

β -环糊精-聚乙二醇-7-乙基-10-羟基喜树碱纳米胶束的制备及其质量评价

张 晨, 徐传锡, 王志强, 孙勇兵, 金 一*

江西中医药大学 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330006

摘 要: 目的 制备两亲性聚合物 β -环糊精-聚乙二醇-7-乙基-10-羟基喜树碱 (β -CD-PEG-SN38) 纳米胶束并进行质量评价。方法 采用自组装法制备 β -CD-PEG-SN38 纳米胶束, 采用单因素变量法对影响纳米胶束粒径的因素进行了考察, 并对 β -CD-PEG-SN38 纳米胶束的粒径、Zeta 电位、形态和稳定性进行评价。结果 胶束制备的最佳条件为丙酮作有机溶剂, β -CD-PEG-SN38 在丙酮中的质量浓度为 1 mg/mL, 有机相和水相的体积比为 1:8。该纳米胶束大小适中、粒径分布均匀, 为均匀的球形结构。 β -CD-PEG-SN38 纳米胶束的临界胶束质量浓度为 7 μ g/mL, 在模拟的生理条件下具有良好的胶体稳定性, 在 4 $^{\circ}$ C 条件下储存 6 个月的粒径未发生明显变化。结论 β -CD-PEG-SN38 在水中能自发形成纳米胶束, 粒径均匀、稳定性好, 具有良好的胶体稳定性和长期储存稳定性。

关键词: β -环糊精-聚乙二醇-7-乙基-10-羟基喜树碱纳米胶束; 制备; 粒径; Zeta 电位; 临界胶束浓度

中图分类号: R963 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2021)08-1586-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2021.08.006

Preparation and quality evaluation of β -cyclodextrin-polyethylene glycol-7-ethyl-10-hydroxycamptothecin nanomicelle

ZHANG Chen, XU Chuan-xi, WANG Zhi-qiang, SUN Yong-bing, JIN Yi

National Engineering Research Center for Solid Preparation Technology of Chinese Medicines, Jiangxi University of Chinese Medicines, Nanchang 330006, China

Abstract: Objective To prepare β -cyclodextrin-polyethylene glycol-7-ethyl-10-hydroxycamptothecin nanomicelle and evaluate the quality. **Methods** β -CD-PEG-SN38 micelle was prepared in water with the self-assembly method. The single factor variable method was used to investigate the factors affecting the particle size of nanomicelles. The properties of β -CD-PEG-SN38 micelle were evaluated, including particle size, Zeta potential, appearance, and stability. **Results** The optimal conditions for preparation of β -CD-PEG-SN38 micelle were optimized. Acetone was used as the organic solvent, the concentration of β -CD-PEG-SN38 in acetone was 1 mg/mL, and the volume ratio of organic phase to aqueous phase was 1:8. The micelle displayed a moderate size, uniform particle size distribution, and a uniform spherical structure. The critical micelle concentration of β -CD-PEG-SN38 nanomicelles was 7 μ g/mL, and it had good colloidal stability under simulated physiological conditions. The particle size of 6-month storage at 4 $^{\circ}$ C did not change significantly. **Conclusion** The particle size distribution of β -cyclodextrin-polyethylene glycol-7-ethyl-10-hydroxycamptothecin nanomicelle is uniform, and it has good colloidal stability and long-term storage stability.

Key words: β -cyclodextrin-polyethylene glycol-7-ethyl-10-hydroxycamptothecin nanomicelle; preparation; particle size; Zeta potential; critical micelle concentration

7-乙基-10-羟基喜树碱 (SN38) 是伊利替康的活性代谢产物。研究表明 SN38 在多种肿瘤细胞株上表现出比伊利替康高 10~1 000 倍的活性, 直接

用 SN38 作为抗癌药物无需体内酯酶的激活, 可以克服伊利替康的代谢激活缺陷^[1]。但是 SN38 在水和生物相容性溶剂中的溶解性极差, 是其制剂开发

收稿日期: 2021-05-06

基金项目: 南昌市科技重大项目重大科技攻关项目 (15); 江西中医药大学“1050 青年人才工程”项目 (5142001006); 江西中医药大学校级研究生创新专项资助项目 (JZYC20S05)

