

• 药物制剂与药品质量控制 •

## 蓝萼甲素自组装纳米胶束的制备与性质研究\*

杨林洁<sup>1</sup> 张健<sup>2</sup> 史家文<sup>3</sup> 王向涛<sup>1</sup>

(1. 北京协和医学院药用植物研究所、中草药物质基础与资源利用教育部重点实验室, 100193; 2. 苏州大学药学院天然药物化学教研室, 215000; 3. 黑龙江中医药大学药学院, 哈尔滨 150040)

**摘要** 目的 制备蓝萼甲素自组装纳米胶束,并考察其性质。方法 以三嵌段聚合物聚酯-聚乙二醇(PLGA-PEG-PLGA)为载体,采用溶剂蒸发法制备蓝萼甲素胶束,并通过正交实验筛选最佳制备工艺;采用荧光探针法测定临界胶束浓度(CMC),透析法测载药胶束包封率和载药量,Zetasizer nano ZS 仪测定其粒径和 Zeta 电位,透射电镜观察形态,并对其体外释放进行研究。结果 胶束的 CMC 为  $2.5 \times 10^{-3} \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; 平均粒径  $(62.49 \pm 0.60) \text{ nm}$ , 电位为  $(-25.4 \pm 0.4) \text{ mV}$ ; 平均包封率  $(84.85 \pm 2.00) \%$ ; 平均载药量  $(5.36 \pm 1.00) \%$ ; 体外缓释约 12 h,符合 Higuchi 方程。结论 用三嵌段聚合物 PLGA-PEG-PLGA 可制备蓝萼甲素纳米胶束,因其缓释和纳米粒度特性而具有良好的应用前景。

**关键词** 蓝萼甲素; 嵌段共聚物; 自组装胶束

中图分类号 R944.9; TQ460.6

文献标识码 A

文章编号 1004-0781(2012)06-0775-04

### Preparation and Properties of Glaucocalyxin A - loaded Self-assemble Nanomicelles

YANG Lin-jie<sup>1</sup>, ZHANG Jian<sup>2</sup>, SHI Jia-wen<sup>3</sup>, WANG Xiang-tao<sup>1</sup> (1. Key Laboratory of Bioactive Substances and Resources Utilization of Chinese Herbal Medicine, Institute of Materia Medica, Peking Union Medical College, Beijing 100193, China; 2. School of Pharmacy, Soochow University, Suzhou 215000, China; 3. School of Pharmacy, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

**ABSTRACT Objective** Glaucocalyxin A shows a significant anti-tumor effect, but the poor water solubility greatly limits its further application. To solve this problem, micelles were intended to be prepared for the administration of Glaucocalyxin A.

**Methods** Glaucocalyxin A micelles were made by using solvent evaporation method with triblock polymer PLGA-PEG-PLGA being the carrier. The preparation was optimized by means of orthogonal experimental design. The critical micelle concentration (CMC) of the polymer was determined with pyrene fluorescent probe method. Dialysis was employed to measure the entrapment efficiency and drug-loading rate. Particle size and zeta potential were studied using Zetasizer nano ZS instrument and the morphology was observed under transmission electron microscope. The drug release *in vitro* was studied. **Results** The CMC of the polymer was  $2.5 \times 10^{-3} \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ . The mean diameter of the particle was  $(62.49 \pm 0.60) \text{ nm}$  with the zeta potential being  $(-25.4 \pm 0.4) \text{ mV}$ ; the average entrapment efficiency was  $(84.85 \pm 2.00) \%$  and the average drug-loading rate was  $(5.36 \pm 1.00) \%$ . The drug release profile *in vitro* exhibited 12-hour sustained release effects and fit Higuchi linear equation.

**Conclusion** Glaucocalyxin A-loaded nanomicelles, gained with the use of polymer PLGA-PEG-PLGA, could solve the poor solubility of the drug. Meanwhile, because of the sustained release and enhanced permeability and retention effect, due to the nano-particle size, it is expected that they may have a good potential application prospect in antitumor therapy.

