

基于近红外光响应性的盐酸阿霉素纳米脂质体的制备工艺优化^Δ

祝侠丽*,王莎莎,李玲华,巴妍妍,刘黎明,贾永艳(河南中医药大学药学院,郑州 450046)

中图分类号 R943 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)10-1312-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.10.04

摘要 目的:建立盐酸阿霉素纳米脂质体药物含量的测定方法,并优化其制备工艺。方法:采用紫外-可见分光光度法测定盐酸阿霉素纳米脂质体的药物含量;采用薄膜分散法制备盐酸阿霉素纳米脂质体。以粒径、包封率、载药量为指标,以磷脂与药物质量比(mg/mg)、磷脂与胆固醇质量比(mg/mg)、超声时间(min)为因素,采用星点设计-响应面法优化制备工艺;采用近红外光照射考察盐酸阿霉素纳米脂质体的光热转换效应。结果:盐酸阿霉素检测质量浓度的线性范围为1.01~16.16 μg/mL($r=0.9997$),精密性、稳定性、重复性均符合《中国药典》相关要求。最优制备工艺为磷脂与药物质量比13.30:1(mg/mg)、磷脂与胆固醇质量比4.09:1(mg/mg)、超声时间10 min。在此工艺条件下,所得的盐酸阿霉素纳米脂质体的粒径、载药量分别为(200.5±25.1)nm、(11.02±0.20)%,与预测值(196.3 nm、10.68%)的相对误差分别为1.82%、1.63%,实测值与预测值一致性良好。于808 nm近红外光照射下,盐酸阿霉素纳米脂质体具有浓度和时间依赖性的光热转换效应。结论:所建含量测定方法简便、准确度较好,优化所得工艺简单、可行。

关键词 盐酸阿霉素;纳米脂质体;近红外光响应性;星点设计-响应面法;粒径;载药量

Optimization of Preparation Technology of Near-infrared Light Response-based Doxorubicin Hydrochloride Nano-liposomes

ZHU Xiali, WANG Shasha, LI Linghua, BA Yanyan, LIU Liming, JIA Yongyan (College of Pharmacy, Henan University of TCM, Zhengzhou 450046, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for content determination of doxorubicin hydrochloride nano-liposomes, and to optimize its preparation technology. METHODS: The contents of doxorubicin hydrochloride nano-liposomes was determined by UV spectrophotometry. The membrane dispersion method was used to prepare doxorubicin hydrochloride nano-liposomes. Using particle size, encapsulation efficiency and drug-loading amount as indexes, the weight ratio of phospholipid to drug (mg/mg), the weight ratio of phospholipid to cholesterol (mg/mg) and ultrasonic time (min) as factors, central composite design-response surface methodology was used to optimize the preparation technology. The photothermal conversion effect of doxorubicin hydrochloride nano-liposomes was investigated by near infrared irradiation. RESULTS: The linear range of doxorubicin hydrochloride were 1.01-16.16 μg/mL ($r=0.9997$); precision, stability and reproducibility tests were all in line with the requirements of *Chinese Pharmacopoeia*. The optimal preparation technology included that the weight ratio of phospholipid to drug was 13.30:1(mg/mg); the weight ratio of phospholipid to cholesterol was 4.09:1 (mg/mg); the ultrasonic time was 10 min. Under this technology, the particle size and drug-loading amount of doxorubicin hydrochloride nano-liposomes were (200.5 ± 25.1) nm and (11.02 ± 0.20)%, relative errors of which to predicted value (196.3 nm, 10.68%) were 1.82% and 1.63%. The consistency between measured value and predicted value was good. Doxorubicin hydrochloride nano-liposomes exhibited concentration-dependent and time-dependent photothermal conversion characteristics under near infrared irradiation at 808 nm. CONCLUSIONS: Established method is simple and good accuracy. The optimized preparation technology is simple and feasible.

