

两亲性无规聚合物 P(MMA-*co*-MAA) 胶束包覆紫杉醇及体外释放

卓小露, 倪鑫炯, 朱瑞波, 曹玉华*, 曹光群

(江南大学 化学与材料工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 运用双亲性无规聚合物 P(MMA-*co*-MAA)透析法制备了紫杉醇载药胶束。用荧光探针法测定双亲性聚合物的 CMC 值;对载药、空白的聚合物胶束的粒径、Zeta 电位进行了比较;考察紫杉醇加入量对包覆率和载药量的影响;并在磷酸缓冲溶液(pH 7.4)中进行紫杉醇载药胶束模拟药物缓释研究。研究表明:两亲性无规聚合物 P(MMA-*co*-MAA)单体摩尔比 7:3 的聚合物的 CMC 为 0.050 mg/mL;载药胶束的粒径比空白胶束增大近两倍,Zeta 电位变得更负;当紫杉醇加入量为 21%时,包封率和载药量可分别达到 85.2%、18.0%;载药胶束在 pH 7.4 磷酸缓冲液中 140 h 内可稳定释放,具有良好的缓释效果。

关键词: 无规聚合物;聚合物胶束;紫杉醇;包覆;释放

中图分类号:TQ 317 文献标志码:A 文章编号:1673—1689(2014)05—0486—06

Encapsulation and Release of Paclitaxel with Amphiphilic Random Polymer P(MMA-*co*-MAA) Micelles

ZHUO Xiaolu, NI Xinjiong, ZHU Ruibo, CAO Yuhua*, CAO Guangqun

(School of Chemical and Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The amphiphilic random polymer P (MMA-*co*-MAA) micelle was firstly applied to encapsulate paclitaxel with dialysis method. Critical micelle concentration (CMC) of amphiphilic random polymer P (MMA-*co*-MAA) was measured using the fluorescent probe method. The Zeta potential and the size of polymeric micelles were measured to compare loading micelle with blank micelle. The influences of the amounts of paclitaxel on encapsulation efficiency and loading content were investigated. Drug release was also studied in a phosphate buffer solution (pH 7.4). The result showed CMC of P (MMA-*co*-MAA) was 0.050 mg/mL as the monomer ratio of the hydrophobic monomer MMA to the hydrophilic monomer MAA was 7:3. The encapsulation efficiency and loading content were 85.2% and 18.0%, respectively, as the content of paclitaxel added in polymeric micelle was 21%. Once loading paclitaxel, polymeric micelle became about twice as big as the blank micelle; and Zeta potential became more negative. The loading micelles release paclitaxel stably in

收稿日期: 2013-07-04

基金项目: 国家自然科学基金项目(21174056)。

* 通信作者: 曹玉华(1964—),女,江苏南通人,理学博士,教授,博士研究生导师,主要从事高分子聚合物胶束应用、毛细管电泳和电化学传感器等方面的研究。E-mail:yuhua64@gmail.com

140 hours in phosphate buffer, which revealed that the paclitaxel loading micelles had an effective sustained-release effect.

Keywords: amphiphilic random polymer, polymeric micelle, paclitaxel, encapsulation, release

紫杉醇是一种含二萜环的天然抗癌成分,其化学结构式见图 1,主要用于乳腺癌和卵巢癌的治疗^[1]。由于它的强疏水性,常用氯化蓖麻油和无水乙醇作为溶剂,在临床使用中往往会引起严重的过敏反应和组织毒性^[2]。针对以上情况,目前解决紫杉醇临床应用问题主要有三个途径:1) 增加紫杉醇的水溶性,避免使用助溶剂;2) 延长半衰期,减少用药剂量;3) 增强靶向性,减少副作用。