作者简介: 张 晨 (1996—), 女, 湖南长沙人, 硕士研究生。E-mail: 1576710664@qq.com

*通信作者: 金 一 (1959—), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为生物技术药物新剂型和仿制药一次性评价。Tel: (0791)87119650
E-mail: jinyizju@hotmail.com

的一个重大障碍,因此开发 SN38 临床上可以接受的制剂具有重大意义。聚合物-药物偶联物纳米胶束作为一种有效的抗肿瘤药物载体能够装载疏水性抗肿瘤药物,并靶向递送至肿瘤部位,且具有延长循环半衰期、增强水溶性、提高物理化学稳定性等诸多优势^[2-4]。本研究采用一种临床上安全可靠的载体材料 β -环糊精-聚乙二醇(β -CD-PEG)作为亲水段^[5],以甘氨酸作为连接臂,利用酯键将 SN38 的 20 位羟基接在 β -CD-PEG 上,使 SN38 成为疏水段。在水性条件下两亲性聚合物-药物偶联物 β -环糊精-聚乙二醇-7-乙基-10-羟基喜树碱(β -CD-PEG-SN38)自组装形成粒径在 100 nm 左右的胶束,这样可以极大地提高 SN38 的溶解度,同时利用肿瘤的 EPR 效应将纳米胶束靶向肿瘤部位^[6],以提高 SN38 活性和降低它对正常组织的毒性。20 位羟基上巨大的空间位阻还能降低 SN38 在体内循环过程中由内酯型向羧酸型的转化率,保证 SN38 活性^[1]。

1 仪器与试药

ZEN3690 马尔文粒径仪(英国 Alvern 公司);SpectraMaxi3 酶标仪(美国 Molecular Devices 公司);JEM-2100 高分辨率透射电子显微镜(日本电子株式会社);SHZ-82A 气浴恒温振荡器(金坛市荣华仪器制造有限公司)。

β -CD-PEG-SN38(M_w 8.8×10^4 ,载药量 12.2%;实验室自制);乙醇、丙酮、四氢呋喃(分析纯,西陇科学股份有限公司);尼罗红(质量分数 $\geq 98\%$;上海源叶生物科技有限公司);胎牛血清(上海 MRC 生物科技中心)磷酸盐缓冲液(北京 Solarbio 科技有限公司);甘露醇(质量分数 $\geq 99.5\%$,美国 Millipore 公司)。

2 方法和结果

2.1 胶束的制备

2.1.1 制备流程 将 β -CD-PEG-SN38 溶解于有机溶剂中,再将该溶液缓慢滴加至 1 500 r/min 剧烈搅拌的超纯水中,继续搅拌 30 min,使其分散均匀。37 °C 旋转蒸发除去有机溶剂,并用超纯水定容得到 1 mg/mL β -CD-PEG-SN38 纳米胶束。

2.1.2 单因素变量法考察影响因素 两亲性聚合物 β -CD-PEG-SN38 可以在水中自组装成纳米胶束。制备工艺会影响纳米胶束的粒径和稳定性。根据前期实验结果,发现影响 β -CD-PEG-SN38 纳米胶束制备的因素主要包括有机溶剂的种类、有机相与水相的体积比以及 β -CD-PEG-SN38 在有机相中的浓

度。实验采用单因素变量法考察了改变上述条件对 β -CD-PEG-SN38 纳米胶束粒径的影响,优化了 β -CD-PEG-SN38 纳米胶束的制备工艺,筛选出最佳制备条件。

不同种类的有机溶剂具有不同的极性,对 β -CD-PEG-SN38 纳米胶束的形成和稳定性有重要的影响。不同的有机溶剂对 β -CD-PEG-SN38 纳米胶束的粒径和分散系数有显著影响,在使用丙酮时,纳米胶束的粒径较小且分散均匀,故选择丙酮作为有机相溶剂,见表 1。