KEYWORDS Doxorubicin hydrochloride; Nano-liposomes; Near-infrared light response; Central composite design-response surface methodology; Particle; Drug-loading amount

恶性肿瘤已成为威胁人类健康的一大杀手,也是现代医药学研究领域面临的巨大挑战。盐酸阿霉素(Doxorubicin hydrochloride, DOX)作为一种广谱抗肿瘤药物,因其普通剂型具有明显的系统毒性而被临床限制使用^[1]。纳米脂质体可通过高通透性和滞留效应(Enhanced permeability and retention effect, EPR)将化疗药

物靶向输送到肿瘤组织,可提高药物的疗效,并降低毒性,同时具有明显的缓释作用和较高的生物相容性^[2]。尽管聚乙二醇(PEG)化的DOX脂质体已应用于临床,但仍存在药物被动释放速度过慢等问题^[3]。近年来,基于纳米材料的肿瘤光热治疗(Photothermal therapy, PTT)技术作为一种新型的治疗方法,因其特异性强、创伤小、并发症少等优势,逐渐受到学者的关注^[2]。纳米硫化铜因具有成本低、光热稳定性好、细胞毒性低以及粒径、形貌可控等特点^[4],在PTT领域具有较大的应用前景。为此,本研究将纳米硫化铜和DOX共同包裹制

^Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81803740);河南省高等学校青年骨干教师培养项目(No.2016GGJS-081)

* 副教授,博士。研究方向:药物新剂型与新技术。电话:0371-65962746。E-mail:zhuxiali1980@126.com

备了具有近红外光响应性的DOX纳米脂质体,并通过星点设计-响应面法优化DOX纳米脂质体的制备工艺,旨在为PTT的研究提供参考。

1 材料

1.1 仪器

BSA224S-CW型电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司);KQ-100型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);N-1100-OSB-2100型旋转蒸发器(上海爱郎仪器有限公司);92-IIN型超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司);T6-1650E型新世纪紫外-可见分光光度(UV)计(北京普析通用仪器有限责任公司);Nano-ZS90型电位及粒度分析仪(英国马尔文仪器有限公司);MW-GX-808/3000 mW型激光器(中国科学院长春激光所)。

1.2 药品与试剂

DOX原料药(大连美伦生物技术有限公司,批号:25316-40-9,纯度:≥99%);豆磷脂(天津市光复精细化工研究所,批号:20160403);胆固醇(郑州奇华顿化工产品有限公司,批号:20150527);纳米硫化铜(河南中医药大学药学院自制,批号:20180317);磷酸盐缓冲溶液(PBS,pH 7.4,批号:20171204)、聚维酮(批号:20161009)均由北京博奥拓达科技有限公司提供;三氯甲烷、甲醇等均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 DOX纳米脂质体的制备

采用薄膜分散法^[5-6]。精密称取豆磷脂、胆固醇各适量,置于同一茄形瓶中,加三氯甲烷适量溶解,摇匀,后将茄形瓶于40℃下旋转减压蒸发以除去有机溶剂,至形成均匀的薄膜,后加入含有DOX和聚维酮、纳米硫化铜的PBS溶液,超声(功率:500 W,频率:40 kHz)处理20 min,后再超声(功率:250 W,频率:25 kHz)处理,每次3 s,间歇3 s,共循环20次,即得含有纳米硫化铜的DOX纳米脂质体。另取薄膜,加入含有聚维酮、纳米硫化铜的PBS溶液,按上述操作“超声处理20 min起至超声处理”,即得空白脂质体。

2.2 DOX纳米脂质体的含量测定

2.2.1 检测波长的确定 采用UV法测定含量^[7]。精密称取DOX原料药5.05 mg,置于5 mL量瓶中,加甲醇溶解并定容,制成质量浓度为1.01 mg/mL的DOX贮备液;取上述DOX贮备液适量,加甲醇稀释,制成质量浓度为8.08 μg/mL的DOX供试品溶液。另取“2.1”项下空白脂质体适量,加甲醇破乳,加甲醇稀释100倍,即得空白脂质体供试品溶液。以甲醇为空白对照,取上述DOX供试品溶液、空白脂质体供试品溶液于200~400 nm波长范围内进行全波长扫描,详见图1。由图1可知,DOX供试品溶液的最大吸收波长为232 nm,而空白脂质体供试品溶液在232 nm波长处无吸收,表明空白辅料对测定无干扰,故选择检测波长为232 nm。

