文章编号:1000-5404(2006)11-1249-03

论著

三氧化二砷 PLGA 纳米粒的制备及工艺优化

张　乐,周世文　　(第三军医大学新桥医院临床药理基地,重庆 400037)

提　要: 目的　载三氧化二砷乳酸羟基乙酸共聚物(polylactic-co-glycolic acid, PLGA)纳米粒的制备及其工艺优化。**方法**　以 PLGA 为载体材料,采用 w/o/w 型乳化溶剂挥发法制备载 As_2O_3 纳米粒,通过均匀设计试验优化处方和制备工艺。**结果**　在优化条件下制备的纳米粒形态圆整、大小均匀,平均粒径为 178.2 nm,平均包封率为 53.19%,平均载药量为 0.64%。**结论**　本纳米粒制备工艺简单,质量可控。

关键词: 三氧化二砷;纳米粒;乳酸羟基乙酸共聚物;均匀设计
中图法分类号: R943; R944.9; R995　　**文献标识码**: A

Optimizing preparation of arsenic trioxide-loaded polylactic-co-glycolic nanoparticles

ZHANG Le, ZHOU Shi-wen (The Base of Clinical Pharmacology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective　To study the preparation of polylactic-co-glycolic acid (PLGA) nanoparticles carrying arsenic trioxide (As_2O_3). **Methods**　Polymer PLGA was used to prepare arsenic trioxide nanoparticles with w/o/w double-emulsion evaporation technique, which was optimized by uniform design test. **Results**　The shape of As_2O_3-loaded PLGA nanoparticle was round, the size was well-distributed, the mean diameter was 178.2 nm, the average encapsulation ratio reached 53.19%, and the average drug loading was 0.64%. **Conclusion**　The technique to prepare nanoparticles is simple and the quality can be easily controlled.

Key words: As_2O_3; nanoparticles; polylactic-co-glycolic acid; uniform design

三氧化二砷(As_2O_3)是中药砒霜的主要成分,自从我国学者将 As_2O_3 用于白血病的治疗达到较高的完全缓解后[1],砷化物又重新引起肿瘤研究者们的关注,也将其适应证扩展到实体瘤,尤其是肝癌的治疗研究[2-4]。目前国内外临床上应用 As_2O_3 治疗肿瘤的剂型主要是注射液,其成分是亚砷酸。静脉给药后由于血液循环可使 As_2O_3 弥散至周围组织,这样不仅使到达肿瘤部位的药物浓度相对较低,而且还会给患者带来严重的不良反应,因此需要将其制成一种高效低毒的给药剂型来更好地满足临床需要。

纳米粒(nanoparticle, NP)是一种毒性小、稳定性好的靶向制剂,经静脉注射入血后能够将包裹的药物浓集于肝脏,并促进药物内化入肿瘤细胞,降低了药物在其他组织中的分布。本试验采用乳酸羟基乙酸共聚物(polylactic-co-glycolic acid, PLGA)为载体材料制备 As_2O_3 纳米粒,以包封率(encapsulation ratio, ER)为指标,通过均匀设计试验优化其制备工艺,以期为制备 As_2O_3 的新剂型提供试验依据。

1　材料与方法

1.1　仪器与试剂

JY92-IID 型超声波细胞粉碎机(宁波新芝科学仪器研究所),低温高速离心机(美国 Beckman 公司),Tec-10 透射电子显微镜(荷兰 Philips 公司),matersize 3000 激光粒度仪(英国 Malvern 公司),原子荧光分光光度计(北京海光仪器公司),微波消解仪(德国耶拿公司)。

As_2O_3(由哈尔滨伊达公司提供),PLGA(50/50,分子量为 20 000,中国科学院成都有机化学研究所),聚乙烯醇 PVA(Sigma 公司),其他试剂为分析纯。

