

· 工艺与制剂 ·

姜黄素 Pluronic F127 载药胶束的制备 及其胶束化行为的 NMR 分析

张峻颖¹, 余霜¹, 张雷², 徐雪³, 朱孝云⁴, 吴春勇^{3,5*}, 黄罗生¹

(1. 中国药科大学中药制剂教研室, 南京 211198; 2. 山东省食品药品检验所, 济南 250101;
3. 中国药科大学药物分析教研室, 南京 210009; 4. 上海医药工业研究院, 上海 200040;
5. 药物质量与安全预警教育部重点实验室, 南京 210009)

[摘要] **目的:**以姜黄素为模型药物,制备 Pluronic F127 聚合物的载药胶束并阐明 Pluronic F127 在水中的胶束化过程。**方法:**采用 HPLC 测定姜黄素含量,流动相 0.1% 甲酸水溶液-甲醇(30:70),检测波长 420 nm。采用薄膜水化法制备姜黄素 Pluronic F127 胶束,通过正交试验考察姜黄素-Pluronic F127 质量比、水相用量、水相 pH 和水化时间对载药共聚物胶束包封率及载药量的影响。利用动态光散射法测定胶束粒径,动态透析法考察载药胶束的体外释放行为,并通过¹H-NMR 分析 Pluronic F127 在水中的胶束化行为。**结果:**优选的处方工艺为姜黄素-Pluronic F127(1:15),水相用量 10 mL,水相 pH 5.0,水化时间 1.0 h。姜黄素 Pluronic F127 胶束的平均粒径约 30 nm,平均包封率 64.5%,平均载药量 4.1%,体外释放符合 Higuchi 方程。在水中随着 Pluronic F127 质量浓度的增高,质子的 NMR 化学位移向高场移动且信号变宽。**结论:**Pluronic F127 在水中已形成了可载药的疏水性胶束内核,Pluronic F127 具有优良的载药及缓释能力。

[关键词] 姜黄素; 胶束; Pluronic F127; 核磁共振; 正交试验; 包封率; 体外释放行为

[中图分类号] R283.6;R943 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)24-0001-04

[doi] 10.11653/syjf2013240001

Preparation of Curcumin-Loaded Pluronic F127 Micelles and NMR Analysis of Its Micellization Behavior

ZHANG Jun-ying¹, YU Shuang¹, ZHANG Lei², XU Xue³, ZHU Xiao-yun⁴,
WU Chun-yong^{3,5*}, HUANG Luo-sheng¹

(1. Department of Pharmaceutics of Traditional Chinese Medicine, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China; 2. Shandong Institute for Food and Drug Control, Ji'nan 250101, China;
3. Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China;
4. Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 200040, China;
5. Key Laboratory of Drug Quality Control and Pharmacovigilance, Ministry of Education, Nanjing 210009, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare curcumin-loaded Pluronic F127 micelles and clarify micellization behavior of Pluronic F127 in water. **Method:** The content of curcumin was determined by HPLC with mobile phase of 0.1% formic acid solution-methanol (30:70) and detection wavelength of 420 nm. Curcumin-loaded Pluronic F127 micelles were prepared by thin-film hydration method and effects of curcumin-Pluronic F127 mass ratio, aqueous phase amount, pH of aqueous phase and hydration time on drug-loading coefficient and entrapment efficiency were investigated by orthogonal design. Particle size of micelles was determined by dynamic light

[收稿日期] 20130630(014)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81102819);药物质量与安全预警教育部重点实验室开放课题(MKLDP2013MS05);中央高校基本科研项目(JKQ2011023)

[第一作者] 张峻颖, 博士, 讲师, 从事中药新剂型及质量分析研究, Tel:025-86185252, E-mail:ivy366300@hotmail.com

[通讯作者] * 吴春勇, 博士, 副教授, 从事药物分析研究, Tel:025-83271269, E-mail:analysis99@126.com

scattering method. *In vitro* release profile of curcumin in micelles was investigated by dynamic dialysis method. $^1\text{H-NMR}$ was performed to study micellization behavior of Pluronic F127 in water. **Result:** Optimized formulation process was as follows: curcumin-Pluronic F127 (1:15), aqueous phase amount 10 mL, pH of aqueous phase 5.0 and hydration time 1.0 h. Average size of curcumin-loaded Pluronic F127 micelles was about 30 nm with average entrapment efficiency of 64.5% and average drug-loading coefficient of 4.1%. *In vitro* release data fitted well to Higuchi equation. $^1\text{H-NMR}$ results demonstrated that chemical shift of Pluronic F127 upshifted and signals broadened with increasing of the concentration. **Conclusion:** Pluronic F127 has been formed hydrophobic micelles core for drug-loaded in water, thus showing excellent drug-loaded and release capability.

