

脂蟾毒配基-乳酸羟基乙酸共聚物纳米粒的制备与表征

徐红^{1*}, 褚秋辰², 高萌², 张成鸿¹, 迟培元³, 巩童童³, 刘航³, 田燕^{2#}(1.大连医科大学基础医学院, 辽宁大连 116044; 2.大连医科大学药学院, 辽宁大连 116044; 3.大连医科大学七年制, 辽宁大连 116044)

中图分类号 R284.62; R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)31-2913-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.31.12

摘要 目的:制备、表征脂蟾毒配基-乳酸羟基乙酸共聚物纳米粒(RPN)。方法:用乳酸羟基乙酸共聚物为载体材料,采用超声乳化-溶剂挥发法制备RPN,以粒径、载药量、包封率和体外释放度表征其质量。用反相-高效液相色谱法测定RPN含量和体外释放度,色谱柱为HYPERSIL C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-0.05%冰醋酸水溶液(9:1, V/V),检测波长为298 nm。结果:RPN的平均粒径为(232.3±2.3) nm,载药量为(18.3±0.3)%,包封率为(72.3±1.2)%,体外药物呈两相释放。结论:RPN载药量较高,体外释放试验显示具有明显的缓释作用。

关键词 脂蟾毒配基; 纳米粒; 乳酸羟基乙酸共聚物; 体外; 释放; 细胞相容性

Preparation and Characteristics of Resibufogenin-loaded PLGA Nanoparticles

XU Hong¹, CHU Qiu-chen², GAO Meng², ZHANG Cheng-hong¹, CHI Bei-yuan³, GONG Tong-tong³, LIU Hang³, TIAN Yan²(1.College of Basic Medical Sciences, Dalian Medical University, Liaoning Dalian 116044, China; 2.College of Pharmacy, Dalian Medical University, Liaoning Dalian 116044, China; 3.Seven Year System, Dalian Medical University, Liaoning Dalian 116044, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To prepare and characterize Resibufogenin (RBG)-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles (RPN), and to evaluate their *in vitro* cytocompatibility. METHODS: RPN were prepared by ultrasonic emulsification/solvent evaporation technique using PLGA as carrier, and their quality was characterized with particle size, drug-loading amount, entrapment efficiency and *in vitro* drug release. RP-HPLC was adopted to determine the content and release rate of RPN. HYPERSIL C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) column was used with methanol-0.05% acetic acid (9:1, V/V) as mobile phase, and the detection wavelength was 298 nm. RESULTS: Mean particle size of RPN was (232.3±2.3) nm, the drug-loading amount was (18.3±0.3)% and entrapment efficiency was (72.3±1.2)%. The *in vitro* drug-release profile of RPN showed a biphasic release pattern. CONCLUSIONS: The RPN prepared in this study has higher DL, and the drug release shows significant sustained release.

KEYWORDS Resibufogenin; Nanoparticles; PLGA; *in vitro*; Drug release; Cytocompatibility

蟾酥具有拔毒消肿、活血止痛、利水、杀虫、止痒之功效,在传统医学中常用于解毒、消肿、强心、止痛等,现代临床已经突破传统用法将其应用到多种疾病治疗中,肿瘤治疗就是其中的一个重要方面^[1-3]。脂蟾毒配基(Resibufogenin, RBG)是蟾酥的主要成分之一,是蟾毒配基3种成分中(另两种为华蟾毒精和蟾毒灵)毒性比较温和的,也是临床上唯一成药的化合物,具有兴奋呼吸、强心升压等作用,是蟾酥中的主要单体成分,但国内外对其制剂研究的报道很少。

纳米粒(Nanoparticles, NPs)为固态胶体颗粒,粒径为10~1 000 nm,分为纳米球和纳米囊,属于胶体分散系统,是一种毒性相对较小、稳定性好的靶向制剂,经静脉注入血后能够将包裹的药物集中于肝、脾、骨髓等处,降低药物在其他组织中的分布。NPs可改变药物在体内的药动学特征,增加药物在靶器官的分布量,从而提高疗效、减轻毒副作用。乳酸羟基乙酸

