

恩诺沙星聚合物胶束的制备及体外释放

杜向党¹, 连明香¹, 陈玉霞¹, 刘建华¹, 赵永星^{2*} (1. 河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002;
2. 郑州大学 药学院, 河南 郑州 450001)

摘要:通过比较3种不同质量比的两嵌段共聚物制备的聚合物胶束, 优化恩诺沙星聚合物胶束的制备工艺, 并考察该胶束的理化性质和体外释药特性。以自乳化溶剂挥发法制备恩诺沙星聚合物胶束, 并采用单因素法优化处方; HPLC法测定其载药量、包封率、体外释药特性, 激光粒度仪测定其粒径及分布, 红外分光光度法(IR)确证含药胶束特征。结果显示, 采用PLA16000-mPEG2000(聚乳酸-聚乙二醇单甲醚)共聚物为载体, 以丙酮为有机溶剂, 所制备胶束平均粒径为(117.2±8.2) nm, 载药量为(3.3±0.17)%, 包封率为(32.3±1.70)%; 相对于另外2种材料制备的胶束有较好的载药量, 且IR确证药物已被包封在胶束中。恩诺沙星胶束体外释药试验表明其具有一定的缓释特性。

关键词: 恩诺沙星; 聚乳酸-聚乙二醇单甲醚; 聚合物胶束; 体外释放

中图分类号: S859.7 文献标志码: A 文章编号: 1005-4545(2012)03-0432-05

Preparation and *in vitro* release of enrofloxacin-polymeric micelles

DU Xiang-dang¹, LIAN Ming-xiang¹, CHEN Yu-xia¹, LIU Jian-hua¹, ZHAO Yong-xing^{2*}

(1. College of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; 2. College of Pharmaceutical Science, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: To optimize the preparation method of the enrofloxacin-polymeric micelles by comparing with three different proportionality of *D,L*-lactide and mPEG, and investigate its properties and release behavior *in vitro*. The enrofloxacin-polymeric micelles were prepared by modified spontaneous emulsification solvent diffusion method. The method by examining the single factor was used to optimize the preparation procedure. The drug loading and encapsulation were determined by HPLC. The mean diameter and distribution of the particle size were also assayed. The formulation of drug loading micelles was confirmed by IR. The results showed that the micelles were prepared with the polymer with the proportion of PLA16000-mPEG2000 as carrier, acetone as organic solvent, which had the better drug loading. The mean diameter was (117.2±8.2) nm, and drug loading as well as the encapsulation efficiency were (3.3±0.17)% and (32.3±1.7)%, respectively. Enrofloxacin was found to be encapsulated in the micelles. *In vitro*, enrofloxacin could be released sustainably from the micelles.

Key words: enrofloxacin; PLA-mPEG; polymer micelles; *in vitro* release

* Corresponding author, E-mail: zhaoyx@zzu.edu.cn

氟喹诺酮类药物是一类新型的化学合成抗菌药, 具有抗菌谱广、杀菌活性强、血药浓度高等特点^[1]。恩诺沙星作为第1个动物专用的氟喹诺酮药物^[2], 现已广泛应用于兽医临床。恩诺沙星在防制动物大肠杆菌、巴氏杆菌、嗜血杆菌、霉形体感染等引起的疾病方面取得良好效果^[3]。恩诺沙星为黄色

或淡橙黄色结晶性粉末, 无臭, 味微苦, 极微溶于水。目前, 国内外常见的恩诺沙星剂型主要有混悬剂、纳米粒、微球等, 但尚未见恩诺沙星胶束的报道。

聚乳酸(PLA)是生物可降解材料, 其最终代谢产物为二氧化碳和水, 中间代谢产物乳酸也是体内正常代谢产物, 不会在体内蓄积^[4]。亲水段的聚乙二醇(PEG)具有易溶于水、链易流动和低毒性的优点, 可达到长循环的效果。由亲水段PEG和疏水段PLA键合在一起所合成的两嵌段共聚物既有亲水性又有疏水性, 可以作为药物的载体材料。以上述两嵌段共聚物为药物载体, 采用自乳化溶剂挥发法

