**分类号：**   **密级：**

**UDC：**

两亲性 β-环糊精星型聚合物的合成及其胶束给药体系的研究

Amphiphilic Star Copolymers based on

β-Cyclodextrin: Synthesis, Characterization and Applications in Drug Delivery Systems

姓 名： 梁润成 学 号： 2241040040

院 系： 药科学院 专 业： 药剂学 研究方向： 药物新剂型与新技术 导师姓名： 杨帆 教授 论文提交日期： 2013 年 5 月

论文答辩日期： 2013 年 5 月 学位授予单位： 广东药学院

二○一三年五月

**广东药学院学位论文原创性声明**

本人郑重声明：本人所呈交的学位论文，系我个人在导师的指导下进行研究工作所取得的成果。除文中已特别加以标注和致谢的地方外，不包含其它个人或机构已经发表或撰写过的研究成果。对本研究做出贡献的其它个人和集体，均已在文中明确说明和致谢。本人充分意识到本声明的法律结果完全由本人承担。

学位论文作者签名：＿＿＿＿＿＿ 日 期： 年 月 日

**学位论文使用授权的声明**

本人完全了解广东药学院有关保留和使用学位论文的规定，学校有权保留和向有关部门或机构送交本论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。学校可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库，可以采用影印、缩印或其它复印手段保存和汇编本学位论文。

保密论文在解密后适用本声明。

论文作者签名：＿＿＿＿＿＿ 论文导师签名：＿＿＿＿＿＿

日 期： 年 月 日

目 录

[摘 要](#_Toc686491056) 4

**[Abstract](#_Toc686491057)** 4

[第一章 绪论](#_Toc686491058) 5

[1 引言](#_Toc686491059) 5

[2 环糊精及其衍Th物](#_Toc686491060) 5

[2.1 环糊精的概况](#_Toc686491061) 5

[2.2 环糊精衍Th物](#_Toc686491062) 5

[3 两亲性嵌段聚合物](#_Toc686491063) 5

[3.1 两亲性嵌段聚合物概况](#_Toc686491064) 5

[3.2 两亲性嵌段聚合物的合成](#_Toc686491065) 5

[4 两亲性嵌段聚合物的自组装](#_Toc686491066) 6

[4.1 两亲性高分子的胶束行为](#_Toc686491067) 6

[4.2 聚合物胶束的药物负载方式](#_Toc686491068) 6

[4.3 载药胶束的制备方法](#_Toc686491069) 6

[5 两亲性嵌段聚合物胶束在给药系统中的应用](#_Toc686491070) 6

[5.1 作为疏水性药物的载体](#_Toc686491071) 6

[5.2 被动靶向给药系统](#_Toc686491072) 6

[5.3 主动靶向给药系统](#_Toc686491073) 7

[5.4 物理化学靶向给药系统](#_Toc686491074) 7

[6 课题的提出](#_Toc686491075) 7

[第二章 基于β-环糊精的两亲性星型聚合物的合成及表征](#_Toc686491076) 7

[1 引言](#_Toc686491077) 7

[2 实验部分](#_Toc686491078) 7

[2.1 原料、试剂与仪器](#_Toc686491079) 7

[2.2 原料与试剂的精制](#_Toc686491080) 8

[2.3 系列两亲性β-CD星型聚合物的设计思路](#_Toc686491081) 8

[2.4 基于β-CD的二硫代酯RAFT试剂的合成](#_Toc686491082) 8

[2.5 丙烯酰化β-CD的合成](#_Toc686491083) 8

[2.6 β-CD](#_Toc686491084)~~[[](#_Toc686491084)~~[P(AA-co-MMA)]](#_Toc686491084)[x](#_Toc686491084)[的合成](#_Toc686491084) 8

[2.7 含A](#_Toc686491085)[1](#_Toc686491085)[-β-CD单体的β-CD](#_Toc686491085)~~[[](#_Toc686491085)~~[P(AA-co-MMA-co-A](#_Toc686491085)[1](#_Toc686491085)[-β-CD)]](#_Toc686491085)[x](#_Toc686491085)[的合成](#_Toc686491085) 9

[2.8 β-CD](#_Toc686491086)~~[[](#_Toc686491086)~~[P(AA-co-MMA)-PVP]](#_Toc686491086)[x](#_Toc686491086)[的合成](#_Toc686491086) 10

[2.9 各合成产物的结构表征](#_Toc686491087) 16

[2.10 β-CD](#_Toc686491088)~~[[](#_Toc686491088)~~[P(AA-co-MMA)-b-PVP]](#_Toc686491088)[x](#_Toc686491088)[在水溶液中胶束化的研究](#_Toc686491088) 16

[3 结果与讨论](#_Toc686491089) 16

[3.1 基于β-CD的两亲性星型聚合物的合成与表征](#_Toc686491090) 16

[3.2 β-CD](#_Toc686491091)~~[[](#_Toc686491091)~~[P(AA-co-MMA)-b-PVP]](#_Toc686491091)[x](#_Toc686491091)[在水溶液中的胶束化](#_Toc686491091) 17

[4 本章小结](#_Toc686491092) 19

[第三章 两亲性β-环糊精星型聚合物载药胶束的制备与优化](#_Toc686491093) 19

[1 引言](#_Toc686491094) 19

[2 长春西汀的理化性质](#_Toc686491095) 19

[3 实验部分](#_Toc686491096) 19

[3.1 原料、试剂与仪器](#_Toc686491097) 19

[3.2 胶束内药物含量测定方法的建立](#_Toc686491098) 19

[3.3 VP胶束制备方法的筛选](#_Toc686491099) 20

[3.4 用于制备VP胶束的系列材料筛选](#_Toc686491100) 20

[3.5 溶剂挥发法制备VP胶束的影响因素考察](#_Toc686491101) 20

[3.6 溶剂挥发法制备VP胶束的正交设计](#_Toc686491102) 21

[3.7 正交试验最佳方案的验证](#_Toc686491103) 22

[3.8 尼莫地平胶束的制备](#_Toc686491104) 22

[4 结果与讨论](#_Toc686491105) 22

[4.1 胶束内药物含量测定方法的确立](#_Toc686491106) 22

[4.2 不同制备方法所得胶束载药量比较](#_Toc686491107) 24

[4.3 不同聚合物所得胶束载药量比较](#_Toc686491108) 25

[4.4 溶剂挥发法制备VP胶束的影响因素考察](#_Toc686491109) 29

[4.5 溶剂挥发法制备VP胶束的正交设计](#_Toc686491110) 35

[4.6 正交试验最佳方案的验证](#_Toc686491111) 40

[4.7 尼莫地平胶束的制备](#_Toc686491112) 41

[5 本章小结](#_Toc686491113) 41

[第四章 载药胶束的表征及体外释放行为研究](#_Toc686491114) 41

[1 引言](#_Toc686491115) 41

[2 实验部分](#_Toc686491116) 41

[2.1 原料、试剂与仪器](#_Toc686491117) 41

[2.2 样品的制备](#_Toc686491118) 41

[2.3 胶束的粒径与粒径分布测定](#_Toc686491119) 41

[2.4 胶束的红外表征](#_Toc686491120) 42

[2.5 胶束的外观形貌](#_Toc686491121) 42

[2.6 VP胶束的体外释放](#_Toc686491122) 42

[3 结果与讨论](#_Toc686491123) 43

[3.1 胶束的粒径与粒径分布](#_Toc686491124) 43

[3.2 胶束的红外表征](#_Toc686491125) 44

[3.3 胶束的外观形貌](#_Toc686491126) 44

[3.4 胶束的体外释放](#_Toc686491127) 44

[4 本章小结](#_Toc686491128) 54

[第五章 载药胶束在大鼠体内的组织分布研究](#_Toc686491129) 54

[1 引言](#_Toc686491130) 54

[2 实验方法](#_Toc686491131) 54

[2.1 试剂与仪器](#_Toc686491132) 54

[2.2 实验动物](#_Toc686491133) 54

[2.3 VP体内分析方法的建立](#_Toc686491134) 54

[2.4 载药胶束的制备](#_Toc686491135) 55

[2.5 大鼠组织分布研究](#_Toc686491136) 55

[2.6 VP胶束靶向性评价](#_Toc686491137) 55

[3 结果与讨论](#_Toc686491138) 55

[3.1 Th物样品前处理方法](#_Toc686491139) 56

[3.2 方法专属性](#_Toc686491140) 56

[3.3 血浆及各组织的标准曲线](#_Toc686491141) 58

[3.4 分析方法的回收率和精密度](#_Toc686491142) 59

[3.5 VP在大鼠组织分布结果与特点](#_Toc686491143) 63

[3.6 VP胶束靶向性评价](#_Toc686491144) 64

[4 本章小结](#_Toc686491145) 66

[参考文献](#_Toc686491146) 66

[全文总结](#_Toc686491147) 69

[攻读硕士学位期间发表的论文](#_Toc686491148) 69

摘 要

两亲性嵌段聚合物在选择性溶剂中发生微相分离，可以形成具有疏溶剂内核和溶剂化外壳的自组装结构，即胶束。因其具有良好的药物控释应用前景而引起了药物制剂研究者的广泛关注。聚合物胶束具有多种优势，包括纳米级粒径（在10~100 nm范围内），能增溶难溶性药物、控制药物释放，能延长体内循环时间、逃离网状内皮系统的识别和摄取，具备EPR效应介导的被动靶向作用、可被修饰而获得的主动靶向作用等。聚合物胶束可通过物理包封、化学键合或静电相互作用等手段负载药物。

两亲性嵌段聚合物是研究胶束制剂的关键所在。环糊精的环外亲水而内腔疏水，这种特殊的结构使其具有对分子进行包合的能力，因此被广泛应用于食品和医药等多种领域，因其含有多个反应活性不同的羟基，可通过改性修饰制备新型环糊精化合物。本课题以β-环糊精为中心，在其伯羟基上引入聚丙烯酸-聚甲基丙烯酸甲酯-聚乙烯基吡咯烷酮高分子链，得到了一系列的基于β-环糊精的两亲性星型聚合物（β-CD[P(AA-co-MMA) -b-PVP]），对该类聚合物的分子结构、胶束化行为进行了研究，并探讨了其对模型药物的载药特性、体外药物释放和体内组织药物分布。主要研究内容如下：

1. 采用以P4S10为介质，用羧酸与醇一步法合成二硫代酯的简易路线，成功地将二硫代酯结构引入到β-CD的伯羟基上，通过调节二硫代酯基团的引入数，制得三、四、五、六个二硫代酯基团的β-CD大分子链转移剂。通过“core-first”的可逆加成－断裂链转移（RAFT）聚合方法，以偶氮二异丁腈为引发剂，分别对丙烯酸、甲基丙烯酸甲酯和N-乙烯基吡咯烷酮进行了RAFT聚合反应，得到两亲性星型聚合物β-CD~~[~~P(AA-co-MMA) -b-PVP]。运用FT-IR对RAFT试剂和聚合物进行了表征，通过芘荧光光谱法和TEM研究了聚合物在水溶液中的胶束化行为，其临界胶束浓度在0.98×10 -3~5.24×10 -2 g/L范围内，预示着该系列聚合物具有良好的载药稳定性。

2. 以长春西汀（VP）为主要模型药物，考察了薄膜分散法、溶剂挥发法和透析法三种载药胶束的制备方法，结果表明，溶剂挥发法最适合该系列聚合物制备载药胶束，其载药量和包封率均高于其它两种方法。对于溶剂挥发法，详细考

察了不同聚合物、不同有机溶剂、不同有机溶剂与水的比例、不同投药量、不同聚合物浓度、不同搅拌温度、不同搅拌转速、不同搅拌时间和不同溶剂蒸发温度对载药情况的影响。并以此为基础，选取AM-PK111-4P1聚合物进行正交优化试验，以投药量、聚合物量、搅拌时间和搅拌转速作为正交设计因素，按五因素、四水平正交设计表[L16(45)]设计试验，确定了投药量为25 mg、材料量为50 mg、

搅拌时间为2 h、搅拌转速为1400 rpm的最佳载药胶束制备工艺。通过方案表明，

VP胶束的载药量和包封率分别达(21.44±0.14) %和(49.05±0.36) %。

3. 采用FT-IR、DLS、TEM等手段对VP胶束进行了表征，确证了VP被包载于聚合物形成的胶束核内，VP胶束的平均粒径在65 nm左右，粒径分布较窄，且胶束粒子呈良好的球形。通过体外释放研究表明，VP胶束具有一定的缓释能力和pH敏感特性，在较低pH条件下（如pH4.5）释放速率较快。不同的聚合物所得VP胶束的释放速率差异也较大。

4. 选取了2种聚合物制得VP胶束进行大鼠体内药动学与组织分布研究，并以市售VP注射液为对照，了解VP胶束在体内的分布特性与缓释性能。结果显示，与市售VP注射液相比，VP胶束具有较明显的肺靶向性，且其它组织内的药物浓度与注射液组在同一水平。

总的来说，该类两亲性β-CD星型聚合物具有一定的应用前景，值得进行深入的研究。

**关键词**：两亲性星型聚合物； 胶束； 长春西汀； 体外释放； 组织分布

**Amphiphilic Star Copolymers based onβ-Cyclodextrin: Synthesis, Characterization and Applications in Drug Delivery Systems**

Author: Liang Run-Cheng (Pharmaceutics) Supervisor: Yang Fan (Professor)

**Abstract**

It is well known that when amphiphilic block copolymers are dissolved in a solvent selective for one of the blocks, micelles are usually formed with a rather dense core of the insoluble blocks, surrounded by the diffuse outer corona formed from the soluble blocks. Its good prospects for controlled drug delivery applications have caused a wide attention from pharmaceutical investigator. The polymer micelle has a variety of advantages, including nanoscale particle size (10 - 100 nm in diameter), solubilization of insoluble drugs, controlled drug release, prolong the circulation time *in vivo*, escaping recognition and uptake of the reticuloendothelial system (RES), passive targeting by the enhanced permeability and retention (EPR) effect, and active targeting after modified. Drug molecules can be loaded into the polymeric micelles by means of physical entrapment, chemical bonding or electrostatic interactions.

The key of the micelle preparation is amphiphilic block polymer. The cyclodextrin ring has outer hydrophilic and hydrophobic inner cavity. Due to this particular structure, it has ability to form inclusion complexes with numerous molecules, and is widely used in a variety of areas such as food and pharmaceutical. Because of a plurality of reaction activity hydroxyl group, cyclodextrin can be modified to gain novel compound. In this work a series of amphiphilic polymers based onβ-CD (β-CD~~[~~P(AA-co-MMA) -b-PVP]) were synthesized by introducing the poly(acrylic acid) -co- poly(methyl methacrylate) -b- poly(vinyl pyrrolidone) block copolymer to the primary hydroxyl group positions onβ-CD. We discuss the

Molecular structure and micellization behavior of the polymer, and explore the drug loading characteristics of the model drug, drug release *in vitro* and drug tissue distribution *in vivo*. The main contents are as follows:

1. Dithiophosphate ester structure was introduced to the primary hydroxyl group onβ-CD using a simple one step reaction between carboxylic acid and alcohol in the presence of P4S10. A series of macromolecular chain transfer agents with different number of dithioester group onβ-CD (three, four, five and six groups) were prepared by adjusting the number of the introduction of the dithioester groups. Through the" core-first" reversible addition - fragmentation chain transfer (RAFT) polymerization approach and the azobisisobutyronitrile as an initiator, the macroRAFT agents were used to induce the RAFT polymerization of acrylic acid, methyl methacrylate and N-vinyl pyrrolidone, respectively, to obtain the multi-arm star copolymerβ-CD~~[~~P(AA-co-MMA) -b-PVP]. The chemical structures of RAFT agents and polymers were characterized by FT-IR. From the results of pyrene fluorescence and TEM measurement, it was confirmed that these amphiphilic polymers could self-assemble in aqueous media to form micelles. In addition, the critical micelle

Concentration (CMC) of the polymers can be regulated from 0.98×10-3~5.24×10-2 g/L,

Indicating that the series polymer has good drug-loaded stability.

2. Vinpocetine (VP), as a model drug, was physically loaded into micelles by film dispersion method, solvent evaporation method and dialysis method. The effects of methods on drug loading content and entrapment efficiency were investigated. It was found that the solvent evaporation method was the most suitable for the preparation of VP-loaded micelles, with higher drug loading and entrapment efficiency than the other two methods. For solvent evaporation method, the effects of type of polymer, type of organic solvent, organic solvent to water ratio, dosage, polymer concentration, mixing temperature, stirring speed, stirring time and solvent evaporation temperature were investigated. After that, the AM-PK111-4P1 was chose

To orthogonal optimization test with the factors of dosage, the amount of polymer, stirring time and stirring speed. A L16(45) orthogonal design was done to get the best VP-loaded micelles process of drug dosage of 25 mg, amount of polymer of 50 mg,

Stirred for 2 h and stirring speed of 1400 rpm. Through the program drug loading and encapsulation efficiency of VP-loaded micelle were (21.44±0.14) % and (49.05±0.36) %, respectively.

3. VP-loaded micelles were characterized by FT-IR, DLS and TEM. It was confirmed that VP package set out in the formation of polymer micelle nuclear. The average particle size of the VP-loaded micelles was about 65 nm and the particle size distribution was narrow, and the micelles showed a good round on TEM. It was shown that in certain sustained-release ability and pH-sensitive characteristics of VP-loaded micelles having a faster release rate in the conditions of low pH (pH4.5) in *in vitro* release studies. Differences in the release rate of the VP micelles prepared by different polymers were presented.

4. Two kinds of polymer were selected to studies of *in vivo* pharmacokinetics and tissue distribution in rats, and commercially available VP injection was as control. The results showed that, compared with the commercial VP injection, VP-loaded micelles have obvious lung targeting, and other organizations within the drug concentration in the injection group at the same level.

Overall, the series of multi-arm star copolymers based on theβ-CD has a certain application prospect which worthy of in-depth study.

Keywords: amphiphilic star polymer; Micelles; Vinpocetine; *In vitro* release; Tissue distribution

# 第一章 绪论

## 1 引言

脂溶性药物由于在水中的溶解性能差而极大地限制了其在临床上的广泛应用，因此开发有效的药物传递系统是一项十分有意义的工作。作为理想的药物传递系统，它必须具有良好的生物相容性、生物可降解性，同时，能够将药物转运到体内特定部位，并在该部位释放药物。为开发负载能力高且在体内相对稳定的药物输送载体，从20世纪80年代即开始了以两亲性嵌段共聚物包埋药物的胶束

体系的研究[[1]](#_bookmark91)。经过近30年的发展，对聚合物胶束给药体系的研究已不断深入，其中设计开发载药性能更优良的新型聚合物载体是一个重要的研究方向。

众所周知，聚合物的链结构将直接影响其化学和物理性能，因此设计和研究具有不同拓扑结构的功能化聚合物材料是提高胶束载药性能的重要途径。近年来，随着聚合技术和方法的不断发展，对胶束载体（高分子聚合物）的研究已经不仅仅局限于线型聚合物的合成和改性，许多具有复杂结构的非线型聚合物，如超支化或树形聚合物、接枝聚合物、星形聚合物、星形嵌段聚合物和杂臂星形聚合物受到了越来越多的关注。这些聚合物特殊的拓扑结构带来的特异性能在药物载体应用上引起了研究者的广泛兴趣[[2,](#_bookmark92) [3]](#_bookmark93)。

本课题的中心思想是设计并合成一系列两亲性星型聚合物，通过评价聚合物的载药能力、体内外释药行为及体内组织分布，比较其链结构对载药性能的影响。本章，我们将简要介绍本课题的研究背景、研究进展与研究目标。

## 2 环糊精及其衍Th物

### 2.1 环糊精的概况

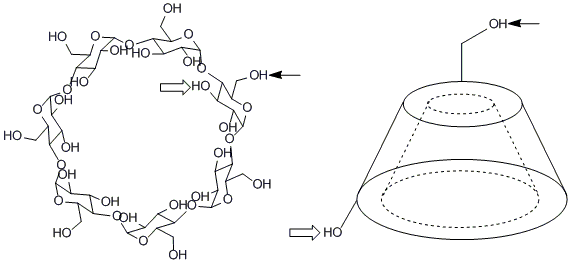
环糊精(Cyclodextrin, 简称CD)是直链淀粉经环糊精葡萄糖基转移酶作用后形成的一系列环状低聚糖的总称，通常含有6~12个D-吡喃葡萄糖单元，由Villiers于1891年最先发现[[4]](#_bookmark94)。目前研究较多的环糊精是α-CD、β-CD和γ-CD，分别由

6、7、8个D-吡喃葡萄糖单元通过α-1,4糖苷键连接而成。X-线晶体衍射、红外光谱和核磁共振波谱分析的结果表明，构成环糊精分子的每个D(+) -吡喃葡萄糖

都是椅式构象，环糊精分子结构呈上宽下窄、两端开口、中空的“锥筒”状，且有腔内疏水、腔外亲水的特性，如图1.1所示。研究显示，环糊精分子的内腔直径（α-CD、β-CD和γ-CD分别为4.7-5.3Å、6.0-6.5Å和7.5-8.3Å）和外腔直径

（α-CD、β-CD和γ-CD分别为14.6±0.4Å、15.4±0.4Å和17.5±0.4Å）均随葡萄糖单元的增加而增大，这样的特殊结构使得环糊精分子可以通过氢键、疏水作用和范德华力等作用，与疏水性药物分子形成稳定的包合物，在医药领域应用广泛

[[5,](#_bookmark95) [6]](#_bookmark96)。



**图1.1** **β-CD结构示意图**

在常见的三种环糊精中，β-CD的生产成本低、内腔尺寸适中，是作为药物载体最常用的一种。但是，由于分子内氢键的影响，β-CD在三种常见的环糊精分子中刚性最强而溶解性最差。在室温下，α-CD、β-CD和γ-CD在水中的溶解量分别为13%、2%和26%(w/w)，这使β-CD在应用中受到一定的限制[[7]](#_bookmark97)。本课题以β-CD为中心，进行衍生化以克服其溶解性较差的最大缺点。

### 2.2 环糊精衍Th物

环糊精衍生物是指在保持大环基本骨架不变的前提下引入取代基，以修饰环糊精，得到不同性质和功能的环糊精衍生物。环糊精分子中含有大量的羟基，如β-CD含有21个羟基（7个伯羟基和14个仲羟基），而且所有的羟基都落在“锥筒”状结构的外侧，这样的特殊结构赋予了环糊精一个重要性质——可修饰性[[8]](#_bookmark98)。尽管β-CD具有一个空腔，可结合底物或客体分子，但用于构筑功能化超分子聚集体则显得力不从心，加上β-CD较低水溶解度的缺点。因此，对环糊精进行结构修饰非常有意义。通过修饰可以达到以下目的[[9]](#_bookmark99)：引入基团改善水溶性，扩大

结合或者提供有特定几何开关的空间，构筑有特殊功能的超分子，融入高分子结构获得有特殊性质的新材料。

重要的环糊精衍生物包括酯衍生物、醚衍生物、去氧衍生物及二聚环糊精等。2-羟丙基-β-环糊精和磺丁基醚-β-环糊精是其中非常具有挖根生的两种环糊精衍生物，可用于口服和非肠道给药系统，已经获得美国FDA的批准，应用于数种注射性药物配方中[[10]](#_bookmark100)。

近年来兴起的通过化学键合、聚合物链或基团包结、复合等方法构筑含环糊精的聚合物，大都具有环糊精的包结、识别、缓释等能力，又兼具聚合物良好的机械性能、稳定性和可调控性[[11]](#_bookmark101)。含环糊精聚合物可基于非共价键构筑，当聚合物链段的横截面积与环糊精内腔直径相匹配时，环糊精就能和聚合物发生包结作用，形成（准）聚轮烷；也可基于共价键构筑，利用环糊精上的羟基作为反应官能团修饰成环糊精单体，再均聚成线性聚合物，或以环糊精为中心，在多个羟基上连接聚合物，得到多臂星型嵌段聚合物。