共聚物(Poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA)是一种生物可降解性合成高分子材料,由于其质量稳定、生物可降解性和良好的生物相容性,近年来被用作注射剂、NPs、植入剂等制剂的材料^[4]。

由于RBG的疏水性较强,根据其本身的结构和性质,本研究用PLGA为载体材料,采用超声乳化-溶剂挥发法制备RBG-PLGA-NPs(RPN)^[5],以粒径、包封率、载药量和体外释放度表征其质量,以期制备RBG新制剂提供试验依据。

1 材料

1.1 仪器

XS105DU型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司);1200型高效液相色谱(HPLC)仪(美国Agilent公司);JY92-IIN型超声波细胞粉碎机(宁波新芝科技股份有限公司);NanoZS90型激光粒径仪(英国Marlvern公司);Sceptoh型离心机(日本Hitachi公司);FD-1C型冷冻干燥机(北京德天佑科技发展有限公司);RW20型数显电动搅拌机(日本IKA公司);HZQ-X100型恒温震荡培养箱(哈尔滨市东联电子技术开发有限公司);354型酶标仪(美国Thermo公司)。

1.2 试剂

* 实验师。研究方向:药物制剂药理、药效。电话:0411-86110323。E-mail:859133790@qq.com

通信作者:教授。研究方向:天然药物新制剂、新技术。电话:0411-86110420。E-mail:tiany2004@126.com

RBG对照品(中国食品药品检定研究院,批号:120930); RBG原料药(大连医科大学药物化学教研室,批号:20130301,纯度:98%);水溶性维生素E(维生素E-聚乙二醇1000琥珀酸酯,TPGS,美国Eastman公司,批号:09060025); PLGA[50:50(V/V),相对分子量:40 000~75 000,山东省医疗器械研究所,批号:09030111];二氯甲烷(分析纯,批号:20090703)、冰醋酸(色谱纯,批号:20120711)均购自天津市科密欧化学试剂有限公司;甲醇(色谱纯,美国Tedia公司,批号:1022001);透析袋(科宏达生物科技有限公司,批号:081220);十二烷基硫酸钠(SDS,山东省医疗器械研究所,批号:09010120);WST-1细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒(德国罗氏公司,批号:M1680);DMEM培养基[赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司,批号:NYD0822];其余辅料均为药用规格,所用试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:HYPERSIL C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-0.05%冰醋酸水溶液(9:1, V/V);流速:1.0 ml/min;检测波长:298 nm;柱温:30 ℃;进样量:20 μl。在此条件下,分别称取RBG原料药、对照品适量,用甲醇溶解;再称取RPN适量置离心管中,用丙酮溶解后减压回收丙酮,残渣加入流动相涡旋使溶解(质量浓度约为80 μg/ml),分别进样,得RBG原料药、对照品和RPN的HPLC色谱图(图1)。RBG的保留时间约为6.3 min,理论板数以RBG峰计算应不低于3 500,分离度符合要求。