**KEY WORDS** Glaucocalyxin A; Block copolymer; Self-assemble micelle

蓝萼甲素又名王枣子乙素,是从唇形科香茶属植物蓝萼香茶菜中提取出的二萜化合物,具有 15-氧-16 贝壳杉烯(ent-15-oxo-16-kaurene)骨架,是香茶菜中的

主要活性成分。研究认为其具有明显的抗肿瘤作用<sup>[1]</sup>,但其水溶性差,给药困难,且在体内代谢很快,如在肝微粒体中可代谢生成羟基或双羟基产物,在胆汁中可代谢成异构化产物,因而需长时间大剂量给药才能产生疗效。目前对蓝萼甲素的剂型研究极少,聚合物胶束稳定性好,在药物的增溶、缓释及靶向等方面均表现出非常好的应用前景。笔者以嵌段聚合物聚酯-聚乙二醇(PLGA-PEG-PLGA)制备胶束,装载蓝萼甲素,报道如下。

### 1 材料与方法

**1.1 仪器** METTLER TOLEDO AL204 电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司), Zetasizer nano ZS 型

收稿日期 2011-10-20 修回日期 2011-12-12

基金项目 \*北京市自然科学基金资助项目(7092067); 国家科技部国际合作项目基金资助(2008DFA31070)

作者简介 杨林洁(1985-),女,山东烟台人,在读博士,研究方向:药物新剂型。电话:010-57833266, E-mail: yanglinjiejiayou@hotmail.com。

通讯作者 王向涛(1973-),男,北京人,副研究员,硕士生导师,博士,从事药物新剂型研究工作。电话:010-57833266, E-mail: xtaowang@163.com。

粒度仪/电位仪(英国 Malvern Instruments 公司) ,JEM 1400 透射电子显微镜(日本 JEOL 公司) ,HGC-36A 氮吹仪(天津恒奥科技发展有限公司) ,TT-8(D) 透皮仪(天津市正通科技有限公司) ,TJ-3A 注射泵(保定兰格恒流泵有限公司) ,Ultimate 3000 高效液相色谱仪(戴安公司)等。

**1.2 试药** PLGA-PEG-PLGA(济南岱罡生物技术有限公司) ,蓝萼甲素(苏州大学药学院提供 ,纯度 > 99.0%) ,甲醇为色谱纯 ,其他试剂均为分析纯。

**1.3 空白胶束的制备** 采用溶剂蒸发法制备载药胶束 ,考察丙酮相加入方法对胶束粒径的影响。具体方法如下:称取 3 份等量聚合物 PLGA-PEG-PLGA 溶于丙酮中 4 ℃ 条件下加到水相中 ,去除丙酮。比较以下 3 种丙酮相加入方法对胶束粒径的影响:直接倒入水中、用注射器滴加到水中、用注射泵以 100 μL · min<sup>-1</sup> 注入到水中。

**1.4 临界胶束浓度 (critical micelle concentration , CMC) 的测定** 采用芘( pyrene) 荧光探针技术测定聚合物 PLGA-PEG-PLGA 的临界胶束浓度。分别精密移取 8 × 10<sup>-6</sup> mol · L<sup>-1</sup> 芘的甲醇溶液 1 mL 于 8 份 10 mL 棕色量瓶 ,氮吹去除甲醇 ,加入系列不同浓度的聚合物空白胶束溶液 ,芘的终浓度为 8 × 10<sup>-7</sup> mol · L<sup>-1</sup> ,过夜放置 ,以 335 nm 为激发波长进行荧光扫描测其荧光值 ,计算 CMC。

**1.5 正交设计优化载药胶束处方** 根据单因素考察结果 ,以投药量(A) 、V<sub>丙酮</sub>/V<sub>水</sub>(B) 及聚合物浓度(C) 为考察因素 ,每个因素 3 个水平 ,如表 1 所示 ,用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交表设计实验 ,实验方法同空白胶束的制备(丙酮相采用注射泵 100 μL · min<sup>-1</sup> 注入到水中)。

表 1 正交因素表  
Tab.1 Factors and levels

水平	A	B	C/ (mg · mL <sup>-1</sup> )
1	1 : 5	1 : 5	5
2	1 : 10	2 : 5	10
3	1 : 15	3 : 5	15

**1.6 色谱条件** 色谱柱: Kromasil C<sub>18</sub> (4.6 mm × 150 mm 5 μm) ;流动相: 甲醇-水 (50 : 50) ;流速: 1 mL · min<sup>-1</sup> ;检测波长: 231 nm ;进样量: 20 μL ;柱温: 30 ℃。

