

丁香苦苷固体脂质纳米粒的制备及表征[△]

张喜武^{1*}, 李秋晗¹, 李英鹏², 李永吉³, 徐坐帝¹, 窦金金^{4#}(1.黑龙江中医药大学中医药研究院, 哈尔滨 150040; 2.天津中医药大学中药学院, 天津 301617; 3.黑龙江中医药大学药学院, 哈尔滨 150040; 4.黑龙江中医药大学临床医学院, 哈尔滨 150040)

中图分类号 R943 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)09-1168-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.09.04

摘要 目的:制备丁香苦苷固体脂质纳米粒(SYR-SLN),优化处方,并对其表征。方法:采用乳化蒸发法制备SYR-SLN,以包封率为指标,在单因素试验考察基础上,通过正交试验设计对处方中卵磷脂-单甘酯质量比、有机相-水相体积比、泊洛沙姆188(F68)浓度、投药量进行优化,确定最优处方工艺,考察所制纳米粒的包封率、载药量、形态、粒径、Zeta电位、稳定性等。结果:卵磷脂-单甘酯质量比为3:1,有机相-水相体积比为1:2,F68的浓度为0.4%,投药量为10 mg,最优处方工艺为单甘酯80 mg、卵磷脂240 mg、F68浓度0.4%、SYR 10 mg、无水乙醇5 mL、蒸馏水10 mL,乳化温度为65℃,搅拌速度为600 r/min。所得SYR-SLN的包封率为(42.35±0.60)%($n=3$),载药量为(5.33±0.03)%($n=3$),其外观圆整,分布均匀,平均粒径为(180.30±5.31) nm,Zeta电位为(-41.9±0.8) mV,4℃条件下贮存15 d稳定性良好。结论:本方法成功制得SYR-SLN,且处方工艺简单,包封率高。

关键词 丁香苦苷;固体脂质纳米粒;制备;处方工艺;表征

Preparation and Characterization of Syringopicroside Solid Lipid Nanoparticles

ZHANG Xiwu¹, LI Qiuhan¹, LI Yingpeng², LI Yongji³, XU Zuodi¹, DOU Jinjin⁴ (1.Academy of TCM, Heilongjiang University of TCM, Harbin 150040, China; 2.College of TCM, Tianjin University of TCM, Tianjin 301617, China; 3.College of Pharmacy, Heilongjiang University of TCM, Harbin 150040, China; 4. College of Clinical Medicine, Heilongjiang University of TCM, Harbin 150040, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To prepare Syringopicroside solid lipid nanoparticles (SYR-SLN), and optimize the formula and characterize SYR-SLN. METHODS: SYR-SLN were prepared by emulsion evaporation method. Using entrapment efficiency as index, based on single factor, orthogonal design was adopted to optimize the mass ratio of lecithin-monoglyceride, volume ratio of organ phase to water phase, poloxamer 188 (F68) concentration and drug dosage. The optimal formula technology was established to investigate entrapment efficiency, drug-loading amount, morphology, particle size, Zeta potential, stability, etc. RESULTS: The mass ratio of lecithin-monoglyceride was 3:1; the volume ratio of organic phase to water phase was 1:2; the concentration of F68 was 0.4%; drug dosage was 10 mg. The optimal formula included that monoglyceride 80 mg, lecithin 240 mg, 0.4% F68, syringopicroside 10 mg, absolute ethyl alcohol 5 mL, distilled water 10 mL, emulsification temperature at 65℃ and stirring at 600 r/min. Encapsulation efficiency of SYR-SLN was (42.35±0.60)% ($n=3$); drug-loading amount was (5.33±0.03)% ($n=3$); SYR-SLN had a spherical morphology and was evenly distributed. The average particle size was (180.30±5.31) nm with Zeta potential of (-41.9±0.8) mV, and the SYR-SLN could maintain stable for 15 days at 4℃. CONCLUSIONS: SYR-SLN is prepared successfully, and the technology is simple with high encapsulation efficiency.

