5-氟尿嘧啶的聚乙二醇-聚乳酸的胶束制备及其体外释药研究

庞国棉, 朱亮, 李远达
(广东药学院 药科学院, 广东 广州 510006)

摘要: 目的 通过化学结合法将药物 5-氟尿嘧啶 (5-FU) 与聚乙二醇-聚乳酸 (mPEG-PLA) 相连接, 制备 mPEG-PLA-5-FUA 含药聚合物胶束, 考察其体外释放性能。方法 在 5-FU 的 N-1 位引入乙酸基, 通过 DCC 缩合法, 使 5-氟尿嘧啶-1-基乙酸 (5-FUA) 与 mPEG-PLA 反应, 制得含药聚合物 mPEG-PLA-5-FUA, 用红外吸收光谱 (IR)、差热分析法 (DTA) 验证其结构; 采用透析法制备聚合物胶束, 分别用透射电镜观察聚合物胶束的形态, 激光散射法测定聚合物胶束的粒径, 紫外-可见分光光度法计算胶束载药量, 芘探针荧光法测定临界胶束浓度 (CMC) 值, 转篮法测定胶束释放度。结果 经 IR、DTA 鉴定, 成功合成了 mPEG-PLA-5-FUA 聚合物; 其胶束平均粒径为 42.1 nm, 能明显看到胶束的球形核-壳结构; 载药量为 1.83%, CMC 为 2.68 μg·mL^{-1}, 24 h 释药量达 28.7%。结论 mPEG-PLA-5-FUA 载药聚合物胶束具有一定的缓释作用, 有利于 5-FU 的抗肿瘤作用。

关键词: 5-氟尿嘧啶; 聚乙二醇-聚乳酸; 聚合物胶束
中图分类号: R 944 文献标识码: A doi 10.3969/j.issn 1006-8783.2011.02.002
文章编号: 1006-8783(2011)02-0116-05

Study on the preparation and release behavior of 5-fluorouracil-polyethyleneglycol-polylactide polymeric micelles *in vitro*

PANG Guo-mian, ZHU Liang, LI Yuan-da
(School of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical College, Guangzhou, Guangdong 510006, China)

Abstract Objective To investigate the preparation and release behavior of 5-fluorouracil-polyethyleneglycol-polylactide (mPEG-PLA-5-FUA) polymeric micelles *in vitro* with 5-fluorouracil active ester and polyethyleneglycol-polylactide (mPEG-PLA) by chemical bonding method. **Methods** Acetic acid was conjugated to N-1 of 5-FU. Then 5-fluorouacil-1-yl-acetic acid was connected with mPEG-PLA block copolymer through DCC chemical reaction to obtain mPEG-PLA-5-FUA polymeric micelles. The structure was identified by IR, DTA. The polymeric micelles were prepared by diafiltration, and the morphology was observed by transmission electron microscope and the particle size was examined by dynamic light scattering. The drug loading encapsulation were determined by UV. The critical micelle concentration (CMC) was detected with fluorescence method with pyrene as a probe. The release of the 5-FU loaded mPEG-PLA micelles *in vitro* was evaluated using a dialysis method. **Results** The mean diameters of the micelles were 42.1 nm. Pictures by transmission electron microscopy revealed spherical and core-shell 5-FU loaded mPEG-PLA micelles. The drug-loading rate was 1.83%, and the CMC were 2.68 μg·mL^{-1}, and the release of the micelles were 28.7% after 24 h. **Conclusions** The mPEG-PLA-5-FUA polymeric micelles can be used as a new carrier for sustained release drug systems, which is beneficial to the anti-tumor activity of 5-FU.

