

PCL-PEG-PCL 载姜黄素纳米粒子的制备以及体外药物释放的考察

郑施施¹, 李星熠², 王增寿^{1*} (1.温州医学院附属第二医院药剂科, 浙江 温州 325027; 2.温州医学院眼视光医院生物医学工程研究院, 浙江 温州 325027)

摘要: 目的 制备一种生物可降解、生物相容性良好的姜黄素纳米粒子, 并对其体外药物释放行为进行考察。方法 采用开环聚合法制备生物可降解的 PCL-PEG-PCL 三嵌段聚合物, 然后采用乳液挥发法制备负载姜黄素的 PCL-PEG-PCL 纳米粒子, 通过透射电镜观察所制备纳米粒子的形貌特征, 动态光散射(DLS)测定粒径, 采用 HPLC 测定纳米粒子的包封率和载药量, 同时考察其体外药物释放行为。结果 姜黄素纳米粒子具有球形结构, 粒径在 200 nm 左右, 载药量为 (14.23±0.35)%, 3 d 体外累积释药量 65%。结论 所制备的姜黄素纳米粒子具有较高的载药量和包封率, 同时体外药物释放实验证实姜黄素纳米粒子具有良好的缓释功能。

关键词: 聚己内酯-聚乙二醇-聚己内酯; 姜黄素; 体外释放

中图分类号: R943

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2012)06-0513-04

Curcumin Loaded PCL-PEG-PCL Nanoparticle: Preparation, Characterization and *in Vitro* Release Study

ZHENG Shishi¹, LI Xingyi², WANG Zengshou^{1*} (1.Department of Pharmacy, the Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325027, China; 2.Institute of Biomedical Engineering, School of Ophthalmology & Optometry and Eye Hospital, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325027, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a novel biodegradable, biocompatible curcumin loaded PCEC (PCL-PEG-PCL) nanoparticles for potential application in the drug delivery system. **METHODS** PCEC copolymer was synthesized by the ring-opening polymerization method and its nanoparticles (blank and curcumin loaded PCEC nanoparticles) were prepared by the emulsification-evaporation method. The developed curcumin loaded PCEC nanoparticles were characterized by scanning electron microscopy (SEM), dynamic light scattering (DLS) and etc. Drug loading capacity/efficiency was determined by HPLC. *In vitro* release behavior of curcumin from nanoparticles was also investigated. **RESULTS** The developed curcumin loaded PCEC nanoparticle showed almost spherical in shape with uniform mean particle size about 200 nm. The drug loading capacity of curcumin was approximately (14.23±0.35)%. *In vitro* release study showed that 65% of total curcumin was released from nanoparticle after 3 days. **CONCLUSION** The developed PCEC nanoparticle is an excellent carrier for the curcumin with great drug loading and encapsulation efficiency. *In vitro* release study indicates that the curcumin could slowly release from the nanoparticle, which might have great potential application in drug delivery system.

KEY WORDS: PCL-PEG-PCL; curcumin; *in vitro* release

姜黄(Curcuma)为姜黄属植物, 药用其根茎, 主产于印度、日本、非洲、中国等地。美国食品药品监督管理局已经批准姜黄用于天然食品添加剂^[1-2]。姜黄素(curcumin)是从中药姜黄中提取的最重要活性成分, 溶于乙醇、碱液、醋酸等溶剂, 不溶于水。姜黄素具有广泛的药理作用, 如抗炎、抗氧化、抑制血管生成及特有的抗肿瘤活性^[3-5]。自 1985 年印度学者 Kuttan 等^[6]报道了姜黄素可以抑制 Duhon'S 淋巴瘤细胞以来, 姜黄素的抗肿瘤作用日益引起人们的重视。但是姜黄素作为一种良好抗肿瘤药物, 水溶性差, 直接导致其生物利用度低。近些年来, 随着高分子科学、材料科学、

药学等相关领域的发展以及交叉融合, 使得药物传递系统(drug delivery system)的开发收到了越来越多的关注。聚己内酯(PCL)、聚乳酸(PLA)等高分子材料已经被批准用于临床药物治疗^[7-9]。基于以上聚合物的载药纳米粒子除了具有传统药物载体的优点, 还可以显著改变药物的分布和代谢, 提高疗效、降低毒性, 受到了越来越多的关注^[10-11]。

为了提高姜黄素的治疗疗效并有效的减低其毒副作用, 笔者合成了三嵌段高分子化合物 PCL-PEG-PCL(聚己内酯-聚乙二醇-聚己内酯), 并将其用于姜黄素的负载。全面考察了所制备载药纳米粒子的粒径、稳定性、包封率、载药量、体

作者简介: 郑施施, 女, 药师 Tel: (0577)88002863
(0577)88002686 E-mail: wangzs@mail.wz.zj.cn

E-mail: zsscici83@126.com

*通信作者: 王增寿, 男, 主任药师 Tel:

外释药特性等参数。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

己内酯(ϵ -CL, 美国 Fluka); 聚乙二醇(PEG)、辛酸亚锡、泊洛沙姆 F127 均购自美国 Sigma-aldrich 公司; 姜黄素(阿拉丁试剂)。

T10 高速匀浆机(德国 IKA); DF-1 油浴锅(金坛市天竟实验仪器厂); FD-1A-50 冷冻干燥机(北京博医康有限公司)。

1.2 PCL-PEG-PCL 三嵌段共聚物的合成与表征

根据已有合成方法, 笔者通过开环聚合方法制备 PCL-PEG-PCL 三嵌段共聚物^[12]。在装有适量 PEG 的三颈瓶中加入计算量的 ϵ -CL, 以及 0.1% 的辛酸亚锡。在真空通氮气条件下, 将其置于 130 °C 油浴反应 48 h。反应得到的粗产物, 用二氯甲烷溶解后, 沉淀于大量无水乙醚中以除去未反应的单体及其他低分子量物质, 收集沉淀并洗涤数次后减压干燥, 得到 PCL-PEG-PCL 三嵌段聚合物。以 CDCl_3 为溶剂对所得到的产物进行 $^1\text{H-NMR}$ 分析并且计算其数均分子量。

1.3 负载姜黄素的 PCL-PEG-PCL 纳米粒子的制备与表征

采用乳液挥发法制备负载姜黄素的 PCL-PEG-PCL 纳米粒子。具体操作如下: 准确称量一定量的姜黄素和 0.2 g PCL-PEG-PCL 共聚物共同溶解在 5 mL 的二氯甲烷溶液中, 形成有机相。将一定量的 F127 溶解在水溶液中形成 5% 的水溶液, 形成水相。将 5 mL 的有机相加入到 10 mL 的水相中, 常温条件下, 用高速匀浆机以 10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 匀浆乳化 5 min, 之后再得到水包油初乳液转移到 25 mL 的旋蒸瓶中采用旋转蒸发仪低压去除乳液中的有机溶剂, 最终得到负载姜黄素的 PCL-PEG-PCL 纳米粒子。

将所得到的负载姜黄素的 PCL-PEG-PCL 纳米粒子采用激光粒度仪测定其粒度分布。纳米粒子的形貌通过透射电镜进行观察, 将所制备的纳米粒子溶液滴加在覆盖硝酸纤维素膜的铜网上, 在空气干燥后, 用 1% 磷钨酸负染之后进行电镜观察。

1.4 载药量和包封率的测定

高效液相色谱法测定其包封率和载药量: 取 20 mg 的载药 PCL-PEG-PCL 纳米粒子, 用二甲基亚砜完全溶解提取其中的姜黄素, 以甲醇/0.3% 醋酸水溶液(70/30)为流动相, 所采用的色谱条件为

ZORBAX Edipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm), 流动相: 甲醇-0.1% 醋酸(70:30), 流速 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 柱温 25 °C, 进样量 20 μL , 检测波长为 420 nm。

$$\text{包封率}(\%) = \frac{\text{所测得的姜黄素量}}{\text{总姜黄素投药量}} \times 100\%$$

$$\text{载药量}(\%) = \frac{\text{所测得的姜黄素量}}{\text{载药纳米粒子重量}} \times 100\%$$

1.5 纳米粒子体外药物释放行为考察

将所制备的一定量的载药纳米粒子装载进入到透析袋中, 然后密封, 放入 20 mL 的磷酸盐缓冲溶液(pH 7.4)中, 进行体外药物释放行为考察。在特定的时间点, 取出 1 mL 的磷酸盐缓冲溶液测定其中含有的姜黄素含量, 从而得到体外释放曲线。

2 方法与结果

2.1 PCL-PEG-PCL 三嵌段共聚物的合成与表征

通过传统的开环聚合的方法, 在辛酸亚锡的催化下, 用聚乙二醇($M_r=4\ 000$)引发己内酯来合成 PCL-PEG-PCL 三嵌段共聚物, 如图 1 所示。

