

伊曲康唑 mPEG-PLA 聚合物胶束的制备及理化性质

黄泽玮¹ 涂家生^{1*} 沈雁¹ 吴仁荣²(¹中国药科大学药剂学教研室 南京 210009; ²南京威尔化工有限公司 南京 210009)

摘要 研究以聚乙二醇单甲醚-聚丙交酯嵌段共聚物(mPEG-PLA)作为载体,制备伊曲康唑聚合物胶束(ITZ-PM)。以开环聚合法合成 mPEG-PLA,以溶剂挥发-薄膜分散法制备 ITZ-PM 溶液,并将其冷冻干燥。分别使用 HPLC、动态光散射法(DLS)、原子力显微镜(AFM)和差示扫描量热法(DSC)等手段对载药量、包封率、粒径与分布和胶束形态等进行表征,采用透析法考察 ITZ-PM 的体外释放,并对释放机制进行探讨。结果显示 ITZ-PM 载药量为 3.82%,包封率为 99.4%,平均粒径为 37.8 nm, pH 为 4.48; DSC 确证药物已被包封在胶束中; AFM 显示胶束呈类球形; ITZ-PM 较市售制剂有一定缓释作用,释药行为较为符合 Peppas-Sahlin 方程。研究结果表明 mPEG-PLA 能有效提高伊曲康唑的溶解度。

关键词 伊曲康唑;聚乙二醇单甲醚-聚丙交酯嵌段共聚物;聚合物胶束;体外释放;理化性质

中图分类号 R944 文献标识码 A 文章编号 1000-5048(2012)04-0302-05

Preparation and physico-chemical properties of itraconazole polymeric micelles using mPEG-PLA as a drug carrier

HUANG Ze-wei¹, TU Jia-sheng^{1*}, SHEN Yan¹, WU Ren-rong²¹Department of Pharmaceutics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009;²Nanjing Well Chemical Co., Ltd., Nanjing 210009, China

Abstract A formulation of itraconazole polymeric micelles was prepared using mPEG-PLA as the drug carrier. mPEG-PLA was synthesized by ring opening and polymerization reaction. ITZ-PM was prepared by solvent evaporation-film dispersion method. The drug-loading and entrapment efficiency were characterized by HPLC. The physico-chemical properties of ITZ-PM was characterized by dynamic light scattering (DLS), atomic force microscopy (AFM) and differential scanning calorimeter (DSC), respectively. The dialysis method was applied to investigate the release behavior of ITZ-PM *in vitro*, and the release mechanism was further discussed. Drug-loading and encapsulation efficiency of ITZ-PM were 3.82% and 99.4%, respectively; nanoparticle size was 37.8 nm, and pH was 4.48. Itraconazole was found to be encapsulated in the micelles rather than forming a physical mixture by DSC; ITZ-PM exhibited to be almost spherical in shape from the observation by AFM. It was proved that ITZ-PM had sustained-release effect *in vitro* which could be described by Peppas-Sahlin equation. Results showed that mPEG-PLA can obviously improve the solubility of itraconazole.

Key words itraconazole; mPEG-PLA; polymeric micelle; release *in vitro*; physico-chemical property

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81072588); and China National Key High-Tech Innovation Project for the R&D of Novel Drugs (No. 2011ZX11501)

伊曲康唑(itraconazole, ITZ)是一种亲脂性三氮唑类广谱抗真菌药,临床主要应用于深部真菌所引起的感染^[1]。伊曲康唑是一种弱碱性化合物(pKa = 3.7),只能在诸如胃液的低 pH 溶液中解

离,且 pH 为 1.2 时水溶性仅为 1.8 μg/mL。pH 为 8.1 时表现为良好的亲脂性,正辛醇/水分配系数为 5.66^[2]。目前,斯皮仁诺®注射剂(Sporanox® Injection)是 ITZ 目前仅有的市售注射制剂,其通过

* 收稿日期 2011-12-30 * 通讯作者 Tel: 025-83271305 E-mail: jiashengtu@yahoo.com.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 81072588); 国家“重大新药创制”科技重大专项资助项目(No. 2011ZX11501)