Key words 5-fluorouracil; polyethyleneglycol-polylactide; polymeric micelles

---

收稿日期: 2010-12-27
作者简介: 庞国棉, 男, 硕士研究生, 助理研究员, 主要从事纳米药物与靶向制剂研究, Email: pangguomian@163.com;
通讯作者: 朱亮, 男, 教授, 主要从事靶向给药以及新药研发研究, Email: liangz99@126.com。
网络出版时间: 2011-03-24 11:52 网络出版地址: http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1413.R.20110324.1152.018.html
© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

小分子抗肿瘤药物具有毒副作用大、代谢快、半衰期短等缺点, 将其键合在大分子材料上制成的大分子前药, 具备缓释、靶向等特点, 可有效改变药物在体内的转运和吸收[1]。5-氟尿嘧啶 (5-Fu) 是抗代谢类的抗癌药, 是多种恶性肿瘤的一线治疗药物, 但其在体内代谢快, 半衰期短 (5~ 10 min); 临床上为了达到有效的体内血药浓度, 往往采用大剂量、持续给药或反复多次给药等途径, 这大大增加了 5-Fu的毒副作用[2]。两亲性的嵌段共聚物组成的聚合物胶束作为抗肿瘤药物载体, 具有胶束在体内外稳定、有很好的生物相容性、对于溶解度很小的药物具有增溶作用、可作为靶向给药的载体等优点[3], 近年来已成为药学领域的研究热点。聚乙二醇-聚乳酸 (mPEG-PLA) 侧链含有羟基, 可通过化学结合反应, 与含有羧基的小分子药物通过酯键键合得到载药聚合物。李苏等[4] 合成的两亲嵌段共聚物聚乙二醇-聚谷氨酸苄酯 (PEG-PBLG) 为载体的 5-FU 核壳型缓释纳米胶束表现出较好的缓释效果。本研究将 5-FU 先衍生成 5-氟尿嘧啶-1-基乙酸 (5-FUA), 再与 mPEG-PLA 通过化学键合的方法连接起来制备成含药胶束, 并对聚合物胶束的释放性能进行了初步的研究。

1　材料与仪器

1.1　材料

mPEG-PLA 嵌段聚合物 (相对分子质量 8 000, 济南岱罡生物科技有限公司); 5-氟尿嘧啶 (南通精华制药有限公司); 氯乙酸 (天津市富宇精细化工有限公司); *N*, *N*-二环乙基碳化亚胺 (DCC, 国药集团化学试剂有限公司); 4-甲基氨基吡啶 (DMAP, 上海晶纯试剂有限公司); 其他试剂均为市售分析纯。

1.2　仪器

UV-1700型紫外分光光度计 (日本岛津公司); RF-5301PC 荧光分光光度计 (日本岛津公司); 激光粒度分布仪 (英国马尔文仪器有限公司); FA1004 电子分析天平 (上海恒平科学仪器有限公司); DF-101S集热式恒温加热磁力搅拌器 (巩义市予华仪器有限公司); RE5298A 旋转蒸发仪 (上海亚荣生化仪器厂); SHZ-D(III)循环水式真空泵 (巩义市予华仪器有限公司); RCZ-1A 型溶出试验仪 (上海黄海药检仪器有限公司)。

2　方法与结果

2.1　mPEG-PLA-5-FUA 的合成及表征

2.1.1　5-FU-1-基乙酸 (5-FUA) 的合成[5]　在配有回流冷凝器的三颈烧瓶中, 加入 12.82 g(23 mmol) KOH 及水 40 mL, 搅拌溶解后, 加入 7.80 g(60 mmol) 5-FU, 水浴加热, 搅拌 30 min, 缓慢滴加含 8.5 g(90 mmol) 氯乙酸的 10 mL水溶液, 滴加时间约为 30 min。水浴加热, 60 ℃下搅拌 5 h, 停止反应后冷却至室温, 用浓 HCl调节 pH 值为 5.5, 放入冰箱冷藏室中冷却 2 h, 如有沉淀析出, 滤除, 再将 pH 调至 2.0, 冷却 12 h过滤, 沉淀物用蒸馏水洗涤 3 次, 用水重结晶, 烘干得针状晶体 8.67 g, 产率为 76.86%。

