

# 熊果酸/PF127/TPGS-多柔比星混合纳米胶束的制备及其体外释药特性研究<sup>Δ</sup>

陈洋洋\*, 耿雪, 屈子卉, 李雪莹, 王琪, 霍元子, 郝若祎, 阎雪莹<sup>#</sup>(黑龙江中医药大学药学院, 哈尔滨150040)

中图分类号 R943;R944.9 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)20-2789-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.20.11

**摘要** 目的:制备熊果酸(UA)/Pluronic F127(PF127)/聚乙二醇维生素E琥珀酸酯(TPGS)-多柔比星(DOX)混合纳米胶束,并对其表征和体外释药特性研究。方法:采用薄膜水化法制备UA/PF127/TPGS纳米胶束;以UA包封率为指标,结合单因素试验结果,通过L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交试验设计对方剂中的UA投药量、PF127与TPGS的摩尔比、水化温度、水化体积进行优化并验证。在琥珀酰化TPGS的基础上,合成TPGS-DOX,与UA/PF127/TPGS混合制备UA/PF127/TPGS-DOX混合纳米胶束,考察其外观、粒径、临界胶束浓度(PF127/TPGS),采用透析袋扩散法考察其体外释药行为。结果:UA/PF127/TPGS纳米胶束的最优制备工艺为UA投药量8 mg,PF127与TPGS的摩尔比3:7,水化温度50℃,水化体积4 mL,所得纳米胶束中UA的平均包封率为89.00%(RSD=0.43%,n=3)。在此基础上所制UA/PF127/TPGS-DOX混合纳米胶束溶液澄清且带有乳光;呈类球形且大小均匀,平均粒径为(115.00±9.42)nm;PF127/TPGS(摩尔比3:7)的临界胶束浓度为0.001 3%。该混合纳米胶束中UA、DOX的体外释放均较其原料药或对照品明显减缓,胶束中两种药物的释药过程均符合Weibull方程。结论:本研究成功制备了UA/PF127/TPGS-DOX混合纳米胶束,其粒径均匀且系统稳定性好,并具有较好的缓释效果。

**关键词** 熊果酸;多柔比星;Pluronic F127;聚乙二醇维生素E琥珀酸酯;混合纳米胶束;正交试验;体外释放

## Study on Preparation and *in vitro* Release Characteristic of Ursolic Acid/PF127/TPGS-doxorubicin Mixed Nanomicelles

CHEN Yangyang, GENG Xue, QU Zihui, LI Xueying, WANG Qi, HUO Yuanzi, HAO Ruoyi, YAN Xueying (College of Pharmacy, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To prepare Ursolic acid (UA)/Pluronic F127 (PF127)/TPGS-doxorubicin (DOX) mixed nanomicelles, and to characterize it and study its *in vitro* release behavior. METHODS: UA/PF127/TPGS nanomicelles were prepared by thin film hydration method. Using encapsulation efficiency of UA as index, combined with the results of single factor tests, L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) orthogonal test was used to optimize drug dosage of UA, molar ratio of PF127 to TPGS, hydration temperature and hydration volume, validation test was performed. On the basis of succinylated TPGS, TPGS-DOX was synthesized and mixed with UA/PF127/TPGS to prepare UA/PF127/TPGS-DOX mixed nanomicelles, the appearance, particle size and critical micelle concentration (PF127/TPGS) were investigated. The drug release behavior was examined by dialysis bag diffusion method. RESULTS: The optimal preparation technology of UA/PF127/TPGS nanomicelles was as follows as drug dosage of UA 8 mg, molar ratio of PF127 to TPGS 3:7, hydration temperature 50℃, hydration volume 4 mL. Average encapsulation efficiency of UA in nanomicelles was 89.00% (RSD=0.43%, n=3). The prepared UA/PF127/TPGS-DOX mixed nanomicelles solution was clear with opalescence. The nanomicelles were spherical and uniform in size; average particle size was (115.00±9.42) nm; critical micelle concentration of PF127/TPGS (molecular ratio 3:7) was 0.001 3%. The *in vitro* drug release of UA and DOX in the mixed nanomicelles was significantly slowed down, compared with raw materials or substance control. The drug release process of the two drugs in the nanomicelles conformed to Weibull equation. CONCLUSIONS: UA/PF127/TPGS-DOX mixed nanomicelles are successfully prepared with uniform particle size, good stability and good sustained-release effect.

**KEYWORDS** Ursolic acid; Doxorubicin; Pluronic F127; TPGS; Mixed nanomicelles; Orthogonal test; Release *in vitro*

<sup>Δ</sup> 基金项目:黑龙江省自然科学基金(重点项目)资助项目(No. ZD2016019)

\* 硕士研究生。研究方向:缓控释制剂、中药体内代谢、中药新药研发。电话:0451-87266988。E-mail:1561231451@qq.com

<sup>#</sup> 通信作者:教授,硕士生导师,博士。研究方向:缓控释制剂、中药体内代谢、中药新药研发。电话:0451-87266988。E-mail:15159267@qq.com

熊果酸(Ursolic acid, UA)属于五环三萜类化合物,具有广泛的药理活性,如抗肿瘤、抗氧化、抗炎、抗高脂血症等,但由于其水溶性差、生物利用度低,使得该化合物的应用受到极大限制<sup>[1-2]</sup>。多柔比星(Doxorubicin, DOX)是从链球菌色素代谢物中分离出来的一种萘环类化合物,被认为是最有效的化疗药之一,是诸多类型癌

症临床治疗的一线用药<sup>[3]</sup>。DOX水溶性好,但长期使用会导致多药耐药,而有研究表明,UA可抑制上述多药耐药性,两药联用具有一定的协同作用<sup>[4]</sup>。

