

毛蕊花苷固体脂质纳米粒的处方优选及其质量评价^Δ

丁立新*, 杨珊珊, 张楠楠, 李 焕, 李冬阳, 王丽红(佳木斯大学药学院黑龙江省生物药剂剂重点实验室, 黑龙江佳木斯 154007)

中图分类号 R284.2;R283 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)03-0231-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.03.13

摘要 目的: 优选毛蕊花苷(VER)固体脂质纳米粒(SLN)的处方, 并对VER-SLN质量进行评价。方法: 采用乳化超声分散法制备VER-SLN, 以包封率为评价指标, 以药脂质量比、单硬脂酸甘油酯用量、泊洛沙姆188用量、豆磷脂用量为考察因素, 通过正交试验对处方进行优化, 同时以载药量、粒径、Zeta电位、包封率、稳定性及体外累积释放度为指标评价其质量。结果: 最佳制备处方为药脂质量比为1:75, 单硬脂酸甘油酯的用量为0.6 g, 泊洛沙姆188用量为0.5 g, 豆磷脂用量为0.2 g。所制得的VER-SLN外观形态圆整, 粒度分布均匀, 平均粒径为(109±17) nm, Zeta电位为(-23±0.91) mV, 平均包封率为96.66%, 平均载药量为2.27%。体外释放结果表明, VER原料药体外8 h累积释放完全, VER-SLN体外4 h累积释放率为47.2%, 48 h可达到92.9%。结论: 该制剂处方设计合理, 制备工艺稳定, 乳化超声分散法制备的VER-SLN质量符合要求, 可达到使药物缓慢释放的效果。

关键词 毛蕊花苷; 固体脂质纳米粒; 质量研究; 体外累积释放度

Preparation Optimization and Quality Evaluation of Verbascoside Solid Lipid Nanoparticles

DING Li-xin, YANG Shan-shan, ZHANG Nan-nan, LI Huan, LI Dong-yang, WANG Li-hong (Pharmacy School of Jiamusi University, Heilongjiang Key Lab of Biological Preparations, Heilongjiang Jiamusi 154007, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the prescription of Verbascoside solid lipid nanoparticles (VER-SLN) and to evaluate the quality of it. METHODS: VER-SLN was prepared by emulsion ultrasound dispersing method. The formulation of VER-SLN was optimized by orthogonal design with the entrapment efficacy as index using the ratio of drug to lipid, amount of glyceryl monostearate, poloxamer 188 and fabaceous lecithin as factors. The quality of preparation was evaluated with drug-loading amount, particle size, Zeta potential, entrapment efficiency, stability and in vitro drug release rate as index. RESULTS: The optimal formulation was as follows: drug:lipid ratio of 1:75(m/m), the amount of glycerol glyceryl monostearate of 0.6 g, the amount of poloxamer 188 of 0.5 g and the amount of fabaceous lecithin of 0.2 g. The obtained VER-SLN was round and smooth particles with average size of (109±17) nm, Zeta potential of (-23±0.91) mV, average entrapment efficiency of 96.66%, and average drug-loading amount of 2.27%. VER solution was released completely within 8 h, and accumulative release rate of VER-SLN was 47.2% at 4 h and reached 92.9% at 48 h. CONCLUSIONS: The formulation is reasonable and stable. VER-SLN prepared by emulsification ultrasonic dispersion method is up to quality standard and can reach sustained-release effects.

KEYWORDS Verbascoside; Solid lipid nanoparticle; Quality study; In vitro drug release rate