1.2　方法

1.2.1　As_2O_3-PLGA-NP 的制备

1.2.1.1　制备方法　　采用 w/o/w 型乳化溶剂挥发法制备纳米粒[5,6]。适量 PLGA 加至 2 ml 的二氯甲烷中,充分溶解后加

作者简介:张　乐(1980-),女,重庆市人,硕士研究生,主要从事药物靶向制剂方面的研究。电话:(023)68774761
通讯作者:周世文,电话:(023)68755311, E-mail:yljd@tmmu.edu.com
收稿日期:2006-01-10;修回日期:2006-02-24

入一定浓度的 As_2O_3 溶液，超声乳化 1 min，再加入 4 ml PVA 溶液，超声 90 s，将上述复乳转移至 80 ml 0.1% 的 PVA 溶液中，室温条件下搅拌(300 r/min)至二氯甲烷蒸发完全，形成 PLGA 载药纳米粒的胶体溶液。定容后将纳米粒胶体溶液于4 ℃，20 000 r/min 离心 30 min，弃去上清液，沉淀用蒸馏水洗 3 次，除去未包裹的游离药物，即得。

1.2.1.2 均匀设计优化 NP 的制备工艺 根据单因素试验，影响 As_2O_3-PLGA-NP 包封率的主要因素有 As_2O_3/PLGA(A)、PLGA 的浓度(B)、超声强度(C)、外水相/油相体积比(D)、PVA 的浓度(E)。以包封率为检测指标，优选提高 As_2O_3-PLGA-NP 包封率的制备工艺。5 个因素各选 5 个水平，采用拟水平法，将各因素所选水平重复使用，选用 $U_{15}(15^5)$ 均匀设计表及其使用表安排试验[7]，具体见表 1。

表 1 均匀设计 $U_{15}(15^5)$ 试验安排表

编号	因素				
	A	B	C	D	E
1	1	4	7	11	13
2	2	8	14	7	11
3	3	12	6	3	9
4	4	1	13	14	7
5	5	5	5	10	5
6	6	9	12	6	3
7	7	13	4	2	1
8	8	2	11	13	14
9	9	6	3	9	12
10	10	10	10	5	10
11	11	14	2	1	8
12	12	3	9	12	6
13	13	7	1	8	4
14	14	11	8	4	2
15	15	15	15	15	15

A：As_2O_3/PLGA；B：PLGA 的浓度；C：超声强度；D：外水相/油相体积比；E：PVA 的浓度

1.2.2 质量评价方法

1.2.2.1 形态观察 取 As_2O_3-PLGA-NP 胶体溶液滴至专用铜网上，3% 磷钨酸染色，在透射电子显微镜下观察 NP 的表面形态并拍摄照片。

1.2.2.2 粒径分布 取 As_2O_3-PLGA-NP 胶体溶液适量，加水稀释后，用激光粒度仪测定纳米粒的平均粒径及分布。

1.2.2.3 包封率和载药量(DL)的测定 采用氢化物原子荧光法测定砷，试样经微波消解后，在酸性条件下，加硫脲－抗坏血酸进行预还原，再用硼氢化钾将砷还原为 AsH_3，由载气导入石英原子化器进行原子化，在砷高强度空心阴极灯发射光谱的激发下产生原子荧光，利用砷的浓度与原子荧光强度成正比，对砷进行定量分析。取 NP 混悬液适量，于 4 ℃，20 000 r/min 下低温离心 30 min，沉淀用蒸馏水洗 3 次，合并上清液，混匀，分别测定混悬液中 As_2O_3 的量(W_1)和合并液中游离 As_2O_3 的量(W_2)，纳米粒中 As_2O_3 的量 $W = W_1 - W_2$，按下式计算包封率(ER)和载药量(DL)：

$$ER = (W_1 - W_2)/W_1 \times 100\% \quad (1)$$

$$DL = (W_1 - W_2)/W_{PLGA} \times 100\% \quad (2)$$

式中 W_{PLGA} 为加入的 PLGA 的量。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 11.0 统计软件对试验数据进行多元逐步回归分析，对 5 个因素的影响程度进行评估，并得回归方程。

2 结果

2.1 均匀设计试验结果

由于在试验条件下所得产品的粒径均能满足要求，所以仅以包封率作为评价指标，结果见表 2。

SPSS 11.0 统计软件进行多元逐步回归分析，得回归方程为：$ER = 66.994 - 26.815A + 5.408B - 0.28C + 4.702E$。