Pluronic F127(PF127)是一种ABA型的三嵌段共聚物,由聚环氧乙烷-聚环氧丙烷-聚环氧乙烷(PEO-PPO-PEO)构成<sup>[5]</sup>。在各种类型的Pluronic中,PF127在生物医学领域中的应用最为广泛,其由PPO疏水性嵌段构成的内核可作为疏水性药物的微环境,PEO亲水性嵌段则可防止结合蛋白质的吸附和聚集<sup>[6]</sup>。聚乙二醇维生素E琥珀酸酯(TPGS)具有两亲性,被美国FDA认定为安全的药用辅料,可作为增溶剂、增塑剂、乳化剂、稳定剂等应用于药物制剂中<sup>[7-8]</sup>;此外,TPGS也可用于前体药物的合成,可与其他共聚物形成混合载体以提高药物的溶解度、渗透性及稳定性,从而实现缓释、控释及靶向作用,以促进药物的吸收<sup>[9]</sup>。本研究将疏水性药物UA包载于PF127和TPGS形成的混合胶束(TPGS-PF127)内核中,初步尝试制备UA/PF127/TPGS,并优化其制备处方工艺<sup>[10]</sup>;同时参考文献方法<sup>[11]</sup>,在琥珀酰化TPGS的基础上,利用其末端羧基与亲水性药物DOX上的氨基结合,合成TPGS-DOX;又将上述TPGS-DOX与TPGS-PF127作为共同载体,制备UA/PF127/TPGS-DOX混合纳米胶束,并对其表征以及体外释药行为考察,以期为该制剂的后续体内代谢研究奠定基础。

## 1 材料

### 1.1 仪器

e2695型高效液相色谱(HPLC)仪(美国Waters公司);R-205B型旋转蒸发仪、W202B型恒温水浴锅(上海申胜生物技术有限公司);TGL-16C型离心机(上海安亭科学仪器厂);HJ-6A型数显恒温磁力搅拌器(金坛市荣华仪器制造有限公司);BT25S型分析天平(德国Sartorius公司);UV9100型紫外-可见分光光度计(北京莱伯泰科仪器股份有限公司);470型傅里叶红外变换光谱仪(美国Nicolet公司);400型核磁共振光谱仪(美国Bruker公司);JEM-2100型透射电子显微镜(日本JEOL公司);Zetasizer Nano-ZS90型纳米粒度及Zeta电位分析仪(英国Malvern公司)。

### 1.2 药品与试剂

UA对照品(长沙麓园生物科技有限公司,批号:LY-UA-20141218012,纯度:≥98%);UA原料药(南京道斯夫生物科技有限公司,批号:141202R,纯度:>98%);盐酸多柔比星对照品(DOX·HCl,北京华奉联博化学材料有限公司,批号:HF150728,纯度:>98%);PF127(德国BASF公司,批号:140215);TPGS(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号:T110277);琥珀酸酐(SA)(国药集团化学试剂有限公司,批号:20150128);二环己基碳二亚胺(DCC,批号:Z23A6Y9)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS,批号:Z31A8N42796)均购自上海源叶生物科技有限公

司;透析袋(截留分子量:8 000~14 400 Da,美国Sigma公司);0.22 μm微孔滤膜(天津市领航实验设备股份有限公司);甲醇、乙腈均为色谱纯,乙醇、三乙胺(TEA)、二甲基亚砜(DMSO)等其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

## 2 方法与结果

### 2.1 UA含量测定

采用HPLC法测定。

2.1.1 色谱条件 色谱柱:Dikma Diamonsil C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-0.5%磷酸水溶液(85:15, V/V);检测波长:210 nm;流速:1.0 mL/min;柱温:25 ℃;进样量:20 μL。

2.1.2 溶液的配制 ①UA贮备液:精密称取UA对照品4.01 mg,用乙醇溶解并定容至10 mL量瓶中,得质量浓度为401.00 μg/mL的UA贮备液。②供试品溶液:精密称定处方量UA原料药,固定摩尔比的PF127、TPGS以及一定量的TPGS-DOX,用乙醇溶解,旋转蒸发挥去有机溶剂,于室温真空干燥箱中静置过夜,得透明干燥的含药薄膜。将上述薄膜用适量水进行水化,于适宜温度水浴中以700 r/min搅拌30 min,冷却至室温,即得UA/PF127/TPGS-DOX混合纳米胶束供试品溶液。③阴性对照溶液:按“2.1.2②”项下方法制备不含UA、DOX的空白胶束溶液,即得阴性对照溶液。

2.1.3 专属性考察 分别取“2.1.2”项下UA贮备液、供试品溶液、阴性对照溶液各适量,按“2.1.1”项下色谱条件进样分析,记录色谱图,详见图1。结果显示,在该色谱条件下,UA峰形较好,保留时间约为14.9 min;DOX在此波长下无吸收,TPGS、PF127等对UA的测定无干扰,表明本方法专属性良好。

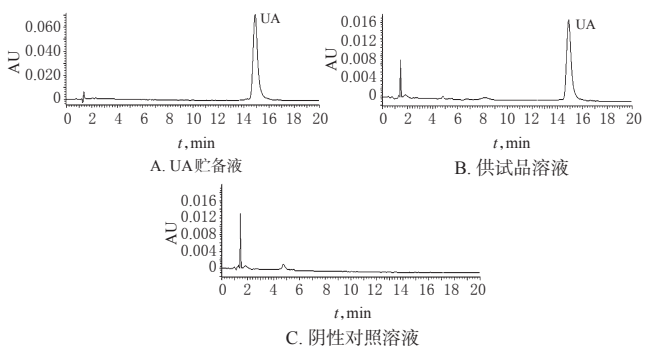


图1 高效液相色谱图(UA定量分析)