KEYWORDS Syringopicroside; Solid lipid nanoparticle; Preparation; Formula technology; Characterization

丁香苦苷(Syringopicroside, SYR)是从木犀科丁香属植物紫丁香的干燥叶中提取得到的单体化合物^[1],具

△ 基金项目:国家自然科学基金青年科学基金资助项目(No.81703719);中国博士后科学基金资助项目(No.2018M631977);黑龙江省自然科学基金资助项目(No.H2018050)

* 副研究员,硕士生导师,博士。研究方向:中药纳米靶向技术。电话:0451-87266827。E-mail:149772105@qq.com

通信作者:副主任医师,博士。研究方向:中西医结合防治心血管病。E-mail:doujinjin1980@126.com

有抗病毒、抗菌、抗炎作用^[2-3],有研究表明SYR对乙型肝炎病毒作用显著^[4-5]。由于SYR属于环烯醚萜苷类化合物,在体内代谢快导致其生物利用度低,限制了该药物的开发。固体脂质纳米粒(Solid lipid nanoparticle, SLN)是一种较为新型的纳米粒给药系统,可控制药物释放,延长药物作用时间,同时也能够起到定位靶向的作用^[6-8]。本研究将SYR研制成SLN制剂,以包封率为考察指标对处方进行了优化,并对最优处方制剂进行了表征,为

SYR新制剂的开发提供参考。

1 材料

1.1 仪器

高效液相色谱仪系统,包括2996-2695Empower色谱工作站(美国Waters公司);85-2A恒温磁力搅拌器(金坛市荣华仪器制造有限公司);Zetasizer-3000HSA Zeta电位分析仪和Mastersizer S激光粒度仪(英国Malvern公司);Tem Tecnaig2透射电子显微镜(荷兰Philips公司)。

1.2 药品与试剂

SYR对照品(批号:20170430,经面积归一化法测定纯度: $>98\%$)、SYR原料药(批号:20170501,纯度: $>95\%$)均由黑龙江中医药大学自制;单硬脂酸甘油酯(单甘脂,湖南尔康制药有限公司,批号:20170324);卵磷脂(上海爱康精细化工有限公司,批号:20170821);泊洛沙姆188(F68,巴斯夫中国有限公司,批号:20170102);葡聚糖凝胶(Sephadex) G-50(瑞典Pharmacia公司);甲醇(美国Dikma公司,色谱纯);其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 SYR-SLN与空白SLN的制备

称取单甘酯100 mg、卵磷脂200 mg、SYR 10 mg,加入10 mL无水乙醇中,加热使溶解,构成有机相;另取0.4% F68(m/V)的水溶液10 mL,加热至与有机相相同温度,构成水相,在1 000 r/min的搅拌速度下,将有机相注入水相中,搅拌1 h,挥发有机溶剂,体积浓缩至5 mL左右,可得半透明纳米乳剂,将所得纳米乳剂在搅拌下快速分散于0~2 °C的稀释相中,继续搅拌2 h,即得SYR-SLN胶体溶液。同时按上述方法制备不含SYR的空白SLN胶体溶液。

2.2 SYR分析方法的建立

2.2.1 色谱条件 色谱柱:ODS- C_{18} (250 mm \times 4.6 mm,5 μ m);流动相:甲醇-水(50:50, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:221 nm;柱温:30 °C;进样量:10 μ L。

2.2.2 溶液的制备 (1)对照品溶液的制备:称取SYR对照品35 mg,精密称定,置于25 mL量瓶中,加入甲醇溶解并稀释定容至刻度,摇匀,制成质量浓度为1.456 mg/mL的SYR对照品溶液。(2)供试品溶液的制备:精密吸取SYR-SLN胶体溶液1 mL,加入甲醇破乳并定容至25 mL量瓶中,1 000 r/min离心10 min,取上清液,即得供试品溶液。(3)空白SLN溶液的制备:精密量取空白SLN胶体溶液1 mL,加入甲醇破乳并定容至25 mL量瓶中,1 000 r/min离心10 min,取上清液,即得空白SLN溶液。

