文章编号:1000-5404(2006)08-0807-03

论著

# 全反式维甲酸脂质体制备及稳定性研究

张敬如,黄复生,王 昆 (第三军医大学基础医学部病原生物学教研室,重庆 400038)

**提 要:目的** 通过制备不同配方全反式维甲酸脂质体,对处方进行优化。**方法** 采用逆相蒸发法制备全反式维甲酸脂质体,高效液相色谱法检测活性药物含量及包封率,并进行加速试验检测其初步稳定性。**结果** 3组全反式维甲酸脂质体包封率分别为33.98%、42.11%、70.34%,各配方稳定性好,冻干前后及0 ℃、25 ℃、40 ℃放置后活性药物含量无显著改变。**结论** 全反式维甲酸脂质体制备工艺可行,质量控制方法简单、准确。

**关键词:** 全反式维甲酸;脂质体;高效液相色谱法
**中图法分类号:** R943;R944;R977.2 **文献标识码:** A

# Preparation and stability research of all-trans-retinoic acid liposomes

ZHANG Jing-ru, HUANG Fu-sheng, WANG Kun (Department of Pathogenic Biology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract:** Objective To prepare and optimize formulation of ATRA liposomes. Methods ATRA liposomes was prepared by reverse evaporating method and to determine the concentration and the entrapment efficiency of ATRA liposomes by HPLC. Results The entrapment efficiency of the three ATRA liposomes formulations reached 33.98%, 42.11%, 70.34% respectively. The liposome was stable. The ATRA content of three formulations almost showed no change during the observing days. Conclusion The technique of preparing the ATRA liposomes is feasible and the method of quality control is simple and accurate.

**Key words:** all-trans-retinoic acid; liposome; HPLC

全反式维甲酸(all-trans-retinoic acid, ATRA)是一种类维生素A类化学药物,为多烯酸结构,疏水,溶解性差,对湿度、温度尤其是光强度十分敏感,极易因发生异构化而失去疗效[1]。ATRA具有很强的诱导分化肿瘤细胞的作用,是治疗急性早幼粒细胞白血病(APL)、骨髓异常增生(白血病前期)的临床首选药物[2]。目前市售ATRA仅有口服片剂,在体内降解快,血药浓度波动大,生物利用度约为50%,可产生较大不良反应和耐药性[3,4]。我们制备了注射用全反式维甲酸脂质体冻干制剂,以期达到降低血药浓度,提高生物利用度,减少不良反应的目的。

## 1 材料与方法

### 1.1 器材和试剂

Agilent 1100型高效液相色谱仪,UVIS-201型检测器,Alltech C18柱(100A,5 μm,4.6 mm × 250 mm)(美国);Sonicsuibra cell™超声波乳化器(Sonics公司,美国);Leybold真空冷冻干燥机(德国);Zetasizer 3000HS激光粒度仪(英国);Climacell 111人工气候箱(德国);Grant Y14恒温水浴循环系统(英国);90型磁力搅拌器(上海);Sartorius电子天平(德国);Millipore Simiplicy 185纯水仪(法国)。

磷脂(纯度>95%,德国Nattermann公司),胆固醇(美国Sigma公司),ATRA标准品(美国Sigma公司),ATRA原料药(上海第六制药厂),葡聚糖凝胶Sephadex G-50(进口分装,上海化学试剂厂),丁基羟基甲苯(butylated hydroxytoluene, BHT,美国Sigma公司),甲醇(色谱纯,美国),乙酸铵(重庆东方化学试剂厂)。

### 1.2 方法

1.2.1 配方设计 ATRA脂质体以磷脂和胆固醇为膜材,加入缓冲液终体积为100 ml。3组配方脂质总量比例为1:2:3,其余各成分含量相同。

1.2.2 制备方法 将ATRA原料药、磷脂、胆固醇和BHT混匀,再加入适量无水乙醇溶液充分溶解,真空减压,去除有机溶剂,得均匀干膜。加入相应缓冲液,在一定温度下高速搅拌,充分水化,获得脂质体。然后将获得的样品,转入超声波乳化器,