**1.7 包封率和载药量测定** 按照正交获得的最优处方制备载药胶束后 ,取 5 mL 对 1 L 水透析 24 h 以分离

载药胶束和游离药物 ,透析袋内溶液冻干后甲醇溶解破坏胶束 ,使药物释放出来 ,测定包入胶束内的药物量。高效液相色谱测不同浓度下蓝萼甲素溶液的峰面积 ,以峰面积 (Y) 对药物浓度 (X) 进行线性回归 ,在 0.1 ~ 16.0 μg · mL<sup>-1</sup> 范围内能得到标准曲线: Y = 0.460 5X - 0.068 8 (R<sup>2</sup> = 0.999 8) ,说明在此范围药物浓度与峰面积线性关系良好。根据以下公式计算包封率 (entrapment efficiency ,EE) 和载药量 (loading content ,LC) : EE (%) = (W<sub>1</sub>/W<sub>2</sub>) × 100% ;载药量 = W<sub>1</sub> / (W<sub>1</sub> + W<sub>3</sub>) × 100% ,其中 ,W<sub>1</sub> 为包入胶束内的药物质量 (mg) ,W<sub>2</sub> 为加入的药物质量 (mg) ,W<sub>3</sub> 为聚合物的质量 (mg)。

**1.8 载药胶束的粒径、电位及形态考察** 采用 Zetasizer nano ZS 型纳米粒度仪、电位仪测定胶束的粒径及 Zeta 电位 ,使用透射电子显微镜观察胶束的形态。

**1.9 载药胶束的体外释放考察** 制备蓝萼甲素胶束溶液 ,精密吸取载药胶束 2 mL 于透析袋中 ,置于纯水 200 mL 中 37 ℃ 下恒温搅拌 ,转速 100 r · min<sup>-1</sup> ,定时取出一定体积释放介质 ,同时补充等体积等温新鲜释放介质 ,高效液相色谱仪测释放介质中药物含量 ,计算累积释放度并绘制释放曲线 ,对曲线进行零级、一级及 Higuchi 方程拟合 ,并设置相应的纯药物对照组。

## 2 结果

**2.1 空白胶束的制备** 丙酮相直接倒入水中、用注射器滴加到水中、用注射泵以 100 μL · min<sup>-1</sup> 的速度注入到水中制得的胶束粒径分别为 54 ,69 ,72 nm。可见有机相加入到水相中的速度和均匀程度可以影响胶束粒径。丙酮相直接倒入水相 ,大量聚合物于水中聚集 ,自组装成胶束所需能量瞬间增大 ,且聚合物分散不均匀 ,易形成大粒径的粒子 ;采用注射器滴入 ,滴入速度较难控制 ,不利于形成均一粒径的胶束 ;采用注射泵注入 ,可控制很小的注入速度 ,聚合物有足够的时间分散组装成胶束 ,粒径较小。整个制备过程控制低温是由于该聚合物临界溶解温度较低 ,室温即为凝胶态。

**2.2 CMC 的测定** 芘激发单线态有较长寿命 ,在水中溶解度小 ,同时胶束对芘有明显的增溶作用 ,故芘为强疏水性荧光探针物质<sup>[2]</sup>。芘经 335 nm 波长激发后 ,荧光发射光谱出现 5 个电子振动峰 ,分别在 373 ,379 ,384 ,394 及 480 nm 附近。第 1 个与第 3 个电子振动峰的荧光强度比值 (I<sub>1</sub>/I<sub>3</sub>) 强烈依赖芘所处环境的极性。芘增溶进入胶束疏水区后 ,由于所处环境极性变化 ,如图 1 所示 I<sub>1</sub>/I<sub>3</sub> 随聚合物浓度 (C) 变化的对数曲线发生突变 ,突变点即为该聚合物胶束 CMC 为 2.5 ×

$10^{-3} \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

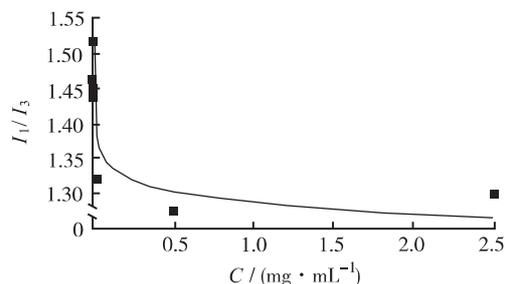


图 1  $I_1/I_3$  随水中聚合物浓度变化曲线

Fig. 1 Curve of intensity ratio of  $I_1/I_3$  versus the concentration of polymer in water

