

主动载药法制备三氧化二砷脂质体

王晓瑜^{1,2}, 马满玲^{2*}

1. 武警后勤学院附属医院 药剂科, 天津 300061

2. 哈尔滨医科大学附属第一医院 药学部, 黑龙江 哈尔滨 150001

摘要: **目的** 采用主动载药法制备三氧化二砷(As_2O_3)脂质体, 并优化处方组成, 考察主动载药法制备 As_2O_3 脂质体的可行性。**方法** 采用正交设计法筛选处方, 主动载药法制备 As_2O_3 脂质体; 用葡聚糖凝胶 G-50 柱分离脂质体和游离药物, 用原子荧光分光光度法测定包封率; 用电镜观察脂质体的外观形态, 并用激光粒径分析仪测定脂质体的粒径和 Zeta 电位; 并进一步考察其优势。**结果** 所得脂质体的包封率为 $(72.3 \pm 0.8)\%$; 形态为粒径均匀的球形或类球形, 粒径为 (193 ± 12) nm, Zeta 电位为 (36.1 ± 3.0) mV; 脂质体具有良好的安全性与较好的稳定性。**结论** 优选得到的 As_2O_3 脂质体处方和制备工艺合理, 并且所制备的 As_2O_3 脂质体具有良好的安全性。

关键词: 三氧化二砷; 脂质体; 正交设计; 主动载药法; 包封率

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)05-0648-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.05.010

Preparation of arsenic trioxide liposome by active drug-loading method

WANG Xiao-yu^{1,2}, MA Man-ling²

1. Department of Pharmacy, the Affiliated Hospital, Logistic College of Chinese People's Armed Police, Tianjin 300061, China

2. Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China

Abstract: Objective To prepare arsenic trioxide (As_2O_3) liposome, to optimize the formulation of As_2O_3 liposomes, and to study the feasibility of As_2O_3 liposomes prepared by the active drug-loading. **Methods** Liposomes were prepared by the active drug-loading method. An orthogonal test was utilized to optimize the formulation and preparation of As_2O_3 liposomes. The unencapsulated As_2O_3 and liposomes were separated by Sephadex gel G-50 column, the entrapment efficiency (EE) was detected by atomic fluorescence spectrophotometry. The morphological examination of As_2O_3 liposomes was performed using transmission electron microscopy. The particle size and Zeta potential of the liposomes were measured. The advantage of As_2O_3 liposomes made by active drug-loading method was investigated. **Results** The EE of the liposomes was $(72.3 \pm 0.8)\%$, the morphology of liposomes was spherical or ellipsoidal shape with uniform particle size, the mean particle size was (193 ± 12) nm, and Zeta potential was (36.1 ± 3.0) mV. Liposomes have good safety and better stability. **Conclusion** The selected formulation and preparation technique of As_2O_3 liposomes could be rational and stable, and the prepared As_2O_3 liposomes have good safety.

Key words: arsenic trioxide; liposome; orthogonal design; active drug-loading method; entrapment efficiency

三氧化二砷(As_2O_3)为我国传统中药, 作为细胞凋亡诱导剂, As_2O_3 治疗急性早幼粒细胞白血病及其他实体瘤具有良好的治疗效果, 为临床常用的抗癌药物之一^[1-2]。但由于毒性大, 限制了其在临床上的应用^[3]。马满玲等^[4]采用薄膜分散法成功将 As_2O_3 制备成脂质体。通过查阅文献发现, 主动载药法更易制出包封率良好的脂质体^[5-7], 因此本实验

采用主动载药法制备 As_2O_3 脂质体, 以期得到更好的包封率。

1 仪器与材料

R—215Advance 型旋转蒸发器(瑞士布琪有限公司), KQ—100E 型超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司), AFS—9800 型原子荧光分光光度计(北京科创海光仪器有限公司), DB—3A 型不锈钢

收稿日期: 2013-10-15

基金项目: 黑龙江省科学技术计划项目(GB05C401-04)

