DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.03.011

载紫杉醇共聚物胶束的合成与表征 *

李扬龚 钱嫦云 陆 菲 徐晓芬 沈园园△

（上海交通大学药学院 上海 200240）

摘要 目的：制备一种包封率、载药量高的紫杉醇载体材料。**方法：**开环聚合法一步合成了两种两亲性共聚物 PTL1 和 PTL2,以核磁和凝胶渗透色谱进行了产物的表征,以固体分散 - 超声法制备紫杉醇胶束,考察了胶束的载药量、包封率。**结果：**核磁和凝胶渗透色谱的结果显示得到了目标产物,所制备得到的载紫杉醇胶束包封率可以达到 90%以上,载药量为 9.5%以上。**结论：**实验结果表明我们所合成的 PTL1 和 PTL2 是好的紫杉醇载体材料。

关键词：开环聚合；载药量；固体分散 - 超声法；包封率

中图分类号：R914 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273(2014)03-441-03

Preparation and Characterization of Paclitaxel-loaded Polymeric Micelles*

LI Yang-gong, QIAN Chang-yun, LU Fei, XU Xiao-fen, SHEN Yuan-yuan△

(School of Pharmacy,Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, 200240, China)

ABSTRACT Objective: To obtain a high loading and encapsulation efficiency micellar carrier of paclitaxel. **Methods:** Amphiphilic block copolymers PTL1 and PTL2, were synthesized by ring-opening polymerization and their compositon were characterized by 1H-NMR and GPC. Paclitaxel micelles were prepared through solid-dispersion-sonication method. The drug loading and encapsulation efficiency of the micelles were investigated. **Results:** PTL1 and PTL2 were successfully synthesized The drug loading contents of micelles were higher than 9.5% and the encapsulation efficiency were high than 90%. **Conclusion:** PTL1 and PTL2 could be promising paclitaxel micellar carriers.

Key words: Ring-opening polymerization; Drug loading; Solid dispersion-sonication; Encapsulation efficiency

Chinese Library Classification(CLC):R914 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2014)03-441-03

前言

紫杉醇 (Paclitaxel, PTX),为从红豆杉科的红豆杉 (紫杉) 属 (Taxus) 植物树皮中分离出的具有良好抗癌活性的天然植物药,是目前临床一线抗肿瘤化疗药物[1-4]。紫杉醇极低的水溶性 (0.006 mg/mL) 限制了它在临床的应用，紫杉醇临床用制剂 Taxol ,由于含有大量的聚氧乙烯蓖麻油和乙醇,因此有很大的毒副作用,会导致过敏反应、神经毒性、肝肾毒性等不良反应,严重时可能导致死亡[5-9]。因此急切需要找到新的给药系统提高紫杉醇的溶解度,降低不良反应。两亲性嵌段共聚物胶束是一种新型的给药方式[10],共聚物在水中自组装形成“核 - 壳”结构的纳米载体,胶束的核能包封紫杉醇物不被降解,壳可以起到稳定的作用。胶束给药系统因其可以提高药物的溶解度[11],提高药物的稳定性[12],增强药物在肿瘤组织内的积蓄,具有长循环作用[13]和靶向作用[14-17],在最近的十年,取得了飞速进展[11, 17-20]。本研究首先合成了两种两亲性共聚物,分别为:PTL1 和 PTL2,它们具有相同的组成和亲疏水段比,但是 PTL1 的分子量是 PTL2 的一半；进一步采用固体分散 - 超声的方法制备了这两种材料的载紫杉醇胶束,并用 HPLC 测定了这两种胶束的载药量和包封率。实验结果显示，这两种胶束的包封率都在 90%以上,载药量也可以达到 9.5 wt.%以上。本研究为该载体应用于紫杉醇给药胶束提供了初步的研究基础。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