表 1 有机相与水相的体积比对 β -CD-PEG-SN38 纳米胶束粒径的影响

Table 1 Influence of volume ratio of organic phase to water phase on the particle size of β -CD-PEG-SN38 nanomicelles

有机溶剂	有机相与水相的体积比	质量浓度/(mg mL ⁻¹)	粒径/nm
丙酮	1:1	1	230.2±0.9
四氢呋喃	1:1	1	311.9±3.4
乙醇	1:1	1	696.4±5.5
甲醇	1:1	1	750.6±4.7
丙酮	1:2	1	149.9±1.4
四氢呋喃	1:2	1	203.0±2.0
乙醇	1:2	1	252.9±6.1
甲醇	1:2	1	511.9±1.5
丙酮	1:4	1	111.3±1.2
四氢呋喃	1:4	1	135.9±1.0
乙醇	1:4	1	201.4±1.3
甲醇	1:4	1	302.6±2.3
丙酮	1:8	1	101.3±1.1
四氢呋喃	1:8	1	110.5±0.9
乙醇	1:8	1	150.1±0.6
甲醇	1:8	1	221.7±3.0
丙酮	1:16	1	103.6±1.6
四氢呋喃	1:16	1	112.2±2.6
乙醇	1:16	1	154.1±5.1
甲醇	1:16	1	221.4±3.3

实验考察了 β -CD-PEG-SN38 在有机相中的浓度、有机相与水相的体积比对于纳米胶束制备的影响。发现有机相与水相的体积比从 1:1 增加到 1:16 时纳米胶束的粒径呈降低的趋势,并在 1:8 后

不再明显降低, 可能的原因是此浓度时 β -CD-PEG-SN38 纳米胶束的浓度已低至接近临界胶束浓度 (CMC)。因此选择有机相和水相的体积比为 1:8, 见表 1。

β -CD-PEG-SN38 在有机相中的浓度越高, 制备得到的纳米胶束粒径越大, 质量浓度低至 2 mg/mL 后, 粒径不再随着浓度的降低而减小。因此 β -CD-PEG-SN38 在丙酮中的质量浓度选择 1 mg/mL, 见图 1。

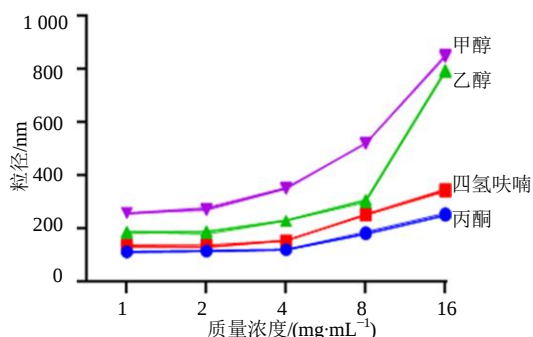


图 1 β -CD-PEG-SN38 在有机相中的浓度对纳米胶束粒径的影响

Fig. 1 Influence of the concentration of β -CD-PEG-SN38 in the organic phase on the particle size of nanomicelles

2.1.3 最佳制备条件 根据上述结果, 确定了 β -CD-PEG-SN38 纳米胶束制备的最佳条件, 即丙酮作有机溶剂, β -CD-PEG-SN38 在丙酮中的质量浓度为 1 mg/mL, 有机相和水相的体积比为 1:8。

2.2 粒径和电位测定

采用马尔文粒径仪测定 β -CD-PEG-SN38 纳米胶束的粒径大小、分布范围和 Zeta 电位。 β -CD-PEG-SN38 在水中形成了 (101.3 ± 1.1) nm 的纳米胶束, PDI 为 0.095 ± 0.006 , Zeta 电位为 (-11.8 ± 0.7) mV, 该纳米胶束大小适中、粒径分布均匀, 见图 2。

