

温敏性吲哚美辛/ β 环糊精包合物的制备及体外评价

夏 芸, 邱利焱*, 金 一

(浙江大学 药学院, 浙江 杭州 310031)

摘要: 目的 合成兼具温敏性及药物包合能力的新型药物载体聚(*N*-异丙基丙烯酰胺)- β 环糊精(PNIPA- β -CD),以吲哚美辛为模型药物,考察该载体的释药行为。方法 末端带羧基的 PNIPA与改性后的环糊精衍生物在 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基-碳二亚胺(EDC)的作用下缩合,得到 PNIPA- β -CD,采用冻干法制备吲哚美辛/PNIPA- β -CD包合物。红外、 ^1H NMR和 DSC表征载体的结构及包合物的形成;用分光光度法测定载体材料的 LCST,并进行包合物体外释药研究。结果 PNIPA- β -CD在 35 $^{\circ}\text{C}$ 发生相转变,吲哚美辛/PNIPA- β -CD包合物的载药量为 5.8%,药物与载体摩尔比为 0.97:1。体外释放研究表明吲哚美辛/PNIPA- β -CD包合物在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的释药比其在 25 $^{\circ}\text{C}$ 的释放要慢,在 LCST以上具有一定的缓释作用。结论 该载体既具有温敏性,又具有药物包合作用,并且在体温条件下具有缓释作用,是一种新型的温敏性药物载体。

关键词: *N*-异丙基丙烯酰胺; 吲哚美辛; β 环糊精; 温敏性

中图分类号: R943.4 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2005)02-0187-06

Preparation and characterization of indomethacin/poly(*N*-isopropylacrylamide)- β -cyclodextrin complex with temperature-sensitivity

XIA Yun, QIU Li-yan*, JIN Yi

(College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China)

Abstract: **Aim** To synthesize poly(*N*-isopropylacrylamide)/cyclodextrin conjugate (PNIPA- β -CD) as the mosensitive drug carrier, incorporate indomethacin into the conjugate and evaluate the drug release from the carrier *in vitro*. **Methods** PNIPA- β -CD was synthesized by introducing carboxyl terminated PNIPA into the primary hydroxy group of β -CD. The obtained conjugate was characterized by FTIR, ^1H NMR and DSC. The indomethacin/PNIPA- β -CD complex was prepared by lyophilization. *In vitro* drug release from the complex was carried out at 25 $^{\circ}\text{C}$ and 37 $^{\circ}\text{C}$ respectively. **Results** The mosensitive PNIPA- β -CD was synthesized successfully. The LCST is 35 $^{\circ}\text{C}$, as measured by turbidity method. The drug release from indomethacin/PNIPA- β -CD complex was slower at 37 $^{\circ}\text{C}$ than that at 25 $^{\circ}\text{C}$. **Conclusion** The mosensitive PNIPA- β -CD with molecular inclusion capacity is a potential carrier for drug sustained release.

Key words: *N*-isopropylacrylamide; indomethacin; β -cyclodextrin; the mosensitive

近年来,温敏性药物载体越来越引起人们的兴趣。一些高分子在水溶液中具有低临界溶液温度(LCST),当环境温度低于 LCST时,高分子溶于水形成均匀的溶液,当环境温度高于 LCST时,溶液

则发生相分离,产生沉淀。在众多的温敏性高分子材料中,聚 *N*-异丙基丙烯酰胺(PNIPA)是研究较多的一种温敏性材料。PNIPA是由 NIPA(*N*-isopropylacrylamide)通过自由基聚合而成的高分子聚合物,其大分子链上具有亲水性的酰胺基和疏水性的异丙基,酰胺键与水可形成较强的氢键,使链在水中伸展;当温度升高时,水分子与酰胺基团之间的氢键作用削弱,PNIPA与水的相容性减弱,链从伸展

收稿日期: 2004-06-05.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(50203012).

