

鬼臼毒素的聚乙二醇-聚己内酯胶束的制备

★ 高鹏 (江西省鄱阳县人民医院药剂科 鄱阳 333100)

摘要:目的:制备鬼臼毒素的聚乙二醇-聚己内酯嵌段共聚物胶束,对其物理化学性质进行评价。方法:采用开环聚合法合成了聚乙二醇-聚己内酯嵌段共聚物;用薄膜分散法制备了聚合物胶束;用透射电镜观察了聚合物胶束的形态;用激光散射法测定了聚合物胶束的粒径及其分布;用 HPLC 法测定药物胶束的包封率。结果:聚合物胶束大小均匀,具有球形核-壳结构,平均粒径为 56.5 ± 25.8 nm, 药物胶束的包封率为 85.6%。结论:聚乙二醇-聚己内酯嵌段共聚物胶束可作为疏水性药物鬼臼毒素的载体。

关键词:嵌段共聚物;聚合物胶束;鬼臼毒素

中图分类号:R 283.6 **文献标识码:**B

鬼臼毒素(podophyllotoxin, POD)属于木脂素类(lignans),是从鬼臼类植物中得到的天然抗肿瘤活性成分,现在 0.5% 鬼臼毒素酞剂是 WHO 公认的治疗尖锐湿疣(CA)的一线药物^[1]。近年来研究表明,鬼臼毒素具有较强的抗肿瘤、抗病毒活性,更是得到普遍关注。但是实际应用中发现其有很大的毒副作用,临床用鬼臼毒素的半合成衍生物 VP-16、VM-26 等治疗小细胞肺癌、淋巴瘤、白血病、睾丸癌等^[2]。

最近,以 PEG 修饰的两亲性共聚物高分子材料更多的受到人们的关注,用于抗癌药的载体^[3-5]。因为其不但能够将药物增溶于其疏水核中,而且亲水性的 PEG 链段使得在注射进入体内后能够避免被 RES 系统吞噬而具备长循环效应,通过 EPR 效应增加药物对癌细胞的作用。为了降低鬼臼毒素的毒性并能更好地发挥其生物活性,扩大其临床应用,我们决定采用 PEG 修饰的两亲性嵌段共聚物聚乙二醇-聚己内酯(MePEG-PCL)作为载体,制备鬼臼毒素胶束新剂型。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

聚乙二醇单甲醚(mPEG, Mn = 5000, Sigma 公司), ϵ -CL(美国 Acros 公司),辛酸亚锡(Sigma 公司),其他试剂均为分析纯。甲苯(南京化学试剂有

限公司);二氯甲烷(南京化学试剂一厂);乙醚(南京化学试剂有限公司);三氯甲烷(江苏汉邦科技有限公司);甲醇(南京化学试剂有限公司);二甲苯(南京化学试剂有限公司);各试剂均为市售分析纯。

Bruker AV-300 型核磁共振波谱仪(德国 Bruker 公司,MSL2300 型);台式离心机(上海安亭科学仪器厂,800B 型);DZF-200 型真空干燥箱(上海浦东荣丰科学仪器有限公司);激光散射仪(英国 Malvern 公司,Malvern Zetasizer nano se2ries)透射电子显微镜(日本 Hitachi 公司,Hitachi-500 型)。

1.2 实验方法

1.2.1 PEG-PCL 嵌段共聚物的合成及表征 先将 ϵ -己内酯加入一定量 CaH_2 置于一圆底烧瓶中干燥 2 天。将干燥好的 ϵ -己内酯单体在真空度为 0.09 MPa 下减压蒸馏,密封保存在干燥器中。称取一定量 MePEG 装入反应的两口烧瓶中,并放入搅拌子。加入一定量的甲苯,共沸除水。大约 3~4 小时后,将甲苯除尽。加入反应比例的 ϵ -CL 和催化剂 1% $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ 二甲苯溶液,调制加热温度控制在 120 $^{\circ}\text{C}$,开始反应。反应完成后产物用少量二氯甲烷溶解,缓慢倒入冷甲醇/乙醚(4 $^{\circ}\text{C}$)溶液中,沉淀物放置在低温下陈化过夜,抽滤。沉淀得到白色产物,放入真空干燥箱中,40 $^{\circ}\text{C}$ 下真空干燥 3 天^[6,7]。

聚合产物用 $^1\text{H-NMR}$ 法计算平均相对分子质量、表征聚合物的结构。

1.2.2 聚合物胶束的制备 用薄膜分散法制备聚合物胶束。将一定比例的鬼臼毒素和 MePEG-PCL 溶于二氯甲烷溶液中,充分溶解。然后在真空度 0.1 MPa 条件下置于温度为 70 °C 的水浴中旋转蒸发 10 分钟,充分除去有机溶剂的残留后在瓶壁上得到聚合物-药物薄膜。然后在 70 °C 水浴中预热至透明胶状,加入 70 °C 的双蒸水和玻璃珠十数枚。采用强力机械搅拌器 1 000 r/min 搅拌。形成的胶束溶液过 0.8 μm 和 0.45 μm 的微孔滤膜去除未包裹的药物结晶及聚合物聚集物。