2.2.3 专属性试验 分别取对照品溶液、供试品溶液及空白SLN溶液各10 μ L,按“2.2.1”项下色谱条件进样测

定,记录色谱。结果显示,在该色谱条件下,SYR色谱峰与其他色谱峰的分离度均符合相关标准,表明空白SLN溶液对SYR的测定无干扰,方法的专属性良好。色谱图见图1。

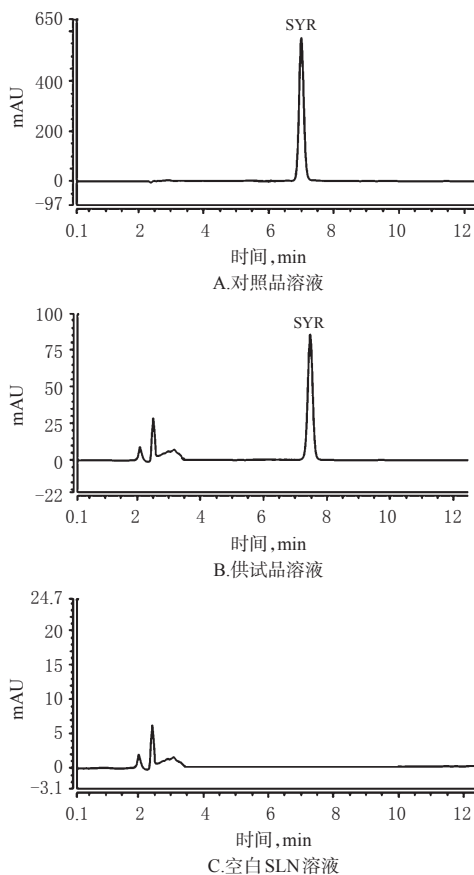


图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.2.4 线性关系考察 精密量取SYR对照品溶液1.0、2.0、4.0、6.25、7.5 mL,置于50 mL量瓶中,制备成系列标准溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样检测,记录峰面积。以峰面积(A)为纵坐标,SYR质量浓度(c)为横坐标,进行回归分析。得回归方程为 $A=16\ 226c-58\ 247$ ($R^2=0.999\ 9$),结果表明,SYR在29.1~218.4 μ g/mL质量浓度范围内与峰面积呈良好的线性关系。

2.2.5 精密度试验 精密量取SYR对照品溶液适量,制备成质量浓度为58.18 μ g/mL的标准溶液,按“2.2.1”项下色谱条件,同日连续进样6次,考察日内精密度;每日进样1次,连续测定6 d,考察日间精密度。结果显示,日内RSD=0.81% ($n=6$),日间RSD=0.93% ($n=6$),表明本方法日内、日间精密度良好。

2.2.6 准确度试验 取已知SYR含量的供试品溶液9份,分别加入质量浓度为50、55、60 μ g/mL的SYR溶液,每个浓度各3份,按“2.2.1”项下色谱条件进样检测,记录峰面积,以测得值与真实值的比值计算回收率。结果显示,平均回收率为100.49%、100.04%、99.05% ($n=3$),

总平均回收率为99.86% (RSD<2%, n=3), 符合含量测定要求。

2.2.7 重复性试验 平行量取同一批供试品溶液6份, 按“2.2.1”项下色谱条件进样检测, 记录峰面积。结果显示, 峰面积的RSD=0.67% (n=6), 表明本方法重复性良好。

2.2.8 稳定性试验 精密量取供试品溶液, 室温下放置0、2、4、8、12、18、24 h后, 按“2.2.1”项下色谱条件进样检测, 记录峰面积, 计算含量。结果显示, SYR含量分别为58.11、57.79、57.91、57.62、57.24、57.13、57.07 μg/mL, RSD=0.71% (n=7), 表明供试品溶液在24 h内基本稳定。