真空干燥箱 (上海一恒科技有限公司) ;核磁共振仪 (美国 Varian 公司) ;凝胶渗透色谱 (美国 waters 公司) ;冰箱(Siemens 公司);超纯水仪器(Millipore 公司);超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)；电子天平（北京赛多利斯仪器系统有限公司);单甲氧基聚乙二醇(MPEG,分子量 2000 和 5000,Fluka);三亚甲基碳酸酯(TMC,吉拉特化工);左旋丙交酯(LLA,吉拉特化工);辛酸亚锡(Alfa Aesar);其余常用化学试剂均为市售分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 PTL1 和 PTL2 的合成与表征 将一定量的 TMC 和 LLA 单体,加入到干燥好的厚壁耐压瓶中,抽真空并充氮气操作三次,加入一定量的聚乙二醇(MPEG,分子量 2000 和 5000)、甲苯和辛酸亚锡催化剂,缓释配套特质塞密闭,在 130 ℃油浴恒温搅拌 48 小时，趁热将溶液沉淀在无水冷乙醚中，通风橱挥干,再在真空干燥箱中干燥 72 小时。MPEG、LLA、TMC 的投料比为 4:4:1(W/W/W)。分别用核磁共振波谱仪 (1H-NMR) 和凝胶渗透色谱(GPC)对所合成的 PTL1 和 PTL2 进行结构表征。

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81171439/H1816)

作者简介:李扬龚(1988-),男,硕士研究生,主要研究方向:聚合物胶束

△通讯作者:沈园园,电话:+86(21) 3420-4793,E-mail: shenyuanyuan@sjtu.edu.cn

(收稿日期:2013-06-08 接受日期:2013-06-30)

1.2.2 **PTL1 和 PTL2 溶解度的测定** 将一定量的 PTL1 或 PTL2 与 1mL 超纯水放置在 5mL EP 管内,放于 37℃ 转速设为 120 rpm 的摇床,摇振 24 h 后取出,肉眼观测管内溶液是否澄清。

1.2.3 **载紫杉醇的 PTL1 和 PTL2 胶束的制备与表征** 分别将 5 mg 紫杉醇和 45 mg PTL1 或 PTL2 加入到 2 mL 二氯甲烷中[19],溶解,旋蒸除去有机溶剂,再在 0℃ 冰浴条件下加入超纯水并超声 5 min, 使其自组装形成胶束 MPTL1 和 MPTL2。考察 MPTL1 和 MPTL2 的载药量和包封率。

2 结果

2.1 PTL1 和 PTL2 的核磁分析

以辛酸亚锡为催化剂,单甲氧基聚乙二醇为引发剂一步开环合成了具有不同分子量但是相同 MPEG/LLA/TMC 组成比的共聚物 PTL1 和 PTL2,用核磁氢谱测定了它们的化学组成,并通过凝胶渗透色谱表征了它们的分布和分子量。图 1 a) 是 PTL1 的氢谱,图 1 b)是 PTL2 的氢谱。MPEG(分子量 2000 和 5000)的单甲氧基质子峰是 δ = 3.38 ppm (a),此外,MPEG(分子量 2000 和 5000) 中重复单元的亚甲基峰是 δ =3.60 ppm (b), δ =1.64 ppm (c) 和 δ =5.3 ppm (d)分别归属于 LLA 重复结构单元中 -CCH_3 和 -COCHO- 上的质子。而 δ =2.19 ppm (f)和 δ =4.23 ppm (e)分别归属于 TMC 重复结构单元中 -CCH_2C- 和 -CCH_2O- 上的质子。由 δ =2.19、1.64、5.3 ppm 特征峰面积的比值以及 MPEG 嵌段的分子量(分子量 2000 和 5000)来计算产物的分子量。从表 1 我们可以看到,由核磁结果得到的合成产物 PTL1 的组成 (MPEG:LLA:TMC=50:30:20) 与投料比(MPEG:LLA:TMC=44:44:11)稍微有点区别,可能是反应过程中环境没有完全密闭聚合反应没进行完全所导致的,由核磁结果计算得到的分子量 4000 也与理论值 4500 接近, 而 PTL2 的组成 (MPEG:LLA:TMC=55:30:15) 与投料比 (MPEG:LLA:TMC=44:44:11)也有一定区别,计算得到的分子量 9000 比理论值 11250 也要小一些,可能是 LLA 没有完全聚合上去。从凝胶渗透色谱的结果来看,所合成的两种材料均具有较窄的分子量分布,PDI 分别为 1.2 和 1.2, 他们具有的亲水链段和疏水链段比达到了 50:50。PTL2 的分子量约是 PTL1 的 2.3 倍,与理论接近。