2.3 外观形态观察

采用负染色法使用透射电镜观察 β -CD-PEG-SN38 纳米胶束的外观形态。将纳米胶束滴加至表面覆有支持膜的铜网 (300 目) 上, 干燥后, 用 2% 磷钨酸溶液染色 20 min, 再次自然干燥后, 使用透射电镜观察并成像, 见图 3。可以看出, 该纳米胶束中间黑, 周围灰, 为均匀的球形结构。

2.4 临界胶束浓度的测定

两亲性聚合物纳米胶束必须具有一定的稳定性才能保证在药物储存和递送的过程中不发生解体。临界胶束浓度越低, 说明形成的胶束越稳定。

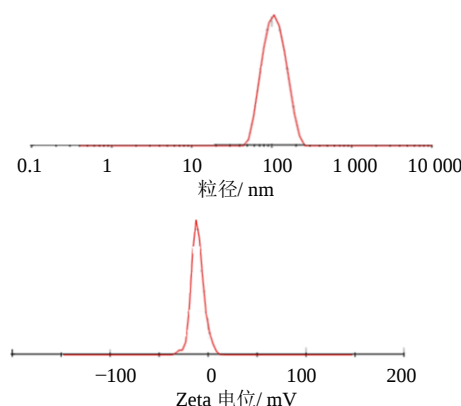


图 2 β -CD-PEG-SN38 纳米胶束的粒径和 Zeta 电位

Fig. 2 Particle diameters and Zeta potential of β -CD-PEG-SN38

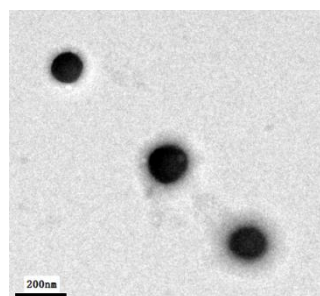
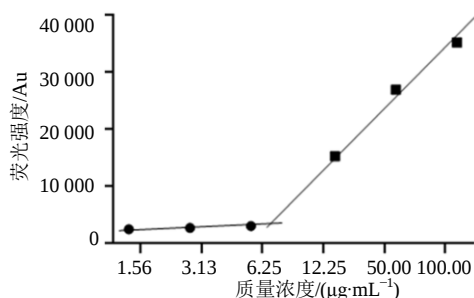


图 3 β -CD-PEG-SN38 纳米胶束的 TEM 图

Fig. 3 TEM image of β -CD-PEG-SN38 nanomicelle

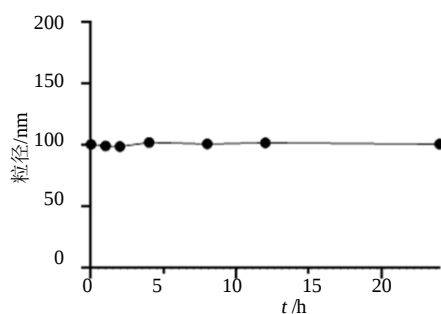
胶束在形成的过程中会由分子状态变为聚集状态, 形成疏水性的核和亲水性的壳。利用荧光探针跟踪胶束的形成可以确定临界胶束浓度。在水性环境下, 疏水性荧光染料尼罗红不产生荧光, 而在疏水性环境中, 尼罗红能在特定波长的激发光下发出强烈的荧光。

将尼罗红溶解于二氯甲烷中, 定容至 1 μ mol/L, 待二氯甲烷挥尽后, 再取适量加入至不同浓度的 β -CD-PEG-SN38 纳米胶束中, 避光条件下, 持续搅拌过夜。在激发波长为 543 nm、发射波长为 630 nm 的条件下, 使用酶标仪检测每个浓度的 β -CD-PEG-SN38 纳米胶束的荧光强度。浓度和荧光强度作切线处理, 两条切线的交点即为 CMC。当 β -CD-PEG-SN38 纳米胶束的浓度低于 7 μ g/mL 时, 基本没有荧光。随着胶束浓度的继续增加, 尼罗红的荧光快速增加, 见图 4, 这说明 β -CD-PEG-SN38 纳米胶束的临界胶束浓度为 7 μ g/mL。通过引入 β -CD-PEG, β -CD-PEG-SN38 在水中的溶解度达到了 6 mg/mL (SN38 等效浓度), 而 SN38 在水中的溶解度大约为 7 μ g/mL, 溶解度提高了约 800 倍。