固体脂质纳米粒(SLN)是20世纪90年代初发展起来的新剂型给药系统^[1], 是以固态类脂化合物(天然或合成)为载

体, 将药物包裹于类脂核中制成的固态胶粒, 是一种理想的载体材料^[2-3]。将药物制成SLN不仅可以提高生物利用度^[4-5], 而

- 药房, 2006, 17(2): 103.
- [2] 王小平, 曹立明. 遗传算法: 理论、应用及软件实现[M]. 西安: 西安交通大学出版社, 2001: 1-344.
- [3] Horn J, Nafpliotis N, Goldberg DE. A niched pareto genetic algorithm for multiobjective optimization[C]//Piscataway: IEEE World Congress on Computational Computation, 1994: 82-87.
- [4] 仇丽霞. 基于遗传算法的最优决策值选择及医药学应用研究[D]. 太原: 山西医科大学, 2007.
- [5] 师先锋. 小生境遗传算法效果评价及程序测试[J]. 中国卫生统计, 2011, 28(4): 361.
- [6] 李飞莹. 基于小生境遗传算法的多目标药物提取条件优化分析应用[J]. 中国卫生统计, 2010, 27(6): 577.
- [7] 白云娥. 金莲花的质量标准及其总黄酮的提取、富集工艺研究[D]. 太原: 山西医科大学, 2008.
- [8] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海: 上海人民出版社, 1977: 1-2 769.
- [9] 叶绍明, 李药兰. 金莲花提取工艺[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(6): 463.

^Δ 基金项目: 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(No.12521559); 佳木斯大学大学生科技创新项目(No.xs2013-127); 佳木斯大学科学技术重点项目(No.Sjz2012-24)

* 教授, 硕士研究生导师。研究方向: 天然产物分离与分析。电话: 0454-8611271。E-mail: dlx200475@163.com

(收稿日期: 2013-01-27 修回日期: 2013-04-25)

且还具有延缓释放和靶向性作用^[6-7]。

毛蕊花苷(VER)为桂花的主要有效成分之一^[8],该类化合物生物活性很强,具有保肝护肝、抗菌、抗炎、抗肿瘤、抗氧化及免疫调节等诸多作用^[9]。国内、外对VER的研究多集中在品种资源、细胞学以及挥发性、精油成分方面,而对VER-SLN鲜有研究。笔者结合VER的结构及药理特性,选用毒性低、生物相容性好的载体材料制备VER-SLN,旨在提高VER的疗效,延长其在体内的作用时间。

1 材料

1.1 仪器

DF-101S集热式恒温磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限公司);TGL-16M台式高速冷冻离心机(长沙平凡仪器仪表有限公司);1100高效液相色谱(HPLC)仪(美国安捷伦公司);UV-757紫外分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);JEM-2100透射电子显微镜(日本电子公司);Zeta PALS高分辨率Zeta电位及粒度分析仪(美国布鲁克海文仪器公司);KQ-600KDE台式高功率数控超声波清洗器(上海玖梧实业有限公司,功率:400 W,频率:40 kHz)。

1.2 试剂

VER对照品(中国食品药品检定研究院,批号:111530-200706,纯度:99.5%);VER原料药(黑龙江省生物药制剂重点实验室自制,经HPLC测定,纯度为98%);单硬脂酸甘油酯(哈尔滨市新达化工厂,批号:20110309);注射用豆磷脂(北京奥博星生物技术有限责任公司,批号:20110129);泊洛沙姆188(德国BASF公司);甲醇(色谱纯,天津市科密欧化学试剂有限公司);95%乙醇(分析纯,天津富宇精细化工有限公司)。

2 方法与结果

2.1 VER-SLN的制备

采用乳化超声分散法制备。称取处方量单硬脂酸甘油酯0.6013 g,加热到70℃使之熔融,将精密称取的处方量VER对照品8.1 mg分散到磁力搅拌下熔融的单硬脂酸甘油酯中,混合均匀构成油相;另称取0.2001 g注射用豆磷脂、0.5072 g泊洛沙姆188,置于20 ml注射用水中,超声混合均匀,形成水相。将加热的水相以10 ml/min左右速度滴加入温度相同的油相中,70℃、2 000 r/min磁力搅拌5 min,制得初乳,趁热将初乳置于超声波细胞粉碎机中超声8 min,冰水浴冷却,0.45 μm微孔滤膜滤过,即得VER-SLN。取不含VER原料药的处方中辅料各适量,按上述方法制备空白SLN。

2.2 包封率及载药量的测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱:Agilent ZORBAX SB-C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-水(70:30, V/V);流速:1.0 ml/min;检测波长:331 nm;进样量:10 μl;柱温:室温。色谱见图1。

2.2.2 线性关系考察 精密称取VER对照品5 mg,用甲醇定容至100 ml量瓶中,振摇,作为VER贮备液。分别精密量取此贮备液0.1、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 ml,置10 ml量瓶中,加甲醇定容,制备成不同质量浓度的对照品溶液。分别吸取各对照品溶液10 μl,注入HPLC仪,按“2.2.1”项下色谱条件测定。以峰面积积分值(y)对VER质量浓度(x)进行线性回归,得回归方程为 $y=7\,146.7x+2.9541$ ($r=0.9991, n=6$)。结果表明,VER质量浓度在0.5~20.0 μg/ml范围内与峰面积积分值呈良好线性关系。