收稿日期: 2011-01-14

基金项目: 河南省高等学校青年骨干教师资助计划

作者简介: 杜向党(1977-), 男, 副教授, 博士。

* 通讯作者, E-mail: zhaoyx@zzu.edu.cn

可制得恩诺沙星聚合物胶束^[5-6]。本试验通过比较以3种不同比例的两嵌段共聚物为载体制得的胶束,从而选出一种较好的共聚物,旨在提高恩诺沙星在水中的溶解度,提高药物的缓释作用和生物利用度,并降低因大量使用表面活性剂而带来的不良反应。

1 材料与方法

1.1 材料 恩诺沙星(河南碧云天动物药业公司提供); MPEG2000-PLA3000、MPEG2000-PLA16000、MPEG2000-PLA30000(山东岱罡生物科技有限公司);离心超滤管(0.5 mL, YM-50)(美国 MILLIPORE 公司);透析袋 MD44(8000-14000)(美国联合碳化公司)。

1.2 仪器设备 88-1 型定时恒温磁力搅拌器(上海司乐仪器有限公司); Nano-ZS90 激光纳米粒度分析仪(英国马尔文公司); TDL-80-2B 台式离心机(上海安亭科学仪器厂); RE-52AA 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); AR1140 电子天平(梅特勒托利多仪器公司); 2.5Plus 冷冻干燥机(英国 Labconco 公司); Agilent-1200 型高效液相色谱仪, U410-86 Premium 超低温冰箱(英国 New Brunswick Scientific 公司); Thermo 型红外光谱仪(ThermoFisher 公司)。

1.3 恩诺沙星胶束的制备 称取 MPEG-PLA、恩诺沙星适量超声充分溶解于 3 mL 乙醇中,然后缓慢滴加于磁力搅拌下的 15 mL 去离子水中,继续搅拌 30 min,于旋转蒸发器上进行减压旋蒸,控制温度为 45~50℃。将有机溶剂挥发尽后,溶液过 0.45 μm 的滤膜并分装于安瓿内,在 -80℃ 的超低温冰箱中冷冻 24 h,之后在冷冻干燥机中干燥 48 h,得到恩诺沙星胶束冻干品。

1.4 恩诺沙星含量的 HPLC 测定

1.4.1 色谱条件 色谱柱: Agilent-1200 C18 柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-磷酸溶液(将 0.025 mol/L 的磷酸用三乙胺调节 pH 值至 3.0, 13:87); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 278 nm; 进样量: 10 μL; 外标法定量。

1.4.2 标准曲线 分别精密量取恩诺沙星储备液(500 mg/L) 10, 20, 50, 100, 200, 400 μL 于 5 mL 量瓶中,用甲醇溶解并定容,得质量浓度为 1, 2, 5, 10, 20, 40 mg/L 的系列标准溶液,进样测定。以峰面积(A)和质量浓度(c)进行线性回归。

1.5 载药量与包封率的测定 精密量取 1.3 中旋

蒸后的恩诺沙星胶束 200 μL 于超滤管中^[7], 7 000 r/min 离心 10 min,收集超滤液,精密量取其体积。

精密量取 1.3 中的恩诺沙星胶束和上述超滤液各 100 μL 分别置于 5 mL 容量瓶中,用甲醇稀释定容。在上述色谱条件下测定,经换算后按照下式计算包封率(EE %)和载药量(DL %):

$$\text{包封率(EE \%)} = W_{\text{包}}/W_{\text{药}} \times 100$$

$$\text{载药量(DL \%)} = W_{\text{包}}/W_{\text{总}} \times 100$$

式中 $W_{\text{包}}$: 聚合物胶束包裹药物量(mg), $W_{\text{药}}$: 投入的总药量(mg), $W_{\text{总}}$: 聚合物胶束的总质量(mg)。