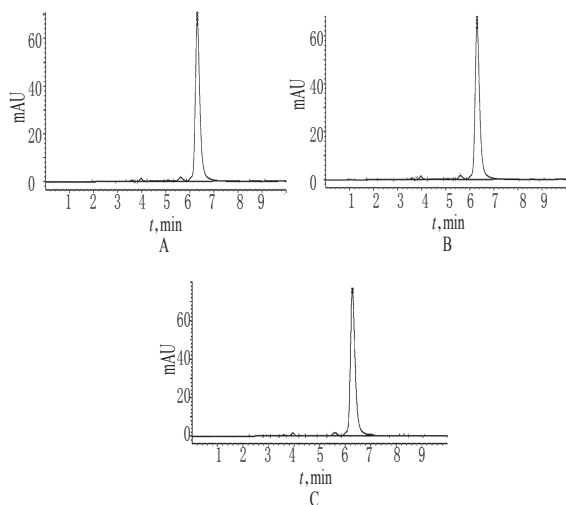


图1 高效液相色谱图

A.RBG原料药;B.RBG对照品;C.RPN

Fig 1 HPLC chromatograms

A.RBG raw material; B.RBG substance control; C. RPN

2.2 RPN的制备

2.2.1 处方 RBG原料药30 mg, PLGA100 mg, 0.05% TPGS水溶液100 ml。

2.2.2 制备 精密称取RBG原料药30 mg、PLGA100 mg,置10 ml离心管中,加入适量二氯甲烷,充分放置使其溶解;精密量取100 ml 0.05% TPGS水溶液置250 ml烧杯中,冰水浴超声处理(功率:250 W)条件下加入RBG和PLGA的二氯甲烷溶液,继续超声3 min,电动搅拌12 h,以离心半径为13.5 cm、

16 000 r/min离心15 min,双蒸水洗3次,冷冻干燥24 h,得RPN。同法制备不载RBG的空白纳米粒(Empty nanoparticles, ENP)。

2.3 RPN的表征^[6]

2.3.1 表观形态 取适量RPN分散在水中制成混悬液,取1滴置于覆有支撑网的铜网上,沉淀2~3 min后,用滤纸吸收多余液体,再滴加2.5%磷钨酸溶液1滴,染色2~3 min。吸干多余的染色液,置透射电镜下观察其形态。结果显示,载药NPs外观圆整,大小均匀,呈类球形,粒径在200 nm左右。RPN的透射电镜图见图2。

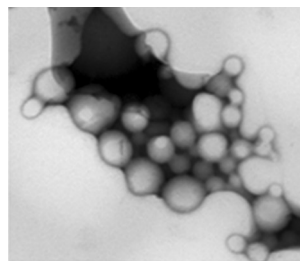


图2 RPN的透射电镜图(25 000×)

Fig 2 Transmission electron micrograph of RPN (25 000×)

2.3.2 粒径和Zeta电位的测定 取RPN适量,加入4 ml蒸馏水中,超声分散后形成NPs混悬液,用激光粒径仪对其粒径和分布情况进行分析。将NPs混悬液用蒸馏水稀释后,再采用Zeta电位仪对NPs表面Zeta电位进行测定。结果,NPs平均粒径为(232.3±2.3) nm(n=3), Zeta电位为(-27.26±0.57) mV(n=3),分布系数(PDI)=0.195,表明NPs的粒径较小、分布较均匀。

2.3.3 含量测定的方法学考察 (1)标准曲线的制备:精密称取干燥至恒质量的RBG对照品0.025 g,置50 ml量瓶中,加甲醇溶解并定容,得质量浓度为500 μg/ml的RBG对照品贮备液。分别精密量取RBG对照品贮备液50、100、200、400、800、1 600、3 200 μl,置10 ml量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,制成质量浓度分别为2.5、5、10、20、40、80、160 μg/ml的系列RBG对照品溶液。按“2.1”项下色谱条件进样测定3次。以峰面积积分值(A)为纵坐标,质量浓度(c)为横坐标,进行线性回归,得回归方程为 $A=13.929c+8.8909$ ($r=0.9998, n=7$)。结果表明, RBG质量浓度在2.5~160 μg/ml范围内与其峰面积积分值呈良好线性关系。(2)精密度的试验:精密量取RBG对照品贮备液适量,制备高、中、低质量浓度(110、90、70 μg/ml)的对照品溶液。按“2.1”项下色谱条件连续进样6次测定日内精密度,连续5 d测定日间精密度。结果,高、中、低质量浓度溶液日内精密度的RSD分别为1.1%、1.0%、1.2%(n=6),日间精密度的RSD分别为1.2%、1.3%、1.5%(n=5),表明本方法精密密度良好。(3)重复性试验:精密称取RPN 5 mg,共6份,分别置5 ml离心管中,用2 ml丙酮溶解后减压回收丙酮,残渣加入适量流动相涡旋使溶解,转移至10 ml量瓶中,再用流动相定容,按“2.1”项下色谱条件进样测定,采用外标两点法计算样品中RBG含量。结果,样品中RBG质量分数分别为18.2%、18.6%、18.5%、18.1%、17.8%、18.3%, RSD=1.5%(n=6),表明本方法重复性良好。(4)加样回收率试验:精密称取RPN 2.5 mg,共9份,分别置5 ml离心管中,用1 ml丙酮溶解后减压回收丙酮,加入适量流动相涡旋混匀,转移至10 ml量瓶中。每3

