

ZHONGGUO YIYAO GONGYE ZAZHI

ISSN 1001-8255

CN 31-1243/R

ZYGZEA

中国医药工业杂志



2018-11
第49卷·第11期

- 全国中文核心期刊
- 中国生物医学核心期刊
- 中国期刊方阵入选期刊
- 中国科技核心期刊
- 中国科学引文数据库来源期刊
- 华东地区优秀期刊



关注患者的顺应性

使用卡乐康包衣的片剂才是完美的

聪明的企业正通过口服固体制剂的外观设计来减少用药差错，并提高患者服药的顺应性。他们相信——片剂产品的外观会影响患者对药物的辨识和感受。监管部门同样深知这一点。

利用卡乐康薄膜包衣技术开发易于吞服的、独特的、品牌化的片剂可以为产品带来额外的价值。卡乐康为您打开了片剂设计的窗口，通过不同颜色、形状和薄膜包衣的组合，打造与众不同的片剂外观。联系我们，使您的片剂更完美。

从片芯到包衣
您可信赖的供应商

www.colorcon.com.cn

Colorcon®



主 办

上海医药工业研究院

中国药学会

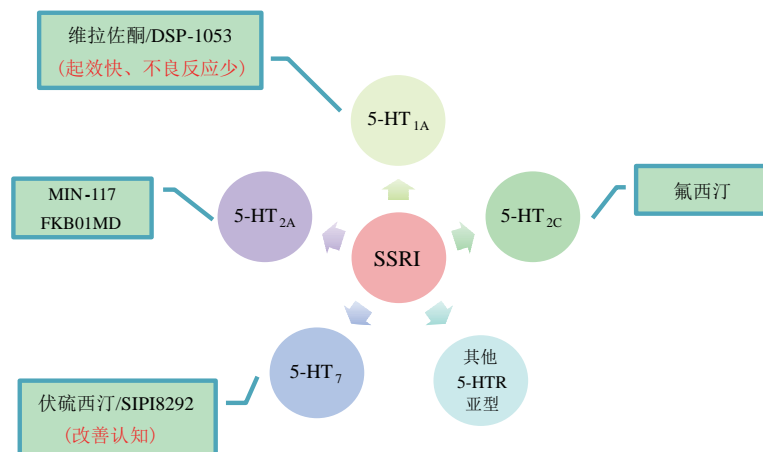
中国化学制药工业协会



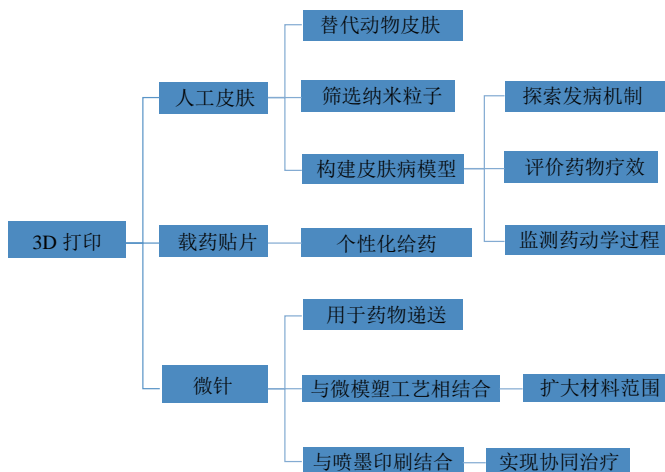
微信号: cjph-cjph

· 专论与综述 ·

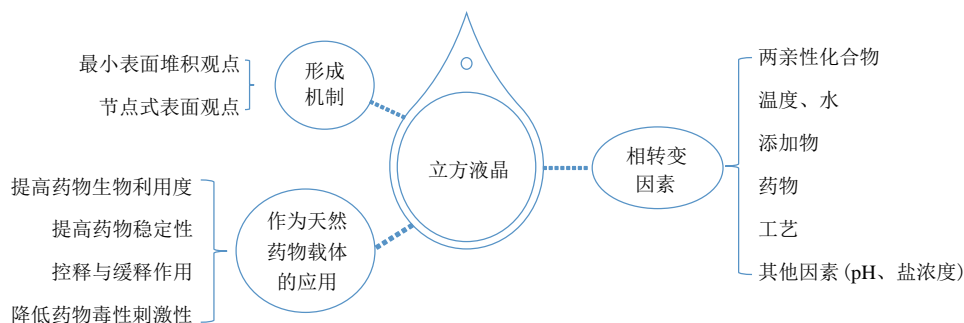
- 1481** 5-HT 再摄取抑制/5-HT 受体亚型多重作用抗抑郁药物研究进展……………谷正松, 李建其*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.001



- 1492** 3D 打印技术在透皮领域的研究进展……………杨雅丽, 童想柳, 边 琼, 罗华菲*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.002

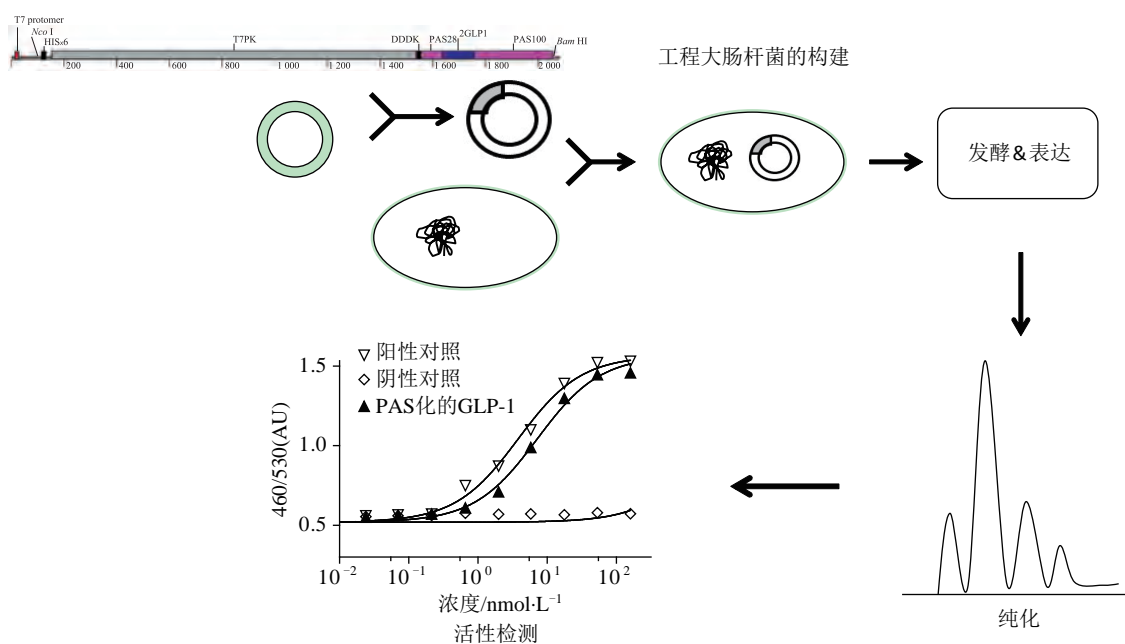


- 1500** 立方液晶作为天然药物载体的研究进展……………徐玲霞, 申宝德, 金 晨, 朱卫丰*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.003



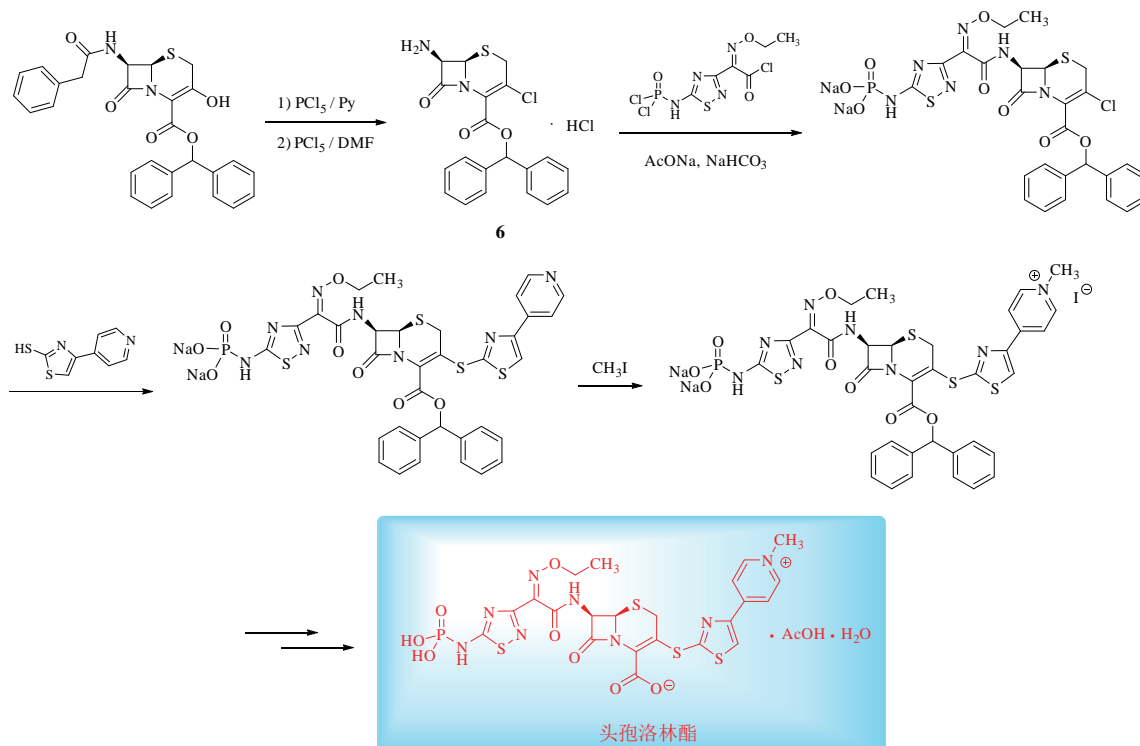
1508 GLP-1 融合蛋白的表达、纯化及其初步活性分析.....姜旻旻, 黄宗庆, 马 洁, 冯 军*

DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.004



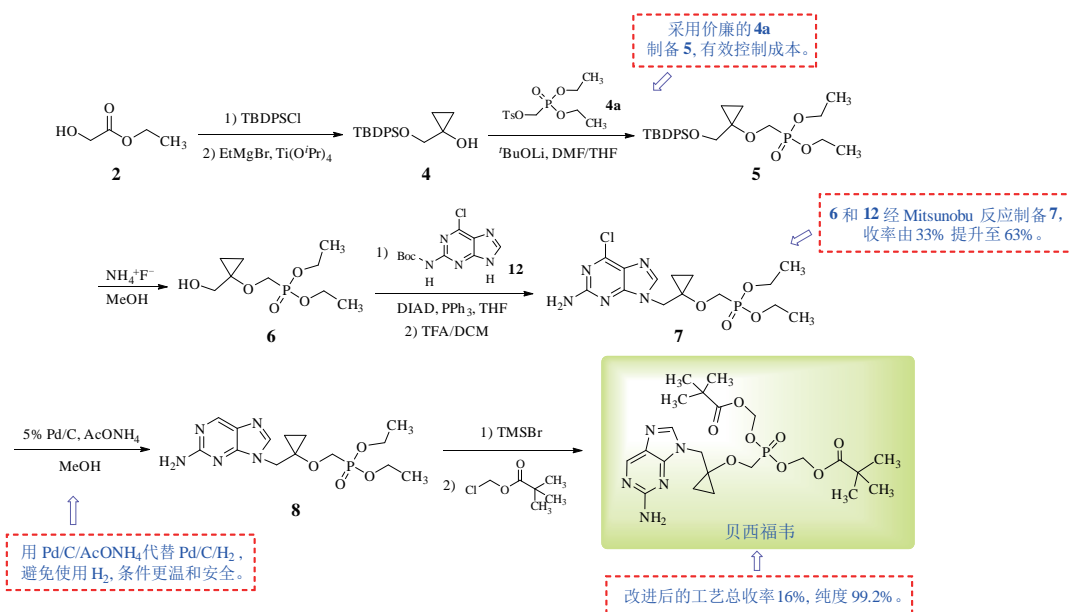
1518 头孢洛林酯的合成新工艺.....郭新亮, 张乃华, 鲍广龙, 张仲奎, 张贵民*

DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.005

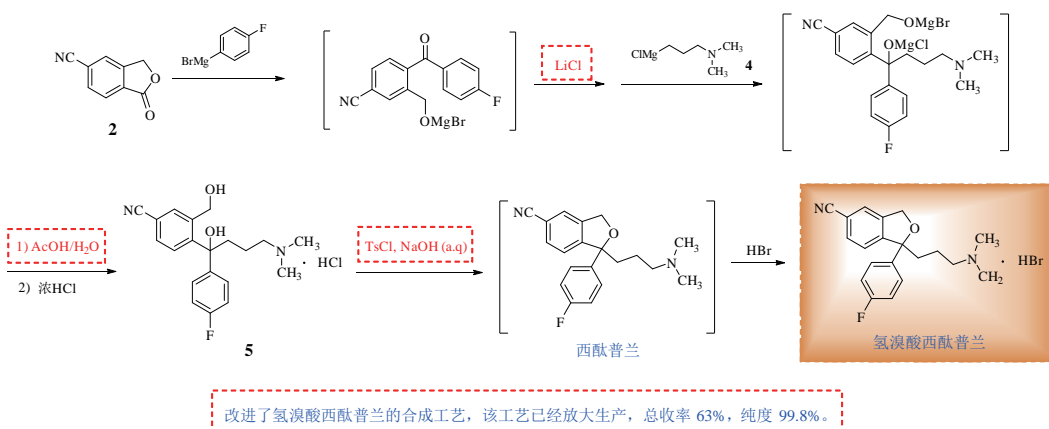


采用新工艺合成了头孢洛林酯，纯度99.56%，总收率34.8%，本工艺已经过中试验证。

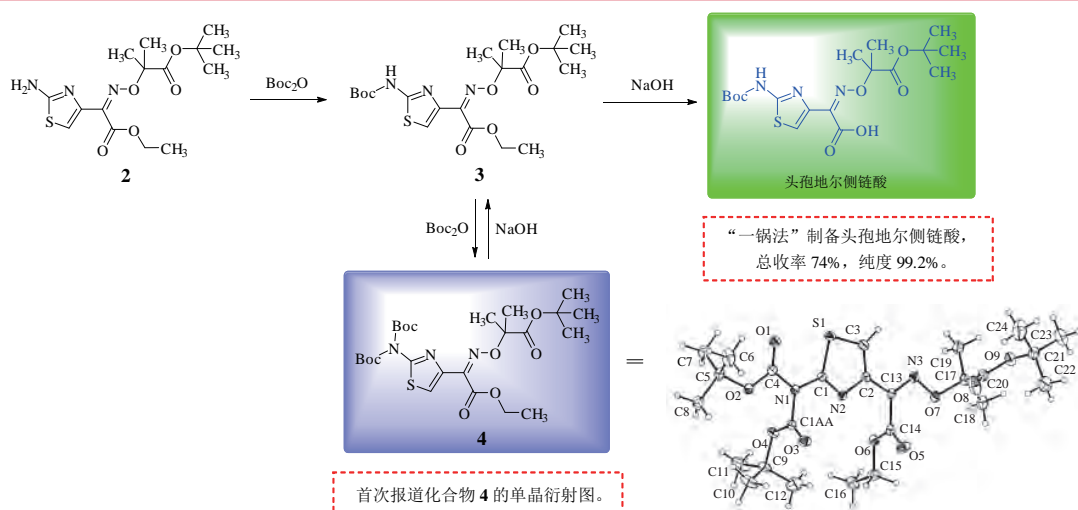
1524 贝西福韦合成工艺改进.....吴 阳, 廖国超, 郝玲花, 王鹏程, 孙平华*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.006



