

聚乙二醇化聚十六烷基氰基丙烯酸酯的合成及其作为纳米药物载体的应用研究^Δ

王丛瑶^{1*}, 沈利君¹, 孔毅¹, 翁建华¹, 叶晓莉² (1. 杭州市萧山区第一人民医院药剂科, 杭州 311200; 2. 杭州市第一人民医院药剂科, 杭州 310006)

中图分类号 R944.9 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)13-1780-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.13.13

摘要 目的: 合成有机聚合物聚乙二醇化聚十六烷基氰基丙烯酸酯(mPEG-PHDCA), 制备载药 mPEG-PHDCA 纳米粒, 并研究其体外释药行为。方法: 采用 Knoevenagel 反应和阴离子聚合反应合成 mPEG-PHDCA, 通过核磁共振氢谱(¹H-NMR)进行表征, 凝胶渗透色谱(GPC)法测定重均分子量和多分散系数(PDI)。以阿霉素为模型药, 采用复乳-溶剂挥发法制备载阿霉素的 mPEG-PHDCA 纳米粒, 透射电镜观察其微观形貌, 粒径仪测定其粒径和 Zeta 电位。高效液相色谱法测定纳米粒中阿霉素的含量并计算载药量和包封率, 透析袋法考察其体外释药特性, 比较其与阿霉素溶液的体外释药效果。结果: 经过 ¹H-NMR 和 GPC 表征, 成功合成 mPEG-PHDCA, 重均分子量约为 6 000, PDI 为 1.13。所制载阿霉素的 mPEG-PHDCA 纳米粒呈圆球颗粒状, 表面光滑、大小均匀、分布良好, 无团聚现象, 粒径、Zeta 电位、载药量和包封率分别为 (94.61 ± 3.91) nm、(-11.68 ± 0.83) mV、(2.17 ± 0.67)%、(79.54 ± 4.66)% (n=3)。载阿霉素的 mPEG-PHDCA 纳米粒 48 h 的体外累积释药率达到 85.38%, 释药曲线符合 Weibull 方程(R²=0.979 4); 阿霉素溶液体外 4 h 已基本释药完全。结论: 成功合成具有良好载药性能、生物相容性和缓释特性的 mPEG-PHDCA, 其有望成为新型纳米递药载体。

关键词 聚乙二醇化聚十六烷基氰基丙烯酸酯; 纳米粒; 缓释特性; 阿霉素

icity in primary cultured rat cortical cells[J]. *J Mol Neuro Sci*, 2010, 42(1): 9-16.

[10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 2015 年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 110-111.

[11] KIM H, KIM M, KIM H, et al. Anti-inflammatory activities of *Dictamnus dasycarpus* Turcz., root bark on allergic contact dermatitis induced by dinitrofluorobenzene in mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 149(2): 471-477.

[12] KIM J, PARK Y, SHIN J, et al. Fraxinellone inhibits lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by negatively regulating nuclear factor-kappa B in RAW 264.7 macrophages cells [J]. *Biol Pharm Bull*, 2009, 32(6): 1062-1068.

[13] SUN Y, QIN Y, GONG F, et al. Selective triggering of apoptosis of concanavalin A-activated T cells by fraxinellone for the treatment of T-cell-dependent hepatitis in mice [J]. *Biochem Pharmacol*, 2009, 77(11): 1717-1724.

[14] 冉启琼, 阮丽萍, 朱丹妮, 等. 改善桉酮的溶解度以提高其口服吸收分数和对小鼠急性肝损伤的保肝作用[J]. *药理学学报*, 2007, 42(6): 675-680.

[15] 冯静, 汪治, 莫非, 等. 白鲜皮乙酸乙酯部位化学成分及其体外抗幽门螺杆菌活性研究[J]. *山地农业生物学报*, 2014, 33(2): 85-88.

[16] 张化为, 周林洪, 邓珊, 等. 白鲜皮不同极性部位的抗氧化活性及对酪氨酸酶活性的影响[J]. *中国药房*, 2017, 28(31): 4401-4404.

[17] LIU ZL, HO SH, GOH SH. Effect of fraxinellone on growth and digestive physiology of Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* Guenee [J]. *Pestic Biochem Phys*, 2008, 91(2): 122-127.

[18] GUO Y, YAN Y, YANG C, et al. Regioselective synthesis of fraxinellone-based hydrazone derivatives as insecticidal agents [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2012, 22(17): 5384-5387.

[19] GUO Y, QU H, ZHI X, et al. Semisynthesis and insecticidal activity of some fraxinellone derivatives modified in the B ring [J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 61(49): 11937-11944.

[20] 国家质量监督检验检疫总局, 国家标准化管理委员会. GB/T 15000.3-2008 标准样品工作导则(3): 标准样品定值的一般原则和统计方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.