### Fig 1 HPLC chromatograms (UA quantitative analysis)

2.1.4 线性关系考察 分别取“2.1.2①”项下UA贮备液适量,用乙醇稀释,制得质量浓度分别为40.10、100.25、200.50、300.75、401.00 μg/mL的系列对照品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件进样分析,记录色谱图。以待测物质量浓度为横坐标( $c$ , μg/mL)、其峰面积为纵坐标( $A$ )进行线性回归,得线性回归方程为 $A=6\ 127.2c-99\ 354$

( $R^2=0.9992$ )。结果,UA检测质量浓度的线性范围为40.10~401.00  $\mu\text{g/mL}$ 。

2.1.5 定量限与检测限考察 取“2.1.4”项下40.10  $\mu\text{g/mL}$ 的UA对照品溶液适量,用乙醇逐级稀释,并按“2.1.1”项下色谱条件进样分析。当信噪比为10:1时,得UA定量限为2.23  $\mu\text{g/mL}$ ;当信噪比为3:1时,得UA检测限为0.808  $\mu\text{g/mL}$ 。

2.1.6 精密度、准确度、重复性、加样回收率和稳定性试验 参照2015年版《中国药典》(四部)要求<sup>[12]</sup>进行精密度、准确度、重复性、加样回收率和稳定性试验。结果,精密度、准确度、重复性、加样回收率均符合药典相关规定,供试品溶液在室温下放置24 h基本稳定。

## 2.2 DOX含量测定

采用HPLC法测定。

2.2.1 色谱条件 色谱柱:Dikma Diamonsil  $C_{18}$  (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ );流动相:磷酸缓冲液[500 mL水中加入磷酸0.68 mL、十二烷基硫酸钠(SDS)1.44 g]-乙腈-甲醇(500:500:60,  $V/V/V$ );检测波长:254 nm;流速:1.0 mL/min;柱温:25  $^{\circ}\text{C}$ ;进样量:20  $\mu\text{L}$ 。

2.2.2 溶液的配制 ①DOX贮备液:精密称取DOX·HCl对照品4.00 mg,用pH 7.4的磷酸盐缓冲液(PBS,含20%乙醇)溶解并定容至100 mL量瓶中,制得质量浓度为40.00  $\mu\text{g/mL}$ (以DOX·HCl质量计,下同)的DOX贮备液。②供试品溶液:按“2.1.2②”项下方法制备供试品溶液。③阴性对照溶液:按“2.1.2③”项下方法制备阴性对照溶液。

2.2.3 专属性考察 分别取“2.2.2”项下DOX贮备液、供试品溶液、阴性对照溶液各适量,按“2.2.1”项下色谱条件进样分析,记录色谱图,详见图2。结果显示,在该色谱条件下,DOX峰形较好,保留时间约为10.5 min;UA在此波长下无吸收,TPGS、PF127等对DOX的测定无干扰,提示本方法专属性良好。

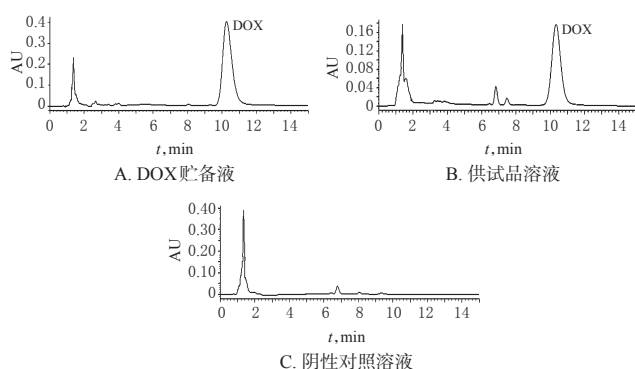


图2 高效液相色谱图(DOX定量分析)

## Fig 2 HPLC chromatograms (DOX quantitative analysis)

2.2.4 线性关系考察 取“2.2.2①”项下DOX贮备液适量,用乙醇稀释,制得质量浓度分别为4.00、8.00、

16.00、32.00、40.00  $\mu\text{g/mL}$ 的系列对照品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样分析,记录色谱图。以待测物质量浓度为横坐标( $c, \mu\text{g/mL}$ )、其峰面积为纵坐标( $A$ )进行线性回归,得线性回归方程为 $A=2585080c-29936$ ( $R^2=0.9999$ )。结果,DOX检测质量浓度的线性范围为4.00~40.00  $\mu\text{g/mL}$ 。

2.2.5 定量限与检测限考察 取“2.2.4”项下40.00  $\mu\text{g/mL}$ 的UA对照品溶液适量,用乙醇逐级稀释,并按“2.2.1”项下色谱条件进样分析。当信噪比为10:1时,得DOX定量限为2.263  $\mu\text{g/mL}$ ;当信噪比为3:1时,得DOX检测限为0.608  $\mu\text{g/mL}$ 。

2.2.6 精密度、准确度、重复性、加样回收率和稳定性试验 参照2015年版《中国药典》(四部)要求<sup>[12]</sup>进行精密度、准确度、重复性、加样回收率和稳定性试验。结果,精密度、准确度、重复性、加样回收率均符合药典相关规定,供试品溶液在室温下放置24 h基本稳定。