2.1.2　mPEG-PLA-5-FUA 的合成与表征[1]　将 2.00 g(0.25 mmol) mPEG-PLA 聚合物以 *N*, *N*-二甲基甲酰胺 (DMF) 10 mL溶解, 加入 0.188 g (1.0 mmol) 5-FUA, 待 5-FUA 充分溶解后, 加入 0.048 g (约 0.4 mmol) 4-甲基氨基吡啶 (DMAP), 溶液澄清后加入 0.412 3 g(约 2 mmol) 二环己基碳二亚胺 (DCC), 室温下反应 24 h, 抽滤除去沉淀, 澄清液中加入 150 mL无水乙醚, 抽滤, 用冷无水乙醚洗涤沉淀, 收集沉淀, 加入 40 mL乙酸乙酯, 抽滤除去未反应的 5-FUA, 澄清液中再加入 200 mL无水乙醚, 抽滤, 无水乙醚洗涤沉淀, 得淡黄色沉淀, 在含 P_2O_5 真空干燥箱里干燥 24 h, 得淡黄色块状固体 1.58 g, 产率为 77.19%。

聚合产物用全反射红外光谱 (IR) 及差热分析法 (DTA) 进行鉴别。

IR 测试表明, mPEG-PLA 聚合物 (图 1) 与 mPEG-PLA-5-FUA 聚合物 (图 2) 相比, 3 666 cm^{-1} 羟基特征峰消失, 1 758 cm^{-1} 处附近多生成 1 个羰基特征峰, 说明原有羟基位置形成了酯键。

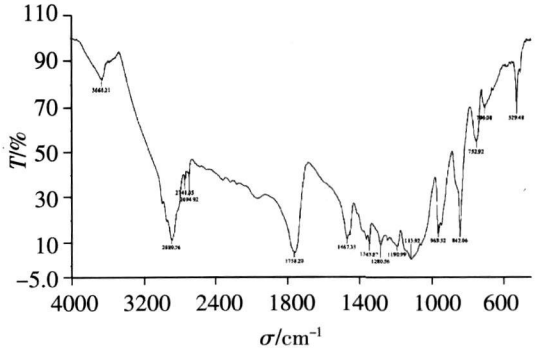

图 1　mPEG-PLA 聚合物红外吸收光谱图

Figure 1　FT-IR spectra of mPEG-PLA polymer

DTA 测试表明 (图 3), mPEG-PLA 熔点峰在 67.5 ℃; 5-FUA 熔点峰在 290.2 ℃; 合成产物

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

mPEG-PLA-5FUA在 64.8 ℃处有最大吸热峰, 同等比例下测得 mPEG-PLA/5-FUA(混合物)在 67.8 ℃和 279.1 ℃同时存在 2个最大吸收峰, 说明合成产物 mPEG-PLA-5FUA是由 mPEG-PLA与 5-FUA通过化学键结合而成。

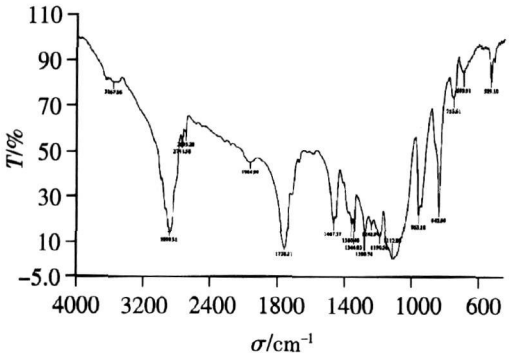

图 2 mPEG-PLA-5-FUA聚合物红外吸收光谱图

Figure 2 FT-IR spectra of mPEG-PLA-5-FUA polymer

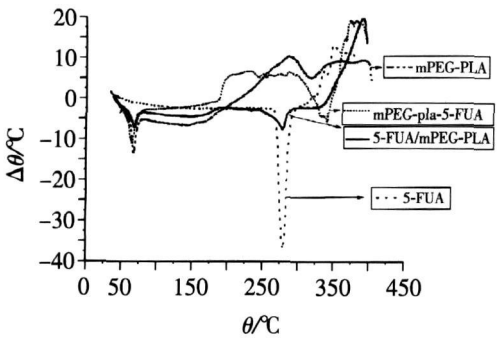

图 3 DTA分析曲线

Figure 3 DTA curves for mPEG-PLA, 5-FUA, mPEG-PLA-5-FUA, mPEG-PLA/5-FUA (mixture)