两亲性聚合物由于亲水链段和疏水链段溶解性的差异,在水溶液中可以自组装形成具有独特

“核-壳”结构的胶束,其中疏水链段聚集成核增溶脂性药物,亲水链段成壳对胶束起到稳定和保护的作用。两亲性聚合物的 CMC 值比小分子表面活性剂 CMC 可低 1 000 倍左右,具有良好的抗稀释性能,在很大程度上避免了药物泄露。聚合物胶束的亲水性外壳和较小的粒径使其可以避免人体网状内皮系统的吞噬,有利于在血液中的长循环^[3-4]。聚合物胶束的小粒径使其容易在肿瘤组织滞留和累积,形成对肿瘤组织的被动靶向作用^[5-6]。

目前针对两亲性聚合物在载药方面的研究都

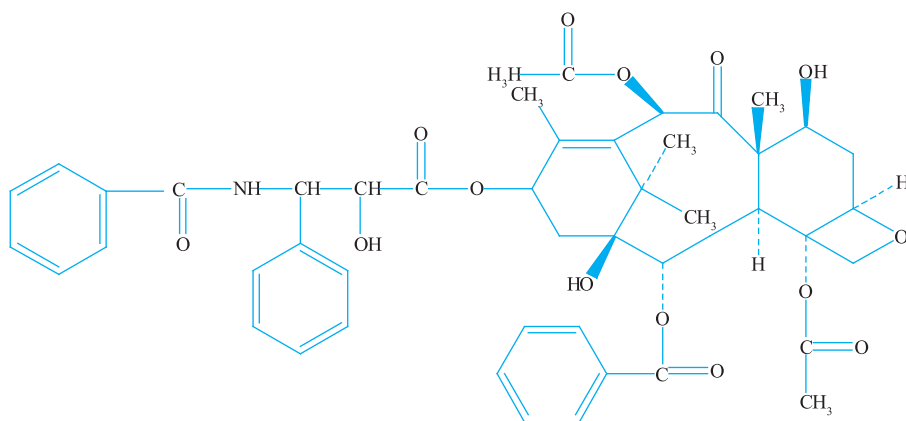


图 1 紫杉醇的分子结构

Fig. 1 Molecular structure of paclitaxel

集中于嵌段共聚物^[7-10],而用双亲性无规聚合物胶束载药的研究鲜见报道。两亲性无规聚合物最大的优点是合成过程操作简单,成本低,工业化程度高,具有较好的应用前景。作者用两亲性无规聚合物来制备紫杉醇药物胶束,是无规共聚物在该药物包覆方面的首次尝试,为其以后在载药方面的应用奠定一定的基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

两亲性无规聚合物 P(MMA-co-MAA):自制;透析袋:国药集团化学试剂有限公司,DM36,截留相对分子质量 8 000~14 000;紫杉醇:纯度 99.8%,沈阳天峰生物工程技术有限公司;无水乙醇:分析

纯,国药集团上海化学试剂;二氯甲烷:分析纯,国药集团上海化学试剂;N,N-二甲基甲酰胺:分析纯,国药集团上海化学试剂;苊:分析纯,国药集团上海化学试剂;氢氧化钠:分析纯,国药集团上海化学试剂;硼酸:分析纯,国药集团上海化学试剂。

Sg-1 型磁力搅拌器:苏州市标准计量局实验工厂;SHZ-82 水浴恒温振荡器:金坛市医疗仪器厂;JA2003 数显电子分析天平:上海分析天平仪器厂;TU-1901 双光束紫外可见分光光度计:北京普析通用仪器有限责任公司;PALS 型 Zeta 电位及粒度分析仪:美国 Brookhaven 公司;PHS-3C 型 pH 计:上海盛磁仪器有限公司;LG10-2.4A 高速离心机:北京医用离心机厂;RF-5301PC 型荧光分光光度计:日本岛津制作所。

1.2 P(MMA-co-MAA) 的制备和表征

无规聚合物 P (MMA-co-MAA) 合成过程:室温下,在 500 mL 单口烧瓶中加入引发剂(偶氮二异丁腈)1.315 g,加入溶剂 1,4-二氧六环 90 mL,溶解后,依次加入甲基丙烯酸甲酯 19.5 mL 和甲基丙烯酸 6.7 mL(单体摩尔比 7:3),通入氮气约 30 min,密封,在 65 °C 的油浴中反应 24 h。反应结束后,冷却至常温,用约 500 mL 无水乙醚沉淀,得到初产物。再重复上述溶解沉淀操作步骤进行纯化,最后,真空干燥至恒重,得到纯净的白色固体聚合物 P (MMA-co-MAA)。用红外光谱、核磁共振和凝胶渗透色谱对聚合物结构进行了表征。