## 2.3 UA包封率和载药量测定

精密量取所得UA/PF127/TPGS-DOX混合纳米胶束溶液适量,经0.22  $\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过后,取续滤液,用乙醇稀释,以12 000 r/min离心10 min,取上清液,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,并采用标准曲线法计算其被包封的UA含量( $m_{\text{包封}}$ );精密量取UA/PF127/TPGS-DOX混合纳米胶束溶液适量,不经滤过处理,同法离心后取上清液,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,并采用标准曲线法计算UA的总量( $m_{\text{总}}$ )。包封率( $\%$ )= $(m_{\text{包封}}/m_{\text{总}})\times 100\%$ ,载药量( $\%$ )= $[m_{\text{包封}}/(m_{\text{投药}}+m_{\text{载体}})]\times 100\%$ (式中, $m_{\text{投药}}$ 为UA投药量, $m_{\text{载体}}$ 为载体总量)<sup>[13-14]</sup>。

## 2.4 UA/PF127/TPGS纳米胶束处方工艺优化

采用薄膜水化法<sup>[15]</sup>制备UA/PF127/TPGS纳米胶束:称取一定量的UA原料药以及一定摩尔比的载体材料PF127、TPGS(载体材料共100 mg),置于同一100 mL茄型瓶中,加入适量有机溶剂使其充分溶解,于45  $^{\circ}\text{C}$ 下旋转蒸发1 h以挥干有机溶剂,残渣于室温真空干燥箱中静置过夜,即得透明干燥的含药薄膜。将上述含药薄膜用一定量的水进行水化后,于一定温度水浴中以700 r/min搅拌30 min,冷却至室温,即得。

2.4.1 单因素试验 参考现有研究<sup>[13]</sup>,以纳米胶束溶液澄清程度为指标,对有机溶剂种类进行考察;以UA包封率为考察指标,对UA投药量、PF127与TPGS的摩尔比、水化温度、水化体积等进行单因素考察。各因素水平均平行操作3次,结果见表1、表2(表1中,“++”表示澄清,“+”表示较澄清,“-”表示浑浊)。由表1、表2可见,以乙醇作为溶剂,可获得澄清的纳米胶束溶液;当UA投药量为8 mg、PF127与TPGS的摩尔比为3:7、水化温度为37  $^{\circ}\text{C}$ 、水化体积为4 mL时,所得UA/PF127/TPGS纳米胶束的包封率相对较高。

表1 不同有机溶剂对纳米胶束溶液澄清程度的影响

Tab 1 Effects of different organic solvents on clarification degree of nanomicells solution

溶剂	澄清程度	溶剂	澄清程度
氯仿	+	乙腈	-
乙醇	++	丙酮	-

表2 不同因素对UA/PF127/TPGS纳米胶束包封率的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab 2 Effects of different factors on encapsulation efficiency of UA in UA/PF127/TPGS nanomicelles( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

UA投药量, mg	包封率, %	PF127与TPGS的摩尔比	包封率, %	水化温度, °C	包封率, %	水化体积, mL	包封率, %
2	79.61±3.37	10:0	72.63±4.26	25	76.78±3.83	2	52.01±3.57
4	82.67±4.55	7:3	75.11±2.78	37	91.72±3.59	4	91.72±5.59
6	91.14±4.79	5:5	88.72±6.59	50	83.71±5.64	6	49.50±3.76
8	91.72±2.59	3:7	89.58±3.53	65	80.56±3.86	8	55.85±2.99
10	54.94±6.71	0:10	86.07±7.07				

2.4.2 正交试验 在单因素试验的基础上,以UA投药量(A)、PF127与TPGS的摩尔比(B)、水化温度(C)、水化体积(D)为考察因素,以UA包封率为考察指标,采用L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)表进行正交试验,每个因素取3个水平。因素与水平见表3,正交试验设计与结果见表4,方差分析结果见表5。

表3 因素与水平

Tab 3 Factors and levels

水平	因素			
	A, mg	B	C, °C	D, mL
1	4	7:3	37	3
2	6	5:5	50	4
3	8	3:7	65	5

表4 正交试验设计与结果

Tab 4 Design and results of orthogonal test

试验号	A	B	C	D	包封率, %
1	1	1	1	1	73.78
2	1	2	2	2	85.25
3	1	3	3	3	86.40
4	2	1	2	3	83.82
5	2	2	3	1	82.87
6	2	3	1	2	88.38
7	3	1	3	2	86.69
8	3	2	1	3	86.67
9	3	3	2	1	87.65
$\bar{K}_1$	81.810	81.432	82.945	81.434	
$\bar{K}_2$	85.022	84.930	85.575	86.774	
$\bar{K}_3$	87.006	87.476	85.317	85.630	
R	5.196	6.044	2.630	5.340	

由表4、表5可见,4个因素对UA包封率的影响程度依次为B>D>A>C;除因素C外,其余因素对试验结果的影响均有统计学意义( $P<0.05$ );最优处方工艺为A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>2</sub>D<sub>2</sub>,即UA投药量为8 mg、PF127与TPGS的摩尔比为3:7、水化温度为50 °C、水化体积为4 mL。

表5 方差分析结果

Tab 5 Results of variance analysis

因素	偏差平方和	自由度	均方	F	P
A	86.816	2	43.408	50.783	<0.05
B	98.617	2	49.308	57.686	<0.05
C	21.654	2	10.827	12.666	>0.05
D	80.567	2	40.283	47.128	<0.05
误差	7.693	2	0.855		

2.4.3 验证试验 按“2.3.2”项下最优处方工艺平行制备3批UA/PF127/TPGS纳米胶束,并按“2.1”项下方法测定UA含量,再按“2.3”项下方法计算UA包封率和载药量,结果见表6。

表6 验证试验结果

Tab 6 Results of validation tests

试验	包封率, %	载药量, %
1	88.68	6.57
2	89.42	6.62
3	88.91	6.59
平均值	89.00	6.59
RSD, %	0.43	0.38

