

文章编号:1008-1542(2021)04-0389-11

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



依托泊苷纳米混合胶束的制备及其理化性质

张欣欣¹, 许洁¹, 蒋岩¹, 赵丽艳^{1,2}, 张万明^{1,2}

(1.河北北方学院药理学系,河北张家口 075000;2.河北省神经药理学重点实验室,河北张家口 075000)

摘要:为提高依托泊苷制剂的水溶性和稳定性,采用星点设计-效应面法优化依托泊苷纳米混合胶束(ETP mPEG-PLA/P123)的处方工艺。在单因素试验基础上,以投药量、mPEG-PLA 所占质量比和水化体积为自变量,以依托泊苷包封率、载药量以及粒径为因变量,进行 3 因素 5 水平的星点设计-效应面法实验,采用荧光探针法测定临界胶束浓度(CMC),并对所制备的胶束制剂进行理化性质和释放行为的评估。结果表明,ETP mPEG-PLA/P123 胶束制剂的最优处方工艺如下:mPEG-PLA 与 P123 质量比为 38:62,投药量为 5 mg,水化体积为 6 mL;采用最优处方制得的混合胶束的包封率为 87.4%,载药量为 4.19%,粒径为 115.6 nm,PDI 为 0.216,Zeta 电位为 -16.3 mV;荧光探针法测定的 CMC 值为 1.7×10^{-3} g/L,mPEG-PLA/P123 胶束稳定性良好;体外释放实验中,依托泊苷可从胶束中缓慢而持续地释放,在 48 h 内释放量可达 80%。采用优化处方制得的 ETP mPEG-PLA/P123 纳米混合胶束,能显著增加依托泊苷的溶解度,胶束制剂稳定性好,且有一定的缓释作用,可为进一步拓宽依托泊苷新型制剂的应用范围提供理论依据。

关键词:药剂学;依托泊苷;P123;胶束;UPLC;薄膜水化法;星点设计-效应面法

中图分类号:TQ460.7;R961

文献标识码:A

doi:10.7535/hbkd.2021yx04009

Preparation and evaluation of physicochemical properties of etoposide nano-mixed micelles

ZHANG Xinxin¹, XU Jie¹, JIANG Yan¹, ZHAO Liyan^{1,2}, ZHANG Wanming^{1,2}

(1. School of Pharmacy, Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei 075000, China; 2. Hebei Key Laboratory of Neuropharmacology, Zhangjiakou, Hebei 075000, China)

Abstract: In order to enhance the aqueous solubility and stability of etoposide preparation, the central composite design-response surface method was used to optimize the prescription technology of etoposide nano-mixed micelles (ETP mPEG-PLA/P123). Based on the results of single factor test, central composite design-response surface method of three factors and five levels was carried out to optimize the prescription technology with drug dosage, the mass ratio of mPEG-PLA and hydration

收稿日期:2021-04-13;修回日期:2021-05-09;责任编辑:张士莹

基金项目:国家自然科学基金(81274005);河北省教育厅高校基本科研业务费(JYT2020002);河北省卫生健康委科研基金(20180812)

第一作者简介:张欣欣(1994—),女,河北石家庄人,硕士研究生,主要从事药物分析、药剂学方面的研究。

通讯作者:张万明教授。E-mail: 429269523@qq.com

张欣欣,许洁,蒋岩,等.依托泊苷纳米混合胶束的制备及其理化性质[J].河北科技大学学报,2021,42(4):389-399.

ZHANG Xinxin, XU Jie, JIANG Yan, et al. Preparation and evaluation of physicochemical properties of etoposide nano-mixed micelles[J].

Journal of Hebei University of Science and Technology, 2021, 42(4): 389-399.

volume as independent variables, and the entrapment efficiency, drug loading and particle size as dependent variables. The critical micelle concentration (CMC) was determined by fluorescence probe method, and the physicochemical properties and release behavior of the prepared micelle preparations were evaluated. The results showed that the optimal prescription of ETP mPEG-PLA/P123 micelle preparation was that mPEG-PLA : P123 = 38 : 62, the drug dosage was 5 mg, and the hydration volume was 6 mL. After optimization, the entrapment efficiency and drug loading were 87.4% and 4.19%, the particle size was 115.6 nm, PDI was 0.216, and Zeta potential was -16.3 mV. The CMC value was 1.7×10^{-3} g/L, so mPEG-PLA/P123 micelles had high stability. In vitro release experiments, etoposide could be released from micelles slowly and continuously, up to 80% within 48 h. The optimized ETP mPEG-PLA/P123 nano-mixed micelles were able to enormously improve the aqueous solubility of etoposide, and the micelle preparation had good stability and a certain slow-release effect. The results of this study could provide theoretical guidance for further broadening the range of application of new etoposide preparations.

Keywords: pharmaceuticals; etoposide; P123; micelles; UPLC; thin film hydration method; central composite design-response surface method

鬼臼毒素是从小蘗科鬼臼属植物华鬼臼的根和茎中提取的木脂类抗肿瘤成分。由鬼臼毒素结构改造而得的衍生物依托泊苷(etoposide, ETP)作为一种临床常用化疗药物,对于肺癌、白血病、淋巴瘤、睾丸肿瘤、神经母细胞瘤等多种恶性肿瘤均有治疗作用^[1]。研究发现,依托泊苷能与拓扑异构酶II结合,形成牢固的药-酶-DNA复合物,阻碍 TopoII对DNA的修复^[2-3]。然而,依托泊苷在临床应用中存在水溶性差(153 mg/L)、易代谢失活、生物利用度低以及剂量限制性血液毒性等问题^[4-5]。此外,市售的依托泊苷注射液中添加的辅料如无水乙醇、苯乙醇、聚山梨酯80等,也可能引发机体的超敏反应^[6]。因此,构建依托泊苷新型给药系统,对增加依托泊苷的溶解性、提高其生物利用度和靶向缓释特性具有重要意义。