[21] YUAN C, WANG X, YANG D. Antimicrobial and pesticidal activity of fraxinellone from *Dictamnus dasycarpus* [J]. *Chem J Internet*, 2006, 8(1): 33-38.

[22] 国家质量监督检验检疫总局, 国家标准化管理委员会. GB/T 8170-2008 数值修约与极限数值的表示和判定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.

Δ 基金项目: 浙江省中医药科技计划项目(No.2015ZB079); 杭州市卫生科技计划项目(No.2014B21、2018B013); 杭州市科技计划引导项目(No.20163501Y70、20171226Y81); 浙江医学高等专科学校科研基金项目(No.2016XZB03)

* 药师, 硕士。研究方向: 药物新剂型与新技术。电话: 0571-83807491。E-mail: wcy1756@163.com

(收稿日期: 2018-01-07 修回日期: 2018-04-16)
(编辑: 林 静)

Study on Synthesis of Adriamycin-loaded mPEG-PHDCA and Their Application as Nanoparticle Drug Carriers

WANG Congyao¹, SHEN Lijun¹, KONG Yi¹, WENG Jianhua¹, YE Xiaoli² (1.Dept. of Pharmacy, Hangzhou Xiaoshan District First People's Hospital, Hangzhou 311200, China; 2.Dept. of Pharmacy, Hangzhou First People's Hospital, Hangzhou 310006, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To synthesize Monomethoxy-polyethyleneglycolcyanoacrylate-co-poly-hexadecylcyanoacrylate (mPEG-PHDCA), prepare adriamycin-loaded mPEG-PHDCA nanoparticle and study its *in vitro* drug release behavior. **METHODS:** Knoevenagel reaction and anionic polymerization were adopted to synthesize mPEG-PHDCA, and it was characterized with ¹H-NMR. Weight-average molecular weight and polydispersity index (PDI) were determined by gel permeation chromatography (GPC). Using adriamycin as model drug, complex emulsion-solvent evaporation method was used to prepare adriamycin-loaded mPEG-PHDCA nanoparticle. TEM was adopted to observe its micromorphology; particle size and Zeta potential were determined by particle size instrument. The content of adriamycin, drug-loading amount and encapsulated efficiency in nanoparticle were determined by HPLC. The characteristics of drug release *in vitro* were investigated by dialysis bag method. The drug release *in vitro* of it was compared with that of adriamycin. **RESULTS:** After characterized with ¹H-NMR and GPC, mPEG-PHDCA was synthesized successfully; mass average molar mass was about 6 000, and PDI was 1.13. Prepared adriamycin-loaded mPEG-PHDCA nanoparticle was round ball-like granule and had smooth appearance, uniform size and good distribution without agglomeration. Particle size, Zeta-potential, drug-loading amount and entrapment efficiency were (94.61 ± 3.91) nm, (−11.68 ± 0.83) mV, (2.17 ± 0.67) %, (79.54 ± 4.66) % (n=3). Accumulative release rate of adriamycin-loaded mPEG-PHDCA nanoparticle reached 85.38% within 48 h. Drug release curve was Weibull equation distribution (R²=0.979 4). The adriamycin solution was released completely *in vitro* after 4 h. **CONCLUSIONS:** mPEG-PHDCA is synthesized with good drug loading efficiency, biocompatibility and sustained-release properties. It is expected to be a new nano drug delivery carrier. **KEYWORDS** mPEG-PHDCA; Nanoparticles; Sustained-release characteristics; Adriamycin

随着纳米技术的不断发展,开发新型纳米制剂为诊断和治疗恶性肿瘤等疾病开辟了方向,其中,纳米粒(Nanoparticles, NPs)作为一类新型药物载体,能够将药物包载于载体内部,具有增强药物稳定性、提高难溶性药物溶解度、增加药物生物利用度、控制药物释放及靶向递药等优点^[1]。根据制备纳米粒的不同材料可分为无机材料(介孔硅、碳纳米管、四氧化三铁、金纳米粒等)和有机聚合物[聚乳酸(PLA)、聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)、聚己内酯(PCL)、聚酰胺-胺(PAMAM)等]。无机材料往往存在生物体内降解困难和生物毒性等问题,难以进行临床应用^[2-3];而有机聚合物因其具有体内降解作用,且降解产物毒副作用小的优点,已有众多有机聚合物制备的纳米制剂进入临床试验^[3]。因此,新型有机聚合物及其在纳米制剂中的应用也逐渐成为医药工作者的研究热点。

聚乙二醇化聚十六烷基氰基丙烯酸酯(Monomethoxy-polyethyleneglycolcyanoacrylate-co-poly-hexadecylcyanoacrylate, mPEG-PHDCA)是一种新型有机聚合物,与氰基丙烯酸正丁酯、氰基丙烯酸异丁酯等相比较,其具备聚合度可控、毒性更小、生物相容性更好的优势^[4-5],国内尚无上市产品。如果将载药 mPEG-PHDCA 制备成纳米粒,将能够赋予药物缓释特性等优点,并且聚乙二醇链的亲水性和柔性可赋予纳米粒在血液中的长循环特性,能够改变药物的体内药动学行为,防止被网状内皮系统清除,延长药物的血液循环时间,提高间接靶向