1.6 聚合物胶束体外释放性质 分别精密量取 1 mL 恩诺沙星胶束,加入已浸泡 12 h 以上的 PBS 缓冲盐(pH=7.0)透析袋中;将透析袋放入含 50 mL PBS 缓冲盐(pH=7.0)的烧杯中,37℃ 水浴,以 100 r/min 的速度进行搅拌;在不同时间点分别取透析液 0.1 mL,同时补充等量同温的 PBS 缓冲盐(pH=7.0)。将所取透析液按 1.4.1 的色谱条件测定出不同时间点透析液中药物的浓度,计算累积释药百分数^[8-10]。

2 结果

根据单因素试验结果显示,影响胶束形成的主要因素有嵌段聚合物 MPEG 和 PLA 的质量比以及聚合物质量浓度,结果如下。

2.1 两嵌段聚合物中 MPEG 和 PLA 不同质量比对恩诺沙星胶束性质的影响

2.1.1 胶束的平均粒径、PDI 保持其他因素不变,对 3 种不同比例的材料进行比较(图 1)。结果表明,当 MPEG 的质量不变,粒径随着 PLA 质量的减小有所减小,但是 PDI 却逐渐增大。

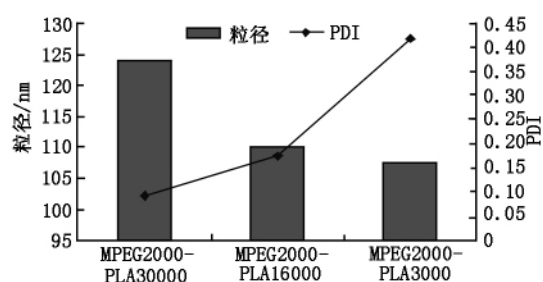


图 1 不同比例聚合物制备胶束的粒径、PDI 变化趋势图

2.1.2 胶束的包封率 恩诺沙星的回归方程 $A = 66.318c - 49.442$ ($n=6$), 相关系数 $r=0.9995$, 恩诺沙星在 1.00~40.00 mg/L 内有良好的线性关系, 分别计算包封率和载药量。最低检测限为 0.5 mg/L。

保持其他因素不变,对3种不同比例的材料进行对比(图2)。结果表明,保持MPEG的质量不变,其他条件不变,包封率随着PLA质量的减小而降低。

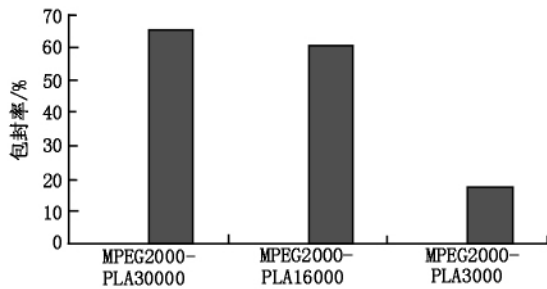


图2 不同比例聚合物制备胶束的包封率变化趋势图

通过对胶束的平均粒径、PDI、包封率等因素的考察,说明材料MPEG2000-PLA30000和MPEG2000-PLA16000形成的胶束有较好效果,包封率比较高。疏水端长度增加能提高药物在胶束核介质之间的分配系数,使每个胶束的结合数增加,内核容量增大,这样载药效率就越高。

2.2 不同比例聚合物在有机相中的质量浓度对恩诺沙星胶束性质的影响 对材料MPEG2000-PLA30000和MPEG2000-PLA16000做进一步的考

察,结果见表1,2。结果表明,当聚合物超过表中所示的最高质量浓度时,聚合物就会析出。

表1 MPEG2000-PLA30000在有机相中的质量浓度对恩诺沙星胶束性质的影响

聚合物/ (g·L ⁻¹)	比率 (有机相:水相)	粒径/nm	PDI	包封率/%
25	1:5	—	材料析出	—
15	1:5	124.3	0.092	65.52

表2 MPEG2000-PLA16000在有机相中的质量浓度对恩诺沙星胶束性质的影响

聚合物/ (g·L ⁻¹)	比率 (有机相:水相)	粒径/nm	PDI	包封率/%
40	1:5	—	材料析出	—
30	1:5	110.0	0.175	60.66