* 通讯作者 Tel / Fax: 86-571-87217244,

E-mail: xgaozu@mail.hz.zj.cn

状态变为卷曲收缩状态,从而产生相分离^[1]。PNIPA的LCST(33℃)介于常温(25℃)与体温(37℃)之间,因此PNIPA在药理学与生命科学领域有较多的应用。

已有报道PNIPA修饰的温敏性脂质体^[2]、胶束^[3]、纳米粒^[4],尚未有线性PNIPA连接 β -CD作为药物载体的报道。本研究的目的在于通过化学方法合成既具有包合药物的能力,又具有温度敏感性的新型药物载体聚(*N*-异丙基丙烯酰胺)- β -环糊精(PNIPA- β -CD),以吲哚美辛(indomethacin, IDM)作为模型药物制备包合物,并考察温敏性吲哚美辛/PNIPA- β -CD包合物的体外释药行为。

材料与方 法

试剂与材料 *N*-异丙基丙烯酰胺(Acros公司,美国),正己烷重结晶;巯基乙酸(Acros公司,美国);1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(Acros公司,美国);偶氮二异丁腈(上海试四赫维化工有限公司),甲醇重结晶纯化; β -环糊精(上海伯奥生物科技有限公司),使用前110℃干燥12h;CaH₂回流3d,使用前蒸出;对甲苯磺酰氯(中国医药集团上海化学试剂公司);吲哚美辛(宁波制药厂);其余试剂均为分析纯。透析袋(*M_w* 3 500,华美生物工程公司上海分公司)。

仪器 红外光谱仪(Vector 22, Bruker公司);核磁共振仪(Avance DMX500, Bruker公司);差动热分析仪(Pyris 1, PerkinElmer公司);电子显微镜(JEM-1230, JEOL公司);紫外分光光度计(Cary 100 Bio, VARIAN公司);元素分析仪(Flash EA112, ThermoFinnigan公司);自动电位滴定仪(ToledoDL50,梅特勒托利多公司);高效液相色谱仪(LC10AT VP,日本岛津公司);高效液相紫外检测器(SPD-10A VP,日本岛津公司)。

PNIPA- β -CD的合成

合成 PNIPA-COOH^[5] 取单体 *N*-异丙基丙烯酰胺(NIPA) 5 g及链转移剂巯基乙酸(MPA) 23.4 mg,置100 mL烧瓶中,用甲醇60 mL溶解,通氮气20 min后,加入引发剂偶氮二异丁腈(AIBN) 50.7 mg,在氮气保护下60℃恒温搅拌24 h。反应结束后,减压抽去大部分甲醇,在丙酮/正己烷体系中纯化两次,减压真空干燥,得到白色粉末PNIPA-COOH,产率86.4%。用0.01 mol·L⁻¹ NaOH溶液进行电位滴定,测定聚合物末端羧基^[6],得PNIPA-COOH平均分子量5 000,聚合度 $n = 44$ 。

单(6-氨基乙基-氨基-6-去氧)- β -环糊精(EDA- β -CD)的合成 500 mL圆底烧瓶中加入 β -CD 10 g,无水吡啶100 mL,搅拌使其全部溶解,加入含对甲苯磺酰氯1.3 g的吡啶溶液100 mL,冰浴下搅拌24 h,于40℃减压蒸馏,得到褐色粘稠物,加入丙酮200 mL浸泡,得到白色沉淀,真空干燥,用水重结晶3次后,于50℃减压干燥12 h,得到白色粉末[mono(6-*O*-tosyl)- β -CD],产率30.1%^[7]。

取mono(6-*O*-tosyl)- β -CD 2 g,加入无水二乙胺20 mL,于40℃反应48 h,45℃减压蒸出未反应的乙二胺,得到黄色油状物,加入丙酮30 mL,析出沉淀,过滤,沉淀溶解于甲醇-水溶液(3:1) 20 mL,加入丙酮200 mL,得到白色沉淀,过滤后减压干燥,得到白色粉末,即6位氨基取代的环糊精衍生物(EDA- β -CD)^[8],产率25%。元素分析:C 43.98, H 9.80, N 1.90,推测分子式为C₄₄H₈₆O₃₄N₂,平均分子量为1 186。

PNIPA- β -CD^[9]的合成 PNIPA-COOH 2 g溶于蒸馏水20 mL,加入1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC)调节pH到5.5,加入EDA- β -CD 150 mg,该溶液室温下搅拌24 h,反应液装入透析袋(*M_w* 3 500),用水透析,除去未反应的 β -CD与小分子物质,透析24 h后,溶液冻干,得到淡黄色粉末,产率36%。元素分析:C 61.88, H 10.10, N 10.64,推测分子式为PNIPA-(β -CD)_{0.9},平均分子量为6 024。