羟丙基- β -环糊精(hydroxypropyl- β -cyclodextrin, HP- β -CD)包裹药物以达到增溶的目的,使 ITZ 的生物利用度得到明显提高^[3-4]。但由于 ITZ 在水中极难溶解(约 1 ng/mL)^[5],虽然使用了大量的 HP- β -CD 对其进行包合(药物与辅料的质量比为 1:40),但在使用过程中药物仍易析出,因而其注射剂的使用被严格控制,并配有专门的稀释介质和输液器具(包括过滤装置),这使得其临床应用费用极高。同时长期使用 ITZ-HP- β -CD 辅料 HP- β -CD 会导致严重的肾功能紊乱;另外还有报道 HP- β -CD 在小鼠致癌实验中会引发胰腺癌^[6]。

为解决化合物的难溶性,科研人员在微粉化、增溶剂、环糊精包合、微乳化、自乳化给药系统、聚合物胶束、脂质体等方面做了许多尝试^[7]。其中,聚合物胶束能增加药物的溶解度,提高治疗剂量;将药物包裹其中,可躲避网状内皮系统的吞噬,避免药物降解失活,减少不良反应;生物可降解性和生物相容性良好;具有高通透性和高滞留性(EPR 效应);还具有缓释、被动靶向和灭菌操作简单等优点^[8-10]。

本研究应用新型药物载体——聚乙二醇单甲醚-聚丙交酯嵌段共聚物[methoxy polyethylene glycol-block-poly(DL-lactide), mPEG-PLA]代替 HP- β -CD,制备伊曲康唑聚合物胶束(itraconazole-polymeric micelles, ITZ-PM),并对其理化性质进行了表征与评价。

1 材料

1.1 药品与试剂

伊曲康唑原料药(寿光富康制药有限公司,批号 201005001);透析袋(南京助研生物技术公司,截留相对分子质量为 3 500);mPEG 2000(瑞士 Fluka 公司,批号 0001352776);D,L-丙交酯(山东岱罡生物科技有限公司,批号 20091126);其他试剂为市售分析纯或色谱纯。

1.2 仪器

RE-52AA 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);Dionex Ultimate 3000 series 高效液相色谱仪(德国 Dionex Softron 公司);ZetaPlus 激光粒度仪(美国 Brookhaven 公司);DSC204 差示扫描量热仪(德国 Netzsch 公司);diNanoScope[®] V 原子力显微镜(美国 Veeco 公司)。

2 方法与结果

2.1 mPEG-PLA 的合成

采用开环聚合法合成 mPEG-PLA^[11]。取 mPEG 2000 60.0 g,置于 250 mL 两颈瓶中,减压加热至 100 °C,待完全熔融后加入 D,L-丙交酯 40.0 g 和辛酸亚锡适量,磁力搅拌混匀后升温至 150 °C,氮气保护下反应 6 h。冷却至室温后向反应物中加入适量二氯甲烷,待完全溶解后以冰乙醚沉淀,减压抽滤,得白色滤饼。反复操作提纯 3 次,所得产物真空干燥 24 h 后为白色粉末或块状物,微有异味,供制备聚合物胶束使用^[10]。

2.2 ITZ-PM 溶液的制备

采用溶剂挥发-薄膜分散法制备 ITZ-PM 溶液^[9,12]。取 mPEG-PLA 2.5 g 和 ITZ 0.1 g,加适量二氯甲烷和盐酸使溶解,涡旋混匀,减压旋转蒸发形成一层凝胶,待有机溶剂完全蒸发后加入超纯水 10 mL,旋转至凝胶完全溶解,用 1 mol/L 氢氧化钠调节 pH 至 4.5,用 0.22 μ m 微孔滤膜过滤后得 ITZ-PM,为淡蓝色乳光澄清溶液。

2.3 ITZ-PM 冻干粉制备

取“2.2”项下所得 ITZ-PM 溶液,于 -60 °C 冷阱中预冻 6 h,冷冻干燥 24 h,得白色饼状、无塌陷的疏松 ITZ-PM 冻干粉。

2.4 伊曲康唑含量测定

2.4.1 HPLC 色谱条件^[13] 色谱柱:Agela Durashell C₁₈(4.6 mm \times 150 mm 5 μ m);流动相:乙腈-0.02 mol/L 四丁基硫酸氢铵溶液(50:50);流速:1.0 mL/min;检测波长:223 nm;柱温:35 °C;进样量:20 μ L。按 ITZ 峰计理论塔板数不小于 3 000。