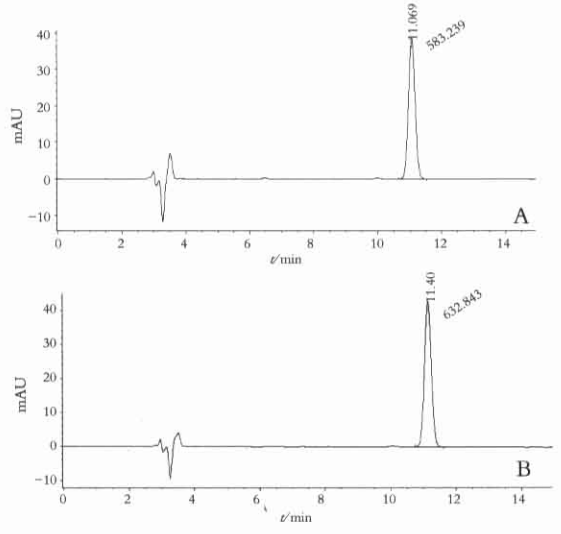
作者简介:张敬如(1972-),女,河北省深泽县人,硕士研究生,实验师,主要从事脂质体方面的研究。电话:(023)68752243
通讯作者:黄复生,电话:(023)68752244
收稿日期:2005-11-20;修回日期:2006-02-24

在一定超声强度下持续超声 5 min，得到粒径均匀的脂质体，分装，真空冷冻干燥。

1.2.3 ATRA 含量测定

1.2.3.1 色谱条件 Alletch 1100 型高效液相色谱仪，UVIS-201 型检测器；色谱柱：C18 柱（250 mm × 4.6 mm）；流速 1.0 ml/min；检测波长 360 nm；柱温：25 ℃；流动相：甲醇-乙酸铵缓冲液（75∶25，V/V）；每次进样量：20 μl。

ATRA 标准品、ATRA 脂质体 HPLC 色谱图见图 1，保留时间在 11.2 min 左右。




A：ATRA 标准品；B：ATRA 脂质体

**图 1 ATRA HPLC 色谱图**

1.2.3.2 标准曲线 精密称取 ATRA 标准品 23 mg 于 100 ml 容量瓶中，加入甲醇溶解并定容至刻度，闭光密闭作为储备液。按不同比例稀释，得系列标准溶液，分别进样 20 μl。以峰面积为纵坐标，相应浓度为横坐标进行线性回归，结果显示 ATRA HPLC 峰面积与其浓度在 1.15 ~ 23 μg/ml 范围内，有良好的线性关系。回归方程为：y = 79.612 287x + 13.881 8，$R^2$ = 0.999 972。

1.2.3.3 精密度试验 取 1.15、2.3、11.5 μg/ml 的 ATRA 标准液，分别连续进样 6 针，测定其 HPLC 峰面积，计算日内精密度，结果显示 RSD 分别为 2.33%、2.13%、1.87%。表明该 HPLC 法精密度良好。

1.2.3.4 回收率试验 取 ATRA 储备液，按照处方量加入各种辅料，以 1.15、2.3、11.5 μg/ml 3 种浓度进行 HPLC 测定，记录色谱峰面积，按回归方程计算药物含量，并按以下公式计算回收率。回收率% = 测量值/加入量 × 100%。结果见表 1。

1.2.3.5 样品含量检测 冻干 ATRA 脂质体置人工气候箱，分别调节温度为 0 ℃、25 ℃和 40 ℃，放置 20 d，在试验期间第 10 天和第 20 天各取样 1 次，HPLC 测定活性药物含量。测定前用流动相 1 ml 充分溶解，按 1.2.4 方法，采用 Sephadex G-50 凝胶柱，过滤分离 ATRA 脂质体及游离 ATRA，HPLC 测定药物含量。

**表 1 回收率实验结果（$n$ = 6）**

| 理论浓度（μg/ml） | 测得浓度（μg/ml） | 回收率（%） | 平均回收率（%） | RSD（%） |
|---|---|---|---|---|
| 1.15 | 1.12 ± 0.04 | 97.39 | | |
| 2.3 | 2.23 ± 0.07 | 97.26 | 99.03 | 2.27 |
| 11.5 | 11.68 ± 0.31 | 102.43 | | |