## 2.5 TPGS-DOX的合成与表征

2.5.1 合成 取相同质量的TPGS、SA,通过开环反应合成琥珀酰化的TPGS-SA。精密称定或量取TPGS-SA 574.82 mg、DOX·HCl对照品 307.51 mg、DCC 222.63 mg、NHS 124.38 mg、TEA 150 μL,置于适量DMSO中,在氮气保护下室温反应24 h。所得产物作透析处理后,依次用DMSO、水清洗,冷冻干燥,即得红色粉末状的TPGS-DOX<sup>[11]</sup>。TPGS-DOX的合成过程见图3。

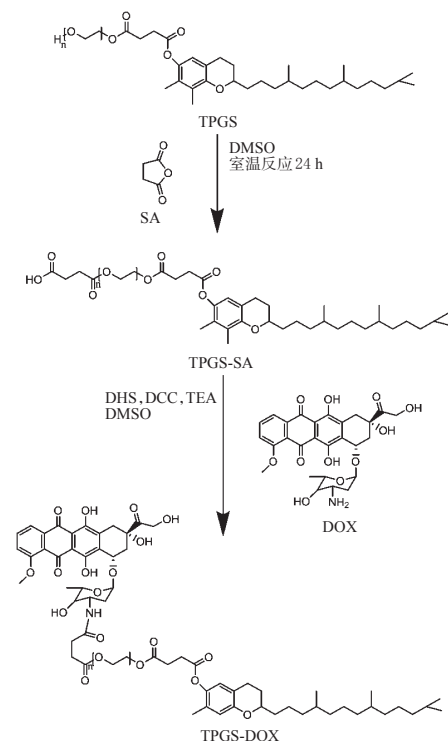


图3 TPGS-DOX的合成过程

Fig 3 Synthetic route of TPGS-DOX

2.5.2 表征 ①红外光谱:称取DOX·HCl对照品、TPGS-GS-DOX各10 mg,采用傅里叶红外变换光谱仪检测,其红外光谱分别见图4A、4B;对照TPGS红外图谱(图4C<sup>[16]</sup>)判定反应是否成功。结果,DOX在3 300~3 500  $\text{cm}^{-1}$ 处可见其氨基的特征吸收峰(双峰),而该双峰在TPGS-DOX的红外光谱中消失;TPGS在1 738、1 108  $\text{cm}^{-1}$ 处分别可见羰基和醚键的特征吸收峰,而上述吸收峰在TPGS-DOX的红外光谱中均有所减弱(见图4画圈处),提示UA的氨基已与TPGS中的羧基连接成功。

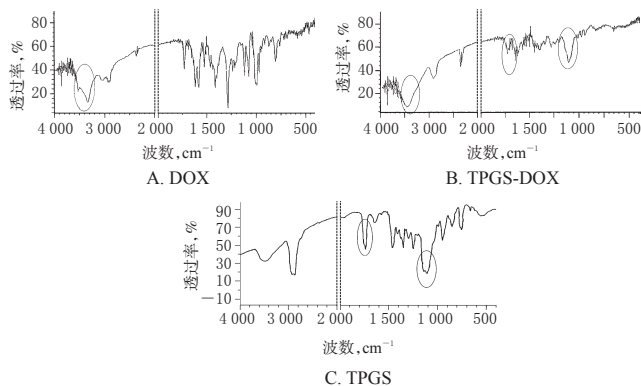


图4 红外光谱图

Fig 4 FTIR spectra

②氢谱( $^1\text{H-NMR}$ ):称取DOX·HCl对照品、TPGS、TPGS-DOX各适量溶于DMSO- $d_6$ 中,使用核磁共振光谱仪检测,其氢谱见图5。由图5可见,DOX在3.99、5.45 ppm处有特征吸收峰;TPGS在3.51 ppm处有特征吸收峰;TPGS-DOX的氢谱包含TPGS的特征吸收峰,且在8.0~8.1 ppm处存在酰胺键的特征吸收峰,但DOX的特征吸收峰变小,提示DOX已通过酰胺键与TPGS结合。

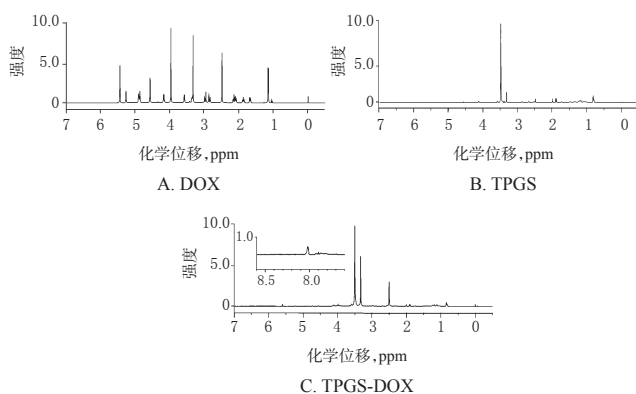


图5 氢谱图

Fig 5  $^1\text{H-NMR}$  spectra

③HPLC定性分析:取DOX·HCl对照品、TPGS-DOX各适量,按“2.2”项下方法测定,记录色谱图,见图6。由图6可见,DOX的保留时间约为10.5 min,而TPGS-DOX的保留时间约为9.4 min,且未见游离DOX的色谱峰。

2.6 UA/PF127/TPGS-DOX混合纳米胶束的制备及表征  
2.6.1 制备 分别精密称取UA原料药8 mg、PF127 78

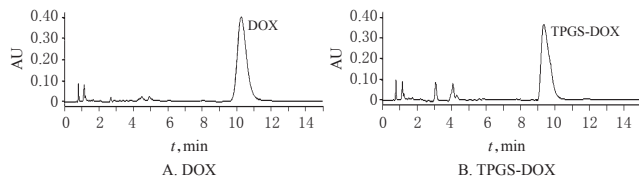


图6 高效液相色谱图(DOX定性分析)

