪的聚 β-氨基酯纳米粒的制备及含量测定[J]. *西北药学杂志*, 2013, 28(3): 296-299.
- [5] Zhang C Y, Yang Y Q, Huang T X, et al. Self-assembled pH-responsive MPEG-b-(PLA-co-PAE) block copolymer micelles for anticancer drug delivery[J]. *Biomaterials*, 2012, 33(26): 6273-6283.
- [6] Shin H C, Alani A W G, Rao D A, et al. Multi-drug loaded polymeric micelles for simultaneous delivery of poorly soluble anticancer drugs[J]. *J Control Release*, 2009, 140(3): 294-300.
- [7] Yu Y, Zhang X L, Qiu L Y. The anti-tumor efficacy of curcumin when delivered by size/charge-changing multistage polymeric micelles based on amphiphilic poly(β-amino ester) derivatives[J]. *Biomaterials*, 2014, 35(10): 3467-3479.
- [8] Lynn D M, Langer R. Degradable poly(β-amino esters): synthesis, characterization, and self-assembly with plasmid DNA[J]. *J Am Chem Soc*, 2000, 122(44): 10761-10768.
- [9] 季冬英, 吴琼珠, 平其能. PLA-mPEG 的合成和多西紫杉醇聚合物胶束的制备[J]. *中国药科大学学报*, 2008, 39(3): 223-227.
- [10] 古建春, 乔明曦, 高玮, 等. 阿霉素温度/pH 双敏感型自组装嵌段共聚物胶束的制备[J]. *药学学报*, 2009, 44(7): 793-797.
- [11] 齐旭, 刘佩, 李速明. 聚乳酸-聚乙二醇三嵌段共聚物包载紫杉醇纳米胶束的制备及其体外药物释放行为[J]. *复旦学报:自然科学版*, 2013, 52(1): 1-8.
- [12] 余巧, 潘仕荣, 杜卓. 紫杉醇自组装核壳型纳米胶束的制备与性能[J]. *药学学报*, 2008, 43(4): 408-414.

[责任编辑 刘德文]