1.2.4 包封率的测定 取 ATRA 脂质体 100 μl 于 5 ml 褐色容量瓶，补充甲醇至刻度，摇匀，HPLC 测定药物含量，乘以稀释倍数即得到全药浓度。取相应 ATRA 脂质体 1 ml，采用 Sephadex G-50 凝胶柱，以蒸馏水为洗脱液，流速 1 ml/min，过滤分离 ATRA 脂质体及游离 ATRA，收集所有 ATRA 脂质体准确测量其体积，HPLC 测定药物含量。包封率 = C 脂/C 总 × 100%。

1.2.5 脂质体粒径大小测定 室温下，取冻干 ATRA 脂质体加水溶解，10 ml 容量瓶中定容，用激光粒度仪测定其平均粒径，入射角度 90°，设定样品温度为 25 ℃时进行测量，每个样品连续测量 3 次。

1.3 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，进行 $t$ 检验。

## 2 结果

### 2.1 ATRA 含量比较

2.1.1 不同配方的 ATRA 脂质体含量比较 不同配方 ATRA 冻干脂质体分别放在 0 ℃、25 ℃和 40 ℃条件下，0、10、20 d HPLC 检测其活性药物含量。结果见表 2，不同配方活性药物含量随脂质含量的增加而增高，不同条件贮存后含量稳定，与贮存前相比无显著变化（$P > 0.05$）。

**表 2 三种配方 ATRA 冻干脂质体含量比较（$n$ = 5，μg/ml）**

| 配方 | 0 d | 10 d | | | 20 d | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 0 ℃ | 25 ℃ | 40 ℃ | 0 ℃ | 25 ℃ | 40 ℃ |
| 1 | 5.52 ± 0.11 | 5.26 ± 0.28 | 5.51 ± 0.19 | 5.43 ± 0.16 | 5.51 ± 0.07 | 6.02 ± 0.11 | 5.73 ± 0.10 |
| 2 | 7.43 ± 0.23 | 7.64 ± 0.22 | 7.82 ± 0.13 | 7.71 ± 0.30 | 7.76 ± 0.19 | 7.64 ± 0.12 | 8.01 ± 0.22 |
| 3 | 18.22 ± 0.29 | 18.30 ± 0.41 | 18.54 ± 0.15 | 18.56 ± 0.21 | 18.71 ± 0.33 | 18.32 ± 0.28 | 18.12 ± 0.44 |

2.1.2 冻干与未冻干脂质体含量比较 脂质含量不同的 3 种配方 ATRA 脂质体每组均分为 2 份，1 份进行真空冷冻干燥后 HPLC 检测活性药物含量，1 份直接检测，检测结果如表 3 所示。统计学分析两组无显著差异（$P > 0.05$）。

**表 3 不同配方 ATRA 脂质体冻干与未冻干组含量比较（$n$ = 5，μg/ml）**

| 配方 | 冻干组 | 未冻干组 |
|---|---|---|
| 1 | 5.46 ± 0.11 | 5.25 ± 0.13 |
| 2 | 7.37 ± 0.18 | 8.04 ± 0.16 |
| 3 | 18.22 ± 0.29 | 17.84 ± 0.20 |

2.2　包封率

三种不同配方 ATRA 脂质体的包封率分别为 33.98%、42.11%、70.34%，包封率随配方中脂质总量的增加而增高。

2.3　ATRA 脂质体粒径

ATRA 脂质体粒径均匀，粒径为(351.5 ± 178.6) nm。

## 3　讨论

自 20 世纪 60 年代 Rahman 等首先将脂质体作为药物载体应用以来，目前世界上已有多个脂质体制剂得到批准应用，并且取得了良好的临床应用效果。但不同的药物在应用脂质体作为载体时，由于制备方法的差异，磷脂、胆固醇等膜材含量以及和药物的比例不同，粒径大小不等，都会对主药含量和包封率产生很大的影响。本室采用逆相蒸发法制备的脂质体粒径均匀，分布范围窄，药物含量稳定，包封率达 70% 以上，较国内学者李国峰等[5]报道的 65% 和薛玉英等[6]报道的 22.3% 有明显提高，接近国外学者 Patel 等[7]报道的 ATRA 脂质体制剂包封率 79.4%。具有较高的应用价值。ATRA 脂质体的包封率较高，表明脂质双分子层可显著增溶疏水性 ATRA，使 ATRA 通过脉管内给药成为可能，这将是解决 ATRA 口服生物利用度低和耐药性的有效手段之一。同时将 ATRA 包封到脂质体后，可以有效地保护 ATRA 对光照的敏感性[8,9]。