作者简介: 王晓瑜, 女, 硕士研究生, 药师。Tel: (022)60578905 E-mail: wxy19841223@126.com

*通信作者 马满玲, 女, 硕士, 主任药师。Tel: (0451)53642755 E-mail: mamananling@126.com

电热板(金坛市杰瑞尔电器有限公司)。

As₂O₃(批号0606088,质量分数99.9%,湖南衡阳市凤凰化学工厂);磷脂(PC,批号20060316,上海伯奥生物科技有限公司);胆固醇(CH,批号20080512,天津虔诚伟业科技发展有限公司);抗坏血酸(批号2008082006)、硝酸(批号20061116),天津市永大化学试剂开发中心;硼氢化钾(天津市光复精细化工研究所,批号20090807072)。

2 方法与结果

2.1 包封率的测定

精密量取0.1 mL砷(As)的母液(1.000 mg/mL的As标准液,由北京科创海光仪器有限公司提供),配制成100 ng/mL的As标准液,4℃下避光保存,备用。

2.1.1 线性关系的考察 精密量取适量的标准储备液,用5% HCl溶液配制成1、5、10、15、20 ng/mL的对照品溶液。测定1、5、10、15、20 ng/mL的对照品溶液的荧光值,建立标准曲线。以荧光值为纵坐标(Y),As₂O₃质量浓度为横坐标(X)绘制标准曲线,计算得As₂O₃回归方程为 $Y=341.04 X+10.915$, $r=0.9998$,线性范围为1~20 ng/mL。结果表明在此质量浓度范围内,As₂O₃的质量浓度与荧光值呈良好的线性关系。

2.1.2 精密度考察 精密吸取质量浓度为0.8、1.0、1.2 mg/mL的As₂O₃脂质体溶液各1 mL,采用硝酸-高氯酸湿法消解。测定低、中、高3个不同质量浓度样品的荧光值,重复进样5次,计算其RSD分别为1.07%、1.35%、1.05%,表明方法精密度良好。

2.1.3 回收率试验 精密吸取质量浓度为1 mg/mL的As₂O₃溶液,加入空白脂质体溶液混匀后,用硝酸-高氯酸湿法消解法处理后,测定质量浓度。精密称取质量浓度1 mg/mL的As₂O₃脂质体溶液,加入空白溶液混匀,消解后,测定质量浓度。计算回收率为98.7%,RSD为2.67%。

2.1.4 稳定性考察 取同一质量浓度的样品,分别于0、2、4、6、8、12、24 h时测量其荧光值,计算质量浓度,考察样品的稳定性,结果质量浓度为 (0.9865 ± 0.0130) mg/mL,RSD为1.27%。由结果可见,该样品有良好的稳定性。

2.1.5 As₂O₃脂质体与游离药物的分离 采用Sephadex G-50柱色谱法分离As₂O₃脂质体中已包封的药物和介质中游离药物。精密量取As₂O₃脂质体混悬液,置于Sephadex G-50柱(250 mm×20

mm),以蒸馏水为洗脱液洗脱,收集分离后的液体每2毫升取1份样置于样品瓶中。

2.1.6 As₂O₃脂质体包封率和载药量的测定 精密量取As₂O₃脂质体混悬液,按“2.1.5”项方法分离As₂O₃脂质体中已包封的药物和介质中游离药物后,硝酸-高氯酸湿法消解分离后的溶液,测定样品质量浓度,制备洗脱曲线。计算包封率和载药量。

包封率=(药物总量-介质中未包入的药物)/药物总量

载药量=脂质体中药物量/(脂质体中药物+载体总量)

2.2 As₂O₃脂质体的制备方法考察

由于已有报道证明薄膜分散法可制备出较好的As₂O₃脂质体^[4],因此本实验用薄膜分散法作为对比实验。

2.2.1 主动载药法 精密称取质量比为4:1的磷脂、胆固醇(总类脂为500 mg),溶于20 mL氯仿中,于旋转蒸发器内减压旋转蒸发,使有机溶剂挥发,脂质混合物在圆底烧瓶底部形成均匀的薄膜,加入pH值为4.0枸橼酸缓冲溶液15 mL(取枸橼酸21 g加水溶解成1 000 mL,备用;取磷酸二氢钠71.63 g,加水溶解成1 000 mL,取38.55 mL新配液与备用液61.45 mL混合,摇匀即得),充分水化,得到空白脂质体。加入1 mg/mL As₂O₃水溶液15 mL,水浴孵化30 min,得到As₂O₃脂质体溶液^[8]。

