

白藜芦醇固体脂质纳米粒制备工艺及形态学研究

梁健钦^{1,2}, 刘华钢¹

(1. 广西医科大学, 南宁 530021; 2. 广西中医学院, 南宁 530001)

[摘要] 目的: 考察白藜芦醇固体脂质纳米粒(Res-SLN)的制备工艺及 Res-SLN 的形态学。方法: 采用 HPLC 测定制剂中白藜芦醇(Res)的含量; 采用单因素考察法筛选载体、稳定剂及制备工艺。结果: 建立了用 HPLC 测定本制剂中 Res 含量, 采用单硬脂酸甘油酯(GMS)作为载体材料, 泊洛沙姆 188(F68)稳定剂, 采用热高压均质法制备得到 Res-SLN, 平均粒径为 125 nm, 平均包封率为 91%, 平均载药量为 10%。结论: 热高压均质法制备 SLN, 包封率高、简便可行。

[关键词] 白藜芦醇; 固体脂质纳米粒; 制备工艺; 形态学

[中图分类号] **[文献标识码]** **[文章编号]** 1005-9903(2010)14-0028-03

白藜芦醇(resveratrol, Res)化学名 3,5,4'-三羟基-反-均二苯代乙烯(3,5,4'-trihydroxysitibene), 具有广泛的生物学活性, 如抗癌、抗动脉粥样硬化、抗凝血、抗氧化、抗菌、免疫调节及神经保护等^[1]。笔者拟将 Res 制成固体脂质纳米粒(Solid lipid nanoparticles, SLN), 以提高 Res 的靶向性。本文对白藜芦醇固体脂质纳米粒(Res-SLN)的制备工艺及其形态学进行了研究。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国); Sartorius BP211D 电子天平(德国); CG-16W 高速微量离心机(北京医用离心机厂); Branson 超声波清洗仪(上海必能信); 超声波细胞粉碎机(JY92-II, 宁波新芝科器研究所); JB-3 雷磁恒温磁力搅拌器(上海); Millipore 超纯水器(Millipore, USA); Niro-Soavi 高压均质机(意大利); Millipore 超滤离心管(MicroconYM-10, MWCO 为 10kDa, USA); Zetasizer 3000 HS 激光粒度分析仪(Malvern, UK)。

白藜芦醇原料药(桂林莱茵生物药业有限公司, 纯度 97.1%); 白藜芦醇对照品(批号 111535-200502, 含量测定用, 中国药品生物制品检定所提供); 泊洛沙姆 188(南京威尔, 注射用); 吐温 80(上海, AR); 聚乙烯醇 PVA₁₇₋₈₈(上海, AR); 卵磷脂(北

京双旋微生物培养基制品厂, BR); 单硬脂酸甘油酯(广东汕头西陇化工厂, CP); 硬脂酸(广东汕头西陇化工厂, CP); 十八醇(广东汕头西陇化工厂, CP); 乙腈(Fisher, 色谱纯); 甲醇(天津四友, 色谱纯)。

2 方法与结果^[2-5]

2.1 Res 含量测定方法学研究

2.1.1 色谱条件 色谱柱为汉邦 Lichrospher C18 硅烷键合硅胶填充柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相乙腈-水(30:70); 检测波长 306 nm; 流速 1 mL·min⁻¹; 柱温 30 °C; 进样量 10 μL。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取 Res 对照品 3.52 mg, 置 50 mL 棕色量瓶中, 加甲醇至刻度制成每 1 mL 含 70.4 μg 的溶液, 即得。

2.1.3 供试品溶液的制备 游离 Res 供试品溶液制备: 吸取 Res-SLN 样品适量, 置超滤离心管中, 离心(12 000 r·min⁻¹) 10 min, 精密吸取滤液 1.0 mL, 置 25 mL 棕色量瓶中, 加甲醇至刻度, 即得。

Res-SLN 供试品溶液制备: 精密吸取 Res-SLN 样品 1.0 mL, 置 100 mL 棕色量瓶中, 加甲醇适量, 水浴加热至溶液澄清, 放冷至室温, 用甲醇稀释至刻度, 吸取适量混悬液, 离心(12 000 r·min⁻¹) 10 min, 取上清液, 即得。

