

· 工艺与制剂 ·

乌索酸固体脂质纳米粒的制备及其抗肿瘤活性考察

陆云华^{1,2}, 曹丽萍¹, 李茜¹, 张琼¹, 谢秀倩¹, 陈武^{1,2}, 张新^{1*}

(1. 湖州师范学院生命科学学院药学系, 浙江湖州 313000;

2. 宜春学院江西省天然药物活性成分研究重点实验室, 江西宜春 336000)

[摘要] 目的: 优选乌索酸固体脂质纳米粒的处方工艺并考察其理化性质及体外抗肿瘤活性。方法: 采用薄膜分散法制备乌索酸固体脂质纳米粒, 以包封率为指标, 通过正交试验优选处方工艺; 利用透射电镜、激光粒度测定仪等考察纳米粒的理化性质, 通过 MMT 法检测其体外抗肿瘤活性。结果: 最佳处方工艺为乌索酸 90 mg, 卵磷脂 30 mg, 硬脂酸 10 mg, 磷酸盐缓冲液浓度 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 制备的乌索酸固体脂质纳米粒在透射电镜下呈球形或椭球形, 平均粒径 $(184.7 \pm 18.3) \text{ nm}$, 包封率 $(82.6 \pm 0.6) \%$, 载药量 $(11.9 \pm 0.5) \%$, 48 h 体外累积释放率达 81.21%, 30 d 内粒径与包封率均无明显变化。在 5, 10, 20, 40, 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 乌索酸对人肝癌细胞株 SMMC-7721 的抑制率分别为 $(9.0 \pm 1.2) \%$, $(15.7 \pm 2.8) \%$, $(42.3 \pm 4.6) \%$, $(78.7 \pm 6.9) \%$, $(79.3 \pm 7.2) \%$; 乌索酸固体脂质纳米粒的抑制率则分别为 $(9.0 \pm 1.3) \%$, $(23.6 \pm 2.2) \%$, $(59.3 \pm 6.1) \%$, $(84.7 \pm 8.3) \%$, $(85.0 \pm 8.1) \%$ 。结论: 薄膜法分散法制备的乌索酸固体脂质纳米粒粒径适中、体外释放和稳定性良好, 具有优良的抗肿瘤活性。

[关键词] 乌索酸; 脂质纳米粒; 处方工艺; 理化性质; 抗肿瘤活性

[中图分类号] R283.6; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)19-0001-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014190001

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140819.0915.002.html>

[网络出版时间] 2014-08-19 9:15

Preparation and *in vitro* Antitumor Activity of Ursolic Acid Solid Lipid Nanoparticles

LU Yun-hua^{1,2}, CAO Li-ping¹, LI Qian¹, ZHANG Qiong¹, XIE Xiu-qian¹, CHEN Wu^{1,2}, ZHANG Xin^{1*}

(1. Department of Pharmacy, College of Life Sciences, Huzhou Teachers College, Huzhou 313000, China;

2. Key Laboratory of Active Ingredient in Natural Medicines of Jiangxi Province, Yichun University, Yichun 336000, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize formulation process of ursolic acid solid lipid nanoparticles and investigate its physicochemical properties and antitumor activity. **Method:** Ursolic acid solid lipid nanoparticles was prepared by film dispersion method, orthogonal test was adopted to optimize formulation process by taking encapsulation efficiency as index. Its physical and chemical properties were studied by transmission electron microscope and laser particle sizer/Zeta potential system, MMT was used to detect its *in vitro* anti-tumor activity. **Result:** The best formulation process was as following: ursolic acid 90 mg, lecithin 30 mg, stearic acid 10 mg, PBS concentration of $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. These prepared nanoparticles showed spherical or ellipsoidal under transmission electron microscope, average particle size, encapsulation efficiency and drug loading were $(184.7 \pm$

[收稿日期] 20140322(014)

[基金项目] 浙江省自然科学基金项目(LY3H280011); 江西教育厅科研项目(GJJ11601); 全国大学生创新创业计划项目(201210347012)

[第一作者] 陆云华, 博士, 教授, 从事分子药物及分子药理学研究, Tel: 15067218310, E-mail: lyh655@hutc.zj.cn

[通讯作者] * 张新, 高级实验师, 从事分子药剂学研究, Tel: 15067219310, E-mail: zhangxin@hutc.zj.cn

18.3) nm, $(82.6 \pm 0.6)\%$ and $(11.9 \pm 0.5)\%$, respectively; release was 81.2% at 48 h, particle size and encapsulation efficiency had no significant change in 30 d. When the concentration of ursolic acid were 5, 10, 20, 40, 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, inhibition rates of ursolic acid on human hepatoma cell line SMMC-7721 were $(9.0 \pm 1.2)\%$, $(15.7 \pm 2.8)\%$, $(42.3 \pm 4.6)\%$, $(78.7 \pm 6.9)\%$ and $(79.3 \pm 7.2)\%$, inhibition rates of ursolic acid solid lipid nanoparticles were $(9.0 \pm 1.3)\%$, $(23.6 \pm 2.2)\%$, $(59.3 \pm 6.1)\%$, $(84.7 \pm 8.3)\%$ and $(85.0 \pm 8.1)\%$, respectively. **Conclusion:** These prepared ursolic acid solid lipid nanoparticles have appropriate size, good *in vitro* release and stability with excellent antitumor activity.

