

叶酸接枝透明质酸聚合物胶束包载紫杉醇的制备

刘艳华¹, 孙进², 王文苹¹, 何仲贵^{2*}

(1. 宁夏医科大学药学院, 银川 750004; 2. 沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016)

[摘要] 目的: 制备叶酸(FA)接枝透明质酸-十八烷基(FA-HA-C₁₈)聚合物胶束, 用于包载紫杉醇。方法: 通过叶酸活性酯与 HA-C₁₈ 上的羟基反应, 制备 FA-HA-C₁₈ 聚合物, 采用红外、紫外光谱法鉴定聚合物的结构, 并测定叶酸取代度; 通过超声法制备 FA-HA-C₁₈ 包载紫杉醇的聚合物胶束, 并优化制备工艺, 测定载药胶束的平均粒径和 Zeta 电位。结果: 合成了每 100 个透明质酸分子上接枝 6.8 个叶酸分子的 FA-HA-C₁₈ 聚合物, 制得的 FA-HA-C₁₈ 载药胶束的平均粒径为 (191.9 ± 8.7) nm, Zeta 电位为 -33.3 mV。结论: FA-HA-C₁₈ 聚合物胶束可作为难溶性药物紫杉醇优良的纳米载体材料。

[关键词] 叶酸(FA)接枝透明质酸-十八烷基(FA-HA-C₁₈); 聚合物胶束; 紫杉醇; 超声法

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)19-0066-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120727.1038.005.html>

[网络出版时间] 2012-07-27 10:38

Preparation of Paclitaxel-loaded Folate-conjugated Hyaluronic Acid Polymeric Micelle

LIU Yan-hua¹, SUN Jin², WANG Wen-ping¹, HE Zhong-gui^{2*}

(1. Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China;

2. Department of Biopharmaceutics, School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare folate-conjugated hyaluronic acid-octadecyl (FA-HA-C₁₈) polymeric micelle for paclitaxel loading. **Method:** FA-HA-C₁₈ copolymer was prepared by the reaction of the activated folate ester with the carboxyl group on the hyaluronic acid. The chemical structure was identified by FTIR and UV techniques. The paclitaxel-loaded FA-HA-C₁₈ polymeric micelle was prepared by ultrasonic method, and the preparing process was also optimized. The average particle size and zeta potential of the paclitaxel-loaded FA-HA-C₁₈ micelle were determined. **Result:** The degree of substitution of folate in FA-HA-C₁₈ copolymer was 6.8%. The average particle size and zeta potential of paclitaxel-loaded FA-HA-C₁₈ polymeric micelles were (191.9 ± 8.7) nm and -33.3 mV, respectively. **Conclusion:** FA-HA-C₁₈ polymeric micelles could be used as a novel drug delivery system for paclitaxel.

[Key words] folate-conjugated hyaluronic acid-octadecyl (FA-HA-C₁₈); polymeric micelles; paclitaxel; ultrasonic method

化疗是临床上治疗肿瘤的主要手段, 目前由于

传统的化疗药物普通剂型缺乏靶向性, 在杀伤肿瘤细胞的同时也会对正常细胞产生毒性, 引起的毒副作用使患者不能耐受。因此, 构建靶向肿瘤组织的药物传递系统是解决肿瘤化疗问题的有效途径。受体介导的药物靶向传递系统是利用肿瘤细胞过量表达的受体, 配体与受体结合后诱导细胞内化进入肿瘤细胞, 从而将药物靶向输送到肿瘤组织, 可增强药

[收稿日期] 20120326(017)

[第一作者] 刘艳华, 博士, 讲师, 从事新型纳米给药系统研究, Tel: 0951-6880581, E-mail: liyanhua1214@126.com

[通讯作者] * 何仲贵, 博士, 教授, 博士生导师, 从事药物新剂型与新技术研究, Tel: 024-23986320, E-mail: hezhongui@gmail.com

物在肿瘤部位的蓄积并减少药物的不良反应^[1-2]。

叶酸(folate, FA)受体是一种糖蛋白受体,在许多肿瘤细胞中过度表达,而在大多数正常组织中低表达或者不表达。叶酸同药物载体连接形成叶酸复合物后,叶酸受体对叶酸复合物仍具有高度亲和性,对肿瘤细胞有高度选择性。因此利用这一特性可将叶酸作为靶向配体,通过与叶酸受体特异性结合将药物靶向传递到肿瘤组织^[3]。