其中以两亲性聚合物链构筑的含环糊精聚合物，在胶束给药体系中应用比较广泛。两亲性环糊精聚合物由于能够自组装形成纳米级的胶束载药系统，是一类具有广阔应用前景的药物载体[[12]](#_bookmark102)。黄燕玉等[[13]](#_bookmark103)，将不同相对分子质量的聚乙二醇单甲醚-聚乳酸(mPEG-PLA)分别连接到N-(2-氨乙基)胺基-β-环糊精上，制得不同相对分子质量的两亲性聚乙二醇单甲醚-聚乳酸-β-环糊精(mPEG-PLA-β-CD)，并以布洛芬为模型药物初步考察4个聚合物的载药性能。苟鹏飞等[[14]](#_bookmark104)，结合配位-插入开环聚合(controlled ring opening polymerization, CROP)及原子转移自由基聚合(atom transfer radical polymerization, ATRP)机理，成功制备出以β-CD为核、14臂聚ε-己内酯(PCL)为疏水端、7臂聚丙烯酸(PAA)为亲水端的两亲性多臂星型聚合物。

## 3 两亲性嵌段聚合物

### 3.1 两亲性嵌段聚合物概况

两亲性嵌段聚合物是指分子中既具有很长的疏水性链段，又具有很长的亲水性链段的高分子聚合物，亦称为高分子表面活性剂。两亲性嵌段聚合物兼具高分子的增粘性和低分子的表面活性，对水相与油相皆有良好亲和力，因而具有很多

独特的物理化学性质[[15]](#_bookmark105)。按其空间构型，两亲性嵌段聚合物主要分为线性、树枝状和星型三种。

星型聚合物，指三条或三条以上的线性聚合物链通过有限的结点连接而形成的“星状”聚合物。星型聚合物和具有相近分子量的线性聚合物相比，因其具有较小的原子空间排列尺寸，其本体和溶液黏度较低，还具有较低的结晶温度和扩散系数以及高官能化的分子表面。其中，以两亲性线性聚合物构筑的星型聚合物，同样具有两亲性特征，也具有独特的微相形态及一些特殊性质和功能。在医药领域中，这些多臂星型聚合物在水溶液中能自组装形成胶束，具有良好的药物包载能力、生物相容性和生物可降解性，且能通过基团修饰获得如受体靶向等新功能，近年来备受研究者关注[[16]](#_bookmark106)。

### 3.2 两亲性嵌段聚合物的合成

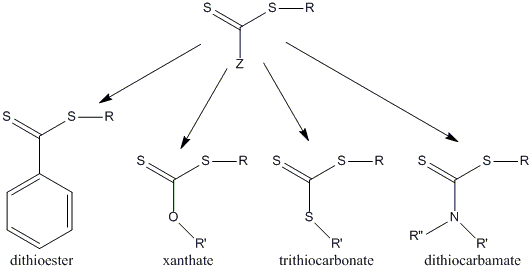
两亲性嵌段聚合物的合成起初时主要是通过活性阴离子聚合和活性开环聚合(POP)实现，随着活性/控制自由基聚合（living/controlled radical polymerization,

CRP）技术的发展而变得更加容易、多样化。目前，活性/控制自由基聚合主要分为四类：1）引发链转移终止剂(Iniferter)，首次出现于Otsu等[[17]](#_bookmark107)报道，2)氮氧自由基调控聚合(nitroxide mediated polymerization, NMP), Georges等[[18]](#_bookmark108)在自由基聚合中加入稳定氮氧自由基实现了苯乙烯的活性自由基聚合，3)原子转移自由基聚合

（ATRP）, 1995年世界上3个研究小组（Matyjaszewski小组、Percec小组、Sawamoto小组）[[19-21]](#_bookmark109)同时报道的一种活性自由基聚合，4）可逆加成-断裂链转移聚合(reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization, RAFT), Rizzardo在第37届国际高分子大会上作了“Tailored polymers by free radical processes"报告，首次提出了RAFT概念[[22]](#_bookmark110)。

RAFT聚合是在通用自由基聚合引发剂如AIBN、BPO作用下，加入链转移剂，与自由基发生加成断裂链转移而生成休眠种（称为大分子RAFT试剂），该聚合物链端仍具有高效链转移能力，可与增长自由基发生快速可逆交换反应，从而实现活性/控制自由基聚合，2005年由Rizzardo等人对RAFT聚合的概况、机理、RAFT试剂的结构对聚合的影响、RAFT聚合中的阻滞现象、RAFT聚合的应用等内容进行了详细综述[[23]](#_bookmark111)。上述链转移剂具有很大的链转移常数，被称为

RAFT试剂，主要是二硫代酯和三硫代酯类化合物，通式如图1.2所示，其中Z基团影响加成断裂速度，R基团作为自由基离去基团，形成的自由基能再引发聚合[[24]](#_bookmark112)。



**图1.2** **具有不同功能性Z基团的主要RAFT试剂结构**

RAFT聚合的特点表现在[[25]](#_bookmark113)：1）适用的单体范围较广，RAFT聚合不仅适用于苯乙烯、（甲基）丙烯酸酯、丙烯睛等常用单体，还可用于丙烯酸、苯乙烯磺酸钠等功能单体，甚至是带羟基、叔胺基等官能团的单体，2）聚合条件较温和，

RAFT聚合可在传统的自由基聚合条件下进行，合适的反应温度范围较宽（一般在40~160°C），且反应过程无需保护和解保护操作，3）聚合实施方法多样，可用本体、乳液、悬浮等方法，加料方式可用间歇、半连续、连续加料，4）可在活性末端引入功能基团，或组成嵌段、梳形、星型及其它复杂拓扑结构的聚合物。

在已报道的RAFT试剂中，应用于合成多臂星型聚合物的二硫代酯链转移剂主要有两类[[26]](#_bookmark114)：一类是“core-first”方法，多官能团RAFT试剂通过R基团与核相连，即聚合物链段是从多官能团的核向外增长的，其聚合过程中链的增长是始终在核的表面进行。这种方法的优点在于可以获得臂数准确、臂长可控的星型聚合物，线性聚合物的含量较少，但是，由于多官能团的引发齐需要预先合成，官能团的数目决定了星型聚合物“臂”的数目，所以合成臂数较多的星型聚合物非常困难，也会导致引发点之间的空间位阻效应，使各位点的引发速率不一致，从而导致合成的星型聚合物的分子量分布较宽。另一类是“arm-first”方法，多官能团RAFT试剂Z基团与核相连，即先合成聚合物线形链段，然后通过链转移反应转移到官能化的核上，其聚合过程中链的增长是脱离核的。这个方法可获得

多达百臂的星型聚合物，但无法精确控制臂数，且产物中混有较多数量的线性聚合物。这两类合成方法各有优缺点，视使用场合而选取。

## 4 两亲性嵌段聚合物的自组装

### 4.1 两亲性高分子的胶束行为

两亲性高分子自组装形成胶束是高分子聚集行为中重要的一种。胶束的特殊结构使其在现代工业中有着重要的应用前景，如将胶束用作纳米微反应器得到单分散的金属粒子和半导体纳米粒[[27,](#_bookmark115) [28]](#_bookmark116)。在医药领域中，胶束的尺寸与典型的病毒相近，且可在血液中循环较长时间，也能穿透肿瘤组织中被破坏的毛细血管，因此在药物的输运、靶向载体等应用研究受到越来越多的重视[[29,](#_bookmark117) [30]](#_bookmark118)。

两亲性嵌段聚合物是聚合物自组装的最主要研究对象，其自组装主要在选择性溶剂中进行，当其具有较长的亲水链段时，可直接溶解在水中形成大壳小核的星形胶束，相反，当其具有较长的疏水链段时，在选择性溶剂中会形成大核小壳的胶束，即“平头胶束”(crew-cut)[[31]](#_bookmark119). Eisenberg等研究表明，相对于星形胶束，平头胶束聚集体系会发生多种形态的变化，平头胶束和星型胶束示意图如图1.3。

Eisenberg等[[32-35]](#_bookmark120)指出，胶束的形态和尺寸主要受三个因素影响：1）聚集体核与壳之间的表面能，2）核链段的伸展，3）壳链段之间的排斥。因此，聚合物组成、共溶剂及选择性溶剂用量、环境的温度、溶液pH值及浓度等因素决定了胶束形态和尺寸。



**图1.3** **平头胶束和星型胶束示意图。(a)星型胶束，(b)平头胶束**

多臂星型嵌段聚合物的自组装与线性聚合物的基本原理和研究方法基本一致，但多臂星型嵌段聚合物的临界胶束浓度较高，且可形成单分子胶束[[36]](#_bookmark121)。而单分子胶束一般是单分散的，结构较稳定，不会随外界条件如浓度、溶剂的变化而变化。

### 4.2 聚合物胶束的药物负载方式

当前，聚合物胶束负载药物的方式主要有以下三种[[37]](#_bookmark122)：

物理包埋，这是最常用的方式，即药物直接被包埋于聚合物胶束核内，主要用于非离子型脂溶性药物的负载。

化学结合，即药物以化学键形式连接在聚合物嵌段中的特定基团上。这种方法能使胶束的包封率接近100%，但只有药物和聚合物间的化学键是可逆的，才能顺利释放药物。

静电结合，某些带阳离子的聚合物疏水嵌段，在水溶液中可与带阴离子的

DNA质粒、寡核苷酸等通过静电作用结合而形成胶束。

### 4.3 载药胶束的制备方法

载药胶束的制备方法主要是针对以物理包埋方式负载药物的情况，最常用的制备方法是有机溶剂挥发法和透析法等。

有机溶剂挥发法[[38]](#_bookmark123)是将药物和聚合物同时溶解于甲醇、乙醇等有机溶剂中，然后在剧烈搅拌下加入去离子水，再把有机溶剂完全除去而得到载药胶束。

透析法[[38]](#_bookmark123)是将药物和聚合物同时溶解于二甲基亚砜等高沸点溶剂中，装入截留分子量小于药物和聚合物但大于溶剂的透析袋中，在去离子水中进行透析，直至有机溶剂去除干净而得到载药胶束。由于透析袋的截留分子通常比较药物分子大，在透析过程中，药物流失较多，使得载药胶束的载药量大部分情况下比有机溶剂挥发法低。

基于超临界二氧化碳的制备方法[[39]](#_bookmark124)，该法与有机溶剂挥发法原理上相似，即以超临界二氧化碳代替有机溶剂溶解药物，然后加入到聚合物水溶液中，充分搅拌后释压放出二氧化碳而制得载药胶束。

## 5 两亲性嵌段聚合物胶束在给药系统中的应用

### 5.1 作为疏水性药物的载体

聚合物胶束天然的疏水核是良好的疏水性药物载体。Okano等[[40]](#_bookmark125)用聚氧乙烯

-聚（β-苯甲酰-天冬氨酸酯）(poly(ethylene oxide) -b-poly(beta benzyl-L-aspartate), PEO-PBLA)胶束负载庚烯类抗真菌药两亲霉素B，使其溶解度增至5 mg/mL，是原来溶解度的1万倍。

除了化学药，聚合物载药系统也被引入至中药制剂领域，张文涛等[[41]](#_bookmark126)以聚乙二醇单甲醚-聚乳酸(mPEG-PLA)为载体负载冬凌草甲素制备成胶束，体外释放显示出良好的缓释效果。聚合物胶束的应用对于开发含疏水性成分的中药提供了新的研究方向。

### 5.2 被动靶向给药系统

两亲性嵌段聚合物胶束利用其较小的粒径降低网状内皮系统(reticuloendothelial system, RES)的识别与摄取，并利用肿瘤特有的高通透性和滞留效应(enhanced permeability and retention effect, EPR)在肿瘤区选择性蓄积以实现被动靶向[[42]](#_bookmark127)。Lukyanov 等[[43]](#_bookmark128)以聚乙二醇-聚磷脂酰乙醇 胺

（polyethyleneglycol-b-phosphatidylethanolamine conjugates, PEG-PE）制备成粒径在7-20 nm范围的胶束，兔子体内分布结果显示，胶束在感染部位的蓄积量为正常心脏肌肉中的8倍，这表明EPR效应是局部蓄积的主要驱动力。

### 5.3 主动靶向给药系统

在两亲性嵌段聚合物胶束表面接上特殊识别分子的配体，如糖基、肽基、叶酸、抗体等，通过靶标分子的特异性结合，实现药物定向输运至靶区发挥作用。

Jing等[[44]](#_bookmark129)将叶酸接在单甲氧基聚乙二醇-聚乳酸-聚赖氨酸(methoxypoly(ethylene glycol) -block-poly(L-lactide) -block-poly(L-lysine)，PEG-PLA-PLL)三嵌段聚合物的赖氨酸基团上，负载荧光试剂mFITC制备成胶束，分别在Hela和CHO细胞系中考察mFITC的细胞内分布情况。结果显示，无叶酸胶束在两种细胞中平均分布，而含叶酸胶束更多的分布在Hela细胞中，因只Hela细胞有叶酸受体。

### 5.4 物理化学靶向给药系统

在靶向药物输送系统中研究最多的是pH/温度响应胶束。Kin和Lee等[[45]](#_bookmark130)采用聚乙二醇单甲醚-聚（β-胺基酯）(MPEG-PbAE)聚合物制备胶束，其中PbAE基团的pKb约6.5，当胶束进入肿瘤组织（即在pH 6.4-6.8时），氨基质子化使PbAE由疏水性转变为亲水性，使胶束快速解胶束化并释放药物。通过对荷人乳腺癌MDA-MB231的小鼠试验表明，相对于DOX溶液，载DOX胶束的抗癌效果极其显著，且毒副作用低。

## 6 课题的提出

由前面绪论部分可清楚地看到，聚合物胶束在给药系统中具有非常广阔的应用前景，通过构建新型两亲性嵌段聚合物作为药物载体，无论是基础研究，还是应用研究，都具有十分重要的意义。

β-CD因其内腔与脂溶性药物分子具有一定的包合作用，在作为药物载体上得到了广泛的研究和应用。然而，β-CD自身在水中溶解度较小，药物包载能力不够好等因素，在一定程度上限制了其应用。将β-CD通过非共价或共价方式与聚合物相结合制备结构复杂、形态各异的β-CD聚合物体系，有望克服β-CD自身的缺陷。设计并合成具有良好生物相容性、生物可降解性的两亲性β-CD聚合物用于胶束给药体系，可实现：延长药物体内循环时间；在病灶富集，提高药物利用率；控制药物的释放，减小对正常组织器官的副作用，增大治疗窗口。这正是本课题的立足点。

本课题首先利用β-CD上的伯位羟基易进行化学修饰的特点，以β-CD为中心，以RAFT 聚合技术引入生物相容性优良的聚（丙烯酸－甲基丙烯酸甲酯）

（P(AA-co-MMA)）、聚乙烯基吡咯烷酮（PVP）嵌段，得到一系列具有不同臂链数和嵌段比例的两亲性β-CD星型聚合物。其次对合成的两亲性β-CD星型聚合物进行自组装成型及负载药物，考察聚合物链结构、胶束制备工艺对载药性能的影响。然后研究载药胶束在不同pH条件下的药物释放行为及在大鼠体内的组织分布行为。

全文分为五章，主要内容如下：

1. 第一章：绪论。介绍了环糊精及其衍生物、两亲性嵌段聚合物及其自组装和聚合物胶束在给药系统中的应用。

2. 第二章：基于β-环糊精的星型聚合物的合成及表征。以β-CD为基础设计多官能团大分子引发剂，通过RAFT聚合，以“core-first”的方式，合成以β-CD为中心的两亲性星型聚合物，并对合成的聚合物进行表征，考察其在水溶液中的胶束化行为；

3. 第三章：两亲性β-环糊精星型聚合物载药胶束的制备及优化。以长春西汀为模型药物，考察两亲性β-CD星型聚合物的载药性能，并对载药胶束的制备处方工艺进行优化；

4. 第四章：载药胶束的表征及体外释放行为研究。对负载长春西汀的两亲性β-CD星型聚合物胶束进行理化性质表征，及体外释放试验；

5. 第五章：载药胶束在大鼠体内的组织分布研究。对负载长春西汀的两亲性β-CD星型聚合物胶束进行体内药动学与组织分布考察。

# 第二章 基于β-环糊精的两亲性星型聚合物的合成及表征

## 1 引言

新型药物载体是随着药剂学、生物材料科学和临床医学的发展而兴起的一种制剂技术，其关键在于载体材料的选择，目前已有各种高分子材料和无机材料被用于新型药物载体的研究。作为理想的新型药物输送和控释载体材料，应当是无毒、可生物降解和生物相容的。作为天然产物的β-CD[[46,](#_bookmark131) [47]](#_bookmark132)，以及丙烯酸[[48,](#_bookmark133) [49]](#_bookmark134)、N-乙烯基吡咯烷酮[[50,](#_bookmark135) [51]](#_bookmark136)，均具有良好的生物相容性，对细胞、酶、微生物等无毒性作用，广泛应用于药物载体及医用生物材料领域。

本章首先以P4S10为介质，将β-CD上的伯位羟基与对甲氧基苯甲酸的羧基反应，制得含二硫代酯基团的RAFT试剂，然后以RAFT乳液聚合方式依次引入P(AA-co-MMA)、PVP聚合物链段，得到一系列具有不同臂链数和嵌段比例的两亲性β-CD 星型聚合物（β-CD~~[~~P(AA-co-MMA) -b-PVP] x）。对合成的两亲性β-CD星型聚合物其进行了FT-IR、NMR等表征，同时用芘荧光探针法和TEM等研究了聚合物在水溶液中的胶束化行为，测定了聚合物的临界胶束浓度。

## 2 实验部分

### 2.1 原料、试剂与仪器

β-环糊精（β-Cyclodextrin, β-CD），≥98%，国药集团化学试剂有限公司；丙烯酸（acrylic acid, AA），AR，阿拉丁试剂（上海）有限公司；

甲基丙烯酸甲酯（methyl methacrylate, MMA），AR，阿拉丁试剂（上海）有限公司；

N-乙烯基吡咯烷酮（N-Vinyl-2-pyrrolidone, NVP），≥99%，Sigma-Aldrich, Co.,

LLC.；

对甲氧基苯甲酸（4-Methoxybenzoic Acid, MBA），≥98%，阿拉丁试剂（上海）有限公司；

五硫化二磷（phosphorus pentasulfide, P4S10），CP，国药集团化学试剂有限公司；2, 2-偶氮二异丁腈（azodiisobutyronitrile, AIBN），≥99%，阿拉丁试剂（上海）

有限公司；

氢氧化钾（potassium hydroxide, KOH），ACS，阿拉丁试剂（上海）有限公司；丙烯酰氯（acryloyl chloride），≥96%，阿拉丁试剂（上海）有限公司；

芘（pyrene），≥99%，阿拉丁试剂（上海）有限公司；

1,4-二氧六环（diethylene dioxide, Dio），AR，广州化学试剂厂；三乙胺（triethylamine, TEA），AR，广州化学试剂厂；

透析袋，MWCO＝3500&7000, Spectrum Laboratories, Inc.；其它试剂均为分析纯或以上。

集热式恒温加热磁力搅拌器，DF-101S型，巩义市予华仪器有限责任公司；旋转蒸发器，RE-52A型，上海亚荣生化仪器厂；

循环水式真空泵，SHZ-D(III)型，巩义市予华仪器有限责任公司；真空干燥箱，DZF-6020MBE型，上海博迅实业有限公司；

电热鼓风干燥箱，GZX-9240MBE型，上海博迅实业有限公司；

pH计，STARTER 2100 / 3C Pro型，OHAUS, Co.；电子天平，CP114型，OHAUS, Co.；

TEM, JEM-2100型，JEOL Ltd；

傅立叶红外光谱仪，Spectrum 100 Optica型，PerkinElmer Inc.；动态光散射粒径仪，Delsa™Nano C型，Beckman Coulter, Inc.；荧光分光光度计，RF-5301PC型，Shimadzu, Co.；

真空冷冻干燥机，LGJ-18A型，北京四环科学仪器厂有限公司。

### 2.2 原料与试剂的精制

β-CD：经去离子水两次重结晶纯化后，80°C下真空干燥12小时，置干燥器中备用；

AIBN：经乙醇两次重结晶纯化后，40°C下真空干燥1小时，置干燥器中备用；

AA：减压蒸馏，置冰箱4°C中保存；

MMA：经10%氢氧化钠溶液洗至水层无色，减压蒸馏，置冰箱4°C中保存；

TEA：经氢氧化钙干燥后，减压蒸馏，密封保存； Dio：加入金属钠和二苯甲酮指示剂，在氮气保护下，回流8小时左右，当出现

蓝色时，蒸出，密封保存；

DMF：加入无水硫酸镁室温下放置过夜，回流4小时，减压蒸馏，密封保存。

### 2.3 系列两亲性β-CD星型聚合物的设计思路

本课题目标为考察两亲性β-CD星型聚合物的臂链结构对其载药性能的影响。所设计的系列聚合物规律为：1）改变由RAFT官能团决定的臂数，我们选取了3~6臂进行合成，2）改变AA与MMA单体的比例，我们选取了3: 1、7:1、

11:1、15:1四种比例，3)改变P(AA-co-MMA)与PVP嵌段的比例，我们选取了

1: 5、1:8两种比例。

### 2.4 基于β-CD的二硫代酯RAFT试剂的合成

反应路线如下：



取β-CD 5.675 g(5 mmol)、KOH 0.421 g（7.5 mmol）放置于带磁力搅拌的干燥烧瓶中，加入Dio 80 mL先在室温下搅拌5 min；分别加入MBA 2.283 g（15 mmol）和P4S10 3.334 g（15 mmol），继续搅拌；升温至120°C，回流30 h，观察反应体系的变化；停止加热放凉后过滤，固体转至300 mL丙酮-水(1:1, v/v)中，充分搅拌30 min后过滤，重复洗3次；得到的固体置真空干燥箱内50°C干燥，得到目标产物含三个二硫代苯甲酸酯基团的RAFT试剂（CTA1）。

β-CD的用量不变，将MBA和P4S10的用量依次增加至20 mmol、25 mmol

和30 mmol，分别制得含四个、五个和六个二硫代苯甲酸酯基团的RAFT试剂

（CTA2、CTA3、CTA4）。

### 2.5 丙烯酰化β-CD的合成

反应路线：



取DMF 80 mL放置于带磁力搅拌的干燥烧瓶中，置于0°C冷却液中冷却，待烧瓶内温度降至稳定；加入β-CD 17.025 g(15 mmol)、TEA 2.10 mL（15 mmol），搅拌5 min；取丙烯酰氯1.22 mL（15 mmol）置于恒压滴液漏斗中，加入DMF 20

mL混匀；以1 d/s的速度滴加进烧瓶中，反应24 h，观察反应体系的变化；将反应所得混悬液倒至500 mL丙酮中沉淀，轻轻搅拌至沉淀不再增加，过滤；将粗产物用滤纸包裹，置于索氏提取器（soxhlet extractor）中，用丙酮索氏提取2 h，提取两次；将所得固体置真空干燥箱内30°C干燥，得到目标产物单取代丙烯酰化β-CD（A1-β-CD）。

### 2.6 β-CD~~[~~P(AA-co-MMA)]x的合成

反应路线：



向带磁力搅拌的干燥反应茄瓶通氩气2 min 除去空气；加入上述合成的

RAFT试剂；加入乙醇-水混合溶剂使RAFT试剂溶解；加入AA、MMA；用真空气体分配器连接反应茄瓶阀门，对反应体系进行循环抽排－充入氩气操作，以除去系统中的氧气；加入AIBN 0.016 g（0.1 mmol），再进行循环抽排－充入氩气操作；密闭反应茄瓶置于70°C反应18 h；将反应茄瓶取出置于冰水浴中冷却并打开瓶口，终止反应，反应混合物用乙酸乙酯沉淀，将所得沉淀物置真空干燥箱内45°C干燥，得β-CD~~[~~P(AA-co-MMA)]x产物。