2.2.2 薄膜分散法 精密称取质量比为4:1的磷脂、胆固醇(总类脂为500 mg),溶于20 mL氯仿中,水浴旋转蒸发成膜后加入As₂O₃水溶液(1 mg/mL)15 mL充分水化,超声使膜完全脱落后得到脂质体混悬液,再用水浴超声法获得粒径较小的As₂O₃脂质体溶液^[9]。

2.3 主动载药法制备脂质体的处方优化

在单因素考察的预试验中,选取脂质比,药脂比,外水相pH值,内水相pH值,孵化温度,孵化时间等可变量为因素进行考察,每个因素选取5个水平,最终根据外观稳定性结果确定以脂质比(A,质量比)、药脂比(B,质量比)、外水相pH值(C)、孵化温度(D)为正交试验因素,每个因素选取3个不同水平,采用正交表L₉(3⁴)安排试验。评价指标为成品脂质体的包封率。因素水平及试验设计与结果见表1。按正交设计表中的制备条件制备As₂O₃脂质体,制备方法见“2.2.1”项。方差分析结果见表2。

以包封率为指标,由方差分析结果得到最佳工艺参数为A₁B₂C₁D₃,该条件下所得包封率最高。

表1 $L_9(3^4)$ 正交试验设计与结果Table 1 Design and results of $L_9(3^4)$ orthogonal test

试验号	A	B	C	D / °C	包封率 / %
1	4 : 1 (1)	5 : 200 (1)	7.5 (1)	30 (1)	43.25
2	4 : 1 (1)	6 : 200 (2)	7.0 (2)	40 (2)	56.98
3	4 : 1 (1)	7 : 200 (3)	6.5 (3)	50 (3)	32.89
4	3 : 1 (2)	5 : 200 (1)	7.0 (2)	50 (3)	42.35
5	3 : 1 (2)	6 : 200 (2)	6.5 (3)	30 (1)	37.78
6	3 : 1 (2)	7 : 200 (3)	7.5 (1)	40 (2)	51.24
7	2 : 1 (3)	5 : 200 (1)	6.5 (3)	40 (2)	25.32
8	2 : 1 (3)	6 : 200 (2)	7.5 (1)	50 (3)	63.12
9	2 : 1 (3)	7 : 200 (3)	7.0 (2)	30 (1)	41.07
K_1	133.12	110.92	157.61	122.10	
K_2	131.37	157.88	140.40	133.54	
K_3	129.51	125.20	95.99	138.36	
R	3.61	46.96	61.62	16.26	

表2 方差分析

Table 2 Analysis of variance

方差来源	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
B	386.349	2	177.795	$P < 0.01$
C	673.940	2	310.143	$P < 0.01$
D	46.499	2	21.399	$P < 0.05$
A (误差)	2.173	2		

$$F_{0.05}(2, 2) = 19.00 \quad F_{0.01}(2, 2) = 99.00$$

2.4 制备工艺验证

按照优化处方 $A_1B_2C_1D_3$ 制备 5 批脂质体样品, 观察其外观、粒径和包封率等。

2.4.1 外观 将制备的 As_2O_3 脂质体稀释 10 倍后, 40 000 倍电镜下观察结果见图 1。由图 1 可见, 脂质体表面光滑圆整, 均匀度良好。

2.4.2 粒径与 Zeta 电位 用激光粒径分析仪测定脂

质体的平均粒径和 Zeta 电位。测得最优处方中脂质体的粒径 (193 ± 12) nm。制备的脂质体表面带正电, Zeta 电位为 (36.1 ± 3.0) mV。

2.4.3 包封率与载药量 采用原子荧光分光光度法测定包封率, 测得样品的包封率为 (72.3 ± 0.8) % ($n=5$), 薄膜分散法制备的 As_2O_3 脂质体的包封率为 (56.6 ± 1.8) % ($n=5$)。由结果可见主动载药法制备的 As_2O_3 脂质体在包封率上要优于薄膜分散法制备的 As_2O_3 脂质。