胶束制剂可以改变活性物质原有的药代动力学和生物分布,在提高药效、降低药物毒性方面具有独特优势^[7-11]。近年来,国内外科研人员在依托泊苷的研究中发现其胶束制剂的抗肿瘤作用明显优于依托泊苷注射液,但对胶束本身的稳定性和载药量仍有待深入研究。本研究以普朗尼克 P123 和甲氧基聚乙二醇-聚乳酸(mPEG-PLA)共同作为载体材料制备负载 ETP 的混合胶束制剂。普朗尼克 P123 是由亲水性的聚氧乙烯嵌段和疏水性的聚氧丙烯嵌段构成的两亲性共聚物,具有安全、易降解、无免疫原性、良好生物相容性^[12]、免于被肝脏和肾脏清除和高载药^[13]性能等优点。甲氧基聚乙二醇-聚乳酸中的聚乙二醇能提供胶束微粒间的空间位阻^[14],提高纳米载药体系的稳定性。聚乳酸(PLA)因水分子间的排斥作用,促使疏水链间相互吸引而缔合,为脂溶性药物提供疏水内腔,提高胶束的载药量和稳定性。

本研究采用薄膜水化法制备依托泊苷纳米混合胶束,通过单因素考察与星点设计-效应面法优化处方,建立 mPEG-PLA/P123 比例、投药量和水化体积 3 个因素对胶束包封率、载药量和粒径的函数关系,并对制备的新型胶束制剂进行粒径、电位、临界胶束浓度等理化性质的评估,以及差示扫描量热分析和释放行为考察,为进一步研究依托泊苷新型制剂的应用提供理论依据。

1 实验材料

1.1 主要仪器

ACQUITY UPLC 色谱仪, PDA 检测器, Empower3.0 化学工作站(美国 Waters 公司提供); Standby sartorius ME/SE 系列微量电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司提供); HJ-4D 数显恒温测速磁力加热搅拌器(金坛市友联仪器研究所提供); GAOKE 旋转蒸发器(巩义市英峪高科仪器厂提供); SHZ-D(III)循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司提供); DZF-6020 型真空干燥箱(宁波市江南仪器厂提供); JPCQ1028 型数控超声波清洗机(武汉嘉鹏电子科技有限公司提供); SHA-B 水浴恒温振荡器(国旺仪器公司提供); Milli-Q 纯水系统(美国 Millipore 公司提供); Lab Tech UV2100 紫外-可见分光光度计(北京莱伯泰科有限公司提供); HH-S6 数显恒温水浴锅(金坛市金南仪器制造有限公司提供); ZETASIZER Nano series 纳米粒度电位仪(英国马尔文仪器有限公司提供); HITACHI F-700 荧光光谱仪(日立公司提供); ZNCL-TS 加热套(巩义市英峪仪器公司提供); RC8CD 溶出仪, RZQ-8D 取样收集系统(天大天发公司提供); DSC1 差示扫描量热仪(瑞士梅特勒托利多公司提供)。

1.2 试药

依托泊苷(批号为 EC220094,质量分数为 98%),安耐吉化学试剂有限公司提供;P123(批号为 MKBQ0305V),Sigma 公司提供;甲氧基聚乙二醇-聚乳酸(济南岱罡生物科技有限公司提供);乙腈,色谱纯,天津市大茂化学试剂厂提供;甲醇、丙酮、无水乙醇,均为分析纯;水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 ETP mPEG-PLA/P123 的制备

采用薄膜水化法制备负载依托泊苷的 mPEG-PLA/P123 共聚物胶束。将一定量的 mPEG-PLA,P123 和 ETP 溶解于适量甲醇中,搅拌至溶解(1 000 r/min,15 min)。使用旋转真空蒸发器至甲醇完全蒸发并形成干燥药膜,之后真空干燥过夜以除去残留的有机溶剂。再加入适量超纯水,超声处理,于 50 °C 恒温振荡 1 h 后,通过 0.45 μm 滤膜过滤,除去未包封的药物和共聚物的聚集体,得到 ETP 胶束制剂。

2.2 色谱条件

Waters BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm,1.7 μm),检测波长为 284 nm(ETP),流动相为乙腈/水(二者体积比为 50:50),体积流量为 0.3 mL/min,柱温为 35 °C,进样量为 1 μL。

2.2.1 专属性试验

以“2.2”项下色谱条件分别对 mPEG-PLA/P123 空白胶束溶液和 ETP mPEG-PLA/P123 载药胶束溶液进样。结果如图 1 所示,在 284 nm 波长下,辅料对依托泊苷的含量测定无干扰。

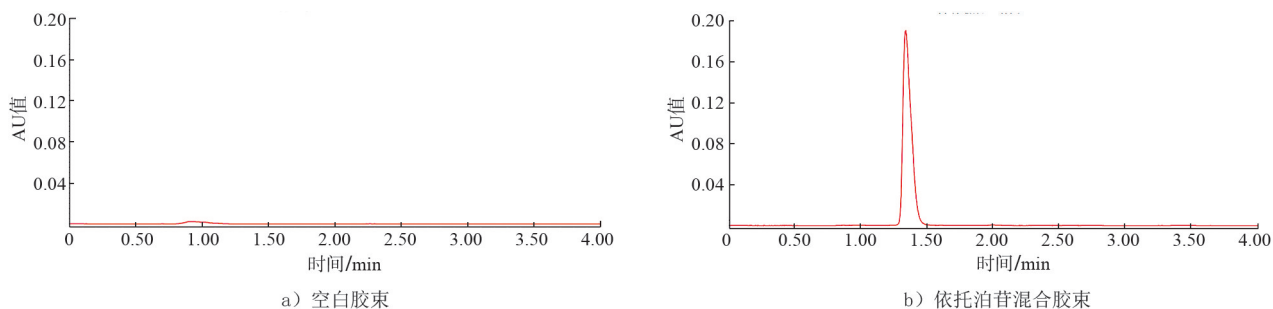


图 1 依托泊苷纳米混合胶束的 UPLC 色谱图

Fig. 1 UPLC chromatograms of etoposide loaded nano-mixed micelles

2.2.2 线性关系考察

精密称取 10 mg 依托泊苷,放入 10 mL 容量瓶中,乙腈定容,制得质量浓度为 1 000 μg/mL 的依托泊苷储备液。将质量浓度依次稀释至 80,40,20,10,5 μg/mL,进样。以样品质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标作图,得到线性回归方程为 $y=2.0299x+2.109$, $R^2=0.9999$ 。在 5~80 μg/mL 范围内,依托泊苷的线性关系良好。