如图 1 所示,ITZ 在 8.5 min 处出峰,峰形良好,无杂质干扰,理论塔板数和分离度均符合测定要求。专属性实验表明,mPEG-PLA 不干扰 ITZ 的测定。

2.4.2 标准曲线的建立 以 ITZ 原料药为对照品,精密称取适量,配制对照品储备溶液。用甲醇稀释配制得系列溶液,按“2.4.1”项条件测定,记录峰面积,以 ITZ 峰面积(A)对质量浓度(c, μ g/mL)进行线性回归,得标准曲线: $A = 0.6757c - 0.0065$ ($r = 0.9999$),说明在 0.05 ~ 10.0 μ g/mL 质量浓度范围内,线性关系良好。符合含量测定要求。

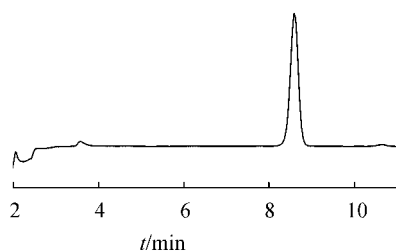


Figure 1 HPLC chromatogram of itraconazole (ITZ)

2.4.3 回收率与精密度 精密移取对照品储备液适量,置于10 mL量瓶中,分别加入mPEG-PLA储备液(1 mg/mL)各1 mL,用甲醇稀释至刻度,配制成低、中、高浓度系列溶液。按“2.4.1”项下色谱条件测定,记录峰面积,代入标准曲线,计算回收率。高、中、低浓度的回收率均在98%~102%范围内。在同一天内连续5次及连续5 d测定,分别计算日内差和日间差,RSD均小于2.0%。符合含量测定要求。

2.5 理化性质研究

2.5.1 pH、粒径及分布 分别取ITZ-PM溶液和ITZ-PM冻干粉复溶溶液(生理盐水为溶剂)各3份,测定溶液pH、粒径及分布。ITZ-PM溶液pH为4.48,平均粒径为37.8 nm,多分散系数为0.177。ITZ-PM冻干粉复溶后pH为4.51,平均粒径为30.5 nm,多分散系数为0.061。

由上述结果可看出,粒径及多分散系数均在冻干复溶后有所减小,这可能是少数粒径较大的胶束在冻干复溶后未能形成胶束,从而造成粒径减小,而多分散系数减小更说明粒径更均一。

2.5.2 载药量和包封率的测定 取ITZ-PM溶液和ITZ-PM冻干粉复溶溶液各1 mL,精密量取,分别置于100 mL量瓶中,甲醇稀释至适当浓度,按“2.4.1”项下操作测定ITZ含量,计算载药量和包封率(表1)。由于ITZ极难溶于水,与ITZ-PM(>1 mg/mL)相比,可以忽略不计。因此在计算载药量和包封率时未考虑ITZ-PM中游离ITZ。

由结果可知,所得的ITZ-PM溶液和冻干粉载药量为3.7%~3.9%,比ITZ-HP- β -CD(2.42%)有所提高;包封率为97%~100%,较ITZ-HP- β -CD(80.2%)有明显提高。这说明与HP- β -CD相比,mPEG-PLA对ITZ的增溶能力更强。

Table 1 Drug-loading and entrapment efficiency (EE) of ITZ-polymeric micelles (ITZ-PM) solution, powder and ITZ hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex (ITZ-HP- β -CD) ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Drug	$c(\text{ITZ}) / (\text{mg/mL})$	Drug-loading/%	EE/%
ITZ-PM solution	9.94 ± 0.05	3.82 ± 0.02	99.4 ± 0.53
ITZ-PM powder	9.75 ± 0.12	3.75 ± 0.04	97.5 ± 1.19
ITZ-HP- β -CD	10.02 ± 0.03	2.42 ± 0.01	80.2 ± 0.25

2.5.3 差示扫描量热分析(DSC) 分别测定ITZ、mPEG-PLA、ITZ与mPEG-PLA的物理混合物(药物与辅料质量比为1:25)以及ITZ-PM冻干粉(药物与辅料质量比为1:25)的DSC图谱(图2)。测定参数:升温速率10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$,升温范围为30~250 $^{\circ}\text{C}$,采用铝制坩埚。