[**Key words**] curcumin; micelles; Pluronic F127; NMR; orthogonal test; encapsulation efficiency; *in vitro* release behavior

姜黄素是一种天然酚类色素,广泛存在于姜黄属植物姜黄、莪术、郁金等的根茎中,是姜黄的重要活性成分。姜黄素对机体各系统作用广泛,具有较好的抗氧化、抗炎、抗动脉粥样硬化、抗肿瘤等药理作用,且毒性低、不良反应小^[1-2]。但姜黄素存在水溶性差、难吸收、对光较敏感、易降解等缺点,限制了其在临床上的推广应用。为克服以上不足,可将其制成磷脂复合物、固体分散体、包合物和聚合物胶束等^[3-6]。

Pluronic 是一种两亲性聚合物,在水溶液中能自发形成核-壳结构,粒径小且稳定性高,可实现被动靶向给药,还可连接具有特异性识别功能的配基实现主动靶向给药。Pluronic 作为药物载体不仅可以增加细胞对药物的摄取量,亦可通过抑制 P-糖蛋白而减少细胞对药物的外排,从而逆转肿瘤多药耐药,目前已被美国 FDA 批准在医药领域中应用^[7]。若能揭示 Pluronic 聚合物在水中胶束化的过程,将有助于揭示药物与胶束的作用机制,优化药物释放行为。近年来核磁共振技术(NMR)被广泛应用于物理化学、生物、医药等多个领域,可检测有机化合物分子中原子核的性质及其周围化学环境的相互作用,具有较高的灵敏度和不可替代性^[8-11]。

本实验以 Pluronic F127 为载体,通过正交试验优选姜黄素 Pluronic F127 胶束的处方工艺,评价其包封率、载药量、粒径及体外释放等理化性质,利用 $^1\text{H-NMR}$ 考察 Pluronic F127 在水中的胶束化行为,为两亲分子自组装机制的探索提供参考。

1 材料

1200 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),AVANED AV-500 型核磁共振波谱仪(瑞士 Bruker 公司),85-2 型恒温磁力搅拌器(上海司乐仪器有限公司),TGL-6A 型台式高速离心机(金坛市白塔新宝仪器厂),XW-80A 型漩涡混合仪(江苏海门市其

林贝尔仪器制造有限公司)。姜黄素对照品(Sigma-Aldrich 公司,批号 C1386),Pluronic F127(南京威尔化工有限公司),甲醇为色谱纯,水为去离子水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 姜黄素 Pluronic F127 胶束的制备 采用薄膜-水化法制备姜黄素 Pluronic F127 共聚物胶束。称取姜黄素 40 mg 和处方量 Pluronic F127 置于茄形瓶中,加入无水乙醇 30 mL,搅拌 1 h 至完全溶解,于 40 °C 旋转蒸发成膜,真空干燥去除残余的有机溶剂,得干燥的聚合物药膜。聚合物药膜用 60 °C 水浴预热使基质溶解,加入同温度的去离子水适量,恒速搅拌,得到聚合物载药胶束的水分散液,用 0.45 μm 水系微孔滤膜滤过,即得。

2.2 分析方法的建立

2.2.1 色谱条件 Hypersil ODS2 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm , 大连依利特分析仪器有限公司),流动相 0.1% 甲酸水溶液-甲醇(30:70),流速 1.0 mL \cdot min⁻¹,进样量 20 μL ,柱温为室温,检测波长 420 nm。