1.3 包覆紫杉醇的聚合物胶束的制备

采用透析法制备载药胶束,具体操作如下:称取 20 mg P(MMA-co-MAA)聚合物,一定质量的紫杉醇,加入 5 mL DMF 静置溶解。搅拌下将混合溶液缓慢滴加至 20 mL 超纯水中,继续搅拌 24 h。然后将混合液装入透析袋中,在超纯水中透析 3 d,每天换 3 次水。透析液经 4 000 r/min 离心 5 min,取上清液得到聚合物载药胶束水溶液。空白聚合物胶束的制备,除不加紫杉醇,其他步骤同上。

1.4 两性性无规聚合物 P (MMA-co-MAA) 的 CMC 测定

用 0.1 mol/L 的氢氧化钠配制芘的饱和水溶液(浓度约 10^{-7} mol/L),用此溶液溶解 P (MMA-co-MAA),配制浓度依次为 5.0、2.0、1.0、 1.0×10^{-1} 、 6.0×10^{-2} 、 3.0×10^{-2} 、 1.0×10^{-2} 、 4.0×10^{-3} 、 1.0×10^{-4} mg/mL 的聚合物溶液,用硼酸调 pH 至 9.2,测定芘的荧光发射光谱,所用激发波长为 335 nm,激发狭缝宽度为 3.0 nm,发射狭缝宽度为 3.0 nm。

1.5 胶束粒径、Zeta 电位的测定

用粒度分析仪分别测定聚合物空白胶束、载药胶束水溶液的粒径,测定温度为 25 °C,测量角度为 90°,每个样品平行测定 3 次,取平均值。用 Zeta 电位仪分别测定聚合物空白胶束、载药胶束水溶液的 Zeta 电位,测定温度为 25 °C,每个样品平行测定 5 次,取平均值。

1.6 紫杉醇紫外吸收标准曲线的建立

准确称取 2.5 mg 的紫杉醇,用无水乙醇溶解并配制定容至 25 mL,即可得质量浓度为 0.1 mg/mL 的紫杉醇标准储备液,用无水乙醇稀释,配制一系列紫杉醇标准溶液,在波长 227 nm 处用紫外分光

光度计测定吸光度值。

1.7 包封率和载药量的测定

紫杉醇在水中的溶解度极低,有机溶剂逐渐被透析,未被胶束包覆的紫杉醇在水中析出沉淀。将聚合物载药胶束制备过程中离心得到的未被包覆的紫杉醇沉淀溶于适量的乙醇,在 227 nm 处的测其吸光度,可得到未被包覆的紫杉醇的量。紫杉醇的包封率可由式计算得出:

$$EE = \frac{M_i - M_k}{M_i} \quad (1)$$

式中,EE 为聚合物胶束对紫杉醇的包封率(%); M_i 为紫杉醇的起始用量(mg); M_k 为未被包覆的紫杉醇的量(mg)。

聚合物胶束对紫杉醇的载药量可由式计算得出:

$$LC = \frac{M_i - M_k}{M_p} \times 100\% \quad (2)$$

式中,LC 为聚合物胶束的载药量(%); M_i 为紫杉醇的起始用量(mg); M_k 为未被包覆的紫杉醇的量(mg); M_p 为聚合物的起始用量(mg)。

1.8 紫杉醇聚合物胶束的体外释放模拟实验

用移液管取 10 mL 的紫杉醇聚合物胶束水溶液置于透析袋内,将密封好的透析袋置于 90 mL、0.2 mol/L 的磷酸缓冲溶液(pH 7.4)中,37 °C 恒温水浴振荡器中进行体外释放模拟实验。在预设的间隔时间每次取 50 mL 释放液供分析检测,并补充 50 mL 新鲜的磷酸盐缓冲液。