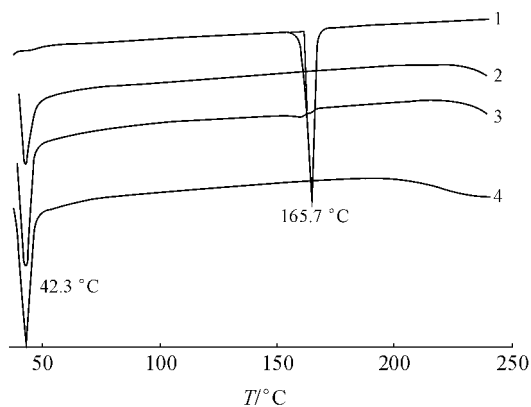


Figure 2 DSC thermograms of ITZ (1), mPEG-PLA (2), physical mixture of ITZ and mPEG-PLA (3, ITZ/mPEG-PLA: 1:25) and ITZ-PM powder (4, ITZ/mPEG-PLA: 1:25)

由图2可见,ITZ在160.0~168.0 $^{\circ}\text{C}$ 有相变吸热峰,这是其熔融峰;mPEG-PLA在43.8 $^{\circ}\text{C}$ 处有相变吸热峰,是其熔融峰。ITZ和mPEG-PLA的物理混合物在42.3和157.0 $^{\circ}\text{C}$ 出现分别与mPEG-PLA和ITZ相同的相变吸热峰,这些吸热峰的峰位和峰形基本没有变化。ITZ-PM冻干粉只在42.6 $^{\circ}\text{C}$ 处出现相变吸热峰,这与mPEG-PLA的相变吸热峰相对应,但是ITZ的熔融峰完全消失。这说明ITZ在聚合物胶束溶液中完全被mPEG-PLA所包裹,而未发生任何变化。

2.5.4 原子力显微镜(AFM)分析 取ITZ-PM冻干粉,用超纯水复溶并稀释至适宜浓度,取适量溶液滴于洁净盖玻片,于净化工作台内自然干燥。使用原子力显微镜观察ITZ-PM胶束结构呈类球状,粒径为30~50 nm(图3)。

2.6 ITZ-PM 体外释放

2.6.1 释放介质的选择 取过量 ITZ 原料药,置 20 mL 具塞西林瓶中,分别加入表 2 中释放介质 10 mL,于 37 °C、100 r/min 恒温振荡 24 h。0.45 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液按“2.4.1”项下色谱条件测定,记录峰面积,计算 ITZ 在各释放介质中的平衡溶解度(表 2)。

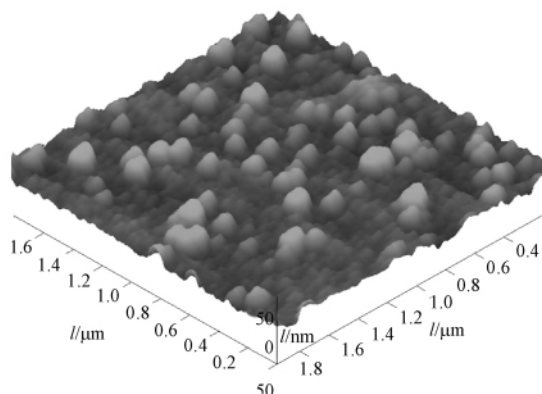


Figure 3 AFM image of ITZ-PM

Table 2 Equilibrium solubility of ITZ in different release media

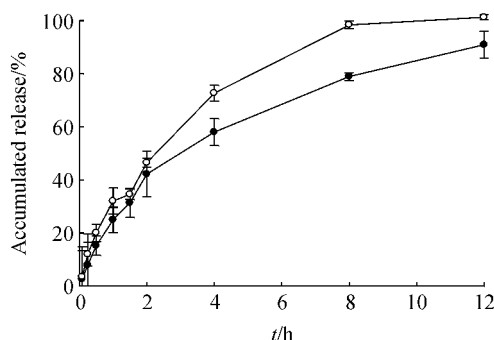
Release medium	Equilibrium solubility/(μg/mL)	
	PBS (pH 7.4)	Saline
Blank	0.001	1.06
Polysorbate 20(1%)	0.07	3.26
Polysorbate 80(1%)	0.14	9.90
Polysorbate 20(1%) and HCl(0.7%)	2.89	15.16
Polysorbate 80(1%) and HCl(0.7%)	5.02	23.65