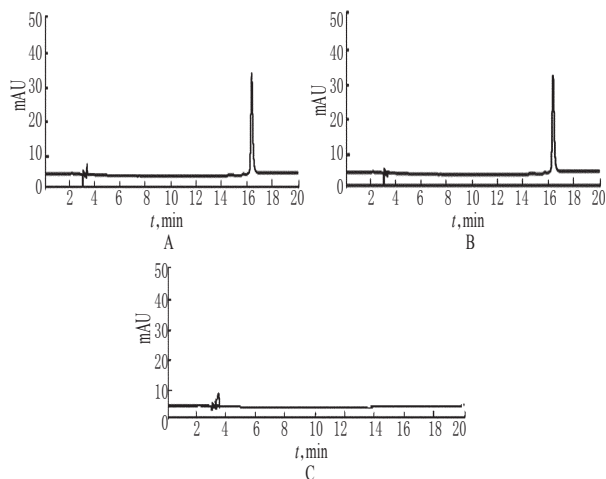


图1 高效液相色谱图

A.VER对照品;B.VER-SLN;C.空白SLN

Fig 1 HPLC chromatograms

A.VER control;B.VER-SLN; C. blank SLN

2.2.3 精密度试验 分别制备低、中、高(5.0、10.0、20.0 μg/ml)质量浓度的对照品溶液,各取10 μl,按“2.2.1”项下色谱条件测定,在1 d内连续进样5次,测定日内精密度;连续5 d分别进样,测定日间精密度。结果显示,日内精密度的RSD分别为1.39%、0.74%、0.83%(n均为5),日间精密度的RSD分别为2.54%、0.78%、0.64%(n均为5),表明仪器精密度良好。

2.2.4 加样回收率试验 取空白SLN混悬液3份,各1.0 ml,分别准确加入低、中、高(5.0、10.0、20.0 μg/ml)质量浓度的VER对照品溶液1.0 ml,按“2.2.1”项下色谱条件测定VER含量,并计算加样回收率。结果显示,平均加样回收率分别为100.4%、101.2%、100.5%,RSD分别为0.94%、0.71%、0.88%(n均为3)。

2.2.5 包封率及载药量的测定 采用离心超滤法测定包封率。精密吸取载药纳米粒胶体分散体5 ml,放入干燥洁净的超滤离心管内,以离心半径为16 cm、5 000 r/min离心10 min,取上清液过膜,按“2.2.1”项下色谱条件测定游离药物质量浓度(WF);另精密吸取等量的VER-SLN混悬液,加入甲醇后超声破乳并稀释相同的倍数,离心后取上清液适量,同法测定SLN中VER总质量浓度(WT)。按下式计算药物包封率和载药量:包封率=(WT-WF)/WT×100%;载药量=(WT-WF)/WLIPID×100%(式中,WLIPID为脂质材料的质量浓度)。

2.3 VER-SLN的处方优化

在单因素试验基础上,选取药脂质量比(A)、单硬脂酸甘油酯用量(B)、泊洛沙姆188用量(C)、豆磷脂用量(D)为考察因素,以包封率为评价指标,用L₉(3⁴)正交表进行筛选。因素与水平见表1;正交试验结果见表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,g	C,g	D,g
1	1:75	0.4	0.5	0.1
2	1:65	0.5	0.6	0.2
3	1:55	0.6	0.7	0.3

由表2、表3可知,各因素影响处方组成的主次顺序是C>A>D>B,其中因素C即泊洛沙姆188用量对方剂的影响有统

表2 正交试验结果

Tab 2 Results of orthogonal test

试验号	A	B	C	D	包封率, %
1	1	1	1	1	97.65
2	1	2	2	2	97.75
3	1	3	3	3	89.87
4	2	1	2	3	84.30
5	2	2	3	1	83.10
6	2	3	1	2	87.75
7	3	1	3	2	93.40
8	3	2	1	3	94.26
9	3	3	2	1	94.37
K_1	95.09	91.78	96.55	85.04	
K_2	81.72	85.04	92.14	96.30	
K_3	94.67	93.99	82.12	89.48	
R	13.37	8.95	14.43	11.26	