性,减轻药物对人体正常组织的毒副作用^[6]。本文将合成有机聚合物 mPEG-PHDCA,以临床抗肿瘤药阿霉素为模型药,制备载阿霉素的 mPEG-PHDCA 纳米粒(mPEG-PHDCA- NPs)并对其进行质量评价。

1 材料

1.1 仪器

Bruker Avance-400 型核磁共振仪(德国 Bruker 公司);JEM-1200EX 型透射电镜(日本电子株式会社);Nano-ZS 90 型激光粒度分析仪(英国 Malvern 公司);2695 型高效液相色谱仪、1515 型凝胶色谱仪(美国 Waters 公司);ST16R 型台式离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);Mill-Q 型超纯水仪(美国 Millipore 公司)。

1.2 药品与试剂

十六醇(批号:H103439)、氰基乙酸(批号:C105698)、甲醛(批号:01342055)、吡咯烷(批号:P108562)、单甲氧基聚乙二醇(mPEG,相对分子量:2 000,批号:01050886)、二环己基碳二亚胺(DCC,批号:01085167)、二甲氨基吡啶(DMAP,批号:01292960)均购自上海阿拉丁试剂有限公司,均为分析纯,纯度:均>95%;阿霉素原料药(浙江海正制药有限公司馈赠,批号:A20150910,纯度:98%);阿霉素对照品(中国食品药品检定研究院,批号:130509-200306,纯度:>99%);泊洛沙姆 188(德国 BASF 公司,批号:P21489);甲醇、乙腈(美国 Honeywell 公司,色谱纯);其他试剂均为国产分析纯。

2 方法与结果

2.1 载体材料的合成

2.1.1 十六烷基氰基乙酸酯的合成 取十六醇 200 mmol 和氰基乙酸 240 mmol, 置于 500 mL 三颈烧瓶中, 加入 120 mL 二氯甲烷和 20 mL 乙酸乙酯, 1 000 r/min 磁力搅拌溶解; 缓慢滴加溶有 300 mmol 缩合剂 DCC 和 20 mmol 催化剂 DMAP 的 60 mL 二氯甲烷溶液, 氮气保护搅拌室温反应 24 h; 加入 100 mL 蒸馏水破坏 DCC, 抽滤, 收集滤液, 滤渣用乙酸乙酯洗涤至白色, 合并滤液置于分液漏斗萃取, 用适量过饱和 NaCl 溶液洗涤 2 次, 加入无水硫酸钠, 除去有机相中的水分, 旋蒸有机溶剂, 析出十六烷基氰基乙酸酯 (Hexadecylcyanoacrylate, HDCA) 粗品。所得 HDCA 粗品经研磨后, 用无水乙醇打浆重结晶, 纯化 3 次后得纯品 HDCA 淡黄色固体 (约 46.4 g, 产率: 75.1%, 纯度: >90%)。

2.1.2 聚乙二醇氰基乙酸酯的合成 取聚乙二醇 10 mmol、DCC 15 mmol 和 DMAP 10 mmol, 置于 250 mL 的三颈烧瓶中, 加入 150 mL 二氯甲烷和 25 mL 乙酸乙酯, 1 000 r/min 磁力搅拌溶解。另称取氰基乙酸 12 mmol 溶于 30 mL 的二氯甲烷和 10 mL 的乙酸乙酯中, 缓慢滴加至烧瓶中, 室温下氮气保护搅拌反应 24 h; 加入 100 mL 蒸馏水, 破坏 DCC, 经抽滤、二氯甲烷洗涤、分液漏斗萃取、收集有机层、过饱和 NaCl 溶液洗涤、无水硫酸钠除水、旋蒸有机溶剂, 得到聚乙二醇氰基乙酸酯 (Monomethoxy-polyethyleneglycolcyanoacrylate cyanoacetate, mPEG-CA) 粗品。所得 mPEG-CA 粗品经研磨后, 用适量的乙酸乙酯打浆重结晶, 纯化 3 次后得纯品 mPEG-CA 白色蜡状固体 (约 17.2 g, 产率: 82%, 纯度: >90%)。