2.3 同种材料的粒径分布和不同药物材料比对载药量和包封率的影响 为了考察药物材料比与载药量和包封率之间的关系,从上面2个材料中选出一个较好的材料MPEG2000-PLA16000,因为它有较高的聚合物浓度,从而可以提高载药量。进一步考察MPEG2000-PLA16000的粒径分布、不同药物材料比对载药量和包封率的影响。

2.3.1 粒径测定 制得的胶束溶液带有蓝色乳光,激光粒度仪测得其平均粒径为(117.17±8.2)nm,且粒径平均分布范围较窄(图3)。

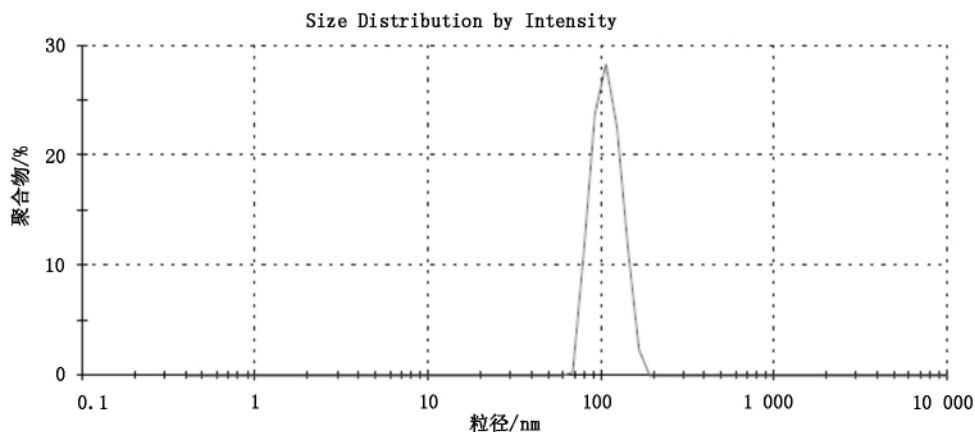


图3 恩诺沙星聚合物胶束粒径分布图

2.3.2 不同的药物材料比对恩诺沙星纳米胶束包封率和载药量的影响 见图4。结果表明,保持其他条件不变,随着药物材料比的降低,包封率逐渐增加,但是载药量逐渐减小。

2.4 恩诺沙星MPEG-PLA载药胶束的确定 MPEG-PLA、恩诺沙星、恩诺沙星和MPEG-PLA的

物理混合物、聚合物胶束冻干粉的红外图谱见图5,在b中,1628 cm⁻¹处为恩诺沙星C=C的特征吸收峰,1496 cm⁻¹处为苯环的特征吸收峰,1287 cm⁻¹处为氟代苯中的C-F的特征吸收峰^[11]。在c中这3个特征峰都存在。与b、c相比,d并无此特征吸收峰,说明恩诺沙星已经被包裹进入胶束中。

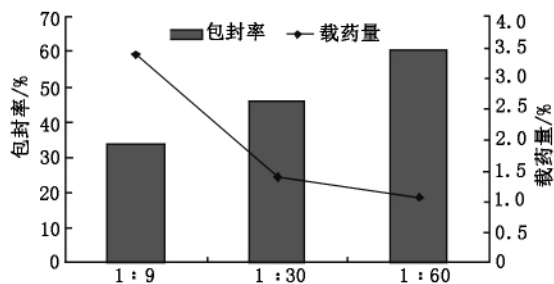


图4 同一聚合物不同药物材料比对包封率、载药量变化趋势图

2.5 胶束的累计释放速率 保持其他因素不变,对3种不同比例的材料制备的胶束体外释药进行比较(图6)。结果表明,以PLA30000的材料制备的胶束没有突释现象,且前4h累计释放了60.73%,故具有一定的缓释效应;以PLA16000的材料制备的胶束有一定的突释现象,但因前4h释放了73.00%,所以也有一定的缓释作用;而以PLA3000的材料制备的胶束缓释作用不明显。