2.3 ETP 载药量和包封率的测定

精密吸取 0.2 mL ETP mPEG-PLA/P123 胶束溶液,放入 10 mL 容量瓶中,用乙腈稀释至刻度,摇匀,即为所得供试品溶液。按“2.2”项下色谱条件进样,将所得峰面积带入线性方程,根据稀释倍数计算 ETP mPEG-PLA/P123 胶束溶液中 ETP 的含量。

$$\text{ETP 载药量} = \frac{\text{胶束中 ETP 含量}}{\text{胶束中 ETP 含量} + \text{载体材料总量}} \times 100\%$$

$$\text{ETP 包封率} = \frac{\text{胶束中 ETP 含量}}{\text{ETP 的投药量}} \times 100\%$$

2.4 单因素考察

2.4.1 投药量

固定载体材料 mPEG-PLA 和 P123 各 50 mg,有机溶剂为甲醇,水化体积 4 mL,其他条件与 2.1 项下一致,考察投药量为 2,4,6,8,10 mg 时对胶束包封率、载药量和粒径的影响,结果见表 1。

由表1可知,随着投药量的增加,包封率和粒径均呈下降趋势,载药量则先升高后降低。故对投药量项进行后续星点设计-效应面法分析。

2.4.2 mPEG-PLA 所占质量比

固定载体材料(mPEG-PLA 与 P123)总量为 100 mg,投药量为 4 mg,其他条件不变,考察 mPEG-PLA 占载体材料总量为 0.2,0.3,0.5,0.7 和 0.8 时,对胶束包封率、载药量和粒径的影响,结果见表 2。

表 2 mPEG-PLA 占比对包封率、载药量和粒径的影响

Tab.2 Effect of the proportion of mPEG-PLA on encapsulation efficiency, drug loading and size

mPEG-PLA 占比	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
0.2	92.8	3.58	93.17
0.3	90.6	3.50	109.90
0.5	82.5	3.19	116.00
0.7	88.9	3.43	117.70
0.8	78.0	3.02	109.00

由表 2 可知,随着 mPEG-PLA 占比的增加,包封率和载药量先降再升,而粒径呈现先升后降的趋势。因此,将 mPEG-PLA 与 P123 的比例作为后续处方优化考察因素之一。

2.4.3 有机溶剂种类

固定载体材料 $m(\text{mPEG-PLA}) : m(\text{P123}) = 3 : 7$ (30 mg : 70 mg),投药量为 4 mg,其他条件不变,考察有机溶剂分别为甲醇、乙腈和丙酮时对胶束包封率、载药量和粒径的影响,结果见表 3。

表 3 有机溶剂种类对包封率、载药量和粒径的影响

Tab.3 Effect of the types of organic solvent on encapsulation efficiency, drug loading and size

有机溶剂种类	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
丙酮	86.1	3.33	115.70
甲醇	90.3	3.49	118.00
乙腈	87.2	3.37	117.20

由表 3 可知,有机溶剂的改变,对包封率、载药量和粒径均无显著影响。由于丙酮挥发性和毒性较强,乙腈沸点较高,故本实验选取甲醇作为有机溶剂。

2.4.4 超声时间

固定载体材料 $m(\text{mPEG-PLA}) : m(\text{P123}) = 3 : 7$ (30 mg : 70 mg),投药量为 4 mg,有机溶剂为甲醇,其他条件不变,考察超声时间为 5,10,20,30,60 min 时,对胶束包封率、载药量和粒径的影响,结果见表 4。

表 4 超声时间对包封率、载药量和粒径的影响

Tab.4 Effect of ultrasonic time on encapsulation efficiency, drug loading and size

超声时间/min	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
5	85.6	3.31	121.70
10	86.1	3.33	115.20
20	88.5	3.42	117.60
30	85.4	3.30	117.30
60	87.1	3.37	114.50

由表 4 可知,随着超声时间的增加,仅粒径略有下降,当超声时间达到 10 min 后,粒径基本不变。故选取 10 min 为本实验的超声时间。

2.4.5 水化体积

固定载体材料 $m(\text{mPEG-PLA}) : m(\text{P123}) = 3 : 7$ (30 mg : 70 mg),投药量为 4 mg,有机溶剂为甲醇,

表 1 投药量对包封率、载药量和粒径的影响

Tab.1 Effect of dosage on encapsulation efficiency, drug loading and size

投药量/mg	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
2	95.1	1.87	122.30
4	93.5	3.61	118.00
6	82.9	4.74	114.40
8	65.2	4.96	103.60
10	35.7	3.45	93.61

超声时间为 10 min,其他条件不变,考察水化体积为 2,4,6,8,10 mL 时,对胶束包封率、载药量和粒径的影响,结果见表 5。

表 5 水化体积对包封率、载药量和粒径的影响

Tab.5 Effect of the volume of water on encapsulation efficiency, drug loading and size

水化体积/mL	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
2	86.5	3.34	127.60
4	93.3	3.60	119.00
6	90.2	3.48	108.50
8	88.5	3.42	102.50
10	81.3	3.15	87.50

由表 5 可知,随着水化体积的增加,会导致胶束粒径减小,而包封率和载药量则呈先升后降的趋势。因此,将水化体积作为后续处方优化考察因素之一。

2.5 星点设计-效应面法优化处方

在单因素考察基础上,通过星点设计-效应面法优化 ETP mPEG-PLA/P123 胶束。以投药量(X_1)、mPEG-PLA 占比(X_2)和水化体积(X_3)作为 3 个自变量,建立对依托泊苷纳米胶束包封率(Y_1)、载药量(Y_2)和粒径(Y_3)的函数关系。利用 Design Expert 10 (32-bit) 软件进行 3 因素 5 水平的 CCD 中心组合实验设计,各因素的取值范围如下:投药量 2~10 mg, mPEG-PLA 占比 0.3~0.7,水相体积 2~10 mL。各水平取值见表 6,实验安排及结果见表 7。