$F = 36.772$，查表 $F_{0.05}(4,10) = 3.48$，$P < 0.05$，回归方程有意义，且可决系数 $r^2 = 0.936$，回方程的效果较好。

表 2 均匀设计试验结果表

编号	因素					
	A(%)	B(%)	C(w)	D	E(%)	ER(%)
1	0.8	3.5	100	3.5	4.0	56.78
2	0.8	4.0	120	3.0	3.5	51.39
3	0.8	4.5	90	2.0	3.0	59.18
4	1.0	3.0	120	4.0	3.0	37.62
5	1.0	3.5	90	3.5	2.5	45.42
6	1.0	4.0	110	2.5	2.0	36.20
7	1.2	5.0	90	2.0	2.0	48.96
8	1.2	3.0	110	4.0	4.0	41.02
9	1.2	3.5	80	3.0	3.5	43.84
10	1.4	4.5	110	2.5	3.5	38.58
11	1.4	5.0	80	2.0	3.0	46.38
12	1.4	3.0	100	3.5	2.5	28.22
13	1.6	4.0	80	3.0	2.5	38.72
14	1.6	4.5	100	2.5	2.0	30.66
15	1.6	5.0	120	4.0	4.0	35.20

A：As_2O_3/PLGA；B：PLGA 的浓度；C：超声强度；D：外水相/油相体积比；E：PVA 的浓度

影响包封率的主要因素依次为 A > B > C > E，同时由上述回归方程可见，方程中 B、E 的系数为正，表明在均匀设计试验范围内其取值愈大，包封率愈大；A、C 的系数为负，表明其取值愈小愈好，而 D 一项已被消去，表明在 $\alpha = 0.05$ 显著水平下 D 的影响较小，可被忽略，可根据预试验取适当值。

结合试验要求，纳米粒的载药量要适当提高，同时保证包封率和粒径大小适宜，可以确定 As_2O_3-PLGA-NP 的优化条件为：As_2O_3/PLGA 1.2%，PLGA 浓度 5%，超声强度 80W，PVA 浓度 4%。代入回归方程得理论 ER = 58.26%，按优化条件试验，制备 3 批样品，其平均 ER = 53.19%，与预测值相比，相对误差分别为 −8.7%，误差较小，均匀设计所得回归方程有较好预报能力，基本揭示了各因素对结果的影响规律，优化成功。

2.2 按优化条件制备 As_2O_3-PLGA-NP 的质量评价

2.2.1 外观形态考察 经透射电镜照片显示，按优化工艺

制备的 As_2O_3-PLGA-NP 基本呈圆整的球形，大小较均匀。透射电镜照片见图 1。

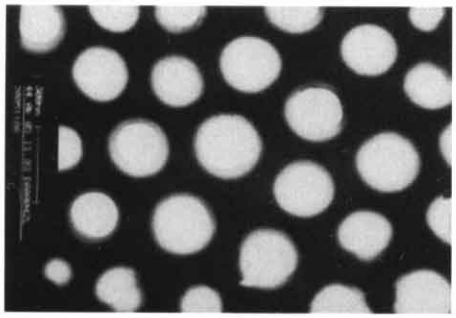


图 1　As_2O_3-PLGA-NP 的电镜观察　（TEM ×44 000）

2.2.2　粒径分布测定　　制得 As_2O_3-PLGA-NP 的平均粒径为 178.2 nm，呈正态分布。

2.2.3　包封率和载药量的测定　　标准曲线方程（F 为荧光强度，C 为三氧化二砷的浓度）$F = 161.543C + 9.129$，$r = 0.999\,7$，高、中、低 3 个浓度的平均回收率为 98.92%。按优化工艺制备 As_2O_3-PLGA-NP3 批，平均包封率为 53.19%，平均载药量为 0.64%。