Fig 6 HPLC chromatograms (DOX qualitative analysis)

mg、TPGS 21.4 mg以及TPGS-DOX 0.6 mg,置于同一100 mL茄型瓶中,加乙醇5 mL使其充分溶解,在45  $^{\circ}\text{C}$ 下旋转蒸发1 h以挥去有机溶剂,残渣于室温真空干燥箱中静置过夜,即得透明干燥的含药薄膜。取上述含药薄膜适量,于50  $^{\circ}\text{C}$ 水浴条件下加水4 mL进行水化。在700 r/min转速下恒速搅拌30 min,冷却至室温,即得UA/PF127/TPGS-DOX混合纳米胶束溶液。

2.6.2 形态观察与粒径测定 取“2.6.1”项下所得UA/PF127/TPGS-DOX混合纳米胶束溶液适量,滴至铺有碳膜的铜网上,用2.0%磷钨酸溶液染色,自然干燥,使胶束粒子在铜网上浓缩沉积,于透射电子显微镜下观察其形态并拍照。室温条件下,取上述UA/PF127/TPGS-DOX混合纳米胶束溶液适量,用水稀释后,采用纳米粒度及Zeta电位分析仪检测其粒径。结果,所得UA/PF127/TPGS-DOX混合纳米胶束溶液澄清且带有乳光;镜下呈类球形,且大小均匀、分散良好;平均粒径为 $(115.00 \pm 9.42)\text{nm}$ ,详见图7、图8。

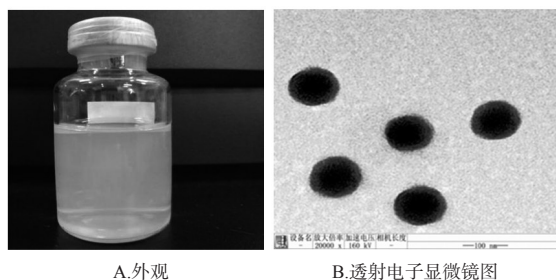


图7 UA/PF127/TPGS-DOX混合纳米胶束的外观及透射电镜图

Fig 7 Appearance and TEM of UA/PF127/TPGS-DOX mixed nanomicelles

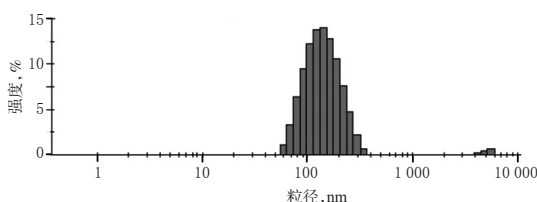


图8 UA/PF127/TPGS-DOX混合纳米胶束的粒径分布  
Fig 8 Distribution of particle size of UA/PF127/TPGS-DOX mixed nanomicelles

2.6.3 临界胶束浓度(CMC)测定 采用 $\text{I}_2$ 探针增溶的紫外-可见分光光度法以紫外-可见分光光度计检测PF127/TPGS水溶液 $\text{I}_2$ 吸光度随其浓度(浓度为

0.000 01%~0.1%)变化的趋势图。结果,摩尔比为3:7的PF127/TPGS水溶液的CMC为0.001 3%,介于PF127(0.003 5%)和TPGS(0.03%)之间,且系统稳定性较好(临界胶束浓度越低,胶束越稳定<sup>[17]</sup>),详见图9。

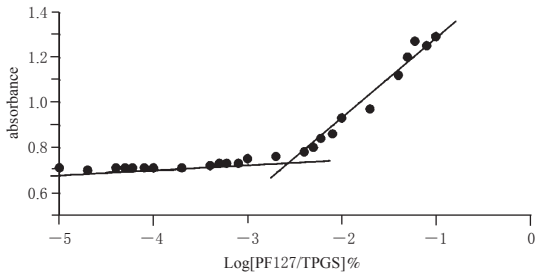


图9 PF127/TPGS CMC的测定结果

Fig 9 Determination results of CMC of PF127/TPGS

### 2.7 体外释药特性研究

采用透析袋扩散法检测。取按最优处方工艺制得的UA/PF127/TPGS-DOX混合纳米胶束溶液、UA原料药、DOX·HCl对照品各8 mL,分别装入透析袋中,以含20%乙醇的PBS为释放介质(总体积为50 mL),于37℃下以100 r/min恒速振摇。分别于释放的0.25、0.5、1、2、4、6、8、10、12、24、36、48、72 h取样2 mL(取样后补充同体积释放介质),经0.45 μm微孔滤膜滤过后,再分别按“2.1.1”“2.2.1”项下色谱条件进样测定。采用标准曲线法计算其中UA、DOX的含量,计算累积释放率(Q),并绘制体外释药曲线,再分别用零级动力学、一级动力学、Weibull、Higuchi、Niebergull、Hixcon-Crowell、Ritger-Peppas等方程对其体外释药行为进行拟合,结果见图10、表7。

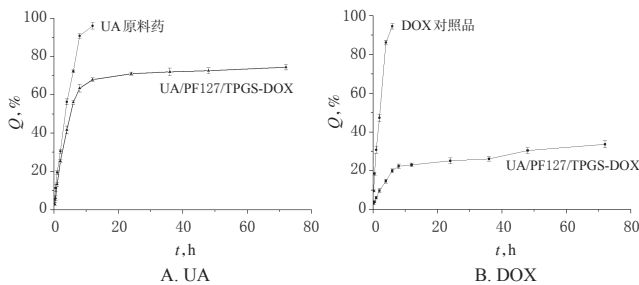


图10 体外释药曲线

Fig 10 *in vitro* drug release curves

由图10可见,UA、DOX体外释药迅速,分别约于12、6 h释放完全,而UA/PF127/TPGS-DOX混合纳米胶束中UA、DOX的释放均明显放缓。由表7可见,UA/PF127/TPGS-DOX混合纳米胶束中药物的体外释药过程均符合Weibull方程(UA、DOX的 $R^2$ 分别为0.960 2、0.919 3)。