制备吲哚美辛/PNIPA- β -CD包合物 采用冻干法制备吲哚美辛/PNIPA- β -CD包合物,吲哚美辛100 mg溶于无水乙醇5 mL,滴入含有PNIPA- β -CD 700 mg的水溶液50 mL中,得到白色混悬液,于30℃搅拌2 d,过滤后得到淡黄色滤液,滤液冻干,得到淡黄色粉末,产率71.4%。

制备吲哚美辛/ β -CD包合物 采用冻干法制备吲哚美辛/ β -CD包合物,取环糊精3.2 g,溶于水100 mL中,吲哚美辛1.2 g溶于乙醇10 mL,滴入环糊精溶液,于30℃搅拌2 d,放冷后过滤,滤液冻干,得到白色粉末,产率68%。

PNIPA- β -CD的表征及其包合物的鉴定 红外光谱由红外光谱仪通过KBr压片法测定。¹H NMR由核磁共振仪测定,四甲基硅烷(TMS)作内标,氘代水(D₂O)作溶剂。DSC由差动热分析仪分析,升温速率10℃·min⁻¹,温度扫描范围50-200℃。采用透射电子显微镜观察PNIPA- β -CD在LCST以下与LCST以上的微观形态,PNIPA- β -CD配成0.5%水溶液,以常温(25℃)与加热(50℃)两种方式在

铜网上制备样品,透射电子显微镜下观察。样品的 LCST由分光光度法测定^[10],PNIPA与 PNIPA- β -CD 分别配成 0.2%水溶液,用配有恒温水循环的紫外分光光度仪测量样品在 500 nm 处的透过率 ($T\%$), 25 $^{\circ}\text{C}$ 开始,升温速率 0.01 $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$,记录每个温度测得的透过率,50%透过率所对应的温度为相转变温度 LCST。元素分析仪分析 C, H, N 元素。

载药量与体外释药实验 取吡啶美辛/PNIPA- β -CD 包合物与吡啶美辛/ β -CD 包合物各 20 mg,溶于 80%甲醇-水溶液 25 mL,用 HPLC 测量吡啶美辛含量。检测条件^[11]为高效液相柱: Diamonsil C_{18} (Dikam 公司, 250 mm \times 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水 (50 mmol \cdot L⁻¹ 三乙胺,磷酸调节至 pH 3) 70:30;检测波长:240 nm;进样量:2 μL ;标准曲线浓度范围 6.06 - 606 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,吡啶美辛标准品用 80%甲醇-水溶液配制。取吡啶美辛/PNIPA- β -CD 包合物 40 mg,用 PBS (pH 7.4, 0.1 mol \cdot L⁻¹) 3 mL 溶解后,装入透析袋,外液加 PBS 10 mL,置恒温振荡器中,分别在 25 $^{\circ}\text{C}$ 与 37 $^{\circ}\text{C}$ 两个温度下振荡,定时取样 10 mL,补 PBS 溶液 10 mL。样品用 HPLC 测定吡啶美辛含量,条件同上。

结果与讨论

1 PNIPA- β -CD 表征

图 1 为 PNIPA-COOH (A), PNIPA- β -CD (B) 和 β -环糊精 (C) 的红外光谱图。A 谱图中 1 709 cm^{-1} 处的小峰为 PNIPA-COOH 末端羧基峰,1 648 cm^{-1} 和 1 543 cm^{-1} 处的两个强峰为 PNIPA-COOH 主链上酰胺键的两个特征峰; C 谱图中环糊精在 1 030 cm^{-1} 处有很强的吸收峰。将 A, B 和 C 三图比较可以看出, PNIPA- β -CD 既具有 PNIPA-COOH 的吸收特征峰 (1 648 cm^{-1} 和 1 543 cm^{-1}), 又具有 β -CD 的吸收特征峰 (1 030 cm^{-1} , 而 β -CD 的其他特征峰被 PNIPA 的峰所覆盖), 且 B 图中 1 709 cm^{-1} 处羧基峰消失, 说明 PNIPA-COOH 上的羧基与环糊精衍生物上的氨基已形成酰胺键, 得到了新的化合物 PNIPA- β -CD。