阴性供试品溶液制备: 精密吸取空白 SLN 混悬液 1.0 mL, 照“Res-SLN 供试品溶液制备”项制备阴性供试品溶液。

2.1.4 干扰试验 精密吸取供试品溶液、对照品溶液、阴性对照溶液各 10 μL, 注入高效液相色谱仪, 测定, 即得。阴性样品色谱图中的组分不干扰供试品溶液的测定。

[收稿日期] 2010-02-02

[基金项目] 桂科攻(0630002-2E)

[第一作者] 梁健钦, 男, 博士, 讲师, 研究方向: 新药开发。
Tel: 0771-2059527; E-mail: liangjianqin@139.com

[通讯作者] * 刘华钢, Tel: 13907862166; E-mail: hgliu@263.net

2.1.5 线性关系 吸取 Res 对照品溶液,加甲醇分别制成 3.52,8.80,17.60,35.20,70.40 mg·L⁻¹对照品溶液,注入色谱仪,以峰面积为纵坐标(Y),Res 浓度(μg·mL⁻¹)为横坐标(X),绘制标准曲线 Y = 60.836 X + 57.544(R = 0.999 6)。

2.1.6 精密度考察 精密吸取浓度为 35.2 mg·L⁻¹的 Res 对照品溶液 10 μL,按上述色谱条件重复进样 6 次,平均峰面积 2 166.8, RSD 1.83%,精密度良好。

2.1.7 重复性 取同一批 Res-SLN 样品 6 份,分别按供试品溶液的制备项下的方法制备供试品溶液,进样,平均峰面积为 2 200.18, RSD 1.74%,重复性良好。

2.1.8 稳定性 取同一供试品溶液,在低温(4℃)避光条件下,分别在制备后 0,2,4,8,12,24 h,精密吸取 10 μL,注入色谱仪,测定。RSD 2.52%,稳定性良好。

2.1.9 加样回收率 精密吸取已知含量的 Res-SLN 样品 300 μL,共 6 份,分别精密加入 Res 对照品溶液(1.013 g·L⁻¹)1.0 mL,照 Res-SLN 样品溶液制备项下方法操作。精密吸取 10 μL,注入色谱仪,测定。平均回收率 101.6%, RSD 2.30%。

2.2 包封率及载药量测定

2.2.1 超滤离心管截留性能考察 取空白 GMS-SLN 溶液,加入 Res 对照品适量,使制成 Res 浓度分别为 0.1,0.2,0.4 g·L⁻¹的样品,吸取不同浓度的药物溶液 0.4 mL,置超滤离心管(MWCO 为 10 kDa)中,离心(12 000 r·min⁻¹)10 min,分别精密吸取上清液 10 μL,注入色谱仪,测定。平均回收率 97.2%, RSD 1.11%(n = 9)。

2.2.2 包封率及载药量的测定 游离 Res 含量(W_F)测定:精密吸取 Res-SLN 样品适量,置超滤离心管中,离心(12 000 r·min⁻¹)10 min,精密吸取上清液 1.0 mL,置 25 mL 棕色量瓶中,加甲醇至刻度,即得。

Res-SLN 总药量(W_T)测定:精密吸取 Res-SLN 样品 1.0 mL,置 100 mL 棕色量瓶中,加甲醇适量,水浴加热至溶液澄清,放冷至室温,用甲醇稀释至刻度,吸取适量混悬液,离心(12 000 r·min⁻¹)10 min,取上清液,即得。

$$\text{包封率(ER)} = \frac{(W_T - W_F)}{W_T} \times 100\% ;$$

$$\text{载药量(DL)} = \frac{W_T - W_F}{W_S} \times 100\%$$

式中,W_T为纳米粒溶液中总药量,W_F为游离药物量,W_S为制备时药物与载体材料的总量。

2.3 Res-SLN 制备工艺研究

2.3.1 载体材料选择 称取基质 5 g,置水浴上加热熔融,再缓慢滴加入 Res 乙醇溶液(0.4 g Res 加适量无水乙醇制成 Res 乙醇溶液),混匀,70℃保温,制成油相。将油相缓缓加入到 100 mL 含 5% 泊洛沙姆 188(F68)水相中,超声(42 kHz,400 W)处理,制成粗分散乳液。将乳液过高压均质机,140 MPa 压力下循环 10 次,冷却至室温,放置 24 h,观察 Res-SLN 的性状。结果见表 1,故选择 GMS 作为载药固体脂质纳米粒的载体。