紫杉醇(paclitaxel, PTX)作为一线广谱抗肿瘤药物,疗效显著,临床上主要用于卵巢癌、乳腺癌及非小细胞肺癌的治疗^[4]。由于PTX在水中的溶解度极低($0.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),给其应用带来了很大的困难。目前用于临床的PTX市售制剂泰素(taxol)是由聚氧乙烯蓖麻油(cremophor EL)与无水乙醇(50:50)配制成的溶液,临床上易产生超敏反应、神经毒性、肾毒性和心脏毒性等不良反应,大大限制了其临床应用^[5]。为解决上述问题,以纳米制剂为基础的给药系统备受关注,如水溶性前药、脂质体、聚合物胶束等^[6-7]。其中,疏水化修饰多糖聚合物胶束以其载药能力强,缓释特性和肿瘤靶向性等优势在药物传递系统领域备受关注。

本课题组前期已以HA作为多糖主链,经 C_{18} 疏水链疏水化修饰,合成HA- C_{18} 接枝聚合物, C_{18} 的取代度为19.3%,该聚合物表现出良好的注射安全性、自聚集特性和载药能力^[8]。本文在HA- C_{18} 聚合物的结构上进一步接枝叶酸配体,合成叶酸受体靶向的FA-HA- C_{18} 接枝聚合物,对聚合物的结构、叶酸取代度进行考察,以其为载体,PTX为模型药物,采用超声法制备载药聚合物胶束,并对其制备工艺进行优化,考察载药胶束的平均粒径和Zeta电位。

1 仪器与试剂

DF-101S型集热式恒温磁力搅拌器,SHZ-D(III)型循环水式真空泵(巩义市英峪峪华仪器厂),Eyela FDU-1100/DRC-1000型冷冻干燥机(Tokyo Rikakikai),IFS55型红外光谱仪(瑞士BRUKER公司),UV1801型紫外分光光度计(北京光谱仪器厂)。

HA- C_{18} 聚合物(实验室合成),叶酸(常州亚邦制药有限公司),*N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS),*N,N'*-二环己基碳二亚胺(DCC,上海共价化学科技有限公司),透析袋(截留相对分子质量7 000 Da,上海绿鸟科技发展有限公司),甲酰胺、无水乙醇、二甲基亚砜(DMSO,天津康科德科技有限公司)。

2 方法与结果

2.1 叶酸接枝HA- C_{18} 聚合物的制备 对于FA-HA- C_{18} 的合成,叶酸首先经DCC/NHS活化形成叶酸活性酯后,通过酯链接枝到HA主链上。

2.1.1 叶酸活性酯的制备 称取叶酸200 mg,溶于10 mL无水DMSO中,加入DCC 1 030 mg和NHS 288 mg,再滴入3~5滴三乙胺,于21℃避光活化5 h,过滤除去活化产生的白色沉淀,滤液即为得到的叶酸活性酯。

2.1.2 叶酸接枝HA- C_{18} 聚合物的制备和纯化 称取HA- C_{18} (C_{18} 取代度为19.3%)100 mg,溶于10 mL无水甲酰胺,逐滴滴入叶酸活性酯的DMSO溶液,室温下避光反应48 h。反应液于pH 10的 NaHCO_3 - Na_2CO_3 缓冲液透析(透析袋截留相对分子质量7 000 Da),直至透析液于281 nm处检测不到叶酸的紫外吸收,随后反应液于蒸馏水中透析3 d,冷冻干燥,得黄色粉末^[9]。FA-HA- C_{18} 聚合物中叶酸含量采用UV法测定。合成路线见图1。