2.1.3 聚十六烷基氰基丙烯酸酯的合成 聚十六烷基氰基丙烯酸酯 (Poly-hexadecylcyanoacrylate, PHDCA) 是由单体 HDCA 聚合而成。取 HDCA 10 g, 置于 100 mL 三颈烧瓶中, 加入 30 mL 二氯甲烷和 10 mL 无水乙醇, 1 000 r/min 磁力搅拌溶解, 向反应液中滴加 37% 甲醛溶液 3.6 mL 和吡咯烷 0.2 mL, 室温下氮气保护搅拌反应 24 h; 将反应液转移至分液漏斗中, 用 10% 盐酸洗涤, 每次 30 mL, 洗涤 3 次, 蒸馏水洗涤, 每次 20 mL, 洗涤 2 次, 最后用适量过饱和 NaCl 溶液洗涤 2 次, 收集有机层, 加入无水硫酸钠除去有机相中的水分, 旋蒸有机溶剂, 析出 PHDCA 粗品。所得 PHDCA 粗品经研磨后, 用适量的无水乙醇打浆重结晶, 纯化 3 次后得纯品 PHDCA 黄色固体 (约 8.6 g, 产率: 78.4%, 纯度: >90%)。

2.1.4 mPEG-PHDCA 的合成 mPEG-PHDCA 是经 Knoevenagel 反应和阴离子聚合反应而成^[4]。称取 PHDCA 22 g 和 mPEG-CA 10 g, 置于三颈烧瓶中, 加入 100 mL 二氯甲烷和 50 mL 乙酸乙酯, 1 000 r/min 磁力搅拌溶

解后滴加 37% 甲醛溶液 1.8 mL 和吡咯烷 0.1 mL, 室温下氮气保护搅拌反应 48 h; 将反应液转移至分液漏斗中, 用 10% 盐酸洗涤, 每次 30 mL, 洗涤 3 次, 蒸馏水洗涤, 每次 20 mL, 洗涤 2 次, 最后用适量过饱和 NaCl 溶液洗涤 2 次, 收集有机层, 加入适量无水硫酸钠除去有机相中的水分, 旋蒸有机溶剂, 析出 mPEG-PHDCA 粗品。所制 mPEG-PHDCA 粗品用少量二氯甲烷溶解后, 冰乙醚沉淀 2 次, 固体经油泵抽真空干燥, 得到纯品 mPEG-PHDCA 淡黄色固体 (约 23.4 g, 产率: 72.8%, 纯度: >90%)。mPEG-PHDCA 的合成路线见图 1。

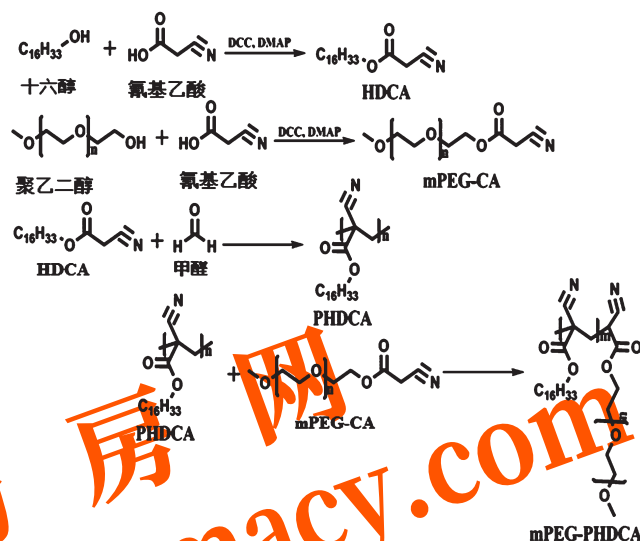


图1 mPEG-PHDCA 的合成路线

Fig.1 Synthesis route of mPEG-PHDCA

2.2 载体材料的表征

2.2.1 核磁共振氢谱 通过核磁共振仪测定“2.2”项下合成所得产物 HDCA、mPEG-CA、PHDCA、mPEG-PHDCA 的核磁共振氢谱 (¹H-NMR)。结果显示, HDCA 的 ¹H-NMR (CDCl₃, 400 Hz), δ (ppm): 0.88 (CH₃—, 3H), 1.26 (—C₁₃H₂₆—, 26H), 1.68 (—CH₂—CH₂—OCO—, 2H), 3.45 (—OCO—CH₂—CN, 2H), 4.20 (—CH₂—CH₂—OCO—, 2H); mPEG-CA 的 ¹H-NMR (CDCl₃, 400 Hz), δ (ppm): 3.42 (CH₃—O—, 3H), 3.50~3.75 (—C₂H₄—O—, 182H), 3.81 (—OCO—CH₂—CN, 2H), 4.36 (—CH₂—OCO—, 2H); PHDCA 的 ¹H-NMR (CDCl₃, 400 Hz), δ (ppm): 0.88 (CH₃—, 3H), 1.28 (—C₁₃H₂₆—, 26H), 1.75 (—CH₂—CH₂—OCO—, 2H), 2.20~2.55 (—C—CH₂—C—, —C—CH₂—CH₂—C—, —OCO—CH (CN)—CH₂—, 3.46H), 4.27 (—CH₂—CH₂—OCO—, 2H); mPEG-PHDCA 的 ¹H-NMR (CDCl₃, 400 Hz), δ (ppm): 0.88 (CH₃—, 3H), 1.26 (—C₁₃H₂₆—, 26H), 1.71 (—CH₂—CH₂—OCO—, 2H), 2.10~2.55 (—C—CH₂—C—, —C—CH₂—CH₂—C—, —OCO—CH (CN)—CH₂—, 3.05H), 3.42 (CH₃—O—, 0.29H), 3.50~3.75 (—C₂H₄—O—,