图 2 为 PNIPA-COOH (A) 与 PNIPA- β -CD (B) 的 ¹H NMR 图谱, PNIPA-COOH 4 种氢的化学位移均在 A 图中标出, B 图中既有 PNIPA-COOH 特征峰, 也有 β -CD 的特征峰。由于 PNIPA- β -CD 中 β -CD 的比例相对较小, 环糊精 6 个氢的化学位移在 B 图的部分放大图中仍可清楚看出。

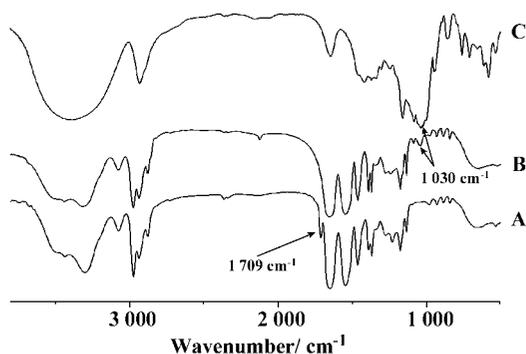


Figure 1 FTIR spectra of PNIPA-COOH (A), PNIPA- β -CD (B) and β -CD (C)

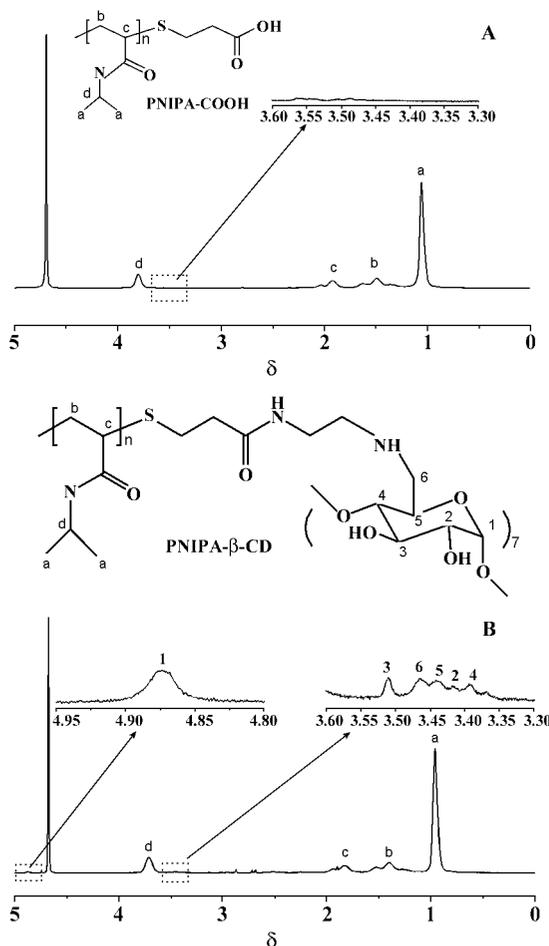


Figure 2 ¹H NMR spectra of PNIPA-COOH (A) and PNIPA- β -CD (B)

2 PNIPA- β -CD 温敏性考察

PNIPA-COOH 与 PNIPA- β -CD 水溶液在温度升高时均会出现相分离现象, 即溶液从澄清变为混浊。图 3 为 PNIPA- β -CD 在常温 (A, 25 $^{\circ}\text{C}$) 与加热 (B, 50 $^{\circ}\text{C}$) 两种状态下的透射电子显微镜照片。常温下, PNIPA- β -CD 为均匀溶液, 透射电镜下无颗粒存

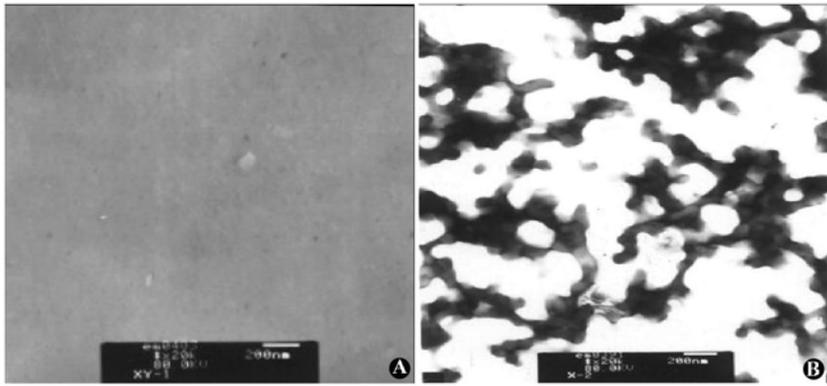


Figure 3 Transmission electron microscope of PNIPA-β-CD solution at 25 °C (A) and 50 °C (B)