2.2.2 线性关系考察 精密量取“2.2.1”项下DOX贮备

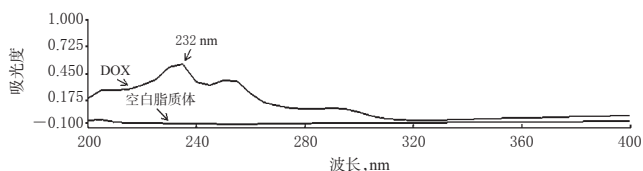


图1 紫外吸收光谱图

Fig 1 UV absorption spectrum

液,加PBS溶液稀释,制成质量浓度分别为1.01、4.04、8.08、12.12、16.16 μg/mL的系列线性关系工作溶液,取上述系列线性关系工作溶液适量,分别于232 nm波长处测定吸光度。以质量浓度(x , μg/mL)为横坐标,吸光度(y)为纵坐标进行线性回归,得DOX的回归方程为 $y=0.0567x+0.0149$ ($r=0.9997$),结果表明,DOX检测质量浓度线性范围为1.01~16.16 μg/mL。经方法学验证,精密度、稳定性、重复性均符合2015年版《中国药典》(四部)要求^[8]。

2.3 包封率、载药量、粒径的测定

采用超滤离心法测定包封率和载药量^[9-10]。精密量取“2.1”项下DOX纳米脂质体0.2 mL,加甲醇破乳并定容至5 mL,于232 nm波长处测定吸光度,记为 $A_{总}$ 。精密量取“2.1”项下DOX纳米脂质体1 mL,置于超滤管(30 kDa)中,以5 000 r/min离心20 min,滤过,取续滤液0.2 mL,加水定容至5 mL,于232 nm波长处测定吸光度,记为 $A_{游}$ 。将 $A_{总}$ 、 $A_{游}$ 按“2.2.2”项下回归方程计算DOX质量浓度,并按如下公式计算包封率和载药量。包封率(%)=($W_{总}-W_{游}$)/ $W_{总}$ ×100%,载药量(%)=($W_{总}-W_{游}$)/ $M_{总}$ ×100%(式中, $W_{总}$ 表示总的药物质量, $W_{游}$ 表示游离药物的质量, $M_{总}$ 表示DOX纳米脂质体的总质量)。另取“2.1”项下DOX纳米脂质体适量,加超纯水稀释10倍,采用粒度分析仪测定粒径。

2.4 DOX纳米脂质体处方工艺优化

2.4.1 星点试验设计与结果 参考预试验结果及相关文献^[11-13],选择以豆磷脂与药物质量比(X_1 , mg/mg)、豆磷脂与胆固醇质量比(X_2 , mg/mg)、超声时间(X_3 , min)为因素,以粒径(Y_1 , nm)、包封率(Y_2 , %)、载药量(Y_3 , %)为指标,采用3因素3水平试验方案。因素与水平见表1,试验方案与结果见表2。

表1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

水平	因素		
	$X_1, m/m$	$X_2, m/m$	X_3, min
1	5:1	3:1	10
2	12.5:1	4:1	20
3	20:1	5:1	30

2.4.2 模型拟合 采用SPSS 17.0软件对表2数据进行分析,得 $P=0.411$ ($P>0.05$),提示包封率在各组之间的差别相对较小($P>0.05$)。因此,以粒径和载药量为指标,采用Design-expert 8.0.6软件进行多元二次多项回归拟合,得粒径和载药量对 X_1 、 X_2 、 X_3 的数学回归模型。以粒径为指标时, $Y_1=215.30-123.90X_1+13.82X_2+13.13X_3-33.07X_1X_2-25.38X_1X_3+1.23X_2X_3+77.49X_1^2+5.09X_2^2+2.94X_3^2$

表2 试验方案与结果

Tab 2 Experiment plan and results

试验号	X_1	X_2	X_3	Y_1, nm	$Y_2, \%$	$Y_3, \%$
1	1	2	3	462.3	96.64	12.47
2	1	1	2	354.8	96.38	11.76
3	1	3	2	493.7	96.16	12.46
4	2	3	3	222.3	94.62	5.73
5	2	2	2	215.3	95.41	5.56
6	3	3	2	174.8	92.72	3.63
7	3	1	2	168.2	93.38	3.31
8	1	2	1	372.0	97.04	12.48
9	2	1	1	226.8	94.57	5.20
10	2	1	3	237.3	95.28	5.24
11	2	3	1	206.9	95.19	5.76
12	3	2	1	179.9	94.22	3.55
13	3	2	3	168.7	93.16	3.51