取充分溶胀的葡聚糖凝胶适量,制备凝胶柱(250 mm \times 15 mm)^[8]。准确吸取 1.0 mL 胶束上柱,用 pH7.0 PBS 洗脱,流速 1.0 mL \cdot min⁻¹,每 3.0 mL 收集一次洗脱液,分别测定 290 nm 波长处的吸收变化。结果显示,胶束约在 10 ~ 30 mL 之间完全洗脱,药物约在 35 ~ 80 mL 之间完全洗脱,两者分离程度较好。合并收集的胶束部分,进行处理,应用 HPLC 法测定包封率。

色谱条件: 色谱柱: ODS-C18 (250 mm \times 4.6 mm, 粒径 5 μm), 液相条件: 流动相为甲醇: 水: 冰醋酸 = 59: 41: 0.6 (体积比), 检测波长 = 285 nm (聚合物该波长下无干扰吸收), 流速 = 1.0 mL/min, 柱温: 30 °C, 进样量 20 μL ^[9]。高效液相色谱法测量 3 份胶束样本对鬼臼毒素的包封率,取平均值,根据包封率 = (包封的药物量/总的药物量) \times 100%, 以洗脱的胶束子中的鬼臼毒素的含量与未过柱的胶束混悬液中鬼臼毒素的含量相比较。

1.2.3 胶束的粒径及形态考察 胶束粒径分布取其载药混悬液适量加双蒸水稀释,采用 Zetasizer3000HS 型粒径分析仪测定胶束混悬液的粒径及其粒径分布。

将实验制备的一滴胶束溶液置于铜网晶片上,0.2% 磷钨酸负染法制备样品,多余液体用滤纸吸去室温烘干后在透射电镜 Hitachi H7650 上观察并拍照。

2 结果与讨论

2.1 嵌段共聚物的表征

MePEG-PCL $^1\text{H-NMR}$ 图谱示, $\delta = 1.41, 1.64, 2.30$ 和 4.10 ppm 分别为 PCL 单元- CH_2 -、 $(\text{CH}_2)_2$ -、 $-\text{OCCH}_2$ -、and $-\text{CH}_2\text{O}$ - 亚甲基的质子峰; $\delta = 3.65$ ppm 的锐峰为 PEG 中亚甲基单元 $-(\text{CH}_2)_2-$; $\delta = 4.1$ ppm 的弱峰则是 PEG 末端甲基峰,该图谱与多篇文献结果相同^[7,10]。mPEG 链段

的相对分子质量为 5 000 计,依据己内酯的氢与聚乙二醇的氢的特征峰面积之比值得出 PCL 链段的相对分子质量。本实验合成的聚乙二醇-聚己内酯经计算,分子量约为 10 000。

通过开环聚合反应获得高相对分子质量聚酯的反应须在较高温度条件下进行,虽然高温条件有利于相对分子质量的提高,但酯交换等副反应发生的几率也随之增加,因此合成高相对分子质量聚酯必须阻止酯交换反应的发生。赵氏等^[10]的研究表明,在 120 °C 不会发生酯交换反应,所以实验中将聚合温度确定为 120 °C。由结果可见,由核磁共振氢谱测得的聚合物产品结构与实验预期的聚合物结构十分接近,说明以辛酸亚锡为催化剂,采用阴离子开环聚合合法合成甲氧基聚乙二醇-聚己内酯嵌段共聚物的方法是可行的。

2.2 鬼臼毒素胶束的形态学观察

制备的 PPT 胶束混悬液是外观均一、稳定的胶体状分散体系。有蓝色乳光,经 DLS 测定胶束粒径为 (56.5 ± 25.8) nm,与电镜示最大的粒子粒径不超过 150 nm,分布较均匀。该图清晰显示载药胶束多为球形或近球形粒子,形成聚合物胶束的疏水链段部分不被磷钨酸所染色,呈现亮白色的内核,亲水的 PEG 外壳吸附了水相中的部分磷钨酸,电镜下呈现灰色晕环。背景为磷钨酸溶液干燥后形成,不透电子束,呈暗黑色。

2.3 鬼臼毒素胶束的包封率测定

在 Sephadex G50 凝胶柱上以蒸馏水为洗脱液分离鬼臼毒素胶束,可见明显呈蓝色乳光的洗脱部分即为含药的胶束子。根据包封率(包封的药物量/总的药物量) \times 100%。以洗脱的胶束子中的鬼臼毒素的含量与未过柱的胶束混悬液中鬼臼毒素的含量相比较,即得 3 份样本中鬼臼毒素胶束的平均包封率为 85.6%。

3 结论

本实验合成的聚乙二醇-聚己内酯嵌段共聚物,其两种单体材料都是经 FDA 批准的可用于人体的生物相容性高分子材料^[11]。在水溶液中可以形成具有核-壳结构的胶束,其临界缔合浓度较低,对疏水药物具有良好的装载和缓控释能力。在亲水链段 PEG 长度一定的条件下,可以通过改变疏水链段 PCL 的长度来调节聚合物胶束的物理化学性质,并控制药物的释放动力学等。因此,两亲性嵌段聚合物胶束是一类具有良好发展前景的药物载体。有关 mPEG-PCL 胶束的体内药剂学性质和不同分子量的