将取出的 50 mL 释放液用 5 mL 二氯甲烷萃取两次,合并两次萃取液,在常温下挥发至干,得到紫杉醇残渣,用无水乙醇溶解并定容,在 227 nm 处测定其吸光度,依据线性方程得出该溶液的浓度,进而用下式计算紫杉醇的累积释放量。

$$E_c = \frac{V_r \sum_{i=1}^{n-1} C_i + V_0 C_n}{m_d} \times 100\% \quad (3)$$

式中, E_c 为紫杉醇的累积释放量(%); V_r 为磷酸盐缓冲溶液的置换体积(50 mL); V_0 为释放液的体积(100 mL); C_i 为第 i 次取样时释放液的质量浓度(mg/mL); n 为总取样次数; m_d 为用于释放研究的聚合物载药胶束中紫杉醇的质量(mg)。

2 结果与讨论

2.1 两性性无规聚合物 P(MMA-co-MAA) 的表征

自制 P (MMA-co-MAA),经 IR 分析,存在 3

516 cm^{-1} 宽吸收峰,1 702 cm^{-1} 强吸收峰和 1 731 cm^{-1} 强吸收峰,表示有—COOH 和 COOR 基团,证实产物为 P (MMA-co-MAA)。 ^1H NMR 分析得到 MMA 与 MAA 单体的摩尔比为 7.45:2.55,近 7:3。GPC 分析得到 $M_n=65\ 000\ \text{g/mol}$, $M_w=82\ 000\ \text{g/mol}$,见文献[11]。聚合物胶束的透射电镜图见图 2,显示双亲性无规聚合物可形成球形胶束。

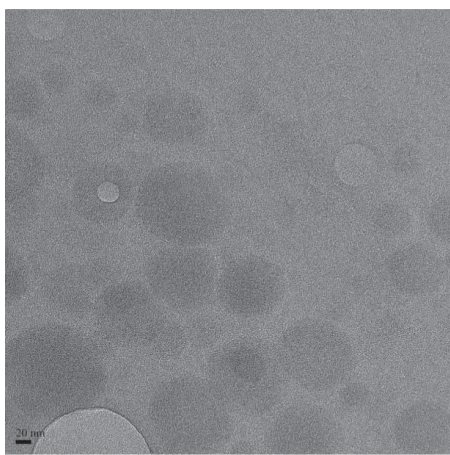


图 2 聚合物胶束的透射电镜图

Fig. 2 Transmission electron microscopy (TEM) picture of polymer micelles

2.2 两亲性无规聚合物 P(MMA-co-MAA)CMC 的测定

芑的稳态荧光光谱有 5 个峰,峰 3 (λ_3 为 384 nm)的荧光强度 I_3 和峰 1 (λ_1 为 373 nm)的荧光强度 I_1 之比强烈地依赖于溶剂的极性,故可用芑增溶于胶束后因所处环境极性的变化引起 I_3/I_1 值的突变(胶束形成)来测定聚合物胶束的 CMC 值。

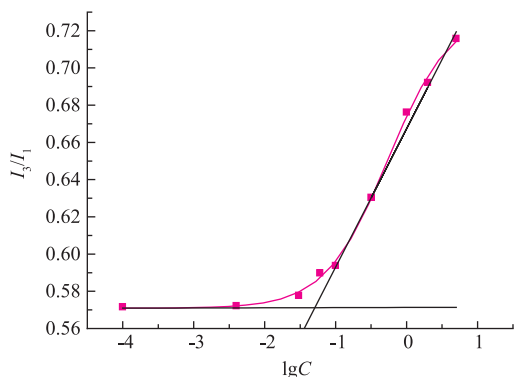


图 3 I_3/I_1 值与聚合物胶束质量浓度对数的关系

Fig. 3 Relationship between the I_3/I_1 value and the logarithm of polymer micelle concentration