2.2.2 专属性试验 分别取空白胶束溶液和姜黄素对照品溶液进样,记录色谱图,结果表明辅料对姜黄素的检测无干扰。

2.2.3 标准曲线及精密度试验 精密称取适量姜黄素对照品,加流动相溶解并分别稀释制成质量浓度为 0.5, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250 mg \cdot L⁻¹ 的对照品溶液,分别按 2.2.1 项下色谱条件测定,以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,得回归方程 $Y = 143.87X - 98.652$ ($r = 0.9997$),表明姜黄素在 0.5 ~ 250 mg \cdot L⁻¹ 与峰面积呈良好线性关系。日内与日间精密度试验结果表明,姜黄素峰面积的 RSD 均 < 2%,符合检测要求。

2.3 包封率的测定 精密移取水化后的姜黄素胶

束溶液 500 μL ,加入甲醇 4.5 mL,漩涡 1 min,于 4 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液进样测定,计算包封率和载药量。

包封率 = 胶束中药物质量 / 药物投入量 $\times 100\%$;

载药量 = 样品中药物测得量 / (投入载体的质量 + 样品中药物测得量) $\times 100\%$

2.4 处方工艺优化 在单因素试验基础上,固定姜黄素投药量 40 mg,选取姜黄素-Pluronic F127 质量比、水相用量、水相 pH 和水化时间为考察因素,以包封率为考察指标,通过 $L_9(3^4)$ 正交试验优选处方工艺,因素水平见表 1,试验安排及结果见表 2。

表 1 姜黄素 Pluronic F127 共聚物胶束 处方工艺正交试验因素水平

水平	A 姜黄素-Pluronic F127	B 水相用量 /mL	C 水相 pH	D 水化时间 /h
1	1:5	10	2.0	1.0
2	1:10	20	5.0	1.5
3	1:15	30	6.8	2.0

表 2 姜黄素 Pluronic F127 共聚物胶束处方工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D	包封率/%
1	1	1	1	1	18.6
2	1	2	2	2	21.7
3	1	3	3	3	16.6
4	2	1	2	3	33.4
5	2	2	3	1	37.1
6	2	3	1	2	24.7
7	3	1	3	2	57.9
8	3	2	1	3	33.0
9	3	3	2	1	63.7
K_1	18.967	36.633	25.433	39.800	
K_2	31.733	30.600	39.600	34.767	
K_3	51.533	35.000	37.200	27.667	
R	32.566	6.033	14.167	12.133	

由直观分析可知,各因素对包封率的影响顺序为 $A > C > D > B$,确定最佳处方为 $A_3B_1C_2D_1$,即姜黄素-Pluronic F127 质量比 1:15,水相用量 10 mL,水相 pH 5.0,水化时间 1.0 h。按优选的处方制备 3 批载药胶束,按 2.3 项下方法测得平均包封率 64.5% (RSD 0.8%),平均载药量 4.1% (RSD 1.2%)。

2.5 粒径分布的测定 取空白胶束溶液和姜黄素载药胶束,用适量水稀释,于激光粒度仪测定粒径分布,结果 Pluronic F127 空白胶束的平均粒径 15 nm,姜黄素载药胶束则约 30 nm。

2.6 体外释药行为考察 采用动态透析法。取姜黄素胶束 2 mL 置于透析袋中(截留相对分子质量 14 000),置于 100 mL 释放介质 (0.01 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS 缓冲液, pH 7.4) 中,于 37 $^{\circ}\text{C}$, 120 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 搅拌下进

行体外释放试验。分别于不同时间点取样,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,并及时补入等量等温释放介质,按 2.2.1 项下色谱条件测定每个时间点释放介质中姜黄素质量浓度,绘制累积释放曲线,见图 1,结果表明姜黄素纳米胶束无突释效应,且具有良好的缓释特性。对释药数据进行模型拟合,结果显示体外释放符合 Higuchi 方程,拟合方程为 $Q = 0.083 1t^{1/2} + 0.015$ ($r^2 = 0.992 2$)。

