

## 三氧化二砷磁微球的制备工艺

雷建林<sup>1\*</sup>, 李芳<sup>2</sup>, 赵婉<sup>1</sup>, 赵宇<sup>1</sup>

(1. 西安交通大学医学院第二附属医院药剂科, 西安 710004; 2. 陕西省中医药研究院, 西安 710003)

**[摘要]** 目的: 研究三氧化二砷磁微球的制备工艺。方法: 采用化学共沉淀法制备四氧化三铁磁性粒子, 采用超声乳化和溶剂萃取挥发法制备三氧化二砷磁微球, 建立二乙基二硫代氨基甲酸银光度法检验微球包封率并确定优化工艺。结果: 最佳工艺为  $A_3B_2C_1$ , 即  $Fe_3O_4-As_2O_3(1:2)$ , 聚乳酸体积分数 0.6%, PVA 体积分数 3%。制备的磁微球平均含量 26%, 包封率 60%。结论: 试验制备的三氧化二砷磁微球包封率高、毒性小。

**[关键词]** 三氧化二砷; 磁微球; 制备工艺; 包封率

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)21-0009-03

## Preparation Technology of $As_2O_3$ Magnetic Microspheres

LEI Jian-lin<sup>1\*</sup>, LI Fang<sup>2</sup>, ZHAO Wan<sup>1</sup>, ZHAO Yu<sup>1</sup>

(1. Department of Pharmacy, Second Affiliated Hospital of Medical College of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China; 2. Shaanxi Provincial Academy of Traditional Chinese Medicine, Xi'an 710003, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study on preparation process of  $As_2O_3$  magnetic microspheres. **Method:** To prepare  $Fe_3O_4$  magnetic particles by chemical coprecipitation, prepared  $As_2O_3$  magnetic microspheres by phacoemulsification and solvent extraction evaporation method, established a method to determinate encapsulation efficiency of microspheres by DDC-Ag method and to optimize preparation technology. **Result:** Optimum process was  $A_3B_2C_1$ ,  $Fe_3O_4-As_2O_3(1:2)$ , concentration of polylactic acid was 0.6% and concentration of PVA was 3%. The average content of prepared magnetic microspheres was 26%, encapsulation efficiency was 60%. **Conclusion:** The prepared  $As_2O_3$  magnetic microspheres had high encapsulation efficiency with less toxicity.

**[Key words]**  $As_2O_3$ ; magnetic microspheres; preparation process; encapsulation efficiency

三氧化二砷 ( $As_2O_3$ ) 是毒性最强的砷化合物, 也是一种细胞毒药物, 能增加肿瘤细胞的凋亡<sup>[1-2]</sup>, 作为传统有效的抗肿瘤药物, 现已证实  $As_2O_3$  在体内和体外都能诱导白血病细胞凋亡<sup>[3]</sup>, 抑制肿瘤细胞增殖和分化, 在治疗以急性早幼粒细胞白血病为主的恶性血液病方面疗效显著。近年来国内外研究发现  $As_2O_3$  对实体瘤等多种肿瘤细胞都有一定的诱导分化作用<sup>[4]</sup>。目前上市药品是以  $As_2O_3$  为原料精

制而成的二类新药亚砷酸注射液, 静脉给药后亚砷酸由血循环分布到体内各脏器, 产生治疗作用, 同时在组织中蓄积, 临床仅应用于晚期肿瘤患者的试验性缓解治疗, 因而阻碍着其在临床上的广泛应用。磁微球具有小尺寸、磁响应性和良好包埋性等优良特性, 包埋  $As_2O_3$ , 在外加磁场引导下按预期方式到达病变区, 使  $As_2O_3$  仅在病灶部位定位释放, 增大该部位药物浓度, 减少药物用量, 降低全身毒副作用等。本试验将磁性粒子在超声条件下分散于可生物降解的聚乳酸高分子溶液中, 包埋  $As_2O_3$  制备的磁微球, 具有很强的磁响应性和缓释功能, 可以延长药物的局部作用时间并减低毒性作用。