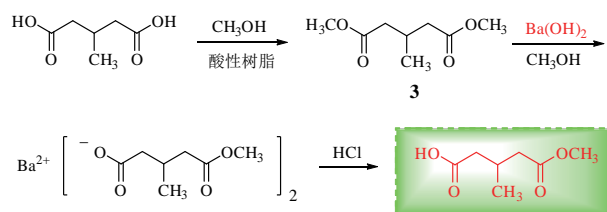
1530 西酞普兰氢溴酸盐的工艺改进.....黄文锋, 余文龙, 胡佳兴, 张 剑*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.007



1534 头孢地尔侧链酸的合成.....唐志勇, 阳学文, 卢凯恺, 毛侦军
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.008

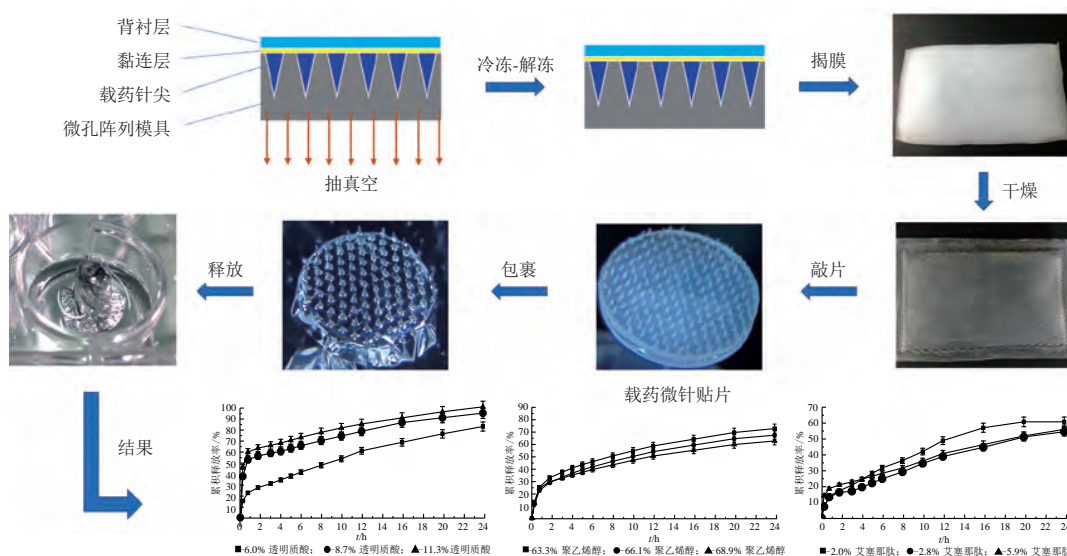


1538 β -甲基戊二酸单甲酯的合成.....赵丽华
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.009

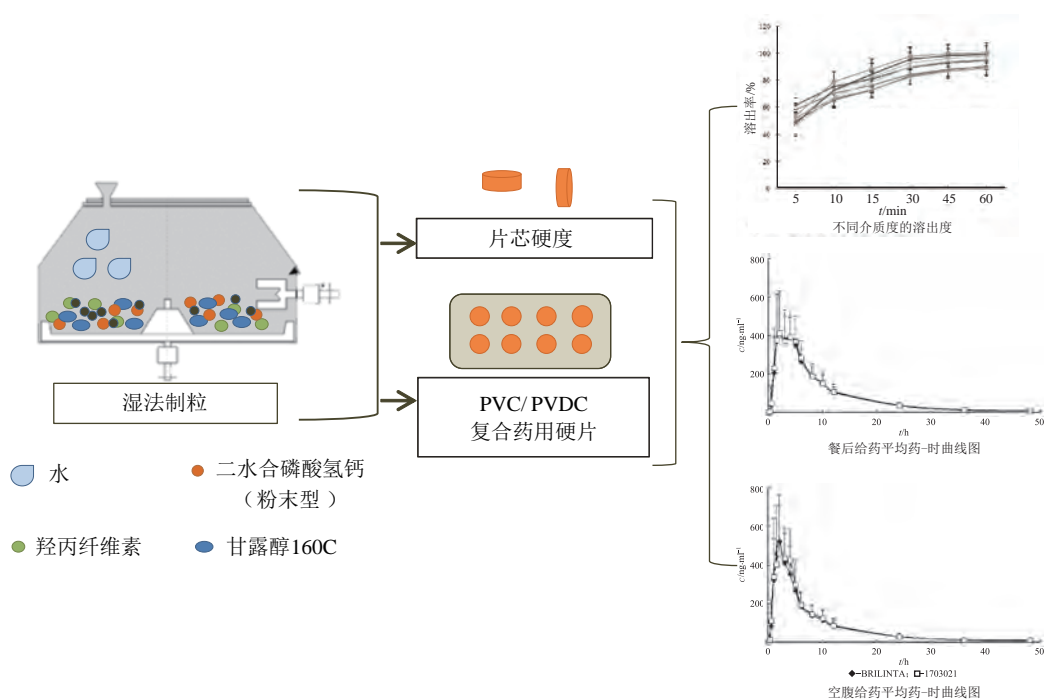


利用氢氧化钡对酯的温和碱解反应，开发了一条合成 β -甲基戊二酸单甲酯的新路线，总收率 90.3%。此工艺已经过中试验证。

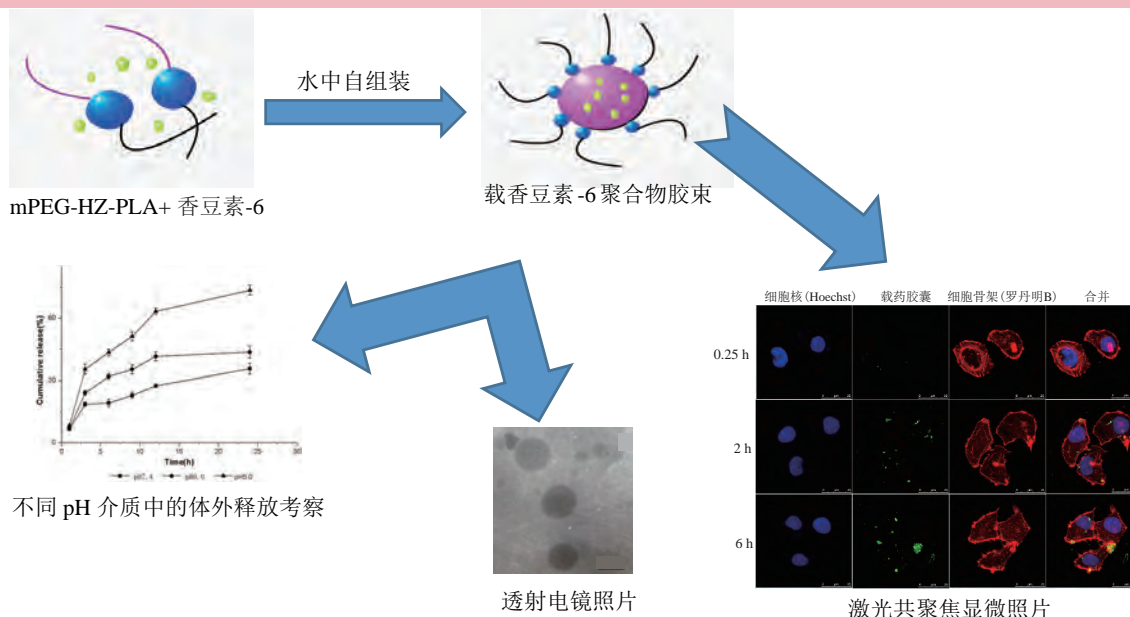
1541 艾塞那肽相转化微针的制备及处方优化.....朱嗣文, 刘 锋, 吴 飞, 金 拓*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.010



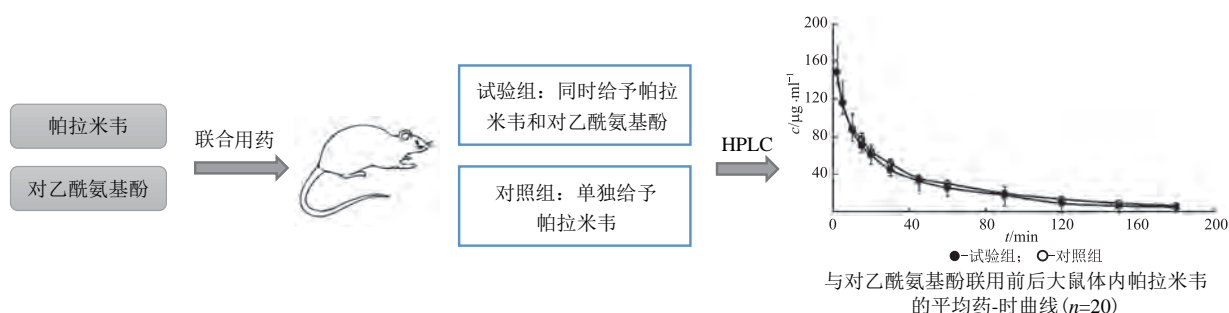
1548 替格瑞洛片处方工艺考察及其人体生物等效性.....刘 双, 屈 芮, 唐 云, 朱永强*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.011



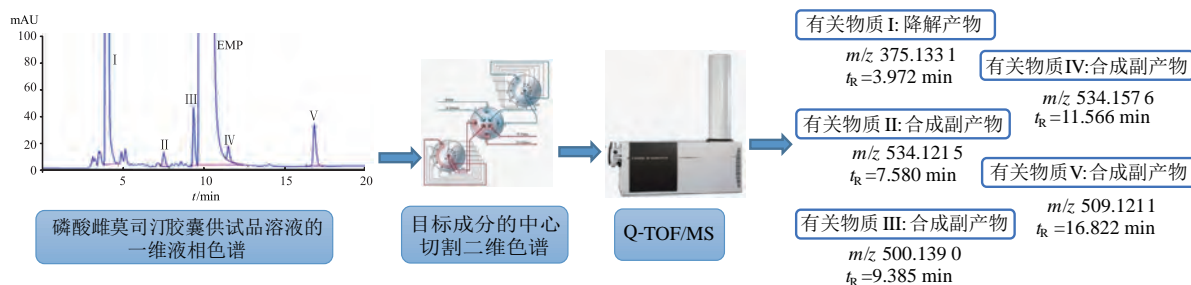
1559 包载荧光探针香豆素-6的pH敏感型聚合物胶束的制备与评价.....赵善科, 尹美林, 郑岩, 史淑丹, 孙玉琦*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.012



1567 对乙酰氨基酚对帕拉米韦在大鼠体内药动学的影响.....赵晓娟, 黄博雅, 刘秀菊, 赵永红, 张志清*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.013



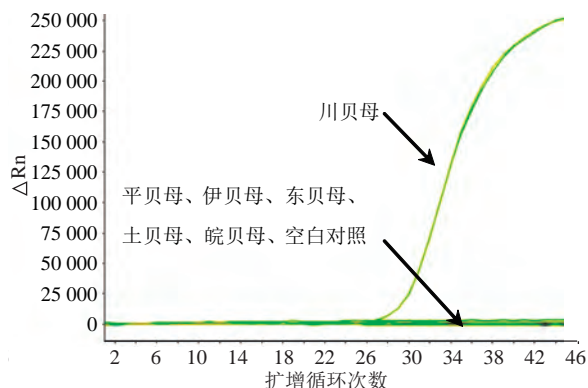
1571 中心切割二维高效液相色谱质谱联用法分析磷酸雌莫司汀胶囊中的有关物质.....邓云菲, 王林波, 吴晓鸾*, 彭兴盛, 林梅
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.014



1581 川贝母物种特异性 TaqMan 探针实时荧光定量 PCR 方法的建立.....

.....王 成，常志远，兰青阔，赵 新，兰 璞*

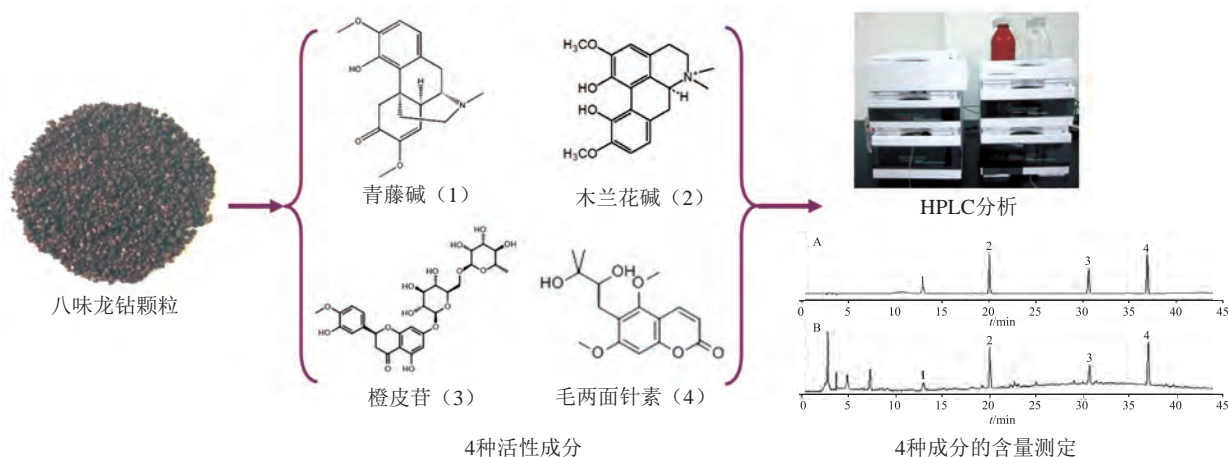
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.015



1586 壮药八味龙钴颗粒中 4 种有效成分的 HPLC 法测定.....

.....李海娇, 李 琪, 方 刚, 王 平, 范 刚*

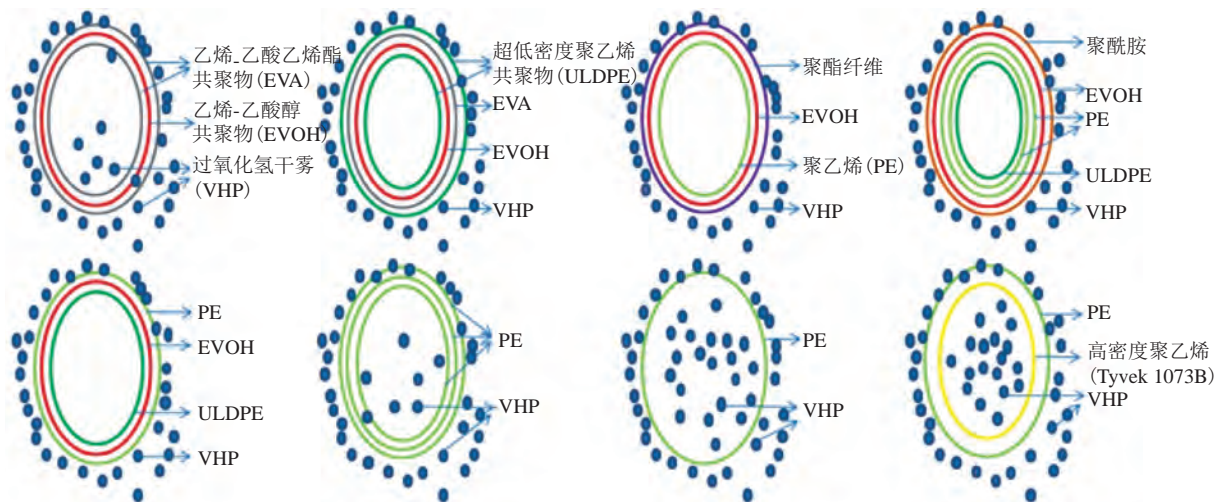
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.016



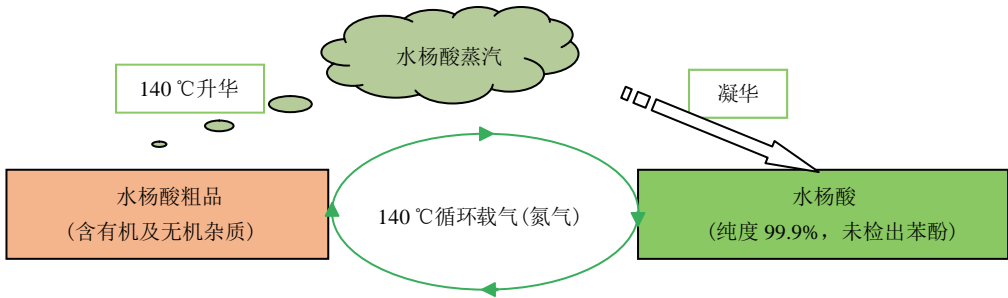
1591 隔离器 VHP 灭菌时呼吸袋及储液袋穿透性探究.....