2.2 透析法制备 mPEG-PLA-5-FUA聚合物胶束

将适量 mPEG-PLA-5-FUA聚合物在搅拌下溶解于 DMF中, 再把聚合物的 DMF溶液转移到透析袋(截留相对分子量为 3 500)中, 用去离子水透析 24 h, 前 3 h每 1 h换 1次水, 后 21 h每 3 h换 1次水。透析结束后, 抽滤除杂, 滤液经 0.22 μm滤膜过滤, 再进行冷冻干燥 36 h, 得淡黄色粉末状固体, 干燥器中保存。

2.3 聚合物胶束粒径的测定

取冻干样品溶于去离子水中配成 10 mg/mL溶液(出现蓝色乳光), 超声分散后, 于激光粒度分布仪中测定粒径分布, 见图 4。由图可见, 所得聚合物胶束的粒径分布集中, 平均粒径为 42.1 nm。

2.4 聚合物胶束的形态表征

将冻干样品分散在水中, 用去离子水稀释, 充分

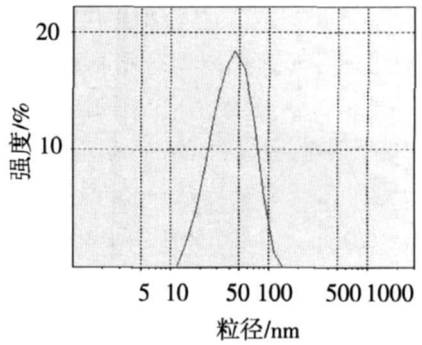

图 4 mPEG-PLA-5-FUA聚合物胶束的粒径分布图

Figure 4 Size distribution of mPEG-PLA-5-FUA polymeric micelles

摇匀后, 沾于铜网上, 待网上液体将干时, 滴加 1滴质量分数为 1%的磷钨酸溶液进行负染, 一段时间后镊起铜网, 用滤纸吸取多余染液, 铜网于室温下自然干燥, 然后在透射电镜上进行观察。结果显示聚合物胶束呈球体或类球体, 粒径分布均匀, 边缘较模糊, 内核外有一冠状层, 能明显看出胶束的核-壳结构(见图 5)。

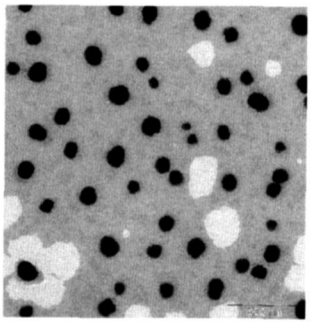

图 5 mPEG-PLA聚合物胶束的透射电镜(×10 000)

Figure 5 Transmission election microscopy of mPEG-PLA-5-FUA polymeric micelles(×10 000)

2.5 载药聚合物临界胶束浓度的测定

分别向一系列 10 mL棕色容量瓶中加入 1 mL已配制好的含芘[6]的丙酮溶液, 用氮气流挥去丙酮, 用已配制好的不同浓度的聚合物水溶液定容, 使芘的最终浓度达到 2×10^{-8} mol·L^{-1}, 振荡数次使溶液均匀。为了平衡芘与胶束, 混合液应在 65 ℃的水浴中加热 1 h, 然后在常温常压下暗处放置过夜。