### 3 讨论

DOX抗癌谱较广,是一种重要的化疗药,但由于其慢性毒性(可导致心脏、肝脏、大脑和肾脏损伤)和急性毒性(恶心、呕吐、心律失常等)导致其应用受到了一定的限制<sup>[18]</sup>。UA来源于天然产物,具有抗多药耐药以及

表7 UA/PF127/TPGS-DOX混合纳米胶束中两种药物体外释药曲线的拟合结果

Tab 7 Drug release curve fitting results of UA and DOX from UA/PF127/TPGS-DOX mixed nanomicelles *in vitro*

拟合模型	药物	拟合方程	$R^2$
零级动力学	UA	$Q=2.902t+19.980$	0.661 3
	DOX	$Q=0.363t+12.308$	0.643 2
一级动力学	UA	$\ln(100-Q)=-0.054t+4.366$	0.750 7
	DOX	$\ln(100-Q)=-0.005t+4.471$	0.687 9
Weibull方程	UA	$\ln[\ln(1/1-Q)]=0.879\ln t-2.037$	0.960 2
	DOX	$\ln[\ln(1/1-Q)]=0.460\ln t-2.617$	0.919 3
Higuchi方程	UA	$Q=0.049t^{1/2}+0.246$	0.871 8
	DOX	$Q=3.610t^{1/2}+6.545$	0.828 2
Niebergull方程	UA	$(1-Q)^{1/2}=-0.195t+8.906$	0.706 4
	DOX	$(1-Q)^{1/2}=-0.020t+9.358$	0.666 3
Hixcon-crowell方程	UA	$(1-Q)^{1/3}=-0.067t+4.293$	0.721 2
	DOX	$(1-Q)^{1/3}=-0.007t+4.440$	0.673 1
Ritger-peppas方程	UA	$\ln Q=0.742\ln t+2.442$	0.936 8
	DOX	$\ln Q=0.024\ln t+2.230$	0.467 4

保肝护肝、保护心血管的功效<sup>[19-20]</sup>。Zong L等<sup>[4]</sup>研究发现,UA不仅可提高DOX的疗效,而且还能逆转细胞对DOX的多药耐药。因此,本研究选择DOX和UA作为模型药物,制备UA/PF127/TPGS-DOX混合纳米胶束,以期在两药联合治疗癌症提供理论支持。

### 3.1 色谱条件的优化

本研究首先建立了检测UA和DOX质量浓度的HPLC法。在前期研究中,本课题组考察了不同流动相比比例、检测波长、流速、柱温等因素对其定量分析的影响。结果发现,检测UA时以流动相为乙腈-0.5%磷酸水溶液(85:15, V/V)、检测波长为210 nm、流速为1.0 mL/min、柱温为25℃,检测DOX时以流动相为磷酸缓冲液(500 mL水中加入磷酸0.68 mL、SDS 1.44 g)-乙腈-甲醇(500:500:60, V/V/V)、检测波长为254 nm、流速为1.0 mL/min、柱温为25℃,两者的色谱峰峰形均较好,且方法学考察结果符合2015年版《中国药典》(四部)的相关要求<sup>[12]</sup>。

### 3.2 混合纳米胶束载体的选择

混合纳米胶束是近年来研究的热点之一,其可通过不同嵌段共聚物来协同发挥包载药物的药理作用,可提高胶束的稳定性和药物的包封率,可优化胶束的粒径分布,并延长载药系统在体内的滞留时间<sup>[21]</sup>。PF127是一种多功能材料,在水溶液中能自发聚集形成胶束,将难溶性药物包裹于其中,可明显提高药物的溶解性和稳定性<sup>[6-6]</sup>。但PF127的CMC较高,当用溶剂稀释时易发生不稳定的现象;而当其与TPGS共同构成混合载体时,所得混合胶束的CMC明显降低;加之TPGS结构中含有芳香环,可使混合胶束的疏水核体积增大,难溶药物更易进入胶束的疏水核内,从而提高了药物的包封率和载药量<sup>[15]</sup>。鉴于此,本课题组选择PF127和TPGS为混合载体制备混合纳米胶束。

### 3.3 混合纳米胶束的制备及体外释药特征分析

本研究曾采用薄膜水化法、自组装法、透析法、乳化溶剂挥发法以及纳米沉淀法制备混合纳米胶束,由于薄膜水化法制备的胶束的包封率、载药量、粒径均优于其他方法,故选择该法首先制备了包载单药的UA/PF127/TPGS纳米胶束,将疏水性药物UA包载于纳米胶束的疏水内核中;并通过正交试验优化UA/PF127/TPGS的处方工艺,制得了包封率较高的UA/PF127/TPGS纳米胶束。随后,将TPGS琥珀酸化,利用其末端羧基与DOX上的氨基进行键合反应,形成酰胺键;通过IR、<sup>1</sup>H-NMR、HPLC法证实TPGS-DOX已被成功合成。根据上述最优处方工艺,将UA、PF127、TPGS与TPGS-DOX混合,进一步制备了UA/PF127/TPGS-DOX混合纳米胶束,并对其理化性质进行了一系列的表征和体外释药特性研究。在进行UA/PF127/TPGS-DOX纳米胶束体外释药特性研究时,溶出介质的选择至关重要,故本研究在2015年版《中国药典》(四部)<sup>[12]</sup>和已有文献<sup>[22]</sup>的基础上,选用含20%乙醇的PBS作为溶出介质。体外释药特性研究结果显示,与单一UA、DOX比较,UA/PF127/TPGS-DOX混合纳米胶束中两药的释放均明显减缓,提示其具有一定的缓释特性;同时,UA/PF127/TPGS-DOX混合纳米胶束中两种药物的体外释药行为符合Weibull方程,提示其释药与溶液渗透所致扩散和载体松弛分散这一双重因素有关<sup>[23]</sup>。