**[收稿日期]** 20110701(008)

**[基金项目]** 陕西省科技攻关项目[2004K18-G9(4)]

**[通讯作者]** \*雷建林, 硕士, 副主任药师, 从事医院药学工作, Tel: 029-87679398, E-mail: jianlinyutian@126.com

## 1 材料

85-2 型恒温加热磁力搅拌器(杭州仪表电机有限公司),UV-2201 型紫外分光光度计(日本岛津),ZRS-8G 型智能溶出仪(天津大学无线电厂),GR-202 型电子天平(日本 AD 公司),OLYMPUS CX21 型系列生物显微镜(广州明美有限公司)。

氯化亚铁(上海新宝精细化工厂,批号 20040812),氯化铁(广州市纳森化工有限公司,批号 20051213), $As_2O_3$ (美国 Sigma 公司),聚乳酸(深圳光华实业有限公司),聚乙二醇 4000(广东汕头市西陇化工厂),油酸钠(中国医药集团化学试剂有限公司),十二烷基磺酸钠(西安化学试剂厂),其他均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1  $Fe_3O_4$  磁性颗粒制备** 分别将  $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  和  $FeCl_2 \cdot 4H_2O$  溶液,用滤纸滤除不溶物,按不同的化学配比(1:1,1:2,1:3)取样加入烧瓶中,搅拌(转速  $1\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ )均匀后,调节温度至  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ ,用浓氨水调 pH 9,升高温度至  $80 \text{ }^\circ\text{C}$ ,加入一定量的表面活性剂,缓慢搅拌加入,继续搅拌 40 min,超声 20 min,用  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  浓盐酸调节使之 pH5。停止搅拌冷却至室温后,用蒸馏水反复洗涤,在磁场作用下分离,用  $AgNO_3$  溶液检查冲洗液,直至无白色沉淀为止,过滤,将湿粒子放入干燥箱中低温干燥,即得磁性颗粒。优化工艺为  $m_{Fe^{2+}} : m_{Fe^{3+}} = 1:2$  时为最佳配比。

**2.2  $As_2O_3$  磁性微球制备** 称取  $0.1 \text{ g}$   $Fe_3O_4$  磁性颗粒,溶解于二氯乙烷-丙酮(80:20),加入( $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) PBS 缓冲  $As_2O_3$  溶液  $10 \text{ mL}$ ,加入聚乳酸  $0.4 \text{ g}$ ,并用超声分散形成油相;另取 3% 聚乙烯醇(PVA)水溶液  $100 \text{ mL}$  作为水相;将油相在高速搅拌下加入水相中,5 min 后呈现均匀乳状,同时将上述乳液缓缓滴加到  $1 \text{ L}$  水溶液(恒温  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ )中持续搅拌 5 h,至有机溶剂蒸发完全,抽滤,干燥即得磁性载药微球。

**2.3  $As_2O_3$  磁性微球制备工艺正交试验** 根据单因素试验结果,筛选主要影响包封率和粒度的因素 A( $Fe_3O_4 : As_2O_3$ )、B(聚乳酸体积分数)及 C(PVA 体积分数)。按照正交试验设计的原理用正交设计表进行试验,结果见表 1~3。

由表 2 可见,对药物包封率的影响程度依次为  $A > B > C$ ,即  $Fe_3O_4$  与  $As_2O_3$  的配比是主要因素,其次为聚乳酸体积分数,PVA 体积分数的影响最小。A 因素中  $A_3 > A_2 > A_1$ ,B 因素  $B_2 > B_1 > B_3$ ,C 因素  $C_1 > C_2 > C_3$ 。从表 3 可见, $Fe_3O_4$  与  $As_2O_3$  的配比

表 1  $As_2O_3$  磁性微球制备工艺正交试验因素水平

水平	A $Fe_3O_4 : As_2O_3$	B 聚乳酸 体积分数/%	C PVA 体积分数/%
1	1:1	0.4	3
2	1:1.5	0.6	5
3	1:2	0.8	7

表 2  $As_2O_3$  磁性微球制备工艺正交试验

No.	A	B	C	D	ER/%
1	1	1	1	1	20
2	1	2	2	2	26
3	1	3	3	3	15
4	2	1	2	3	42
5	2	2	3	1	39
6	2	3	1	2	40
7	3	1	3	2	50
8	3	2	1	3	60
9	3	3	2	1	45
$K_1$	20	37	40		
$K_2$	40	42	38		
$K_3$	52	33	35		
R	32	9	5		