由于 ATRA 极不稳定，所有操作均在暗室中进行，试验中使用棕色容器，且避免高温。本室制备的脂质含量不同 3 种配方 ATRA 脂质体均分为 2 份，1 份真空冷冻干燥后用 HPLC 方法检测活性药物含量，1 份直接检测，结果表明冻干和未冻干脂质体活性药物含量无显著差异，说明冷冻干燥过程对脂质体中活性药物没有明显影响。冻干脂质体加速试验显示活性药物含量稳定，说明该方法切实可行，并为该脂质体的贮藏条件选择及储存时间的预测提供了依据。

脂质体主要成分磷脂不饱和的酰基链双键易发生氧化，40 ℃以上非常明显，一定条件下，脂质体的稳定性与温度呈负相关[10]。文献[11]报道 ATRA 脂质体在高温下易分解，最终致 ATRA 脂质体的药物含量和包封率急剧下降，因此本研究只考察了 0 ℃、25 ℃、40 ℃ 3 种温度下的稳定性。结果表明，3 种条件下活性药物含量稳定。目前，我们只是对 ATRA 冻干脂质体的短期稳定性进行了初步检测，其长期稳定性仍需进一步研究，考察条件也需进一步优化，为 ATRA 脂质体的制备、贮藏条件选择、储存时间的预测和最终商品化提供足够的依据和指导。

**参考文献：**


[1] 唐跃年，胡松浩，孙朝荣，等. 全反式维甲酸的药理学特点[J]. 医药导报，2002，21(6)：381－382.

[2] 中国科学院. 2000 科学发展报告[M]. 北京：科学出版社，2000：134－139.

[3] LEYDEN J，GROVE G，ZERWECK C. Facial tolerability of topical retinoid therapy[J]. J Drugs Dermatol，2004，3(6)：641－651.

[4] 汪　进，曾志雄，黄明辉，等. 全反式维甲酸诱导人急性早幼粒白血病 HL-60 细胞分化的机制[J]. 药学学报，2004，39(1)：22－28.

[5] 李国峰，候连兵，曾　抗. 维甲酸脂质体的制备与临床应用[J]. 中国药学杂志，1998，33(2)：121－122.

[6] 薛玉英，赵　俊，翁幗英，等. 维 A 酸脂质体凝胶剂局部透皮作用及稳定性考察[J]. 中国药科大学学报，1996，27(7)：405－407.

[7] PATEL V B，MISRA A，MARFATIA Y S. Topical liposomal gel of tretinoin for the treatment of acne：research and clinical implications [J]. Pharm Dev Technol，2000，5(4)：455－464.

[8] BRISAERT M，GABRIELS M，MATTHIJS V，*et al*. Liposomes with tretinoin：a physical and chemical evaluation [J]. J Pharm Biomed Anal，2001，26(5-6)：909－917.

[9] 邹玉明，顾　琦，刘　理. 高效液相色谱法测定全反式维甲酸脂质体的含量[J]. 药品检测，2001，10(9)：43.

[10] RAWICZ W，OLBRICH K C，MCINTOSH T，*et al*. Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers [J]. Biophys J，2000，79(1)：328－339.

[11] TANG D，BORCHMAN D. Temperature induced structural changes of beta-crystallin and sphingomyelin binding [J]. Exp Eye Res，1998，67(1)：113－118.


（编辑　薛国文）

## 关于修回稿件附软盘的说明

为缩短学报出版周期，减少编排错误，请作者根据学报编辑部提出的意见对文稿修改后，将修改稿以 Word 格式存入软盘，并请标明软盘中的文件名、作者姓名及稿件编号，连同修改稿一并送交本刊编辑部或 E-mail：aammt@mail.tmmu.com.cn(校外稿件请邮寄)。

本刊编辑部