

Gemini 表面活性剂对类脂囊泡理化性质及 pH 敏感性的影响^{*}

王慧云

(济宁医学院药学院, 山东 日照 276826)

摘要 目的 为开发新型药物传递系统, 本文考察了非离子型 Gemini 表面活性剂对 pH 敏感类脂囊泡理化性质及 pH 敏感度的影响。**方法** 以 Tween 20、胆固醇、胆固醇半琥珀酸酯(CHEMS)为囊材, 用薄膜水化-超声法制备 pH 敏感类脂囊泡, 通过粒度、电位、包封率、囊泡于不同 pH 下的释放速率以及在牛血清中培育后囊泡荧光强度的变化等探讨 CHEMS、Gemini 对囊泡理化性质及 pH 敏感性的影响。**结果** 含有 Gemini 表面活性剂的 pH 敏感类脂囊泡, 体系分布均匀, 包封率高, 在酸性环境中可快速释药, 且 Gemini 表面活性剂对 pH 敏感类脂囊泡的 pH 敏感性没有明显影响, 在牛血清中 pH 敏感 Gemini 类脂囊泡仍然可保持其较好的 pH 敏感性。**结论** pH 敏感双子表面活性剂囊泡, 可用于向某些病理组织靶向输送药物, 有望开发为一种理想的新型药物传递系统。

关键词 类脂囊泡; pH 敏感性; 双子表面活性剂; CHEMS

中图分类号: TQ423 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-9760(2013)02-009-05

Effects of gemini surfactant on the physical-chemical properties and pH sensitivity of niosome

WANG Hui-yun

(School of Pharmaceutical Sciences, Jining Medical University, Rizhao 276826, China)

Abstract: Objective In order to explore the new DDS, the effects of gemini surfactant on the physical-chemical properties and pH sensitivity of pH sensitive niosome were investigated. **Methods** The pH sensitive niosome was prepared by thin film hydration-ultrasonic method, taking Gemini surfactant, Tween 20, cholesterol and CHEMS as wall material. And the influence of CHEMS and Gemini surfactant on the physical-chemical properties of the niosome were studied by using DLS to measure the variation of vesicle size, PDI, zeta potential and encapsulation efficiency with the increasing concentration of the above two substances. The release rate in different pH buffer solution of the niosome and the fluorescent intensity of the niosome in different buffer solution was also determined after being incubated in the bovine serum for 2h to investigate the pH sensitivity of the niosome. **Results** The obtained pH sensitive Gemini niosome was almost a monodisperse vesicular system with high encapsulation efficiency high pH sensitivity and the quick release of the enveloped drug in acid environment, moreover the pH sensitive Gemini niosome can hold its pH sensitivity in the buffer solution containing the bovine serum. **Conclusion** The prepared pH sensitive niosome can be used to transport of drugs to the target site, and might be explored to an ideal drug delivery system.

Key words: Niosome; pH sensitivity; Gemini surfactant; CHEMS

由于人体病理组织如炎症或感染区域, 某些肿瘤组织或局部缺血时会出现异常酸化现象, 从而导致了其 pH 值较正常组织的 pH 偏低^[1-4]。基于此生理特点 pH 敏感药物传递系统应运而生, 它可以

通过环境 pH 值的变化, 实现药物的控制释放, 或者根据病变部位与机体正常生理状态 pH 值差别而实现靶向给药^[5], 减少药物的不良反应^[6-7], 其研究和应用近年来受到了国内外的广泛关注^[8-9]。其中 pH 敏感类脂囊泡由于其具有较 pH 敏感脂质体更高的稳定性而成为新型药物传递系统领域的

^{*} [基金项目] 山东省科技攻关项目(2009GG10002076)

一大亮点^[10]。pH 敏感类脂囊泡的制备通常由非离子表面活性剂与胆固醇及 pH 敏感物质共同组成^[11-16]。非离子 Gemini 由 2 个亲水基和 2 个疏水基构成的一类新型表面活性剂,具有高表面活性、生物安全性及传统表面活性剂良好的协同作用等特点^[17-18]。然而关于非离子 Gemini 表面活性剂对类脂囊泡理化性质及 pH 敏感性和稳定性的影响较少报道。本文利用 Gemini 表面活性剂与 Tween 20 胆固醇、胆固醇半琥珀酸酯为囊材制备了 pH 敏感类脂囊泡,考察了 Gemini 表面活性剂对囊泡稳定性及 pH 敏感性的影响,旨在开发新型 pH 敏感药物传递系统及拓宽 Gemini 表面活性剂的应用领域。