在荧光光度计上绘制芘的激发光谱(300~360 nm, 发射波长 390 nm)[7], 记录各浓度溶液激发光谱的 I_{338}/I_{333}, 以 I_{338}/I_{333}对聚合物浓度的对数用 Origin作图(见图 6), 由曲线的突变点确定聚合物的临界胶束浓度(CMC值), 按 $Y=0.01936X+0.51701$ ($r=0.8424$)、$Y=0.28329X+0.41293$ ($r=0.9993$)计算 CMC值, 结果为 2.48 μg/mL(即

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3.287×10^{-5} mol·L^{-1})。两亲聚合物的 CMC 一般为 10^{-6} mol·L^{-1}[8], 而小分子表面活性剂 CMC 大约为 10^{-3} mol·L^{-1}。本文结果与小分子表面活性剂相比, CMC 值很低, 表明胶束在体内具有较好的稳定性。

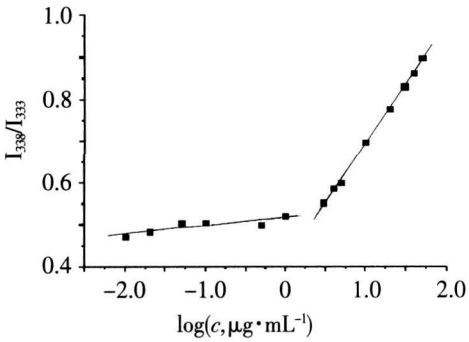

图 6　mPEG-PLA-5-FUA 聚合物胶束浓度与 I_{338}/I_{333} 的对数图

Figure 6　Plots of I_{338}/I_{333} vs log c of mPEG-PLA-5-FUA polymeric micelles

2.6　载药量及体外释放度的研究

2.6.1　5-FUA 标准曲线的制作　精密称取 5-FUA 10 mg 置 100 mL 容量瓶中, 加 0.1 mol·L^{-1} HCl 溶解并定容至刻度, 分别取 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 mL 于 25 mL 容量瓶中, 并用 0.1 mol·L^{-1} HCl 定容至刻度。用紫外光谱测定其在 269.5 nm 处吸光度值, 得回归方程 $Y = 55.441X + 0.0043$ ($r = 0.999\ 6$), 表明质量浓度在 2~14 μg/mL 范围内与吸光度呈良好的线性关系。

2.6.2　载药量的测定　精密称取 100 mg 的冻干样品, 加入 0.1 mol·L^{-1} HCl 溶液 10 mL, 60 ℃加热 1 h, 取 1 mL 稀释至 25 mL, 在 269.5 nm 处测定吸光度, 结果测得载药量为 1.83%, 包封率为 90.42%。

2.6.3　载药胶束体外释放的测定[8]　本文的胶束拟通过静脉注射途径给药。精密称取 300 mg 冻干样品溶于 5 mL PBS 缓冲液 (pH = 7.4) 中, 然后置于透析袋 (截留相对分子量为 3 500), 将透析袋放入转篮内, 置于溶出仪, 溶出介质为 PBS 缓冲溶液, 水浴 37 ℃, 分别于 0.5、1、2、4、6、12 h 取样, 之后每 12 h 取样, 每次取透析液 10 mL, 并补充 PBS 溶液 10 mL, 按"2.6.2"项下方法测定吸光度并计算累积释放度 (释放度 = 释放介质中药物的量/含药胶束中的药物总量 × 100%)。

聚合物胶束的累积释放曲线见图 7。从图可见, 24 h 前药物释药速度较快, 释药量约占总药量的 28.7%, 120 h 释药量约占总药量的 60.3%。药物释放初期表现出一定的"突释现象", 之后平缓地线性增加, 近似于零级释放。高分子前药的缓释效果主要由药物的水解速度和扩散速度控制, 此外还与载体的表面积大小、致密程度、外表形态等因素有关。由于 mPEG-PLA 的良好水溶性, 使得高分子前药表层药物水解后迅速扩散, 导致在释药初期表现出"突释现象", 随着药物水解速度和载体材料的溶解速度达到平衡, 释药速度逐渐趋于平衡, 表现出良好的缓释性能。