综上所述,本研究利用PF127和TPGS自身特点,实现了对疏水性UA和亲水性DOX的共同装载,构建了混合载药纳米胶束,为溶解性差异较大的药物联用提供了新的设计思路。但本研究仅进行了胶束的处方工艺优化和体外释药行为的研究,仍有待后续进一步开展体内药动学与药效学分析,为其临床应用奠定基础。

#### 参考文献

[1] 张皓.熊果酸载药纳米微球的制备及其体内外抗肿瘤的效果评价[D].南京:南京医科大学,2015.

[2] 邱琳,赵修华,祖元刚,等.熊果酸纳米粒的乳化溶剂蒸发制备工艺、表征及溶出特征[J].中草药,2018,49(10):2387-2393.

[3] 高燕.抗肿瘤药多柔比星新型递送系统的研究进展[J].药物生物技术,2018,25(3):273-276.

[4] ZONG L, CHENG G, LIU S, et al. Reversal of multidrug resistance in breast cancer cells by a combination of ursolic acid with doxorubicin[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2019. DOI:10.1016/j.jpba.2018.11.057.

[5] AKASH MS, REHMAN K. Recent progress in biomedical applications of Pluronic(PF127): pharmaceutical perspectives[J]. *J Control Release*, 2015. DOI: 10.1016/j.jconrel.2015.04.032.

[6] 严兆坤.熊果酸Pluronic F127纳米胶束的制备及其对大肠癌细胞生长的影响[D].福州:福建中医药大学,2017.

[7] 郑楠楠,唐景玲,吴琳华.聚乙二醇维生素E琥珀酸酯作

为药物载体的最新进展[C]//2013中国药学会暨第十三届中国药师周论文集.南宁:中国药学会,2013:1-8.

[8] ZHANG Z, TAN S, FENG SS. Vitamin E TPGS as a molecular biomaterial for drug delivery[J]. *Biomaterials*, 2012,33(19):4889-4906.

[9] 钱薇,于兆慧,朱云泽.人参稀有皂苷Compound K混合胶束的处方优化及体外评价[J].中国药房,2016,27(28):3988-3991.

[10] BUTT AM, AMIN MC, KATAS H, et al. In vitro characterization of Pluronic F127 and D- $\alpha$ -tocopheryl polyethylene glycol 1 000 succinate mixed micelles as nanocarriers for targeted anticancer-drug delivery[J]. *J Nanomaterials*, 2012. DOI:10.1155/2012/916573.

[11] CAO N, FENG S. Doxorubicin conjugated to D- $\alpha$ -tocopheryl polyethylene glycol 1 000 succinate (TPGS): conjugation chemistry, characterization, in vitro and in vivo evaluation[J]. *Biomaterials*, 2008,29(28):3856-3865.

[12] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:368-370,374-377.

[13] YUE C, YANG Y, ZHANG C, et al. ROS-responsive mitochondria-targeting blended nanoparticles: chemo- and photodynamic synergistic therapy for lung cancer with on-demand drug release upon irradiation with a single light source[J]. *Theranostics*, 2016,6(13):2352-2366.

[14] 潘超,刘会丽,许俊鹏,等.抗肿瘤药H6聚合物胶束的制备及体外抗肿瘤作用研究[J].中国药房,2017,28(4):533-536.

[15] 黄仁杰,鄢雪梨,陈虎彪.蛇葡萄素混合纳米胶束的制备及体外评价[J].中国中药杂志,2016,41(6):1054-1058.

[16] 俞红凯.表面活性剂TPGS的合成及其在辛伐他汀微乳制剂中的应用[D].沈阳:沈阳药科大学,2005.

[17] 蒋燕平,牛丽娜,梁桂贤,等.低分子肝素-阿霉素聚合物胶束的制备及体外细胞增殖抑制作用研究[J].中国新药杂志,2019,28(2):195-201.

[18] 顾觉奋.多柔比星毒副作用机制及其防治研究进展[J].国外医药抗生素分册,2017,38(4):145-151.

[19] 汤涛,董伟,张婧,等.中药单体成分逆转肿瘤多药耐药的研究进展[J].中草药,2017,48(4):792-797,846.

[20] 张明发,沈雅琴.熊果酸和齐墩果酸的血管药理作用研究进展[J].药物评价研究,2017,40(10):1510-1519.

[21] ATTIA ABE, ONG ZY, HEDRICK JL, et al. Mixed micelles self-assembled from block copolymers for drug delivery[J]. *Cur Opin Colloid Interface Sci*, 2011, 16(3):182-194.

[22] 齐娜,刘广,廖迎,等.熊果酸脂质体的制备及体外释放特性考察[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(2):28-31.

[23] 宗蕊,王翠,郭童林,等.槲皮素Pluronic P123/Poloxamer 188混合胶束体外释放和药代动力学研究[J].中国药理学通报,2019,35(2):246-250.

(收稿日期:2019-01-18 修回日期:2019-07-26)

(编辑:张元媛)