由图 3 可见,在低的聚合物质量浓度下, I_3/I_1 值保持不变,此时胶束并未形成,芑所处的环境极性未发生变化。当 $\lg C$ 值在 -1.30 时, I_3/I_1 值突然增大,芑所处环境极性突然改变,说明此时聚合物开始形成胶束,对应的聚合物质量浓度为 0.050 mg/mL,即为 CMC 值。

2.3 聚合物胶束包封率和载药量的测定

2.3.1 紫杉醇紫外吸收标准曲线 按 1.5 方法,建立紫杉醇紫外吸收工作曲线。见图 4。

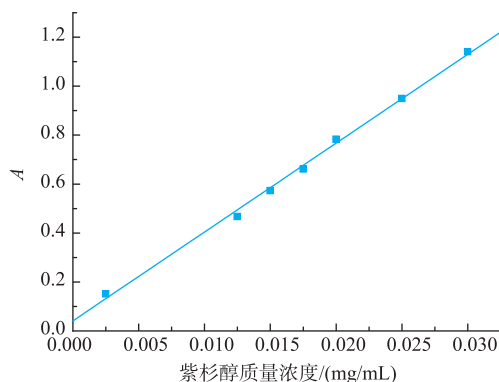


图 4 紫杉醇标准曲线

Fig. 4 Standard curve of paclitaxel

紫杉醇标准溶液紫外吸光度值与质量浓度的关系符合线性方程: $A=0.037\ 8+36.4C$ $R^2=0.999$,吸光度值在此质量浓度范围内线性关系良好。

2.3.2 包封率和载药量的测定 加入 5.7 mg 紫杉醇,按 1.3 方法进行聚合物载药胶束制备。将聚合物载药胶束制备过程中离心得到的沉淀溶于适量的乙醇,与紫杉醇标准溶液的紫外吸收光谱进行比对,见图 5。可知两种溶液的紫外吸收曲线的最大吸收峰位置及曲线的形状完全一致,因此通过离心所得的沉淀即为未包覆紫杉醇,离心方法可以实现未包覆紫杉醇与聚合物载药胶束的较好分离。通过测定未包覆紫杉醇溶液的吸光度,可得出未被包覆的紫杉醇的质量浓度。

分别根据公式(1)和(2),计算聚合物对紫杉醇包封率及载药量分别为 73.5% 和 20.8%。聚合物在水中可诱导形成以疏水链段甲基丙烯酸甲酯为内核,亲水链段甲基丙烯酸为外壳的胶束,其中疏水内核可增溶紫杉醇。

2.4 聚合物胶束粒径、Zeta 电位的测定

聚合物空白胶束、包覆紫杉醇的聚合物胶束平均粒径和 Zeta 电位的测定结果见表 1。

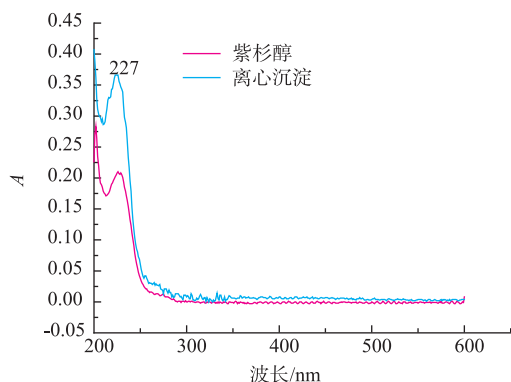


图5 离心沉淀与紫杉醇紫外吸收曲线

Fig. 5 Ultraviolet absorption curves of centrifugal precipitations and paclitaxel

表1 胶束平均粒径和 Zeta 电位

Table 1 Micellar average particle size and Zeta potential

样品	粒径/nm	Zeta 电位/mV
聚合物空白胶束	295.5	-35.68
包覆紫杉醇的聚合物胶束	495.1	-51.88

对载药前后的聚合物胶束粒径数值进行 t 值检验,计算得到 $t=4.22$,查 t 分布表得 $t_{0.05,4}=2.132$,说明载药前后聚合物胶束粒径显著性差异;对载药前后的聚合物胶束 Zeta 电位值进行 t 值检验,计算得 $t=9.45$,查 t 值分布表得 $t_{0.05,8}=1.860$,说明载药前后聚合物胶束 Zeta 电位值显著性差异。