表 1 不同载体材料筛选

载体材料	结果
GMS	透明、略带蓝色、泛乳光、无沉淀、通针性良好
硬脂酸	较混浊、有少数沉淀、通针性良好
十八醇	较混浊、无沉淀、通针性良好

2.3.2 稳定剂选择 每份称取 GMS 5 g 共 4 份,分别置水浴上加热熔融,加入 Res 乙醇溶液(0.4 g Res 加适量无水乙醇制成 Res 乙醇溶液),混匀,70℃保温,制成油相,将油相分别加入到不同种类稳定剂溶液中,超声(42 kHz,400 W)处理,制成粗分散乳液。将乳液过高压均质机,140 MPa 压力下循环至溶液透明,冷却至室温,放置 24 h,观察 RES-SLN 的性状。结果见表 2,选用 F68 作为载药固体脂质纳米粒的稳定剂,制剂澄清度好,粒径测定结果约为 120 nm。

表 2 不同稳定剂筛选

稳定剂种类	结果
F68(5%)	无色较透明、略带蓝色、无沉淀、通针性良好
Tween 80(5%)	呈黄色、放冷后较混浊、通针性良好
PVA ₁₇₋₈₈ (1%)	略带白色、较混浊、有少许沉淀、通针性良好
卵磷脂(1%)	呈黄色、有少量黄色沉淀、混浊、通针性良好

2.3.3 纳米粒制备方法选择 热高压均质法:称取 GMS 5 g,置水浴上加热熔融,加入 Res 乙醇溶液(0.4 g Res 加适量无水乙醇制成 Res 乙醇溶液),混匀,70℃保温,制成油相,将油相缓慢加入到 5% F68 溶液中,70℃保温,超声(42 kHz,400 W)处理,制成粗分散乳液。将乳液过高压均质机,140 MPa 压力下循环至溶液透明,冷却至室温,放置 24 h,观察 Res-SLN 的性状。

超声波粉碎法:称取 GMS 5 g,置水浴上加热熔融,加入 Res 乙醇溶液(0.4 g Res 加适量无水乙醇制成 Res 乙醇溶液),混匀,70℃保温,制成油相。将油相缓慢加入到 5% F68 溶液中,70℃保温,超声

(42 kHz, 400 W) 处理, 制成粗分散乳液。用超声波细胞粉碎机 (20 kHz, 600 W) 处理至透明, 冷却至室温, 放置 24 h, 观察 Res-SLN 的性状。

超声波分散法: 称取 GMS 5 g, 置水浴上加热熔融, 加入 Res 乙醇溶液 (0.4 g Res 加适量无水乙醇制成 Res 乙醇溶液), 混匀, 70 °C 保温, 制成油相。将油相缓慢加入到 5% F68 溶液中, 70 °C 保温, 边加边搅拌, 超声处理 (42 kHz, 400 W) 2 h, 观察 Res-SLN 的性状。

磁力搅拌法: 称取 GMS 5 g, 置水浴上加热熔融, 加入 Res 乙醇溶液 (0.4 g Res 加适量无水乙醇制成 Res 乙醇溶液), 混匀, 70 °C 保温, 制成油相。将油相缓慢加入到 5% F68 溶液中, 磁力搅拌 ($1\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$) 2 h, 观察 Res-SLN 的性状。

结果见表 3, 采用热高压均质法跟超声波粉碎法可以达到要求。但是, 超声波粉碎法容易带入金属颗粒 (该法制备的样品, 经过 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 置普通光学显微镜下观察, 发现大量金属微粒)。热高压均质法避免出现超声波粉碎法的缺点, 为此本实验采用热高压均质法制备载药固体脂质纳米粒。