表 6 星点设计的因素和水平

Tab.6 Factor and level for central composite design

因素	编码	水平				
		-1.682	-1	0	1	1.682
投药量/mg	X_1	2.00	3.62	6.00	8.38	10.00
mPEG-PLA 占比	X_2	0.30	0.38	0.50	0.62	0.70
水化体积/mL	X_3	2.00	3.62	6.00	8.38	10.00

表 7 星点设计的结果

Tab.7 Results of central composite design

试验号	X_1 /mg	X_2	X_3 /mL	Y_1 /%	Y_2 /%	Y_3 /nm
1	6.00(0)	0.30(-1.682)	6.00(0)	84.00	4.78	108.90
2	10.00(+1.682)	0.50(0)	6.00(0)	36.10	3.49	114.10
3	6.00(0)	0.50(0)	6.00(0)	69.50	4.00	116.20
4	6.00(0)	0.50(0)	10.00(+1.682)	61.30	3.55	87.61
5	8.00(+1)	0.62(+1)	8.38(+1)	35.20	2.87	102.30
6	6.00(0)	0.50(0)	6.00(0)	71.50	4.11	110.70
7	6.00(0)	0.50(0)	6.00(0)	73.20	4.21	116.90
8	2.00(-1.682)	0.50(0)	6.00(0)	91.00	1.79	123.60
9	6.00(0)	0.70(+1.682)	6.00(0)	81.00	4.63	121.20
10	6.00(0)	0.50(0)	6.00(0)	71.20	4.10	114.70
11	8.38(+1)	0.38(-1)	3.62(-1)	31.40	2.57	105.50
12	6.00(0)	0.50(0)	6.00(0)	68.90	3.97	117.10
13	8.38(+1)	0.62(+1)	3.62(-1)	28.40	2.32	112.50
14	8.38(+1)	0.38(-1)	8.38(+1)	45.80	3.70	112.40
15	3.62(-1)	0.38(-1)	8.38(+1)	93.60	3.28	96.51
16	3.62(-1)	0.62(+1)	3.62(-1)	92.00	3.22	124.40
17	3.62(-1)	0.62(+1)	8.38(+1)	84.00	2.95	117.70
18	3.62(-1)	0.38(-1)	3.62(-1)	94.50	3.31	119.40
19	6.00(0)	0.50(0)	6.00(0)	76.40	4.38	115.90
20	6.00(0)	0.50(0)	2.00(-1.682)	60.40	3.50	109.50

根据 Design Expert 10 (32-bit) 软件对各因素及指标进行多元线性及二项式拟合,确定最优处方参数。统计结果显示,二次多项式回归模型是描述各因素与指标关系的最佳模型,数学模型如下:

$$Y_1 = 71.78 - 22.98X_1 - 2.98X_2 + 0.39X_3 + 0.25X_1X_2 + 2.70X_1X_3 - 0.90X_2X_3 - 4.78X_1^2 + 2.43X_2^2 - 3.88X_3^2 (r^2 = 0.9800, P < 0.01);$$

$$Y_2 = 4.13 + 0.11X_1 - 0.16X_2 + 0.06X_3 - 0.05X_1X_2 + 0.16X_1X_3 - 0.03X_2X_3 - 0.73X_1^2 + 0.10X_2^2 - 0.24X_3^2 (r^2 = 0.9693, P < 0.01);$$

$$Y_3 = 116.80 - 7.01X_1 + 2.07X_2 + 3.04X_3 + 0.77X_1X_2 - 0.45X_1X_3 - 0.45X_2X_3 + 2.17X_1^2 - 0.41X_2^2 + 0.21X_3^2 (r^2 = 0.8842, P < 0.01)。$$

方差分析见表8—表10。

表8 ETP 包封率回归模型方差分析

Tab.8 Variance analysis for regression model on entrapment efficiency of ETP

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	8 040.44	9	893.38	54.38	<0.000 1
X ₁	7 210.45	1	7 210.45	438.92	<0.000 1
X ₂	120.21	1	120.21	7.32	0.022 1
X ₃	2.07	1	2.07	0.13	0.730 1
X ₁ X ₂	0.50	1	0.50	0.03	0.865 0
X ₁ X ₃	58.32	1	58.32	3.55	0.088 9
X ₂ X ₃	6.48	1	6.48	0.39	0.544 0
X ₁ ²	328.68	1	328.68	20.01	0.001 2
X ₂ ²	82.76	1	82.76	5.04	0.048 6
X ₃ ²	216.22	1	216.22	13.16	0.004 6
残差	164.28	10	16.43		
失拟项	127.01	5	25.40	3.41	0.102 3
纯误差	37.27	5	7.45		
总和	8 204.72	19			

表9 ETP 载药量回归模型方差分析

Tab.9 Variance analysis for regression model on loading capacity of ETP

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	9.330	9	1.040	35.10	<0.000 1
X ₁	0.150	1	0.150	5.10	0.047 6
X ₂	0.350	1	0.350	11.94	0.006 2
X ₃	0.045	1	0.045	1.52	0.245 1
X ₁ X ₂	0.018	1	0.018	0.61	0.452 5
X ₁ X ₃	0.210	1	0.210	7.15	0.023 3
X ₂ X ₃	0.007	1	0.007	0.24	0.632 1
X ₁ ²	7.630	1	7.630	258.33	<0.000 1
X ₂ ²	0.150	1	0.150	5.07	0.048 0
X ₃ ²	0.830	1	0.830	27.96	0.000 4
残差	0.300	10	0.030		
失拟项	0.180	5	0.037	1.62	0.304 5
纯误差	0.110	5	0.023		
总和	9.630	19			