载药后的聚合物胶束粒径增大近两倍,紫杉醇被增溶在聚合物胶束中,增大了胶束尺寸。载药后胶束 Zeta 电位更负,揭示载药后的胶束更加稳定。

2.5 紫杉醇加入量对包封率和载药量的影响

当紫杉醇加入量依次为聚合物量的 6%、11%、15%、21%、28%时,载药量与包封率的关系见图 6。

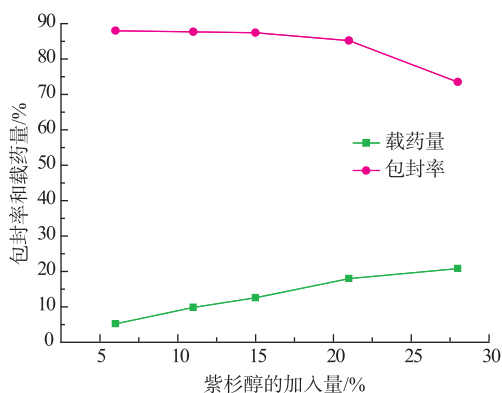


图6 紫杉醇加入量对载药量和包封率的影响

Fig. 6 Effect of amount of paclitaxel on loading content and encapsulation efficiency

由图 6 可知,随着紫杉醇加入量的不断增大,聚合物胶束对其包封率逐渐降低,且当紫杉醇加入量超过 21%之后下降更加明显;同时载药量逐渐增大,当紫杉醇加入量超过 21%之后载药量增加不明显。综合考虑,选择紫杉醇加入量为 21%作为最佳药物加入量。

2.6 紫杉醇载药胶束的体外释放研究

为了模拟人体血液的环境,紫杉醇聚合物胶束的体外释放研究在 37 ℃、pH 7.4 的缓冲液中进行,以紫杉醇加入量为 21%的胶束溶液为对象进行缓释研究,缓释结果见图 7。

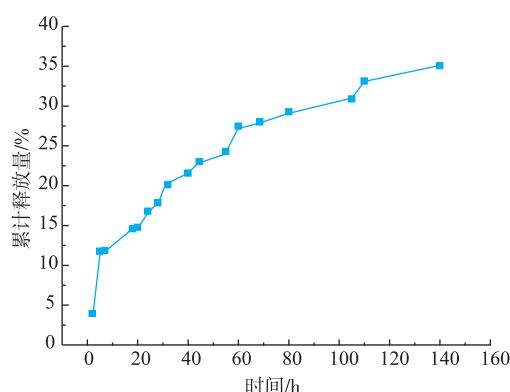


图7 紫杉醇缓释曲线

Fig. 7 Curve of paclitaxel sustained-release

图 7 是无规聚合物制备的胶束的紫杉醇累积释放量与释放时间的关系图。可以看出,无规聚合物制备的紫杉醇胶束对紫杉醇药物的累积释放量随释放时间的不断延长逐渐增加,且趋势较为稳定,不会出现突跃释放。因此采用此种无规聚合物胶束制得的载药胶束具有良好的缓释效果,一次性给药后,药物可在体内长时间的稳定逐渐释放,可有效降低药物的毒性。

3 结语

作者利用透析法成功制备了包覆紫杉醇的双亲性无规聚合物胶束。用芘荧光探针法测得的聚合物胶束 CMC 为 0.050 mg/mL,说明胶束具有良好的抗稀释能力,载药胶束粒径比空白胶束增大了两倍,Zeta 电位变得更负。当紫杉醇加入量为 21%时,聚合物对紫杉醇的包封率和载药量分别达到 85.2%和 18.0%。该载药胶束可在 140 h 内长时间稳定释放。

参考文献:

- [1] Panchagnula R, Pharmaceutical aspects of paclitaxel[J]. **International Journal of Pharmaceutics**, 1998, 172: 1-15.
- [2] Pham A Q, Berz D, Patricia K, et al. Cremophor-induced lupus erythematosus-like reaction with taxol administration: a case report and Review of the Literature[J]. **Case Reports in Oncology**, 2011, 4(3): 526-530.
- [3] Kazunori K, Atsushi H, Yukio N. Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance [J]. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2001, 47: 113-131.
- [4] Stolnik S, Illum L, Davis S S. Long circulating microparticulate drug carriers [J]. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 1995, 16: 195-214.
- [5] Yokoyama M, Okano T, Sakuraj Y, et al. Selective delivery of adriamycin to solid tumor using a polymeric micelle carrier system [J]. **Journal of Drug Targeting**, 1999, 9(3): 171-186.
- [6] H Maeda, J Wu, T Sawa, et al. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review [J]. **Journal of Controlled Release**, 2000, 65: 271-284.
- [7] Johnston K P, Sandro R P R. Colloids in supercritical fluids over the last 20 years and future directions [J]. **The Journal of Supercritical Fluids**, 2009, 47(3): 523-530.
- [8] Shin H C, Cho H, Lai T C, et al. Pharmacokinetic study of 3-in-1 poly(ethylene glycol)-block-poly(D, L-lactic acid) micelles carrying paclitaxel, 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin, and rapamycin [J]. **Journal of Controlled Release**, 2012, 163(1): 93-99.
- [9] Nahain A A, Jeong A N, Mok H, et al. Dual-responsive crosslinked pluronic micelles as a carrier to deliver anticancer drug taxol [J]. **Macromolecular Research**, 2013, 21(1): 92-99.
- [10] Lee S C, Kim C, Kwon C, et al. Polymeric micelles of poly(2-ethyl-2-oxazoline)-block-poly(ϵ -caprolactone) copolymer as a carrier for paclitaxel [J]. **Journal of Controlled Release**, 2003, 89: 437-446.
- [11] 王博妮, 倪鑫炯, 曹玉华. 两亲性无规聚合物 P(MMA-co-MAA)的合成及其自组装研究[J]. **应用化工**, 2012, 41(1): 664-667.
WANG Boni, NI Xinjiong, CAO Yuhua. The investigation on synthesis and self-assemble of amphiphilic random polymer P(MMA-co-MAA) [J]. **Applied Chemical Industry**, 2012, 41(1): 664-667. (in Chinese)

会议信息

会议名称(中文): “组学时代的微生物学”国际研讨会

所属学科: 细胞生物学, 遗传与发育生物学, 生物医学工程学

开始日期: 2014-06-27 结束日期: 2014-06-30

具体地点: 西南大学

主办单位: 中国微生物学会、海外华人微生物学会

协办单位: 中国遗传学会微生物遗传学专业委员会/重庆市微生物学会/中国科学院重庆绿色智能技术研究院/中国科学院-马普学会计算生物学伙伴研究所

承办单位: 西南大学生命科学学院/研究生院、清华大学医学院

组织委员会主席: 邓子新 中国微生物学会理事长、施文元 海外华人微生物学会主席

联系人: 谢建平 联系电话: 86-23-68367108

E-MAIL: georgex@swu.edu.cn 会议网站: <http://www.gsc.ac.cn/tzgg/201403/P020140321350176752689.docx>

会议背景介绍: 为促进微生物学和组学的研究、发展和交融, 增进国际合作交流, 由中国微生物学会和海外华人微生物学会主办, 西南大学研究生院/生命科学院、清华大学医学院承办、中国遗传学会微生物遗传学专业委员会和重庆市微生物学会协办的“组学时代的微生物学”国际研讨会将于 2014 年 6 月 27-30 日在重庆市北碚区西南大学召开。大会将邀请微生物学、组学、计算生物学、合成生物学及相关领域的国际著名学者作大会报告或专题报告, 会议规模 200 人左右。

会议主题: 组学时代的微生物学