1 实验部分

1.1 仪器与药品

1.1.1 仪器 JY92-II 超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司);2X-2 型旋片式真空泵(南京市真空泵厂);8010 型搅拌式超滤杯(MILLIPORE COMPANY);RE-52AA 涡旋混合器(上海亚荣生化仪器厂);旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);循环水真空泵(郑州市长城科工贸有限公司);Zetasizer Nano ZS90(英国, Malvern);F-4600 荧光分光光度计(Hitachi High-Technologies Corporation Tokyo Japa);LC-10AT 高效液相色谱仪(日本岛津株式会社);N-2000 双通道色谱工作站(浙江大学智能信息工程研究所有限公司);ZRS-8G 智能溶出试验仪(天津大学无线电厂)。

1.1.2 药品 吐温 20(上海山浦化工有限公司);2,4,7,9-tetramethyl-5-decyne-4,7-diol ethoxylate (Gemini 表面活性剂)(Sigma-Aldrich);胆固醇半琥珀酸酯(CHEMS)(Sigma);胆固醇(CHOL)(AR,上海蓝季科技发展有限公司);8-羟基-1,3,6-萘三磺酸三钠(HPTS)(sigma);胎牛血清(上海劲马生物科技有限公司);三氯甲烷(AR,江苏南京中山集团公司化工厂);甲醇(AR,江苏南京中山集团公司化工厂);醋酸缓冲溶液(pH 5.4,北京百汇生物科技有限责任公司);磷酸盐缓冲溶液(pH 7.4, LR,北京索宝生物科技有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 pH 敏感类脂囊泡的制备与纯化 采用薄膜水化—超声法制备 pH 敏感类脂囊泡,取适量的表面活性剂 Tween20、Gemini 与胆固醇以及 pH 敏感物质胆固醇半琥珀酸酯按照一定的配比

溶于氯仿和甲醇的混合液中,使其溶解,利用旋转蒸发器于适当温度下旋转蒸发成膜,然后加入含有荧光探针 HPTS 的缓冲溶液水化,将得到的混悬液于常温水浴中超声处理 5 min(超声功率 400 W,间隔 3 s,工作 3 s),即得到 pH 敏感型 HPTS 囊泡混悬液。囊泡的纯化:应用美国 MILLIPORE 公司的搅拌式超滤杯,加入囊泡混悬液后,向容器内通入氮气提高超滤压力,同时开启磁力搅拌,游离药物和溶剂分子被挤压排出超滤膜外。

1.2.2 囊泡粒度和 zeta 电位的测定 利用动态光散射(DLS)测定囊泡大小及电位:将囊泡混悬液超声处理后,用缓冲溶液稀释,再经微孔滤膜过滤后,放入 Zetasizer Nano ZS 90 纳米粒度 zeta 电位分析仪样品池中,于 25℃,散射角为 90.0°条件下测定囊泡大小及分散指数。将样品放入 U 型样品池中测其 zeta 电位。

1.2.3 囊泡包封率的测定 将载药囊泡用磷酸盐缓冲液水化,超声混匀,立即倒入超滤杯进行超滤,取出滤液,用 HPLC 进行测量,此浓度为 C 剩余,即未包入囊泡的游离药物,求出样品中未包入囊泡的药物的质量 D 剩余,再求出药品中投入药物总量 D 总,代入下式即可求出包封率。

$$E\% = \frac{D - D_{\text{剩余}}}{D} \times 100\%$$

高效液相参数:色谱柱为 C18 色谱柱(250mm × 4.6mm, 5μm)。流动相为甲醇和磷酸盐缓冲液,二者体积比为 50 : 50,超声 0.5h 脱气。紫外检测波长 246 nm,流速 1.0 ml / min。进样量 20μl,柱温为室温。