通过使用不同的RAFT 试剂，调整AA、MMA 的加入量，得系列

β-CD~~[~~P(AA-co-MMA)]x聚合物，各试验的试剂用量与产物编号见表2.1。

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  |  |  |
|  | CTA (g) | 乙醇-水 (mL) |  | AA (mL) | MMA (mL) | 产物编号 |
| CTA1 | 0.4 | 15+10 |  | 7.92 | 1.75 | AM-PK115-3 |
|  | 0.4 | 15+10 |  | 8.30 | 1.17 | AM-PK115-4 |
|  | 0.4 | 15+10 |  | 8.49 | 0.88 | AM-PK115-5 |
|  | 0.4 | 15+10 |  | 7.24 | 2.80 | AM-PK115-6 |
| CTA2 | 0.4 | 15+10 |  | 7.70 | 1.70 | AM-PK111-3 |
|  | 0.4 | 15+10 |  | 8.10 | 1.14 | AM-PK111-4 |
|  | 0.4 | 15+10 |  | 8.30 | 0.86 | AM-PK111-5 |
|  | 0.4 | 15+10 |  | 7.00 | 2.71 | AM-PK111-6 |
| CTA3 | 0.4 | 15+10 |  | 8.76 | 1.93 | AM-PK112-3 |
|  | 0.4 | 15+10 |  | 9.18 | 1.29 | AM-PK112-4 |
|  | 0.4 | 15+10 |  | 9.39 | 0.97 | AM-PK112-5 |
|  | 0.4 | 15+10 |  | 8.01 | 3.1 | AM-PK112-6 |
| CTA4 | 0.4 | 15+10 |  | 9.69 | 2.14 | AM-PK113-3 |
|  | 0.4 | 15+10 |  | 10.15 | 1.43 | AM-PK113-4 |
|  | 0.4 | 15+10 |  | 10.38 | 1.07 | AM-PK113-5 |
|  | 0.4 | 15+10 |  | 8.86 | 3.43 | AM-PK113-6 |

**表2.1** **合成β-CD[P(AA-co-MMA)]x的处方表**

### 2.7 含A1-β-CD单体的β-CD~~[~~P(AA-co-MMA-co-A1-β-CD)]x的合成

反应路线：



向带磁力搅拌的干燥反应茄瓶通氩气2 min除去空气；加入A1-β-CD（与CTA

摩尔比为1: 1）和水，使A1-β-CD溶解；加入上述合成的RAFT试剂和乙醇，使

RAFT试剂溶解；加入AA、MMA；用真空气体分配器连接反应茄瓶阀门，对反应体系进行循环抽排－充入氩气操作，以除去系统中的氧气；加入AIBN 0.016 g

（0.1 mmol），再进行循环抽排－充入氩气操作；密闭反应茄瓶置于70 °C反应18 h；将反应茄瓶取出置于冰水浴中冷却并打开瓶口，终止反应，反应混合物用乙酸乙酯沉淀，将所得沉淀物置真空干燥箱内45°C干燥，得到β-CD~~[~~P(AA-co-MMA-co-A1-β-CD)]x产物。

通过使用不同的RAFT试剂，调整A1-β-CD、AA和MMA的加入量，分别制得不同β-CD单体含量的系列β-CD~~[~~P(AA-co-MMA-co-A1-β-CD)]x聚合物，各试验的试剂用量与产物编号见表2.2。

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  |  |  |
|  | CTA (g) | A1-β-CD (g) | 乙醇-水 (mL) | AA (mL) | MMA (mL) | 产物编号 |
| CTA1 | 0.4 | 1.451 | 20+10 | 7.92 | 1.75 | AP-PK115-1 |
|  | 0.4 | 1.451 | 20+10 | 8.49 | 0.88 | AP-PK115-3 |
| CTA2 | 0.4 | 1.053 | 20+10 | 7.66 | 1.69 | AP-PK111-1 |
|  | 0.4 | 1.053 | 20+10 | 8.21 | 0.85 | AP-PK111-3 |
|  | 0.4 | 2.106 | 20+10 | 7.66 | 1.69 | AP2-PK111-1 |
|  | 0.4 | 3.159 | 20+10 | 7.66 | 1.69 | AP3-PK111-1 |
|  | 0.4 | 4.212 | 20+10 | 7.66 | 1.69 | AP6-PK111-1 |
| CTA3 | 0.4 | 0.963 | 20+10 | 8.76 | 1.93 | AP-PK112-1 |
|  | 0.4 | 0.963 | 20+10 | 9.39 | 0.97 | AP-PK112-3 |
| CTA4 | 0.4 | 0.888 | 20+10 | 9.69 | 2.14 | AP-PK113-1 |
|  | 0.4 | 0.888 | 20+10 | 10.38 | 1.07 | AP-PK113-3 |

**表2.2** **合成含A1-β-CD单体的β-CD[P(AA-co-MMA-co-A1-β-CD)]x的处方表**

### 2.8 β-CD~~[~~P(AA-co-MMA) -PVP] x的合成

##### 反应路线1：



##### 反应路线2：



向带磁力搅拌的干燥反应茄瓶通氩气2 min 除去空气；加入上述合成所得

micro-CTA试剂（β-CD~~[~~P(AA-co-MMA)]x或β-CD~~[~~P(AA-co-MMA-co-A1-β-CD)]x）

1.2 g和乙醇，使溶解；再加入水，加入NVP；用真空气体分配器连接反应茄瓶阀门，对反应体系进行循环抽排－充入氩气操作，以除去系统中的氧气；加入AIBN 0.010 g（0.06 mmol），再进行循环抽排－充入氩气操作；反应茄瓶置于68°C反应18 h；将反应茄瓶取出置于冰水浴中冷却并打开瓶口，终止反应，反应混合物用乙酸乙酯沉淀，将所得沉淀物置真空干燥箱内45°C干燥，得β-CD~~[~~P(AA-co-MMA) -b-PVP] x终产物。

各试验的试剂用量与产物编号见表2.3。

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |
|  | 乙醇-水(mL) | NVP(mL) | 产物编号 |
| AM-PK115-3 | 6+13 | 9 | AM-PK115-3P1 |
|  | 8+24 | 13 | AM-PK115-3P2 |
| AM-PK115-4 | 6+13 | 9 | AM-PK115-4P1 |
|  | 8+24 | 13 | AM-PK115-4P2 |
| AM-PK115-5 | 6+13 | 9 | AM-PK115-5P1 |
|  | 8+24 | 13 | AM-PK115-5P2 |

**表2.3** **合成β-CD[P(AA-co-MMA) -b-PVP] x的处方表**

续表2.3

| AM-PK115-6 | 6+13 | 9 | AM-PK115-6P1 |
| --- | --- | --- | --- |
|  | 8+24 | 13 | AM-PK115-6P2 |
| AM-PK111-3 | 6+13 | 9 | AM-PK111-3P1 |
|  | 8+24 | 13 | AM-PK111-3P2 |
| AM-PK111-4 | 6+13 | 9 | AM-PK111-4P1 |
|  | 8+24 | 13 | AM-PK111-4P2 |
| AM-PK111-5 | 6+13 | 9 | AM-PK111-5P1 |
|  | 8+24 | 13 | AM-PK111-5P2 |
| AM-PK111-6 | 6+13 | 9 | AM-PK111-6P1 |
|  | 8+24 | 13 | AM-PK111-6P2 |
| AM-PK112-3 | 6+13 | 9 | AM-PK112-3P1 |
|  | 8+24 | 13 | AM-PK112-3P2 |
| AM-PK112-4 | 6+13 | 9 | AM-PK112-4P1 |
|  | 8+24 | 13 | AM-PK112-4P2 |
| AM-PK112-5 | 6+13 | 9 | AM-PK112-5P1 |
|  | 8+24 | 13 | AM-PK112-5P2 |
| AM-PK112-6 | 6+13 | 9 | AM-PK112-6P1 |
|  | 8+24 | 13 | AM-PK112-6P2 |
| AM-PK113-3 | 6+13 | 9 | AM-PK113-3P1 |
|  | 8+24 | 13 | AM-PK113-3P2 |
| AM-PK113-4 | 6+13 | 9 | AM-PK113-4P1 |
|  | 8+24 | 13 | AM-PK113-4P2 |
| AM-PK113-5 | 6+13 | 9 | AM-PK113-5P1 |
|  | 8+24 | 13 | AM-PK113-5P2 |
| AM-PK113-6 | 6+13 | 9 | AM-PK113-6P1 |
|  | 8+24 | 13 | AM-PK113-6P2 |
| AP-PK115-1 | 6+16 | 9 | AP-PK115-1P1 |
|  | 8+25 | 13 | AP-PK115-1P2 |

续表2.3

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| AP-PK115-3 | 6+16 | 9 | AP-PK115-3P1 |
|  | 8+25 | 13 | AP-PK115-3P2 |
| AP-PK111-1 | 6+16 | 9 | AP-PK111-1P1 |
|  | 8+25 | 13 | AP-PK111-1P2 |
| AP2-PK111-1 | 6+10 | 6 | AP2-PK111-1P1 |
|  | 6+16 | 9 | AP2-PK111-1P2 |
|  | 8+25 | 13 | AP2-PK111-1P3 |
|  | 7+25 | 18 | AP2-PK111-1P4 |
| AP3-PK111-1 | 6+10 | 6 | AP3-PK111-1P1 |
|  | 6+16 | 9 | AP3-PK111-1P2 |
|  | 8+25 | 13 | AP3-PK111-1P3 |
|  | 7+25 | 18 | AP3-PK111-1P4 |
| AP6-PK111-1 | 6+10 | 6 | AP6-PK111-1P1 |
|  | 6+16 | 9 | AP6-PK111-1P2 |
|  | 8+25 | 13 | AP6-PK111-1P3 |
|  | 7+25 | 18 | AP6-PK111-1P4 |
| AP-PK111-3 | 6+16 | 9 | AP-PK111-3P1 |
|  | 8+25 | 13 | AP-PK111-3P2 |
| AP-PK112-1 | 6+16 | 9 | AP-PK112-1P1 |
|  | 8+25 | 13 | AP-PK112-1P2 |
| AP-PK112-3 | 6+16 | 9 | AP-PK112-3P1 |
|  | 8+25 | 13 | AP-PK112-3P2 |
| AP-PK113-1 | 6+16 | 9 | AP-PK113-1P1 |
|  | 8+25 | 13 | AP-PK113-1P2 |
| AP-PK113-3 | 6+16 | 9 | AP-PK113-3P1 |
|  | 8+25 | 13 | AP-PK113-3P2 |

### 2.9 各合成产物的结构表征

#### 2.9.1 傅立叶红外光谱

采用Spectrum 100 Optica型傅立叶红外光谱仪（PerkinElmer Inc.）扫描各聚合物的FT-IR图谱。

样品的制备采用溴化钾压片法[[52]](#_bookmark137)，取样品2 mg置于玛瑙研钵中，加入预干燥的溴化钾100 mg，充分研磨混匀，然后移置于压模中，使分布均匀，将压模

水平放置于压片机座上，加压至15 MPa，保持2 min，取出样品片，经目视检查应均匀、表面平滑、透光好。扫描范围为4000~400 cm-1，分辨率为4 cm-1，扫描次数为3次。

### 2.10 β-CD~~[~~P(AA-co-MMA) -b-PVP] x在水溶液中胶束化的研究

#### 2.10.1 临界胶束浓度的测定

利用芘荧光探针法测定两亲性嵌段星型聚合 物

（β-CD~~[~~P(AA-co-MMA) -b-PVP] x）的临界胶束浓度（critical micelle concentration, CMC）[[53-55]](#_bookmark138)。首先以丙酮为溶剂配制一定浓度的芘储备液和聚合物储备液（芘在使用前经2次乙醇重结晶纯化），在20个10 mL棕色容量瓶中分别加入一定量的经丙酮稀释的芘溶液，常温下挥干丙酮；然后向各容量瓶依次加入系列聚合物储备液，用二次蒸馏水定容至刻度，得到0.05×10-3 g/L~1.00 g/L的聚合物溶液，其中芘的浓度为6.0×10-7 mol/L；将各溶液在室温下水浴超声30 min，转至60°C

水浴恒温30 min，降温至40°C恒温过夜，使芘和聚合物充分平衡；采用荧光分

光光度计分别扫描各溶液的荧光光谱图，荧光扫描的发射波长为390 nm，激发波长范围300~350 nm，激发和发射狭缝宽度均为5 nm，测定温度25°C。

#### 2.10.2 TEM表征聚合物的胶束化

采用透射电镜观察聚合物的形貌特征，将聚合物（AM-PK111-4P1）溶解于水中，浓度为1.00 mg/mL，滴于铜网支持膜上，室温下自然干燥，再进行透射电镜测试。

## 3 结果与讨论

### 3.1 基于β-CD的两亲性星型聚合物的合成与表征

RAFT聚合技术在第一章已作介绍，本章采用乳液聚合方式合成两亲性β-CD星型聚合物，用于药物载体研究。合成的流程主要分步：1）多官能团的二硫代酯RAFT试剂的合成，2）烯烃取代的环糊精的合成，3）以“core-first”的方式先引入臂链P(AA-co-MMA)或P(AA-co-MMA-co-A1-β-CD)嵌段，4)再在上一步所得臂链的外端引入PVP嵌段，5)产物的初步纯化与表征。

#### 3.1.1 RAFT试剂的合成与表征

由RAFT机理可知，决定RAFT聚合的关键在于RAFT试剂，即CTA(chain transfer agent)。CTA的聚合活性决定着聚合反应的成败，没有优良性能的CTA就不能使用RAFT聚合，由于目前市面上没有该类产品销售，只能依靠各科研工作者自行设计与探索，以求获得性能更优更容易分离纯化的CTA，这更突显了

CTA设计与合成的重要性。

本文采用P4S10“一锅煮”的方法[[56]](#_bookmark139)，合成CTA，即以P4S10为催化剂，用羧酸与醇反应得到二硫代酯。此反应经过两个步骤完成，第一步先生成硫代羧酸酯，第二步得到二硫代羧酸酯，因在实际操作过程中此反应是一步完成的，即“一锅煮”。该法具有操作简单、方便，且适用范围广等特点，适用于各种不同的酸和醇，可制备各种结构的二硫代羧酸酯。其反应机理如下：



**图2.1** **P4S10法合成二硫代酯的反应机理**

本章以β-CD的D-吡喃葡萄糖单元中较活泼的6位羟基与MBA中的羧基反应得到二硫代酯，通过调节反应原料的比例可得到不同二硫代酯基团数的RAFT试剂。将合成的二硫代酯RAFT试剂样品重结晶提纯，进行FT-IR测试，各RAFT试剂的FT-IR图谱如图2.2所示。



(A)

(B)





(C)

(D)





(E)

**图2.2** **合成的二硫代酯RAFT试剂的FT-IR图谱。**A)β-CD，B)三基团RAFT试剂，C)四基团RAFT试剂，D) 五基团RAFT试剂，E)六基团RAFT试剂

由β-CD的FT-IR图谱分析可知，3380 cm-1附近为β-CD中O—H的伸缩振动吸收峰，2928 cm-1处为—CH2的反对称伸缩振动吸收峰，1157 cm-1、1080 cm-1、1028 cm-1显示β-CD中C—O和C—O—C伸缩振动峰，1642 cm-1附近为β-CD中羟基面内弯曲振动的吸收峰。对比RAFT试剂的FT-IR图谱可知，β-CD的特征峰基本上保持不变，由于硫原子质量是氧原子的两倍，C＝S的伸缩振动频率比C＝O低得多，吸收强度也较弱，一般C—S的伸缩振动吸收也较弱，因而 C

＝S(1030 cm-1)、C—S（859 cm-1）等特征峰与β-CD的峰重叠。在1706 cm-1、1599 cm-1及1510 cm-1处出现苯环的骨架振动，这可以证明MBA被连接在环糊精上。而且，随着取代基团数增加，吸收强度随之增大。综合以上分析可以初步确定合成的RAFT试剂是含有[—C(＝S)—S—]结构的二硫代羧酸酯。

#### 3.1.2 β-CD~~[~~P(AA-co-MMA) -b-PVP] x的合成与表征

详细的RAFT聚合机理由Rizzardo等研究者[[57,](#_bookmark140) [58](#_bookmark141)]提出，RAFT聚合具有自由基反应的化学特性，在引发阶段必需要引入自由基才能产生单体自由基并进行链转移和增长。目前，RAFT 体系中的自由基产生方式主要有以下三种：1） 有机

自由基引发剂的分解[[59]](#_bookmark142)，2）通过外加方式引发（如此外辐照[[60]](#_bookmark143)、γ射线辐照[[61]](#_bookmark144)和等离子体引发[[62]](#_bookmark145)等），3） 单体自身热引发[[63]](#_bookmark146)。本文选用有机自由基引发剂的分解方式产生自由基，其聚合机理如图2.3所示。



**图2.3** **RAFT聚合机理**

本文选用AIBN作为自由基引发剂，实验表明其对选用的三种单体引发效果良好，所得产物产率达75%以上。其中一种聚合物样品（AM-PK111-4P1）的FT-IR图谱如图2.4所示。

与RAFT试剂的FT-IR图谱对比可知，AM-PK111-4P1终产物的FT-IR图谱中最显著的变化是1677.8 cm-1的特征峰，即C＝O伸缩振动吸收峰，可认为是来自PVP嵌段，而在1729.8 cm-1处的C＝O伸缩振动吸收峰则来自P(AA-co-MMA)嵌段，因其没有共轭而比PVP嵌段的羰基波数略大；1288.2 cm-1处为C—N伸缩振动吸收峰，来自PVP，其吸收强度较大；736.7 cm-1处为来自吡咯烷酮的C—H环弯曲振动弱吸收峰。由此可判断聚合物中含P(AA-co-MMA)和PVP两种嵌段。同时，吸收强度大大增加的2954.4 cm-1 处的吸收峰则表明体系中的亚甲基

（—CH2）显著增加，因只有当单体大量聚合成链状才会使亚甲基大量增加，这是聚合成功的重要特征。

对于其它批次的聚合物，因只是各单体的比例存在差异，由于各嵌段的特征峰有较多的重叠，故从FT-IR图谱上很难区分各种聚合物的差异。



**图2.4 合成的聚合物AM-PK111-4P1的FT-IR图谱**

### 3.2 β-CD~~[~~P(AA-co-MMA) -b-PVP] x在水溶液中的胶束化

#### 3.2.1 临界胶束浓度（CMC）

芘作为一种具有特征荧光发射谱的典型疏水性荧光物质，其荧光强度强烈依赖于溶剂的极性。与两亲性聚合物处于同一水环境时，随着胶束的形成芘会逐渐移向胶束的疏水内核中，使其荧光强度因周围环境极性的改变而发生显著的变化。根据这一原理，芘荧光探针法被广泛应用于聚合物胶束的临界胶束浓度

（CMC）的测定。Yukio、Meredith等[[64,](#_bookmark147) [65]](#_bookmark148)发现在发射波长为390 nm时，芘在333 nm和335 nm的激发光强度之比（I335/I333）是探针周围溶剂环境的函数：两亲性聚合物浓度小于CMC时，芘的I335/I333和其在水中的I335/I333相同，当浓度为CMC时，I335/I333急剧增大，当浓度大于CMC时，I335/I333变回常数，与聚合物浓度无关。杜坡、陈大为等[[66,](#_bookmark149) [67]](#_bookmark150)研究表明，聚合物浓度从低于CMC 到高于

CMC，芘的激发光谱带出现红移，选取强度较大的峰值波长的荧光强度值用于计算CMC值时更准确、灵敏。

本节选取其中一种聚合物（AM-PK111-4P1）为例讨论CMC计算过程。芘

在不同浓度的聚合物（AM-PK111-4P1）溶液中的激发光谱如图2.5所示。在较低浓度时（低于CMC），体系中没有胶束的存在，芘的荧光强度基本保持不变，表明聚合物分子是以分散状态存在于水中；当聚合物浓度大于CMC时，芘的荧光强度突然增大，并伴随着谱带的红移（333 nm→337 nm），表明胶束已经形成。因此，选取333 nm和337 nm的荧光强度值进行计算。以I337/I333作为纵坐标，以聚合物浓度（mg/mL）的对数值作为横坐标作图，如图2.6所示，从数据点可以看出有两个转折点。

参考Aguiar、陆国庆等[[68,](#_bookmark151) [69]](#_bookmark152)研究，数据的变化趋势符合Boltzmann公式时，采用该公式进行拟合，然后在曲线突变的中点）处作曲线的切线，与最低浓度点的曲线的切线相交，求得交点所对应的聚合物浓度即为CMC值。采用该法



求得CMC值相对于常用的线性拟合法更可靠。通常情况下，对低于CMC 的

值进行线性回归时，相关系数较小（一般小于0.9），这是产生误差的主要来源，而用Boltzmann公式拟合则可较好的减小误差。

Boltzmann公式，其中A1指低浓度下，A2 指高浓度下，指曲线突变的中点。

我们得到的数据符合Boltzmann公式，拟合曲线如图2.6所示，求得各参数

分别为，=0.322，A1=0.684，A2=1.571.