.....刘向东, 梁开宇, 邓 启, 徐 威, 王 威*

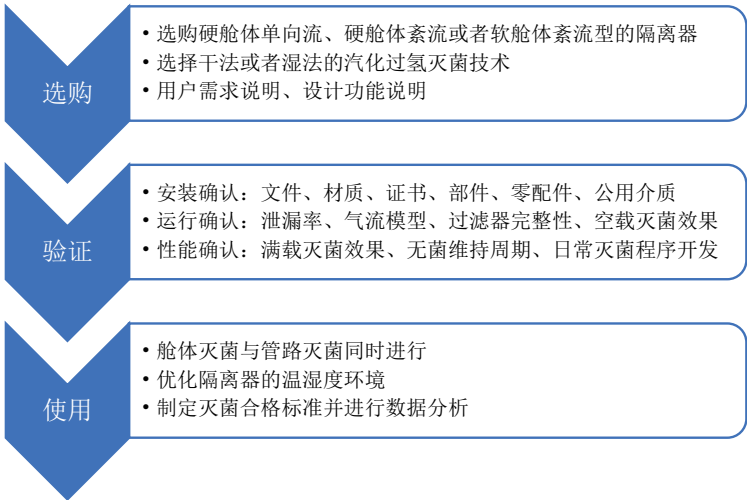
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.017



1595 升华法精制水杨酸的工艺研究.....徐 龙, 徐 旋, 林 波, 刘 芬, 赵国标*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.018

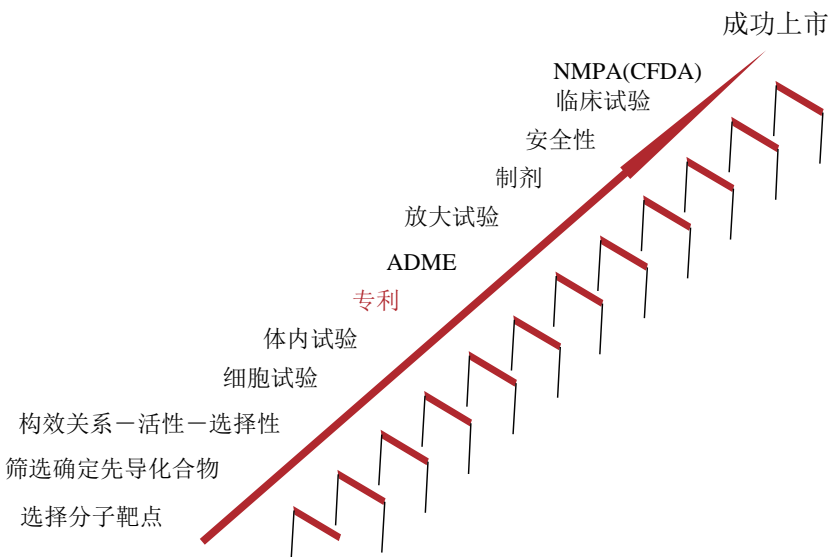


1602 无菌检查用隔离器选购、验证和使用的探讨.....黄家乐, 王 玥*, 何 睿, 徐雪娥
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.019

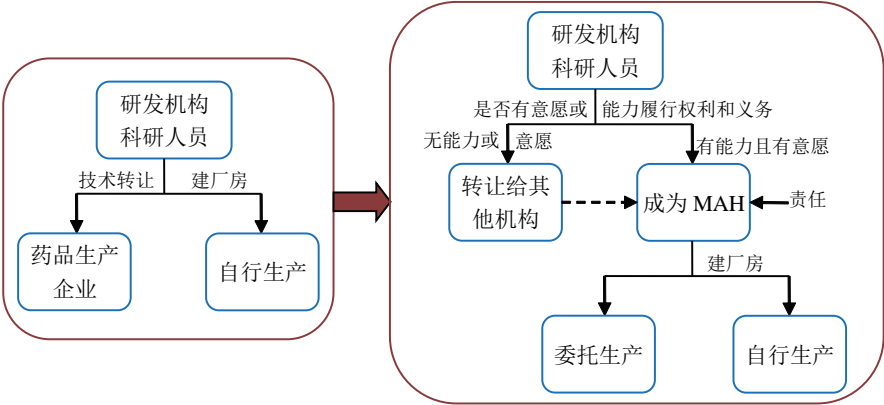


· 药学管理与信息 ·

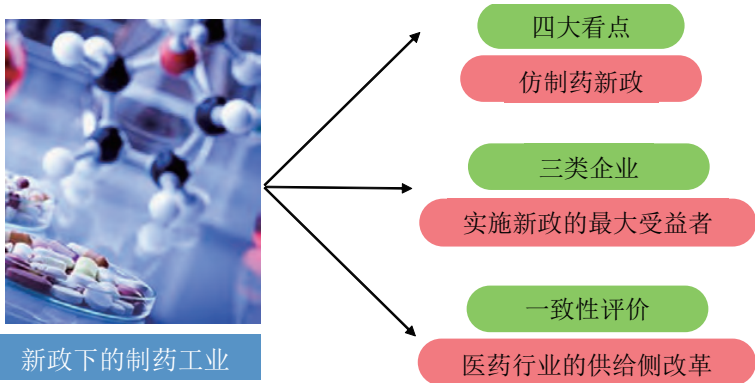
1610 新药研发专利保护策略.....刘桂明, 黄超峰
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.020



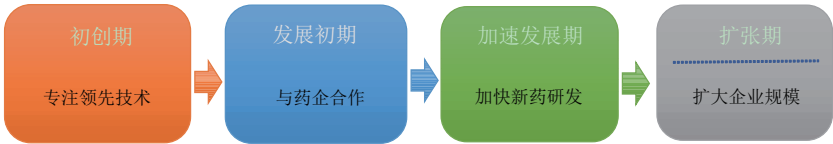
1615 药品上市许可持有人制度与现行制度的衔接问题探讨.....赵华婷，颜建周，邵 蓉*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.021



1624 医药新政下我国制药行业发展的新思路.....徐培红，刘天尧*，干荣富
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.022



1629 创新型医药中小企业发展路径研究及启示——以约尼斯制药为例.....陆 杰，颜建周，邵 蓉*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.023



创新型医药中小企业发展路径

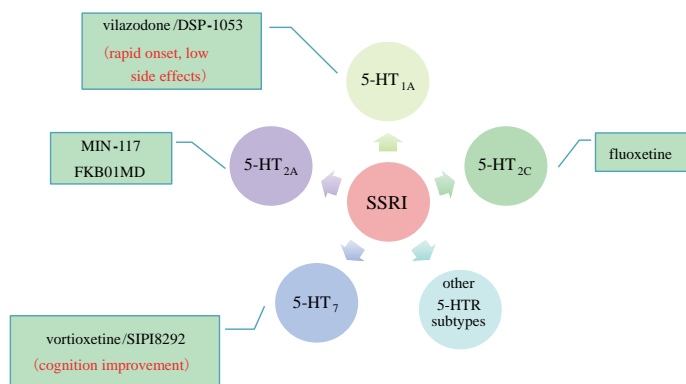
· 其他 ·

广告索引(1516)

Perspectives & Review

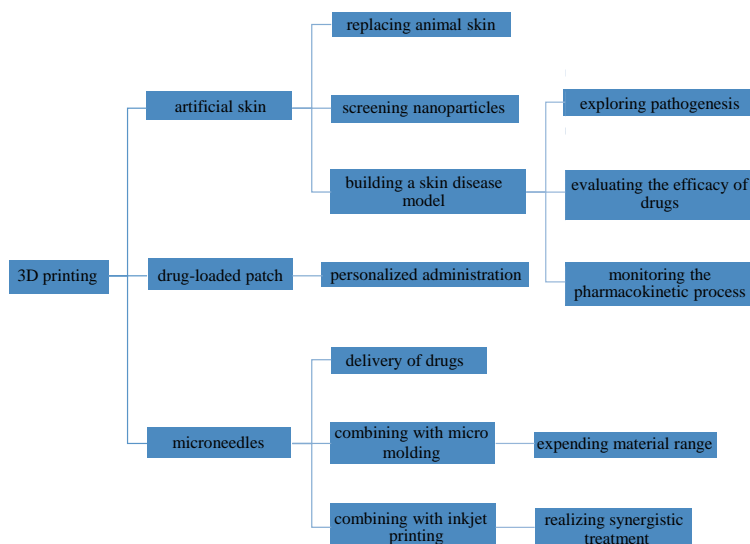
- 1481** Research Progress of Multi-target Antidepressants with SSRI and 5-HT Receptor Subtypes Activity *GU Z S, LI J Q**

DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.001



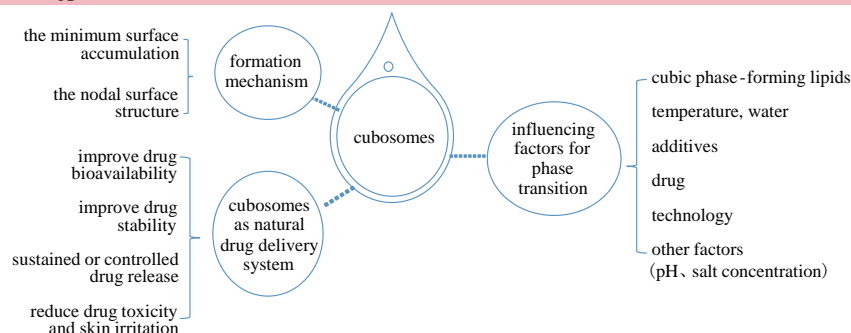
- 1492** Recent Advances of 3D Printing Technology in Transdermal Drug Delivery System *YANG Y L, TONG X L, BIAN Q, LUO H F**

DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.002

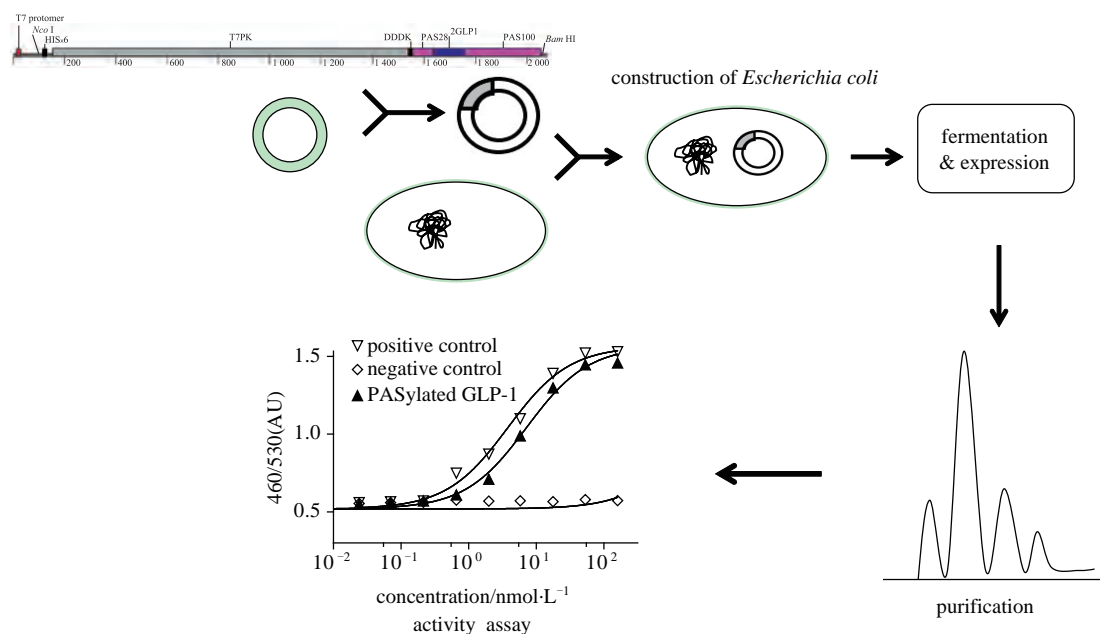


- 1500** Research Advance in Cubosomes as Carriers for Natural Medicines *XU L X, SHEN B D, JIN C, ZHU W F**

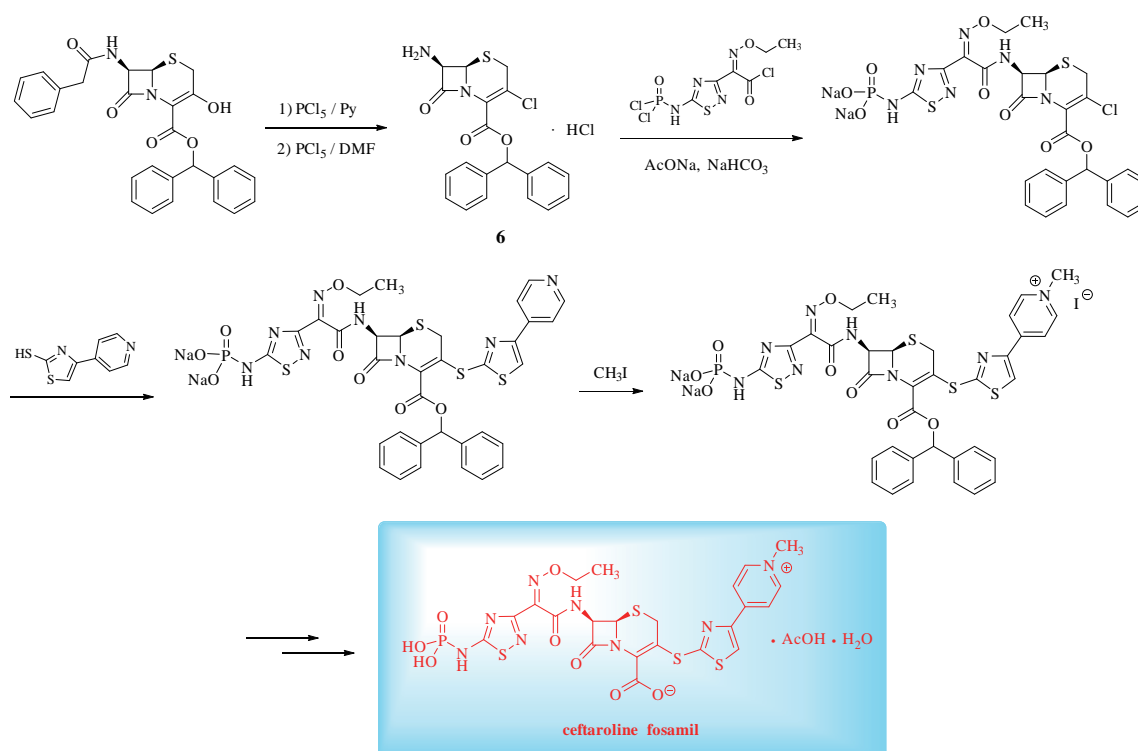
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.003



- 1508** Expression, Purification and Preliminary Activity Analysis of GLP-1 Fusion Protein.....
JIANG Y N, HUANG Z Q, MA J, FENG J*
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.004