14.52H), 4.26(—CH₂—OCO—, 2.36H)。¹H-NMR 图谱见图2。

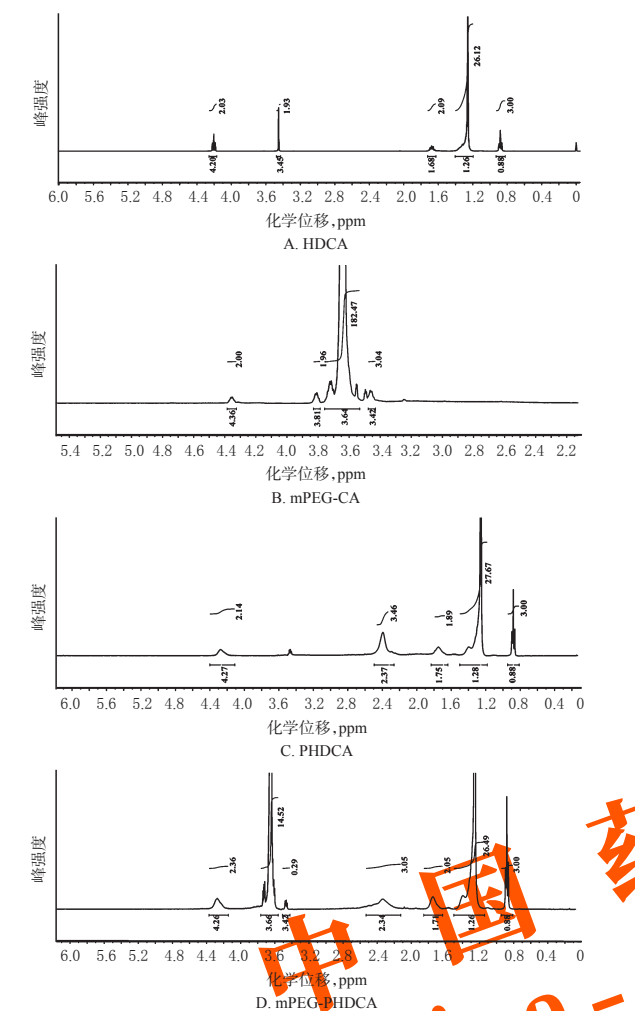


图2 ¹H-NMR图谱
Fig 2 ¹H-NMR spectrum

由图2所示,化学位移0.9左右为十六醇上烷基链甲基的特征峰,化学位移3.4左右为聚乙二醇上端甲氧基的特征峰,将这2个特征峰上的3个氢作为标准值,用于峰强度和推算评估各聚合物的纯度或重均分子量。经计算,HDCA和mPEG-CA合成纯度均大于95%,而PHDCA和mPEG-PHDCA的纯度均大于90%。在聚合物mPEG-PHDCA中,mPEG的重均分子量为2 000,其结构中重复单元—C₂H₄—O—对应约180个氢,图2D相应化学位移峰强度约为15,表明mPEG-PHDCA中的重复单元HDCA约为12个(180/15=12),因此推算出mPEG-PHDCA的重均分子量约为6 000(即2 000+85-18+12×309+12×30-12×18=5 919)。

2.2.2 重均分子量 采用凝胶渗透色谱法测定mPEG-CA、PHDCA、mPEG-PHDCA的重均分子量和多分散系数(PDI)。结果显示,mPEG-CA、PHDCA、mPEG-PHDCA的重均分子量分别为2 110、3 470、5 850,PDI分别为1.07、1.05、1.13。mPEG-PHDCA的重均分子量接近

“2.2.1”项下估算的结果。绘制重均分子量分布曲线,结果见图3。

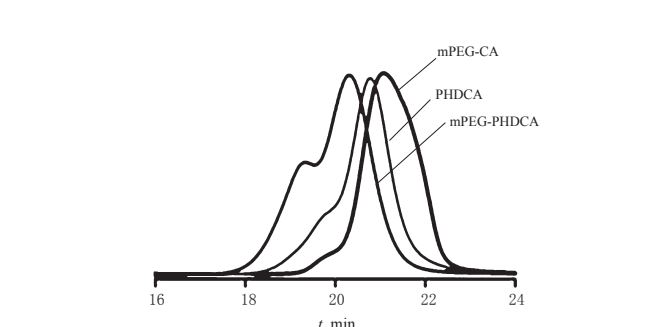


图3 重均分子量分布曲线
Fig 3 Molecular weight distribution curve

由图3显示,PHDCA和mPEG-CA重均分子量分布均一,而mPEG-PHDCA重均分子量分布曲线中有一个前展肩峰,可能是由于聚合反应中有少量的PHDCA直链两侧均偶联了mPEG-CA所致。