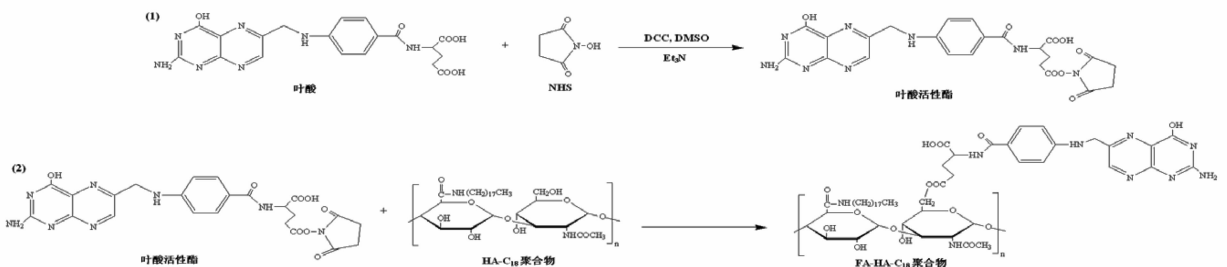


图1 FA-HA- C_{18} 聚合物合成路线

2.2 聚合物结构确证

2.2.1 红外光谱 分别取叶酸,HA- C_{18} 和FA-HA- C_{18} 聚合物适量,经KBr混合压片后,IFS55红外光谱仪进行红外光谱测定,红外光谱图见图2。在FA-HA- C_{18} 的红外光谱图中, $3 425 \text{ cm}^{-1}$ 处—COOH,

$1 637 \text{ cm}^{-1}$ 处— NH_2 伸缩振动吸收峰, $1 637 \text{ cm}^{-1}$ 处— NH_2 的增强,表明叶酸成功接枝到HA- C_{18} 上。

2.2.2 紫外光谱 将叶酸,HA- C_{18} 和FA-HA- C_{18} 溶液分别在紫外分光光度计上进行扫描。图3为HA- C_{18} 、叶酸和纯化后的FA-HA- C_{18} 的紫外扫描图比

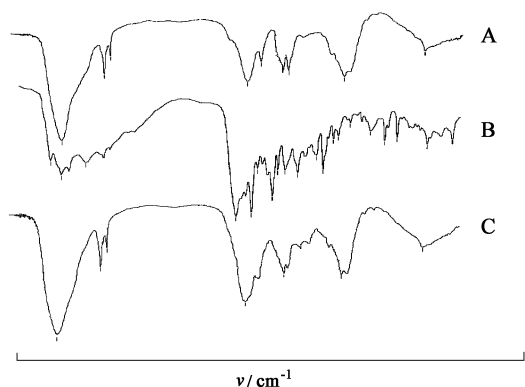


图 2 HA-C₁₈ (A), 叶酸 (B) 和 FA-HA-C₁₈ 聚合物 (C) 红外光谱较。叶酸在 280 nm 处有紫外吸收, HA-C₁₈ 在 200 ~ 500 nm 无紫外吸收, 而纯化后的 FA-HA-C₁₈ 在 280 nm 处有一个明显的叶酸的吸收峰。以上结果表明叶酸已成功与 HA-C₁₈ 聚合物偶联。

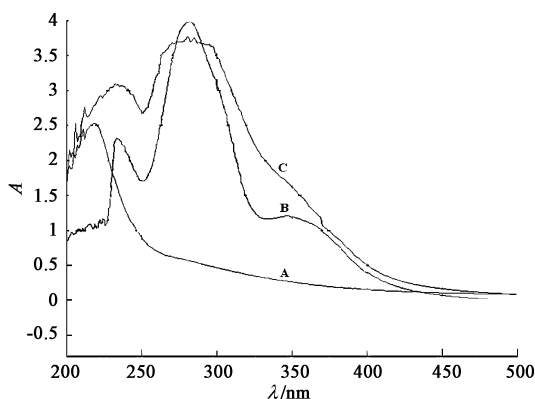


图 3 HA-C₁₈ (A), 叶酸 (B) 和 FA-HA-C₁₈ 聚合物 (C) 紫外光谱

2.3 叶酸取代度考察 取代度, 定义为 HA 多糖主链上, 每 100 个单糖基团上取代的叶酸的数目。本实验采用紫外法测定叶酸的取代度。

2.3.1 叶酸标准曲线的制备 取叶酸 50 mg, 精密称定, 溶解于 DMSO, 100 mL 量瓶定容, 作为叶酸储备液 (500 mg·L⁻¹)。取叶酸储备液适量, 用醋酸-醋酸钠缓冲液 (pH 5.6) 稀释成质量浓度为 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50 mg·L⁻¹ 的标准溶液, 以醋酸-醋酸钠缓冲液为空白, 用紫外分光光度计在 361 nm 波长处测定吸光度。以叶酸浓度对吸光度作标准曲线。