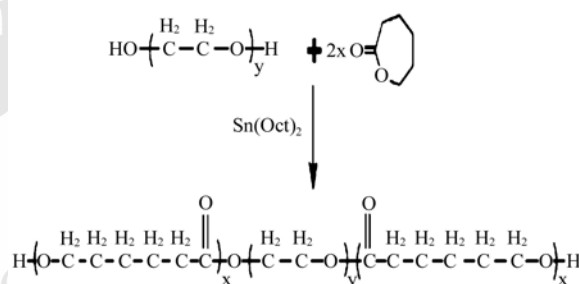


图 1 PCL-PEG-PCL 三嵌段共聚物的合成示意图

Fig 1 Synthesis schemes of PCL-PEG-PCL

采用 $^1\text{H-NMR}$ 来鉴定所合成的共聚物, 如图 2 所示。‘f’, ‘e’ 和 ‘b’ 峰分别与 PCL 嵌段中 $-(\text{CH}_2)_3-$, $-\text{CH}_2\text{CO}-$ 和 $-\text{COOCH}_2-$ 中的亚甲基有关。‘d’ 峰与 PEG 中的 $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$ 有关。比较弱的 ‘a’ 和 ‘c’ 峰与 PEG 和 PCL 连接处的 $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ 有关。

同时, 还可以通过核磁图谱来计算 PCL-PEG-PCL 的分子量, 计算公式如下:

$$2(2(x-1))/I_b=4/I_a;$$

$$4(y-2)+4/I_d=4/I_a;$$

$$M_n(\text{PCL-PEG-PCL})=M_n(\text{PEG})+M_n(\text{PCL})=44y+2(114x);$$

其中 x 和 y 分别是 PCL 和 PEG 的聚合度。通过核磁图谱计算, 合成的 PCL-PEG-PCL 的分子量为 58 700。

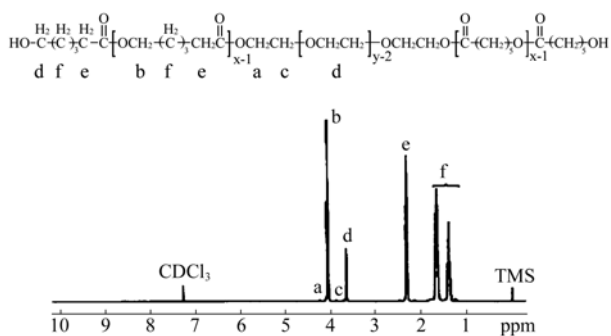


图2 PCL-PEG-PCL 三嵌段共聚物的核磁图谱

Fig 2 MIR of PCL-PEG-PCL

2.2 载药纳米粒子的制备以及表征

通过激光粒度仪测定笔者所制备的姜黄素载药纳米粒子,结果见图3,所制备的载药纳米粒子平均粒径为 249.5 nm,具有良好的单分散性。同时通过透射电镜观察发现所制备的姜黄素 PCL-PEG-PCL 纳米粒子是球形规则结构,粒径在 200 nm 左右,显示采用乳液挥发法所制备载药纳米粒子具有较小的粒径,可用于静脉给药,其结果与激光粒度仪检测结果一致。

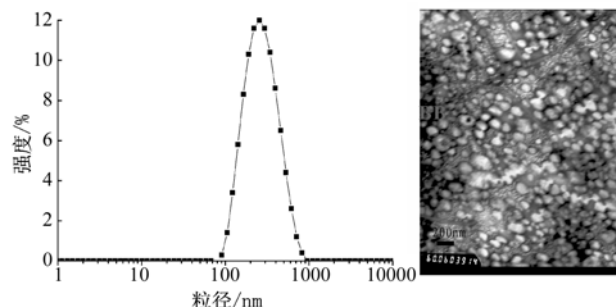


图3 粒径分布图和透射电镜图

Fig 3 The diameter distribution of nanoparticles and TEM of nanoparticles

2.3 纳米粒子的载药量和包封率

先前的大量研究表明基于 PCL 和 PEG 的共聚物具有优良的载药性能,可用于提高疏水性药物的水溶性,以及达到缓慢释放药物的功能。实验采用 PCL-PEG-PCL 三嵌段共聚物来装载疏水性药物姜黄素,以泊洛沙姆 F-127 为乳化剂,考察了药物投药量与载药量和包封率之间的关系,结果见表 1。

表 1 投药量与载药量和包封率之间的关系

Tab 1 The relationship of entrapment efficiency and loading efficiency between drug dosage

投药量/mg	包封率/%	载药量/%
20	96.65±2.45	8.67±0.67
30	96.24±1.78	12.34±0.28
40	97.65±2.19	14.23±0.35

由结果可知,随着姜黄素的投药量从 20 mg 增加到 40 mg,聚合物纳米粒子的包封率基本变化不大,维持在 96%左右,显示采用的 PCL-PEG-PCL 三嵌段共聚物具有良好的载药能力。而载药量却随着投药量的增加而逐渐从 8%增长到 14%,说明所制备的纳米粒子具有较高的药物装载能力。