表 3 方差分析

因素	SS	f	F	P
A	1 510.22	2	43.286 6	*
B	104.22	2	2.987 3	
C	42.89	2	1.229 3	
D(误差)	34.89	2		

注:  $F_{0.05} = 19.00$ 。

对药物包封率有显著性影响。最终确定  $As_2O_3$  磁微球的较佳制备工艺为  $A_3B_2C_1$ ,即用  $m_{Fe_3O_4} : m_{As_2O_3} = 1:2$ ,聚乳酸体积分数为 0.6%,PVA 体积分数为 3%。

### 2.3 药物包封率的测定

**2.3.1 最大吸收峰波长的测定** 按照《中国药典》2010 年版一部附录 IXF<sup>[5]</sup>的方法制备标准砷溶液( $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ),精密量取标准砷溶液  $2 \text{ mL}$ ,置于 a 瓶中,加盐酸  $5 \text{ mL}$  与水  $21 \text{ mL}$ ,再加碘化钾试液  $5 \text{ mL}$ ,与酸性氯化亚锡试液 5 滴,在室温放置 10 min 后,加无砷锌粒  $2 \text{ g}$ ,立即将导气管 c 与 a 瓶密塞,使生成的砷化氢气体导入 d 管中,并将 a 瓶置  $25 \sim 40 \text{ }^\circ\text{C}$  水浴中反应 45 min,取出 d 管,添加三氯甲烷至刻度,混匀,以二乙基二硫代氨基甲酸银溶液做空白,照紫外-可见分光光度法在  $400 \sim 600 \text{ nm}$  扫描,结果在  $510 \text{ nm}$  有最大吸收峰。

**2.3.2 标准曲线** 精密量取标准砷溶液 2.0,4.0,6.0,8.0,10.0,12.0 mL,分别置砷化氢发生器中,按照 2.3.1 的方法,以二乙基二硫代氨基甲酸银溶液

为空白溶液,在 510 nm 处测定吸收度,以吸收度为纵坐标( $Y$ ),浓度为横坐标( $X$ ),进行线性回归,得回归方程  $Y = 0.1363X - 0.2413 (r = 0.9975)$ 。

**2.3.3 精密度试验** 取标准砷溶液 4.0, 6.0, 8.0 mL, 分别置砷化氢发生器中,按照 2.3.1 的方法,连续进样测定 6 次,以吸收度计算 RSD 分别为 1.9%, 2.4%, 2.1%, 表明方法精密度良好。

**2.3.4 回收率试验** 取已知含量的三氧化二砷磁微球样品,共 6 份,分别精密加入适量三氧化二砷,按照 2.3.1 和 2.3.2 项下方法进行测定,计算平均回收率为 96.51%, RSD 2.3%。

**2.3.5 磁微球包封率的测定** 精密称取最佳工艺制备的  $As_2O_3$  磁微球 0.5 g, 用葡聚糖凝胶柱 Sephadex G-50 柱, 内径 1.5 cm, 柱高 10 cm, 先用 pH6.0 PBS 洗脱至灰黑色混浊液全部流出, 然后换用 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 的 NaOH 溶液洗脱, 流速为 1.5 mL·min<sup>-1</sup>, 每流份 1 mL, 共收集 30 mL。经镜检确认 1~7 流分含有磁微球, 按照 2.3.1 的方法测定吸光度, 计算浓度为  $C_1$ ; 收集其余流分, 取适量, 以 pH 6.0 PBS 溶液作空白对照, 按照 2.3.1 的方法, 测定吸光度, 发现其中含有游离的  $As_2O_3$ , 浓度为  $C_2$ ; 然后按下式计算磁微球包封率:  $ER = C_1 / (C_1 + C_2) \times 100\%$ , 式中 ER 指磁微球包封率,  $C_1$  表示包封在磁微球中的砷量,  $C_2$  表示包围在磁微球中的游离砷量。测得最佳工艺的包封率为 60%, 微球中游离药物体积分数为 10%。