2.3.2 叶酸取代度的测定 精密称取 FA-HA-C₁₈ 聚合物适量溶于 DMSO, 10 mL 量瓶定容, 测定其在 361 nm 处的吸光值, 应用相应的标准曲线计算叶酸浓度, 取代度可通过计算每 100 个葡萄糖单元中接枝的叶酸的个数测得^[11]。UV 法测得 FA-HA-C₁₈ (C₁₈ 取代度为 19.3%) 中叶酸的取代度为 6.8%。

2.4 FA-HA-C₁₈ 载 PTX 聚合物胶束的制备 FA-HA-C₁₈ 聚合物 25 mg 以 2.5 g·L⁻¹ 溶解于蒸馏水, 将

加药量为 20% 载体量的 PTX 溶解于 0.5 mL 无水乙醇中, 缓慢滴加至上述聚合物水溶液中, 磁力搅拌 24 h 后, 冰浴超声 10 min (超声功率 200 W, 工作 2 s, 间歇 3 s), 溶液于 3 500 r·min⁻¹ 离心 30 min, 上清液过 0.45 μm 滤膜, 得到澄清透明溶液, 冻干^[10]。

2.5 制备工艺的优化 粒子的粒径大小及粒度分布是影响微粒分散体系物理稳定性的重要因素。因此以聚合物胶束的粒径为考察指标, 考察不同超声功率和超声时间对制备 FA-HA-C₁₈ 载药胶束的粒径的变化, 进行工艺的优化。

FA-HA-C₁₈ 聚合物 25 mg 以 2.5 g·L⁻¹ 溶解于蒸馏水, 将加药量为 20% 载体量的 PTX 溶解于 0.5 mL 无水乙醇中, 缓慢滴加至上述聚合物水溶液中, 磁力搅拌至溶解完全后, 然后分别按功率为 100, 200, 300 W 条件下冰浴超声 5 min (工作 2 s, 间歇 3 s), 溶液于 3 500 r·min⁻¹ 离心 30 min, 上清液过 0.45 μm 滤膜, 得到澄清透明溶液, 测定胶束的平均粒径, 结果见表 1。

在保持聚合物胶束的质量浓度为 2.5 g·L⁻¹, 超声时间定为 5 min 时, 随着超声功率的增加, 聚合物胶束的平均粒径随之减小, 但是超声功率分别为 200, 300 W 时, 制得胶束的平均粒径没有明显差异。考虑到制备胶束时, 超声功率不宜过大, 因此选取超声功率为 200 W。

表 1 超声功率对 FA-HA-C₁₈ 载药胶束平均粒径的影响 (超声时间 5 min)

超声功率/W	平均粒径/nm	粒度分布/PI
100	286.3	0.425
200	221.6	0.283
300	216.4	0.275

在保持聚合物胶束的质量浓度为 2.5 g·L⁻¹, 超声时间为 10 min 时, 测定胶束的平均粒径, 考察超声时间对胶束平均粒径的影响。结果见表 2, 胶束的平均粒径及粒径分布均较超声时间为 5 min 时有显著减小, 因此超声时间定为 10 min。

表 2 超声功率对 FA-HA-C₁₈ 载药胶束平均粒径的影响 (超声时间 10 min)

超声功率/W	平均粒径/nm	粒度分布/PI
100	236.1	0.382
200	195.4	0.246
300	189.9	0.261

选用最优处方与最佳制备工艺制备 FA-HA-C₁₈ 载药胶束, 采用动态光散射技术测定其平均粒径和

Zeta 电位(图 4)。制得的载药胶束的平均粒径为 (191.9 ± 8.7) nm, Zeta 电位为 -33.3 mV。

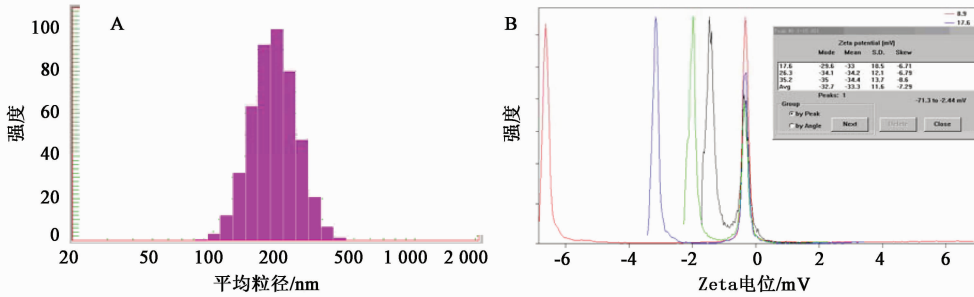


图 4 FA-HA-C₁₈载药胶束粒径分布(A)和 Zeta 电位(B)