表3 方差分析结果

Tab 3 Analysis of variance

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F	P
A	168.43	2	45.00	14.61	
B	15.37	2	10.67		
C	350.90	2	32.54	38.66	<0.05
D	134.20	2	5.34	11.50	

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$; $F_{0.01}(2, 2) = 99.00$

note: $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$; $F_{0.01}(2, 2) = 99.00$

计学意义 ($P < 0.05$)。最优处方为 $A_1B_3C_1D_2$, 即 $m(\text{药}) : m(\text{脂}) = 1 : 75$, 脂质用量为 0.6 g, 泊洛沙姆 188 用量为 0.5 g, 豆磷脂用量为 0.2 g。

2.4 处方验证试验

按上述最优处方制备 3 批 VER-SLN, 照“2.2”项下方法测定 VER-SLN 的包封率和载药量。结果显示, 3 批 VER-SLN 的包封率分别为 96.07%、96.58%、97.34%, 平均包封率为 96.66% ($RSD = 1.74\%$, $n = 3$); 载药量分别为 2.21%、2.29%、2.30%, 平均载药量为 2.27% ($RSD = 1.35\%$, $n = 3$)。包封率与正交试验最高值相当, 表明所选处方合理、可行、重现性好。

2.5 VER-SLN 的形态观察

将适量 VER-SLN 混悬液用重蒸馏水稀释 20 倍后, 用 2% 的磷钨酸负染, 滴加在覆盖碳膜的铜网上, 自然干燥后, 用透射电镜观察其形态。结果显示, VER-SLN 为类球形实体粒子, 且粒径分布较均匀。VER-SLN 的透射电镜图见图 2。

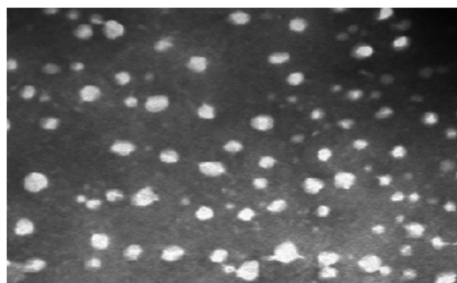


图2 VER-SLN 的透射电镜图

Fig 2 Morphology of VER-SLN under TEM

2.6 VER-SLN 粒径和 Zeta 电位的测定

用适量蒸馏水稀释按最优处方制备的 VER-SLN 混悬液, 并测定 VER-SLN 粒径和 Zeta 电位。结果显示, VER-SLN 的平均粒径为 $(109 \pm 17) \text{ nm}$, Zeta 电位为 $(-23 \pm 0.91) \text{ mV}$ 。

VER-SLN 的粒径分布图见图 3; VER-SLN 的 Zeta 电位图见图 4。

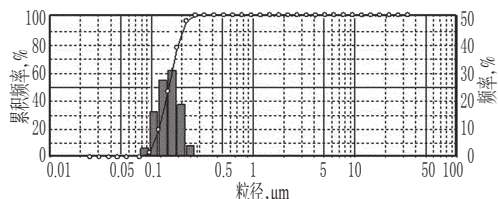


图3 VER-SLN 的粒径分布图

Fig 3 Particle size distribution of VER-SLN

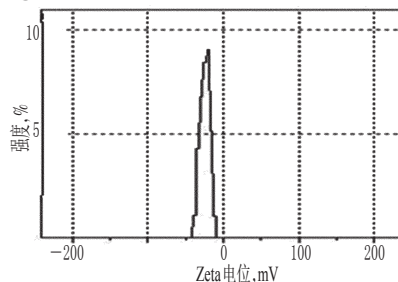


图4 VER-SLN 的 Zeta 电位图

Fig 4 Zeta potential of VER-SLN

2.7 稳定性考察

取 VER-SLN 混悬液适量, 分别放置于室温下 ($25\text{ }^\circ\text{C}$) 及冰箱内 ($4\text{ }^\circ\text{C}$), 观察不同时间其外观及稳定性变化。结果, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 下 VER-SLN 在 15 d 内外观保持澄清, 粒径及 Zeta 电位基本无变化, 稳定性好; 而在室温 ($25\text{ }^\circ\text{C}$) 下, 7 d 内其稳定性良好。稳定性试验结果见表 4。