2.4 姜黄素纳米粒子的体外释放行为

选用 14.23%载药量的姜黄素纳米粒子来进行体外药物释放行为考察,结果见图 4。

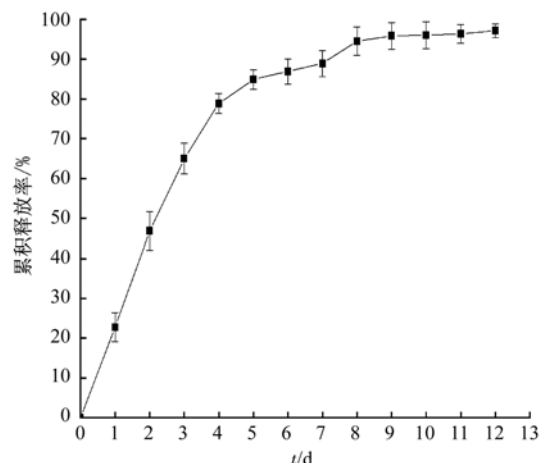


图4 姜黄素的体外药物释放曲线

Fig 4 In vitro release of curcumin

将药物装载进入聚合物纳米粒子可以有效的达到药物缓释功能,由结果可知药物在前 3 d 释放较快,达到了总载药量的 65%左右,这可能是部分药物吸附在纳米粒子表面从而使得药物较快的释放,而 3 d 之后药物的释放逐渐减慢,达到一个释放的平台期。药物释放持续时间长可能是由于聚合物缓慢降解、聚合的结晶性、药物和聚合物之间分子间的范德华力、氢键所导致的。同时由于姜黄素为疏水性药物,主要包裹在共聚物纳米粒子的疏水核中,所以共聚物的疏水段对药物释放有很大的影响。随着共聚物中疏水聚己内酯链段比率的增加导致姜黄素和聚己内酯链段的键合亲合作用增强,药物释放变慢^[12]。

3 讨论

本实验通过开环聚合反应成功合成一种生物可降解的 PCL-PEG-PCL 三嵌段共聚物,分子量在 60 000 左右;同时采用乳液-挥发法制备负载姜黄素的 PCL-PEG-PCL 纳米粒子,所得到的纳米粒子,粒径均匀(大约为 200 nm),具有较高的包封率和载药量,药物主要是包裹在嵌段共聚物的疏水区域,而纳米粒子表面存在大量的聚乙二醇,

可以有效的避免纳米粒子被代谢排出。通过此种方法制备载药纳米粒子,操作简单、重复性好,所得到的载药纳米粒子稳定。

REFERENCES

- [1] BAO H Y, CHEN R H. The research progress of Curcumin [J]. Foreign Med Sci(Paediatr)(国外医学 儿科学分册), 2003, 30(5): 254-256.
- [2] MAHESHWARI R K, SINGH A K, GADDIPATI J, et al. Multiple biological activities of curcumin: a short review [J]. Life Sci, 2006, 78(18): 2081-2087.
- [3] MANI H, SIDHU G S, KUMARI R, et al. Curcumin differentially regulates TGF- β 1, its receptors and nitric oxide synthase during impaired wound healing [J]. Biofactors, 2002, 16(1/2): 29-43.
- [4] REJINOLD N S, MUTHUNARAYANAN M, DIVYARANI V V, et al. Curcumin-loaded biocompatible thermoresponsive polymeric nanoparticles for cancer drug delivery [J]. J Colloid Interf Sci, 2011, 360(1): 39-51.
- [5] ZHAGN W G, HAN G, WANG B, et al. Effect of curcumin solid dispersion on oxidative stress in diabetic rats [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2010, 27(1): 13-15.
- [6] KUTTAN R, BHANUMATHY P, NIRMALA K, et al. Potential anticancer activity of turmeric (*Curcuma longa*) [J]. Cancer letters, 1985, 29(2): 197-202.
- [7] WU X P, WANG C. Advances in peptide-modified liposome targeted drug delivery system [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2010, 27(8): 681-685.
- [8] SONG C X, WANG P Y. Poly caprolactone degradation *in vivo*, absorption and excretion [J]. J Biomed Eng(生物医学工程学杂志), 2000, 17(3): 25-28.
- [9] SUN L, GAN Z H. Synthetic caprolactone degradation *in vivo* study [J]. Chin J Exp Surg(中华实验外科杂志), 1999, 16(3): 169-170.
- [10] SCHMIDT G, MALWITZ M M. Properties of polymer-nanoparticle composites [J]. Curr Opin Colloid Int Sci, 2003, 8(1): 103-108.
- [11] SHENHAR R, NORSTEN T B, ROTELLO V M. Polymer-mediated nanoparticle assembly: structural control and applications [J]. Advanced Materials, 2005, 17(6): 657-669.
- [12] YEN M, KUO S. PCL-PEG-PCL triblock ester-ether copolydiol-based waterborne polyurethane. II. Effect of NCO/OH mole ratio and DMPA content on the physical properties [J]. J Appl Polym Sci, 1998, 67(7): 1301-1311.

收稿日期: 2011-09-20