3 讨论

当 FA-HA-C₁₈溶于水相介质中时,由于 C₁₈疏水基团间的相互作用产生非共价键交联点,从外水相分离,聚集形成疏水内核,而 HA 多糖分子主链发生卷曲形成包裹疏水内核的亲水性外壳,以获得在水溶液中的最小能量状态,并最终组装成具有多个疏水内核结构的聚合物胶束系统。胶束的内核通过疏水间作用力可以包载疏水性抗癌药物 PTX。亲水性 HA 多糖外壳具有良好的生物相容性,并对胶束粒子在水中的分散起立体稳定作用。HA 亲水性外壳表面修饰的 FA 配体可特异性地与其受体相互作用,通过叶酸受体介导的主动靶向作用靶向输送药物进入肿瘤组织,提高 PTX 的抗肿瘤疗效。

根据疏水化修饰多糖在水中的溶胀性和溶解性,以其为载体材料制备聚合物胶束的方法主要有超声法、透析法和微乳法。超声法适用于在水中具有良好溶胀性和溶解性的疏水化多糖。本实验合成的 FA-HA-C₁₈聚合物在水中具有良好的溶胀性,因此选用超声法制备 FA-HA-C₁₈聚合物胶束。将疏水修饰的 FA-HA-C₁₈聚合物悬浮于水溶液中,待多糖聚合物充分溶胀后,通过超声波的破碎作用,把亲水性的多糖长链骨架打断,利用疏水基团之间的疏水作用,产生分子间和分子内的自聚集,从而形成自组装聚合物胶束。该方法操作简单,不需要添加稳定剂,乳化剂等其他试剂。

4 结论

选用疏水化修饰多糖 HA-C₁₈为载体材料,FA 为配体进行修饰,成功合成了叶酸受体靶向的 FA-HA-C₁₈聚合物,叶酸的取代度为 6.8%。选用 PTX 为模型药物,采用超声法制备了 PTX-FA-HA-C₁₈载药聚合物胶束,载药胶束粒径小,分布窄。FA-HA-C₁₈聚合物有望成为包载紫杉醇的良好纳米载体。

[参考文献]

- [1] Sutton D, Nasongkla A N, Blanco E, et al. Functionalized micellar systems for cancer targeted drug delivery [J]. *Pharm Res*, 2007, 24(6): 1029.
- [2] 王光明,潘艳,孔秋玲,等. 羟丙基-β-环糊精包合对细辛脑靶向生物利用度的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(5): 21.
- [3] Ganta S, Devalapally H, Shahiwala A, et al. A review of stimuli-responsive nanocarriers for drug and gene delivery [J]. *J Control Rel*, 2008, 126(19/20): 187.
- [4] 刘同祥,张艳平,徐羽,等. 紫杉醇联合三尖杉宁碱诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(9): 115.
- [5] Weiss R, Donehower R C, Wiernik P H. Hypersensitivity reactions from taxol [J]. *J Clin Oncol*, 1990, 8(7): 1263.
- [6] 蒋小红,黄雄,黄越燕,等. 载药体系-聚合物胶束的应用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(10): 220.
- [7] 王燕. 新型脂质体作为中药靶向载体在肿瘤治疗中的作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(10): 212.
- [8] Liu Y H, Sun J, Cao W, et al. Dual targeting folate-conjugated hyaluronic acid polymeric micelles for paclitaxel delivery [J]. *Int J Pharm*, 2011, 421(1): 160.
- [9] Wang H J, Zhao P Q, Liang X F, et al. Folate-PEG coated cationic modified chitosan-cholesterol liposomes for tumor-targeted drug delivery [J]. *Biomaterials*, 2010, 31(14): 4129.
- [10] Lee S J, Koo H, Lee D E, et al. Tumor-homing photosensitizer-conjugated glycol chitosan nanoparticles for synchronous photodynamic imaging and therapy based on cellular on/off system [J]. *Biomaterials*, 2011, 32(16): 4021.

[责任编辑 邹晓翠]