表4 稳定性试验结果 ($n = 3$)

Tab 4 Results of stability tests ($n = 3$)

温度, $^\circ\text{C}$	时间, d	外观	平均粒径, nm	Zeta 电位, mV	包封率, %	载药量, %
4	1	澄清	109 ± 15	-23 ± 0.81	96.58	2.27
	7	澄清	124 ± 17	-21 ± 0.47	94.76	2.28
	15	澄清	130 ± 25	-24 ± 0.56	91.23	2.23
	30	浑浊	139 ± 16	-22 ± 0.77	85.06	2.01
25	1	澄清	108 ± 15	-23 ± 0.45	96.08	2.25
	7	澄清	169 ± 23	-20 ± 0.51	94.42	2.18
	15	浑浊	289 ± 11	-18 ± 0.14	78.15	1.57

2.8 体外累积释放率测定

精密量取 3.0 ml 的 VER-SLN 混悬液, 放入预先处理好的透析袋中 (截留分子量: 12 000), 两端用细线系紧, 放入装有 300 ml 释放介质的溶出杯中。试验条件: 释放介质为 pH 7.4 磷酸盐缓冲液, 水浴温度为 $37\text{ }^\circ\text{C}$, 转速为 100 r/min, 分别于 0.5、1、2、4、8、12、24、48 h 取样 3 ml, 同时补液 3 ml, 取出的释放介质经 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤后按“2.2.1”项下色谱条件测定, 并对 VER-SLN 累积释药数据进行拟合; 采用相同方法考察 VER 原料药的体外释放率。VER 原料药和 VER-SLN 的累积释放曲线见图 5; VER-SLN 累积释放率拟合方程见表 5。

由图 5、表 5 可知, VER 原料药在 8 h 内的累积释放率已达到 100%; VER-SLN 在 4 h 的累积释放率为 47.2%, 48 h 时可达 92.9%, 可见 VER-SLN 与 VER 原料药相比, 具有明显的缓释作用。Weibull 模型的 r 最接近 1, 说明方程拟合度较好, VER-SLN 的释放结果更符合 Weibull 模型的释放规律。

3 讨论

3.1 脂质材料和乳化剂的选择

笔者采用单硬脂酸甘油酯作为脂质材料。脂质材料在常

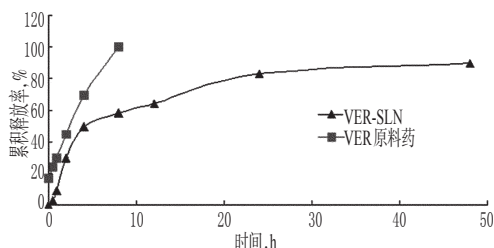


图5 VER原料药和VER-SLN的累积释放曲线($n=3$)

Fig 5 Accumulative release curve of VER and VER-SLN ($n=3$)

表5 VER-SLN 累积释放率拟合方程

Tab 5 Fitting equation of accumulative release percentage of VER-SLN

模型	拟合方程	r
零级模型	$Q=0.2470t+0.03754$	0.96561
一级模型	$\ln[1-Q]=-0.0481t+2.1285$	0.91258
Higuchi模型	$Q=0.16980t^{1/2}$	0.96230
Weibull模型	$\ln \ln[1/(1-Q)]=0.4131nt-1.806$	0.99474

温下为固态,只有在高于其熔点的制备温度下才能使乳化成为可能,但是温度太高将影响乳化剂的乳化能力,故温度应控制在脂质材料熔点以上5~10℃。由于单硬脂酸甘油酯的熔点为60℃,故本试验的温度选择70℃。一般情况下,复合型乳化剂可有效降低粒径^[10],故本试验选用复合型乳化剂泊洛沙姆188。

3.2 电位对SLN的影响

Zeta电位与SLN体系的稳定性关系密切。一般来说,高Zeta电位体系由于电荷间的排斥作用,粒子间凝聚几率减小,体系更为稳定。但是,在测定制剂的Zeta电位时,必须明确该数值产生的测定条件,如稀释介质、稀释倍数等,否则所得数值没有意义^[11]。本试验以重蒸馏水为稀释介质,稀释20倍测定VER-SLN的Zeta电位。结果显示,制备得到的VER-SLN表面带有负电荷,其Zeta电位为 (-23 ± 0.91) mV,绝对值虽然不高,但加上泊洛沙姆188分子的空间位阻作用,体系仍比较稳定。