2.3 包封率和载药量检测

精密量取SYR-SLN胶体溶液, 加入至Sephadex G-50凝胶柱顶部, 蒸馏水洗脱, 分离出游离的SYR溶液。取游离的SYR溶液, 用甲醇破乳并定容至25 mL量瓶中, 1 000 r/min离心10 min, 取上清液10 μL, 按“2.2.1”项下色谱条件进样检测, 计算游离SYR的含量。再计算SYR-SLN的包封率和载药量, 包封率(%)=($W_{总}-W_{游离}$)/ $W_{总}$ ×100%, 载药量(%)=($W_{总}-W_{游离}$)/ W_p ×100%, 式中 $W_{总}$ 表示SYR-SLN胶体溶液中SYR的总含量; $W_{游离}$ 表示游离SYR的含量; W_p 表示SYR-SLN的总量。

2.4 SYR-SLN处方筛选与优化

2.4.1 单因素试验 在预试验的基础上, 以包封率为考察指标, 对乳化剂的选择、乳化剂用量、有机相中乳化剂与载体材料比例、载体材料用量、投药量、有机相-水相比例、搅拌速度、乳化条件进行了单因素考察, 确定选用卵磷脂和F68为乳化剂, F68浓度为0.4%, 有机相中卵磷脂-单甘酯质量比为3:1, 单甘酯用量为80 mg, 投药量为10 mg, 有机相-水相体积比为1:2, 搅拌速度为600 r/min, 乳化温度为65℃时SYR-SLN的包封率最高。

2.4.2 正交试验 在单因素试验的基础上, 确定以卵磷脂-单甘酯质量比(A)、有机相-水相体积比(B)、F68浓度(C)、投药量(D)为考察因素, 包封率为考察指标, 采用 $L_9(3^4)$ 的正交试验设计方案, 每个因素取3个水平。因素与水平见表1, 正交试验设计与结果见表2, 方差分析结果见表3。

表1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

水平	因素			
	A	B	C, %	D, mg
1	2:1	1:1	0.2	8
2	3:1	1:2	0.4	10
3	4:1	1:4	0.8	12

由表2中R结果可知, 4个因素对包封率的影响程度为A>B>C>D。

表2 正交试验设计与结果

Tab 2 Design and results of orthogonal tests

序号	A	B	C, %	D, mg	包封率, %
1	2:1	1:1	0.2	8	33.88
2	2:1	1:2	0.4	10	34.56
3	2:1	1:4	0.8	12	28.25
4	3:1	1:1	0.4	12	38.90
5	3:1	1:2	0.8	8	39.19
6	3:1	1:4	0.2	10	37.92
7	4:1	1:1	0.8	10	25.93
8	4:1	1:2	0.2	12	26.51
9	4:1	1:4	0.4	8	25.26
K_1	32.230	32.903	32.770	32.777	
K_2	38.670	33.420	32.907	32.803	
K_3	25.900	30.477	31.123	31.220	
R	12.770	2.943	1.784	1.583	

表3 方差分析结果

Tab 3 Results of analysis of variance

因素	偏差平方和	自由度	F比	F临界值	P
A	244.615	2	49.608	19.000	<0.05
B	14.819	2	3.005	19.000	
C	5.910	2	1.199	19.000	
D	4.931	2	1.000	19.000	
误差	4.930	2			

由表3结果可知, 除因素A对试验结果具有显著影响外, 其他因素的影响均不显著。综合考虑, 确定最优处方为 $A_2B_2C_2D_2$, 即卵磷脂-单甘酯质量比为3:1, 有机相-水相体积比为1:2, F68浓度为0.4%, 投药量为10 mg。