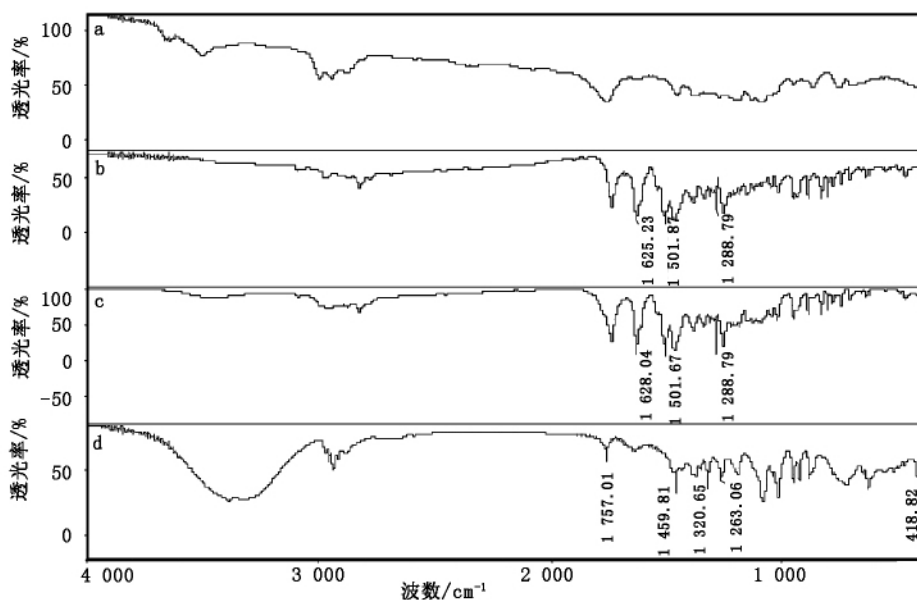


图5 红外吸收图谱 a. MPEG-PLA 聚合物; b. 恩诺沙星; c. 恩诺沙星和 MPEG-PLA 聚合物物理混合; d. 胶束冻干粉

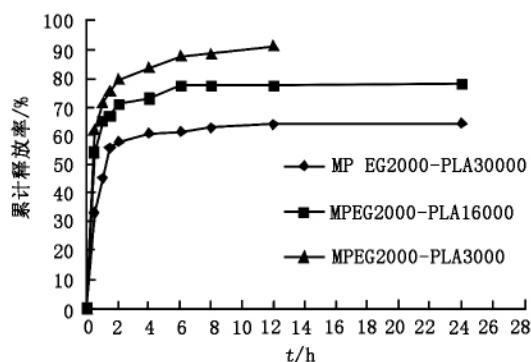


图6 不同比例聚合物制备胶束的体外释放趋势图

3 讨论

临界胶束浓度(CMC)越低的两亲性分子,其性能越稳定,越能抗稀释而不易解缔合。CMC受嵌段共聚物相对分子质量尤其是疏水嵌段相对分子质量影响较大,随疏水嵌段相对分子质量增大,CMC值减小。因随着疏水嵌段相对分子质量增大,共聚物

中可溶性嵌段质量分数下降,可溶性嵌段对疏水嵌段影响减弱,疏水嵌段更易聚集,使CMC值减小^[12-15]。本研究也发现不同比例的两嵌段共聚物形成胶束的聚合物浓度有很大差别,PLA的质量越大所需要的浓度越低,浓度甚至可以相差1/2,可能是因为疏水链越长CMC越低,所以形成胶束所需的嵌段共聚物越少。

嵌段聚合物MPEG-PLA的玻璃化温度为一般为37.9℃。聚合物胶束疏水嵌段粘度随着温度的升高而减小,在玻璃化温度附近粘度开始不再变化。随着环境温度增加至玻璃化温度附近,疏水嵌段的粘性逐渐降低,该嵌段迁移较剧烈,说明在该温度下适于药物在聚合物薄膜中的分布^[16],故本试验减压旋转蒸发的温度控制在45~50℃。