3.3 包封率和载药量的测定

笔者选择离心超滤法测定了纳米粒的包封率。结果显示,制得的VER-SLN的包封率较高,推测可能是泊洛沙姆188对VER的增溶效果较小,在制备的过程中,溶解在水相中的VER较少,因而有较多的VER被包封进纳米粒的内部造成

的。由包封率的试验结果可知,表面活性剂的性质对纳米粒的包封率有较大影响。

3.4 体外释放率的测定

试验中,纳米粒在初期释放很快,这部分的释放是游离药物和纳米粒表面吸附药物共同释放的结果。其后,纳米粒的释放趋于平缓,主要是药物从固体骨架中扩散出来,载体材料降解或溶解,使药物随之而释放。VER原料药体外8h释放完全,而VER-SLN 48h累积释放出92.9%,由此可以说明SLN具有延长药物释放的作用。

参考文献

- [1] Muller RH, Mader K, Gohla S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery-a review of the state of the art [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2000, 50(1): 161.
- [2] 应晓英,胡富强,袁弘.卡马西平硬脂酸固体脂质纳米粒的制备与理化性质研究[J]. *中国医药工业杂志*, 2002, 33(11): 543.
- [3] 琚辉,郝存江,尹飞,等.姜黄素固体脂质纳米粒的制备及表征[J]. *药物评价研究*, 2010, 33(6): 420.
- [4] Weiss J, Decker EA, McClements DJ, et al. Solid lipid nanoparticles as delivery systems for bioactive food components[J]. *Food Biophysics*, 2008, 3(2): 146.
- [5] Esposito E, Fantin M, Marti M, et al. Solid lipid nanoparticles as delivery systems for bromocriptine[J]. *Pharm Res*, 2008, 25(7): 1521.
- [6] 韩静,李智,岑琴,等.紫杉醇固体脂质纳米粒的制备和质量评价[J]. *中草药*, 2008, 39(7): 996.
- [7] 许海玉,张铁军,赵平,等.中药缓控释制剂的研究现状及研发思路[J]. *药物评价研究*, 2010, 33(1): 30.
- [8] 杨康民,朱文江.桂花[M].上海:上海科学技术出版社, 2000: 175-177.
- [9] 胡蕾,刘松青,戴青.醋酸布舍瑞林纳米粒的制备及体外释放特性研究[J]. *中国药房*, 2010, 21(29): 2759.
- [10] 陈锋,金日显,陈燕军.纳米结构脂质载体研究进展[J]. *中国新药杂志*, 2008, 17(6): 456.
- [11] 王艳芝,郑甲信,王海玲,等. β -榄香烯固体脂质纳米粒Zeta电位影响因素检测[J]. *郑州大学学报:医学版*, 2010, 45(1): 137.

(收稿日期:2013-03-22 修回日期:2013-05-21)

国家卫生和计划生育委员会要求加强食品安全风险监测体系建设

本刊讯 2013年12月24日,国家卫生和计划生育委员会在京召开电视电话会,要求全国卫生计生系统加强食品安全风险监测体系建设,在31个省(市、自治区)和新疆生产建设兵团疾控中心加挂“国家食品安全风险监测(省级)中心”,指定北京市疾控中心等6具备条件的省级疾控中心为“国家食品安全风险监测参比实验室”。

会议强调,食品安全风险监测是食品安全监管的基础性工作。通过系统、持续地监测食源性疾病、食品污染物、食品中有害因素及其变化情况,并经过科学评估,可为制定、修订

食品安全国家标准,确定监管重点以及评价管理措施效果等提供科学依据。根据《食品安全法》和国务院“三定”规定,国家卫生和计划生育委员会牵头组织开展国家食品安全风险监测工作,会同国务院有关部门制定和实施国家食品安全风险监测计划,省级卫生计生行政部门牵头在本辖区组织实施。《国务院关于加强食品安全工作的决定》和《国家食品安全监管体系“十二五”规划》提出要健全国家食品安全风险监测体系,要求到2015年末,我国食品安全风险监测覆盖全部县级行政区,并逐步延伸到社区、乡村,覆盖从农田到餐桌全过程。