在。在加热状态下,由于 PNIPA 链收缩,溶液产生相分离,透射电镜下可以观察到有许多颗粒聚集,说明 PNIPA-β-CD 在低于 LCST 时能溶于水形成均匀的溶液,在高于 LCST 时则产生相变,高分子链收缩形成纳米级的微粒,并相互聚集。图 4 为 PNIPA-COOH (A) 与 PNIPA-β-CD (B) 在不同温度下 500 nm 处的透光率。从图中可以看出 PNIPA-COOH 和 PNIPA-β-CD 的 LCST 分别在 33.7 °C 和 35 °C, PNIPA 与 β-CD 连接后, LCST 有所提高,这是由于 β-CD 的羟基较多,提高了聚合物的亲水性,使聚合物与水的氢键作用增强,提高了聚合物的 LCST。这种现象也被文献^[12]所证实。

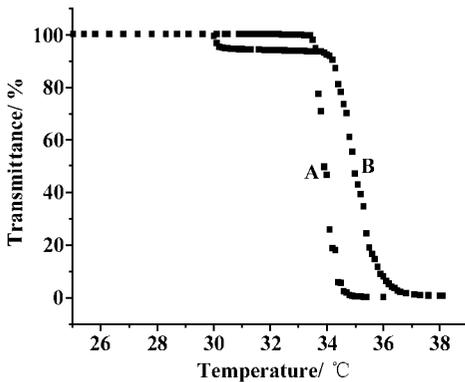


Figure 4 Temperature effect on the light transmittance of the solution of PNIPA-COOH (A) and PNIPA-β-CD (B). Wavelength 500 nm

3 吲哚美辛 /PNIPA-β-CD 包合物的鉴定

吲哚美辛 (A), 吲哚美辛 /PNIPA-β-CD 混合物 (B), PNIPA-β-CD (C) 和吲哚美辛 /PNIPA-β-CD 包合物 (D) 的 DSC 图谱如图 5 所示。PNIPA-β-CD 在扫描温度范围内没有明显的吸热峰, 吲哚美辛和吲哚美辛 /PNIPA-β-CD 混合物在 158 °C 均有吲哚美辛吸热峰, 而吲哚美辛 /PNIPA-β-CD 包合物在 158 °C

处吲哚美辛的吸热峰消失, 在 134 °C 出现了包合物的吸热峰, 说明用冻干法制得的是吲哚美辛与 PNIPA-β-CD 包合物, 而非物理混合物。

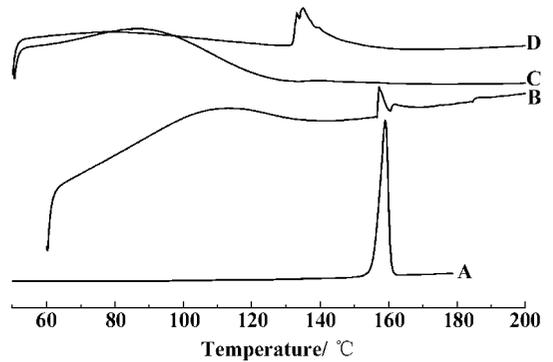


Figure 5 DSC thermogram of indomethacin (A), IDM/PNIPA-β-CD physical mixture (B), PNIPA-β-CD (C) and IDM/PNIPA-β-CD complex (D)

4 吲哚美辛 /PNIPA-β-CD 包合物与吲哚美辛 /β-CD 的载药量

$$\text{载药量} = (W_1 / W_2) \times 100\%$$

$$\text{药载分子摩尔比} = \frac{W_1 / M_1}{(W_2 - W_1) / M_{\text{PNIPA-}\beta\text{-CD}}}$$