纳米粒包封率测定方法常用的有超速离心法、透析法、超滤离心法和凝胶色谱法等。本研究采用超滤离心法测包封率时具有操作简单、快速、高效的优点。

本试验比较了3种不同规格两嵌段共聚物制备的恩诺沙星聚合物胶束的理化性质,相比较而言MPEG2000-PLA16000 有较高的载药量。且采用的自乳化溶剂挥发法操作简单易行,制备的聚合物胶束显示了对恩诺沙星有较好的载药性能。

参考文献:

- [1] Vancutsem P M, Babishh J G, Schwark W S. The fluoroquinolone antimicrobials: structure, antimicrobial activity, pharmacokinetics, clinical use in domestic animals and toxicity[J]. *Cornell Vet*, 1990, 80(2): 173-183.
- [2] Bauditz R. Results of clinical studies with Batril in poultry [J]. *Vet Med Rev*, 1987, 30(2): 130-136.
- [3] 陈杖榴. 兽医药理学[M]. 2版. 北京: 中国农业出版社, 2002: 237.
- [4] Salaam L E, Dean D, Bray T L. *In vitro* degradation behavior of biodegradable 4-star micelles[J]. *Polymer*, 2006, 47(1): 310-318.
- [5] Liu M X, Dong J, Yang Y J, et al. Characterization and release of triptolide-loaded poly-(D, L-lactic acid) nanoparticles[J]. *Eur Polym J*, 2005, 41(2): 375-382.
- [6] 刘明星, 董静, 杨亚江, 等. 雷公藤甲素聚乳酸纳米粒载药体系的研究[J]. *中国药科大学学报*, 2004, 35(2): 117-121.
- [7] Du Y Z, Wang L, Yuan H, et al. Preparation and characteristics of linoleic acid-grafted chitosan oligosaccharide micelles as a carrier for doxorubicin [J]. *Colloid Surface B*, 2009, 69(2): 257-263.
- [8] 林宏英, 陆晓燕, 唐宁, 等. 长春新碱 PEG-PE 胶束的制备及其对乳腺癌细胞生长的抑制[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2006, 33(8): 769-774.
- [9] 李媛, 齐宪荣. 维甲酸/聚乙二醇-聚乳酸二嵌段共聚物胶束的制备及其体外性质[J]. *中国新药杂志*, 2008, 17(3): 219-227
- [10] Fontana G, Pitarresi G, Tomarchio V, et al. Preparation, characterization and *in vitro* antimicrobial activity of ampicillin-loaded polyethylcyanoacrylate nanoparticles[J]. *Biomaterials*, 1998, 19(11/12): 1009-1017.
- [11] 姚凤云, 王付华, 王树槐. 盐酸恩诺沙星制备及结构确证[J]. *中国兽药杂志*, 1999, 33(2): 29-31.
- [12] Nguyen C A, Allémann E, Schwach G, et al. Cell interaction studies of PLA-MePEG nanoparticles[J]. *Int J Pharm*, 2003, 254(2): 69-72.
- [13] Yang D, Zhang X H, Yuan L, et al. PEG-g-poly(aspartamamide-co-N, N-dimethylenediamino aspartamide): Synthesis, characterization and its application as a drug delivery system [J]. *Prog Nat Sci*, 2009, 19: 1305-1310.
- [14] Kabanov A V, Nazarova I R, Astafieva I V, et al. Micelle formation and solubilization of fluorescent probes in poly(oxyethylene-b-oxypropylene-b-oxyethylene)solution[J]. *Macromolecules*, 1995, 28(7): 2303-2314.
- [15] 徐凌云. 载雷公藤内酯 PEG-PLA 聚合物胶束研究[D]. 湖北 武汉: 华中科技大学, 2008.
- [16] 林琳, 涂家生, 庞卉. 注射用紫杉醇聚合物胶束稳定性的研究[J]. *药学与临床研究*, 2009, 17(2): 85-89.