表 10 ETP 胶束粒径回归模型方差分析

Tab.10 Variance analysis for regression model on micelles size of ETP

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	937.63	9	104.18	8.480	0.001 3
X_1	671.42	1	671.42	54.660	<0.000 1
X_2	58.25	1	58.25	4.740	0.054 5
X_3	126.41	1	126.41	10.290	0.009 4
X_1X_2	4.80	1	4.80	0.390	0.545 7
X_1X_3	1.62	1	1.62	0.130	0.724 0
X_2X_3	1.62	1	1.62	0.130	0.724 0
X_1^2	67.97	1	67.97	5.530	0.040 5
X_2^2	2.41	1	2.41	0.200	0.667 3
X_3^2	0.62	1	0.62	0.051	0.826 2
残差	122.83	10	12.28		
失拟项	101.10	5	20.22	4.650	0.058 5
纯误差	21.73	5	4.35		
总和	1 060.47	19			

由表 8—表 10 可知,各模型 $P < 0.000 1$,表明以上二次多项式方程的显著性极高,也显示了独立变量 X_1, X_2 和 X_3 对因变量 Y_1, Y_2 和 Y_3 的影响;失拟项均大于 0.05,说明各回归方程与其实验结果拟合度良好,使用二项式数学模型预测的实验数据结果可取。

根据二项式拟合方程绘制因素对各指标影响趋势的三维效应面与等高线图,描述各独立变量(投药量、mPEG-PLA 占比、水化体积)对因变量(包封率、载药量和粒径)响应的影响,结果如图 2 所示。

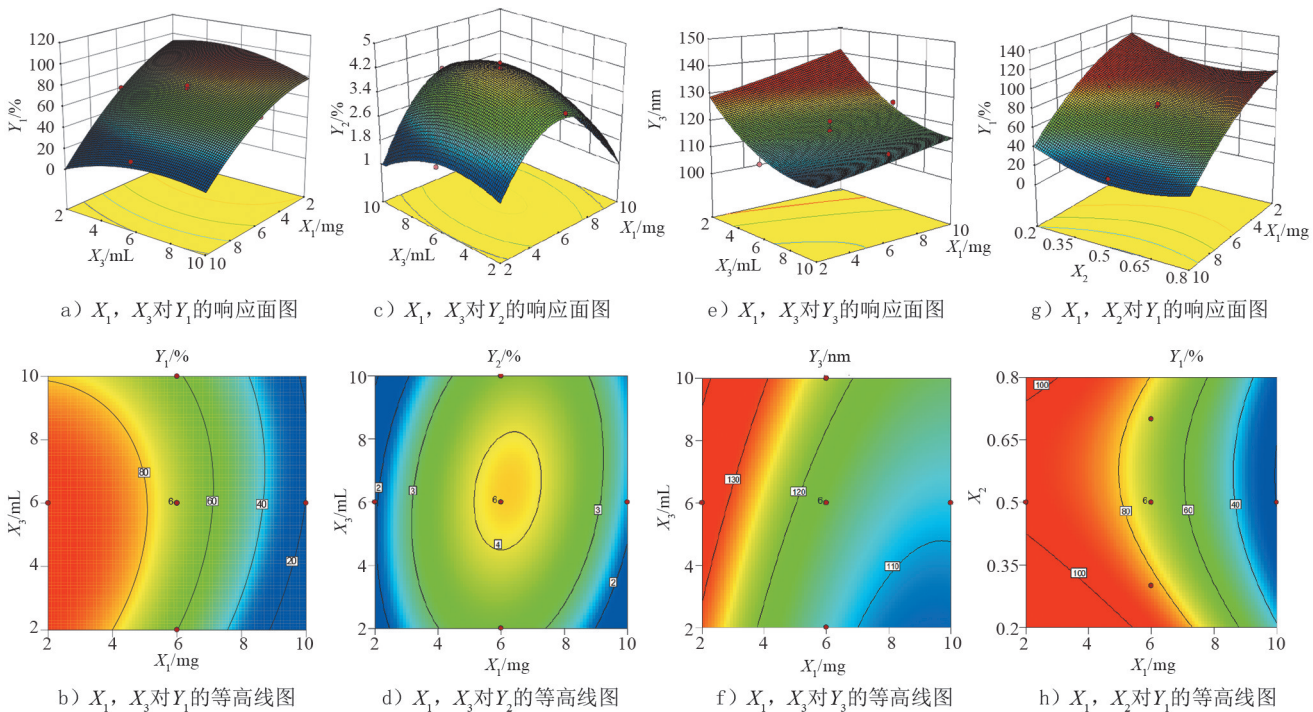


图 2 因素对考察指标的响应面图和等高线图

Fig. 2 Effects of factors on response surface and contour plots of each evaluation index

2.6 最优处方的验证试验

为获得最大的包封率、载药量及最小粒径,使用 Design-Expert 软件评估了独立变量对响应影响的显著性,使用响应面图确定了制备胶束的最佳条件。最优处方: $m(\text{mPEG-PLA}) : m(\text{P123}) = 38 : 62$,投药量为

5 mg,水化体积为 6 mL。预测此条件下胶束的包封率为 86.05%,载药量为 4.21%,粒径为 118.05 nm。根据最佳条件将预测值与最新制备的 3 批 ETP mPEG-PLA/P123 胶束的实验值进行比较,以证明该模型的适用性,结果见表 11。

表 11 最优处方验证结果

Tab.11 Verification of optimized formulation

样品	包封率/%	载药量/%	ETP 质量浓度/(mg·mL ⁻¹)	粒径 d/nm
1	89.00	4.26	0.742	116.8
2	85.80	4.12	0.716	114.6
3	87.40	4.19	0.728	118.3
平均值	87.40	4.19	0.729	116.6
RSD 值/%	1.77	1.67	1.790	1.6

由表 11 可知,该胶束实际的平均包封率为 87.4%,平均载药量为 4.19%,粒径为 116.6 nm,该方法的实验值与预测值的绝对值均小于 5%。结果表明,该数学模型预测的实验数据结果可取。