3　讨论

本试验采用的主要辅料 PLGA 为人工合成的聚酯类共聚物，经美国 FDA 批准作为注射用微料、纳米粒、植入剂等制剂的材料，广泛应用于药物给药系统的研究，它具有生物相容性好、无毒、无免疫原性、可生物降解性等优点。在生物体内经过酶分解，最终形成二氧化碳和水，不污染环境，因而被认为是最有发展前途的生物可降解高分子材料，备受国内外关注。通过调节 PLGA 分子中乳酸（LA）和羟基乙酸（GA）的比例和分子量的大小，可以得到不同降解速率的载体材料。常用的 PLGA 比例有 80∶20、75∶25、50∶50 等，按分子量的大小又分为不同的规格。比例为 50∶50 的 PLGA 由于亲水性好，具有较好的混悬分散性能和降解速率，因而是目前最为常用的 PLGA 规格。

制备亲水性药物纳米粒的方法众多，其中，w/o/w 型乳化溶剂挥发法是目前较常用的方法，有利于提高包封率，且方法简便、易行。本试验运用 w/o/w 型乳化溶剂挥发法制备了 As_2O_3 的 PLGA 纳米粒，但复乳法制备纳米粒时，影响药物粒径和包封率的因素较多，包括投料比、PLGA 浓度、乳化剂浓度、内水相和油相的比例、油相和外水相的比例、制备初乳和复乳的超声强度、温度、时间等。为了简化试验，根据文献报道和已完成的单因素试验结果，我们将其他条件固定，主要考察了投料比、PLGA 浓度、油相和外水相的比例、超声强度、PVA 浓度这 5 个因素对纳米粒包封率的影响，采用均匀设计优化了制备工艺。

均匀设计法是将数论和多元统计相结合的一种新的试验方法，特别适用于因素多且每个因素变化范围较大的试验设计。本试验若采用全面试验的方法，需进行 5^5 次试验，若改用正交设计至少也需 5^2 次试验，而均匀设计只做了 15 次试验，因此可见均匀设计法在考察多因素多水平试验中具有优越性。

通过多元逐步回归分析发现投料比、PLGA 浓度、超声强度、PVA 浓度对包封率有重要影响，而外水相和油相的比例在试验范围内对包封率影响不明显，可根据单因素试验结果取值。经筛选所得的该纳米粒平均粒径为 178.2 nm，电镜下观察粒子圆整、规则、大小均匀，平均包封率为 53.19%，载药量为 0.64%。虽然制得的纳米粒存在载药量较低的缺点，通过我们的试验已初步证明采用该法制备纳米粒是可行的，在今后的工作中，我们将进一步提高载药量并进行动物体内靶向性及药效学研究。

参考文献：

[1] 张　鹏，王树叶，胡龙虎，等. 三氧化二砷注射液治疗 72 例急性早幼粒细胞白血病[J]. 中华血液学杂志，1996，17(2)：58－60.

[2] TCHOUNWOU P B，WILSON B A，ISHAQUE A B，*et al*. Atrazine potentiation of arsenic trioxide-induced cytotoxicity and gene expression in human liver carcinoma cells(HepG2)[J]. Mol Cell Biochem，2001，222(1－2)：49－59.

[3] 曾建新，王文亮，王知力，等. 肝癌细胞凋亡相关基因分析[J]. 第四军医大学学报，2002，23(24)：2240－2243.

[4] 刘连新，朱安龙，陈　炜，等. 三氧化二砷对原发性肝癌的作用及其机理研究[J]. 中华外科杂志，2005，43(1)：33－36.

[5] CEGNAR M，PREMZL A，ZAVASNIK-BERGANT V，*et al*. Poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles as a carrier system for delivering cysteine protease inhibitor cystatin into tumor cells[J]. Exp Cell Res，2004，301(2)：223－231.

[6] ZAMBAUX M F，BONNEAUX F，GREF R，*et al*. Influence of experimental parameters on the characteristics of poly(lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method[J]. J Controlled Release，1998，50(1－3)：31－40.

[7] 何　林，蒋学华，李　屯. 阿克拉霉素 A 聚乳酸毫微粒的制备工艺研究[J]. 中国药学杂志，1998，33(5)：289－291.

（编辑　陈聪连）