由表 2 可知,在含 1% 聚山梨酯 80 和 0.7% HCl 的生理盐水中,ITZ 的平衡溶解度较只含 1% 聚山梨酯 80 的生理盐水提高 2 倍多,而在含 1% 聚山梨酯 80 和 0.7% HCl 的 PBS (pH 7.4) 中 ITZ 的平衡溶解度仅为含 1% 聚山梨酯 80 和 0.7% HCl 生理盐水中平衡溶解度的 1/4。故选取含 1% 聚山梨酯 80 和 0.7% HCl 的生理盐水作为释放介质。

药物在释放介质中的释放应满足漏槽条件,即在到达溶出终点的溶液中,药物浓度远小于其饱和溶解度,一般以 1/3 ~ 1/10 溶解度为限。本实验中选择 1% 聚山梨酯 80 和 0.7% HCl 的生理盐水作为释放介质。在药物释放实验设计中,制剂中总药量为 1 mg,释放介质体积为 200 mL。

2.6.2 ITZ-PM 体外释放 取 ITZ-PM 冻干粉,用适量生理盐水溶解后,分别移取上清液适量(平行 3 份,相当于含 ITZ 1 mg)于透析袋内(5.0 cm × 2.5 cm),置于释放介质 200 mL 中,于 37 °C、100

r/min 的恒温振荡仪中进行释放试验,分别于 0.083, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 8, 12 h 定时取出释放介质 2.0 mL,同时补加等量释放介质。样品按“2.4.1”项下色谱条件测定,分别以 0 h ITZ-PM 中 ITZ 含量为 100%,计算累积释放百分率,以累积释药百分率(Q)对时间(t)作图,绘制 ITZ-PM 体外累积释药曲线。同法绘制市售制剂 ITZ-HP-β-CD 体外累积释药曲线(图 4)。由图 4 可知,ITZ-PM 与 ITZ-HP-β-CD 相比,具有一定的缓释效果;ITZ-PM 在体外释放中无突释现象,说明药物不是吸附在载体材料上,而是完全被载体所包裹。



—●—ITZ-PM; —○—ITZ-HP-β-CD

Figure 4 Cumulative release profiles of ITZ from ITZ-PM and ITZ-HP-β-CD into saline with 1% polysorbate 80 and 0.7% HCl ($\bar{x} \pm s, n=3$)

将 ITZ-PM 的体外释放数据分别用零级方程, Higuchi 方程, Weibull 方程和 Peppas-Sahlin 方程拟合(表 3) 结果显示释药行为较符合 Peppas-Sahlin 方程。

Table 3 Fitting equation and correlation coefficients

Model	Equation	R ²
Zero-order	$Q = 0.092 t$	0.726 6
Higuchi	$Q = 0.270 t^{0.5}$	0.983 9
Weibull	$Q = 100 \{1 - \exp[-(t - 0.207)^{0.460} / 331.965]\}$	0.994 2
Peppas-Sahlin	$Q = 0.268 t^{0.719} - 0.020 t^{1.438}$	0.997 2

Peppas-Sahlin 方程标准式为 $Q = \alpha t^{m/2} + \beta t^m$, 说明药物的释放机制为非 Fick 扩散,即扩散与溶蚀并存。由该式可推出通过 Fick 扩散机制释放的药物量所占整个释药量的比例为: $F = 1 / (1 + \beta / \alpha \times t^{m/2})$, 通过溶蚀机制释放的药物量所占的释药比例为: $R = 1 / (\alpha / \beta \times t^{-m/2} + 1)$ 。各时间点的累积释药量中扩散释药量与溶蚀释药量各自所占比重见图 5。

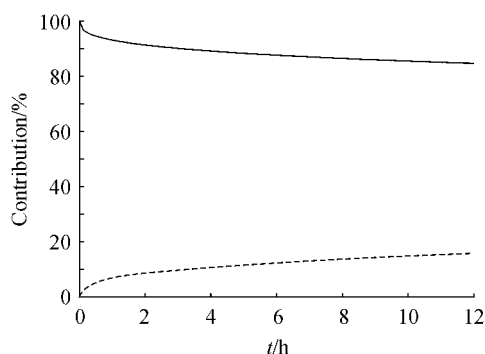


Figure 5 Percentage of the Fick diffusion (solid line) and the erosion (dotted line) mechanisms over the drug release form ITZ-PM