份为一组,分别精密加入 500 $\mu\text{g/ml}$ RGB 对照品贮备液 500、900、1 500 μl ,再用流动相定容,按“2.1”项下色谱条件进样测定,计算加样回收率。结果,RGB 平均回收率为 100.5%, $\text{RSD}=1.1\%$ ($n=9$),表明本方法准确度良好。加样回收率试验结果见表 1。(5)稳定性试验:精密称取 RPN 6、5、4 mg,各 3 份,分别按“2.3.3(3)”项下方法制备高、中、低质量浓度供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件于 0、1、2、4、6、12、18、24、30 d 测定。结果,高、中、低质量浓度供试品溶液稳定性的 RSD 分别为 1.6%、1.4%、1.5% ($n=9$),表明供试品溶液在 30 d 内稳定。

表 1 加样回收率试验结果 ($n=9$)
Tab 1 Results of recovery tests ($n=9$)

序号	称样量, mg	样品含量, mg	加入品量, mg	测得量, mg	回收率, %	\bar{x} , %	RSD, %
1	2.50	0.457 5	0.25	0.709 7	100.9	100.5	1.1
2	2.60	0.475 8	0.25	0.729 7	101.6		
3	2.40	0.439 2	0.25	0.689 8	100.2		
4	2.50	0.457 5	0.45	0.909 7	100.5		
5	2.50	0.457 5	0.45	0.919 5	102.7		
6	2.40	0.439 2	0.45	0.889 8	100.1		
7	2.60	0.475 8	0.75	1.219 6	99.2		
8	2.50	0.457 5	0.75	1.209 7	100.3		
9	2.50	0.457 5	0.75	1.199 8	99.0		

2.3.4 载药量和包封率的测定 精密称取 RPN 5 mg,共 6 份,按“2.3.3”项下方法操作,测得样品中 RGB 含量,再根据以下公式分别计算载药量和包封率:载药量 = NPs 中的药物质量/取样量 $\times 100\%$;包封率 = 全部 NPs 中的药物质量/制备时的投药质量 $\times 100\%$ 。采用外标两点法计算出样品中 RGB 的载药量为 $(18.3 \pm 0.3)\%$ ($n=6$),包封率为 $(72.3 \pm 1.2)\%$ ($n=6$)。

2.3.5 体外释放度的测定 精密称取 15 mg RPN 和 2.5 mg RGB 原料药,各 6 份,分别加入溶有 0.1% SDS 的 PBS (pH 7.4) 溶液 5 ml 中,分散均匀后再分别置于透析袋中,放入 PBS 25 ml 中,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、120 r/min 摇床中放置,分别于 0、0.25、1、2、3、4、5、7、9、12、15、18、21、24、27、30 d 精密吸取透析液 15 ml (同时补充加入同样温度的 PBS 15 ml),减压蒸干后用适量流动相复溶,余下操作同“2.3.3”项下,测定 RGB 含量,分别计算二者的累积释放度。RPN 和 RGB 的体外释放度曲线见图 3。

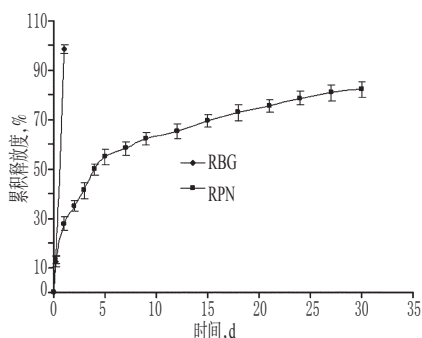


图 3 RPN 和 RGB 的体外释放度曲线 ($n=6$)