W_1 为包合物中吲哚美辛量 (mg), W_2 为包合物总重量 (mg)。 M_1 为吲哚美辛分子质量, $M_{\text{PNIPA-}\beta\text{-CD}}$ 为 PNIPA-β-CD 分子质量。吲哚美辛 /PNIPA-β-CD 包合物与吲哚美辛 /β-CD 包合物的载药量以及药载分子摩尔比见表 1。

Table 1 Drug-load efficiency of indomethacin (IDM) /PNIPA-β-CD and IDM /β-CD complex

Complex	(IDM / complex) / mg • 100 mg ⁻¹	(IDM / complex) / mol • mol ⁻¹
IDM /PNIPA-β-CD	5.8	0.97
IDM /β-CD	15.6	0.58

结果表明, PNIPA- β -CD的载药量为 5.8%, β -CD的载药量为 15.6%。吲哚美辛与 PNIPA- β -CD的摩尔比接近 1:1, 而吲哚美辛与环糊精摩尔比为 0.58, 因此, 用冻干法制备包合物时, PNIPA- β -CD对吲哚美辛的包合效率要比 β -CD的包合效率高, 推测这是由于 PNIPA有一疏水基团与亲水基团, 具有一定表面活性剂的作用, 降低了吲哚美辛与水之间的表面张力, 使吲哚美辛与 PNIPA- β -CD的接触机会增加, 从而提高了 PNIPA- β -CD的包合效率。

5 吲哚美辛/PNIPA- β -CD包合物的体外释放

吲哚美辛/PNIPA- β -CD包合物在 25 °C 与 37 °C 的药物释放曲线如图 6 所示, 25 °C 条件下, 药物累积释放量在 6 h 达到了 85%, 而 37 °C 下 6 h 的药物累积释放量为 75% 左右, 37 °C 的药物释放比 25 °C 的慢。实验测得吲哚美辛在 PBS (pH 7.4, 0.1 mol·L⁻¹) 中的溶解度随着温度升高而升高, 37 °C 时溶解度为 2.751 mg·mL⁻¹, 25 °C 时溶解度为 0.356 mg·mL⁻¹。虽然吲哚美辛在 37 °C 时的溶解度较 25 °C 时高但药物释放却慢, 这主要是因为 37 °C 高于 PNIPA- β -CD 的 LCST (35 °C), PNIPA 链收缩形成颗粒, 蜷缩在环糊精空洞的外部, 阻碍了药物从环糊精空洞中释放出来; 当环境温度 (25 °C) 低于 LCST 时, 包合物溶解于 PBS 形成澄清的均相溶液, PNIPA 链处于伸展状态, 对药物从环糊精空洞中释放出来的阻力较小, 因此 37 °C 条件下药物释放比 25 °C 下要慢, 当环境温度高于 LCST 时, 该载体具有一定的缓释作用, 但是从图中可以看出, 该包合物维持药物释放的时间较短。由于吲哚美辛的分子结构比较大, 只有部分可以进入 PNIPA- β -CD 的空洞, 还有部分仍暴露在空洞的外部^[13], PNIPA 收缩后对吲哚美辛从空洞中释放出来的阻碍作用相对较小,

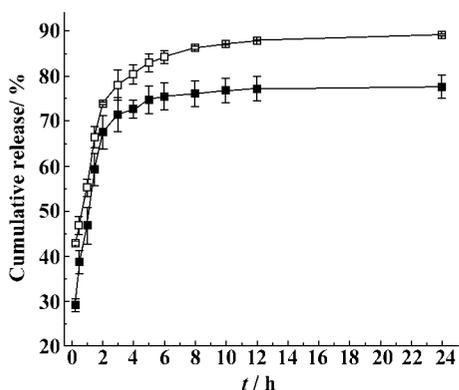


Figure 6 Indomethacin release from indomethacin/PNIPA- β -CD complex at 37 °C (■-■) and 25 °C (□-□) (n=3)