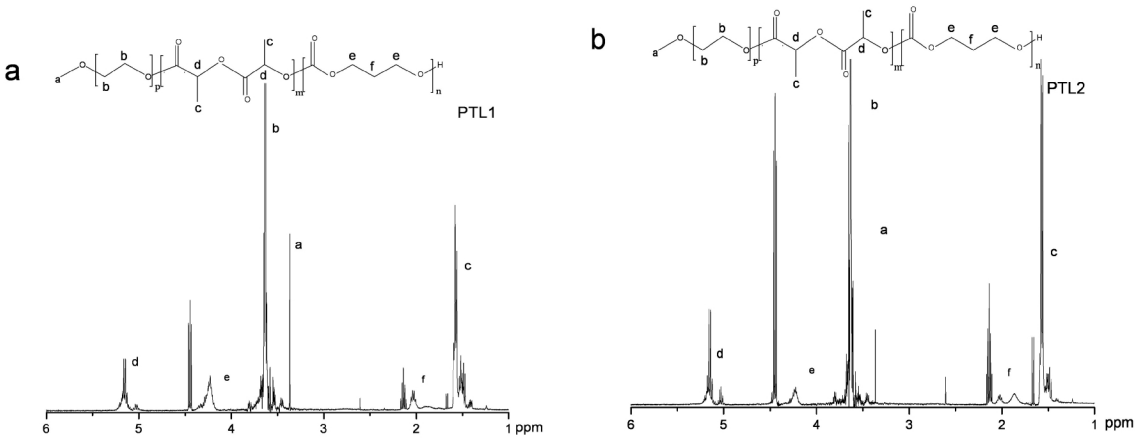

图 1 PTL1 (a)和 PTL2 (b)的核磁图谱

Fig.1 1HNMR spectra of PTL1 (a) and PTL2 (b)

2.2 PTL1 和 PTL2 溶解度的测定

如表 1 所示,PTL1 的水溶解度达到了 80 mg/mL,而 PTL2 的水溶解度则仅仅只有 8 mg/mL。说明在组成和亲水疏水比例一样的情况下,分子量的差异导致了水溶解度的极大差异。

表 1 聚合物的组成、分子量及溶解度

Table 1 Molecular weights, solubilities and Compositions of copolymers

Polymer	Composition (wt%)	Mn (Theory)	Mn (NMR)	Mn (GPC)	PDI (GPC)	Solubility (mg/mL)
PTL1	50/30/20	4500	4000	3900	1.2	80
PTL2	55/30/15	11250	9000	8450	1.2	8

2.3 载紫杉醇的 PTL1 和 PTL2 胶束的制备与表征

从表 2 我们可以看到,MPTL1 粒径在 30 nm 左右,MPTL2 粒径在 70 nm 左右, 其粒径之比恰与其分子量之比相同。PDI 在 0.2~0.3 之间,说明粒径比较均一。MPTL1 和 MPTL2 的载药量均达到了 9.8 %以上, 包封率在 98 %左右。说明 PTL1 和 PTL2 是很好的紫杉醇载体。

表 2 胶束的粒径、分散系数、载药量、包封率

Table 2 Particle size, PDI, EE and DL of micelles

Micelles	ptx/polymer (W/W)	EE (%)	DL (%)	Particle size (nm)	PDI
MPTL1	10/90	98.33± 2.98	9.83± 0.30	32.2± 1.6	0.221± 0.037
MPTL2	10/90	97.45± 3.13	9.75± 0.31	70.6± 5.3	0.280± 0.022

3 结论

胶束给药系统因其可以提高药物的溶解度,提高药物的稳定性,增强药物在肿瘤组织内的积蓄,具有长循环作用和靶向作用,在最近的十年,取得了飞速进展。本研究合成了两亲性嵌段共聚物 PTL1 和 PTL2，并制备了载紫杉醇胶束 MTPL1 和 MPTL2。研究表明 MPTL1 和 MPTL2 的载药量可达 9.5%以上，包封率在 95%以上，说明 PTL1 和 PTL2 在胶束给药上有很大的应用前景。

参 考 文 献(References)

[1] Naill M. C., Kolewe M. E., Roberts S. C. Paclitaxel uptake and transport in taxus cell suspension cultures [J]. Biochem Eng J, 2012, 63: 50-56

[2] Seki M., Ohzora C., Takeda M., et al. Taxol (paclitaxel) production using free and immobilized cells of taxus cuspidata [J]. Biotechnol Bioeng, 1997, 53(2): 214-219

[3] Lv P. P., Ma Y. F., Yu R., et al. Targeted delivery of insoluble cargo (paclitaxel) by pegylated chitosan nanoparticles grafted with arg-gly-asp (rgd) [J]. Mol Pharm, 2012, 9(6): 1736-1747