由Boltzmann公式可知，最低浓度点的曲线的切线为处曲线的切

线斜率，点的坐标。则切线方程可表示为，如图2.7所示。使两切线相交得交点，计算得AM-PK111-4P1的CMC为5.45×10-3 g/L。





**图2.5 芘在不同浓度的AM-PK111-4P1溶液中的激发光谱**

(1: 0.05×10-3 g/L, 2: 0.10×10-3 g/L, 3: 0.40×10-3 g/L, 4: 0.70×10-3 g/L,

5: 1.00×10-3 g/L, 6: 4.00×10-3 g/L, 7: 7.00×10-3 g/L, 8: 0.01 g/L, 9: 0.015 g/L,

10: 0.02 g/L, 11: 0.03 g/L, 12: 0.05 g/L, 13: 0.08 g/L, 14: 0.12 g/L,

15: 0.20 g/L, 16: 0.30 g/L, 17: 0.40 g/L, 18:0.60 g/L, 19: 0.80 g/L, 20: 1.00 g/L)



**图2.6** **CMC拟合曲线图**



**图2.7** **拟合曲线切线示意图**

在合成的系列聚合物中，选取了几种进行了CMC值的测定，结果如表2.4所示。结果显示，1）随着聚合物臂数的增加，CMC值逐渐减小，其中6臂聚合物的CMC值仅为3臂的1/22，这可能是由于臂数的增加（即每臂的链长变短），分子内各基团的空间排列较紧密，更容易形成疏水性内核，而使得CMC值变小；

2）由AM-PK111-4P1和AM-PK111-4P2的结果可知，PVP嵌段的增长，CMC值也随之增加，这是由于两者CMC值的摩尔浓度相当，而后者分子量增加，使得质量浓度增加；3）AA与MMA基团的比例改变对CMC值的影响不明显，变化均在一个数量级内，这可能是由于CMC值最大的影响因素是分子量，AA与MMA基团的比例改变是在理论分子量基本不变的前提下进行的，故CMC值变化不明显；4）聚合物分子中β-CD的含量增加对CMC值的影响不明显；

**表2.4** **聚合物CMC值表**

| 聚合物批号 | CMC 值(g/L) |
| --- | --- |
| AM-PK115-4P1 | 2.25×10-2 |
| AM-PK111-4P1 | 5.45×10-3 |
| AM-PK112-4P1 | 2.11×10-3 |
| AM-PK113-4P1 | 0.98×10-3 |
| AM-PK111-3P1 | 8.74×10-3 |
| AM-PK111-5P1 | 2.62×10-3 |
| AM-PK111-6P1 | 3.58×10-3 |
| AM-PK111-4P2 | 3.04×10-2 |
| AP-PK111-3P1 | 8.26×10-3 |
| AP-PK111-3P2 | 5.24×10-2 |

#### 3.2.2 TEM表征聚合物胶束化

从TEM图中可看出，聚合物在水中能形成类球状的分散粒子。由于未染色，故图中呈现出的中心较黑的部分为胶束核，外周略暗的部分为胶束壳，这表明聚合物形成了“核－壳”结构的典型胶束结构，即聚合物有形成胶束的能力。



**图2.8** **聚合物水溶液的TEM 图**

## 4 本章小结

本章成功运用RAFT聚合机理合成了一系列的β-CD~~[~~P(AA-co-MMA) -b-PVP] x聚合物，并以FT-IR确证各单体聚合成功。通过CMC的测定确证该系列聚合物能在水中形成胶束结构，且具有较低的临界胶束浓度。系列聚合物的成功合成为后续作为药物载体的应用作好了铺垫。

# 第三章 两亲性β-环糊精星型聚合物载药胶束的制备与优化

## 1 引言

对于现有的大量亲脂性药物，在临床应用上受到了很大的限制，通过亲水性改造或制成前药等方法可以增加药物在水中的溶解度，而通过选择合适的药物载体来增溶更是有效可行的方法，其不仅能以药物的原始活性形式输运药物，更能达到局部给药、靶向给药以更充分发挥其药效。聚合物胶束由于自身的优点，被广泛用于负载亲脂性药物，现今在环境响应（pH、温度响应等）和靶向给药系统中的应用更是遍地开花。

本章选用长春西汀作为主要模型药，以第二章所合成的系列两亲性β-CD星型聚合物（β-CD~~[~~P(AA-co-MMA) -b-PVP] x）为药物载体，进行了胶束制备方法的筛选；选取最佳方法与适当条件，考察所有合成的系列聚合物的载药能力，选取最佳聚合物；以最佳聚合物为药物载体，对最佳方法进行深入的制备工艺、处方优化。其次，选用尼莫地平为次要模型药，以上述最佳聚合物为药物载体，简单考察其载药能力，并与长春西汀胶束作对比。

## 2 长春西汀的理化性质

长春西汀（vinpocetine），化学名称为乙基(13aS, 13bS) -13a-乙基-2, 3, 5, 6, 13a, 13b六氢-1H-吲哚[3, 2, 1-de]吡啶[3, 2, 1-ij][1, 5]二氢杂萘-12-羧酸，又名阿扑长春胺酸乙酯，其结构式如图3.1所示。长春西汀为白色或淡黄色的结晶或结晶性粉末，熔点在149~153 ℃，比旋度为+127~134，在274 nm时的吸收系数为330~343，易溶于氯仿和冰醋酸及96%的乙醇，略溶于丙酮、乙酸乙酯、DMF和乙酐中，微溶于甲醇、乙醇、乙醚和正己烷中，不溶于水。长春西汀是从夹竹桃科小蔓长春花[Catharanthus roseus (L.) G. Don]中提取的一种吲哚类生物碱，广泛适用于缺血性脑血管疾病的治疗和预防。其药理作用主要有：①选择性地作用于脑血管系统，抑制脑磷酸二酯酶活性，舒张血管平滑肌，增加脑部血液供应；②增加脑部动静脉血含氧量，促进血红蛋白的氧释放，改善脑组织代谢；③改善血液流变学

性质，增加红细胞变形能力，使红细胞能够通过微小血管，降低血液黏稠度，抑制血小板的聚集；④增加神经元树突棘的数目和长度，调节神经递质的释放和转化，改善认知，提高记忆，减轻痴呆状况，延缓痴呆发展；⑤改善眼底血液循环和内耳血液循环。该药由匈牙利吉瑞（Gedeon Richter）公司开发成功，1978年上市。



图3.1 长春西汀的结构式

## 3 实验部分

### 3.1 原料、试剂与仪器

长春西汀（vinpocetine, VP），42971-09-5，含量(%): 99%，东北制药（沈阳）科技发展有限公司；

尼莫地平（nimodipine, NM），CAS 66085-59-4，含量(%): 99%，质量标准：BP98，珠海远城医药化工有限公司；

甲醇，HPLC/500mL，天津市科密欧化学试剂有限公司；无水乙醇，AR/500mL，广州化学试剂厂；

二甲基亚砜，AR/500mL，成都金ft化学试剂有限公司；标准pH缓冲剂，天津市科密欧化学试剂有限公司；

透析袋，MWCO=3500, Spectrum Laboratories, Inc.；其它试剂均为分析纯或以上。

加热磁力搅拌器，RET基本型，IKA Works, Inc.；

集热式恒温加热磁力搅拌器，DF-101S型，巩义市予华仪器有限责任公司；旋转蒸发器，RE-52A型，上海亚荣生化仪器厂；

循环水式真空泵，SHZ-D(III)型，巩义市予华仪器有限责任公司；

电热鼓风干燥箱，GZX-9240MBE型，上海博迅实业有限公司；

pH计，STARTER 2100 /3C Pro型，OHAUS, Co.；电子天平，CP114型，OHAUS, Co.；

紫外-可见分光光度计，752N型，上海仪电分析仪器有限公司（原上海精密科学仪器有限公司）；

紫外-可见分光光度计，UV-1750型，Shimadzu, Co.；

真空冷冻干燥机，LGJ-15D型，北京四环科学仪器厂有限公司。

### 3.2 胶束内药物含量测定方法的建立

#### 3.2.1 VP含量测定方法的建立

以甲醇为溶剂，分别配制适当浓度的VP和AM-PK111-4P1溶液，用UV-Vis分光光度计在200 nm~400 nm波长范围内进行样品扫描，以甲醇为参比，每样品重复三次加以验证。

精密称取VP 10.0 mg至100 mL容量瓶中，加甲醇溶解并定容至刻度。分别精密移取0.5 mL、1 mL、2 mL、3 mL、4 mL、5 mL、6 mL、7 mL母液至10 mL容量瓶中，加甲醇定容至刻度，得0.005 mg/mL、0.010 mg/mL、0.020 mg/mL、

0.030 mg/mL、0.040 mg/mL、0.050 mg/mL、0.060 mg/mL、0.070 mg/mL的VP

甲醇溶液。在选定的吸收波长处，以甲醇为参比测吸光度，绘制标准曲线。

#### 3.2.2 NM含量测定方法的建立

以甲醇为溶剂，分别配制适当浓度的NM和AM-PK111-4P1溶液，用UV-Vis分光光度计在200 nm~400 nm波长范围内进行样品扫描，以甲醇为参比，每样品重复三次加以验证。

精密称取NM 5.0 mg至100 mL容量瓶中，加甲醇溶解并定容至刻度。分别精密移取0.8 mL、1.4 mL、2.0 mL、2.6 mL、3.2 mL、3.8 mL、4.4 mL、5.0 mL母液至10 mL容量瓶中，加甲醇定容至刻度，得0.004 mg/mL、0.007 mg/mL、0.010 mg/mL、0.013 mg/mL、0.016 mg/mL、0.019 mg/mL、0.022 mg/mL、0.025

mg/mL的NM甲醇溶液。在选定的吸收波长处，以甲醇为参比测吸光度，绘制标准曲线。

3.2.3胶束载药量、包封率和产率的测定方法

精密称取制备所得胶束冻干粉于容量瓶中，以甲醇为溶剂溶解并定容至刻度，胶束结构被有机溶剂破坏使负载的药物溶解于溶剂中，用UV-Vis分光光度计在选定的吸收波长处测得吸光度，代入相应标准曲线计算出药物浓度与质量，根据以下公式计算胶束载药量（DL）、包封率（EE）和产率（Y）：







### 3.3 VP胶束制备方法的筛选

选取第二章合成所得系列两亲性β-CD 星型聚合 物

（β-CD~~[~~P(AA-co-MMA) -b-PVP] x）材料中的5种作为代表，筛选出较合适的载药胶束制备方法，以便于进行后续研究，材料批号分别为：AM-111-3P1、AM-111-4P1、AM-111-5P1、AM-111-4P2、AP-111-3P1.

#### 3.3.1 薄膜水化法

精密称取聚合物材料40 mg和VP 20 mg置于带磁力搅拌的250 mL干燥圆底烧瓶中；加入甲醇50 mL，搅拌使聚合物和药物溶解并均匀分散在有机溶剂中；将烧瓶置于40°C水浴，减压旋蒸除去甲醇，使溶质成膜黏附于烧瓶壁上；转至60°C水浴中保温5 min使固体骨架膜融化；加入60°C去离子水10 mL，搅拌 2

h (1500 r/min)水化成胶束；骤冷至室温，用0.22µm针筒式过滤器滤去未包裹的药物得载药胶束溶液；所得胶束溶液经冷冻干燥得到载药胶束样品，放于常温真空干燥器中待用。

#### 3.3.2 溶剂挥发法

精密称取聚合物材料40 mg和VP 20 mg置于带磁力搅拌的250 mL干燥圆底烧瓶中；加入甲醇50 mL，搅拌使聚合物和药物溶解并均匀分散在有机溶剂中；

设置水浴恒温30°C，搅拌转速1500 r/min；逐滴滴加25 mL去离子水，并继续

搅拌3 h；将烧瓶置于30°C水浴，减压旋蒸除去甲醇；用0.22µm针筒式过滤

器过滤，除去未包裹药物得载药胶束溶液，所得胶束溶液经冷冻干燥得到载药胶束样品，放于常温真空干燥器中待用。

#### 3.3.3 透析法

精密称取聚合物材料40 mg和VP 20 mg置于带磁力搅拌的干燥烧杯中；加入DMSO 20 mL，搅拌使聚合物和药物溶解并均匀分散在有机溶剂中；将溶液转移至透析袋（MWCO=3500）中，置于2 L去离子水中透析；分别于第2 h、4 h、6 h、8 h、12 h、18 h更换新鲜去离子水；透析24 h后，取出透析袋内的溶液，用0.22µm针筒式过滤器过滤，除去未包裹药物得载药胶束溶液，所得胶束溶液经冷冻干燥得到载药胶束样品，放于常温真空干燥器中待用。

### 3.4 用于制备VP胶束的系列材料筛选

分别采用第二章合成所得系列两亲性β-CD 星型聚合物

（β-CD~~[~~P(AA-co-MMA) -b-PVP] x），根据以上试验结果，采用溶剂挥发法，按照

3.3.2所述制备载药胶束，测得载药量，每个材料重复3次。

### 3.5 溶剂挥发法制备VP胶束的影响因素考察

根据以上试验结果，选取AM-PK111-4P1材料进行VP胶束的制备工艺、处方优化。

#### 3.5.1 有机溶剂的类型

选取的有机溶剂种类为：甲醇、乙醇、异丁醇、三氯甲烷；AM-PK111-4P1、

VP的用量为30 mg、10 mg，有机溶剂、水的用量为50 mL、20 mL；分别按照

#### 3.3.2 所述方法制备载药胶束，测得载药量。

#### 3.5.2 有机溶剂与水的比例

选取的有机溶剂（甲醇）与水的比例为：1.5: 1、2:1、2.5:1、3:1；AM-PK111-4P1、

VP的用量为30 mg、10 mg，水的用量固定为20 mL；分别按照3.3.2所述方法制备载药胶束，测得载药量。

#### 3.5.3 投药量

选取的投药量为：5 mg、10 mg、15 mg、20 mg；AM-PK111-4P1的用量为

30 mg，甲醇、水的用量为40 mL、20 mL；分别按照3.3.2所述方法制备载药胶

束，测得载药量。

#### 3.5.4 聚合物浓度

选取的聚合物的用量为：10 mg、20 mg、30 mg、40 mg；VP的用量为15 mg，甲醇、水的用量为40 mL、20 mL；分别按照3.3.2所述方法制备载药胶束，测得载药量。

#### 3.5.5 搅拌温度

选取的搅拌温度为：20°C、30°C、40°C、50°C；AM-PK111-4P1、VP的用量为30 mg、15 mg，甲醇、水的用量为40 mL、20 mL；分别按照3.3.2所述方法制备载药胶束，测得载药量。

#### 3.5.6 搅拌转速

选取的搅拌转速为：500 r/min、1000 r/min、1500 r/min、2000 r/min；AM-PK111-4P1、VP的用量为30 mg、15 mg，甲醇、水的用量为40 mL、20 mL；分别按照3.3.2所述方法制备载药胶束，测得载药量。

#### 3.5.7 搅拌时间

选取的搅拌时间为：1 h、2 h、3 h、4 h；AM-PK111-4P1、VP的用量为30 mg、15 mg，甲醇、水的用量为40 mL、20 mL；分别按照3.3.2所述方法制备载药胶束，测得载药量。

#### 3.5.8 溶剂蒸发温度

选取的溶剂蒸发温度为：30°C、35°C、40°C、50°C；AM-PK111-4P1、VP

的用量为30 mg、15 mg，甲醇、水的用量为40 mL、20 mL，搅拌时间为2 h；

分别按照3.3.2所述方法制备载药胶束，测得载药量。

### 3.6 溶剂挥发法制备VP胶束的正交设计

#### 3.6.1 因素和水平的确定

溶剂挥发法制备VP胶束的影响因素较多，为了快速进一步优化载药胶束的制备工艺条件，采用正交设计法对VP胶束的处方组成和制备工艺等因素进行优化。

根据上述溶剂挥发法制备VP胶束的影响因素考察结果，选取了对VP胶束的载药量影响最明显的四个因素A（投药量）、B（聚合物量）、C（搅拌时间）、

D（搅拌转速）作为正交设计因素，按五因素、四水平正交设计表[L16(45)]设计试验，如表3.1所示。

**表3.1** **正交设计因素水平表**

| 水平 | 投药量(mg) | 聚合物量(mg) | 因素  搅拌时间(h) | 搅拌转速(rpm) |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 | 5 | 10 | 1 | 1000 |
| 2 | 15 | 30 | 2 | 1400 |
| 3 | 25 | 50 | 3 | 1800 |
| 4 | 35 | 70 | 4 | 2200 |
| 3.6.2 | 优化指标的选取 |  |  |  |

在本次正交设计中，选取了载药胶束的三个最重要的特征理化参数为考察指标，即：载药量、包封率和平均粒径。为了确定最优处方与制备工艺，引入理想函数（DF, desirability function）将两个因变量转化为一个总体渴求值即D 值

（desirability value）进行综合评价。对于载药量和包封率，我们期望其越大越好，按以下公式转换：



其中是载药量的渴求值是包封率的渴求值和分别是实验

设计中各因变量所得到的最大值和最小值是实验设计中任意处方中因变量的实测值。

整体渴求值和的几何平均值，按以下公式转换：



其中是每个试验的整体渴求值。因此，可以使进行方差分析以得到 正交试验的最优条件。

### 3.7 正交试验最佳方案的验证

溶剂挥发法：精密称取AM-PK111-4P1 50 mg和VP 25 mg置于带磁力搅拌

的250 mL干燥圆底烧瓶中；加入甲醇50 mL，搅拌使聚合物和药物溶解并均匀

分散在有机溶剂中；设置水浴恒温30°C，搅拌转速1400 r/min；逐滴滴加25 mL

去离子水，并继续搅拌2 h；将烧瓶置于30°C水浴，减压旋蒸除去甲醇；用0.22

µm针筒式过滤器过滤，除去未包裹药物，得最佳处方工艺验证胶束样品，测得载药量、包封率和产率。

### 3.8 尼莫地平胶束的制备

以VP胶束正交试验最佳方案为基础，NM胶束的制备方法如下：精密称取AM-PK111-4P1 50 mg和NM 25 mg置于带磁力搅拌的250 mL干燥圆底烧瓶中；加入甲醇50 mL，搅拌使聚合物和药物溶解并均匀分散在有机溶剂中；设置水浴

恒温30°C，搅拌转速1400 r/min；逐滴滴加25 mL去离子水，并继续搅拌2 h；将烧瓶置于30°C水浴，减压旋蒸除去甲醇；用0.22µm针筒式过滤器过滤，除去未包裹药物，得NM胶束样品，测得载药量、包封率和产率。

## 4 结果与讨论

### 4.1 胶束内药物含量测定方法的确立

#### 4.1.1 测定波长的选择

VP和AM-PK111-4P1的甲醇溶液，在200 nm~400 nm波长范围内的扫描图如图3.1所示。从图中可以看出，VP在甲醇中有三个吸收峰，最大吸收波长在229 nm，次吸收波长在273 nm，第三吸收波长在313 nm，聚合物在后两个波长下的紫外吸收极小，不足以干扰样品的测定。同时，VP在229 nm处的吸收峰不光滑，跳动较大。因此，在满足定量灵敏度的情况下，选择干扰更小的次吸收波长（273 nm）作为VP胶束载药量测定的紫外检测波长。

NM和AM-PK111-4P1的甲醇溶液，在200 nm~400 nm波长范围内的扫描图如图3.2所示。从图中可以看出，NM在甲醇中的最大吸收波长在237 nm，聚合物在此波长下的紫外吸收较小，不足以干扰样品的测定，因此，选择237 nm作为NM胶束载药量测定的紫外检测波长。



**图3.1** **甲醇溶液中VP、AM-PK111-4P1的紫外吸收光谱。**(a) VP；(b) AM-PK111-4P1



**图3.2** **甲醇溶液中NM、AM-PK111-4P1的紫外吸收光谱。**(a) NM；(b) AM-PK111-4P1

#### 4.1.2 VP、NM在甲醇中的标准曲线

按3.2.1方法配制的系列VP甲醇溶液在273 nm处测得吸光度值，结果如表

3.2所示。以VP浓度（c）为横坐标，吸光度值（A）为纵坐标作图，经线性回归分析，得标准曲线回归方程：A=27.947c+0.0099，R2=0.9998，浓度范围为0.005 mg/mL~0.070 mg/mL，在此浓度范围内，线性关系良好，可以用于胶束载药量的测定。

按3.2.2方法配制的系列NM甲醇溶液在237 nm处测得吸光度值，结果如表3.2所示。以NM浓度（c）为横坐标，吸光度值（A）为纵坐标作图，经线性回归分析，得标准曲线回归方程：A=47.667c+0.0123，R2=0.9993，浓度范围为0.001

mg/mL~0.022 mg/mL，在此浓度范围内，线性关系良好，可以用于胶束载药量的测定。

**表3.2** **VP、NM在甲醇中的标准曲线**

| VP 浓度(mg/mL) | VP 吸光度 | NM 浓度(mg/mL) | NM 吸光度 |
| --- | --- | --- | --- |
| 0.005 | 0.150 | 0.001 | 0.066 |
| 0.010 | 0.291 | 0.004 | 0.195 |
| 0.020 | 0.558 | 0.007 | 0.351 |
| 0.030 | 0.861 | 0.010 | 0.481 |
| 0.040 | 1.131 | 0.013 | 0.639 |
| 0.050 | 1.389 | 0.016 | 0.764 |
| 0.060 | 1.704 | 0.019 | 0.932 |
| 0.070 | 1.960 | 0.022 | 1.056 |

### 4.2 不同制备方法所得胶束载药量比较

由三种制备方法（薄膜水化法、溶剂挥发法、透析法）制得的VP载药胶束，按胶束载药量测定方法，在273 nm处测得吸光度，代入VP在甲醇中的标准曲线，根据公式计算得到各VP载药胶束的载药量，结果如表3.3所示。

由表3.3结果可知，溶剂挥发法制备的VP胶束载药量最高。据文献报道[[70](#_bookmark153)]，一般情况下采用乳化-溶剂挥发法制备的载药胶束的载药量相对较高，且对聚合物水溶性要求较低。因此我们在后续的材料筛选和制备工艺处方优化试验中选用溶剂挥发法制备载药胶束。

对于薄膜水化法，在成膜过程中，有部分聚合物聚集成块状沉淀，并不能全部形成药物-聚合物薄膜；并且，随着PMMA比例的增大，药物-聚合物薄膜会整体脱落。这可能是由于PVP嵌段的亲水性较强，且链较长，在水化过程中，

PVP嵌段快速溶于水，致使聚合物分子容易发生并聚而不能有效形成独立分散胶束颗粒。此外，相对于星型聚合物，薄膜水化法更适用于采用链状聚合物制备载药胶束，因为星型聚合物通常可以单独形成胶束颗粒，而在形成药物-聚合物薄膜时，星型聚合物的臂会相互镶嵌，导致在水化过程中形成大聚集体而不能形成胶束。

对于透析法，因其制备过程简便，是最常用的胶束制备方法。但同时这也是其缺点，只能改变有机溶剂的类型来优化胶束的制备，而有机溶剂的选择受到药物和聚合物的限制，可选范围已经很窄，因此几乎不能通过制剂学方法改善载药胶束的质量。其次，透析法与溶剂挥发法的适用范围是完全相同的。因此，在后续试验中不采用透析法。

**表3.3 不同制备方法所得胶束载药量比较**

| 聚合物 | 制备方法 | 载药量(%) |
| --- | --- | --- |
| AM-111-3P1 | 薄膜水化法 | 3.52 ± 0.27 |
|  | 溶剂挥发法 | 10.29 ± 0.16 |
|  | 透析法 | 2.50 ± 0.21 |
| AM-111-4P1 | 薄膜水化法 | 4.15 ± 0.31 |
|  | 溶剂挥发法 | 12.17 ± 0.24 |
|  | 透析法 | 4.41 ± 0.25 |
| AM-111-5P1 | 薄膜水化法 | 2.33 ± 0.28 |
|  | 溶剂挥发法 | 9.57 ± 0.39 |
|  | 透析法 | 5.41 ± 0.20 |
| AM-111-4P2 | 薄膜水化法 | 1.38 ± 0.23 |
|  | 溶剂挥发法 | 10.03 ± 0.12 |
|  | 透析法 | 2.97 ± 0.31 |
| AP-111-3P1 | 薄膜水化法 | 3.64 ± 0.24 |
|  | 溶剂挥发法 | 10.45 ± 0.18 |
|  | 透析法 | 5.09 ± 0.13 |

### 4.3 不同聚合物所得胶束载药量比较

以第二章合成所得全系列聚合物为载体，采用溶剂挥发法且制备处方相同，制备VP胶束，所得载药量按材料属性分类，如表3.4所示。其中，表3.4A的分类依据为：以CTA试剂的取代基数目不同而后得到的聚合物的臂数不同分为3臂、4臂、5臂，以P(AA-co-MMA)嵌段中的单体AA与MMA的比例不同分为

3:1、7:1、11:1、15:1，以P(AA-co-MMA)嵌段与PVP嵌段的比例不同分为1: 5、

1: 10；表3.4B的分类依据为：CTA2与A1-β-CD的比例为1: 1，其它同“表3.4A”；表3.4C的分类依据为：以聚合物中β-CD单体含量不同（即CTA2与A1-β-CD的比例不同）分为1: 2、1:3、1:6，以P(AA-co-MMA)嵌段与PVP嵌段的比例不同分为2: 1、1:5、1:10、1:15，而P(AA-co-MMA)嵌段中的单体AA与MMA的比例固定为7: 1。

**表3.4** **A系列VP胶束载药量**

| (AA+MMA):NVP | | | |
| --- | --- | --- | --- |
|  |  | 1:5 | 1:10 |
| AA/MMA=3:1 | 3 臂 | 8.84% | 5.02% |
|  | 4 臂 | 10.29% | 5.11% |
|  | 5 臂 | 8.73% | 7.82% |
|  | 6 臂 | 7.73% | 6.85% |
| AA/MMA=7:1 | 3 臂 | 9.52% | 8.16% |
|  | 4 臂 | 12.17% | 10.03% |
|  | 5 臂 | 10.37% | 8.33% |
|  | 6 臂 | 10.05% | 7.18% |
| AA/MMA=11:1 | 3 臂 | 7.73% | 6.43% |
|  | 4 臂 | 9.57% | 7.45% |
|  | 5 臂 | 10.03% | 5.54% |
|  | 6 臂 | 8.08% | 5.92% |
| AA/MMA=15:1 | 3 臂 | 4.41% | 4.28% |
|  | 4 臂 | 7.40% | 4.50% |
|  | 5 臂 | 7.71% | 6.99% |
|  | 6 臂 | 5.94% | 4.75% |