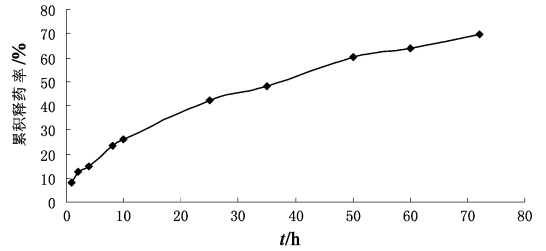
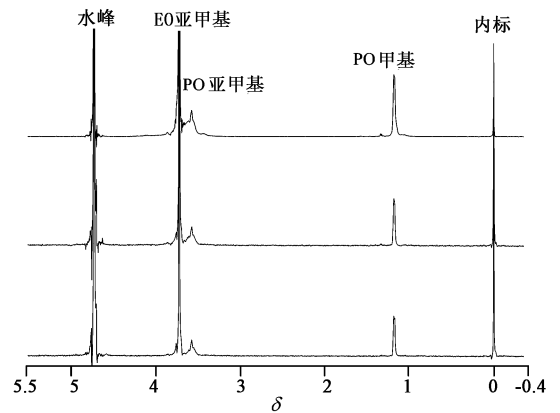


图 1 姜黄素 Pluronic F127 胶束的体外释放曲线

2.7 胶束化过程的 NMR 研究 Pluronic 是由聚氧乙烯和聚氧丙烯组成的三嵌段聚合物,中间为相对疏水的聚氧丙烯嵌段 (PO),两侧为相对亲水的聚氧乙烯嵌段 (EO)。NMR 试验中 ^1H 的共振频率为 500 MHz, ^1H 化学位移相对于以 TMS 为 0 设定,采样点数 1 024,累加次数为 32 次,试验温度 37 $^{\circ}\text{C}$,溶剂为氘代水,Pluronic F127 在重水中质量浓度分别为 0.5, 1, 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,通过考察该 3 种质量浓度下 Pluronic F127 的分子状态,研究其胶团化行为,质子峰的归属见图 2~4。



注:上、中、下分别为 10, 1, 0.5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (图 3, 4 同)

图 2 不同质量浓度的 Pluronic F127 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 重水中的 ^1H -NMR

由图 3, 4 可知, 0.5 和 1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时 Pluronic 聚合物的质子化学位移一致, 83.75, 3.71, 3.57, 1.17。当质量浓度增加至 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, Pluronic F127 聚合物的化学位移 δ 变为 3.69, 3.54, 1.14, 与 0.5, 1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的图谱相比, 化学位移向高场移动, 信号变宽, 说明 Pluronic F127 在 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 质量浓度下质子周围的微环境发

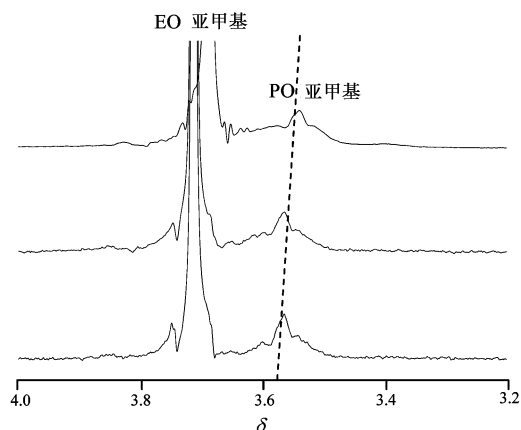


图 3 不同质量浓度的 Pluronic F127
在 37 °C 重水中的 ¹H-NMR (δ 3.2 ~ 4.0)

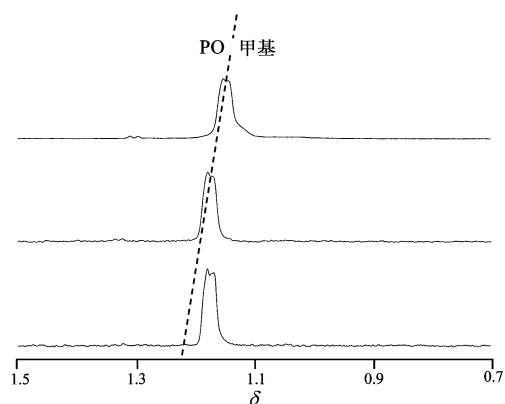


图 4 不同质量浓度的 Pluronic F127
在 37 °C 重水中的 ¹H-NMR (δ 0.7 ~ 1.5)