2.3 载阿霉素的mPEG-PHDCA-NPs的制备

在前期工艺考察的基础上,笔者采用复乳-溶剂挥发法^[7]制备mPEG-PHDCA-NPs,称取阿霉素10 mg,用去离子水溶解成2.5 mg/mL的内水相贮备液;称取50 mg mPEG-PHDCA,溶于2 mL有机溶剂[二氯甲烷-乙酸乙酯(1:1,V/V)]中构成有机相;将0.5 mL内水相贮备液加入到有机相中,探头超声(功率:40 W,冰浴超声:5 min)乳化分散,形成初乳(W/O);另取10 mL质量浓度为0.5%的泊洛沙姆188水溶液,调节pH至9.0左右构成外水相;在1 000 r/min磁力搅拌下,将外水相逐滴加入初乳中,滴毕,继续搅拌30 min,形成复乳(W/O/W);将复乳置于40 ℃减压旋蒸除去有机溶剂和部分水,最终用纯水定容至10 mL,得到橙红色乳光的载阿霉素的mPEG-PHDCA-NPs混悬液,并具有明显乳光。相同方法,不加阿霉素,制备空白mPEG-PHDCA-NPs混悬液。

2.4 阿霉素的含量测定

采用高效液相色谱法检测阿霉素的含量^[8],色谱柱:安捷伦 ODS 型(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-0.02 mol/L 磷酸二氢钠(磷酸调pH=3)(30:70,V/V);流速:1.0 mL/min;柱温:25 ℃;检测波长:233 nm;进样量:20 μL;出峰时间:5.14 min。以峰面积(y)为纵坐标,质量浓度(x)为横坐标,绘制标准曲线,阿霉素检测质量浓度的线性范围为0.5~50 μg/mL,回归方程为y=85.38x-10.87(r=0.999 8,n=6),检测限为0.1 μg/mL,定量限为0.5 μg/mL。50、5、0.5 μg/mL阿霉素溶液的日内和日间RSD均小于2%(n=3),重复性试验中峰面积的RSD为1.26%(n=3),平均回收率为96.9%,RSD均小于2%(n=3),24 h稳定性试验中峰面积的RSD为1.49%(n=3),均符合方法学要求。

2.5 载阿霉素的mPEG-PHDCA-NPs的质量评价

2.5.1 粒径及Zeta电位 取少量载阿霉素的mPEG-PHDCA-NPs混悬液于样品池中,蒸馏水稀释,激光粒度分析仪测定其平均粒径及Zeta电位。结果显示,平均粒径为(94.61±3.91) nm,Zeta电位为(−11.68±0.83) mV (n=3)。载阿霉素的mPEG-PHDCA-NPs的粒径分布图见图4。

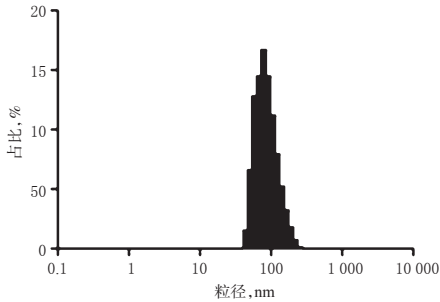


图4 载阿霉素的mPEG-PHDCA-NPs的粒径分布图
Fig 4 Particle size distribution of adriamycin-loaded mPEG-PHDCA-NPs

2.5.2 外观形貌 取一滴载阿霉素的mPEG-PHDCA-NPs混悬液滴于铜网上,用2.0%磷钨酸溶液负染,透射电镜观察其外观形貌。结果显示,载阿霉素的mPEG-PHDCA-NPs呈圆球颗粒,表面圆滑,大小均匀,分布良好,粒子之间未见粘连及团聚现象。载阿霉素的mPEG-PHDCA-NPs的透射电镜图见图5。

2.5.3 包封率和载药量 精密取1 mL载阿霉素的mPEG-PHDCA-NPs混悬液,20 000 r/min(离心半径6.8 cm)离心30 min,取上清液按“2.1”项下方法测定游离的阿霉素浓度,计算包封率和载药量。包封率=(阿霉素的加入量−游离的阿霉素的量)/阿霉素的加入量×100%;载药量=(阿霉素的加入量−游离的阿霉素的量)/载阿霉素的mPEG-PHDCA-NPs的量×100%。结果显示,载阿霉素的mPEG-PHDCA-NPs的载药量为(2.17±0.67)%,包封率为(79.54±4.66)%(n=3),表明mPEG-PHDCA具有较佳的载药能力。