**表3.4** **B系列VP胶束载药量**

| (AA+MMA):NVP | | | |
| --- | --- | --- | --- |
|  |  | 1:5 | 1:10 |
| AA/MMA=7:1 | 3 臂 | 9.28% | 3.21% |
|  | 4 臂 | 9.76% | 6.46% |
|  | 5 臂 | 6.47% | 4.53% |
|  | 6 臂 | 6.04% | 3.52% |
| AA/MMA=11:1 | 3 臂 | 8.40% | 3.12% |
|  | 4 臂 | 10.45% | 6.25% |
|  | 5 臂 | 8.34% | 5.27% |
|  | 6 臂 | 7.30% | 5.52% |

**表3.4** **C系列VP胶束载药量**

| (AA+MMA):NVP | | | | | |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  | 2:1 | 1:5 | 1:10 | 1:15 |
| CTA2:A1-β-CD | 1:1 |  | 9.76% | 6.06% |  |
|  | 1:2 | 8.78% | 9.00% | 5.68% | 4.63% |
|  | 1:3 | 9.95% | 8.52% | 5.74% | 4.91% |
|  | 1:6 | 9.03% | 8.46% | 5.29% | 4.56% |

从表3.4A可看出，随着聚合物的臂数增加，VP胶束的载药量并非一直增加，而是在4臂时载药量最大，这可能与聚合物臂形成的疏水性胶束核的大小和间隙

大小有关。当只有3条聚合物臂时，臂在有机溶剂中分布较松散，药物能较轻易地靠近聚合物核心（即β-CD），也就是能较好地利用CD内空腔作为药物载体，但这也使得有机溶剂挥发过程中，即胶束形成过程中，聚合物臂之间的空隙较大造成VP逸出，使得载药量较低，因此胶束载药量随着臂数的增加而增加。当聚合物臂增加到6条时，在β-CD的大开口侧形成较强的空间位阻作用，使得药物不容易被β-CD 内空腔包载；同时，由于臂数较多（即每条臂链较短），形成既小又紧密的疏水性胶束核，从而载药空间变小，载药量不升反降。综合以上两点，聚合物臂数为4条和5条时，胶束载药量较高。

事实上，在我们合成的β-CD~~[~~P(AA-co-MMA) -b-PVP] x嵌段聚合物中，PAA

和PVP两种单体嵌段都具有良好的亲水性，PMMA嵌段是疏水性的，但其在整个聚合物中所占比例是非常小的。β-CD~~[~~P(AA-co-MMA) -b-PVP] x嵌段聚合物能在水溶液中形成具有内疏水外亲水的核-壳特征的胶束，主要是因为AA上的羧基能与NVP上的羰基形成不溶性的氢键络合物[[71]](#_bookmark154)。由这样的氢键络合物形成疏水性“内核”，而没有形成氢键的NVP基团则作为胶束的亲水性“外壳”。引入

MMA单体在β-CD~~[~~P(AA-co-MMA) -b-PVP] x聚合物中的作用是改善PAA嵌段的

“硬度”。AA属于软单体，即PAA嵌段弯曲变形性能较好，在形成胶束时容易被压缩而降低载药能力，引入一定比例的MMA单体，无规律地嵌接在AA单体之间，能使P(AA-co-MMA)嵌段变硬，在形成胶束时能给予适当的支撑而获得更优的药物负载能力或调节药物释放速率。

从表3.4A的结果来看，随着AA/MMA两种单体的比值增加，VP胶束的载药量也是先增大后减小。这是跟臂数的结果相似，同样是载药量的最大值出现在

AA与MMA这对矛盾体的平衡处。相对较多的MMA，使得聚合物中形成的氢键减少，只能依靠硬单体（MMA）形成胶束疏水核。而由氢键组成的胶束疏水核呈网格状，显然地，对药物的负载能力比前者好。但是MMA的量太少又会使得胶束疏水核过于紧密，而无法容纳较多的药物分子。因此，当AA/MMA为7:1时，VP胶束的载药量最高。

对于NVP单体在聚合物中的比例，则是NVP较少的聚合物所得VP胶束的载药量更高。可能的原因是，低比例的NVP聚合物，其量足以形成胶束，而NVP较少，则分子量较小，但胶束的疏水核大小并不随NVP的量的变化而显著变化，使得含药量变化不明显，即载药量相对较高。对于NVP单体在聚合物中的比例更低是否能进一步提高载药量或影响胶束的其它性质则有待考察。

表3.4B的结果表明，每个聚合物分子中增加了一个β-CD，但其载药能力趋势与上述分析基本一致。从表3.4C中可以看出，随着聚合物中β-CD的比例增加，VP胶束的载药量逐渐降低。通常情况下，β-CD包合中的主客体分子摩尔比为1: 1，在我们合成的聚合物中，假设β-CD也能包合长春西汀，并且包合比例达到1: 1，则只计算β-CD包合部分的载药量约为22%。从这点来看，增加β-CD在聚合物中的比例能提高载药量。但是，当P(AA-co-MMA)嵌段中接入了β-CD，会影响AA与NVP之间形成氢键，而组成该氢键的络合物是形成胶束疏水性核

的主要部分，即β-CD的加入影响了胶束疏水性核的形成，从而影响了胶束对药物的负载能力。综合来看，β-CD的加入并不能增加聚合物的载药能力，而β-CD的加入是否对聚合物的其它理化性质有影响则有待考察。

综合以上分析，选取批号为AM-111-4P1的聚合物用于VP胶束的制备处方工艺优化，以获得更理想的VP胶束。

### 4.4 溶剂挥发法制备VP胶束的影响因素考察

#### 4.4.1 有机溶剂的类型

由于已经选用了溶剂挥发法制备载药胶束，有机溶剂的选择范围限定为既能作为聚合物和VP的共溶剂又具有较低沸点（相对于水）。对于聚合物而言，其主要组成是P(AA-co-MMA)、PVP嵌段，可选溶剂为醇类、三氯甲烷，而这些溶剂同时也能作为VP的溶剂。因此，选择了三种醇（甲醇、乙醇、异丁醇）、三氯甲烷为聚合物和VP的共溶剂进行筛选，制备得VP载药胶束，结果（载药量、包封率、产率）如表3.5所示。

**表3.5** **有机溶剂种类筛选**

| 有机溶剂类型 | 载药量(%) | 包封率(%) | 产率(%) |
| --- | --- | --- | --- |
| 甲醇 | 10.23 | 28.64 | 80.00 |
| 乙醇 | 9.64 | 24.10 | 71.43 |
| 异丁醇 | 8.92 | 13.20 | 42.29 |
| 三氯甲烷 | 8.69 | 13.04 | 42.86 |

从表3.5中可以看出，以醇作为共溶剂所得胶束的质量比三氯甲烷好，这可能是因为PAA嵌段在三氯甲烷中的溶解度有限，使得聚合物在三氯甲烷中的分散不够好，从而影响了形成胶束的质量。在三种醇溶剂中，以甲醇最优。首先，聚合物在甲醇中的溶解速度是最快的，说明甲醇对聚合物三种主要嵌段的亲和力均比较好。其次，甲醇与水的可混合性比乙醇、异丁醇大。异丁醇的溶解度最小，当含有聚合物和药物的异丁醇溶液滴入水中，会部分形成油滴，这些油滴仅仅依靠搅拌作用分散在水中，随着异丁醇的挥发，油滴内的聚合物才与水接触形成胶束，因而容易产生多分子聚集而沉淀；对于水溶性更好的甲醇、乙醇，当有机溶剂被滴入水中，溶剂会立即分散在水中，聚合物不容易产生聚集，从而能形成更

多的胶束粒子。产率结果也证实了这一点。

综合以上分析，选取甲醇作为有机溶剂进行后续优化考察。

#### 4.4.2 有机溶剂与水的比例

固定水的用量为20 mL，改变有机溶剂（甲醇）的用量使甲醇与水的体积比例分别为：1.5: 1、2:1、2.5:1、3:1，制备所得VP胶束结果如表3.6所示。

**表3.6** **有机溶剂用量筛选**

| 甲醇用量(mL) | 载药量(%) | 包封率(%) | 产率(%) |
| --- | --- | --- | --- |
| 30 | 8.67 | 24.88 | 82.00 |
| 40 | 10.34 | 29.99 | 82.86 |
| 50 | 9.92 | 28.97 | 83.43 |
| 60 | 8.54 | 24.34 | 81.43 |

从表3.6中可以看出，总体上，甲醇水的比例改变对VP胶束的质量影响较小，最佳的甲醇水比例为2: 1。有机溶剂主要通过影响药物与聚合物的混合均匀程度以及聚合物的伸展程度来影响胶束的质量，有机溶剂占比越大，聚合物越易舒展，得益于水对亲脂性药物分子和聚合物疏水段的排斥作用，药物分子更容易分布于聚合物的疏水段附近，从而提高载药量。但并非有机溶剂的用量越大，药物与聚合物的混合越均匀，胶束的载药量就越大，因为在其后的旋蒸除去有机溶剂过程，可能会造成聚合物与药物的再分散。

综合以上分析，选取甲醇水比例为2: 1进行后续优化考察。

#### 4.4.3 投药量

固定其它制备条件，投药量分别为5 mg、10 mg、15 mg和20 mg时制备所得VP胶束的结果如表3.7所示。

**表3.7** **投药量筛选**

| 投药量(mg) | 载药量(%) | 包封率(%) | 产率(%) |
| --- | --- | --- | --- |
| 5 | 5.63 | 34.34 | 87.14 |
| 10 | 11.08 | 31.91 | 72.00 |
| 15 | 11.78 | 22.54 | 63.78 |
| 20 | 9.74 | 14.07 | 57.80 |

总体上来看，投药量对载药量和包封率的影响较大。随着投药量的增加，

VP胶束载药量先急剧增大后趋于平衡，而包封率则几乎是直线下降。我们选取的胶束载药方式是物理包载，即亲脂性VP分子是通过疏水相互作用被包载于聚合物胶束的疏水内核中，因此胶束包载VP分子的多少是符合概率统计学规律的。当投药量增加时，VP分子与聚合物之间相互碰撞团聚的机率增大，载药量也随之增加；当投药量较高时，载药量的增加受到聚合物所形成的胶束的疏水核对药物的负载能力的限制，而趋于平衡。相应的，未被包载的药物量随着胶束包载的药物量增加而增加，而且未被包载的药物量增加幅度更大，因此包封率随着投药量的增加不升反降。

综合以上分析，选取投药量为15 mg进行后续优化考察。

#### 4.4.4 聚合物用量

固定其它制备条件，聚合物用量分别为10 mg、20 mg、30 mg和40 mg（即最终胶束溶液中聚合物浓度为1、2、3、4 mg/mL）时制备所得VP胶束的结果如表3.8所示。

**表3.8** **聚合物浓度筛选**

| 聚合物用量(mg) | 载药量(%) | 包封率(%) | 产率(%) |
| --- | --- | --- | --- |
| 10 | 10.18 | 9.98 | 39.20 |
| 20 | 10.24 | 10.24 | 57.14 |
| 30 | 11.65 | 11.18 | 64.00 |
| 40 | 10.98 | 11.61 | 76.91 |

从表3.8结果可以看出，聚合物用量对胶束载药量和包封率影响也较大。随着聚合物用量从10 mg上升到40 mg，胶束的包封率从9.98%略增加到11.61%，

而载药量却先从10.18%增加到11.65%再减小到10.98%。这是因为随着聚合物用量的增加，则最终胶束溶液中聚合物浓度相应增加，意味着胶束形成个数也随之增加，使得可以容纳药物的疏水性空间增加，从而提高了胶束的包封率。值得注意的是：胶束包封率的变化规律成立的条件是投药量较大（15 mg），远远超过胶束的包封能力，这也致使包封率总体上较小，仅能达到11.61%。同时，在投药量过大的情况下，理论上胶束的载药量不会出现显著性变化，结果显示载药量极差仅1.47%，这可能是由于聚合物浓度的变化引起粒径大小改变，使得可以容纳药物的疏水性空间并非随着胶束个数的增加而线性增加，从而出现载药量出现先增加后减小的现象。

综合以上分析，选取聚合物用量为30 mg进行后续优化考察。

#### 4.4.5 搅拌温度

固定其它制备条件，搅拌温度分别为20°C、30°C、40°C、50°C时制备所得VP胶束的结果如表3.9所示。

**表3.9** **搅拌温度筛选**

| 搅拌温度(°C) | 载药量(%) | 包封率(%) | 产率(%) |
| --- | --- | --- | --- |
| 20 | 11.54 | 10.92 | 63.11 |
| 30 | 11.88 | 12.00 | 67.33 |
| 40 | 10.27 | 10.54 | 68.44 |
| 50 | 9.32 | 9.23 | 66.00 |

从表3.9结果可知，搅拌温度对胶束载药量和包封率的影响是所有考察的因素中最小的。溶液中的溶质均遵循热力学定律，即随着搅拌温度的升高，溶液中的聚合物和药物的分子运动速率增加，从而聚合物与药物的碰撞机率增加，胶束的形成过程是聚合物从有机相向水相迁移，因而胶束包载药物的机率也增加。但在结果中，胶束载药量的变化并不显著，可能是因为在搅拌后还需要进行溶剂挥发过程，已经包载药物的胶束在溶剂挥发过程中会重新向有机相迁移使聚合物变得松散而释放出药物。20°C和30°C的结果相近，但在实际操作中，20°C不容易准确控制。

综合以上分析，选取搅拌温度为30°C进行后续优化考察。

#### 4.4.6 搅拌转速

固定其它制备条件，搅拌转速分别为500 r/min、1000 r/min、1500 r/min、2000

r/min时制备所得VP胶束的结果如表3.10所示。

**表3.10** **搅拌转速筛选**

| 搅拌转速(r/min) | 载药量(%) | 包封率(%) | 产率(%) |
| --- | --- | --- | --- |
| 500 | 7.71 | 14.29 | 61.78 |
| 1000 | 9.26 | 18.33 | 66.00 |
| 1500 | 11.56 | 24.04 | 69.33 |
| 2000 | 11.31 | 23.75 | 70.00 |

搅拌转速对胶束载药量和包封率的影响与搅拌温度类似，同样是影响聚合物和药物分子在溶液中的运动速率，不同的是，搅拌转速是通过机械力加快聚合物和药物分子的运动，且能使聚合物和药物分子在溶液中分布更均匀。另外，此试验中搅拌温度与溶剂蒸发温度相同，不会出现上述考察搅拌温度时两个过程的温度不一致而影响了胶束的形成质量现象。因此，搅拌转速对胶束载药量和包封率的影响比搅拌温度更显著，随着搅拌转速的增加，载药量和包封率均呈增加趋势。由于磁力搅拌器的限制，很难达到更高的搅拌转速，或搅拌不够稳定。

综合以上分析，选取搅拌转速为1500 r/min进行后续优化考察。

#### 4.4.7 搅拌时间

固定其它制备条件，搅拌时间分别为1 h、2 h、3 h、4 h时制备所得VP胶束的结果如表3.11所示。

**表3.11 搅拌时间筛选**

| 搅拌时间(h) | 载药量(%) | 包封率(%) | 产率(%) |
| --- | --- | --- | --- |
| 1 | 11.24 | 19.86 | 58.89 |
| 2 | 11.95 | 24.38 | 68.00 |
| 3 | 10.47 | 21.92 | 69.78 |
| 4 | 8.56 | 17.69 | 68.89 |

从表3.11结果可以看出，随着搅拌时间的增加，胶束的载药量和包封率均

呈减小趋势。这可能与星型聚合物的本质相关，对于链状聚合物而言，搅拌的目的是增加聚合物疏水端的碰撞机率，提高胶束形成率，而星型聚合物通常可以单独形成胶束颗粒，搅拌的目的只是使聚合物成分散态。因此，搅拌时间只需使聚合物均匀分散即可，从结果可以看出，2 h足以使聚合物均匀分散，搅拌时间越长反而使药物更多地从胶束中逸出。

综合以上分析，选取搅拌时间为2 h进行后续优化考察。

#### 4.4.8 溶剂蒸发温度

固定其它制备条件，溶剂蒸发温度分别为30°C、35°C、40°C、50°C时制备所得VP胶束的结果如表3.12所示。

**表3.12** **溶剂蒸发温度筛选**

| 溶剂蒸发温度(°C) | 载药量(%) | 包封率(%) | 产率(%) |
| --- | --- | --- | --- |
| 30 | 9.45 | 18.65 | 65.78 |
| 35 | 11.48 | 23.95 | 69.56 |
| 40 | 11.07 | 22.95 | 69.11 |
| 50 | 8.23 | 14.65 | 59.33 |

溶剂蒸发温度直接影响了完全除去有机溶剂所需时间。在除去有机溶剂之前，体系内聚合物呈舒展状态，在有机溶剂逐渐减少时，有机相中的聚合物链段迁移至水相中，PAA和PVP之间形成氢键作为疏水性核心并包载药物分子。有机溶剂蒸发的快慢影响了胶束形成的快慢，胶束形成过快容易导致聚合物之间聚集，而胶束形成过慢则容易使药物逸出胶束的疏水核，因此，溶剂蒸发温度在中间温度（35°C）时胶束的载药量和包封率较高。

溶剂蒸发温度对载药量和包封率的影响也较大，但不被选为正交试验的因素，主要是考虑到有机溶剂残留问题。在较高的蒸发温度（50°C）时，水的蒸发也非常快，导致最后胶束溶液体积较小，聚合物浓度变得非常高致使胶束之间容易发生团聚。而且，较高的蒸发温度也更难使有机溶剂挥发完全。因此，在实验中固定溶剂蒸发温度为35°C。

### 4.5 溶剂挥发法制备VP胶束的正交设计

按照正交试验[L16(45)]进行试验，测定的各项考察指标如表3.13所示，并将各指标代入渴求值计算公式进行计算。以整体渴求值为指标，进行直观分析和单因素方差分析，分析结果如图3.13和表3.14所示。

**表3.13** **正交设计试验结果**

| 因素 | | | |  | 载药量  % | VP 浓度  mg/mL |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 序号 | 投药量  mg | 聚合物量  mg | 搅拌时间  h | 搅拌转速  rpm | DF |
| 1 | 5 | 10 | 1 | 1000 | 5.05 | 0.0534 | 0.0173 |
| 2 | 5 | 30 | 2 | 1400 | 11.09 | 0.3062 | 0.2954 |
| 3 | 5 | 50 | 3 | 1800 | 6.83 | 0.2740 | 0.1909 |
| 4 | 5 | 70 | 4 | 2200 | 3.17 | 0.2102 | 0.0348 |
| 5 | 15 | 10 | 2 | 1800 | 19.49 | 0.1928 | 0.3147 |
| 6 | 15 | 30 | 1 | 2200 | 11.88 | 0.3345 | 0.3258 |
| 7 | 15 | 50 | 4 | 1000 | 12.00 | 0.5808 | 0.4485 |
| 8 | 15 | 70 | 3 | 1400 | 12.86 | 0.8601 | 0.5810 |
| 9 | 25 | 10 | 3 | 2200 | 14.59 | 0.1427 | 0.2124 |
| 10 | 25 | 30 | 4 | 1800 | 17.23 | 0.5221 | 0.5318 |
| 11 | 25 | 50 | 1 | 1400 | 21.21 | 0.9775 | 0.8444 |
| 12 | 25 | 70 | 2 | 1000 | 18.00 | 1.2038 | 0.8534 |
| 13 | 35 | 10 | 4 | 1400 | 10.80 | 0.1083 | 0.1386 |
| 14 | 35 | 30 | 3 | 1000 | 17.92 | 0.5092 | 0.5373 |
| 15 | 35 | 50 | 2 | 2200 | 18.17 | 0.8744 | 0.7259 |
| 16 | 35 | 70 | 1 | 1800 | 14.35 | 1.0090 | 0.6770 |
| K1 | 0.1346 | 0.1708 | 0.46613 | 0.4641 |  |  |  |
| K2 | 0.4175 | 0.4226 | 0.5474 | 0.4649 |  |  |  |
| K3 | 0.6105 | 0.5524 | 0.3804 | 0.4286 |  |  |  |
| K4 | 0.5197 | 0.5366 | 0.2884 | 0.3247 |  |  |  |
| 极差 | 0.4759 | 0.3816 | 0.2590 | 0.1402 |  |  |  |

**表3.14 正交试验结果方差分析**

| 因素 | 偏差平方和 | 自由度 | F 比 | F 临界值 | 显著性 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| A | 0.5108 | 3 | 31.34 |  | \*\*\* |
| B | 0.3730 | 3 | 22.88 | F0.01(3,3)=29.50  F0.05(3,3)=9.28  F0.1(3,3)=5.39 | \*\* |
| C | 0.1489 | 3 | 9.13 | \* |
| D | 0.0524 | 3 | 3.21 |  |  |
| 误差列 | 0.0163 | 3 | 1 |  |  |
| 误差 | 0.0163 | 15 |  |  |  |

极差值的大小反映了各因素对测定指标的影响程度，从表3.13中可以看出，四个因素的重要性大小依次为：投药量>聚合物量>搅拌时间>搅拌转速，即

A> B> C> D。从方差分析结果可以看出，选择95%的置信区间时，(A)投药量和（B）聚合物量具有显著性差异。从各极差值可以看出，各因素四个水平的优劣次序为：投药量：3> 4> 2> 1；聚合物量：3> 4> 2> 1；搅拌时间：2> 1> 3> 4；搅拌转速：2> 1> 3> 4。各因素取最佳水平，确定VP胶束的优化处方组成和制备工艺为A3B3C2D2，即投药量为25 mg、材料量为50 mg、搅拌时间为2 h、搅拌转速为1400 rpm。

### 4.6 正交试验最佳方案的验证

采用优化处方工艺制备VP胶束5批，测得其载药量为(21.44±0.14) %，包封率为(49.05±0.36) %，平均粒径为(70.1±2.5) nm。结果表明，载药胶束的制备工艺稳定，重现性良好，且具有较好的VP包载性能。

### 4.7 尼莫地平胶束的制备

采用VP 胶束的优化处方工艺制备NM 胶束5 批，结果载药量为（3.24 ±

0.10）%，包封率为(34.38±0.21) %，平均粒径为(74.2±3.1) nm。结果表明，该聚合物同样可用于包载NM，但载药量和包封率明显不如VP胶束，该制备方法具有较大的改良性。同时，这也说明载药胶束处方工艺优化的必要性。

## 5 本章小结

本章以VP 作为模型药，两亲性β-CD 星型聚合 物

（β-CD~~[~~P(AA-co-MMA) -b-PVP] x）为药物载体，成功制备了载药胶束制剂。最终筛选出最佳的载药胶束制备方法为溶剂挥发法，载药能力最佳的聚合物为AM-PK111-4P1，即含有四条聚合物臂、AA/MMA=7:1、(AA+MMA): NVP=1:5、

无A1-β-CD的β-CD衍生物。通过正交试验得到载药胶束的最佳制备处方工艺，并进行了验证。最后以另一个模型药（NM）验证了该聚合物的载药能力。

结果显示，本研究合成所得聚合物具有良好的药物负载能力，且对不同类型药物也有较好的相容性，有必要进行后续的释药规律与体内组织分布研究。

# 第四章 载药胶束的表征及体外释放行为研究

## 1 引言

为了确证由第二章合成的两亲性多臂嵌段β-CD 衍生物

（β-CD~~[~~P(AA-co-MMA) -b-PVP] x）制备所得载药胶束的一些特征性的理化性质，本章通过FT-IR、DLS、TEM等手段对VP胶束进行了表征，为该β-CD衍生物胶束在给药系统的应用提供了基本的依据。