表 3 不同制备方法制备 SLN 效果

方法	结果
热高压均质法	澄明度好、无沉淀、无可见颗粒、略带蓝色
超声波粉碎法 (20 kHz)	澄明度好、无沉淀、无可见颗粒、泛蓝色
超声波分散法 (42 kHz)	呈乳白色乳剂、液面有油滴
磁力搅拌法	呈乳白色乳剂、液面有油滴、烧杯底部有黄色黏稠物

2.3.4 Res-SLN 制备工艺 经优化后, 制剂的制备工艺如下: 精密称取 6 g 泊洛沙姆 188 (F68)、3.5 g 单硬脂酸甘油酯 (GSM) 及 0.45 g Res。将 GSM 置烧杯中, 水浴加热熔融。Res 置烧杯中, 加无水乙醇适量, 制成 Res 乙醇溶液。将已加热熔融的 GSM 加入到 Res 乙醇溶液中, 搅拌, 水浴保温, 制得油相。F68 置烧杯中, 加约 80 mL 水, 水浴加热, 搅拌使溶解, 制得水相。将油相缓慢加入到水相中, 超声分散形成乳浊液, 加水至 100 mL, 过高压均质机, 140 MPa 压力下循环至透明, 冷却至室温, 用 0.45 μm 滤膜过滤, 即得。经测定, Res-SLN 的表面积平均粒径为 125 nm, 平均包封率为 91%, 平均载药量为 10%。

2.4 Res-SLN 形态学

2.4.1 形态学研究 吸取 Res-SLN 样品适量, 加纯化水稀释, 滴在铜网上, 在透射电镜下观察粒子形态。

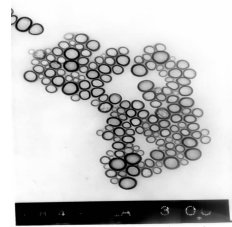


图 1 Res-SLN 溶液电镜图 ($\times 30\ 000$)

2.4.2 粒径及分布 吸取 Res-SLN 样品 1 mL, 用纯化水稀释至 10 mL, 吸取 1 mL, 用激光粒径仪器测定, 表面积平均粒径为 125 nm, 粒度分布系数 (SPAN) 为 0.76。

3 讨论

关于包封率测定 纳米粒包封率的测定方法通常采用一定的手段分离游离药物, 测定游离药物的含量, 间接计算纳米粒的包封率。目前, 常采用的将纳米粒与游离药物分离的方法有: 透析法、膜分离技术 (膜滤、超滤)、低温超速离心、凝胶柱色谱法。凝胶层析法操作繁琐, 但结果准确; 低温超速离心时纳米粒有可能凝聚而被破坏; 透析法测定费时, 游离药物的分离明显受到透析膜的影响, 导致包封率测定结果比实际值偏高。本实验采用超滤离心法, 操作简单, 实验结果证明, 超滤膜对游离药物的截留性能无明显差异。

[参考文献]

- [1] 毕红彬, 阎晓卓, 邵攀科. 白藜芦醇的研究进展 [J]. 河北化工, 2006, 29(6): 22.
- [2] 薛克昌, 顾宜, 张三奇, 等. 十六酸拉米夫定酯固体脂质纳米粒的制备 [J]. 第四军医大学学报, 2003, 24(10): 890.
- [3] 杜志永, 刘建平, 朱家璧, 等. 丹参酮 II_A 固体脂质纳米粒的制备及大鼠在体肠吸收研究 [J]. 中国药学杂志, 2004, 39(8): 611.
- [4] 官金岩, 胡连栋, 刘洋, 等. 维甲酸固体脂质纳米粒中主药的含量及包封率测定 [J]. 中国药房, 2008, 19(16): 1252.
- [5] 段明华, 王东凯, 刘红, 等. 固体脂质纳米粒制备方法简介 [J]. 中国医院药学杂志, 2004, 24(7): 432.

[责任编辑 仝燕]