2.3 正交设计优化载药胶束处方 以胶束的粒径大小为评价指标  $L_9(3^4)$  正交表设计结果如表 2 所示。

表 2 正交实验设计与结果

Tab. 2 Results of orthogonal test

实验号	A	B	C	D	粒径/nm
1	1	1	1	1	212.50
2	1	2	2	2	96.27
3	1	3	3	3	76.67
4	2	1	2	3	345.30
5	2	2	3	1	65.13
6	2	3	1	2	70.03
7	3	1	3	2	329.90
8	3	2	1	1	124.10
9	3	3	2	3	84.28
$K_1$	128.48	295.90	135.54	133.91	
$K_2$	160.15	95.170	175.28	165.40	
$K_3$	179.43	76.993	157.23	168.75	
R	50.947	218.90	39.740	34.840	

由表 3 可知,各因素对蓝萼甲素胶束粒径的影响强度为:  $B > A > C$ , 并且因素 B ( $V_{\text{丙酮}}/V_{\text{水}}$ ) 有显著性影响,丙酮相极易在水相中扩散,丙酮相体积增大,浓度相对较低的聚合物更易分散在水中,粒径减小。最佳制备工艺为  $A_3B_1C_2$  (投药量 1:15;  $V_{\text{丙酮}}/V_{\text{水}}$  为 1:5; 聚合物浓度为  $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )。按最优处方进行 3 次重复验证实验,粒径分别为: 62.13, 63.27, 62.08 nm, RSD 值为 0.76%,说明制备工艺稳定可靠,且达到被动靶向给药设计的要求,为下一步对蓝萼甲素靶向给药研究提供基础。

2.4 包封率和载药量测定结果 载药胶束的平均 EE 为  $(84.85 \pm 2.00)\%$ ; 平均 LC 为  $(5.36 \pm 1.00)\%$ 。从以上数据可看出,与蓝萼甲素在水中的溶解度

( $17 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 相比,载药胶束很大程度上提高了药物的表观溶解度(提高了约 40 倍),解决了其水溶性差的问题。

表 3 方差分析

Tab. 3 Analysis of variance

方差来源	离差平方和	自由度	F 值	P
A	3 970.2	2	1.791 1	>0.05
B	88 544.0	2	39.945	<0.05
C	13 638.0	2	1.071 7	>0.05
误差	2 216.7	2		

2.5 载药胶束的粒径、电位及形态考察 Zetasizer nano ZS 型纳米粒度仪测得载药胶束的粒径为  $(62.49 \pm 0.60) \text{ nm}$ , PDI 为  $(0.291 \pm 0.008)$ , 粒径分布为正态单分布。Zeta 电位仪测得载药胶束的电位为  $(-25.4 \pm 0.4) \text{ mV}$  (图 2), 胶束表面较大绝对值的电位有利于其在水中通过静电斥力而稳定存在。

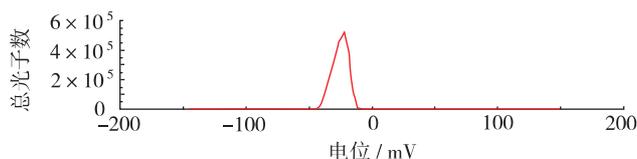


图 2 载药胶束的 Zeta 电位

Fig. 2 Zeta potential of drug-loaded micelles

载药胶束的透射电子显微镜照片如图 3 所示,背景为磷酸钨溶液,载药胶束为白色球形,分布较均匀。

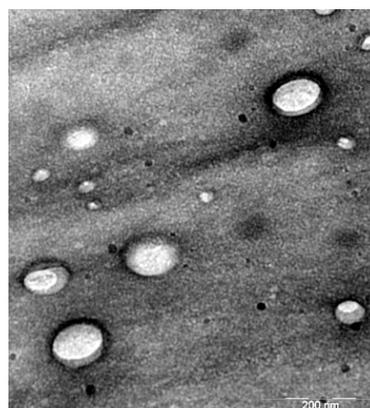


图 3 载药胶束的透射电子显微镜照片 ( $\times 200\ 000$ )

Fig. 3 TEM picture of drug-loaded micelles ( $\times 200\ 000$ )