同时，对VP胶束的体外释放行为进行了研究，以了解其释药规律与机理，评价该β-CD衍生物胶束对药物的缓释性能，为后续进行的体内行为研究作好了铺垫。

## 2 实验部分

### 2.1 原料、试剂与仪器

长春西汀（vinpocetine, VP），42971-09-5，含量(%): 99%，东北制药（沈阳）科技发展有限公司；

甲醇，HPLC/500mL，天津市科密欧化学试剂有限公司；

十二烷基硫酸钠（SDS），ACS，阿拉丁试剂（上海）有限公司；溴化钾，光谱纯SP，阿拉丁试剂（上海）有限公司；

标准pH缓冲剂，天津市科密欧化学试剂有限公司；透析袋，MWCO=7000, Spectrum Laboratories, Inc.；其它试剂均为分析纯或以上。

加热磁力搅拌器，RET基本型，IKA Works, Inc.；

集热式恒温加热磁力搅拌器，DF-101S型，巩义市予华仪器有限责任公司；旋转蒸发器，RE-52A型，上海亚荣生化仪器厂；

循环水式真空泵，SHZ-D(III)型，巩义市予华仪器有限责任公司；电热鼓风干燥箱，GZX-9240MBE型，上海博迅实业有限公司；

pH计，STARTER 2100 / 3C Pro型，OHAUS, Co.；电子天平，CP114型，OHAUS, Co.；

紫外-可见分光光度计，752N型，上海仪电分析仪器有限公司（原上海精密科学仪器有限公司）；

紫外-可见分光光度计，UV-1750型，Shimadzu, Co.；

气浴恒温振荡器，SHZ-82型，常州澳华仪器有限公司（原金坛市富华仪器有限公司）；

傅立叶红外光谱仪，Spectrum 100 Optica型，PerkinElmer, Inc.；动态光散射粒径仪，Delsa™Nano C型，Beckman Coulter, Inc.; TEM, JEM-2100型，JEOL Ltd；

真空冷冻干燥机，LGJ-15D型，北京四环科学仪器厂有限公司。

### 2.2 样品的制备

载药胶束的制备：由优化后的溶剂挥发法制备VP胶束，详细操作方法见第三章。若无特殊说明，则表示使用的聚合物材料批号为AM-PK111-4P1，且本章中采用其它批号聚合物制备VP胶束的处方与制备工艺相同。

空白胶束的制备：由直接溶解法制备空白聚合物胶束，将适量的聚合物溶解于去离子水中，得空白胶束。若无特殊说明，则表示使用的聚合物材料批号为AM-PK111-4P1。

粒径分布的测定、体外释放和TEM样品制备直接使用胶束溶液，而红外表征因采用溴化钾圧片法制备样品，故需要制备胶束冻干粉。对于VP胶束，将同一份VP溶液分开两份，其中一份加入的5% (w/v)的D-海藻糖作为冻干保护剂。

### 2.3 胶束的粒径与粒径分布测定

采用动态光散射法（dynamic light scattering, DLS）[[72]](#_bookmark155)测定VP胶束的粒径与粒径分布。激光波长为658 nm（30 mW固体激光光源），散射角度为165°，样品温度为25°C，累积计算点个数为50个。将各VP胶束适当稀释后置于石英比色皿中测得平均粒径和多分散指数（Polydispersity Index, PDI），每样品测试三次取平均值。

### 2.4 胶束的红外表征

采用傅里叶变换红外光谱仪（Fourier transform infrared spectrometer, FT-IR

spectrometer）分别扫描空白KBr、VP、空白胶束冻干粉、VP胶束冻干粉、VP胶束（含5%海藻糖）冻干粉五个样品得FT-IR图谱，通过对图谱中各样品的特征吸收峰进行分析，以确证VP被包载于聚合物胶束核中。

样品的制备采用溴化钾压片法[[52]](#_bookmark137)，取样品2 mg置于玛瑙研钵中，加入预干燥的溴化钾100 mg，充分研磨混匀，然后移置于压模中，使分布均匀，将压模

水平放置于压片机座上，加压至15 MPa，保持2 min，取出样品片，经目视检查应均匀、表面平滑、透光好。扫描范围为4000~400 cm-1，分辨率为4 cm-1，扫描次数为3次。

### 2.5 胶束的外观形貌

采用透射电镜观察胶束的形貌特征。分别将合适浓度的VP载药胶束和空白胶束滴于铜网支持膜上，干燥，滴加2%磷钨酸于铜网上进行染色，2 min后用滤纸吸去多余液体，室温下自然干燥，再进行透射电镜测试。

### 2.6 VP胶束的体外释放

#### 2.6.1 释放介质的选择

参考《中国药典》2010年版二部附录XIX D“缓释、控释和迟释制剂指导原则”下关于体外药物释放度试验指导原则，结合VP 的性质（难溶），选择含少量表面活性剂的不同pH的缓冲液作为体外释放介质。具体如下：a. pH1.0的稀盐酸；b. pH4.5的醋酸-醋酸钠缓冲液，含0.5%SDS；c. pH6.5的磷酸盐缓冲液，含0.5%SDS；d. pH7.4的磷酸盐缓冲液，含0.5%SDS。

#### 2.6.2 含量测定方法的建立

以蒸馏水为参比，分别用UV-Vis分光光度计在200 nm~400 nm波长范围内扫描上述四种释放介质，每样品重复三次加以验证。

精密称取VP 5.0 mg至100 mL容量瓶中，加甲醇1 mL使VP充分溶解，分别用上述四种体外释放介质作为溶剂定容至刻度，得0.05 mg/mL的VP母液，分别用UV-Vis分光光度计在200 nm~400 nm波长范围内对四种VP母液进行扫

描，以蒸馏水为参比，每样品重复三次加以验证。

取上述四种VP母液，分别配制系列浓度的VP溶液，在选定的吸收波长处，分别以相应的释放介质为参比测吸光度，绘制标准曲线。

#### 2.6.3 体外药物释放

采用透析法考察VP胶束的体外释放行为。精密移取5 mL VP胶束溶液置于预先处理好的透析袋中，分别放入装有95 mL不同释放介质的容器中，于37°C

±0.2°C恒温水浴，100 rpm振荡下进行体外释放实验。间隔一定时间取样10 mL，并补充10 mL同温度新鲜介质于其中。每个时间点释放的药物量通过紫外法定量，并计算累积释放百分率。考虑到透析袋对药物的吸附可能成为药物释放的限速步骤，故将四种VP母液在相同条件下的释放作为对照。

体外药物释放试验分为两部分：一、对采用第三章中优化过的AM-PK111-4P1聚合物所得VP胶束，考察其在不同pH值的缓冲溶液中的释放行为；二、选取代表性的几种具有不同组成的聚合物所得VP 胶束，考察其在

pH7.4的磷酸盐缓冲液（含0.5%SDS）中的释放行为。药物累积释放百分率计算公式为：



其中，Q：药物的累积释放百分率：第n个时间点所取样品的浓度，

mg/mL；V：释放介质总体积，100：第i个时间点的取样体积，10 mL；

：第i个时间点所取样品浓度：用于释放的每份 VP 胶束样品中VP的质量，mg；n：置换释放介质的次数。

#### 2.6.4 释药方程拟合

采用Origin 9.0.0软件，分别依照零级释放动力学、一级释放动力学、Higuchi方程、Ritger-peppas方程、Weibull方程、Hixcon-Crowe方程及Neibergull方程，对2.6.3所得的各体外释放曲线进行拟合，以判断最佳释放模型。各释放动力学模型的描述见表4.1。

**表4.1 各释放动力学模型的描述**

| 模型 | 拟合方程 | 描述 |
| --- | --- | --- |
| 零级释放动力学 |  | Q%为累积释放百分率  k、C 为常数 |
| 一级释放动力学 |  |  |
| Higuchi 方程 |  |  |
| Ritger-peppas 方程 |  |  |
| Weibull 方程 |  | |
| Hixcon-Crowe 方程 |  |  |
| Neibergull 方程 |  |  |

## 3 结果与讨论

### 3.1 胶束的粒径与粒径分布

如图4.1所示，测得空白胶束和最优处方VP胶束的平均粒径分别为104.1 nm和67.4 nm，多分散指数（Polydispersity Index, PDI）分别为0.304和0.249，呈单峰分布。结果表明，VP的载入不但使胶束的粒径变小，还使PDI指数变小，即胶束粒径分布更窄。这与我们的聚合物性质相符，我们合成的聚合物依赖于

AA上的羧基与NVP上的羰基形成不溶性的氢键络合物而形成核壳状胶束，在制备空白胶束时，可能是AA与NVP之间形成有效络合物的量较少，各臂链在水中的分布较松散，使得粒径比载药胶束大。另外，PAA在水中的溶解性能较好，这也影响了其与NVP嵌段之间交联而形成的相对密闭环境，而这也是胶束疏水性内腔形成的促进性因素。当加入VP后，因VP带一定的负电荷，容易与带正电荷的AA产生静电吸引力而由亲水性变成疏水性，而疏水作用又促使其向内（环糊精核）聚集，因此聚合物各臂链的分布变得紧密，使粒径变小且粒径分布更均匀。

为了更好地理解胶束粒径的变化原理与规律，使用第三章正交设计试验所得结果进行分析，由正交设计的方差分析可知，只有投药量和聚合物量具有显著性

差异（F比> F0.05(3, 3)），即可暂时忽略其它制备因素的影响，分析投药量和聚合物量的变化对粒径的影响，如图4.2所示。在聚合物量一定时，随着投药量的增加，载药胶束粒径呈减小趋势，这是由于VP更多，则与AA之间的静电吸引力更强，使得胶束更紧密，粒径更小，与上述分析基本一致。

我们合成的聚合物中有PVP嵌段，Senel等[[73]](#_bookmark156)通过质谱研究表明，PVP在水溶液中可与多元酸形成不溶性的氢键络合物，在较高浓度时可呈凝胶状。我们对此进行了简单的考察，在制备载药胶束时加入20%（以聚合物的质量计量）的柠檬酸（三元酸），其它制备条件如2.2所述，得到的胶束粒径如图4.3所示，平均粒径为123.1 nm, PDI指数为0.163。相对于不含柠檬酸的载药胶束，其载药量达24.23%（提高了12%），但粒径更大（增加了83%），同时粒径分布更均匀，肉眼观察胶束溶液的黏度更大，呈淡蓝色乳液状，这说明多元酸的加入能使聚合物成凝胶，与Senel等研究相符。



(A)



(B)

**图4.1 聚合物胶束的强均粒径分布图。**(A)空白胶束；(B) VP胶束



**图4.2** **投药量对粒径分布图**



**图4.3 含辅料柠檬酸的载药胶束粒径**

### 3.2 胶束的红外表征

分别扫描各样品得FT-IR谱图如图4.4所示。对比可知，VP的特征吸收峰有部分与聚合物的吸收峰重叠，不能在载药胶束的谱图中区分出来。选取干扰较少的峰用于确证VP被包载于聚合物里。747.8 cm-1处为VP苯环芳氢的面外弯曲振动峰，1081.9 cm-1处为VP酯键C—O—C伸缩振动吸收峰。在VP胶束的谱图中，存在747.8 cm-1和1081.9 cm-1两处吸收峰，但峰强度有所减弱；而在含海藻糖的VP胶束的谱图中，几乎无747.8 cm-1和1081.9 cm-1两处吸收峰，表明VP几乎没有泄露，海藻糖起到良好的保护作用。



**图4.4 各样品的FT-IR谱图**

### 3.3 胶束的外观形貌

采用TEM观察胶束粒子的形貌特征，空白胶束和载药胶束的TEM图如图

4.5所示。从图中可看出，经磷钨酸染色后，能较好地在TEM中展现出胶束粒子的外观形貌。这是由于磷钨酸在胶束粒子表面具有选择性吸附，使胶束粒子的外周呈深黑色，清晰地显现了胶束粒子的整体形状，图中所显示区域内的胶束粒子均表现出较良好的圆形。我们所合成的星型聚合物是由多个嵌段臂连接在中心的β-CD，具有天然的核壳型分子结构，加之得益于星型嵌段聚合物特殊的分子构型和流体力学性质，其在选择性溶剂中容易自组装成球型胶束[[74]](#_bookmark157)。通过标尺对胶束粒子的直径作简单测量，空白胶束和载药胶束的粒径约为70 nm和65 nm，相对于用DLS测得胶束粒径略偏小。这两种表征方法得到的粒径差异主要源于测定时粒子状态的差异，采用DLS测定时，胶束分散在水中，有一定溶胀，颗粒外周和水分子形成一个水合层，实际上测出的是胶束粒子的水合粒径，因此粒径较大；而采用TEM表征时，样品需要干燥，此时胶束粒子可能会发生收缩和塌陷，导致粒径变小[[75,](#_bookmark158) [76]](#_bookmark159)。

而胶束粒子内部区域，则不能被磷钨酸染色而呈亮白色[[77,](#_bookmark160)[78]](#_bookmark161)。采用磷钨酸染色法能较好地体现出胶束粒子的整体形状，但不能分辨出核壳状的胶束特征性结构。



(A)



(B)

**图4.5** **VP胶束的外观形貌图。**(A)空白胶束；(B)载药胶束

### 3.4 胶束的体外释放

#### 3.4.1 释放介质的确立

由于聚合物中PAA嵌段的pKa约为4.5，具有pH敏感特性，因而选取了四种不同pH值的缓冲溶液作为体外释放介质，以考察VP胶束的体外释放行为，了解其pH响应性能。

确立释放介质的另一个标准是漏槽条件，其生理学解释为：药物在体内被迅速吸收，释药系统将基本不受到已释放药物的影响。在实际应用中，通常要求饱和浓度为释放介质中浓度的3-5 倍。VP 为难溶性药物，在水中溶解度仅约 5

µg/mL[[79,](#_bookmark162) [80]](#_bookmark163)，因此仅使用缓冲溶液不能满足漏槽条件，需加入适量的表面活性剂。经过简单的过饱和溶液法测定，VP在含0.5%SDS的醋酸-醋酸钠缓冲液和磷酸盐缓冲液中的溶解度均大于0.5 mg/mL，本释放试验设计为VP完全释放后介质中VP浓度约0.05 mg/mL，即能满足漏槽条件；而VP在0.1 N盐酸溶液中的溶解度大于0.5 mg/mL，不需加入SDS即可满足漏槽条件。

#### 3.4.2 含量测定方法的建立

由UV-Vis扫描图可知，VP在含0.5%SDS的醋酸-醋酸钠缓冲液和磷酸盐缓冲液中的最大吸收波长为225 nm，次吸收波长为269 nm，但在最大吸收波长处缓冲液略有吸收，而在269 nm处几乎没有吸收，且269 nm处VP的吸收值能满足测试要求，因此选择269 nm为检测波长。VP在0.1 N盐酸溶液中的最大吸收波长和次吸收波长分别为224 nm和270 nm，为方便检测，统一选择269 nm为检测波长。

表4.2列出了VP在不同pH的释放介质（0.1 N盐酸溶液、pH4.5的醋酸-醋酸钠缓冲液、pH6.5和pH7.4的磷酸盐缓冲液）中的标准曲线回归方程、相关系数以及浓度范围。

(A)



(B)



(C)



(D)



**图4.6 VP溶液与相应释放介质的UV-Vis扫描图。**(A) pH1.0的稀盐酸；(B) pH4.5的醋酸-醋酸钠缓冲液；(C) pH6.5的磷酸盐缓冲液；(D) pH7.4的磷酸盐缓冲液。

**表4.2** **VP在不同pH的释放介质中的标准曲线回归方程**

|  | 标准曲线回归方程 | R2 | 浓度范围 (mg/mL) |
| --- | --- | --- | --- |
| pH1 | A=22.182c+0.0188 | 0.9991 | 0.001~0.060 |
| pH4.5 | A=26.711c-0.0018 | 0.9998 | 0.0005~0.0500 |
| pH6.5 | A=29.181c+0.0028 | 1.0000 | 0.0005~0.0500 |
| pH7.4 | A=30.120c+0.0120 | 1.0000 | 0.0005~0.0500 |

#### 3.4.3 体外药物释放及数据拟合

以释放时间（h）为横坐标，药物累积释放百分率（%）为纵坐标，绘制VP溶液与VP胶束在不同pH环境下的累积释放曲线，如图4.7、4.8所示。从图4.7可知，VP溶液不同pH环境下的累积释放百分率均在2 h内达99%，表明VP可以自由地透过透析袋扩散，故透析袋对VP释放的阻滞作用几乎可忽略不计，本章所采用的体外释放方法（透析袋法）可被接受。

图4.8显示的是由AM-PK111-4P1聚合物所得VP胶束在不同pH环境下的释放曲线。由各曲线对比可知，本文合成所得聚合物制备所得VP胶束的体外释放具有较明显的pH敏感特征，在低pH环境下，可以较快地释放胶束内核中负载的疏水性药物VP，而在生理pH下，释放较缓慢。这是由于PAA嵌段的pKa

约为4.5[[81-83]](#_bookmark164)，具有pH敏感特征。由此，在释放介质pH低于4.5时，胶束中包载的药物的释放速率明显加快。pH1.0、pH4.5、pH6.5、pH7.4四种释放环境下，

VP胶束在12 h内的累积释放百分率分别为57%、34%、15%、9%，可见在低

pH环境下突释比较严重，而在接近生理pH时突释（12 h内释放率）在15%内，属于较良好范围（参考国外同类研究[[84-86]](#_bookmark165)，突释一般控制在20%以内）。其次，四种释放环境下72 h内的累积释放百分率分别为93%、69%、49%、43%，可见在低pH环境下药物释放较完全，而在生理pH环境下药物释放率不足50%，这主要是载药胶束的后续释药能力不足（后期释放曲线几乎呈直线）所致。最后，四种释放环境下的总释放率分别达99%、80%、77%、65%，同样的问题是生理

pH环境下药物释放率不足，可能是胶束粒子中良好的疏水内核在无其它外力影响下比较稳定且比较紧密，无溶剂进入通道而使得包载的药物无法顺利释放到外环境中。

VP胶束这样的释放特性，使得在后续工作中，可以利用pH敏感特征，比如用于肿瘤pH靶向，因为在肿瘤组织中的pH通常比生理pH低（能达到pH 5甚至更低）[[87]](#_bookmark166)。



**图4.7** **VP溶液在不同pH环境下的累积释放曲线**



**图4.8** **VP胶束(AM-PK111-4P1)在不同pH环境下的累积释放曲线**

以同样方法绘制不同组成的聚合物所得VP胶束在pH6.8环境下的累积释放曲线，如图4.9所示。从图中可以看出，VP胶束的释放速率随聚合物的臂数的增加而逐渐增加，但随之突释也相应地增加，相对而言，AM-PK111-4P1胶束的释放过程更缓和、持续。另一方面，含A1-β-CD的材料所得载药胶束的释放速率普遍比其它胶束快，可能是由于材料中含更多的环糊精，使得胶束空间构型更疏松，药物更容易被释放出来。



**图4.9** **不同组成的聚合物所得VP胶束的累积释放曲线**

对上述所得的各VP胶束体外释放曲线进行数学模型拟合，求得常数值k、

C及相关系数值R2如表4.10、4.11所示。从R2值可知，所有的释放曲线均对

Weibull方程的拟合度最高，其次，对Higuchi方程和Ritger-peppa方程的拟合度也较好。表明本文合成所得聚合物制备的VP胶束体外释放较平稳，具有一定的缓释能力。

**表4.3** **VP胶束在不同pH环境下的累积释放曲线的模型拟合参数**

|  |  | Ph 1 |  |  | Ph 4.5 |  |  | Ph 6.8 |  |  | Ph 7.4 |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | k | C | R2 | k | C | R2 | k | C | R2 | k | C | R2 |
| 零级释放动力学 | 0.71656 | 35.43584 | 0.6717 | 0.27992 | 29.83279 | 0.6781 | 0.32689 | 12.9943 | 0.8895 | 9.41318 | 0.29000 | 0.8791 |
| 一级释放动力学 | 0.05629 | -0.03387 | 0.9737 | 0.01092 | -0.19715 | 0.8612 | 0.00738 | -0.05925 | 0.9794 | 0.00554 | -0.04277 | 0.9600 |
| Higuchi 方程 | 0.09517 | 0.05938 | 0.8621 | 0.05173 | 0.13162 | 0.8654 | 0.00158 | -0.03715 | 0.9855 | 0.05028 | -0.05464 | 0.9770 |
| Ritger-peppas 方程 | 0.36002 | -1.61709 | 0.9066 | 0.32661 | -1.90677 | 0.9222 | 0.02508 | 0.12351 | 0.9807 | 0.55981 | -3.39327 | 0.9668 |
| Weibull 方程 | 0.80905 | -2.33145 | 0.9858 | 0.53664 | -2.26297 | 0.9700 | 0.75532 | -3.67643 | 0.9973 | 0.75078 | -3.92394 | 0.9860 |
| Hixcon-Crowe 方程 | 0.01127 | 0.95149 | 0.9320 | 0.00241 | 0.92075 | 0.8054 | 0.00193 | 0.97273 | 0.9586 | 0.00151 | 0.98002 | 0.9381 |
| Neibergull 方程 | -0.01041 | -0.88029 | 0.8716 | -0.00286 | -0.87123 | 0.7745 | -0.00253 | -0.95311 | 0.9449 | -0.00203 | -9.6564 | 0.9252 |

**表4.4 不同组成的聚合物所得VP胶束的累积释放曲线的模型拟合参数**

|  |  | AM-115-4P1 |  |  | AM-111-4P1 |  |  | AM-112-4P1 |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | k | C | R2 | k | C | R2 | k | C | R2 |
| 零级释放动力学 | 0.25763 | 10.56905 | 0.9655 | 0.32689 | 12.9943 | 0.8895 | 0.36241 | 9.8169 | 0.95474 |
| 一级释放动力学 | 0.00456 | -0.07157 | 0.9923 | 0.00738 | -0.05925 | 0.9794 | 0.00824 | -0.01483 | 0.99229 |
| Higuchi 方程 | 0.04434 | -0.02414 | 0.9818 | 0.00158 | -0.03715 | 0.9855 | 0.06207 | -0.08224 | 0.98177 |

续表4.4

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Ritger-peppas 方程 | 0.52334 | -3.28382 | 0.9727 | 0.02508 | 0.12351 | 0.9807 | 0.60048 | -3.4077 | 0.97273 |
| Weibull 方程 | 067246 | -3.66155 | 0.9948 | 0.75532 | -3.67643 | 0.9973 | 0.90825 | -4.35305 | 0.99484 |
| Hixcon-Crowe 方程 | 0.00127 | 0.97224 | 0.9775 | 0.00193 | 0.97273 | 0.9586 | 0.00218 | 0.98726 | 0.97749 |
| Neibergull 方程 | -0.00173 | -0.95543 | 0.9655 | -0.00253 | -0.95311 | 0.9449 | -0.00287 | -0.97416 | 0.96549 |

续表4.4

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  | AM-111-4P2 |  |  | AP-111-3P1 |  |  | AP-112-3P1 |  |
|  | k | C | R2 | k | C | R2 | k | C | R2 |
| 零级释放动力学 | 0.36132 | 14.9716 | 0.9413 | 0.34017 | 22.33809 | 0.7995 | 0.30781 | 32.59327 | 0.7219 |
| 一级释放动力学 | 0.00963 | -0.05063 | 0.9893 | 0.01177 | -0.09938 | 0.9617 | 0.01502 | -0.18995 | 0.9195 |
| Higuchi 方程 | 0.06275 | -0.03643 | 0.9813 | 0.06071 | 0.03635 | 0.9454 | 0.05612 | 0.14814 | 0.8943 |
| Ritger-peppas 方程 | 0.51634 | -2.90631 | 0.9771 | 0.41945 | -2.356 | 0.9597 | 0.32591 | -1.81499 | 0.9455 |
| Weibull 方程 | 0.80569 | -3.69603 | 0.9984 | 0.68925 | -2.97382 | 0.9938 | 0.5749 | -2.23958 | 0.9876 |
| Hixcon-Crowe 方程 | 0.00246 | 0.97392 | 0.9695 | 0.00285 | 0.9553 | 0.9265 | 0.00357 | 0.92654 | 0.8773 |
| Neibergull 方程 | -0.00317 | -9.5309 | 0.9545 | -0.00362 | -0.92464 | 0.9035 | -0.00532 | -0.89672 | 0.8719 |