由图5可知,扩散机制所占比例随着时间延长略有减小,最低为85.5%,说明整个释药期间扩散释药虽有减小,但一直占主导地位;溶蚀释药所占比例随着时间延长略有增大,最大为15.5%,说明溶蚀作用对ITZ-PM的释药有所影响,但影响不大。在ITZ-PM的释药过程中,包裹在mPEG-PLA中的药物以药物储库的形式不断缓慢地向外扩散,这是主要的释药机制;另一方面,由于释放介质渗入到mPEG-PLA胶束形成的内核,使胶束内核溶胀,从而加速药物的释放^[14-15],形成扩散和溶蚀的协同作用。

3 小结

使用两亲嵌段共聚物mPEG-PLA制备得到的ITZ-PM冻干粉为疏松白色固体粉末,外观饱满,胶束包封率高,复溶后粒径约为30 nm,且呈较窄分布,胶束溶液pH在注射剂pH允许范围内。通过体外释放实验,胶束溶液与市售制剂相比,具有一定缓释作用。这些结果都显示了伊曲康唑聚合物胶束是一个符合静脉注射和具有临床应用价值的制剂。

参考文献

- [1] Groll AH. Itraconazole-perspectives for the management of invasive aspergillosis[J]. *Mycoses* 2002 **45**(S3): 48-55.
- [2] Jung JY, Yoo SD, Lee SH *et al.* Enhanced solubility and dissolution rate of itraconazole by a solid dispersion technique[J]. *Int J Pharm*, 1999, **187**(2): 209-218.
- [3] Boogaerts MA, Maertens J, Van Der Geest R *et al.* Pharmacokinetics and safety of a 7-day administration of intravenous itraconazole followed by a 14-day administration of itraconazole oral solution in patients with hematologic malignancy[J]. *Antimicrob Agents Chemother* 2001 **45**(3): 981-985.
- [4] Akkar A, Müller RH. Intravenous itraconazole emulsions produced by SolEmuls technology[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2003 **56**(1): 29-36.
- [5] Peeters J, Neeskens P, Tollenaere JP *et al.* Characterization of the interaction of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin with itraconazole at pH 2 and 7[J]. *J Pharm Sci* 2002 **91**(6): 1414-1422.
- [6] Yi Y, Yoon HJ, Kim BO *et al.* A mixed polymeric micellar formulation of itraconazole: characteristics, toxicity and pharmacokinetics[J]. *J Control Release* 2007 **117**(1): 59-67.
- [7] Yan L, Gao YL. Solubilization of hydrophobic drugs[J]. *Chin New Drugs J* (中国新药杂志) 2005 **14**(11): 1276-1279.
- [8] Gaucher G, Dufresne MH, Sant VP *et al.* Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery[J]. *J Control Release* 2005 **109**(1/2/3): 169-188.
- [9] Burt HM, Zhang X, Toleikis P *et al.* Development of copolymers of poly(D,L-lactide) and methoxy polyethylene glycol as micellar carriers of paclitaxel[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 1999, **16**(1/2/3/4): 161-171.
- [10] Li JP. *Studies on Freeze-Dried Docetaxel-Loaded Polymeric Micelles For Injection* (注射用多西他赛冻干粉的研究)[D]. Nanjing: China Pharmaceutical University 2011.
- [11] Zhu KJ, Li XZ, Shilin Y. Preparation, characterization, and properties of polylactide (PLA)-poly(ethylene glycol) (PEG) copolymers: a potential drug carrier[J]. *J Appl Polym Sci*, 1990, **39**(1): 1-9.
- [12] Zhang X, Jackson JK, Burt HM. Development of amphiphilic diblock copolymers as micellar carriers of taxol[J]. *Int J Pharm*, 1996, **132**(1/2): 195-206.
- [13] Chinese Pharmacopoeia Commission. *Chinese Pharmacopoeia: Part 2* (中华人民共和国药典: 二部)[M]. Beijing: China Medical Science Press 2010: 273-275.
- [14] Bai HJ, Pan WS, Zhao PJ *et al.* Preparation and release characteristics of actarit sustained-release tablets[J]. *Chin J Pharm* (中国药剂学杂志) 2004 **2**(4): 79-85.
- [15] Li Y, Qi XR. Preparation and *in vitro* characterization of ATRA loaded mPEG-PLA diblock copolymeric micelles[J]. *Chin New Drugs J* (中国新药杂志) 2008 **17**(3): 217-224, 227.