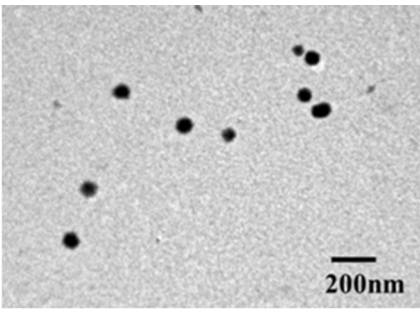


图5 载阿霉素的mPEG-PHDCA-NPs的透射电镜图
Fig 5 TEM of adriamycin-loaded mPEG-PHDCA-NPs

2.5.4 体外释药考察 以pH 7.4磷酸盐缓冲液作为释放介质,采用透析法考察载阿霉素的mPEG-PHDCA-NPs体外释药特性。分别取阿霉素水溶液和载阿霉素的mPEG-PHDCA-NPs混悬液适量(折合阿霉素为1 mg)倒入透析袋内,用透析夹封口后置于200 mL释放介质中,放于37℃恒温水浴振荡(60 r/min)中恒温振荡,分别于0.25、0.5、1、2、3、4、6、8、12、24、48 h取样1 mL,同时补加等量空白释放介质,测定取样液中阿霉素的含量,计算累积释药率(Q),绘制体外释药曲线,再分别用零级动力学、一级动力学、Higuchi模型、Weibull模型对其体外释药行为进行拟合。体外累积释药曲线见图6,体外释药曲线方程拟合结果见表1。

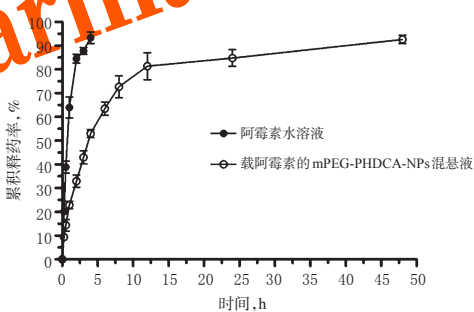


图6 体外累积释药曲线(n=3)
Fig 6 Accumulative release curve *in vitro* (n=3)

表1 体外释药曲线方程拟合结果

样品	零级动力学模型	一级动力学模型	Higuchi模型	Weibull模型
阿霉素水溶液	$Q=0.143\ 3t+0.303$ ($R^2=0.690\ 7$)	$\ln(1-Q)=-0.498\ 9t-0.360\ 3$ ($R^2=0.8882$)	$Q=0.419\ 3t^{1/2}+0.089\ 6$ ($R^2=0.896\ 7$)	$\ln\ln(1/1-Q)=0.814\ 5\ln t-0.161\ 5$ ($R^2=0.965\ 2$)
载阿霉素的mPEG-PHDCA-NPs混悬液	$Q=0.017t+0.321\ 2$ ($R^2=0.563\ 6$)	$\ln(1-Q)=-0.053\ 5t-0.407\ 9$ ($R^2=0.829\ 2$)	$Q=0.145\ 6t^{1/2}+0.136\ 6$ ($R^2=0.833\ 2$)	$\ln\ln(1/1-Q)=0.658\ 2\ln t-1.315\ 4$ ($R^2=0.979\ 4$)

由图6显示,阿霉素水溶液在释放介质中释药很快,4 h时药物已基本全部释放,累积释药率达到95.32%。载阿霉素的mPEG-PHDCA-NPs混悬液的释药行为可以分为突释和缓释两相,开始时释放较快,3 h内的累积释药率为42.25%,这可能由于部分药物吸附在纳米粒表面故释放较快,而随后释药曲线渐趋平稳,缓慢释药,48

h内累积释药率为85.38%。拟合方程结果表明,载阿霉素的mPEG-PHDCA-NPs在磷酸盐缓冲液中的释药行为符合Weibull方程。

3 讨论

虽然纳米制剂为诊断和治疗恶性肿瘤等疾病带来了曙光,但是能够最终进入临床试验甚至推向应用的产

品却非常稀少,究其原因一方面是纳米制剂发挥作用时所依赖的滞留效应在临床试验中并不明显,使动物实验与临床试验结果相差甚远^[9-10];另一方面在于制备纳米制剂的载体材料不能满足临床要求,无机材料虽具备较高的稳定性和载药能力,但同时受到难降解性和毒性的制约;有机聚合物具备优良的生物相容性和可降解性,但往往稳定性差和载药量低而难以应用^[3,11]。因此,纳米制剂的研究既需要以更加准确的临床理论为指导,同时也需要完美的载体材料为依托,本研究中合成和考察的mPEG-PHDCA载体材料也许可为纳米制剂的发展提供参考。