## 4 本章小结

本章通过FT-IR、DLS、TEM等手段对由合成的两亲性多臂嵌段β-CD衍生物（β-CD~~[~~P(AA-co-MMA) -b-PVP] x）制备所得VP胶束进行了理化性质的表征，并对VP胶束的体外释放行为进行了研究，以确证合成的聚合物能较好地作为药物载体，并具有一定的缓释性能与pH敏感特性，为后续进行的体内行为研究作好了铺垫。

# 第五章 载药胶束在大鼠体内的组织分布研究

## 1 引言

在前一章，我们分别研究了VP胶束在不同pH环境下和不同聚合物组成的

VP胶束在同一种pH环境下的体外释药行为，初步证实了VP胶束在体外具有不同程度的缓释性能，且有一定的pH敏感特性。为了进一步考察VP胶束的体内行为规律，本章就系列两亲性β-CD星型聚合物中的2种制备的VP胶束进行大鼠体内药动学与组织分布研究，并以市售长春西汀注射液为对照，了解VP胶束在体内的分布特性与缓释性能。

## 2 实验方法

### 2.1 试剂与仪器

长春西汀注射液，2 mL，10 mg/mL，河南润弘制药股份有限公司；

长春西汀（vinpocetine, VP），42971-09-5，含量(%): 99%，东北制药（沈阳）科技发展有限公司；

甲醇，HPLC/500mL，天津市科密欧化学试剂有限公司；肝素钠，≥150 u/mg, Amresco分装；

甲醇，HPLC/4L，Oceanpak Alexative chemical Co., Ltd.；乙腈，HPLC/4L，Oceanpak Alexative chemical Co., Ltd.；蒸馏水，屈臣氏；

无水乙醚，AR/500mL，衡阳市凯信化工试剂有限公司；其它试剂为分析纯或以上；

集热式恒温加热磁力搅拌器，DF-101S型，巩义市予华仪器有限责任公司；旋转蒸发器，RE-52A型，上海亚荣生化仪器厂；

循环水式真空泵，SHZ-D(III)型，巩义市予华仪器有限责任公司；高效液相色谱仪，1260型四元梯度系统，Agilent Technologies；

C18色谱柱，Gemini C18 (5µm, 250×4.6 mm), Phenomenex Inc.；高速离心机，H/T18MM型，赫西仪器装备有限公司；

涡漩混合器，Vortex5型，江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司；数显高速分散均质机，FJ200-S型，上海标本模型厂；

电子天平，CP114型，OHAUS, Co.；

氮吹仪，D10型，杭州奥盛仪器有限公司。

### 2.2 实验动物

Dprague-Dawley大鼠，SPF级，雄性，280±20 g，购于广州中医药大学（大学城）实验动物中心，许可证号：SCXK（粤）2008-0020。

### 2.3 VP体内分析方法的建立

#### 2.3.1 Th物样品处理方法

取大鼠心、肝、脾、肺、肾、脑样品，分别精密称定；按1: 4比例定量加入生理盐水，在冰水浴条件下置高速分散均质机中匀浆；精密称取1 g组织匀浆液，血浆取1 mL，分别加入0.2 mL 1 mol/L NaOH碱化，涡旋混合30 s；加入4 mL

无水乙醚提取，涡旋混合3 min，于5000 r/min离心5 min，将上清液移至另一干净离心管中；沉淀中再加入4 mL无水乙醚，同上述进行第二次提取；合并上清液，于40°C水浴氮气吹干；残留物用200µL甲醇溶解，12000 r/min离心10 min，取上清液按色谱条件进行分析，以峰面积外标法进行定量分析。

#### 2.3.2 色谱条件

色谱分析采用Gemini C18（5µm, 250×4.6 mm）色谱柱，流动相为水：甲醇：

乙腈=30: 30: 40，流速为1 mL/min，检测波长为274 nm，柱温为40°C，进样量

为10µL。

#### 2.3.3 标准溶液的配制

精密称取VP对照品10.00 mg，置于10 mL容量瓶中，加甲醇超声溶解并定容至刻度，摇匀，即得1.00 mg/mL的VP标准储备液。精密量取一定量的VP标准储备液，分别用甲醇稀释定容至两个10.0 mL容量瓶中，配成浓度为100.00

µg/mL和10.00µg/mL的VP标准溶液。所有标准液均置于冰箱中冷藏待用。

#### 2.3.4 方法专属性考察

取大鼠空白血浆和各空白组织，分别按照“2.3.1”生物样品处理方法处理，

得相应的空白样品。

取大鼠空白血浆和各空白组织匀浆液，分别加入VP标准储备液10µL，涡旋混合30 s，按照“2.3.1”生物样品处理方法处理，得相应的加标样品。

将空白样品、加标样品和10.00µg/mL的VP标准溶液，按“2.3.2”色谱条件进行测定，对比所得色谱图。

#### 2.3.5 Th物样品标准曲线的建立

从VP标准溶液中精密量取一系列的溶液，用空白不含药的血浆、组织匀浆液定容，配成VP的血浆、组织匀浆的标准溶液，涡旋混合30 s，按上述生物样品处理方法和色谱条件进行操作及分析，记录峰面积。以VP样品浓度（µg/mL，

C）为横坐标，VP峰面积（A）为纵坐标，进行线性回归，得标准曲线回归方程。

#### 2.3.6 分析方法的回收率考察

取大鼠空白血浆及各空白组织匀浆液，精密加入一定量的VP标准溶液，配制得高、中、低三种不同浓度的血浆及组织样品，其中血浆样品的三种浓度分别为18.00µg/mL、15.00µg/mL、12.00µg/mL，肝、心、肾组织样品的三种浓度分别为12.00µg/mL、10.00µg/mL、8.00µg/mL，肺、脾、脑组织样品的三种浓度分别为50.00µg/mL、40.00µg/mL、30.00µg/mL。涡旋混合30 s，按上述生物样品处理方法和色谱条件进行操作及分析，记录峰面积，代入相应的标准曲线，通过测得量与加入量的比值求得相对回收率。

2.3.7分析方法的精密度考察

取大鼠空白血浆及各空白组织匀浆液，精密加入一定量的VP标准溶液，配制得高、中、低三种不同浓度的血浆及组织样品，其中血浆样品的三种浓度分别为18.00µg/mL、15.00µg/mL、12.00µg/mL，肝组织样品的三种浓度分别为12.00

µg/mL、10.00µg/mL、8.00µg/mL，肺组织样品的三种浓度分别为50.00µg/mL、

40.00µg/mL、30.00µg/mL。涡旋混合30 s，按上述生物样品处理方法和色谱条件进行操作及分析，记录峰面积。一天内进样5次，考察高、中、低三种浓度的日内精密度，第天测定一次，连续测定5天得日间精密度。

### 2.4 载药胶束的制备

采用第三章优化后的溶剂挥发法制备VP胶束，详细操作方法见第三章。使

用的聚合物材料批号为AM-PK111-4P1、AP-PK111-3P1。选择这两种聚合物材料，是因为：1）胶束溶液中的VP浓度（<2 mg/mL）相对市售注射液中的VP浓度

（10 mg/mL）较低，因此选择载药量较高（VP浓度较高）的胶束，2）在体外释放实验中得出，加入环糊精单体的聚合物所得VP胶束，其前期释放速率显著提高，这能使两种胶束的体外释放差异较大，因此在本章作体内组织分布对比，初步考察其体内外相关性。

### 2.5 大鼠组织分布研究

雄性SD大鼠80只，随机分为3组，每组25只，每个时间点5只，其余作为空白组，实验前禁食12 h以上，不禁水。3组SD大鼠分别给予对照组市售长春西汀注射液（5%葡萄糖溶液稀释至1 mg/mL）以及胶束组2种不同的胶束溶液，以8 mg/kg的剂量由尾静脉注射给药。分别于给药后7 min、15 min、30 min、60 min、90 min眼眶取血5 mL，处死后立即取心、肝、脾、肺、肾、脑组织。血样置于经肝素钠润洗过的离心管中，3500 rpm离心15 min后，取血浆置于另一离心管中；组织样品用冷生理盐水冲洗，滤纸吸干后称重，装入离心管中。血浆和组织样品置于-20°C冻存待测。

### 2.6 VP胶束靶向性评价

分别以相对摄取率、峰浓度比和靶向效率来评价VP胶束的靶向性[[88]](#_bookmark167)。各计算公式如下：

1)相对摄取率：re=AUCmicelles / AUCinjection

其中：AUCmicelles表示胶束制剂在器官中的药－时曲线下面积，AUCinjection表示注射液在该器官中的药－时曲线下面积

re表示药物制剂对靶器官的选择性，re越大表示靶向效果越好，等于或小于

1表示无靶向性。

2)峰浓度比：Ce=(Cmax) micelles / (Cmax) injection

其中：(Cmax) micelles为胶束制剂的峰浓度，(Cmax) injection为注射液的峰浓度

Ce值表示药物制剂改变药物在各组织或器官中的分布效果，Ce越大表示改变药物分布的效果越明显。

3)靶向效率：te=AUCtissue / AUCplasma

其中：AUCtissue表示制剂在靶器官中的药－时曲线下面积，AUCplasma表示制剂在血浆中的药－时曲线下面积

靶向效率可用于比较同一制剂对不同组织的趋向性差异。

## 3 结果与讨论

### 3.1 Th物样品前处理方法

采用高效液相色谱法进行分析一般不要求复杂的样品预处理过程，但是对于生物样品，样品中含有大量的内源性物质，不仅能与药物及其代谢物结合，且常干扰测定，因此，生物样品的前处理是色谱分析中必不可少的操作步骤，其主要目的是：改善组分的可测定性、改善分析结果的准确度与精密度、延长色谱柱的寿命、改善分析的选择性、改变样品中组分的色谱行为等。目前，液体样品的前处理方法主要有蛋白沉淀、液－液萃取、固相萃取等。

3.1.1蛋白沉淀法

蛋白沉淀法是指加入与水相混溶的有机溶剂、中性盐、强酸、酶等，使样品中的蛋白质变性沉淀，这种方法操作简便、快速，也足以保护色谱柱不受蛋白质沉淀的影响，常用于大批量样品前处理。但是对于蛋白结合率较高的药物，去蛋白过程常常伴随着药物的共沉淀，而且某些酸性蛋白质沉淀剂易使药物降解，影响定量结果。在研究初期，曾探讨使用三氯乙酸、乙腈、甲醇等蛋白沉淀剂处理生物样品，结果使用三氯乙酸沉淀时导致VP部分分解，而采用乙腈、甲醇沉淀时回收率较低，因VP的蛋白结合率较高，达66%[[89]](#_bookmark168)。故在本实验中不采用蛋白沉淀法。

3.1.2液－液萃取法

液－液萃取法是最经典的样品前处理方法，它的操作装置简单，只需选择合适的萃取溶剂，即可把待测物质从所在样品介质中提取出来，达到分离和富集的目的。在提取过程中，提高回收率可以通过调节pH值，使被提取组分呈分子状态，或者加入一些强离子的无机盐（如氯化钠），利用盐析作用，促进组分进入有机相，而通过选择不同的有机溶剂可提高提取的选择性[[90]](#_bookmark169)。液－液萃取法一

般适用于水为基质的样品中非极性或弱极性组分的提取。与其它方法相比，液－液提取法较费时、劳动强度大、有机溶剂消耗量大、容易引入污染或样品损失[[90](#_bookmark169)]。另外，萃取过程中容易出现乳化现象，可加入适当的试剂改变其表面张力而破乳，或使用特殊的方法，如硅藻土吸附。

经综合考虑，本实验选择液－液萃取法对生物样品进行前处理。考虑到VP有一定碱性，参考相关文献，加入NaOH碱化生物样品，形成分子状态可以被有机溶剂提取。另外，在方法建立初期考察了几种不同的有机溶剂作为萃取剂，如乙醚、乙酸乙酯、正己烷。其中乙醚提取样品分析发现内源性物质不干扰样品出峰，且提取效率较高，故采用乙醚作提取溶剂。

3.1.3固相萃取法

固相萃取，是将待测样品置入一根常压色谱柱中，然后用不同强度的溶剂洗脱，以达到纯化样品的目的。与液－液萃取法相比，固相萃取法的优点有[[91]](#_bookmark170)：快速，一般1~2 min即可完成一个样品的处理，且可同时批量处理；回收率高，通常超过90%；精密度比较好；样品用量少，有一定的选择性，无乳化现象等。固相萃取现已被广泛应用于各种生物样品的分离和纯化。

在本实验初期，曾尝试使用固相萃取处理生物样品，得到的提取回收率比采用液－液萃取法高，达到95%左右，同时，杂质有所减少。但由于没有固相萃取仪，采用人手操作，得到的精密度稍差，约为15%。综合考虑，固相萃取并没有显示出其优势，因而放弃使用。

### 3.2 方法专属性

按“2.3.4”进行实验，结果如图5.1所示。在大鼠的血浆及组织样品分析中，

VP达到良好的基线分离，保留时间约为15 min，理论塔板数每米大于5000，且生物样品中内源性物质均不干扰体内VP的含量测定。

(A)



(B)



(C)



(D)



(E)



(F)



(G)



**图5.1方法专属性考察结果。**（A）血浆；（B）心；（C）肝；（D）脾；（E）肺；（F）肾；（G）脑

### 3.3 血浆及各组织的标准曲线

经回归处理，血浆及各组织的标准曲线回归方程、相关系数以及浓度范围如表5.1所示。结果表明，血浆、肝组织和肺组织中VP浓度在范围内，浓度与峰面积之间具有良好的线性关系。心组织和肾组织使用肝组织标准曲线进行定量，脾组织和脑组织使用肺组织标准曲线进行定量。

**表5.1** **VP在血浆及各组织的标准曲线回归方程**

|  | 标准曲线回归方程 | R | 浓度范围(µg/mL) |
| --- | --- | --- | --- |
| 血浆 |  | 0.9991 | 1.00~30.00 |
| 肝、心、肾 |  | 0.9991 | 0.20~20.00 |
| 肺、脾、脑 |  | 0.9990 | 0.70~70.00 |

### 3.4 分析方法的回收率和精密度

按“2.3.6”所得大鼠血浆及各组织的相对回收率与精密度结果如表5.2-5.4所示。结果表明，本方法的回收率、日内精密度及日间精密度的结果符合临床药代动力学的研究要求。

**表5.2 大鼠血浆及各组织中样品的相对回收率（n=5）**

|  | C (µg/mL) | X±SD (%) | RSD (%) |
| --- | --- | --- | --- |
| 血浆 | 12.00 | 87.08±2.03 | 2.33 |
|  | 15.00 | 88.25±2.75 | 3.12 |
|  | 18.00 | 89.01±2.55 | 2.86 |
| 心 | 8.00 | 88.02±1.26 | 1.48 |
|  | 10.00 | 89.38±2.20 | 2.53 |
|  | 12.00 | 90.65±1.87 | 2.17 |
| 肝 | 8.00 | 88.12±1.10 | 1.29 |
|  | 10.00 | 90.62±1.51 | 1.74 |
|  | 12.00 | 89.01±2.09 | 2.41 |
| 脾 | 30.00 | 85.21±3.01 | 3.42 |
|  | 40.00 | 87.08±3.28 | 3.67 |
|  | 50.00 | 86.16±2.67 | 2.94 |
| 肺 | 30.00 | 85.05±2.10 | 2.38 |
|  | 40.00 | 86.59±3.27 | 3.61 |
|  | 50.00 | 86.66±2.39 | 2.69 |
| 肾 | 8.00 | 88.92±1.83 | 2.15 |
|  | 10.00 | 90.48±3.23 | 3.74 |
|  | 12.00 | 88.05±1.37 | 1.58 |
| 脑 | 30.00 | 85.09±2.96 | 3.33 |
|  | 40.00 | 86.31±1.66 | 1.84 |
|  | 50.00 | 86.75±2.32 | 2.63 |

**表5.3 大鼠血浆及各组织中样品的日内精密度（n=5）**

|  | C (µg/mL) | X±SD (µg/mL) | RSD (%) |
| --- | --- | --- | --- |
| 血浆 | 12.00 | 11.98±0.71 | 5.93 |
|  | 15.00 | 15.01±0.58 | 3.89 |
|  | 18.00 | 18.03±0.51 | 2.84 |
| 肝 | 8.00 | 8.01±0.51 | 6.35 |
|  | 10.00 | 9.97±0.53 | 5.27 |
|  | 12.00 | 11.99±0.52 | 4.33 |
| 肺 | 30.00 | 29.96±1.68 | 5.61 |
|  | 40.00 | 40.05±1.63 | 4.06 |
|  | 50.00 | 50.02±1.34 | 2.68 |

**表5.4 大鼠血浆及各组织中样品的日间精密度（n=5）**

|  | C (µg/mL) | X±SD (µg/mL) | RSD (%) |
| --- | --- | --- | --- |
| 血浆 | 12.00 | 11.99±0.89 | 7.44 |
|  | 15.00 | 14.98±0.87 | 5.83 |
|  | 18.00 | 18.04±0.63 | 3.47 |
| 肝 | 8.00 | 8.03±0.82 | 10.23 |
|  | 10.00 | 10.01±0.85 | 8.52 |
|  | 12.00 | 11.98±0.75 | 6.29 |
| 肺 | 30.00 | 30.03±2.75 | 9.15 |
|  | 40.00 | 39.97±3.05 | 7.63 |
|  | 50.00 | 50.04±2.28 | 4.56 |

### 3.5 VP在大鼠组织分布结果与特点

根据不同时间点的血药浓度，得到血药浓度－时间曲线，如图5.2所示。市售注射液对照组的血药浓度比胶束组高，且消除比胶束组慢。按照现有趋势推断，市售注射液对照组的血药浓度将出现双峰，而胶束组的血药浓度均呈快速降低趋势。这从一定程度上反映出有载体包载的VP（胶束）比无载体包载的VP（注射液）更迅速地分布到组织中，且能滞留在组织中释放药物，而市售注射液对照组

将出现的第二个血药浓度峰可能是由于分布于组织中的药物重新进入血液循环所致。

市售注射液对照组和胶束组的大鼠体内组织分布如图5.3－5.5所示。可以明显看出，不管是胶束组还是市售注射剂组，几乎每个时间点的血药浓度均比组织中浓度低。这与姚继红[[92]](#_bookmark171)等研究结果相符，VP的表观分布容积（Vd）较高，因而更倾向于分布于组织器官中。对于市售注射剂对照组，各器官组织中VP浓度无显著差异（P> 0.05），这说明VP 的体内分布无特殊选择性；而脑组织可测得原形药，且浓度较其它组织略高，这可能与VP脂溶性较高有关，提示VP以常规注射液形式给药也能达到较好的治疗效果。胶束组相对于市售注射剂组，最明显的特征是胶束促进了VP在肺组织中的分布，而相应的是在其它组织中的VP浓度略有降低，另一特征是加快了VP在体内的消除速率，在90 min后大部分组织的VP浓度都变得非常低。

胶束组所表现出的肺靶向现象可能原因是胶束带有少量正电荷，引起吸附介导的胞吞转运使胶束进入细胞内。霍美蓉、王金丽等[[93]](#_bookmark172)研究表明，带正电荷的粒子由于静电作用更易被肺组织摄取，因而肺靶向作用更强，而且，带电荷的粒子，无论是带正电荷还是带负电荷，在心脏和肾脏的分布都较少，本研究所得结果与之基本相符。在我们合成的聚合物中，丙烯酸基团的羧基在中性环境下是带负电荷的，而乙烯基吡咯烷酮基团的N原子在中性环境下是部分带正电荷[[94]](#_bookmark173)的，而制得的胶束表面带少量正电荷，推测正电荷来自于N原子。另一方面，研究表明[[95]](#_bookmark174)，粒子表面的正电荷会导致亲水性增加，从而受到生物膜结构疏水－亲水作用力的排斥。粒子进入细胞是吸引力和排斥力共同作用的结果，那么，胶束组的组织分布规律可以解释为，表面带正电荷的胶束在肺组织受到更多的吸引力作用，而在其它组织受到更多的排斥力作用。

从达峰时间上看，市售注射液在组织中的达峰时间普遍比胶束组长，这可能是由于VP扩散进入组织细胞比胶束吸附介导的胞吞转运进入细胞慢。而两种聚合物胶束的达峰时间基本一致，这说明额外增加的环糊精对细胞亲和力影响不明显，即电中性的β-环糊精不影响胶束的表面电荷。



**图5.2 血药浓度与时间变化关系曲线**



**图5.3** **AM-PK111-4P1载药胶束在大鼠中的组织分布**



**图5.4** **AP-PK111-3P1载药胶束在大鼠中的组织分布**



**图5.5** **注射液在大鼠中的组织分布**

### 3.6 VP胶束靶向性评价

采用同上海博佳医药科技有限公司编写的DAS 3.1.1软件，计算出各血浆或组织的AUC（采用非房室模型统计矩参数），以相对摄取率Re、峰浓度比Ce、靶向效率Te作为评价参数，结果如表5.5所示。

从总体上看，胶束组和市售注射液组的组织靶向效率Te均大于1，表明VP

更倾向于分布于组织器官中，与上述分析相符。其中，对于肺组织，AM-111-4P1和AP-111-3P1两种胶束制剂组的靶向效率Te分别为市售注射液组的8.98倍和

7.45倍，而其它组织（心、肝、脾、肾、脑）的靶向效率无明显差异，表明该类型聚合物胶束制剂能较好地提高VP的肺靶向能力。

从Re和Ce来看，除肺组织外，其它组织和血液的Re和Ce均小于1或略大于1。而在肺组织中，AM-111-4P1和AP-111-3P1两种胶束制剂组的相对摄取率

Re达到4.71和4.49，峰浓度比Ce分别为4.32和4.11。表明胶束制剂相对于市售注射液，只在肺组织中表现出明显的蓄积现象，且能在一定程度上减少在其它组织中的蓄积，这是靶向制剂设计的最佳方向。

**表5.5** **靶向性评价参数表**

| 组织 | Re | AM-111-4P1  Ce | Te | Re | AP-111-3P1  Ce | Te | 注射液  Te |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 血 | 0.53 | 0.73 | 1.00 | 0.68 | 0.68 | 1.00 | 1.00 |
| 心 | 0.48 | 0.40 | 1.31 | 0.51 | 0.76 | 1.22 | 1.44 |
| 肝 | 0.68 | 0.93 | 2.09 | 0.79 | 0.76 | 2.10 | 1.61 |
| 脾 | 0.46 | 0.43 | 1.61 | 0.78 | 1.04 | 2.38 | 1.84 |
| 肺 | 4.71 | 4.32 | 18.31 | 4.49 | 4.11 | 15.20 | 2.04 |
| 肾 | 0.96 | 0.92 | 4.03 | 0.74 | 0.97 | 2.69 | 2.20 |
| 脑 | 0.71 | 0.61 | 3.31 | 0.71 | 1.07 | 2.88 | 2.46 |

## 4 本章小结

通过建立合适的、可靠的体内药物分析方法，初步研究了聚合物胶束制剂在大鼠体内的组织分布规律，并与市售注射液进行了比较，结果表明，聚合物胶束制剂显示出一定的肺靶向性，但其在体内消除速率较快。

对于所选取的两种聚合物，主要差异在于环糊精的含量，但从结果来看，两种胶束制剂无明显差异，具体原因有待进一步研究。

参考文献

[1] Bader H., Ringsdorf H., Schmidt B. Watersoluble polymers in medicine[J]. Die Angewandte Makromolekulare Chemie. 1984, 123(1): 457-485.

[2] Kwon G. S. Polymeric micelles for delivery of poorly water-soluble compounds[J]. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 2003, 20(5): 357-403.