1.2.4 囊泡形态的测定 取囊泡混悬液少许滴于载玻片上,加盖玻片,加 1 滴香柏油,于光学显微镜下观察,接数码相机拍照。囊泡在显微镜下的形态如图 1 所示。



图 1 囊泡的光学显微镜照片(×4000)

由图 1 可见,所制得的类脂囊泡为球形,具有明显的双层膜结构。

1.2.5 类脂囊泡体外 pH 敏感性的考察 载药囊泡在不同 pH 环境中释放速率:将超滤后的囊泡放入透析袋中,然后放入装有 250 ml pH7.4 或 pH5.4 的缓冲溶液的智能溶出仪烧杯中,透析袋置于搅拌浆的下端,设定温度为 37℃,转速为 50 r/min,模拟体内环境进行药物缓释性实验。于 1~8 h 每小时取样 1 次,吸取释放液 5 ml,同时补充 5 ml 缓冲溶液。释放液用高效液相色谱法检测峰面积,从而求得 HPTS 的累积释放度。

血清对类脂囊泡稳定性和 pH 敏感性的影响:将适量 pH 敏感类脂囊泡混悬液加入含有 50% 胎牛血清的缓冲溶液中,培育 2h 后用 pH=7.4 的 PBS 缓冲溶液和 pH=5.4 的醋酸缓冲溶液稀释 100 倍,然后利用 F-4600 荧光分光光度计测定其荧光强度,温度 25℃、发射波长为 510nm,用 2.5nm 的狭缝宽度,在 300~600nm 范围内以 10nm/min 的速度扫描,扫面出最大激发波长后,再固定激发波长。通过测定不同 pH 下囊泡的荧光强度及包载物质的累积释放量来考察囊泡的 pH 敏感性。

1.3 各因素对类脂囊泡的影响

1.3.1 CHEMS 对类脂囊泡理化性质及包封率的影响 文献^[19]报道,在非离子表面活性剂囊泡的制备中加入 CHEMS 可改变膜的流动性,该功能与加入胆固醇相似,因此在实验中保持胆固醇和 CHEMS 的总量不变,但改变胆固醇和 CHEMS 的比例,考察不同 pH 下 CHEMS 对囊泡理化性质及包封率的影响。Tween 20 : Gemini : (CHOL+CHEMS)为 0.5 : 0.5 : 1。

1.3.2 Gemini 表面活性剂对类脂囊泡理化性质及包封率的影响 固定 Tween 20、胆固醇、CHEMS 的量(分别为 100nmol、50nmol、50nmol),考察不同 Gemini 表面活性剂的量分别(0nmol、20nmol、40nmol、60nmol、80nmol、100nmol、150nmol)对囊泡理化性质及包封率的影响。

1.3.3 Gemini 表面活性剂对类脂囊泡 pH 敏感性的影响 筛选出一定配比的囊泡体系,分别考察不同 pH 下含有及不含 Gemini 表面活性剂的囊泡体系所包载物质的释放行为及粒度变化,并进一步考察胎牛血清蛋白对该类囊泡体系稳定性及 pH 敏感性的影响。

2 结果与讨论

2.1 CHEMS 对类脂囊泡理化性质及包封率的影响

CHEMS 对类脂囊泡粒度、分布指数、电位及包封率的影响,结果见表 1。

表 1 不同 pH 条件下 CHEMS 对囊泡粒度、zeta 电位、PDI 的影响

CHEMS 量 nmol	粒径 (nm) pH 7.4	PDI pH 7.4	粒径 (nm) pH 5.4	PDI pH 5.4	Zeta 电位 pH7.4(mV)	Zeta 电位 pH5.4(mV)
0	280±5	0.15	296±2	0.27	-35.6±2.3	-30.7±1.5
20	230±7	0.07	290±5	0.28	-45.3±1.5	-20.4±0.9
40	215±6	0.17	320±6	0.31	-50.8±3.2	-21.3±0.8
80	285±5	0.14	460±4	0.35	-60.3±2.8	-18.5±0.5
100	295±4	0.08	534±3	0.41	-61.5±1.9	-19.8±0.2