图4 荧光强度与 β -CD-PEG-SN38浓度的关系Fig. 4 Relationship between fluorescence intensity and β -CD-PEG-SN38 concentration

2.5 纳米胶束的胶体稳定性和长期储存稳定性

选用含10% FBS的PBS (pH 7.4) 为孵育介质, 以粒径变化为评价指标, 考察 β -CD-PEG-SN38 纳米胶束的胶体稳定性。 β -CD-PEG-SN38 纳米胶束与孵育介质按照体积比1:3混合后, 置于37℃恒温振荡器中(100 r/min), 孵育24 h, 分别在0、2、4、8、12、24 h测定 β -CD-PEG-SN38 纳米胶束的粒径, 见图5。在24 h内, β -CD-PEG-SN38 纳米胶束的粒径无明显变化, 表明 β -CD-PEG-SN38 纳米胶束在模拟的生理条件下具有良好的胶体稳定性。

图5 β -CD-PEG-SN38 纳米胶束的胶体稳定性Fig. 5 Colloidal stability of β -CD-PEG-SN38 micelles

此外, 还测定了 β -CD-PEG-SN38 纳米胶束在4℃条件下储存6个月的粒径变化情况, 用于考察 β -CD-PEG-SN38 纳米胶束的长期储存稳定性。储存前后 β -CD-PEG-SN38 纳米胶束的粒径分别为 (101.3 ± 1.1) 、 (105.2 ± 0.7) nm。在此期间, β -CD-PEG-SN38 纳米胶束的粒径未发生明显变化, 具有

较好的低温储存稳定性。

3 讨论

本实验优化了 β -CD-PEG-SN38 纳米胶束的制备条件, 并对其制剂学性质进行了评价。 β -CD-PEG-SN38 纳米胶束在水中的溶解度达到了6 mg/mL (SN38 等效浓度), 使得SN38 溶解度提高了约800倍。 β -CD-PEG-SN38 纳米胶束在模拟的生理条件下具有良好的胶体稳定性和较好的低温长期储存稳定性。

实验制备的 β -CD-PEG-SN38 纳米胶束具有结构稳定、粒径适中、分布均匀等诸多优势, 以上实验结果为开展体内药效学评价提供了指导。通过化学键将难溶性抗癌小分子药物SN38 连接在临床上可以接受的高分子材料上, 自组装成粒径较小的纳米胶束, 实现肿瘤的靶向治疗作用, 达到减毒增效的目的, 可为其他肿瘤药物的开发提供一种策略。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Rivory L P, Chatelut E, Canal P, *et al.* Kinetics of the in vivo interconversion of the carboxylate and lactone forms of irinotecan (CPT-11) and of its metabolite SN-38 in patients [J]. *Cancer Res*, 1994, 54(24): 6330-6333.
- [2] Ringsdorf H. Structure and properties of pharmacologically active polymers [J]. *J Polymer Sci*, 1975, 51(1): 135-153.
- [3] Turecek P L, Bossard M J, Schoetens F, *et al.* PEGylation of biopharmaceuticals: A review of chemistry and nonclinical safety information of approved drugs [J]. *J Pharm Sci*, 2016, 105(2): 460-475.
- [4] Abuchowski A, van Es T, Palczuk N C, *et al.* Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol [J]. *J Biol Chem*, 1977, 252(11): 3578-3581.
- [5] Clark A J, Wiley D T, Zuckerman J E, *et al.* CRLX101 nanoparticles localize in human tumors and not in adjacent, nonneoplastic tissue after intravenous dosing [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(14): 3850-3854.
- [6] Torchilin V. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2011, 63(3): 131-135.

[责任编辑 解学星]