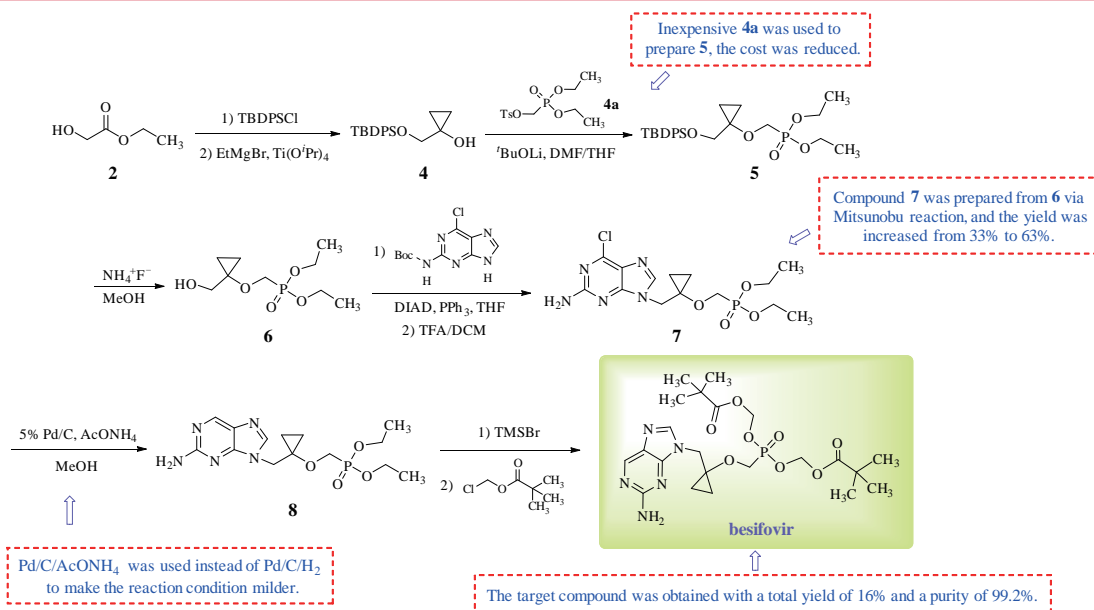


- 1518** A Novel Synthetic Process for Ceftaroline Fosamil.....
GUO X L, ZHANG N H, BAO G L, ZHANG Z K, ZHANG G M*
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.005

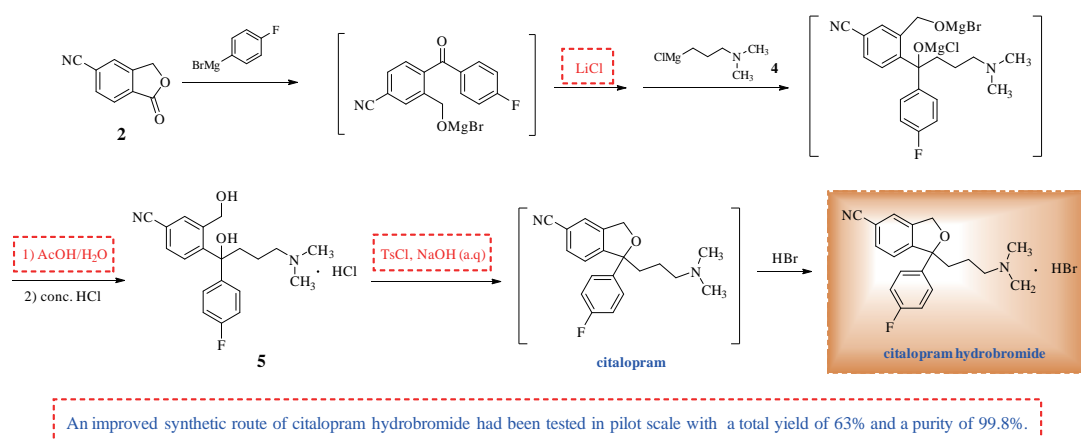


Ceftaroline fosamil was synthesized with a purity of 99.56% and a total yield of 34.8%, and this new process had been tested in pilot scale.

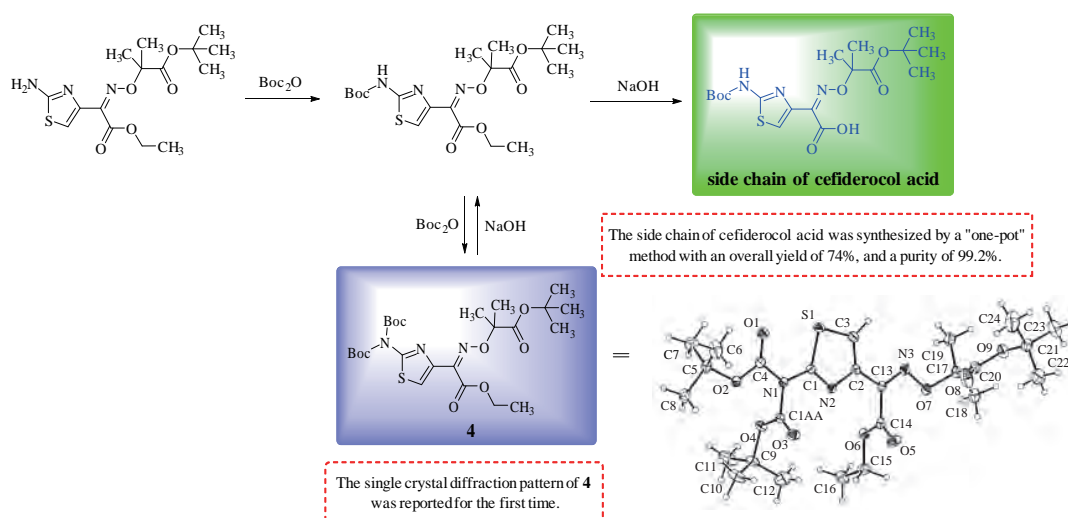
1524 Synthesis Improvement of Besifovir.....WU Y, LIAO G C, HAO L H, WANG P C, SUN P H*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.006



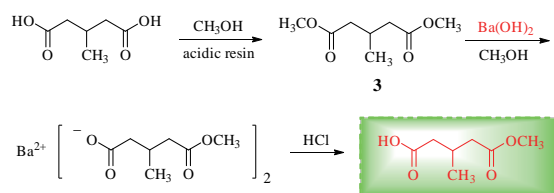
1530 Process Improvement for Citalopram Hydrobromide.....HUANG W F, YU W L, HU J X, ZHANG J*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.007



1534 Synthesis of the Side Chain of Cefiderocol Acid.....TANG Z Y, YANG X W, LU K K, MAO Z J
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.008

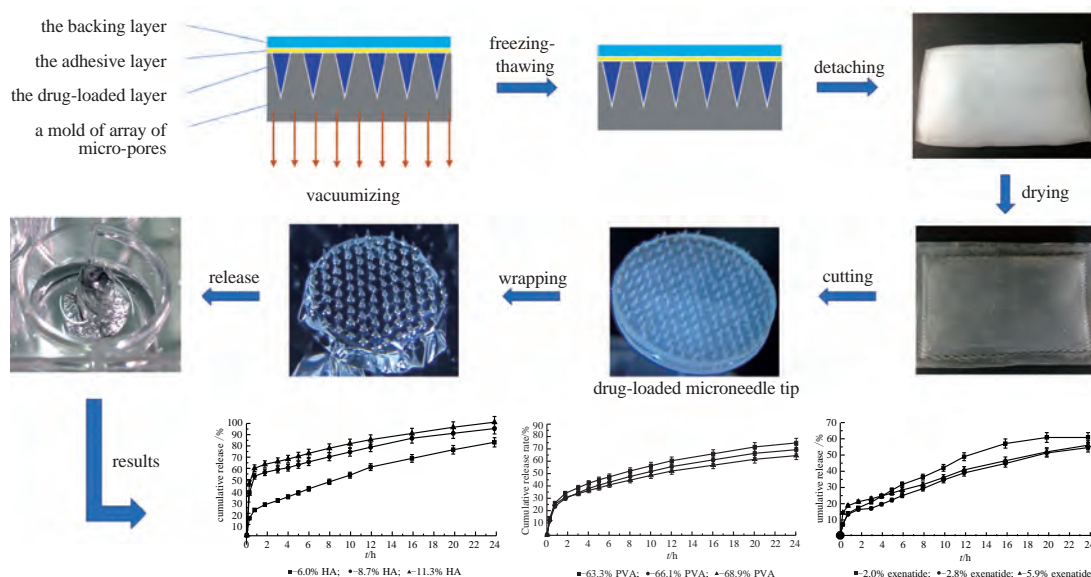


1538 Synthesis of Monomethyl β -Methylglutarate.....ZHAO L H
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.009

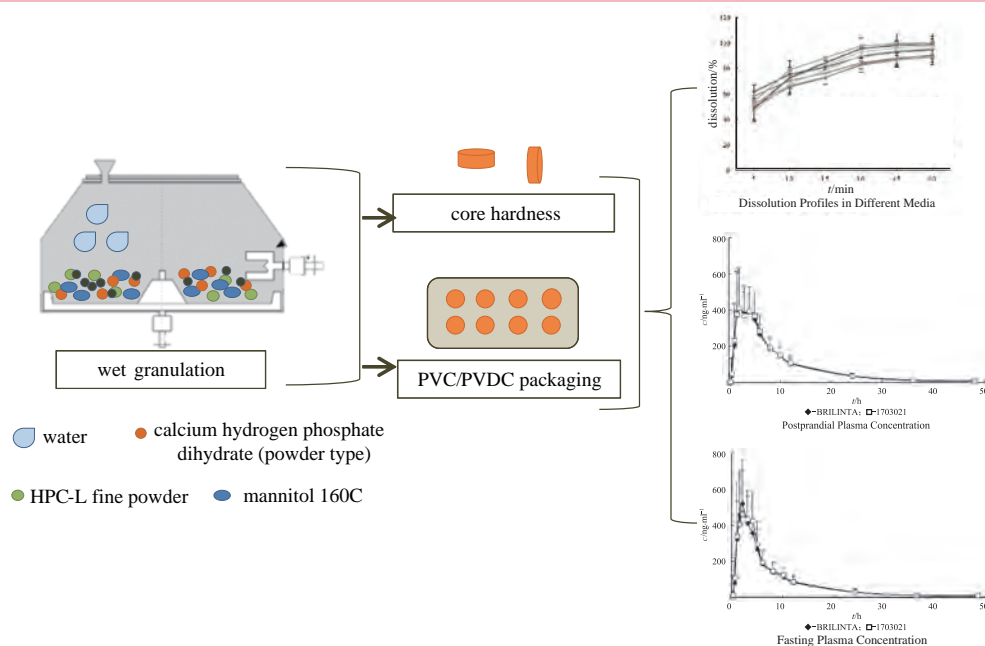


A novel synthetic process for monomethyl β -methylglutarate by utilizing the mild alkaline hydrolysis of barium hydroxide was developed. This new process had been validated in pilot scale with a total yield of 90.3%.

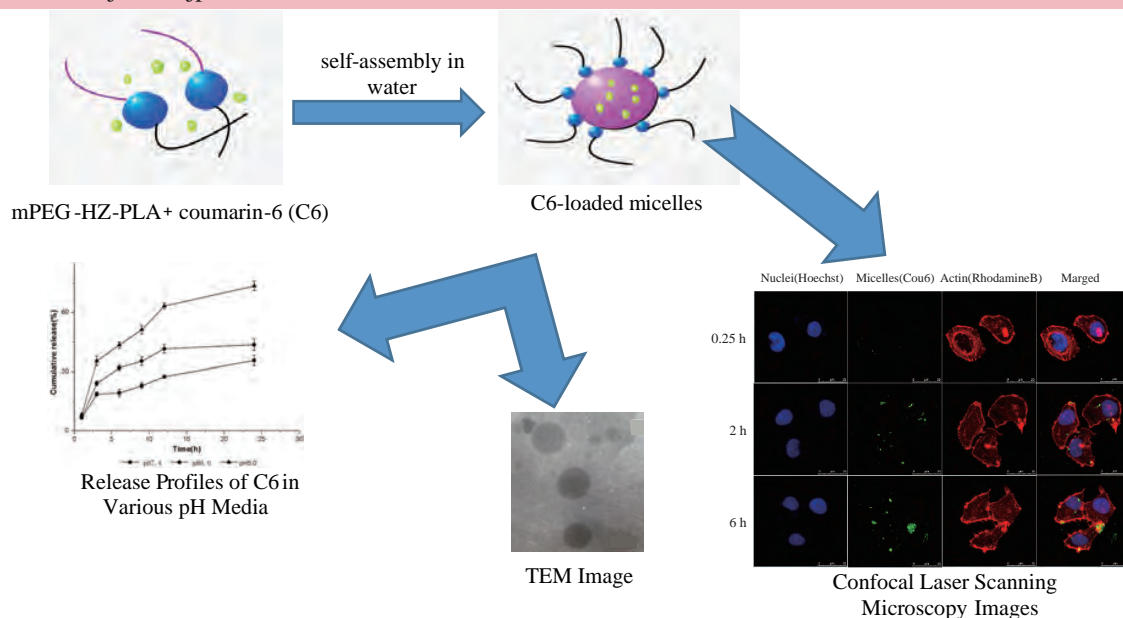
1541 Preparation and Formulation Optimization of the Exenatide Phase-transition Microneedle TipsZHU S W, LIU F, WU F, JIN T*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.010



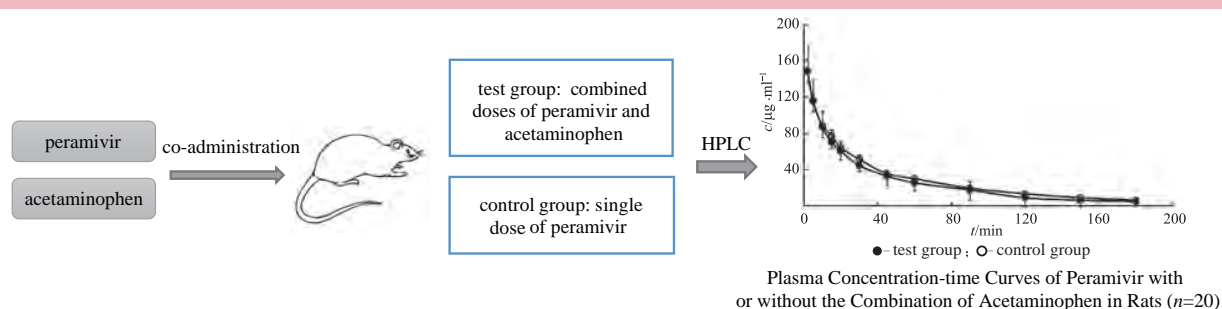
1548 Investigation on Formulation and Process of Ticagrelor Tablets and Their Human BioequivalenceLIU S, QU R, TANG Y, ZHU Y Q*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.011



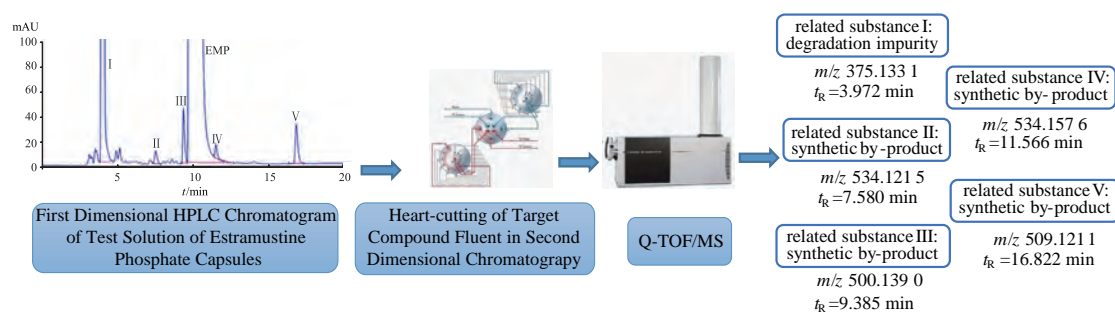
- 1559** Preparation and Evaluation of pH-Sensitive Polymer Micelles Coated with Fluorescent Probe Coumarin-6.....*ZHAO S K, YIN M L, ZHENG Y, SHI S D, SUN Y Q**
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.012