2.5 最优处方工艺验证

按“2.4”项下结果, 确定最优处方工艺: 称取10 mg SYR、240 mg卵磷脂、80 mg的单甘酯, 加入5 mL无水乙醇中, 加热使之完全溶解, 构成有机相; 另取0.4%的F68水溶液10 mL, 水浴加热至与有机相相同温度, 构成水相, 在65℃水浴中, 600 r/min的搅拌速度下, 将有机相注入水相中, 乳化1 h, 挥发有机溶剂, 体积浓缩至5 mL左右, 将所得纳米乳剂在搅拌下快速分散于5 mL 0~2℃的稀释相中, 继续搅拌1.5 h, 即得SYR-SLN的胶体溶液。按上述处方工艺制备3批SYR-SLN的胶体溶液, 再按“2.3”项下方法考察其包封率和载药量, 结果显示, 3批样品的工艺稳定、重现性好。验证试验结果见表4。

表4 验证试验结果

Tab 4 Results of validation tests

指标	批次			$\bar{x} \pm s$
	1	2	3	
包封率, %	41.78	42.30	42.97	42.35±0.60
载药量, %	5.30	5.34	5.35	5.33±0.03

2.6 SYR-SLN的表征

2.6.1 粒子形态 (1)肉眼观察。用肉眼对SYR-SLN进行观察, 显示SYR-SLN为透明略带乳光的澄清液体,

无沉淀及粒子存在。SYR-SLN的外观见图2。

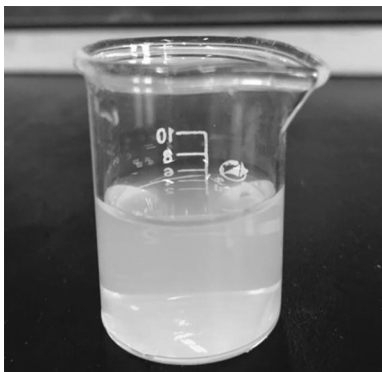


图2 SYR-SLN的外观

Fig 2 Appearance of SYR-SLN

(2)透射电镜观察。取SYR-SLN胶体溶液稀释后,滴于封口膜上,用镊子轻轻夹取涂好膜的铜网,放在SYR-SLN液滴上,漂浮沾取样品后用镊子将铜网置于2%磷钨酸染液上漂浮染色,干燥完成后用透射电镜进行观察并拍照。结果显示,SYR-SLN呈类球形实体粒子,外观圆整,分布均匀。SYR-SLN的透射电镜图见图3。

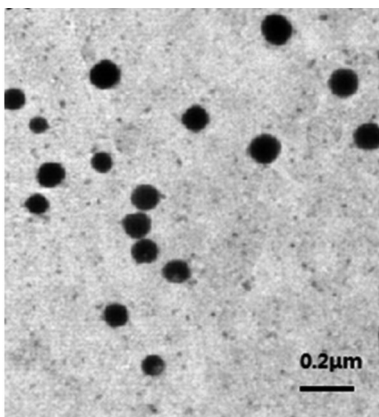


图3 SYR-SLN的透射电镜图($\times 16\ 500$)

Fig 3 TEM of SYR-SLN($\times 16\ 500$)

2.6.2 粒径分布与Zeta电位 用激光粒度仪及Zeta电位分析仪对SYR-SLN的粒径与Zeta电位进行测定。结果显示,SYR-SLN的平均粒径为 (180.30 ± 5.31) nm($n=3$),Zeta电位为 (-41.9 ± 0.8) mV。SYR-SLN的粒径分布见图4,Zeta电位分布见图5。

2.6.3 稳定性 将3批SYR-SLN样品于室温(25 ℃)及4 ℃冰箱冷藏保存,分别于0、1、3、7、15 d取样,肉眼观察外观,并检测其包封率,考察稳定性。SYR-SLN在15 d内的外观变化结果见表5,稳定性试验结果见表6。

从表4和表5结果可知,SYR-SLN在4 ℃条件下存放15 d,外观均匀,包封率几乎无变化。25 ℃条件下,SYR-SLN包封率随存放时间的延长明显下降,当存放7 d时,肉眼可见少许絮凝,且包封率有所降低;当存放15