主动载药法制备的 As_2O_3 脂质体载药量为 (2.11 ± 0.02) %, 载药量偏低是由于药物本身的治疗浓度偏低, 在 As_2O_3 脂质体对鼠脑胶质瘤的影响实验 (见“2.4.5”项) 中证实, 载药量偏低并不影响其对肿瘤细胞的诱导凋亡作用。

2.4.4 稳定性考察 将主动载药法和薄膜分散法制备的 As_2O_3 脂质体, 置于 4 °C 温度下 1 个月, 于 0、3、5、10 d, 1 个月时取样, 采用“2.1”项方法测定包封率。结果主动载药法制备样品的包封率分别为 72.3%、70.7%、69.2%、67.8%、63.3%, 薄膜分散法制备样品的包封率分别为 56.6%、46.8%、41.3%、35.8%、19.3%。由结果可见, 由主动载药法制备的 As_2O_3 脂质体虽然还存在一定的泄露现象, 但在稳定性上已明显优于薄膜分散法所制备的 As_2O_3 脂质体。

2.4.5 安全性评价 张旭等^[10]在研究 As_2O_3 脂质体对鼠脑胶质瘤的影响实验中, 分别将 As_2O_3 脂质体与 As_2O_3 水溶液 (目前临床上应用的亚砷酸注射液) 静脉注射于载有脑胶质瘤的大鼠体内, 观察其对脑胶质瘤的诱导凋亡作用, 结果显示 As_2O_3 脂质体可较单纯的 As_2O_3 水溶液具有更明显地诱导鼠脑胶质瘤细胞凋亡, 延长载瘤鼠的生存期的作用。证实了 As_2O_3 脂质体的安全有效。

3 讨论

主动载药法是制备包裹了特定的内相缓冲液的空白脂质体, 再通过形成脂质体膜内、外水相的梯度差异, 使脂质体外水相的药物自发地向脂质体内部聚集。通常用脂质体包封酸性缓冲盐, 然后用碱把外水相调成中性, 建立脂质体内外的梯度。而在脂质体内水相中药物被质子化转为离子形式, 不能再通过脂质体双层回到外水相, 因而被包封在脂质体中。主动载药法广义上就是指梯度法。细分为 pH 梯度法、硫酸铵梯度法、醋酸钙梯度法等^[10]。本实验选用的为 pH 梯度法, 并以脂质比、药脂比、外

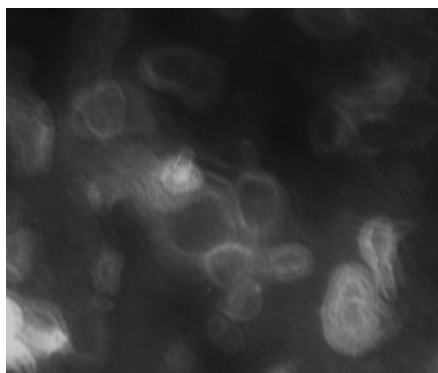


图1 电镜结果

Fig. 1 Results of electromicroscopy

水相 pH、孵化温度为因素进行优化试验,由结果可见各因素的重要程度依次为 $C > B > D > A$,最佳的处方工艺组合为 $A_1B_2C_1D_3$,即磷脂与胆固醇的质量比为 4:1,药脂比为 6:200,外水相 pH 值 7.5,孵化温度为 50 ℃。