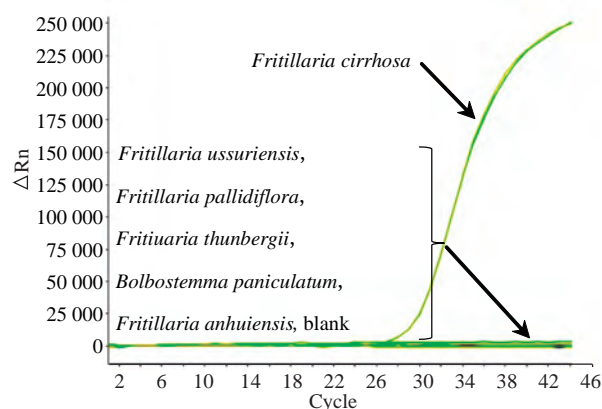
- 1567** Effect of Acetaminophen on the Pharmacokinetics of Peramivir in Rats.....*ZHAO X J, HUANG B Y, LIU X J, ZHAO Y H, ZHANG Z Q**
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.013



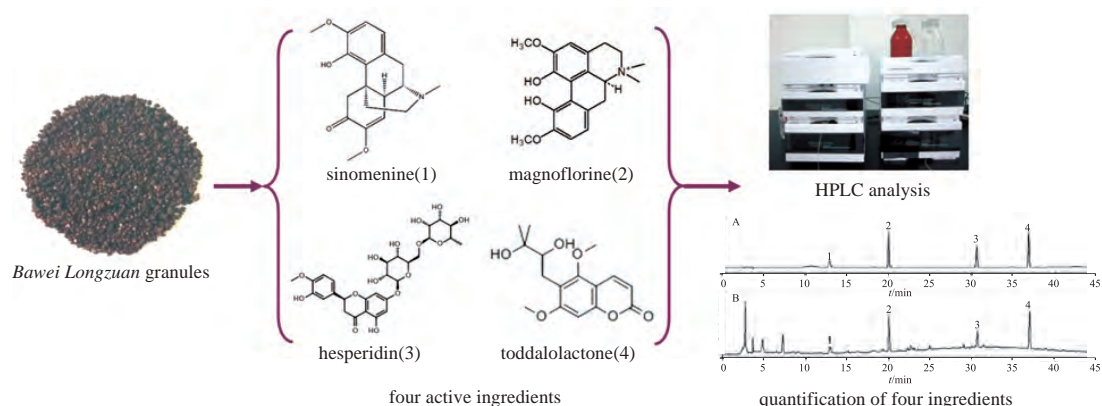
- 1571** Analysis of Related Substances in Estramustine Phosphate Capsules by Heart-cutting Two-dimensional Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry.....*DENG Y F, WANG L B, WU X L*, PENG X S, LIN M*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.014



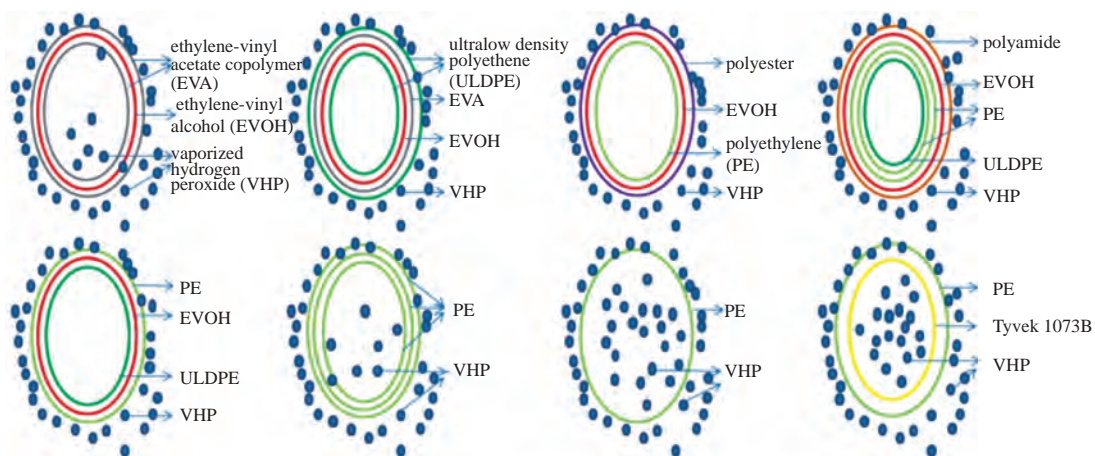
1581 Establishment of Real-time Quantitative PCR for TaqMan Probe Method of *Fritillaria cirrhosa* Species.....WANG C, CHANG Z Y, LAN Q K, ZHAO X, LAN P*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.015



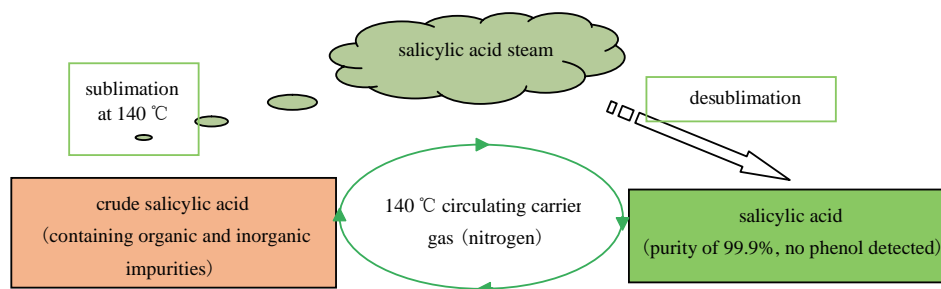
1586 Determination of Four Active Ingredients in *Bawei Longzuan* Granules by HPLC.....LI H J, LI Q, FANG G, WANG P, FAN G*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.016



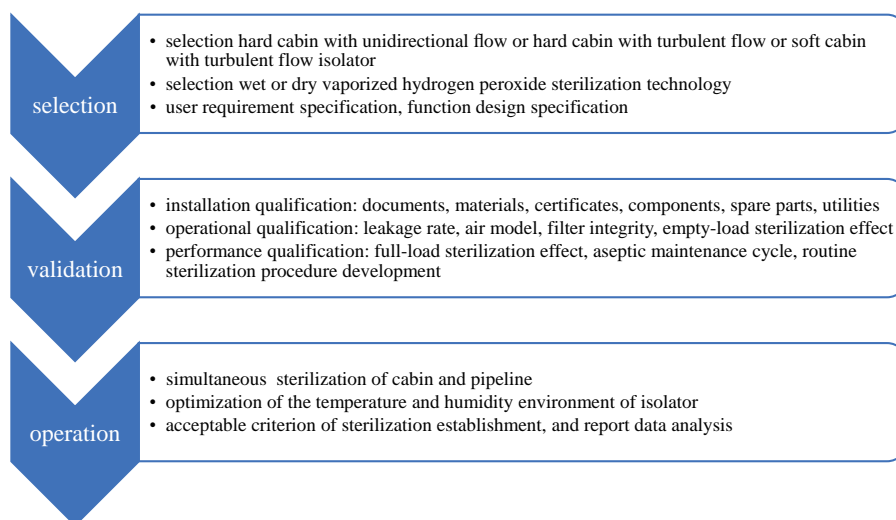
1591 Penetrability Tests of Breathe Bags and Bioprocess Containers during VHP Sterilization.....LIU X D, LIANG K Y, DENG Q, XU W, WANG W*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.017



1595 Purification of Salicylic Acid by Sublimation.....*XU L, XU X, LIN B, LIU F, ZHAO G B**
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.018

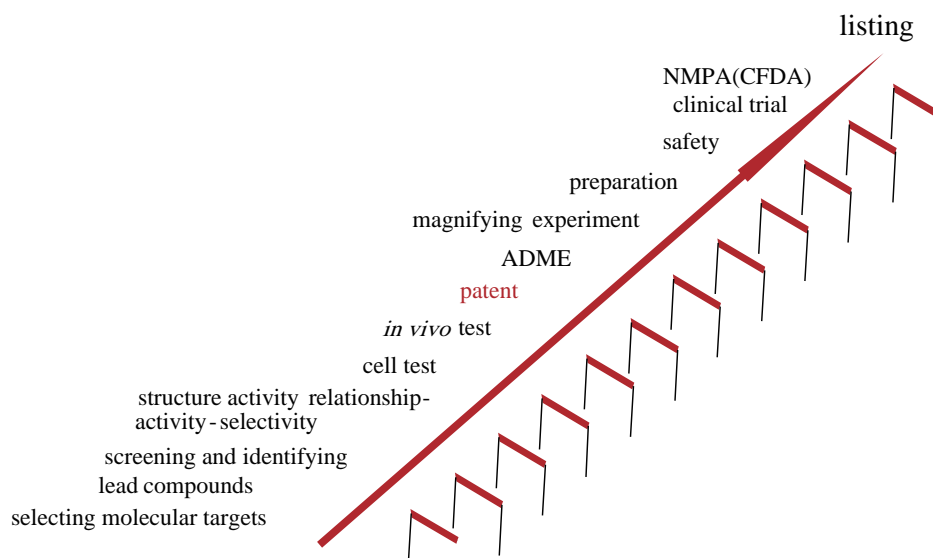


1602 Selection, Validation and Operation of Isolator for Sterility Test.....
.....*HUANG J L, WANG Y*, HE R, XU X E*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.019

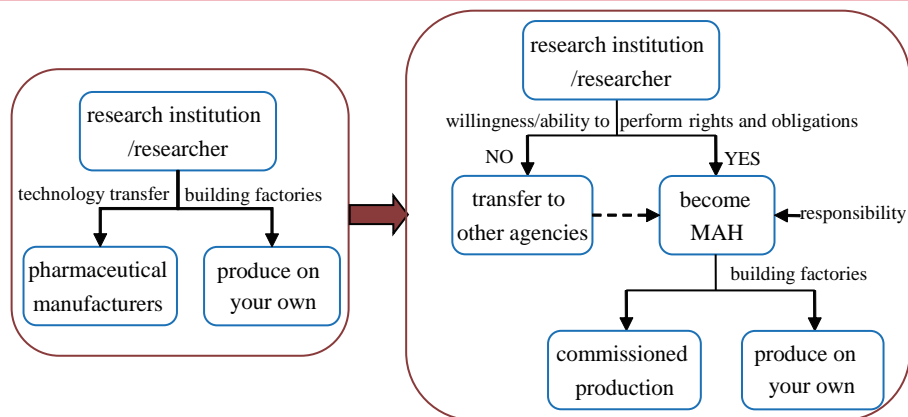


Pharmaceutical Management & Information

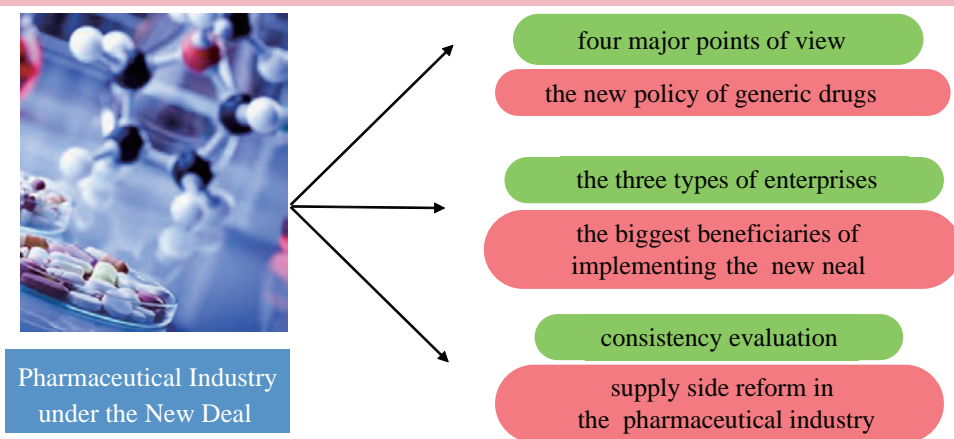
1610 Patent Protection Strategies in New Drug Development.....*LIU G M, HUANG C F*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.020



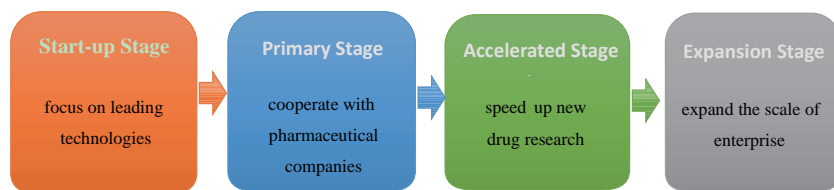
1615 Discussion of the Link between Rules of Marketing Authorization Holder and the Existing SystemZHAO H T, YAN JZ, SHAO R*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.021



1624 New Ideas for the Development of Chinese Pharmaceutical Industry under the New Policy of Medicine.....XU P H, LIU T Y*, GAN R F
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.022



1629 Development Path of Innovative Small and Medium-sized Pharmaceutical Enterprises: Taking Ionis Pharmaceuticals for Example.....LU J, YAN J Z, SHAO R*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.023



Development Path of Innovative Small and Medium-sized Pharmaceutical Enterprises

中国医药工业杂志

ZHONGGUO YIYAO GONGYE ZAZHI

(月刊, 1970年11月创刊)

2018年第49卷 第11期 11月10日出版

版权所有



Monthly (Founded in 1970)

Vol.49 No.11 November 10, 2018

©All Rights Reserved

主 管	上海医药工业研究院	Director	Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry
主 办	上海医药工业研究院 中国药学会 中国化学制药工业协会	Sponsor	Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry Chinese Pharmaceutical Association China Pharmaceutical Industry Association
协 办	浙江海正集团有限公司 上海数图健康医药科技有限公司 山东罗欣药业集团股份有限公司 楚天科技股份有限公司 鲁南制药集团股份有限公司 广东东阳光药业有限公司	Assist Sponsor	Zhejiang Hisun Group Co., Ltd. China Pharmadl (Shanghai) Co., Ltd. Shandong Luoxin Pharmaceutical Group Stock Co., Ltd. Truking Technology Limited Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd. Sunshine Lake Pharma Co., Ltd., HEC Pharma Group
总 编 辑	周伟澄	Managing Editor	ZHOU Weicheng
副 总 编 辑	黄志红, 刘玲玲	Associate Managing Editor	HUANG Zhihong, LIU Lingling
责 任 编 辑	王 盈	Executive Editor	WANG Ying
编 辑 出 版	《中国医药工业杂志》编辑部	Editor by	Editorial Board of Chinese Journal of Pharmaceuticals
编 辑 部 地 址	上海市北京西路1320号(200040)	Address for Foreign Subscriber	1320 Beijing Road (W), Shanghai 200040, China
电 话	021-62793151	Tel	0 086-21-62793151
传 真	021-62473200	Fax	0 086-21-62473200
电 子 邮 件	cjph@pharmadl.com	E-mail	cjph@pharmadl.com
网 址	www.cjph.com.cn www.pharmadl.com	Web Site	http://www.cjph.com.cn http://www.pharmadl.com
广告发行联系			
电 话	021-62474272	Tel	021-62474272
传 真	021-62473200	Fax	021-62473200
电 子 邮 件	taoxh@pharmadl.com ouyy@pharmadl.com	E-mail	taoxh@pharmadl.com ouyy@pharmadl.com
印 刷	上海欧阳印刷厂有限公司	Printed by	Shanghai Ouyang Printing Co., Ltd.
发 行 范 围	公开发行		
国 内 发 行	上海市报刊发行局	Domestic Distributed by	Local Post Office
国 外 发 行	中国国际图书贸易集团有限公司 (北京399信箱, 100044)	Abroad Distributed by	China International Book Trading Corporation (P.O.Box 399, Beijing 100044, China)
国 内 订 阅	全国各地邮政局		