Fig 3 Release profile of RPN and RGB in vitro ($n=6$)

由图 3 可见,RGB 在 24 h 时已经释放完全,而 RPN 的体外释放呈两相释放,初期存在突释现象。前 24 h 释放达到 $(27.8 \pm 1.4)\%$,在 1 d 与 2 d 间进行突释,7 d 后达到稳定的扩散阶段,释药量 $>55\%$,30 d 时药物累积释放度达到 80% 以上。突释现象是由于 NPs 表面分布有药物,更容易从载体骨架中释

放出来,而大部分药物分布在 NPs 内部,在载体骨架的影响下释放较慢,故与 RGB 比较,RPN 具有明显的缓释作用。由于 RGB 分布在 PLGA 载体材料中,药物的释放必须通过载体材料的骨架结构,随着 PLGA 的降解,药物逐步释放出来,因此达到了较好的缓释效果。

3 讨论

RGB 作为蟾酥中的有效成分之一,有着较好的抗肿瘤作用,但同时也存在着一些毒副作用,如头晕、恶心、四肢发凉、抽搐等。通过对其进行剂型设计,本试验首次将其制备成 NPs,通过控制粒径和 Zeta 大小使其具有一定的靶向作用,进而减小副作用,更好的发挥其抗肿瘤活性^[3,7-8]。

笔者采用 RP-HPLC 法测定 NPs 和释放介质中 RGB 的含量,操作简便,重复性好。RGB 在水中的溶解度较小,故选用 0.1% SDS 水溶液作释放介质,SDS 具有一定的增溶作用,能有效增加 RGB 在释放介质中的溶解度,且 PLGA 和 SDS 对 RGB 的测定均无干扰。

处方中 0.05% TPGS 水溶液作为乳化剂使用,与传统的乳化剂聚乙烯醇比较,TPGS 能够明显提高药物在 PLGA NPs 的包封率。TPGS 在体内可生物降解,比一般的乳化剂更安全;同时,TPGS 还具有一定的肝脏靶向作用^[9],由于其所带负电荷分布在 NPs 表面,更易被肝细胞摄取,因而采用此工艺制备 NPs 更有利于临床应用。

参考文献

- [1] 王传社,李燕燕,陈娜,等.脂蟾毒配基对入宫颈癌 Hela 裸鼠移植瘤生长的抑制作用[J].北京中医药大学学报,2006,29(3):184.
- [2] 刘丹,祝林,奉建芳.蟾酥中蟾毒配基类成分的分离纯化及其体外抗肿瘤活性的研究[J].中成药,2010,32(6):937.
- [3] 肖义秀,张瑾峰,吴白燕.脂蟾毒配基诱导人肝癌细胞凋亡作用的研究[J].中国生物工程杂志,2006,26(6):36.
- [4] 樊新,陈剑,阮建明,等.聚乳酸类可降解材料研究进展[J].粉末冶金材料科学与工程,2008,13(4):187.
- [5] Maribel T, Maria JA, Madalena M, et al. Development and characterization of PLGA nanospheres and nanocapsules containing xanthone and 3 methoxy-xanthone[J].Eur J Pharm Biopharm,2005,59(3):491.
- [6] 顾晓华,王轩,安磊,等.齐墩果酸 PLGA-TPGS 纳米粒体外释放度的测定及质量控制[J].中国药房,2012,23(29):2726.
- [7] 黄应申,肖建军,孟书聪,等.脂蟾毒配基通过线粒体途径诱导人肝癌 Bel-7402 细胞凋亡的研究[J].中国肿瘤临床,2006,33(20):1141.
- [8] 唐信威,肖洁,宋健.脂蟾毒配基选择性杀伤肿瘤细胞的研究[J].中国癌症杂志,2012,22(3):196.
- [9] Yu L, Bridgers A, Polli J, et al. Vitamin E-TPGS increases absorption flux of an HIV Protease inhibitor by enhancing solubility and permeability[J]. Pharm Res,1999,16(12):1812.

(收稿日期:2013-08-07 修回日期:2013-11-05)