3 ETP mPEG-PLA/P123 混合胶束制剂理化性质

3.1 胶束粒径及 Zeta 电位

利用 Zetasizer 粒度仪测定 ETP mPEG-PLA/P123 胶束的粒径和 Zeta 电位。将 2.1 项下胶束溶液用超纯水适当稀释,滤膜过滤,测定其电位和粒径(d),结果见图 3 和图 4。

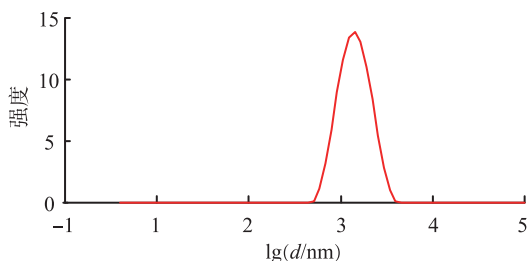


图 3 依托泊苷胶束粒径分布

Fig. 3 Particle sizes distribution of micelle

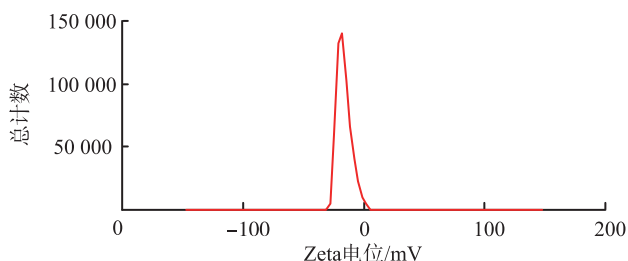


图 4 依托泊苷胶束 Zeta 电位分布

Fig. 4 Zeta potential of micelle

由图 3 和图 4 可知,ETP mPEG-PLA/P123 胶束粒径分布均一,平均粒径为 115.6 nm,PDI 为 0.216,Zeta 电位为 -16.3 mV。

3.2 临界胶束浓度

在室温下,使用芘作为荧光探针,通过荧光分光光度计,测定 mPEG-PLA/P123 混合胶束的临界胶束浓度(CMC)。将适量芘溶解在丙酮中,然后分别加入到 9 个 10 mL 容量瓶中,并在氮气下蒸发丙酮。将以超纯水稀释的质量浓度分别为 6.4×10^{-3} , 3.2×10^{-2} , 1.6×10^{-3} , 8×10^{-3} , 4×10^{-4} , 2×10^{-5} , 1×10^{-6} , 5×10^{-6} , 2.5×10^{-7} $\mu\text{g/mL}$ 的空白胶束溶液加入上述容量瓶中,稀释至刻度,使混合胶束溶液中芘的最终浓度保持在 5×10^{-7} mol/L。将所得溶液于 45 °C 恒温振荡 2 h,冷却到室温过夜平衡。采用荧光分光光度计测定各浓度溶液中芘的荧光激发光谱,发射波长为 390 nm,激发波长的范围为 300~360 nm,发射波长和激发波长的狭缝宽度均为 5 nm,记录 337.2 nm 和 334.8 nm 处的荧光强度 $I_{337.2}$ 和 $I_{334.8}$ 。以 $I_{337.2}$ 和 $I_{334.8}$ 的强度比与聚合物浓度(c)的对数作图,CMC 值为拐点处曲线的切线与低浓度点上水平切线的交点,结果见图 5。由图 5 可知,mPEG-PLA/P123 空白胶束的 CMC 为 2.5×10^{-3} g/L,该临界胶束质量浓

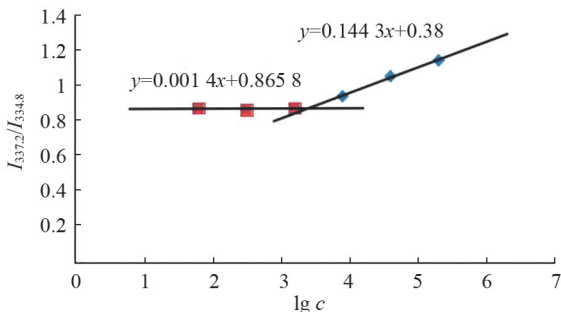


图 5 mPEG-PLA/P123 的 CMC 曲线

Fig.5 CMC curve of mPEG-PLA/P123

度与 mPEG-PLA(1.7×10^{-3} g/L)相近,低于 P123(CMC 为 5×10^{-2} g/L)。因此,在体内稀释条件下, mPEG-PLA/P123 混合胶束具有更高的稳定性和保证胶束完整性的能力。

3.3 热性能

采用差示扫描量热仪测定天然依托泊苷、mPEG-PLA/P123 空白胶束、依托泊苷和 mPEG-PLA/P123 的物理混合物以及 ETP mPEG-PLA/P123 载药胶束的热性能,以空标准铝坩埚为空白对照。温度扫描设定为 $40 \sim 200$ °C,速度为 20 °C/min,结果见图 6。图 6 中,a—d 分别为天然依托泊苷、mPEG-PLA/P123 空白胶束、ETP mPEG-PLA/P123 载药胶束以及依托泊苷和 mPEG-PLA/P123 的物理混合物的热分析图。

由图 6 可知,天然依托泊苷在 189 °C 时出现放热峰,此为依托泊苷的特征峰;在空白胶束中, 58 °C 处出现一个放热峰,当其与依托泊苷物理混合后,在 58 °C 和 185 °C 处出现两者的叠加峰,说明依托泊苷以晶体形式存在;在载药胶束中,未发现依托泊苷的特征峰,表明胶束内部的依托泊苷可能处于分散的无定形或无序结晶相形式。