**2.4 样品含量测定** 分别用消化液 ( $V_{浓硫酸} : V_{王水} = 1 : 10$ ) 溶解空白磁微球和  $As_2O_3$  磁微球, 磁性分离磁铁粉, 澄清溶液置于 a 瓶中, 加盐酸 5 mL 与水 21 mL 再加碘化钾试液 5 mL, 与酸性氯化亚锡试液 5 滴, 在室温放置 10 min 后, 加无砷锌粒 2 g, 立即接上装有醋酸铅棉花导气管 c 的瓶塞并密塞, 将导管通入盛有 5.0 mL 二乙基二硫代氨基甲酸银试液的吸收管 d 中, 并将 a 瓶置 25~40 °C 水浴中反应 45 min, 使生成的砷化氢与二乙基二硫代氨基甲酸银络合, 取出 d 管, 添加三氯甲烷至刻度, 以空白磁微球组产物为对照, 在 510 nm 测定吸光度, 按照标准曲线进行计算, 结果为 0.26 g·g<sup>-1</sup>。

**2.5 粒度测定** 磁微球超声分散于水溶液中, 用粒度测定仪测定, 不同直径微球所占的分布比见图 1。

### 3 讨论

本试验  $Fe_3O_4$  是一种亲水性物质, 其制备工艺

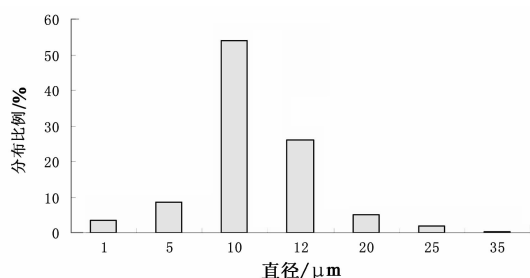


图 1 不同粒径微球的分布

选择了目前比较成型的化学共沉淀法, 较为合适的条件为铁盐溶液和氨水浓度均为 0.5 mol·L<sup>-1</sup>;  $m_{Fe^{2+}} : m_{Fe^{3+}} : m_{OH^-} = 1 : 2 : 6$ ; 搅拌速度为 1 000 r·min<sup>-1</sup>。因为其与有机溶剂很难混合, 为了克服这种困难, 我们对其进行表面处理, 用油酸钠对其进行表面修饰后, 增大了它的亲油性, 有助于形成比较稳定的油相;  $As_2O_3$  不溶于水, 我们选择 PBS 缓冲液 (以氢氧化钠和盐酸促溶和调节 pH 7.4) 溶解于水相中, 并用超声分散, 溶剂萃取挥发法制备出磁微球, 方法可行, 但是周期长。

本试验中  $Fe_3O_4$  是磁性微球的内核, 用聚乳酸对磁性微球进行表面修饰, 包埋了抗肿瘤药物  $As_2O_3$ , 因为既要突出其磁响应性, 又要有一定的药效, 所以在正交试验中对二者的比例进行了筛选, 发现其是影响包封率的主要因素。制备的微球的粒径在 10~12  $\mu\text{m}$  (80%), 粒径较大, 尚未解决微球团聚的问题, 希望在以后的实验中能进一步克服。制备工艺中引入超声波法, 不仅提高了反应速率和收率, 而且使磁性微球的粒径分布更窄, 是一种可以借鉴的快速分散方法。

### [参考文献]

- [1] Falnogai, Slejkovec Z, Pucer A, et al. Arsenic metabolism in multiple myeloma and astrocytoma cells[J]. Biol Trace Elem Res, 2007, 116(1): 5.
- [2] Pettersson Hm, Karlsson J, Pietras A, et al. Arsenic trioxide and neuroblastoma cytotoxicity [J]. J Bioenerg Biomembr, 2007, 39(1): 35.
- [3] Subbarayan P R, Lima M, Ardalan B. Arsenic trioxide/ascorbic acid therapy in patients with refractory metastatic colorectal carcinoma: a clinical experie-ncce [J]. Acta Oncol, 2007, 46(4): 557.
- [4] 陈鑫, 吴诚义. 三氧化二砷在实体瘤中的研究现状 [J]. 临床肿瘤学杂志, 2003, 8(3): 229.
- [5] 中国药典. 一部[S]. 2010: 附录 50.

[责任编辑 全燕]