* 通信联系人; 如为第一作者则不加“*”号。征稿简则刊登于当年第1期 *To whom correspondence should be addressed

[期刊基本参数] CN 31-1243/R *1970*m*A4*154*zh*P*20.00* *23*2018-11

2018年版权归《中国医药工业杂志》编辑部所有, 除非特别声明, 本刊刊出的所有文章不代表本刊编委会的观点。

ISSN 1001-8255

CN 31-1243/R

国内邮发代号 4-205

国外邮发代号 M6070

CODEN: ZYGZEA

国内定价: 每册 20.00 元



公众微信
微信号: cjph-cjph



公众微博
weibo.com/cjph

《中国医药工业杂志》第十四届编辑委员会
EDITORIAL BOARD OF 《CHINESE JOURNAL OF PHARMACEUTICALS》
(以姓名拼音为序)

名誉主编 (HONORARY EDITOR-IN-CHIEF)

桑国卫* (SANG Guowei)

顾问 (CONSULTANT)

陈凯先* (CHEN Kaixian)

蒋建东 (JIANG Jiandong)

沈竞康 (SHEN Jingkang)

杨胜利* (YANG Shengli)

丁 健* (DING Jian)

孔德云 (KONG Deyun)

王广基* (WANG Guangji)

朱宝泉 (ZHU Baoquan)

侯惠民* (HOU Huimin)

李绍顺 (LI Shaoshun)

吴晓明 (WU Xiaoming)

主任编委 (EDITOR-IN-CHIEF)

陈芬儿* (CHEN Fener)

副主任编委 (ASSOCIATE EDITOR-IN-CHIEF) (△常务副主任编委)

白 骅 (BAI Hua)

陈桂良 (CHEN Guiliang)

唐 岳 (TANG Yue)

魏宝康 (WEI Baokang)

张 霁 (ZHANG Ji)

周 斌 (ZHOU Bin)

朱建伟 (ZHU Jianwei)

陈 兵 (CHEN Bing)

胡文浩 (HU Wenhao)

王 浩△ (WANG Hao)

杨 超 (YANG Chao)

张万斌 (ZHANG Wanbin)

周伟澄△ (ZHOU Weicheng)

陈代杰△ (CHEN Daijie)

李明华 (LI Minghua)

王军志 (WANG Junzhi)

张贵民 (ZHANG Guimin)

张绪穆 (ZHANG Xumu)

周 燕 (ZHOU Yan)

编委 (MEMBER OF THE EDITORIAL BOARD)

蔡正艳 (CAI Zhengyan)

邓卫平 (DENG Weiping)

董树沛 (DONG Shupe)

冯 军 (FENG Jun)

干荣富 (GAN Rongfu)

何严萍 (HE Yanping)

黄志红 (HUANG Zhihong)

刘玲玲 (LIU Lingling)

龙亚秋 (LONG Yaqiu)

罗国强 (LUO Guoqiang)

马 璟 (MA Jing)

邵 蓉 (SHAO Rong)

孙飘扬 (SUN Piaoyang)

孙 逊 (四川大学) (SUN Xun)

屠永锐 (TU Yongrui)

王 旻 (WANG Min)

王 彦 (WANG Yan)

吴 伟 (WU Wei)

杨立荣 (YANG Lirong)

杨玉社 (YANG Yushe)

张福利 (ZHANG Fuli)

张卫东 (ZHANG Weidong)

赵临襄 (ZHAO Linxiang)

钟大放 (ZHONG Dafang)

周建平 (ZHOU Jianping)

陈少欣 (CHEN Shaoxin)

丁锦希 (DING Jinxi)

范代娣 (FAN Daidi)

傅 磊 (FU Lei)

郭 文 (GUO Wen)

胡海峰 (HU Haifeng)

李范珠 (LI Fanzhu)

刘新泳 (LIU Xinyong)

陆伟根 (LU Weigen)

罗一斌 (LUO Yibin)

潘卫三 (PAN Weisan)

宋秋玲 (SONG Qiuling)

孙小强 (SUN Xiaoqiang)

陶 涛 (TAO Tao)

王建新 (WANG Jianxin)

王全瑞 (WANG Quanrui)

王玉成 (WANG Yucheng)

吴 勇 (WU Yong)

杨 明 (YANG Ming)

殷 明 (YIN Ming)

张启明 (ZHANG Qiming)

张英俊 (ZHANG Yingjun)

赵文杰 (ZHAO Wenjie)

钟为慧 (ZHONG Weihui)

程卯生 (CHENG Maosheng)

董江萍 (DONG Jiangping)

方 浩 (FANG Hao)

甘 勇 (GAN Yong)

何 菱 (HE Ling)

胡又佳 (HU Youjia)

李建其 (LI Jianqi)

刘 忠 (LIU Zhong)

陆伟跃 (LU Weiyue)

吕 扬 (Lǚ Yang)

朴虎日 (PIAO Huri)

苏为科 (SU Weike)

孙 逊 (复旦大学) (SUN Xun)

涂 涛 (TU Tao)

王 健 (WANG Jian)

王善春 (WANG Shanchun)

吴 彤 (WU Tong)

吴勇琪 (WU Yongqi)

杨苏蓓 (YANG Subei)

尤启冬 (YOU Qidong)

张庆文 (ZHANG Qingwen)

张志荣 (ZHANG Zhirong)

郑起平 (ZHENG Qiping)

周虎臣 (ZHOU Huchen)

*院士

《中国医药工业杂志》编辑部成员 (EDITORIAL STAFF)

总编辑 (Managing Editor): 周伟澄 (ZHOU Weicheng)

副总编辑 (Associate Managing Editor): 黄志红 (HUANG Zhihong), 刘玲玲 (LIU Lingling)

责任编辑 (Editor): 刘玲玲 (LIU Lingling) (兼), 王 盈 (WANG Ying), 郭琳琳 (GUO Linlin), 马建芳 (MA Jianfang)

美术编辑 (Art Editor): 沈建成 (SHEN Jiancheng), 陆燕玲 (LU Yanling), 钱苗苗 (QIAN Miaomiao)

编辑助理 (Editorial Assistant): 韦旭华 (WEI Xuhua)

广告、发行负责 (Advertisement Manager): 陶旭辉 (TAO Xuhui), 欧阳怡 (OUYANG Yi)

包载荧光探针香豆素-6的pH敏感型聚合物胶束的制备与评价

赵善科, 尹美林, 郑岩, 史淑丹, 孙玉琦*

(锦州医科大学, 辽宁锦州 121001)

摘要: 制备了含脲键的pH敏感型嵌段共聚物聚乙二醇单甲醚-聚乳酸(mPEG-HZ-PLA), 采用酸碱滴定法测定其pKa值, 并用荧光探针法测定该共聚物的临界胶束浓度(CMC)。用薄膜分散-超声法制备了负载香豆素-6(C6)的聚合物胶束, 并对胶束的理化性质进行表征, 同时以不含脲键的聚乙二醇单甲醚-聚乳酸(mPEG-PLA)为对照, 考察载C6的mPEG-HZ-PLA胶束在不同pH条件下的释放行为。最后, 考察了肿瘤细胞SMCC-7721对载C6的mPEG-HZ-PLA胶束的摄取情况。结果表明, mPEG-HZ-PLA的pKa值为6.25, CMC为 0.78×10^{-3} g/L; 2种载药胶束呈球形且分布均匀, 平均粒径均约为100 nm, 包封率均大于85%。不同pH值介质对载药胶束的体外释放行为有显著影响。在pH 5.0介质中mPEG-HZ-PLA胶束释放速率加快, 24 h的累积释放率达73.6%, 说明mPEG-HZ-PLA聚合物载体材料具有较好的pH敏感释药行为。mPEG-HZ-PLA胶束的细胞摄取结果表明, 随着时间的推移, 肿瘤细胞对其的摄取逐渐增强, 提示该胶束作为抗肿瘤药物的靶向传递系统具有较好的应用前景。

关键词: pH敏感性; 脲键; 聚合物胶束; 香豆素-6; 细胞摄取

中图分类号: R944.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-8255(2018)11-1559-08

DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.012

pH敏感型聚合物胶束主要通过两亲性嵌段共聚物自组装形成胶束制备而成, 共聚物中含对pH敏感的聚合物链段或基团。用pH敏感聚合物胶束包埋抗肿瘤药物可以提高抗肿瘤药物的水溶性, 延长药物在血液中的循环时间, 并可以通过增强渗透和滞留(EPR)效应靶向肿瘤部位。此外, pH敏感型聚合物胶束被肿瘤细胞内吞后在胞内要经历从胞外(pH 6.5~7.2)至溶酶体(pH 4.5~5.0)的一系列pH梯度, 这种pH的变化可以触发pH敏感胶束快速释药, 提高抗肿瘤药物在细胞微酸性环境中的药物浓度, 继而提高药物的疗效。因此, pH敏感聚合物胶束引起了研究者的广泛关注^[1-2]。

脲键常被用到pH敏感聚合物胶束的构建中, 其对酸灵敏度高, 酸性条件下水解速度快, 故脲键

常被应用到各种pH敏感药物载体中^[3-4]。本试验利用脲键在酸性环境下快速断裂的特性, 合成含脲键的两亲性嵌段共聚物聚乙二醇单甲醚-聚乳酸(mPEG-HZ-PLA)^[3], 同时以不含脲键的聚乙二醇单甲醚-聚乳酸(mPEG-PLA)作对照^[5]。以疏水性荧光探针香豆素-6(**1**)作为难溶性的模型药, 制备**1**的聚合物胶束。通过体外模拟肿瘤的酸性环境, 研究该胶束的释放和细胞摄取情况, 为其进一步作为抗肿瘤药物靶向传递系统的研究提供帮助。

1 仪器与试剂

Varian 400-MR型核磁共振波谱仪(美国瓦里安公司); Affinity-1型傅里叶变换红外光谱仪和UV-2550型UV-Vis分光光度计(日本Shimadzu公司); 1515型凝胶渗透色谱仪(美国Waters公司); RE-52AA型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); Nano-ZS90型激光粒度仪(英国马尔文公司); JEM-1200EX型透射电镜(日本电子公司); FV1000-IX81型激光共聚焦扫描显微镜(日本Olympus公司)。

1(含量98%, 批号20161203)、水合肼、溴代乙酸乙酯(北京百灵威科技有限公司); D,L-丙交酯和聚乙二醇单甲醚[mPEG, 重均相对分子质量(M_w)2 000](东京化成工业株式会社); 异辛酸亚锡和对羟基苯甲醛(阿拉丁试剂上海有限公司); 叔丁醇、叔丁醇钾(上海麦克林生化科技有

收稿日期: 2018-05-08

基金项目: 中药组分构建的pH响应型主动肝癌靶向葫芦素B脂质体研究(201602312)

作者简介: 赵善科(1993—), 男, 硕士, 从事药物新剂型与新技术的研究。

Tel: 15641684085

E-mail: 15641684085@163.com

通信联系人: 孙玉琦(1978—), 男, 博士, 副教授, 从事药物分析研究。

Tel: 13634981089

E-mail: cpushyq@jzmu.edu.cn

限公司); Hoechst33258(上海碧云天生物技术有限公司); 无水乙醇、四氢呋喃(天津永晟精细化工有限公司); 无水甲醇(天津市科密欧化学试剂有限公司); 所有试剂均为分析纯。

人肝癌细胞 SMCC-7721(中国科学院上海细胞库, 目录号 TCHu52)。

2 方法与结果

2.1 嵌段共聚物的合成(图1)

2.1.1 mPEG-PLA 的合成

精密称取 mPEG₂₀₀₀ 3.0 g, *D,L*-丙交酯 2.0 g, 置 25 ml 圆底烧瓶中, N₂ 保护下置 70 °C 油浴中加热熔融, 滴加 1~2 滴催化剂异辛酸亚锡, N₂ 保护下升温至 140 °C 反应 6 h, 冷却至室温, 得到淡黄色固体状粗产物 4.5 g。用少量二氯甲烷(DCM)溶解粗产物, 逐滴滴入到冷乙醚中, 形成白色沉淀, 低温静置 24 h, 减压抽滤, 得到白色絮状固体, 重复抽滤 3 次, 40 °C 减压干燥 24 h, 得到理论 M_w 为 3 300 的嵌段共聚物 mPEG-PLA 3.1 g, 产率 62% (以反应物 mPEG₂₀₀₀、丙交酯的总量计)。

2.1.2 mPEG-HZ-PLA 的合成

mPEG-HZ-PLA 由 4 步反应合成。取 mPEG₂₀₀₀ 4.0 g 置 100 ml 圆底烧瓶中, 加入甲苯 10 ml 溶解, 60 °C 减压旋蒸除去大部分溶剂。将叔丁醇钾 1.2 g 溶于叔丁醇 15 ml 中, 加入上述 mPEG 的甲苯体系中, N₂ 保护下 50 °C 反应 20 min。将溴代乙酸乙酯 2.2 ml 加入叔丁醇 20 ml 中, 混匀后加入上述反应体系中, 立即出现黄色沉淀, 继续 50 °C 水浴反应 48 h。反应结束后离心除去沉淀, 上清液旋蒸除去大部分溶剂, 逐滴滴入冷甲基叔丁基醚, 静置沉淀, 抽滤得到的固体用 DCM 复溶, 再用冷甲基叔丁基醚沉淀, 反复操作 3 次, 40 °C 减压干燥 48 h, 得到黄色固体状甲氧基聚乙二醇酸甲酯 3.6 g, 产率 90% (以 mPEG₂₀₀₀ 计)。

将上述所得的甲氧基聚乙二醇酸甲酯 (3.6 g, 0.25 mmol) 溶于无水甲醇 45 ml 中, 加入水合肼 (80%) 23 ml, 60 °C 回流反应 24 h。反应结束后, 将反应液减压浓缩, 逐滴滴入冷甲基叔丁基醚沉淀, 抽滤, 滤饼于 40 °C 减压干燥 48 h, 得到白色

粉末状末端连有伯胺基的聚乙二醇单甲醚衍生物 (mPEG-NH-NH₂) 2.3 g, 产率 64% (以甲氧基聚乙二醇酸甲酯计)。

将上述所得的 mPEG-NH-NH₂ (2.0 g, 1.0 mmol) 和对羟基苯甲醛 (1.0 g, 8.2 mmol) 溶于四氢呋喃 30 ml 中, N₂ 保护下 60 °C 反应 24 h。反应结束后, 将反应液减压浓缩, 逐滴滴入冷甲基叔丁基醚沉淀, 抽滤, 滤饼于 40 °C 减压干燥 48 h, 得到淡黄色固体状含脲键的聚乙二醇单甲醚衍生物 (mPEG-HZ-OH) 1.2 g, 产率 40% (以反应物 mPEG-NH-NH₂ 和对羟基苯甲醛总量计)。

精密称取上述所得的 mPEG-HZ-OH 0.5 g, 置圆底烧瓶中, 50 °C 干燥过夜, 加入甲苯 30 ml, 60 °C 旋蒸除去一部分甲苯, 加入 *D,L*-丙交酯 0.3 g, 加入催化剂异辛酸亚锡 70 μl, N₂ 保护下 110 °C 油浴反应 24 h 后停止反应。旋蒸除去反应溶剂甲苯, 加入二氯甲烷溶解粗产物, 逐滴滴入冷甲基叔丁基醚沉淀, 抽滤, 滤饼于 40 °C 减压干燥 36 h, 得到淡黄色固体状嵌段共聚物 mPEG-HZ-PLA 0.45 g, 产率 56% (以反应物 mPEG-HZ-OH 和丙交酯的总量计)。