2.6 载药胶束的体外释放考察 见图 4。

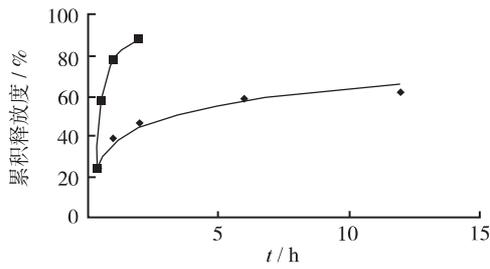


图4 游离药物及载药胶束中蓝萼甲素的释放曲线

—■— 游离药物; —●— 载药胶束

Fig.4 Release curves of glaucocalyxin A from free drug and drug-loaded micelles

—■— free drug; —●— drug-loaded micells

对曲线进行零级、一级及 Higuchi 方程拟合,基本符合一级动力学方程。对照组游离药物 2 h 内几乎完全释放,而载药胶束 12 h 累积释放度为 60%,缓释效果显著。2 h 释放约 20% 推断为未包封而物理吸附在 PEG 链内的药物;2~6 h 内释放较 6 h 后稍快,推测可能与共聚物 PLGA-PEG-PLGA 形成的胶束的花瓣状结构<sup>[3]</sup>有关,两端连 PLGA 的 PEG 链弯曲并堆积成胶束的球形表面,近乎封闭的弯曲单条 PEG 链内大量羟基,以氢键形式装载表面带羰基的蓝萼甲素,推测该部分药物 6 h 内释放。

### 3 讨论

正常组织中血管内皮间隙致密,结构完整,大分子、药物载体及分子聚集体等不易透过血管壁。实体瘤组织由于细胞快速生长需要大量营养物质,血管丰富,血管壁间隙较宽,结构完整性差,造成大分子等的高通透性;同时,由于淋巴系统相对减弱的排泄能力,也造成这些大分子在肿瘤组织中的高滞留性,这种现象被称为实体瘤组织的高通透性和高滞留性,简称 EPR(enhanced permeability and retention)效应。本研究获得的蓝萼甲素胶束粒径 < 100 nm,在体循环过程中通过 EPR 效应则更易通过病理部位的血管聚积在肿瘤部位,达到被动靶向给药的目的,显著降低了药物中毒的可能性。

目前文献对蓝萼甲素的剂型研究报道极少,主要有固体脂质纳米粒,但其包封率(约 50%<sup>[4]</sup>)并不理

想,本研究中所用的三嵌段聚合物 PLGA-PEG-PLGA 与药物分子除了疏水缔合作用结合外,前者结构中的大量羟基还可与药物分子结构中的羰基形成氢键,故材料与药物作用较强,包封率明显上升<sup>[6-8]</sup>。

本研究结果表明,蓝萼甲素新型聚合物胶束粒径小且分布较好,对蓝萼甲素包封率高,一定程度上提高蓝萼甲素的表观溶解度;体外释放发现该胶束具有较显著缓释效果,该载体材料作为抗肿瘤药物蓝萼甲素新型缓释给药系统具有良好的应用前景。

### 参考文献

- [1] YANG X Y, ZHANG Y H, DING L, et al. Cytotoxic activity of a natural product Wangzaozin A [J]. Acta Phys Chim Sin, 2009, 25(9): 1749 - 1755.
- [2] RICHTER A, OLBRICH C, KRAUSE M, et al. Solubilization of sagopilone, a poorly water-soluble anticancer drug, using polymeric micelles for parenteral delivery [J]. Eur J Pharm Biopharm 2010, 75(2): 80 - 89.
- [3] KEDAR U, PHUTANE P, SHIDHAYE S, et al. Advances in polymeric micelles for drug delivery and tumor targeting [J]. Nano Biology Med 2010, 6(6): 714 - 729.
- [4] GAO L Y, YAN J C, WANG Y S, et al. Preparation and physico-chemical property of glaucocalyxin A solid lipid nanoparticles [J]. China Pharm 2008, 19(9): 666 - 668.
- [5] ICCIARDI M, CAVALLARO G, DI STEFANO M, et al. New self-assembling polyaspartylhydrazide copolymer micelles for anticancer drug delivery [J]. Int J Pharm 2010, 396(1-2): 219 - 228.
- [6] ZHANG W, SHI Y, CHEN Y, et al. The potential of pluronic polymeric micelles encapsulated with paclitaxel for the treatment of melanoma using subcutaneous and pulmonary metastatic mice models [J]. Biomaterials, 2011, 32(25): 5934 - 5944.
- [7] JIANG S, YAO Y, NIE Y Z, et al. Investigation of pH-responsive properties of polymeric micelles with a core-forming block having pendant cyclic ketal groups [J]. J Coll Int Sci, 2011, 364(1): 264 - 271.
- [8] QU T H, WANG A R, YUAN J F, et al. Preparation of an amphiphilic triblock copolymer with pH- and thermo-responsiveness and self-assembled micelles applied to drug release [J]. J Coll Int Sci 2009, 336(2): 865 - 871.

DOI 10.3870/yydb.2012.06.024