注:表 1 中数据为取 3 次测试平均值

由表 1 可见,修饰有 CHEMS 的囊泡粒度大小及表面电荷明显收到 pH 的影响,但在相同 pH 条件下,随 CHEMS 量的增加粒度变化并不显著,但电位明显随 CHEMS 的增加而增加。相同 CHEMS 含量条件下,囊泡的粒径随 pH 的降低而增加,电位随 pH 降低显著减小,PDI 也随 pH 的降低而增加,说明加入 CHEMS 后囊泡在较低 pH 条件下稳定性降低。这是由于 CHEMS 是一种 pH 敏感分子,当处于酸性环境中时,由于 CHEMS 的极性头基发生质子化或水化,从而降低了 zeta 电位及脂质膜的稳定性,膜失稳后可能导致两亲性分子的重组,电位的降低将导致囊泡的聚集,从而使得其粒度及分布系数有较大变化。

2.2 Gemini 表面活性剂对类脂囊泡理化性质及包封率的影响

Gemini 表面活性剂对类脂囊泡理化性质及包封率的影响结果见表 2。

表 2 Gemini 表面活性剂对 pH 敏感类脂囊泡粒度、PDI、电位及包封率的影响

Gemini 量 nmol	粒径(nm) pH 7.4	PDI pH 7.4	Zeta 电位 pH7.4(mV)	包封率 %
0	278±4	0.326	-62.5±5	39.8
20	280±5	0.134	-59.8±3	43.2
40	275±3	0.138	-57.6±4	49.4
60	295±2	0.025	-54.3±5	65.8
80	300±4	0.075	-56.5±6	63.5
100	285±6	0.132	-57.6±2	62.8
150	315±7	0.215	-54.8±7	60.9

由表 2 可见,随 Gemini 表面活性剂用量的增加,体系粒度值略有增加,zeta 电位并没有发生明显变化,但 PDI 值变化较明显,随 Gemini 表面活性剂用量的增加 PDI 总体变化趋势是先降低后增加,体系的包封率也随着 Gemini 表面活性剂用量的增加而增加,但增加到一定值后基本不再发生明显变化,甚至略有降低。

出现这些现象的原因可能是,这可能是由于非离子 Gemini 表面活性剂具 2 个亲水基和 2 个疏水基,有较强的表面活性,分散能力较传统表面活性剂强,且连接基团插入囊泡双层膜中进一步增加了膜的稳定性,从而增加了其包封率及粒度分布的均匀性。当浓度过高时,由于 Gemini 表面活性剂的强分散能力,使其与 Tween 20 及胆固醇/胆固醇半琥珀酸酯之间的协同成膜能力降低,包封率随 Gemini 表面活性剂浓度的增加反而降低。

2.3 Gemini 表面活性剂对类脂囊泡 pH 敏感性的影响

选择处方为 Tween20 50nmol、胆固醇 50nmol、CHEMS 50nmol、Gemini 50nmol 囊泡体系,分别将其放入 pH7.4 的磷酸盐缓冲溶液及 pH5.4 的醋酸缓冲溶液中,测定 HPTS 在不同 pH 条件下的累积释放曲线。结果见图 2。

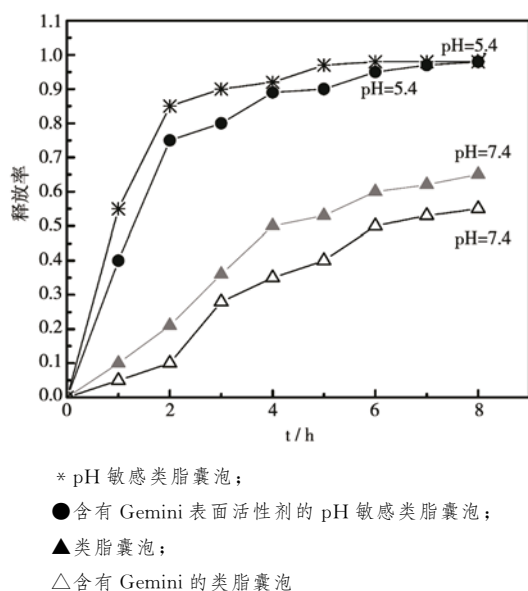


图 2 类脂囊泡体系在不同 pH 条件下的释药行为

由图 2 可见:2 种 pH 敏感类脂囊泡在较低 pH 条件下药物快速释放,而不含 CHEMS 的类脂囊泡,HPTS 释放较慢,对药物具有一定缓释作用。含有 Gemini 表面活性剂的类脂囊泡其释放速率在 2 种 pH 条件下均较不含 Gemini 体系略低,可能