哮喘固本颗粒剂薄层色谱鉴别及微生物检查

★ 杨卫星 陈浩 (江西省中医院 南昌 330006)

摘要:目的:确立哮喘固本颗粒剂的质量检验标准。方法:采用薄层色谱法鉴别处方中黄芪、白术、防风;采用药典微生物检验标准对哮喘固本颗粒剂进行检测。结果:哮喘固本颗粒剂生产质量状况良好。结论:本研究为哮喘固本颗粒剂的质量检验标准提供了科学依据。

关键词:哮喘固本颗粒剂;薄层色谱鉴别;微生物检验

中图分类号:R 284.1 **文献标识码:**B

哮喘固本颗粒剂具有截哮平喘、扶正固本等功效,用于预防感冒,提高御寒能力,控制和减少慢性气管炎、哮喘、慢性阻塞性肺气肿等疾病。临床使用多年,效果显著。为了控制其质量,保证临床用药安全、有效,我们对哮喘固本颗粒剂进行了质量标准的再研究,采用薄层色谱法对七味处方中防风、黄芪、白术等进行薄层色谱鉴别;并对哮喘固本颗粒剂进行微生物检定。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

玻璃点样毛细管,华西医科大学仪器厂生产;数显恒温水浴锅 HH-S,江苏省金坛市医疗仪器厂;高温灭菌锅,上海博迅实业有限公司医疗设备厂;操作台,苏州净化设备有限公司;电子天平,BS 124S,北京赛多利斯仪器;超声波清洗器,KQ3200,昆山市超

声仪器有限公司;微型植物试样粉碎,FZ-102,天津市泰斯特仪器有限公司;真空干燥箱,DZF-6050,上海博迅实业有限公司;薄层电动涂敷器,YOKO-BF,武汉科新技术开发公司。

1.2 试剂

大肠埃希菌:肉汤,杭州微生物试剂有限公司;对照品,黄芪(120947-200706 中国药品生物制品检定所);对照药材,防风(110781-200613 中国药品生物制品检定所);白术(120925-200708 中国药品生物制品检定所);化学试剂均为分析纯试剂。

2 薄层色谱的实验操作^[1-3]

2.1 防风

2.1.1 供试品溶液的制备 取本品 10 g,加丙酮 50 ml,超声处理 15 分钟,滤过,取续滤液 5 ml 蒸干,残渣加甲醇 1 ml 溶解,作为供试品溶液。

聚合物载体包载鬼臼毒素胶束的性质正在研究中。

参考文献

- [1]徐文严. 尖锐湿疣的治疗进展[J]. 国外医学皮肤病学分册, 1992,18(1):6.
- [2]张覃沐. 鬼臼乙叉甙(VP16)[J]. 河南医学院学报,1985,20(1):62.
- [3]A. Ro'sler G. Vandermeulen, H. Klok, Advanced drug delivery devices via self-assembly of amphiphilic block copolymers[J]. Adv. Drug Del. Rev 2001(53):95-108.
- [4]D. Sutton, N. Nasongkla, E. Blanco, Functionalized micellar systems for cancer targeted drug delivery[J]. Pharma. Res, 2007, 24(6):1029-1046.
- [5]N. Kumar, M. Ravikumar, A. J. Domb, Biodegradable block copolymers[J]. Adv. Drug Del. Rev, 2001(53):23-44.
- [6]J. Liu, F. Zeng, C. Allen, In vivo fate of unimers and micelles of a poly(ethylene glycol)-block-poly(caprolactone) copolymer in mice following intravenous administration[J]. Euro. J. Pharma. Biophar-

ma, 2007(65):309-319.

- [7]S. Zhou, X. mo Deng, H. Yang, Biodegradable poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene glycol) block copolymers: characterization and their use as drug carriers for a controlled delivery system, Biomaterials, 2003(24):3563-3570.
- [8]张晓云,倪京满. 正交试验法优选鬼臼毒素纳米脂质体的制备工艺[J]. 西北药学杂志, 2006, 21(1):34.
- [9]张琰,程建峰,贺建荣. 高效液相色谱法测定疣克酊中鬼臼毒素的含量[J]. 中国医院药学杂志, 2002, 22(12):721-722.
- [10]赵三平,尹玥,冯增国 PCL-PEG-PCL 嵌段共聚物的合成与性能[J]. 功能高分子学报, 2002, 14(1):44.
- [11]I. G. Shin, S. Y. Kim, Y. M. Lee, Methoxy poly(ethylene glycol)/ ϵ -caprolactone amphiphilic block copolymeric nanoparticle suspension containing indomethacin. I. Preparation and characterization[J]. J. Control. Release, 51(1998):1-11.

(收稿日期:2009-11-20 责任编辑:曹征)