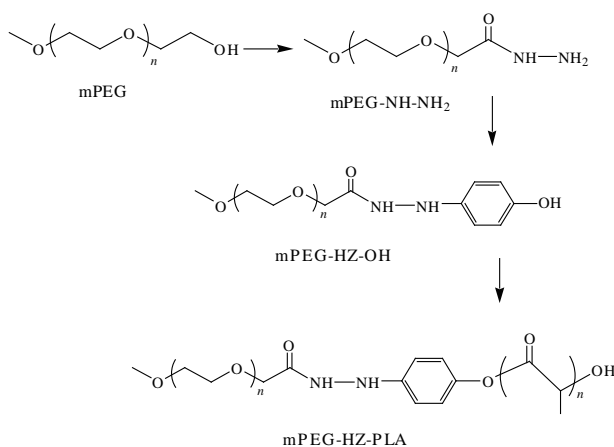


图1 mPEG-HZ-PLA 的合成路线

Fig.1 Synthesis Route of Copolymer mPEG-HZ-PLA

2.2 嵌段共聚物的表征

2.2.1 红外光谱表征

样品于室温下, 以溴化钾为分散剂, 研磨成糊

状后, 取适量压片, 然后在 $400 \sim 4\,000\text{ cm}^{-1}$ 波数范围内扫描, 扫描次数为 256 次, 分辨率为 2 cm^{-1} , 结果见图 2。

图 2A 中可见, $3\,431\text{ cm}^{-1}$ 为羟基的伸缩振动吸收峰, $2\,887\text{ cm}^{-1}$ 为 mPEG 亚甲基的伸缩振动吸收峰, $1\,757\text{ cm}^{-1}$ 为酯羰基 $\text{C}=\text{O}$ 的伸缩振动吸收峰, 由于羧酸羰基 $\text{C}=\text{O}$ 的伸缩振动, $1\,114\text{ cm}^{-1}$ 为酯基 $\text{C}-\text{O}$ 的伸缩振动吸收峰, 证明了聚乳酸 (PLA) 与 mPEG 连接的 $-\text{COO}-$ 的存在, $1\,465$ 和 $1\,360\text{ cm}^{-1}$ 为亚甲基的弯曲振动吸收峰, 963 和 842 cm^{-1} 为 mPEG 结晶区的特征峰。图 2B 中, $1\,729\text{ cm}^{-1}$ 处为羰基 ($\text{C}=\text{O}$) 伸缩振动吸收峰。图 2C 中, 除在 $1\,683\text{ cm}^{-1}$ 处的羰基 ($\text{C}=\text{O}$) 吸收峰外, 在 $1\,604$ 和 $1\,514\text{ cm}^{-1}$ 处的峰分别是腙键碳氮双键和苯环的吸收峰。图 2D 中, 在 $1\,758\text{ cm}^{-1}$ 处的峰是酯羰基的振动吸收峰, 在 $1\,594\text{ cm}^{-1}$ 处的峰是腙键吸收峰。

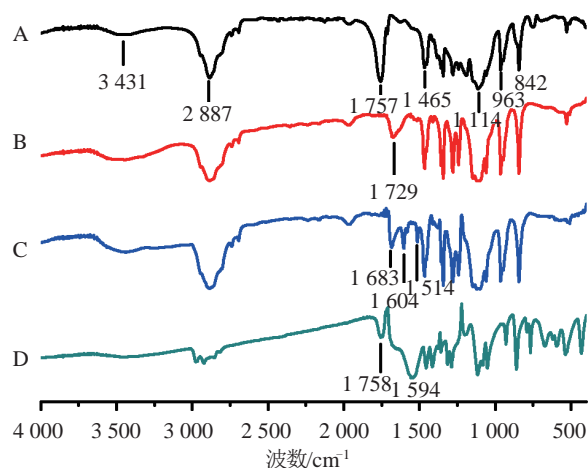


图 2 mPEG-PLA (A)、mPEG-NH-NH₂ (B)、mPEG-HZ-OH (C) 和 mPEG-HZ-PLA (D) 的红外光谱图
Fig.2 Infrared Spectra of mPEG-PLA (A), mPEG-NH-NH₂ (B), mPEG-HZ-OH (C) and mPEG-HZ-PLA (D)

2.2.2 ¹H NMR 表征

取少量共聚物粉末, 以氘代氯仿 (CDCl_3) 为溶剂, 共振频率为 300 Hz, 进样分析, 结果见图 3。

图 3A 可见中, PLA 上的 CH_3 和 CH 的峰分别在 $\delta\ 1.60$ 和 5.18 处, $\delta\ 3.66$ 为 mPEG ($-\text{CH}_2\text{CH}_2-$) 的质子吸收峰, $\delta\ 3.39$ 处为 mPEG 端甲氧基 (CH_3O)

质子吸收峰, $\delta\ 4.28$ 处为 *D,L*-丙交酯的 ($-\text{CH}-$) 和每个 PEG 链末端 PEG 的 ($-\text{CH}_2$) 质子吸收峰, 证明合成了共聚物 mPEG-PLA。图 3B 中, $\delta\ 4.05$ 和 3.64 处分别为与羰基相连的亚甲基和聚合的亚甲基的质子峰, 证明了中间体 mPEG-NH-NH₂ 的合成。图 3C 中, $\delta\ 8.15$ 处的吸收峰属于腙键的次甲基质子峰, $\delta\ 7.66$ 和 6.88 处的吸收峰归属于苯环的吸收峰, $\delta\ 4.16$ 处的吸收峰归属于与羰基相邻的亚甲基质子峰。图 3D 中, $\delta\ 5.20$ 处出现 PLA 甲基的峰, 其他峰的化学位移值大体不变, 证明合成了共聚物 mPEG-HZ-PLA。

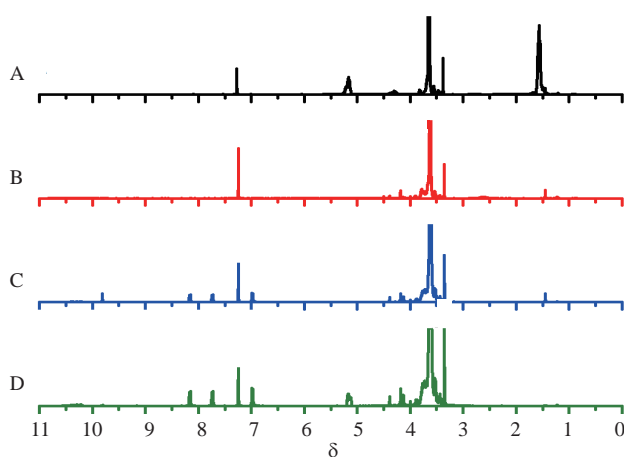


图 3 mPEG-PLA (A)、mPEG-NH-NH₂ (B)、mPEG-HZ-OH (C) 和 mPEG-HZ-PLA (D) 的核磁表征图
Fig.3 ¹H NMR Spectra of mPEG-PLA (A), mPEG-NH-NH₂ (B), mPEG-HZ-OH (C) and mPEG-HZ-PLA (D)

2.2.3 凝胶渗透色谱 (GPC) 法表征

以四氢呋喃为流动相、流速 1 ml/min 的条件下, 共聚物 mPEG-HZ-PLA 的 GPC 测定结果见图 4。测得共聚物中数均相对分子质量 (M_n) 为 $3\,271$, M_w 为 $3\,581$, 多分散系数为 1.13 , 说明所得嵌段共聚物具有较窄的分子质量分布, 理化性质较均一。图 4 中后面两个峰可能是共聚物中残留杂质的峰。

2.3 mPEG-HZ-PLA 理化常数测定

2.3.1 pKa 值测定

用酸碱滴定法测定共聚物 pKa 值, 以此考察共聚物 mPEG-HZ-PLA 的 pH 敏感性^[6-7], 具体方法

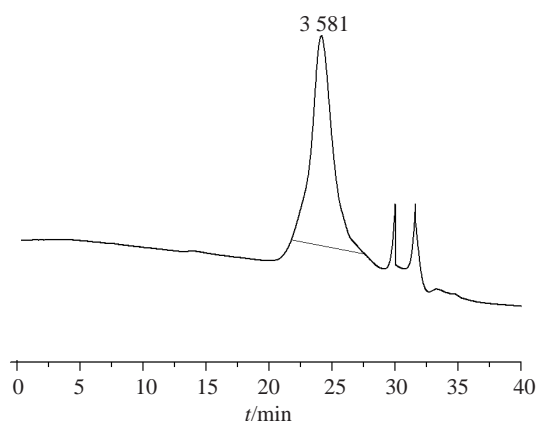


图4 mPEG-HZ-PLA 的 GPC 表征结果
Fig.4 GPC Chromatogram of mPEG-HZ-PLA

如下。取共聚物 mPEG-HZ-PLA 的水溶液 (1.0 mg/ml) 25.0 ml, 加入 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液调至 pH 11.0, 然后用 0.01 mol/L 盐酸滴定。记录滴定过程中突跃点的 pH 值 pH_1 、 pH_2 , 根据 pK_a 计算公式计算 mPEG-HZ-PLA 的 pK_a 值。酸碱滴定结果表明, 该嵌段共聚物的缓冲当量介于 pH 7.6 ~ 4.9, 计算得到 mPEG-HZ-PLA 的 pK_a 值为 6.25, 提示 mPEG-HZ-PLA 在生理环境 (pH 5.0 ~ 8.0) 下有较好的 pH 缓冲能力。

2.3.2 临界胶束浓度 (CMC) 的测定

共聚物 mPEG-HZ-PLA 的 CMC 值通过荧光分光光度法测定, 具体方法如下。将茚的丙酮溶液加入到西林瓶中, 使丙酮挥发完全, 随后将不同浓度的共聚物 mPEG-HZ-PLA 溶液加入到西林瓶中, 超声 15 min 后在 37 °C 孵育 24 h, 然后用荧光分光光度计检测样品的荧光光度值 (激发波长 335 nm, 发射波长为 373 和 384 nm)。以共聚物浓度的对数值 $\log c$ 为横坐标, 茚在 384 nm 和 373 nm 处的荧光强度比值 I_{384}/I_{373} 为纵坐标作图, 见图 5。

由图 5 可见, 当 mPEG-HZ-PLA 的浓度小于 CMC (两趋势线交点) 时, I_{384}/I_{373} 变化幅度较小; 达到 CMC 时, 茚开始向胶束内核转移, 且 I_{384}/I_{373} 随浓度的增加而增大。计算结果表明, mPEG-HZ-PLA 的 CMC 值为 0.78×10^{-3} g/L。

2.4 1 聚合物胶束的制备及形态表征

采用薄膜分散-超声法制备 1 的聚合物胶束 1/

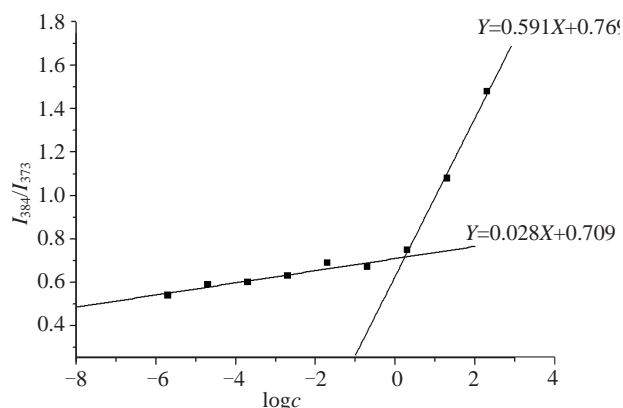


图5 mPEG-HZ-PLA 的临界胶束浓度 (CMC)
Fig.5 Critical Micelle Concentration (CMC) of mPEG-HZ-PLA

mPEG-HZ-PLA 及 1/mPEG-PLA^[8-9]。取 mPEG-HZ-PLA 或 mPEG-PLA 20 mg 置 250 ml 茄型瓶中, 加入 1.0 mg/ml 的 1 的 DCM 溶液 100 μ l, 再加 DCM 与无水乙醇 (4 : 1) 混合液 10 ml, 45 °C 旋转蒸发除去溶剂, 在茄形瓶内壁形成一层均匀的薄膜, 继续旋蒸 10 min, 加入预热至 45 °C 的去离子水 10 ml, 45 °C 常压旋转水化 15 min。水化液在室温下搅拌 1 h, 然后超声 (功率 100 W) 5 min, 冷却至室温, 经 0.22 μ m 滤膜过滤, 即得 1 的聚合物胶束溶液 1/mPEG-HZ-PLA 或 1/mPEG-PLA。用激光粒度仪测定 1 聚合物胶束的粒径以及粒度分布。另取少量胶束溶液滴加到铜网上, 室温自然晾干后, 进行透射电镜扫描。

1 胶束的粒度分布图见图 6。测定结果显示: 1/mPEG-HZ-PLA 的平均粒径 (104.7 ± 22.5) nm, 略大于 1/mPEG-PLA 的平均粒径 (94.4 ± 19.3) nm, 二者多分散系数 (PDI) 均较低, 分别为 0.056 和 0.042, 提示粒度分布较为均匀。

透射电镜照片见图 7, 显示 2 种聚合物胶束形态均呈类球状, 表面圆润规整。

2.5 包封率的测定

选择超速离心法测定 1 聚合物胶束的包封率 (EE)^[10]。精密量取制备的 1 聚合物胶束溶液 5.0 ml, 用紫外分光光度法在 458 nm 处测定吸光度 D_0 。另取等量的 1 聚合物胶束溶液置离心管中, 离心 (6 708 \times g) 15 min 除去游离的 1, 所得上清液即

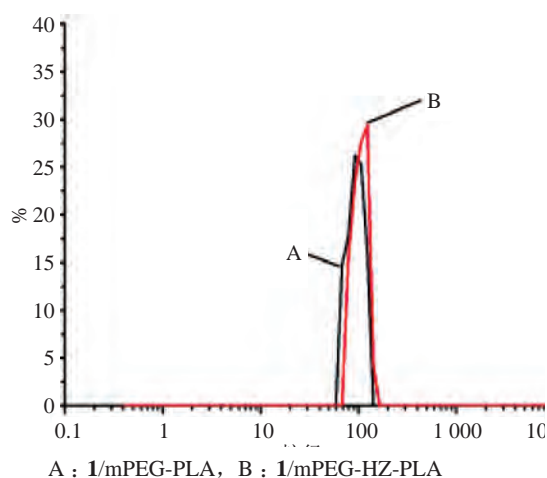
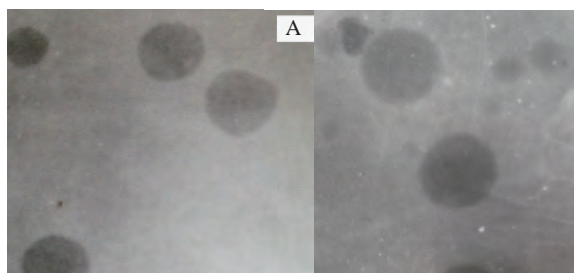


图6 载药胶束的粒径分布图

Fig.6 Size Distribution of the Drug-loading Micelles



A : 1/mPEG-PLA, B : 1/mPEG-HZ-PLA

图7 载药胶束的 TEM 电镜照片 ($\times 250\,000$)Fig.7 TEM Image of the Drug-loaded Micelles ($\times 250\,000$)

为 **1** 胶束溶液, 采用紫外分光光度法测定上清液中 **1** 的吸光度 D_1 。由 **1** 吸光度 D 值与浓度 c 的标准曲线方程 ($D=0.156\,6c-0.00\,81$, $r=0.999\,4$; 线性范围 $1.5 \sim 4.5\,\mu\text{g/ml}$) 计算得 c_0 和 c_1 , 再计算 **1** 胶束的包封率。

结果表明, 两种 **1** 聚合物胶束 (**1**/mPEG-PLA 和 **1**/mPEG-HZ-PLA) 的包封率为 $(87.1\pm 2.31)\%$ 和 $(91.2\pm 1.76)\%$ ($n=3$), 包封率均在 85% 以上, 结果表明 2 种聚合物胶束均有较高的包封率。