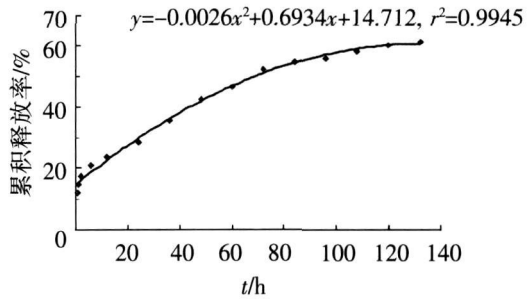

图 7　mPEG-PLA-5-FUA 聚合物胶束的累计释放曲线

Figure 7　Accumulated released amount of mPEG-PLA-5-FUA polymeric micelles

从实验结果可看出, 在 PBS 缓冲液 (pH = 7.4) 环境中, mPEG-PLA-5-FUA 聚合物胶束能够缓慢释放, 从而可达到延长 5-FU 药效的目的。

3　讨论

针对 5-FU 的毒副作用较大、半衰期短等缺点, 本文将其键合在聚合物 mPEG-PLA 上制成大分子前体药物, 使其具备缓释、靶向等特点, 改善其在体内的转运和吸收。先把 5-FU 制备成活性更高的 5-FUA, 利用其羧基与 mPEG-PLA 中的羟基进行酯化反应, 通过 DCC 缩聚法, 将 5-FU 与 mPEG-PLA 更好地结合起来, 方法操作简便安全, 可在常温常压下完成。红外光图谱显示在 1 758 cm^{-1} 附近形成新的酯键吸收峰, DTA 图中观察到混合物中同时出现 mPEG-PLA 与 5-FUA 的熔点峰, 而合成产物只有 1 个熔点峰, 表明已成功合成目标化合物。

聚合物胶束是两亲性嵌段共聚物, 其溶于水后在疏水作用、氢键、静电作用等分子间作用力的推动下可自发地形成具有疏水性内核与亲水性外壳的自组装结构。由于 5-FU 微溶于水, 具有一定的亲水性, 在形成胶束时, 不能完全包裹在疏水性内核内而容易过早释放。故此次实验, 先把 5-FU 键合在 mPEG-PLA 上, 再通过透析法制备成胶束。通过透射电镜观察胶束外部形态, 胶束呈球体或类球体, 粒径分布均匀, 边缘较模糊, 内核外有一冠状层, 能明

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

显看出胶束的核-壳结构。

CMC决定胶束的稳定性, CMC越小聚合物胶束越稳定。当药物输送系统静脉注射到人体或动物体内,受到体内血液的急剧稀释。如果稀释后聚合物的浓度大于 CMC,胶束在体内稳定存在;反之,胶束在体内解聚,小分子表面活性剂胶束注射到体内后易裂解,不溶性药物容易从中泄漏并沉积在血管内造成危险。两亲聚合物的 CMC一般在 10^{-6} mol• L^{-1}[9],而小分子表面活性剂 CMC大约为 10^{-3} mol• L^{-1}。本实验所得聚合物的临界胶束浓度为 3.287×10^{-5} mol• L^{-1},与小分子表面活性剂相比, CMC值很低,表明胶束在体内具有较好的稳定性。

从 mPEG-PLA-5-FUA胶束的释药曲线可见, 24 h内表现出一定的突释现象,之后的 120 h缓慢释放,且只释放了 60.3%,可见药物表现出良好的缓释性能。

参考文献:

[1] 张静夏,潘仕荣,王琴梅,等. 聚羟乙谷氨酰胺-5-氟尿嘧啶-1-乙酸的合成、表征与缓释性[J]. 应用化学, 2004, 21(10): 1057-1058.

[2] 王卫东,黄石. 5-氟尿嘧啶类抗癌药物的分子修饰研究进展[J]. 药学进展:综述与专论, 2008, 32(12): 536-537.

[3] TORCHILIN V P. Targeted polymeric micelles for delivery of poorly soluble drugs [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2004, 96(2): 273-283.