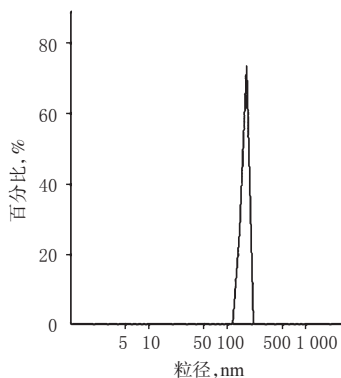


图4 SYR-SLN的粒径分布

Fig 4 Particle size distribution of SYR-SLN

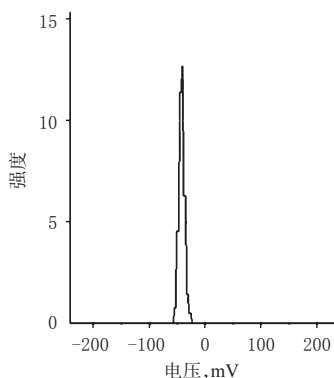


图5 SYR-SLN的Zeta电位分布

Fig 5 Zeta potential distribution of SYR-SLN

表5 SYR-SLN在15 d内的外观变化($n=3$)

Tab 5 Appearance changes of SYR-SLN within 15 days($n=3$)

温度, ℃	外观				
	0 d	1 d	3 d	7 d	15 d
4	-	-	-	-	-
25	-	-	-	±	+

注:“-”表示不分层,无沉淀;“±”表示不分层,有少许絮凝,振荡后可复原;“+”表示分层,有不可逆沉淀

Note:“-” means no stratification, no precipitation;“±” means no stratification, a little flocculation recovered after shaking;“+” means stratification, irreversible precipitation

表6 SYR-SLN在15 d内的稳定性试验结果($n=3, \%$)

Tab 6 Results of stability tests of SYR-SLN within 15 days($n=3, \%$)

温度, ℃	0 d	1 d	3 d	7 d	15 d	RSD
4	42.30	42.28	42.29	41.85	40.76	1.58
25	42.30	41.98	41.05	39.85	36.94	5.36

d时,出现不可逆沉降,且包封率明显下降。由此表明,SYR-SLN在4 ℃条件下存放15 d内比较稳定。

3 讨论

SYR-SLN的制备方法有很多,如薄膜超声法、微乳法、复乳法和乳化蒸发法、乳化聚合法、溶剂分散法等^[9-11]。本研究考虑SYR亲水性极强,其中乳化聚合法、

复乳法及乳化蒸发法均适合于水溶性药物。预试验发现,复乳法所制SYR-SLN粒径较大,稳定性不好;乳化聚合法制备SYR-SLN,得到的包封率较好,但载药量极低;乳化蒸发法制备得到SYR-SLN的包封率和载药量都很高,并且粒径圆整、不粘连。另外笔者还比较了薄膜超声法、乳化蒸发法、溶剂分散法所制SYR-SLN的包封率,结果发现,还是乳化蒸发法制备的SYR-SLN包封率最高,所以确定用乳化蒸发法作为SYR-SLN的制备方法。

在单因素考察过程中,虽然单独使用卵磷脂作为乳化剂的包封率较高,但所得纳米粒粘连、大小不均匀、粒径偏大;单独使用F68所得纳米粒大小均匀、粒径小,但包封率较低。F68是一种亲水性表面活性剂,与卵磷脂合用作为乳化剂能得到较小的粒径和较高包封率,且稳定性好。因此选择卵磷脂和F68合用作为乳化剂。其中F68作为水相的主要成分,而卵磷脂是有机相的成分之一,故在考察乳化剂和载体材料的质量比时,只选择了卵磷脂与单甘脂进行比较。