表3 方差分析结果

Tab 3 Results of variance analysis

误差来源	粒径					载药量				
	离均差平方和	自由度	均方差	F	P	离均差平方和	自由度	均方差	F	P
X_1	1.23×10^5	1	1.23×10^5	82.41	0.002 8	154.62	1	154.62	9 853.39	<0.000 1
X_2	1 529.05	1	1 529.05	1.03	0.385 7	0.54	1	0.54	34.13	0.01
X_3	1 378.13	1	1 378.13	0.92	0.407 2	2.00×10^{-4}	1	2.00×10^{-4}	0.013	0.917 2
X_1X_2	4 375.82	1	4 375.82	2.94	0.185 1	0.036	1	0.036	2.3	0.226 6
X_1X_3	2 575.56	1	2 575.56	1.73	0.280 1	2.25×10^{-4}	1	2.25×10^{-4}	0.014	0.912 3
X_2X_3	6	1	6	4.03×10^{-3}	0.953 4	1.23×10^{-3}	1	1.23×10^{-3}	0.078	0.798 1
X_1^2	13 724.14	1	13 724.14	9.21	0.056 1	12.89	1	12.89	821.64	<0.000 1
X_2^2	59.16	1	59.16	0.04	0.854 8	0.048	1	0.048	3.06	0.178 4
X_3^2	19.72	1	19.72	0.013	0.915 7	0.01	1	0.01	0.66	0.474 9
模型	1.50×10^5	9	16 675.52	11.19	0.035 9	172.98	9	19.22	1 224.87	<0.000 1
残差	4 470.8	3	1 490.27			172.98	9	19.22	1 224.87	<0.000 1
总和	1.55×10^5	12				154.62	1	154.62	9 853.39	<0.000 1

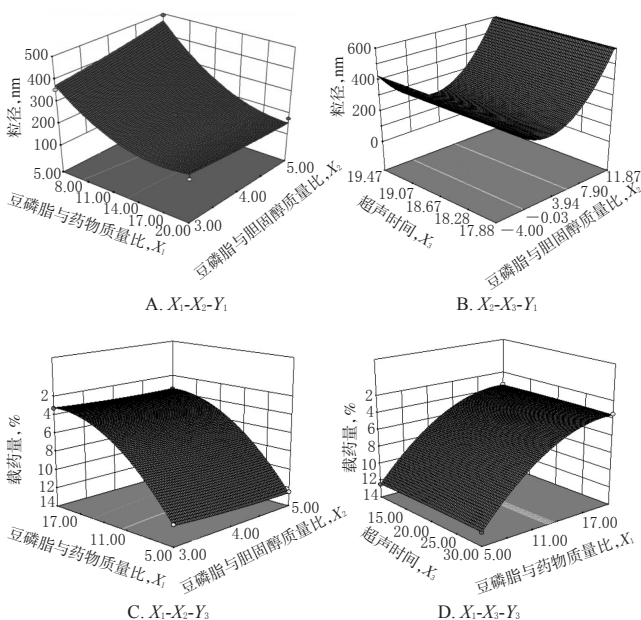


图2 各因素对粒径和载药量影响的响应面图

Fig 2 Response surface plots of each factor to particle size and drug-loading amount

($r=0.985 4$); 以载药量为指标时, $Y_3=5.56 - 4.40X_1 + 0.21X_2 - 0.046X_3 + 0.075X_1X_3 - 0.017X_2X_3 + 2.38X_1^2 - 0.056X_2^2 - 0.021X_3^2$ ($r=0.999 9$)。 r 均大于0.9, 提示模型设计的拟合效果及预测性均较好。对该模型进行方差分析, 结果见表3。

2.4.3 各因素交互作用分析 采用Design-expert 8.0.6软件以豆磷脂与药物质量比($X_1, \text{mg/mg}$)、豆磷脂与胆固醇质量比($X_2, \text{mg/mg}$)、超声时间(X_3, min)为因素, 以粒径(Y_1, nm)和载药量($Y_3, \%$)为指标, 绘制响应面图, 详见图2。