[3] Allen C., Maysinger D., Eisenberg A. Nano-engineering block copolymer aggregates for drug delivery[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 1999, 16(1–4): 3-27.

[4] Villiers A. Sur la transformation de la fécule en dextrine par le ferment butyrique[J]. Compt Rend Fr Acad Sci. 1891, 112: 435-438.

[5] Uekama K., Hirayama F., Irie T. Cyclodextrin Drug Carrier Systems[J]. Chem Rev. 1998, 98(5): 2045-2076.

[6]杨建平， 巨晓洁， 褚良银. 两亲性环糊精的合成研究进展[J]. 化工进展.

2008, 27(1): 21-25.

[7]申健. 新型β-环糊精衍生物的合成及应用[D]. ft东: ft东大学, 2008。

[8] Dodziuk H. Cyclodextrins and their complexes: chemistry, analytical methods, applications[M]. Wiley-VCH, 2006.

[9] Khan A. R., Forgo P., Stine K. J., D'Souza V. T. Methods for Selective Modifications of Cyclodextrins[J]. Chem Rev. 1998, 98(5): 1977-1996.

[10] Vyas A., Saraf S., Saraf S. Cyclodextrin based novel drug delivery systems[J]. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry. 2008, 62(1-2): 23-42.

[11] Szejtli J. Cyclodextrin technology[M]. Springer, 1988.

[12] Falvey P., Lim C. W., Darcy R., Revermann T., Karst U., Giesbers M., Marcelis A. T., Lazar A., Coleman A. W., Reinhoudt D. N., Ravoo B. J. Bilayer vesicles of amphiphilic cyclodextrins: host membranes that recognize guest molecules[J]. Chemistry. 2005, 11(4): 1171-1180.

[13]黄燕玉， 孟婷， 曲国威， 张灿. 两亲性聚合物聚乙二醇单甲醚-聚乳酸-β-环

糊精的合成、表征及载药性能[J]. 中国药科大学学报. 2011, 42(4)：294-298.

[14] Gou P. -F., Zhu W. -P., Xu N., Shen Z. -Q. Synthesis and characterization of well-defined cyclodextrin-centered seven-arm star poly(ε-caprolactone) s and amphiphilic star poly(ε-caprolactone-b-ethylene glycol) s[J]. Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry. 2008, 46(19): 6455-6465.

[15]叶琳， 张明祖， 闻荻江. 两亲性高聚物的研究进展[J]. ft东轻工业学院学

报（自然科学版）. 2005, 19(3): 9-13.

[16]张俊乐，付鹏，赵清香，刘民英， 阮先辉， 王玉东. 两亲性星型聚合物合成的研究进展[J]. 高分子材料科学与工程. 2010, 26(8)：154-156.

[17] Otsu T., Yoshida M. Role of initiator-transfer agent-terminator (iniferter) in radical polymerizations: Polymer design by organic disulfides as iniferters[J]. Die Makromolekulare Chemie, Rapid Communications. 1982, 3(2): 127-132.

[18] Georges M. K., Veregin R. P. N., Kazmaier P. M., Hamer G. K. Narrow molecular weight resins by a free-radical polymerization process[J]. Macromolecules. 1993, 26(11): 2987-2988.

[19] Wang J. -S., Matyjaszewski K. Controlled/" living" radical polymerization. atom transfer radical polymerization in the presence of transition-metal complexes[J]. Journal of the American Chemical Society. 1995, 117(20): 5614-5615.

[20] Percec V., Barboiu B." Living" Radical Polymerization of Styrene Initiated by Arenesulfonyl Chlorides and CuI(bpy) nCl[J]. Macromolecules. 1995, 28(23): 7970-7972.

[21] Matyjaszewski K., Xia J. Atom transfer radical polymerization[J]. Chem Rev. 2001, 101(9): 2921-2990.

[22] Chiefari J., Chong Y. K., Ercole F., Krstina J., Jeffery J., Le T. P. T., Mayadunne R. T. A., Meijs G. F., Moad C. L., Moad G., Rizzardo E., Thang S. H. Living Free-Radical Polymerization by Reversible Addition−Fragmentation Chain Transfer: The RAFT Process[J]. Macromolecules. 1998, 31(16): 5559-5562.

[23] Barner-Kowollik C., Perrier S. The future of reversible addition fragmentation chain transfer polymerization[J]. Journal of Polymer Science Part A: Polymer

Chemistry. 2008, 46(17): 5715-5723.

[24] Thang S. H., Chong Y. K., Mayadunne R. T. A., Moad G., Rizzardo E. A novel synthesis of functional dithioesters, dithiocarbamates, xanthates and trithiocarbonates[J]. Tetrahedron Letters. 1999, 40(12): 2435-2438.

[25]王艳君， 王玉霞， 袁才登， 曹同玉. 可逆加成-断裂链转移活性自由基聚合

[J]. 高分子通报. 2003, (3): 57-63.

[26] Mayadunne R. T. A., Jeffery J., Moad G., Rizzardo E. Living Free Radical Polymerization with Reversible Addition−Fragmentation Chain Transfer (RAFT Polymerization):  Approaches to Star Polymers[J]. Macromolecules. 2003, 36(5): 1505-1513.

[27] Dingenouts N., Norhausen C., Ballauff M. Observation of the Volume Transition in Thermosensitive Core−Shell Latex Particles by Small-Angle X-ray Scattering[J]. Macromolecules. 1998, 31(25): 8912-8917.

[28] Lu Y., Mei Y., Drechsler M., Ballauff M. Thermosensitive Core–Shell Particles as Carriers for Ag Nanoparticles: Modulating the Catalytic Activity by a Phase Transition in Networks[J]. Angewandte Chemie International Edition. 2006, 45(5): 813-816.

[29] Hu X., Jing X. Biodegradable amphiphilic polymer-drug conjugate micelles[J]. Expert Opin Drug Deliv. 2009, 6(10): 1079-1090.

[30] Mikhail A. S., Allen C. Block copolymer micelles for delivery of cancer therapy: transport at the whole body, tissue and cellular levels[J]. J Control Release. 2009, 138(3): 214-223.

[31] Gao Z., Varshney S. K., Wong S., Eisenberg A. Block Copolymer" Crew-Cut" Micelles in Water[J]. Macromolecules. 1994, 27(26): 7923-7927.

[32] Zhang L., Eisenberg A. Multiple Morphologies and Characteristics of" Crew-Cut" Micelle-like Aggregates of Polystyrene-b-poly(acrylic acid) Diblock Copolymers in Aqueous Solutions[J]. Journal of the American Chemical Society. 1996, 118(13): 3168-3181.

[33] Zhang L., Eisenberg A. Morphogenic Effect of Added Ions on Crew-Cut Aggregates of Polystyrene-b-poly(acrylic acid) Block Copolymers in

Solutions[J]. Macromolecules. 1996, 29(27): 8805-8815.

[34] Zhang L., Yu K., Eisenberg A. Ion-Induced Morphological Changes in" Crew-Cut" Aggregates of Amphiphilic Block Copolymers[J]. Science. 1996, 272(5269): 1777-1779.

[35] Zhang L., Eisenberg A. Formation of crew-cut aggregates of various morphologies from amphiphilic block copolymers in solution[J]. Polymers for Advanced Technologies. 1998, 9(10-11): 677-699.

[36] Zhou Y., Yan D. Supramolecular self-assembly of giant polymer vesicles with controlled sizes[J]. Angew Chem Int Ed Engl. 2004, 43(37): 4896-4899.

[37]姜维， 王运东， 费维扬， 刘玉玲. 嵌段共聚物胶束作为药物载体的研究进

展[J]. 中国医药工业杂志. 2004, 35(4): 50-54.

[38]焦真，王星，陈志明. 两亲嵌段聚合物载药胶束研究进展[J]. 高分子通报. 2010，(12)：78-83.

[39] Jiao Z., Liu N., Chen Z. Selection suitable solvents to prepare paclitaxel-loaded micelles by solvent evaporation method[J]. Pharm Dev Technol. 2012, 17(2): 164-169.

[40] Yu B. G., Okano T., Kataoka K., Kwon G. Polymeric micelles for drug delivery: solubilization and haemolytic activity of amphotericin B[J]. J Control Release. 1998, 53(1-3): 131-136.

[41]张文涛， 王东凯， 何晓霞， 潘英， 黄庆柏， 韩凌， 林丽峰， 刘晓棠. 冬凌草

甲素嵌段共聚物胶束的制备与表征[J]. 中国新药杂志. 2009, 18（16）：

1560-1565.

[42] Maeda H. Tumor-selective delivery of macromolecular drugs via the EPR effect: background and future prospects[J]. Bioconjug Chem. 2010, 21(5): 797-802.

[43] Lukyanov A. N., Hartner W. C., Torchilin V. P. Increased accumulation of PEG-PE micelles in the area of experimental myocardial infarction in rabbits[J]. J Control Release. 2004, 94(1): 187-193.

[44] Lu T., Sun J., Chen X., Zhang P., Jing X. Folate-conjugated micelles and their folate-receptor-mediated endocytosis[J]. Macromol Biosci. 2009, 9(11):

1059-1068.

[45] Wu X. L., Kim J. H., Koo H., Bae S. M., Shin H., Kim M. S., Lee B. H., Park R. W., Kim I. S., Choi K., Kwon I. C., Kim K., Lee D. S. Tumor-targeting peptide conjugated pH-responsive micelles as a potential drug carrier for cancer therapy[J]. Bioconjug Chem. 2010, 21(2): 208-213.

[46] Xu J., Liu S. Synthesis of well-defined 7-arm and 21-arm poly(N-isopropylacrylamide) star polymers withβ-cyclodextrin cores via click chemistry and their thermal phase transition behavior in aqueous solution[J]. Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry. 2009, 47(2): 404-419.

[47] Zhang J., Ellsworth K., Ma P. X. Hydrophobic pharmaceuticals mediated self-assembly of beta-cyclodextrin containing hydrophilic copolymers: novel chemical responsive nano-vehicles for drug delivery[J]. J Control Release. 2010, 145(2): 116-123.

[48] Gross R. A., Kalra B. Biodegradable polymers for the environment[J]. Science. 2002, 297(5582): 803-807.

[49] Hu Y., Jiang X., Ding Y., Ge H., Yuan Y., Yang C. Synthesis and characterization of chitosan-poly(acrylic acid) nanoparticles[J]. Biomaterials. 2002, 23(15): 3193-3201.

[50] Benahmed A., Ranger M., Leroux J. C. Novel polymeric micelles based on the amphiphilic diblock copolymer poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) -block-poly(D, L-lactide)[J]. Pharm Res. 2001, 18(3): 323-328.

[51] Frutos P., Diez-Pena E., Frutos G., Barrales-Rienda J. M. Release of gentamicin sulphate from a modified commercial bone cement. Effect of (2-hydroxyethyl methacrylate) comonomer and poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) additive on release mechanism and kinetics[J]. Biomaterials. 2002, 23(18): 3787-3797.

[52] Ribeiro L. S., Ferreira D. C., Veiga F. J. Physicochemical investigation of the effects of water-soluble polymers on vinpocetine complexation with beta-cyclodextrin and its sulfobutyl ether derivative in solution and solid state[J]. Eur J Pharm Sci. 2003, 20(3): 253-266.

[53] Wilhelm M., Zhao C. L., Wang Y., Xu R., Winnik M. A., Mura J. L., Riess G., Croucher M. D. Poly(styrene-ethylene oxide) block copolymer micelle formation in water: a fluorescence probe study[J]. Macromolecules. 1991, 24(5): 1033-1040.

[54] Astafieva I., Zhong X. F., Eisenberg A. Critical micellization phenomena in block polyelectrolyte solutions[J]. Macromolecules. 1993, 26(26): 7339-7352.

[55] Jeong J. H., Park T. G. Novel polymer-DNA hybrid polymeric micelles composed of hydrophobic poly(D, L-lactic-co-glycolic acid) and hydrophilic oligonucleotides[J]. Bioconjug Chem. 2001, 12(6): 917-923.

[56] Sudalai A., Kanagasabapathy S., Benicewicz B. C. Phosphorus pentasulfide: A mild and versatile Catalyst/Reagent for the preparation of dithiocarboxylic esters[J]. Org Lett. 2000, 2(20): 3213-3216.

[57] Moad G., Rizzardo E., Thang S. H. Living Radical Polymerization by the RAFT Process[J]. Australian Journal of Chemistry. 2005, 58(6): 379-410.

[58] Moad G., Rizzardo E., Thang S. H. Living Radical Polymerization by the RAFT Process—A First Update[J]. Australian Journal of Chemistry. 2006, 59(10): 669-692.

[59] Denisov E. T., Denisova T. G., Pokidova T. S. Handbook of free radical initiators[M]. Wiley-Interscience, 2003.

[60] Quinn J. F., Barner L., Barner-Kowollik C., Rizzardo E., Davis T. P. Reversible Addition−Fragmentation Chain Transfer Polymerization Initiated with Ultraviolet Radiation[J]. Macromolecules. 2002, 35(20): 7620-7627.

[61] Bai R. -K., You Y. -Z., Pan C. -Y. 60Coγ-Irradiation-Initiated" Living" Free-Radical Polymerization in the Presence of Dibenzyl Trithiocarbonate[J]. Macromolecular Rapid Communications. 2001, 22(5): 315-319.

[62] S. D. M., A. S. T., B. L. A., S. S. B., Yoshiro M., L. M. C. RAFT polymerization of N, N-dimethylacrylamide in water[J]. Macromolecules. 2002, 35(12): 4570-4572.

[63] Wang Z., He J., Tao Y., Yang L., Jiang H., Yang Y. Controlled Chain Branching by RAFT-Based Radical Polymerization[J]. Macromolecules. 2003,

36(20): 7446-7452.

[64] Nagasaki Y., Okada T., Scholz C., Iijima M., Kato M., Kataoka K. The Reactive Polymeric Micelle Based on An Aldehyde-Ended Poly(ethylene glycol) /Poly(lactide) Block Copolymer[J]. Macromolecules. 1998, 31(5): 1473-1479.

[65] Hans M., Shimoni K., Danino D., Siegel S. J., Lowman A. Synthesis and Characterization of mPEG−PLA Prodrug Micelles[J]. Biomacromolecules. 2005, 6(5): 2708-2717.

[66]杜坡， 崔福德， 李汉蕴， 景遐斌. 紫杉醇两亲性嵌段键合物胶束的研究[J].

沈阳药科大学学报. 2008, 25(1): 1-5.

[67]陈大为，鄢璐，乔明曦，胡海洋， 赵秀丽， 陈曦， 邓意辉. 多西他赛pH 敏感嵌段共聚物胶束的制备[J]. 药学学报. 2008, 43(10): 1066-1070.

[68] Aguiar J., Carpena P., Molina-Bolı́var J. A., Carnero Ruiz C. On the determination of the critical micelle concentration by the pyrene 1:3 ratio method[J]. Journal of Colloid and Interface Science. 2003, 258(1): 116-122.

[69]陆国庆， 郑江， 郑新川， 鲁永玲， 何凤慈. 芘荧光探针法结合曲线拟合研

究胆盐-磷脂混合纳米胶束的聚集行为[J]. 中国药业. 2011, 20(10)：21-23.

[70]王蓉娟. 基于β-环糊精的两亲聚合物胶束给药系统的研究[D]. 浙江：浙江大学, 2010。

[71]高青雨，张玉娟，俞贤达. 温度及pH敏感性N-乙烯基吡咯烷酮与丙烯酸β-羟基丙酯共聚物/聚（丙烯酸）互穿网络水凝胶的合成及其性能研究[J]. 高分子学报. 2001，(3)：329-332.

[72] Xu R. Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement[J]. Particuology. 2008, 6(2): 112-115.

[73] Senel S., Isik-Yuruksoy B., Cicek H., Tuncel A. Thermoresponsive isopropylacrylamide-vinylpyrrolidone copolymer by radiation polymerization[J]. Journal of Applied Polymer Science. 1997, 64(9): 1775-1784.

[74] Huh J., Kim K. H., Ahn C. H., Jo W. H. Micellization behavior of star-block copolymers in a selective solvent: A Brownian dynamics simulation

Approach[J]. J Chem Phys. 2004, 121(10): 4998-5004.

[75]黄微，王平，王蔚，张玥， 张闯年， 田秦， 王秀华， 刘媛， 袁直. 甘草次酸修饰PEG-PLGA纳米粒的制备及与肝癌细胞的亲和性[J]. 高等学校化学学报. 2011, 32(2)：416-420.

[76]易昌凤，沈艳华，邓字巍，徐祖顺, W. T. F. 含树枝状大分子PAMAM的苯乙烯乳液聚合[J]. 高分子学报. 2004, (6): 831-834.

[77]李小琴，陈沛智，秦昌华，廖寿贤. 磷钨酸在核壳型乳液TEM表征技术中的应用研究[J]. 高分子材料科学与工程. 1999, 15(1)：130-132.

[78]任现文，江明. 原位聚合法制备温敏性聚合物核壳胶束的响应温度调控及其负载行为[J]. 高等学校化学学报. 2006, 27(11)：2204-2208.

[79] Miskolczi P., Kozma K., Polgar M., Vereczkey L. Pharmacokinetics of vinpocetine and its main metabolite apovincaminic acid before and after the chronic oral administration of vinpocetine to humans[J]. Eur J Drug Metab Pharmacokinet. 1990, 15(1): 1-5.

[80] Polgar M., Vereczkey L., Nyary I. Pharmacokinetics of vinpocetine and its metabolite, apovincaminic acid, in plasma and cerebrospinal fluid after intravenous infusion[J]. J Pharm Biomed Anal. 1985, 3(2): 131-139.

[81] Thompson R. G. Colloid-Polymer Interactions[M]. American Chemical Society, 1993.

[82] Wang R. -M., Li G., Zhang H. -F., He Y. -F., He N. -P., Lei Z. Preparation of albumin—PAA nanocapsules and their controlled release behavior for drugs[J]. Polymers for Advanced Technologies. 2010, 21(10): 685-690.

[83] Gu J., Xia F., Wu Y., Qu X., Yang Z., Jiang L. Programmable delivery of hydrophilic drug using dually responsive hydrogel cages[J]. Journal of Controlled Release. 2007, 117(3): 396-402.

[84] Tsai H. -C., Chang W. -H., Lo C. -L., Tsai C. -H., Chang C. -H., Ou T. -W., Yen

T. -C., Hsiue G. -H. Graft and diblock copolymer multifunctional micelles for cancer chemotherapy and imaging[J]. Biomaterials. 2010, 31(8): 2293-2301.

[85] Wang K., Luo G. -F., Liu Y., Li C., Cheng S. -X., Zhuo R. -X., Zhang X. -Z. Redox-sensitive shell cross-linked PEG-polypeptide hybrid micelles for

Controlled drug release[J]. Polymer Chemistry. 2012, 3(4): 1084-1090.

[86] Chen W., Meng F., Cheng R., Zhong Z. pH-Sensitive degradable polymersomes for triggered release of anticancer drugs: A comparative study with micelles[J]. Journal of Controlled Release. 2010, 142(1): 40-46.

[87]梁润成，黄志军，李桃，杨帆. pH响应纳米递药系统在逆转肿瘤多药耐药

性方面的研究进展[J]. 中国药学杂志. 2012, 47(20): 1609-1613.

[88]崔福德. 药剂学（第7版）[M]. 北京：人民卫生出版社, 2011。

[89]尹昌浩，李思瓯，李同伟. 长春西汀治疗糖尿病周围神经病变疗效观察[J]. 中国现代医生. 2011, 49(33)：126-127.

[90]李章万，徐秀荣. 色谱分析中生物样品的前处理方法[J]. 药物分析杂志. 1996, 16(1)：55-59.

[91] 孔琦, 张振清. 药物代谢转化和样品前处理技术的研究进展[J]. 国际药学研究杂志. 2008, 35(2): 124-127.

[92]姚继红，苏成业，储晓岩. 长春西汀在大鼠体内的药代动力学及生理处置

[J]. 药学学报. 1994, 29(2): 81-85.

[93]霍美蓉，周建平，魏彦，吕霖. 紫杉醇壳聚糖聚合物胶束的制备及表面电荷对其在小鼠体内组织分布的影响[J]. 药学学报. 2006, 41(9)：867-872.

[94]王金丽. 荷载紫杉醇药物的普朗尼克（F127）/聚乙烯亚胺（PEI）多功能胶束的构建及其体内外评价[D]. ft东: ft东大学, 2011。

[95]徐丰. 阳离子白蛋白结合PLGA纳米粒介导c-Myc基因siRNA治疗C6脑胶质瘤的研究[D]. 上海： 复旦大学, 2009。

# 全文总结

本论文以β-CD为中心，设计合成了一系列含聚（丙烯酸－甲基丙烯酸甲酯）及聚乙烯基吡咯烷酮基团的两亲性β-CD 星型聚合 物

（β-CD~~[~~P(AA-co-MMA) -b-PVP] x），并对其结构特性、在水溶液中的胶束化行为、载药性能、载药胶束体外释放行为及大鼠体内组织分布进行了系统的研究。主要研究结果如下：

1. 以β-CD为中心，引入二硫代酯基团得多官能团的大分子链转移剂，通过“core-first”的RAFT聚合方法，聚合得到两亲性β-CD星型聚合物β-CD~~[~~P(AA-co-MMA) -b-PVP] x. RAFT试剂和聚合物的结构通过FT-IR进行了表征。

2. 通过芘荧光光谱法和TEM研究了聚合物在水溶液中的胶束化行为，其临界胶束浓度在0.98×10 -3~5.24×10 -2 g/L范围内。

3. 以长春西汀（VP）为模型药物制备载药胶束，溶剂挥发法得到的载药胶束载药量与包封率均高于薄膜分散法和透析法。通过单因素考察，选取了AM-PK111-4P1聚合物进行正交优化试验，得最佳载药胶束制备工艺。VP胶束的载药量和包封率分别达(21.44±0.14) %和(49.05±0.36) %。

4. 采用FT-IR确证了VP被包载于聚合物形成的胶束核内，DLS和TEM表明VP胶束呈较良好的球形，平均粒径在65 nm左右，粒径分布较窄。

5. 通过体外释放研究表明，VP胶束具有一定的缓释能力和pH敏感特性，在较低pH条件下（如pH4.5）释放速率较快。

6. 大鼠体内药动学与组织分布研究表明，与市售VP注射液相比，VP胶束具有较明显的肺靶向性，且其它组织内的药物浓度与注射液组在同一水平。

# 攻读硕士学位期间发表的论文

1. 梁润成，黄志军，李桃，杨帆. pH响应纳米递药系统在逆转肿瘤多药耐药性方面的研究进展[J]. 中国药学杂志. 2012, 47(20)：1609-1613.

致谢

本论文是在导师杨帆教授的悉心指导下完成的。杨老师的治学态度、渊博的知识、广阔的视野使我受益匪浅，您正直的人格永远值得我学习。三年研究生活中，杨老师在学习、生活、课题研究等各方面均给予了极大的帮助，尤其在实验遇到困难时，杨老师都给予了无私的支持与鼓励，尽力帮助自己解决，才使实验顺利进行。值此论文完成之际，谨向导师表示衷心的感谢和崇高的敬意。

在本课题的聚合物合成实验中，得到了刘意老师的悉心指导及其实验的全力支持，在此十分感谢刘老师在合成过程中给我的无私关怀和帮助。同时也非常感谢魏木培、陈超声等师弟师妹在合成实验中对我的帮助。

另外，药科学院的卢琦雯老师、洪慧老师及严春艳老师等在仪器使用中鼎立相助，在此表示衷心的感谢！感谢何增兴、余彩苹、黄淑玲等众多师弟师妹的帮助与支持，还有我的同学黎小莉、温定文、王李平、杨本坤等在实验与生活中的关心，你们的友谊是我一生的财富。

感谢我的家人，正是你们对我的支持与关爱，才使我能够安心的完成学业。

梁润成

2013年5月于广药湖畔