[Key words] ursolic acid; lipid nanoparticles; formulation process; physicochemical properties; antitumor activity

乌索酸又名熊果酸、乌苏酸,属五环三萜类化合物,存在于白花蛇舌草、熊果、陆英、枇杷叶等植物中,以游离形式或与糖结合成苷存在^[1],具有显著的抗肿瘤、保肝等药理作用^[2]。目前大多数抗肿瘤药物均存在一定程度的肝损伤,特别是抗肝癌药物^[3],故研发既有抗肿瘤又保护肝细胞的药物具有重要意义。乌索酸由于水溶性差,生物利用度低,导致其应用受到较大限制,虽然该成分已被研制成片剂、胶囊、固体分散体、脂质体等剂型^[4],但上述难题仍未得到很好的改善。为更好地发挥乌索酸的抗肿瘤活性,增强靶组织及靶器官对其的选择性,降低给药剂量,本实验拟采用薄膜分散法制备乌索酸固体脂质纳米粒,通过正交试验优选处方工艺,考察该制剂的理化性质和体外抗肿瘤活性,为乌索酸的临床推广提供参考。

1 材料

1100 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司), BS2202S 型电子天平(德国赛多利斯公司), 2.5 L 型冷冻干燥机(美国 Labconco 公司), Mastersize2000 型激光粒度仪(英国马尔文仪器公司), H-600 型透射电子显微镜、NEC-2020 型超声波振荡器(日本日立公司)。

乌索酸原料药(纯度 > 99%, 浏阳艾特天然产物研究与开发有限公司), 人肝癌细胞株 SMMC-7721(中国科学院生化与细胞研究所), 乌索酸对照品(中国食品药品检定研究院, 批号 110742-200415), 硬脂酸(瑞士 Fluka 公司), 乳糖、卵磷脂(阿克努公司), 透析袋(相对分子质量截留 12 000 ~ 14 000, 美国 Sigma 公司), PRMI-1640 培养基、二甲基亚砜(DMSO)均购自上海源叶生物科技有限公司, 甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

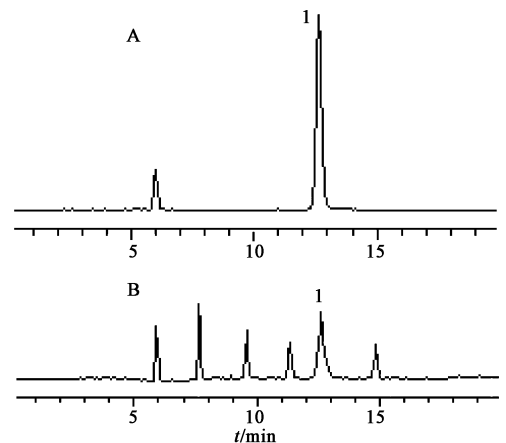
2 方法与结果

2.1 乌索酸固体脂质纳米粒的制备 按处方量精密称取乌索酸样品 5 g 置于烧瓶中, 加入乙醇 20 mL

于 60 °C 溶解, 精确加入适量卵磷脂和硬脂酸, 搅拌 10 min, 于 50 °C 搅拌 30 min, 减压旋转蒸发有机溶剂, 加入磷酸缓冲液(PBS), 超声处理 20 min, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.2 乌索酸的含量测定

2.2.1 色谱柱 Symmetry Shield RP18 色谱柱(3.9 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相甲醇-水-磷酸(88 : 12 : 0.1), 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 210 nm, 柱温 25 °C, 进样量 20 μL , 见图 1。



A. 对照品; B. 供试品; 1. 乌索酸

图 1 固体脂质纳米粒 HPLC

2.2.2 供试品溶液的制备 精密吸取乌索酸固体脂质纳米粒 2 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 超声 5 min, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.2.3 标准曲线的绘制 精密称取乌索酸对照品 9.6 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得对照品溶液。精密吸取该对照品溶液 50, 200, 400, 600, 800 μL , 分别置于 5 mL 量瓶中, 加甲醇定容, 按 2.2.1 项下方法测定, 以进样量为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得回归方程 $Y = 1.25 \times 10^5 X + 1.21 \times 10^4$ ($r = 0.9999$), 表明乌索酸进样量在 0.192 ~ 3.072 μg 与峰面积的线性关系良好。

2.2.4 精密度试验 精密吸取同一对照品溶液 20 μL , 重复进样 5 次, 按 2.2.1 项下方法测定, 计算乌索酸峰面积的 RSD 0.3%, 表明仪器精密度良好。