2.6 胶束的体外释放试验

用透析法考察胶束的体外释放行为。为提高试验数据的精确性, 采用先离心再检测的方法。因封包率较高, 从成本效益角度考虑, 后续应用时可不进行离心操作。精密吸取离心分离除去游离 **1** 后

的 **1** 胶束溶液 4.0 ml, 放入经预溶胀的透析袋 (截留分子量为 3 000) 内, 分别置装有 pH 为 7.4、6.0 以及 5.0 的 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS, 释放介质) 25 ml 中, 于 37 °C、振摇速度 100 r/min 条件下试验。分别于 0.5、1.0、3.0、6.0、9.0、12.0 和 24.0 h 时取样 4.0 ml (及时补充同温等量介质)。释放介质中的 **1** 含量照 “2.5” 项下方法测定, 绘制释放曲线 [11]。

2 种胶束在不同 pH 值条件下的释放曲线见图 8。结果显示, 24 h 内, mPEG-HZ-PLA 和 mPEG-PLA 胶束在 pH 7.4 介质中的累积释放率较为接近, 约为 31.0%, 而在 pH 6.0、pH 5.0 释放介质中, mPEG-HZ-PLA 胶束的药物累积释放率为 43.6% 和 73.6%, mPEG-PLA 胶束则仅为 31.3% 及 39.2%。由此可见, **1** 从胶束中的释放速率在较大程度上受到介质 pH 值的影响, 含脲键的 mPEG-HZ-PLA 胶束在酸性环境下释放速率加快, 而 mPEG-PLA 的释放并没有明显的增加。

2.7 胶束的细胞摄取试验

用激光共聚焦显微镜观察负载 **1** 的 mPEG-HZ-PLA 聚合物胶束在肝癌细胞 SMCC-7721 中的摄取情况。将 SMCC-7721 细胞以每孔 2×10^5 个的密度接种在 12 孔板中孵育过夜, 然后加入负载 **1** 的 mPEG-HZ-PLA 聚合物胶束, 在 37 °C 孵育 0.25、2 和 6 h。用 PBS 清洗 3 次以除去未被摄取和吸附在细胞表面的 **1**, 用 4% 多聚甲醛溶液固定细胞, 然后用 Hoechst33258 溶液和罗丹明 B ($10\,\mu\text{g/ml}$) 在避光条件下分别标记细胞核与细胞骨架, 用激光共聚焦显微镜观察负载 **1** 胶束的细胞摄取情况。**1** 的荧光效率高, 因而被广泛用于纳米药物载体的细胞定位试验中, 大多数细胞在 **1** 的荧光光谱范围内没有背景干扰; 此外, 未处理的 **1** 不会被细胞直接内化, 因此细胞摄取试验中的荧光强度直接反映负载 **1** 胶束的摄取情况。

负载 **1** 的 mPEG-HZ-PLA 聚合物胶束在肝癌细胞 SMCC-7721 中的经时摄取情况见图 10。摄取结果显示, 随着时间的增加, 细胞内绿色荧光强度逐渐增强, 提示 **1** 的摄取增加; 在 6 h 时大多数绿色荧光集中在肿瘤细胞内, 表明负载 **1** 的 mPEG-HZ-

PLA 聚合物胶束被肝癌细胞 SMCC-7721 所摄取。

3 讨论

利用肿瘤组织或细胞微酸性这一特征, 构建

pH 敏感聚合物胶束载药系统是目前研究的热点。

构建 pH 敏感聚合物胶束载药系统首先要合成 pH 敏感型两亲性嵌段共聚物, PLA 的碳链短, 降解

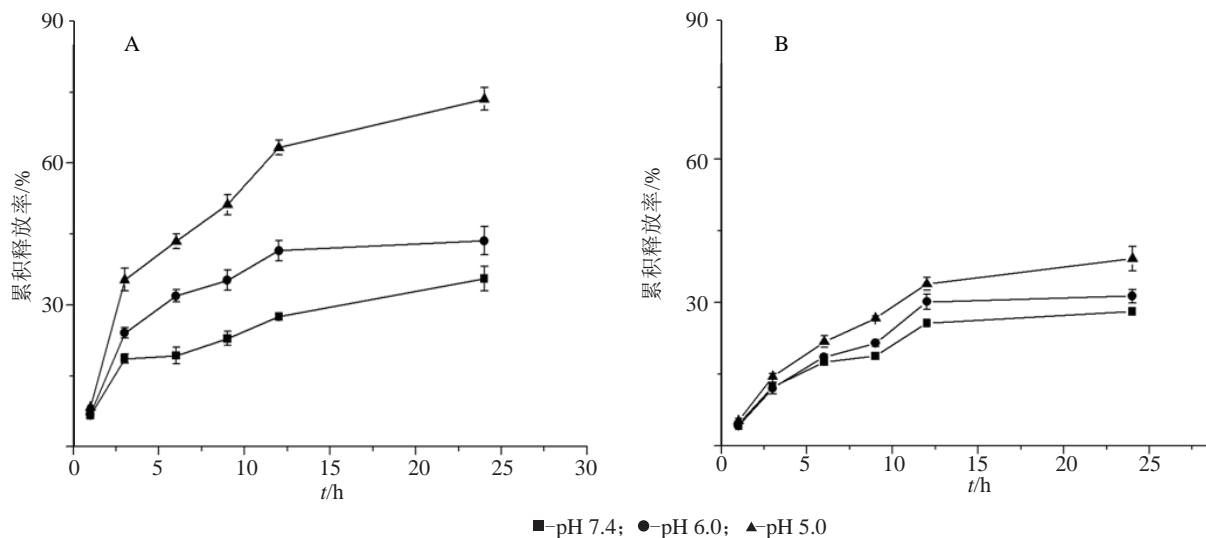
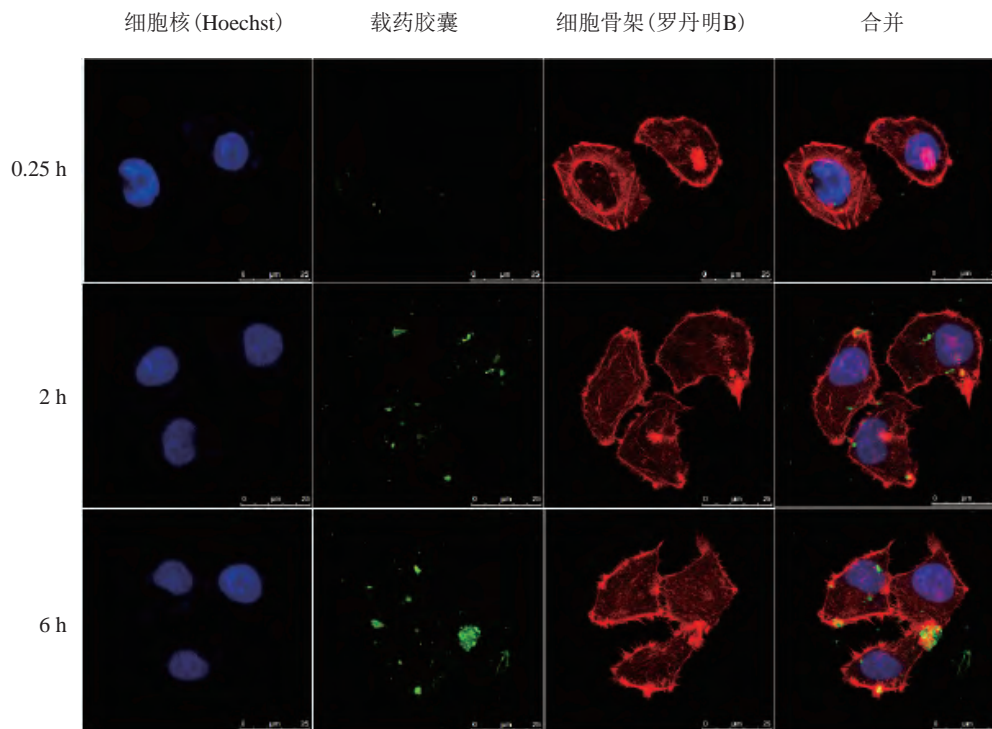


图 8 聚合物胶束 mPEG-HZ-PLA (A) 和 mPEG-PLA (B) 中 1 的释放曲线 ($n=3$)

Fig.8 Drug Release Profiles from 1-loaded mPEG-HZ-PLA Micelles (A) and mPEG-PLA Micelles (B) ($n=3$)



注: 细胞核被 Hoechst33258 负染成蓝色, 1 聚合物胶束呈绿色荧光, 红色罗丹明 B 负染细胞骨架, 图片比例尺为 25 μm

图 9 激光共聚焦显微镜观察负载 1 的 mPEG-HZ-PLA 胶束在 SMCC-7721 细胞中的经时摄取情况

Fig.9 Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) Images of SMCC-7721 Cells Incubated with 1-loaded mPEG-HZ-PLA Micelles

速度快, 广泛应用于疏水药物载体材料。聚乙二醇(PEG)生物相容性好、可降解, 可以作为嵌段共聚物的亲水段, 形成胶束的壳层。因此, 本研究选用PLA和mPEG分别作为嵌段共聚物的疏水嵌段和亲水嵌段, 以pH敏感化学键脲键作为连接基团, 制备含脲键的pH敏感型嵌段共聚物mPEG-HZ-PLA, 以其为载体构建pH敏感聚合物胶束载药系统。

本研究曾尝试在PLA末端连接醛基, 再与末端连有胍基的聚乙二醇单甲醚反应生成脲键, 由于反应位阻大、收率低等原因, 始终难以制成含脲键的嵌段共聚物。因此, 本试验首先合成含脲键的聚乙二醇单甲醚衍生物(mPEG-HZ-OH)作为反应的引发剂, 引发丙交酯开环聚合生成相对分子质量可控的两亲性嵌段共聚物mPEG-HZ-PLA。根据文献报道^[12], 胍基与芳香醛生成脲键的反应常数远大于胍基与脂肪醛生成脲键常数, 并且用芳香醛制备的脲键更加稳定, 故选用对羟基苯甲醛作为合成脲键的反应物, 使所制备的脲键更稳定, 进而提高所制备胶束的稳定性。

对聚合物胶束载药系统体内评价的一个重要内容是研究其体内吸收和转用过程, 常用荧光标记法示踪给药系统的体内转运过程。**1**是一种激光转化率高、性能比较稳定的疏水性荧光探针, 并且可用HPLC法测定, 检测灵敏度高^[13]。因此选用**1**为疏水性模型药物, 制备载**1**聚合物胶束, 为进一步研究胶束体内转运过程提供依据。

体外释放试验中, 在pH 6.0及5.0的PBS释放介质中, mPEG-HZ-PLA胶束的释放速度明显快于mPEG-PLA胶束, 说明药物的释放是由于脲键在酸性环境下断裂所致。

总之, 本试验制备的胶束具有较好的载药能力及生物相容性, 可在酸性条件下实现快速释药。同时, 载**1**胶束的制剂学评价结果较好, 提示该载药系统具有良好的应用前景。

参考文献:

- [1] WORAPHATPHADUNG T, SAJOMSANG W, ROJANARATA T, *et al.* Development of chitosan-based pH-sensitive polymeric micelles containing curcumin for colon-targeted drug delivery [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2017, **19**(3): 991-1000.
- [2] LI H, LI X, ZHANG C, *et al.* Regulated pH-responsive polymeric micelles for doxorubicin delivery to the nucleus of liver cancer cells [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2016, **12**(6): 1258-1269.
- [3] 马敏, 苑莹芝, 张丹, 等. RAFT聚合制备一种新型的pH敏感胶束[J]. 广东化工, 2016, **43**(18): 9-11.
- [4] 马红岩, 乔桂红. pH敏感磁靶向纳米给药系统的构建及其对HepG2肿瘤细胞的作用[J]. 贵州医科大学学报, 2016, **41**(9): 1047-1052.
- [5] NIE M, ZHANG Q, ZHANG G, *et al.* Synthesis of resveratrol loaded mPEG-PLA nanomicelles for the prevention of osteoporosis in ovariectomized rats [J]. *Lat Am J Pharm*, 2017, **36**(10): 2112-2119.
- [6] WU W, WANG W, LI S, *et al.* Physiological pH-triggered morphological transition of amphiphilic block copolymer self-assembly [J]. *J Polym Res*, 2014, **21**(7): 494.
- [7] KE J, DOU H, ZHANG X, *et al.* Determination of pKa values of alendronate sodium in aqueous solution by piecewise linear regression based on acid-base potentiometric titration [J]. *J Pharm Anal*, 2016, **6**(6): 404-409.
- [8] 姚海璐, 王震, 邵晓婷, 等. 载穿心莲内酯mPEG-PLA聚合物胶束制备工艺研究[J]. 河南大学学报: 医学版, 2017, **36**(1): 14-18.
- [9] LU W, ZHANG Y, TAN Y Z, *et al.* Cationic albumin-conjugated pegylated nanoparticles as novel drug carrier for brain delivery [J]. *J Controlled Release*, 2005, **107**(3): 428-448.
- [10] 李雪春, 董晓旭, 张玲玲, 等. 高速离心法测定包载香豆素-6荧光探针聚乳酸-羟基乙酸共聚物纳米粒的包封率[J]. 中国药理学杂志, 2016, **51**(11): 915-919.
- [11] LI Z, LIU K, SUN P, *et al.* Poly(D,L-lactide-co-glycolide)/montmorillonite nanoparticles for improved oral delivery of exemestane [J]. *J Microencapsul*, 2013, **30**(5): 432-440.
- [12] NGUYEN R, HUC I. Optimizing the reversibility of hydrazone formation for dynamic combinatorial chemistry [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2003, **9**(8): 942-943.
- [13] ELEY JG, PUJARI VD, MCLANE J. Poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles containing coumarin-6 for suppository delivery: *in vitro* release profile and *in vivo* tissue distribution [J]. *Drug Deliv*, 2004, **11**(4): 255-261.

Preparation and Evaluation of pH-Sensitive Polymer Micelles Coated with Fluorescent Probe Coumarin-6

ZHAO Shanke, YIN Meilin, ZHENG Yan, SHI Shudan, SUN Yuqi*

(Jinzhou Medical University, Jinzhou 121001)

ABSTRACT: The pH-sensitive methoxypolyethylene glycol-polylactic acid (mPEG-HZ-PLA) block copolymer containing hydrazone bond was synthesized, whose pK_a value was determined by acid-base titration and critical micelle concentration (CMC) was mensurated using pyrene as fluorescence probe. The polymeric micelles loaded with coumarin-6 (C6) were prepared by thin film dispersed-ultrasonic method, and the physicochemical properties of micelles were characterized. At the same time, the C6-loaded micelles with methoxypolyethylene glycol-polylactic acid (mPEG-PLA) without hydrazone bond as carriers were prepared. The release profiles of C6 from two kinds of micelles in various pH media were compared to confirm the pH-sensitivity of the mPEG-HZ-PLA micelles. Finally, the cellular uptake of C6-loaded mPEG-HZ-PLA micelles in tumor cells SMCC-7721 was investigated. The results showed that the pK_a value of mPEG-HZ-PLA was 6.25 and the CMC value was 0.78×10^{-3} g/L. The two kinds of drug-loaded micelles were spherical and evenly distributed, with the average particle size of about 100 nm and the encapsulation efficiency of more than 85%. The *in vitro* release behaviors of drug-loaded micelles were significantly influenced by pH value of release medium. The release rate of the mPEG-HZ-PLA micelles increased in pH 5.0 medium, and the cumulative amount reached 73.6% within 24 h, indicating the better pH-sensitivity of mPEG-HZ-PLA polymer. The cellular uptake of mPEG-HZ-PLA micelles increased in a time dependent manner, which suggested that the micelles had a good application prospect as a targeted delivery system for antineoplastics.

Key Words: pH-sensitivity; hydrazone bond; polymer micelle; coumarin-6; cellular uptake