[4] Lv P. P., Wei W., Yue H., et al. Porous quaternized chitosan nanoparticles containing paclitaxel nanocrystals improved therapeutic efficacy in non-small-cell lung cancer after oral administration [J]. Biomacromolecules, 2011, 12(12): 4230-4239

[5] Friedland D., Gorman G., Treat J. Hypersensitivity reactions from taxol and etoposide [J]. J Natl Cancer Inst, 1993, 85(24): 2036

[6] Dank M. [weekly taxol (paclitaxel) administration in the second-line treatment of breast cancer] [J]. Magy Onkol, 2002, 46(2): 189-191

[7] Meerum Terwogt J., van Tellingen O., Nannan Panday V. R., et al. Cremophor el pharmacokinetics in a phase i study of paclitaxel (taxol) and carboplatin in non-small cell lung cancer patients [J]. Anticancer Drugs, 2000, 11(9): 687-694

[8] Hennequin C., Giocanti N., Favaudon V. Interaction of ionizing radiation with paclitaxel (taxol) and docetaxel (taxotere) in hela and sq20b cells [J]. Cancer Res, 1996, 56(8): 1842-1850

[9] Guchelaar H. J., ten Napel C. H., de Vries E. G., et al. Clinical, toxicological and pharmaceutical aspects of the antineoplastic drug taxol: A review [J]. Clin Oncol (R Coll Radiol), 1994, 6(1): 40-48

[10] Wang C., Wang Y., Fan M., et al. Characterization, pharmacokinetics and disposition of novel nanoscale preparations of paclitaxel [J]. Int J Pharm, 2011, 414(1-2): 251-259

[11] Kim S., Shi Y., Kim J. Y., et al. Overcoming the barriers in micellar drug delivery: Loading efficiency, in vivo stability, and micelle-cell interaction [J]. Expert Opin Drug Deliv, 2010, 7(1): 49-62

[12] Su W., Luo X. H., Wang H. F., et al. Hyperbranched polycarbonate-based multimolecular micelle with enhanced stability and loading efficiency [J]. Macromol Rapid Commun, 2011, 32(4): 390-396

[13] 曾昭武, 肖人钟, 王小丽, 等. 聚乙二醇—聚乳酸嵌段共聚物纳米粒的研究进展 [J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(1): 179-182
Zeng Zhao-wu, Xiao Ren-zhong, Wang Xiao-li, et al. Study Progress of Polyethylene Glycol-Polylactic Acid Block Copolymer Nanoparticles [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2012, 12(1): 179-182

[14] Wang F., Chen Y., Zhang D., et al. Folate-mediated targeted and intracellular delivery of paclitaxel using a novel deoxycholic acid-o-carboxymethylated chitosan-folic acid micelles [J]. Int J Nanomedicine, 2012, 7: 325-337

[15] Jiao Z., Wang X., Chen Z. Folate-conjugated methoxy poly (ethylene glycol)/poly (l-alanine) amphiphilic block copolymeric micelles for targeted delivery of paclitaxel [J]. Drug Deliv, 2011, 18(7): 478-484

[16] Liu Y., Sun J., Cao W., et al. Dual targeting folate-conjugated hyaluronic acid polymeric micelles for paclitaxel delivery [J]. Int J Pharm, 2011, 421(1): 160-169

[17] Wu W., Zheng Y., Wang R., et al. Antitumor activity of folate-targeted, paclitaxel-loaded polymeric micelles on a human esophageal ec9706 cancer cell line [J]. Int J Nanomedicine, 2012, 7: 3487-3502

[18] Wang Y., Wang C., Gong C., et al. Polysorbate 80 coated poly (varepsilon-caprolactone)-poly (ethylene glycol)-poly (varepsilon-caprolactone) micelles for paclitaxel delivery [J]. Int J Pharm, 2012, 434(1-2): 1-8

[19] Song Lei, Shen Yuan-yuan, Hou Jing-wen, et al. Polymeric micelles for parenteral delivery of curcumin: Preparation, characterization and in vitro evaluation [J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2011, 390(1-3): 25-32

[20] Yoncheva K., Calleja P., Agueros M., et al. Stabilized micelles as delivery vehicles for paclitaxel [J]. Int J Pharm, 2012, 436 (1-2): 258-264