包封率是评价SYR-SLN的重要指标,测定SLN包封率的方法有多种,如葡聚糖凝胶柱法、鱼精蛋白沉淀法、冷冻超速离心法、微型柱法、透析法及超滤法等,其原理都是采用一定的方法使包封的药物与游离药物分离,测定包封或游离药物的浓度,计算包封率^[12-13]。透析法将纳米粒溶液注入到适当的透析袋内,利用游离药物可透过半透膜而纳米粒不能透过的原理,从而达到分离的目的^[14]。但是透析法时间较长,并且过程中会导致包封在纳米粒中的药物泄露,因此所测得包封率偏低。超速离心法是利用纳米粒与其分散介质密度的不同而达到分离的目的,对设备的要求较高,操作费时且能源消耗较大。葡聚糖凝胶柱层析法是利用分子筛的原理,使混合组分依据分子的大小不同而得到分离^[15],纳米粒由于其分子比游离药物大,不易进入凝胶内部而先被洗脱,游离药物后被洗脱。该法操作简便,避免了超速离心法在离心过程中可能发生的纳米粒变形与破裂现象。因此,最终选用葡聚糖凝胶柱层析法作为SYR-SLN测定包封率的方法。

综上所述,本研究成功制得SYR-SLN,且处方工艺简单、包封率高。

参考文献

- [1] 张树军,时志春,王丹,等.紫丁香树叶化学成分研究[J].中草药,2018,49(16):3747-3757.
- [2] 于陶钧,王立波,吴立军.丁香属植物化学成分及药理作用研究进展[J].安徽农业科学,2016,44(2):168-170.
- [3] 管庆霞,于欣,吕邵娃,等.包载丁香苦苷和羟基酪醇的mPEG-PLGA纳米粒处方与制备工艺的优化[J].中成药,2017,39(12):2508-2512.
- [4] ZHANG XW, LV SW, LI YJ, et al. Preparation, characterization and in vivo distribution of solid lipidnanoparticles loaded with syringopicroside[J]. *Die Pharmazie*, 2011, 66(6):404-407.
- [5] 宋光西,马玲云,魏锋,等.丁香属植物的化学成分分类及药理作用研究进展[J].亚太传统医药,2011,7(5):179-181.
- [6] 夏爱晓,宋倩倩,孙渊.固体脂质纳米粒制备及应用研究进展[J].药学实践杂志,2012,30(5):331-333,368.
- [7] 吉顺莉,倪华,何磊.川芎嗪固体脂质纳米粒的制备及质量评价[J].沈阳药科大学学报,2017,34(8):629-633,639.
- [8] 管庆霞,华晓丹,李伟男,等.载中药肝靶向纳米给药系统的研究进展[J].中国药房,2015,26(7):1002-1005.
- [9] 丁立新,柴佳丽,李焕,等.固体脂质纳米粒的研究新进展[J].中国民康医学,2014,26(20):69-71.
- [10] 冯炜玮,陈志伟.固体脂质纳米粒制备方法的研究进展[J].中国医药生物技术,2011,6(3):218-221.
- [11] 李楠,李旭,刘伟伟,等.姜黄素固体脂质纳米粒干粉吸入剂的体外释药、体内急性毒性及对哮喘模型小鼠炎症反应的影响[J].中国药房,2019,30(3):332-338.
- [12] 邵红霞,奉建芳,龙晓英.脂质体包封率的测定方法[J].中南药学,2009,3(7):212-214.
- [13] 鞠静红,张志荣,韩静,等.穿琥宁脂质体包封率的测定[J].中国医药工业杂志,2008,39(7):514-516.
- [14] 蔡晓瑶,张莉,任翔,等.离心法和透析法测定蟾皮提取物固体脂质纳米粒包封率的比较[J].国际药学研究杂志,2016,43(4):744-747.
- [15] 万胜利,钟萌,赵德璋,等.葡聚糖凝胶柱色谱法测定姜黄素囊泡包封率[J].激光杂志,2015,36(2):142-144.

(收稿日期:2019-01-03 修回日期:2019-03-15)

(编辑:邹丽娟)