[4] 李苏,姜文奇,王安训,等. 5-FU核壳型共聚物纳米胶束制备及其体内释药的研究[J]. 癌症, 2004, 23(4): 381-385.

[5] 扈靖,刘彦钦,韩士田. 5-氟尿嘧啶-1-基乙酸合成方法的改进[J]. 化学试剂, 2005, 27(8): 500-509.

[6] SEZGIN Z, YUKSEL N, BAYKARA T. Preparation and characterization of polymeric micelles for solubilization of poorly soluble anticancer drugs [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2006, 64(3): 261-268.

[7] 涂家生. 具有肿瘤靶向性的甲基聚乙二醇-聚乳酸嵌段聚合物胶束的研究[D]. 南京:中国药科大学, 2004.

[8] 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.

[9] TORCHILIN V P. Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems [J]. *J Control Release*, 2001, 73: 137-172.

(责任编辑:陈 翔)

美国 FDA批准聚乙二醇干扰素 α-2b(Sylatron)用于治疗黑色素瘤

美国 FDA于 2011年 3月 29日批准聚乙二醇干扰素 α-2b(Peg interferon alfa-2b)用于治疗涉及到淋巴结且已接受过外科切除术的黑色素瘤。该药由先灵药业公司(Schering Corporation)生产,商品名称为 Sylatron。在临床试验中,服用 Sylatron的患者黑色素瘤复发时间比不服药者要延后大约 9个月。

该药的批准是基于 1项为期 5年的多中心临床试验的结果,总共有 1 256名黑色素瘤患者参加了这个试验,试验数据由一个独立的不知情委员会进行审核。

在试验中,黑色素瘤患者被随机分成 2组, 1组服用聚乙二醇干扰素 α-2b,另 1组(观察组)则不服用。在头 2年,每 3个月对试验对象作 1次肿瘤转移情况检查,余下 3年里则每 6个月检查 1次。试验的疗效终点是无复发生存时间(relapse-free survival, RFS)。

在 696个出现黑色素瘤复发的患者中,服用聚乙二醇干扰素 α-2b者平均 RFS为 34.8个月, 95%可信区间为 26.1~47.4;而未服用聚乙二醇干扰素 α-2b者其 RFS则为 25.5个月, 95%可信区间为 19.6~30.8。

聚乙二醇干扰素 α-2b并不会影响 2组实验对象的整体生存率, 2组风险比为 0.98, 95%可信区间为 0.82~1.16。5年研究期限到期后,有 525名患者已经死亡。

聚乙二醇干扰素 α-2b推荐用药方法是,先用每周 6 μg• kg^{-1}的剂量皮下注射 8周,往后剂量减至每周 3 μg• kg^{-1},治疗期可一直持续 5年。

FDA报告说,服用聚乙二醇干扰素 α-2b的患者有三分之一因为副作用而停止用药。超过 60%的服药者出现以下副作用:困惫、丙氨酸氨基转移酶和天门冬氨酸氨基转移酶水平升高、发烧、头痛、食欲不振、肌痛、恶心、冷颤和注射部位反应等。有 5名服用聚乙二醇干扰素 α-2b的患者在停药 30 d内死亡,其中 2人死于心血管疾病, FDA表示这 2例死亡可能与聚乙二醇干扰素 α-2b的使用有关。

Sylatron是 FDA在 2011年批准的第 2种治疗黑色素瘤药物,也是 2011年批准的第 3种抗肿瘤药。在 3月 25日, FDA批准了布迈施贵宝公司的 Yervoy(ipilimumab注射液)用于治疗转移性或无法实施外科切除术的黑色素瘤。

α干扰素类(包括 Sylatron)会增加患神经精神性障碍(如严重抑郁症)的风险。FDA网站可提供处方指南及临床试验方面的详细资料和信息。

(来源: Medscape.com 2011-04-04 作者: Laurie Bouck; 夏训明 编译)

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net