生了改变,推断此时已形成了聚合物胶束。

3 讨论

正交试验结果表明,姜黄素经胶束包裹后在水中的溶解度显著提高,最高可达 $2.32 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (第 7 组),较纯水中的溶解度至少增加了 25 倍,说明 Pluronic F127 是较好的载体材料。利用薄膜水化法制备姜黄素 Pluronic F127 纳米胶束的工艺简单可行,载药率高,稳定性好且粒径适中(可借助肿瘤 ERP 效应),体外释放无突释现象,释放持续缓慢($>72 \text{ h}$)。

NMR 结果表明,当嵌段共聚物 Pluronic F127 质量浓度为 $0.5, 1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,PO 链段的 ¹H-NMR 信号出现一组超精细结构,聚合物以单分子形态溶解在水中,PO 链段可以自由运动;随着质量浓度的增高($\geq 10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$),PO 基团的超精细结构消失,信号开始变宽变钝(图 3,4),暗示此浓度高于临界胶束浓度(CMC),此时 PO 链段与水发生微相分离,进入胶团内核、运动受限。PO 链段在胶团化过程中起主导作用,形成的疏水性胶束内核可用来包裹难溶性药物,提高药物溶解度和稳定性。Pluronic F127 的

CMC 较低,暗示其作为药物载体具有增溶空间大、抗稀释能力强的优点。

一般来说,Pluronic 的 PO 嵌段越长,生成的胶束相应较大。Pluronic F127 的 PO 质量分数为 30%,可形成空间较大的胶束内核,产生较好的增溶作用。难溶性药物可通过氢键、范德华力及静电作用等与 Pluronic F127 的 PO 链段结合,包裹于胶束内核中。Pluronic 聚合物还具有生物相容、结构可控、温度敏感等优点,在介孔材料制备、药物载体、生物大分子分离和嵌段共聚物修饰等方面均有重要的应用背景。

[参考文献]

- [1] 肖长坤. 姜黄属植物的化学成分研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(21): 339.
- [2] 余美荣, 蒋福升, 丁志山. 姜黄素的研究进展[J]. 中草药, 2009, 40(5): 828.
- [3] Maiti K, Mukherjee K, Gantait A, et al. Curcumin-phospholipid complex: preparation, therapeutic evaluation and pharmacokinetic study in rats [J]. Int J Pharm, 2007, 330(1/2): 155.
- [4] 韩刚, 翟丽, 赵琳琳, 等. 姜黄素固体分散体在大鼠体内的药动学研究[J]. 中国药学杂志, 2009, 44(9): 698.
- [5] 韩刚, 许建华, 李魏娜, 等. 姜黄素 β -环糊精包合物的制备工艺研究[J]. 中药材, 2004, 27(12): 946.
- [6] MA Z, Shayeganpour A, Brocks D R, et al. High-performance liquid chromatography analysis of curcumin in rat plasma: application to pharmacokinetics of polymeric micellar formulation of curcumin [J]. Biomed Chromatogr, 2007, 21(5): 546.
- [7] 关延彬, 左岚, 饶子超, 等. 普流罗尼克对 P-gp 底物罗丹明 123 在 Caco-2 细胞蓄积的影响[J]. 中国药理学杂志, 2011, 46(12): 937.
- [8] ZHANG J Y, Higashi K, Linwikrant W, et al. Molecular-level characterization of probucol nanocrystal in water by *in situ* solid-state NMR spectroscopy [J]. Int J Pharm, 2012, 423(2): 571.
- [9] ZHANG J Y, Tozuka Y, Uchiyama H, et al. NMR investigation of a novel excipient, α -glucosylhesperidin, as a suitable solubilizing agent for poorly water-soluble drugs [J]. J Pharm Sci, 2011, 100(10): 4421.
- [10] Tozuka Y, Higashi K, Morita T, et al. Transglycosylated rutin-specific non-surface-active nanostructure affects absorption enhancement of flurbiprofen [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2012, 82(1): 120.
- [11] Moribe K, Masaki M, Kinoshita R, et al. Guest molecular size-dependent inclusion complexation of parabens with cholic acid by cogrinding [J]. Int J Pharm, 2011, 420(2): 191.

[责任编辑 全燕]