3.4 体外释放行为

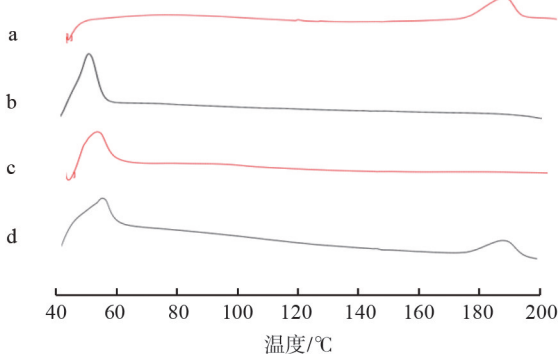
采用动态透析袋法研究依托泊苷在不同制剂中的体外释放行为。将依托泊苷注射液、依托泊苷原料药溶液以及负载依托泊苷的胶束溶液置于透析袋(截留 $M_w = 3\ 500$)中,然后放入 200 mL 释放介质(含有 0.5% 十二烷基硫酸钠的磷酸盐缓冲溶液)中,恒温保持在 (37 ± 0.5) °C,并以 100 r/min 搅拌。分别于 $1, 3, 5, 7, 9, 12, 24, 36, 48$ h 时收集样品 2 mL,并以同等体积空白释放介质替换,最后通过 UPLC 测定释放的 ETP 浓度,计算累计释放率。释放曲线如图 7 所示。

由图 7 可以看出,在 $1 \sim 5$ h 内,依托泊苷注射液和原料药溶液释放速率较快,在 7 h 已达到释放末期,累计释放率均在 80% 以上;与之相比,依托泊苷胶束溶液释放缓慢,此时释放率仅为 30% 左右;当释放时间为 48 h 时,胶束制剂中依托泊苷的最大释放率达到 82% ,因此 ETP mPEG-PLA/P123 胶束制剂符合缓释制剂的特点。

4 结论

1) 临界胶束浓度(CMC)是衡量两亲性聚合物胶束性能的主要指标之一,反映了胶束制剂的稀释稳定性。CMC 值越小,形成胶束的聚合物所需浓度越低,胶束的结构也更稳定。一般而言,与混合胶束相比,单一聚合物形成的胶束受其链段限制,常出现载药量较低和稳定性较差等问题。本实验成功制备了以 P123 和 mPEG-PLA 为载体的依托泊苷纳米混合胶束。普朗尼克 P123 是一种结构简单、安全性高的多功能药用辅料,以 P123 自组装形成的胶束,具有较高的包封率和载药量^[15],但其稳定性较差,且随保存时间的延长,粒径变大、PDI 增加。而 mPEG-PLA 的加入显著增强了该胶束的稳定性^[16]。实验结果表明,该混合胶束的临界胶束质量浓度(2.5×10^{-3} g/L)与 mPEG-PLA(1.7×10^{-3} g/L)相近,低于 P123(CMC 为 5×10^{-2} g/L),表明与 P123 相比,mPEG-PLA/P123 混合胶束具有更高的自身稳定性、完整性和抗稀释能力。

2) 载药胶束制剂的释放采用动态透析袋法。为满足漏槽条件,选择磷酸盐缓冲液(pH 值为 $7.4, 0.5\%$ 十



a—天然依托泊苷; b—mPEG-PLA/P123 空白胶束;
c—ETP mPEG-PLA/P123 载药胶束;
d—依托泊苷和 mPEG-PLA/P123 的物理混合物。

图 6 DSC 图

Fig.6 Diagram of DSC

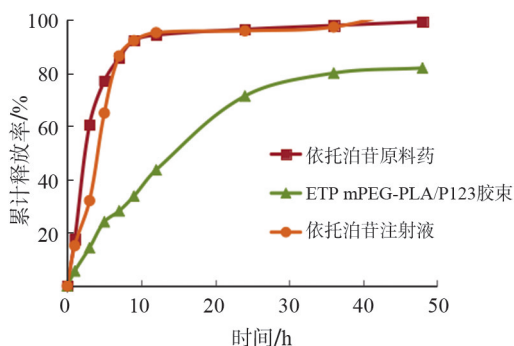


图 7 依托泊苷的体外释放行为

Fig.7 Release behavior of ETP

二烷基硫酸钠)为释放介质考察依托泊苷聚合物胶束的体外释放特性。由于依托泊苷在 PBS 水溶液中的溶解度极低,为了使释放介质中药物浓度远低于其饱和浓度^[17](即维持漏槽条件),采用添加表面活性剂的方法提高药物的溶解度。药物释放实验中常用的释放介质包括磷酸盐(PBS)缓冲溶液^[18-19]、含 Tween 80 的 PBS 溶液^[20-21]以及含十二烷基硫酸钠(SDS)的 PBS 溶液^[22]等。实验结果表明,依托泊苷在以上 3 种释放介质中的溶解度分别为 0.36, 1, 2.5 mg/mL。本实验选用含 SDS 的磷酸盐缓冲溶液研究疏水药物依托泊苷的释放行为。相较于传统制剂,ETP mPEG-PLA/P123 胶束在 7 h 内的释放率仅为 30%。因此,该胶束制剂具有显著的缓释作用,可延长依托泊苷的血液循环时间,维持血药浓度,增加药物在肿瘤细胞中的累积率。

3)本研究以 P123 和 mPEG-PLA 共同作为载体材料,采用薄膜水化法制备了负载 ETP 的纳米混合胶束制剂,通过单因素考察与星点设计-效应面法优化处方,对制备的新型胶束制剂进行了理化性质评估。研究表明,以 mPEG-PLA/P123 为载体材料制备的 ETP 胶束制剂,在水溶性、安全性、缓释性、稳定性和载药量等方面均具有显著优势,是一种极具应用前景的纳米制剂。

今后,关于 ETP mPEG-PLA/P123 纳米胶束制剂的药代动力学、组织分布以及抗肿瘤活性与机制方面还有待作进一步的研究。

参考文献/References:

- [1] MARTIN B, SEGUIN J, ANNÉREAU M, et al. Preparation of parenteral nanocrystal suspensions of etoposide from the excipient free dry state of the drug to enhance in vivo antitumoral properties[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 18059.
- [2] YIN X L, HAN L Q, MU S J, et al. Preparation and evaluation of etoposide-loaded lipid-based nanosuspensions for high-dose treatment of lymphoma[J]. *Nanomedicine*, 2019, 14(11): 1403-1427.
- [3] ZAREKAZEMABADI F, HEYDARINASAB A, AKBARZADEH A, et al. Preparation, characterization and in vitro evaluation of PEG-ylated nanoliposomal containing etoposide on lung cancer[J]. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 2019, 47(1): 3222-3230.
- [4] WANG Y, WANG S H, XU Y J, et al. Etoposide amorphous nanopowder for improved oral bioavailability: Formulation development, optimization, in vitro and in vivo evaluation[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2020, 15: 7601-7613.
- [5] WANG Z J, LIANG P, HE X L, et al. Etoposide loaded layered double hydroxide nanoparticles reversing chemoresistance and eradicating human glioma stem cells in vitro and in vivo[J]. *Nanoscale*, 2018, 10(27): 13106-13121.
- [6] ARUMUGAM S P, BALAKRISHNAN S B, GANESAN V, et al. In-vitro dissolution and microbial inhibition studies on anticancer drug etoposide with β -cyclodextrin[J]. *Materials Science and Engineering: C*, 2019, 102: 96-105.
- [7] BAI J N, TIAN Y, LIU F Z, et al. Octreotide-conjugated core-cross-linked micelles with pH/redox responsivity loaded with etoposide for neuroendocrine neoplasms therapy and bioimaging with photoquenching resistance[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2019, 11(20): 18111-18122.
- [8] HE Y H, WU C, DUAN J Y, et al. Anti-glioma effect with targeting therapy using folate modified nano-micelles delivery curcumin[J]. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 2020, 16(1): 1-13.
- [9] FARES A R, ELMESHAD A N, KASSEM M A A. Enhancement of dissolution and oral bioavailability of lacidipine via pluronic P123/F127 mixed polymeric micelles: Formulation, optimization using central composite design and in vivo bioavailability study[J]. *Drug Delivery*, 2018, 25(1): 132-142.
- [10] 解方园, 陈俊, 李英, 等. 载阿霉素的 TPGS-聚乙二醇-神经酰胺混合胶束对乳腺癌细胞多药耐药的逆转作用[J]. *中国新药杂志*, 2019, 28(14): 1766-1770.
XIE Fangyuan, CHEN Jun, LI Ying, et al. Reverse effect of doxorubicin-loaded TPGS-polyethylene glycol-ceramide micelles on multidrug resistance in breast cancer[J]. *Chinese Journal of New Drugs*, 2019, 28(14): 1766-1770.
- [11] BAIDYA D, KUSHWAHA J, MAHADIK K, et al. Chrysin-loaded folate conjugated PF127-F68 mixed micelles with enhanced oral bioavailability and anticancer activity against human breast cancer cells[J]. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2019, 45(5): 852-860.
- [12] 梁宇飞, 张欣欣, 许洁, 等. 星点设计-效应面法优化姜黄素-胡椒碱聚合物复方胶束的处方工艺研究[J]. *中草药*, 2020, 51(1): 43-50.
LIANG Yufei, ZHANG Xinxin, XU Jie, et al. Optimization of prescription process of curcumin-piperine polymeric micelles by central composite design-response surface method[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2020, 51(1): 43-50.
- [13] 赵炎军, 王建平, 吴凡, 等. 黄芩苷 PEG-PLGA 纳米胶束的制备、表征及在急性心肌缺血模型大鼠体内的组织分布[J]. *中草药*, 2018, 49

(18):4269-4276.

ZHAO Yanjun, WANG Jianping, WU Fan, et al. Preparation and characterization of baicalin PEG-PLGA nanomicelles and tissue distribution in rats with acute myocardial ischemia[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2018, 49(18): 4269-4276.

- [14] SHUAI Q, CAI Y, ZHAO G K, et al. Cell-penetrating peptide modified PEG-PLA micelles for efficient PTX delivery[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(5): 1856-1863.
- [15] 段玉伟. 姜黄素 PEG-PLA/TPGS 口服胶束制剂的研究[D]. 济南: 山东大学, 2016.
DUAN Yuwei. Studies on Curcumin-loaded PEG-PLA/TPGS Micelles for Oral Administration[D]. Jinan: Shandong University, 2016.
- [16] CHEN L J, TAN L W, ZHANG X N, et al. Which polymer is more suitable for etoposide; a comparison between two kinds of drug loaded polymeric micelles in vitro and in vivo? [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2015, 495(1): 265-275.
- [17] XIANG J J, WU B H, ZHOU Z X, et al. Synthesis and evaluation of a paclitaxel-binding polymeric micelle for efficient breast cancer therapy[J]. Science China Life Sciences, 2018, 61(4): 436-447.
- [18] 谢英花, 刘朝霞, 张梅梅, 等. 盐酸二甲双胍 pH 敏感性水凝胶微球的制备[J]. 河北科技大学学报, 2021, 42(1): 60-66.
XIE Yinghua, LIU Chaoxia, ZHANG Meimei, et al. Preparation of metformin hydrochloride loaded pH-sensitive hydrogel microspheres[J]. Journal of Hebei University of Science and Technology, 2021, 42(1): 60-66.
- [19] PARK C W, LEE H J, OH D W, et al. Preparation and in vitro/in vivo evaluation of PLGA microspheres containing norquetiapine for long-acting injection[J]. Drug Design Development and Therapy, 2018, 12: 711-719.
- [20] ABOUD H M, MAHMOUD M O, ABDELTAWAB M M, et al. Preparation and appraisal of self-assembled valsartan-loaded amalgamated Pluronic F127/Tween 80 polymeric micelles; Boosted cardioprotection via regulation of Mhrt/Nrf2 and Trx1 pathways in cisplatin-induced cardiotoxicity[J]. Journal of Drug Targeting, 2020, 28(3): 282-299.
- [21] XI Y H, JIANG T W, YU Y L, et al. Dual targeting curcumin loaded alendronate-hyaluronan- octadecanoic acid micelles for improving osteosarcoma therapy[J]. International Journal of Nanomedicine, 2019, 14: 6425-6437.
- [22] GU M J, LU L D, WEI Q X, et al. Improved oral bioavailability and anti-chronic renal failure activity of chrysophanol via mixed polymeric micelles[J]. Journal of Microencapsulation, 2021, 38(1): 47-60.