在脂质体主动载药的过程中,建立和控制脂质体膜内外 pH 梯度差是一个关键步骤。亚砷酸是以酸性为主,具有微弱两性的氢氧化物,当 pH 值较低时,发生碱性电离转化为离子型。pH 梯度法是利用药物弱酸、弱碱能够以电中性的形式跨过脂质双层,但其电离形式却很少能跨过脂质双层的原理来实现。根据 Henderson-Hasselbalc 理论,每个 pH 单位的变化,会产生分子型与离子型药物的物质的量浓度 10 倍之差。通过调节脂质体内外水相的 pH,形成一定的 pH 梯度差,使内水相药物主要以离子形式存在,而外水相药物主要以分子形式存在,这样,药物就能顺着 pH 梯度,以分子形式跨越磷脂膜而以离子形式被包封在内水相中,跨膜的 pH 梯度是药物主动装载的驱动力。文献报道 pH 梯度的选择也对包封率及稳定性有一定的影响^[11],pH 值差为 3~6 时包封率及稳定性较好,与本实验结果相符。与此同时在相变温度下水浴孵化,脂质体由“胶晶”态变为“液晶”态,膜的通透性大大增加,也加快了药物分子的内转。由此可见,主动载药法是利用亚砷酸的两性,通过形成内外水相的 pH 梯度,使药物获得驱动力,在相变温度下孵化使更多的药物被包封于脂质体内。

正交试验设计在药剂学上得到广泛应用,其减少了实验次数,实验结果经过处理可得出各个因素对实验结果的影响程度和理论的最佳实验条件,是处理多因素多水平实验设计的首选方法。本实验选取的最佳处方在工艺验证实验中得到较好的结果。

As_2O_3 是剧毒物质,目前临床上用于治疗急性早幼粒细胞白血病的亚砷酸注射液的主要成分为 1 mg/mL 的 As_2O_3 ,与本实验选用的药物质量浓度相同。本实验采用主动载药法将 As_2O_3 制备成脂质体,其可作为制剂的中间体,制成 As_2O_3 脂质体注射液

等制剂,在主动载药法优势考察的实验中,结果显示应用主动载药法制备的 As_2O_3 脂质体在包封率和稳定性上优于传统的薄膜分散法所制备的 As_2O_3 脂质体,在 As_2O_3 脂质体对鼠脑胶质瘤的影响实验中证实其的安全有效性。另外,薄膜分散法多用于实验室内制备小剂量的脂质体,其很难生产放大,主动载药法的成功制备为将来 As_2O_3 脂质体的大剂量生产提供了可能。

参考文献

- [1] 王长安. 三氧化二砷抗肿瘤机制研究进展 [J]. 肿瘤基础与临床, 2011, 24(5): 458-460.
- [2] 石瑞平, 郭树霞. 三氧化二砷治疗急性早幼粒性白血病患者骨髓和血液中砷分布的临床检测 [J]. 现代药物与临床, 2012, 27(3): 242-244.
- [3] 甘 戈, 孙 骏, 王佳域, 等. 27 例三氧化二砷严重不良反应病例报告分析 [J]. 药物警戒, 2008, 5(5): 286-290.
- [4] 马满玲, 陈 岩. 三氧化二砷脂质体的制备及其包封率的测定 [J]. 中国药师, 2008, 11(9): 1019-1021.
- [5] 郑佳映. 脂质体主动载药及其研究进展 [J]. 国外医学: 药学分册, 2005, 32(4): 271-274.
- [6] 郑杭生, 黄绳武, 李范珠, 等. 盐酸青藤碱脂质体的制备工艺研究 [J]. 中草药, 2013, 44(4): 408-413.
- [7] 谭静净, 程 岚, 李学涛. 中心组合设计-效应面法优化长春碱亲水基修饰阳离子脂质体的处方 [J]. 中草药, 2012, 43(9): 1742-1745.
- [8] Qiu L Y, Jing N, Jin Y. Preparation and in vitro evaluation of liposomal chloroquine diphosphate loaded by a transmembrane pH-gradient method [J]. *Int J Pharm*, 2008, 361(1/2): 56-63.
- [9] 张跃珍, 林 军. 天然药物脂质体制备研究进展 [J]. 中国药房, 2007, 18(21): 1671-1673.
- [10] 张 旭, 赵世光, 任 颖. 三氧化二砷脂质体的制备及其对鼠脑胶质瘤的影响 [J]. 中国微侵袭神经外科杂志, 2007, 12(6): 269-272.
- [11] 邓英杰. 脂质体技术 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007.
- [12] 王 祥, 王 淼, 范明辉, 等. pH 梯度法制备谷胱甘肽脂质体 [J]. 食品工业科技, 2008, 29(3): 237-239.