由图2A可知, 因素 X_1 与 X_2 交互作用显著, 随着 X_1 增大, 粒径也随之增大; 由图2B可知, 因素 X_2 与 X_3 交互作用显著, 随着 X_2 的增大, 粒径呈现先减小后增大的趋势; 由图2C可知, 因素 X_1 与 X_2 交互作用显著, 随着 X_2 的增大, 载药量逐渐减小; 由图2D可知, 因素 X_1 与 X_3 交互作用显著, 随着 X_1 的增大, 载药量也逐渐减小。

2.4.4 最优制备工艺的确定 基于Design-expert 8.0.6软件对所建模型进行参数最优分析, 得最优制备工艺为豆磷脂与药物质量比13.30:1(mg/mg)、豆磷脂与胆固醇质量比4.09:1(mg/mg)、超声时间10 min, 得到预测粒径为196.3 nm, 载药量为10.68%。

2.4.5 验证试验 按上述最优制备工艺进行验证, 平行制备3批DOX纳米脂质体, 详见表4、图3。由表4、图3可知, 实测值与预测值一致性良好, 提示优化所得制备工艺简单、可行, 其粒径符合正态分布。

表4 最优制备工艺验证结果

Tab 4 Results of optimal preparation technology validation

指标	预测值	实测值	相对误差, %
粒径, nm	196.3	200.5 ± 25.1	1.82
载药量, %	10.68	11.02 ± 0.20	1.63

2.5 DOX纳米脂质体的光热转换试验

参考相关文献进行DOX纳米脂质体的光热转换试验^[14]。取“2.1”项下DOX纳米脂质体, 加水稀释, 制成纳米硫化铜质量浓度为0.1、0.2、0.5 mg/mL的纳米混悬

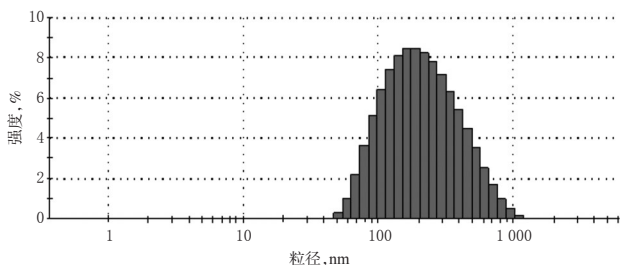


图3 粒径分布图

Fig 3 Distribution of particle size

液。分别取上述纳米混悬液 3 mL,置于石英比色池中,采用激光器(2.5 w/cm^2)照射(激发波长:808 nm),每 30 s 记录 1 次温度随时间的变化值,以水为对照组,以时间为横坐标、温度为纵坐标,采用 OriginPro 8.5.1 软件绘制光热转换曲线,详见图 4。

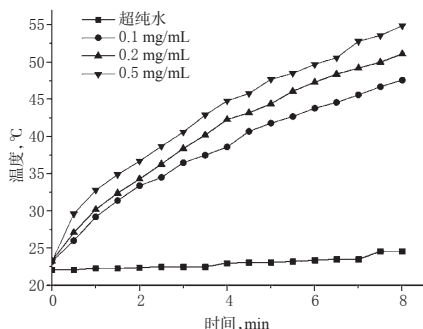


图4 光热转换曲线图

Fig 4 Light heat transformation curve plot

由图 4 可知,含有纳米硫化铜不同质量浓度的 DOX 纳米脂质体在 808 nm 激光照射下,温度可随照射时间的延长明显上升,浓度越高温度上升越快。当照射时间为 8 min 时,纳米硫化铜质量浓度为 0.1、0.2、0.5 mg/mL 时的温度分别为 47.6、51.1、54.9 °C,此时超纯水温度基本不变,维持在 24.6 °C。提示,DOX 纳米脂质体具有浓度和时间依赖性的光热转换效应,可结合近红外激光照射进行 PTT 治疗。