是由于在实验条件下,Gemini 表面活性剂与处方中其他成分间产生协同效应,从而使得类脂囊泡的膜更紧密,从而导致了其释放速率减小,但从图中可见,Gemini 表面活性剂的存在对类脂囊泡的 pH 敏感度影响不大。

胎牛血清对含 Gemini 表面活性剂 pH 敏感类脂囊泡稳定性及 pH 敏感度的影响结果见图 3。

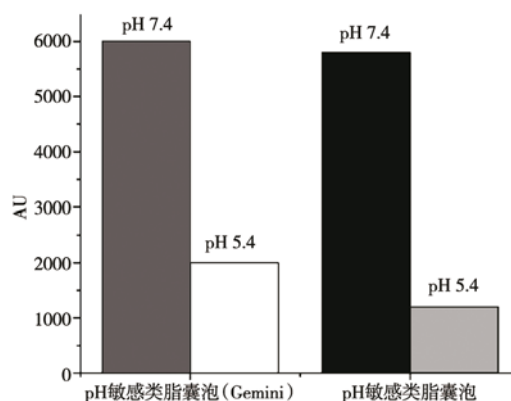


图 3 pH 敏感类脂囊泡在不同 pH 值下的荧光强度与随 pH 值的变化

由图 3 可见,经过胎牛血清培育 2h 后,pH 敏感类脂囊泡在较低 pH 下,荧光强度显著降低,说明体系仍具有较好的 pH 敏感性。相对来说,含有 Gemini 表面活性剂的 pH 敏感类脂囊泡,经过牛血清培育后其 pH 敏感程度相对不含 Gemini 体系来说略有降低,但影响不是太大。可能是由于 Gemini 表面活性剂与处方中其他成分存在较强的协同效应,构成的双层膜的稳定性较强,从而使得荧光物质不宜泄漏,故其在较低 pH 条件下,囊泡的荧光强度高于 pH 敏感非离子表面活性剂囊泡体系。

3 结论

Tween 20 表面活性剂与 2,4,7,9-tetramethyl-5-decyne-4,7-diol ethoxylate (Gemini 表面活性剂)、胆固醇、胆固醇半琥珀酸酯可形成粒度大小合适、分布均匀、包封率高、pH 敏感性强的类脂囊泡,CHEMS 的加入,对囊泡的粒度没有明显影响,但却可显著增加其 zeta 电位和 pH 敏感性。Gemini 可增加 pH 敏感类脂囊泡的均匀度及包封率,对其 pH 敏感性影响不大,因此 pH 敏感 Gemini 类脂囊泡将成为一种非常有潜力的靶向药物传递系统。

参考文献:

- [1] Gaucher G, Dufresne MH, Sant VP, et al. Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery[J]. J Control Release, 2005, 109: 169-188.
- [2] Ganta S, Devalapally H, Shahiwala A, et al. A review of stimuli-responsive nanocarriers for drug and gene delivery [J]. J Control Release, 2008, 126: 187-204.
- [3] Engin K, Leeper DB, Cater JR. Extracellular pH distribution in human tumours[J]. Int J Hyperthermia, 1995, 11: 211-216.
- [4] Stubbs M, McSheehy PM, Griffiths JR, et al. Causes and consequences of tumour acidity and implications for treatment[J]. Mol Med Today, 2000, 6(1): 15-19.
- [5] 闫志强, 刘晓红, 何仲贵. 智能材料在药剂学中的分类与应用[J]. 沈阳药科大学学报, 2008, 25(6): 503-508.
- [6] Bae, Nishiyama N, Fukushima S, et al. Preparation and biological characterization of polymeric micelle drug carriers with intracellular pH-triggered drug release property: tumor permeability, controlled subcellular drug distribution, and enhanced in vivo antitumor efficacy[J]. Bioconjug Chem, 2005, 16: 122-130.
- [7] Oh KT, Kim D, You HH, et al. pH-sensitive properties of surface charge-switched multifunctional polymeric micelle [J]. Int J Pharm, 2009, 376: 134-140.
- [8] Liu R, Li D, He B, et al. Anti-tumor drug delivery of pH-sensitive poly(ethylene glycol)-poly(L-histidine)-poly(L-lactide) nanoparticles[J]. J Control Release, 2011, 152: 49-56.
- [9] Na K, Lee ES, Bae YH. Self-organized nanogels responding to tumor extracellular pH: pH-Dependent drug release and in vitro cytotoxicity against MCF-7 cells [J]. Bioconjugate Chem, 2007, 18(5): 1568-1574.
- [10] Francis MF, Dhara G, Winnik FM, et al. In vitro evaluation of pH-sensitive polymer/niosome complexes[J]. Biomacromolecules 2001, 2: 741-749.
- [11] Hafez IM, Ansell S, Cullis PR. Tunable pH-sensitive liposomes composed of mixtures of cationic and anionic lipids [J]. Biophys J, 2000, 79(3): 1438-1446.
- [12] Simoes S, Moreira JN, Fonseca C, et al. On the formulation of pH-sensitive liposomes with long circulation times[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2004, 56(7): 947-965.
- [13] Banerjee S, Sen K, Pal TK, et al. Poly(styrene-co-maleic acid)-based pH-sensitive liposomes mediate cytosolic delivery of drugs for enhanced cancer chemotherapy [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2012, 436: 786-797.
- [14] Roux E, Francis M, Winnik FM, et al. Polymer based pH-sensitive carriers as a means to improve the cytoplasmic delivery of drugs[J]. Int. J. Pharm, 2002, 242: 25-36.
- [15] Carafa M, Di Marzio L, Marianecchi C, et al. Designing novel pH-sensitive non-phospholipid vesicle: Characterization and cell interaction[J]. Eur J Pharm Sci, 2006, 28(5): 385-393.
- [16] Di Marzio L, Marianecchi C, Petrone M, et al. Novel pH-sensitive non-ionic surfactant vesicles: comparison between Tween 21 and Tween 20[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2011, 82(1): 18-24.
- [17] FitzGerald PA, Carr MW, Davey TW, et al. Preparation and dilute solution properties of model gemini nonionic surfactants[J]. J Colloid Interface Sci, 2004, 275(2): 649-658.
- [18] 丁运生, 查敏, 王僧山. Gem in i 表面活性剂的性质与应用[J]. 高分子材料科学与工程, 2005, 21(6): 24-26.
- [19] Hafez IM, Cullis PR. Cholesteryl hemisuccinate exhibits pH sensitive polymorphic phase behaviour[J]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1463(1): 107-114.

(收稿日期 2013-02-20)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

作者书写参考文献须知

作者论文中引用的参考文献应为亲自阅读过的主要文章;按照文中首次出现的次序编写,在引文句末右上角用方括号注明,如^{[1],[3-6]}。论著的引用文献择其主要者,一般不超过 10 篇;综述不超过 25 篇。应引用公开发行的新的研究著作,勿引译文、文摘、转载、内部资料等。尽量不引用教科书。

引用参考文献的题录及外语拼写和著录符号容易出现错误,请按下列顺序及格式仔细核对,如有错误,将退回作者修正。格式如下:

1. 期刊文章

[序号] 作者姓名(3 位作者姓名,之间用逗号隔开;3 位作者以上者,只写前 3 位作者,后加“等”或“et al”), 题目[J]. 刊名(外文刊名缩写按 Index Medicus 格式). 年,卷(期):起页-止页。

2. 专著

[序号] 作者姓名. 书名[M]. 版次(第 1 版略). 出版地:出版社,出版年:起页-止页。

3. 专著中析出文献

[序号] 作者姓名. 题目[M]. 主编姓名. 书名. 版次. 出版地:出版社,出版年:起页-止页。

本刊编辑部