吲哚美辛仍可较容易地从环糊精空洞中解离释放出来, 导致释药持续时间较短。

结论

本研究合成了既具有温敏性又具有药物包合能力的 PNIPA- β -CD, 采用冻干法制备了吲哚美辛/PNIPA- β -CD包合物, 并用红外、¹H NMR和 DSC等方法证实了 PNIPA- β -CD与吲哚美辛/PNIPA- β -CD包合物的形成。从载药量与药物释放曲线可以看出, 该药物载体可以提高吲哚美辛的溶解度, 吲哚美辛/PNIPA- β -CD包合物水溶液在体温 (37 °C) 条件下形成沉淀, 其药物释放比在常温下药物释放慢, 因此该载体在体温条件下具有一定的缓释作用, 但是由于吲哚美辛分子只有部分进入环糊精空洞, 导致该载体对吲哚美辛的缓释作用时间较短。以后的研究将继续寻找更加适合该载体的药物, 提高 PNIPA 收缩后对药物从环糊精空洞中释放的阻滞作用, 从而延长药物的缓释时间。该 PNIPA- β -CD 药物包合物可配制成水溶液, 通过皮下注射给药, 在体温条件下, PNIPA 链收缩产生沉淀, 停留在局部, 并缓慢释放药物, 有关体内作用方面正在进一步研究中。

References:

- [1] Winnik FM, Ottaviani MF, Bossman SH, *et al.* Phase separation of poly(*N*-isopropylacrylamide) in water: a spectroscopic study of apolymer tagged with a fluorescent dye and a spin label [J]. *J Phys Chem*, 1993, **97**: 12998 - 13005.
- [2] Kono K, Henmi A, Yamashita H, *et al.* Improvement of temperature-sensitivity of poly(*N*-isopropylacrylamide)-modified liposomes [J]. *J Control Release*, 1999, **59** (1): 63 - 75.
- [3] Kim IS, Jeong YH, Cho CS, *et al.* The m α -responsive self-assembled polymeric micelles for drug delivery *in vitro* [J]. *Int J Pharm*, 2000, **205**(1 - 2): 165 - 172.
- [4] William L, Hideki I, Yoshinobu F, *et al.* Preparation of stable insulin-loaded nanospheres of poly(ethylene glycol) macromers and *N*-isopropyl acrylamide [J]. *J Control Release*, 2002, **80**(1 - 3): 357 - 363.
- [5] Takei YG, Matsukata M, Aoki T, *et al.* Temperature-responsive bioconjugates. 3. Antibody-poly(*N*-isopropylacrylamide) conjugates for temperature-modulated precipitations and affinity bioseparations [J]. *Bioconjug Chem*, 1994, **5**(6): 577 - 582.
- [6] Li XW, Yan CH, Liao Q. Preparation and releasing behaviour of temperature responsiveness of graft copolymer PAA-PIPA microspheres [J]. *Acta Polym Sin* (高分子学报), 1994, **2**: 156 - 161
- [7] Ruebner A, Statton GL, James MR. Synthesis of a linear

- polymer with pendent γ -cyclodextrins [J]. *Macromol Chem Phys*, 2000, **201**(11):1185 - 1188.
- [8] Nozaki T, Maeda Y, Kitano H, *et al.* Cyclodextrin gels which have a temperature responsiveness [J]. *J Poly Sci Part A: Poly Chem*, 1997, **35**(8):1535 - 1541.
- [9] Hirasawa T, Maeda Y, Kitano H, *et al.* Inclusional complexation by cyclodextrin-polymer conjugate in organic solvents [J]. *Macromolecules*, 1998, **31**(14): 4480 - 4485.
- [10] Yuk SH, Cho SH, Lee HB. Temperature-sensitive drug delivery system composed of poly (*N*, *N*-dimethylaminoethylmethacrylate-co-acrylamide) [J]. *Polym Mater Sci Eng*, 1997, **76**: 230 - 231.
- [11] Casella R, Williams DA, Jambhekar SS. Solid-state β -cyclodextrin complexes containing indomethacin ammonia and water. I. Formation studies [J]. *Int J Pharm*, 1998, **165**(1):1 - 14.
- [12] Yoo MK, Sung YK, Lee YM, *et al.* Effect of polymer complex formation on the cloud-point of poly (*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) in the poly(NIPAAm-co-acrylic acid): polyelectrolyte complex between poly (acrylic acid) and poly (*L*-lysine) [J]. *Polymer*, 1998, **39**(16): 3703 - 3708.
- [13] Wang WX, Shi TS, Mian ZC, *et al.* Complex of indomethacin- β -CD preparation, identification and solubility determination [J]. *Chin Pharm J (中国药学杂志)*, 1994, **29**(5): 279 - 281.