3 讨论

本课题以亲水性纳米硫化铜为光热转换剂,采用薄膜分散法制备了 DOX 纳米脂质体,试验中通过旋转减压蒸发,可有效避免纳米脂质体中有机溶剂的残留;此外磷脂易吸潮,在保存过程中应注意避潮,可将其放入真空袋中以保持干燥性。DOX 是一种需要避光保存的药物^[15],研究过程中需注意避光操作,且制得的 DOX 纳米脂质体也应避光保存。

本研究采用星点设计-响应面法优化了 DOX 纳米脂质体的制备工艺,优化后的最佳工艺为豆磷脂与药物质量比 13.30:1(mg/mg)、豆磷脂与胆固醇质量比 4.09:1(mg/mg)、超声时间 10 min。按此优化工艺所得 DOX 纳米脂质体的粒径为 $(200.5 \pm 25.1) \text{ nm}$ 、载药量为 $(11.02 \pm 0.20) \%$,该工艺简单、可行。光热转换试验结果显示,DOX 纳米脂质体具有浓度和时间依赖性的光热转换效

应,这可为近红外光响应性肿瘤靶向递药载体的进一步研究提供参考。

综上所述,本研究所建含量测定方法简便、准确度较好,优化所得制备工艺简单、可行。

参考文献

- [1] 房琳,张平宇,张晴,等.阿霉素靶向制剂研究进展[J].中南药学,2018,16(9):1263-1267.
- [2] 梁国海,邢达.用于肿瘤光热治疗的有机纳米材料研究进展[J].中国激光,2018,45(2):241-250.
- [3] SAINT-CRICQ P, DESHAYES S, ZINK JI, et al. Magnetic field activated drug delivery using thermodegradable azo-functionalised PEG-coated core-shell mesoporous silica nanoparticles[J]. *Nanoscale*, 2015, 7(31):13168-13172.
- [4] 赵承志,李万万.无机纳米材料用于肿瘤光热治疗的研究进展[J].肿瘤,2017,37(3):97-102.
- [5] HARDIANSYAH A, YANG MC, LIU TY, et al. Hydrophobic drug-loaded PEGylated magnetic liposomes for drug-controlled release[J]. *Nanoscale Res Lett*, 2017. DOI:10.1186/s11671-017-2119-4.
- [6] 李飞阳,崔纯莹,王玉记,等.阿霉素脂质体的制备及抗肿瘤活性研究[J].首都医科大学学报,2015,36(2):157-160.
- [7] 常桂民,段芳龄,杨淑英,等.脂质体阿霉素的制备及包封率测定方法的研究[J].中国医院药学杂志,1999,19(6):328-331.
- [8] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:38-40.
- [9] ZHU X, XIE Y, ZHANG Y, et al. Thermo-sensitive liposomes loaded with doxorubicin and lysine modified single-walled carbon nanotubes as tumor-targeting drug delivery system[J]. *J Biomater Appl*, 2014, 29(5):769-779.
- [10] 李晓,赵东林,白利忠,等.盐酸阿霉素在纳米载体氧化石墨烯上的可控负载与释放[J].功能材料,2013,44(1):96-98.
- [11] 焦岩,李大婧,刘春泉,等.叶黄素纳米脂质体的制备工艺优化及其氧化稳定性[J].食品科学,2017,38(18):266-272.
- [12] PATRO CS, SAHU PK. Combined effect of synthetic and natural polymers in preparation of cetirizine hydrochloride oral disintegrating tablets: optimization by central composite design[J]. *J Pharm: Cairo*, 2017. DOI: 10.1155/2017/8305976.
- [13] 苏艳莹,雷小小,桂卉,等.星点设计-效应面法优化山茱萸总环烯醚萜苷脂质体的制备工艺[J].中国药房,2018,29(19):2612-2616.
- [14] ZHU X, HUANG H, ZHANG Y, et al. Cit/CuS at FeO-based and enzyme-responsive magnetic nanoparticles for tumor chemotherapy, photothermal, and photodynamic therapy [J]. *J Biomater Appl*, 2017, 31(7):1010.
- [15] 宋阳.盐酸阿霉素脂质体的研究[D].沈阳:沈阳药科大学,2009.

(收稿日期:2018-11-14 修回日期:2019-03-05)

(编辑:陈宏)