在制备纳米粒工艺中,与其他方法(自乳化溶剂扩散法、纳米沉淀法、乳液聚合法等)比较,本研究选择的复乳-溶剂挥发法更加有利于制备包载水溶性药物的纳米粒^[12-13],其原理是将水溶性药物溶液作为内水相,通过两步乳化形成W/O/W型乳滴,再通过减压旋蒸除去有机溶剂,在聚合物载体析出组装成球的过程的同时包载内水相的药物,其中稳定的初乳是该法成功的关键,整体工艺更复杂,要求较高。由于在制备过程中水溶性药物难以避免地会向外水相泄漏,或者在旋蒸除去有机溶剂过程中吸附在纳米粒表面,故可造成载药性能降低,但相较于已报道^[14-15]的材料,载体材料mPEG-PHDCA仍然具有较佳的包封率和载药量。

综上,本研究采用Knoevenagel反应和阴离子聚合反应成功合成了有机聚合物mPEG-PHDCA,以复乳-溶剂挥发法制备了载阿霉素的mPEG-PHDCA-NPs,该研究证实纳米粒具有较佳的包封率和载药量,粒径均一、分散性好及一定的缓释特性,初步显示出mPEG-PHDCA的良好生物相容性,并有望成为一种合适的纳米递药载体材料,但其体内生物安全性有待进一步研究。

参考文献

- [1] ULBRICH K, HOLÁ K, ŠŮBR V, et al. Targeted drug delivery with polymers and magnetic nanoparticles: covalent and noncovalent approaches, release control, and clinical studies[J]. *Chem Rev*, 2016, 116(9): 5338-5431.
- [2] ZHENG H, GAO F, VALTCHEV V. Nanosized inorganic porous materials: fabrication, modification and application[J]. *J Mater Chem A*, 2016, 4(43): 16756-16770.
- [3] BOBO D, ROBINSON KJ, ISLAM J, et al. Nanoparticle-based medicines: a review of FDA-approved materials and clinical trials to date[J]. *Pharm Res*, 2016, 33(10): 2373-2387.
- [4] PERACCHIA MT, DESMAËLE D, COUVREUR P, et al. Synthesis of a novel poly (MePEG cyanoacrylate-co-alkyl cyanoacrylate) amphiphilic copolymer for nanoparticle technology[J]. *Macromolecules*, 1997, 30(4): 846-851.
- [5] PERACCHIA MT, FATTAL E, DESMAËLE D, et al. Stealth PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles for intravenous administration and splenic targeting[J]. *J Control Release*, 1999, 60(1): 121-128.
- [6] KOLATE A, BARADIA D, PATIL S, et al. PEG: a versatile conjugating ligand for drugs and drug delivery systems[J]. *J Control Release*, 2014, 192(28): 67-81.
- [7] ZAFAR N, AGUSTI G, FESSI H, et al. Elaboration of sponge-like biodegradable cationic particles via double-emulsion solvent evaporation[J]. *J Disper Sci Technol*, 2017, 38(4): 577-583.
- [8] WANG CY, KONG Y, SHEN LJ, et al. Preparation and cellular uptake mechanism evaluation of liposomal coating-cationic mesoporous silica nanoparticles[J]. *Chin J Pharm*, 2017, 48(8): 1138-1147.
- [9] SHI J, KANTOFF PW, WOOSTER R, et al. Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities[J]. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17(1): 20-37.
- [10] 徐红, 高萌, 褚秋辰, 等. 脂磷毒配基 PLGA-TPGS 纳米粒的体外细胞摄取及毒性研究[J]. *中国药房*, 2017, 28(16): 2252-2255.
- [11] SUNDAR DS, ANTONIRAJ MG, KUMAR CS, et al. Recent trends of biocompatible and biodegradable nanoparticles in drug delivery: a review[J]. *Curr Med Chem*, 2016, 23(32): 3730-3751.
- [12] YADAV K, YADAV D, YADAV M, et al. Noscapine loaded plga nanoparticles prepared using oil-in-water emulsion solvent evaporation method[J]. *J Nanopharm Drug Deliv*, 2016, 3(1): 97-105.
- [13] VAUTHIER C. *Polymer nanoparticles for in vivo applications: progress on preparation methods and future challenges*[M]. Berlin: Springer International Publishing, 2016: 3-16.
- [14] SCHLEICH N, SIBRET P, DANHIER P, et al. Dual anti-cancer drug/superparamagnetic iron oxide-loaded PLGA-based nanoparticles for cancer therapy and magnetic resonance imaging[J]. *Int J Pharm*, 2013, 447(1/2): 94-101.
- [15] CAO J, SU T, ZHANG L, et al. Polymeric micelles with citraconic amide as pH-sensitive bond in backbone for anticancer drug delivery[J]. *Int J Pharm*, 2014, 471(1/2): 28-36.

(收稿日期:2017-12-15 修回日期:2018-05-21)

(编辑:邹丽娟)