2.2.5 重复性试验 精密称取同一样品 5 份, 每份 2.0 g, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.2.1 项下方法测定, 计算乌索酸峰面积的 RSD 1.9%, 表明本方法重复性良好。

2.2.6 回收率试验 采用加样回收测定法。精密称取已知乌索酸含量的同一样品 5 份, 每份 2.0 g, 各加入乌索酸对照品约 5.0 mg, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.2.1 项下方法测定乌索酸含量, 计算平均回收率 99.36%, RSD 1.7%。

2.2.7 稳定性试验 取同一供试品溶液, 日内每隔 1 h 按 2.2.1 项下方法测定 1 次, 共 5 次, 结果乌索酸峰面积的 RSD 0.6%; 日间每天按 2.2.1 项下方法测定 1 次, 共 5 d, 结果乌索酸峰面积的 RSD 1.1%, 表明供试品溶液稳定性较好。

2.3 包封率和载药量的测定 采用超速离心法测定^[5]。精密吸取乌索酸固体脂质纳米粒溶液 2 mL, 于 20 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 30 min, 取沉淀用甲醇溶解并定容至 10 mL, 按 2.2.1 项下方法测定乌索酸含量; 精密吸取制备好的乌索酸固体脂质纳米粒溶液 2 mL, 加甲醇溶解并稀释至 10 mL, 按 2.2.1 项下方法测定乌索酸含量, 计算包封率和载药量。

2.4 处方工艺优化 选取载药量、卵磷脂和硬脂酸质量、PBS 摩尔浓度为考察因素, 以包封率为评价指标, 按 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验, 试验安排及结果见表 1。结果显示影响乌索酸固体脂质纳米粒包封率

的因素主次顺序为 $A > D > B > C$, 优选的处方组合为 $A_3B_1C_2D_2$, 即乌索酸 90 mg, 卵磷脂 30 mg, 硬脂酸 10 mg, PBS 摩尔浓度 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。按优选的处方制备 3 批样品, 测得包封率分别为 83.08%, 81.26%, 82.76%, 载药量分别为 11.39%, 11.46%, 12.88%, 表明该处方工艺稳定。

2.5 透射电镜形态观察 将乌索酸固体脂质纳米粒稀释至一定质量浓度, 吸取少量滴加到铜网正面, 过多样品液用滤纸吸去, 加 2% 磷钨酸钠溶液负染 3 min, 取出铜网, 用滤纸吸取过多染液, 将铜网正面朝上置于玻璃皿中, 自然晾干, 在透射显微镜下观察其形态, 结果见图 2, 表明该纳米粒外观呈球形或椭圆球形的结构。

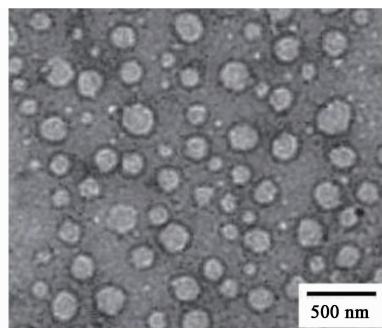


图 2 乌索酸固体脂质纳米粒 TEM ($\times 300$ 万)

2.6 粒径的测定 利用激光粒径仪测定粒径, 取乌索酸固体脂质纳米粒用水稀释于样品池内, 调节光强度至约 300 $\text{cd}\cdot\text{m}^{-2}$, 平衡后测定 10 min, 保存数据, 结果粒径 184.7 nm, 多分散指数 (PDI) 0.189, 见图 3。

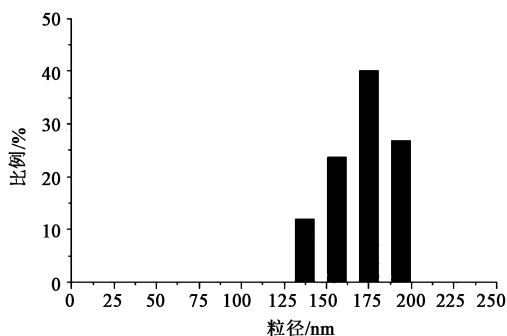


图 3 乌索酸固体脂质纳米粒粒度分布

表 1 乌索酸固体脂质纳米粒处方工艺正交试验安排及直观分析

No.	A 乌索酸 /mg	B 卵磷脂 /mg	C 硬脂酸 /mg	D PBS /mmol·L ⁻¹	包封率 /%
1	70	30	5	5	83.35
2	70	40	10	10	84.81
3	70	50	15	20	70.37
4	80	30	10	20	67.24
5	80	40	15	5	66.83
6	80	50	5	10	74.22
7	90	30	15	10	89.19
8	90	40	5	20	80.58
9	90	50	10	5	88.26
K_1	79.51	79.93	79.38	79.48	
K_2	69.43	77.41	80.10	82.74	
K_3	86.01	73.47	75.46	72.73	
R	16.58	6.46	4.64	10.01	

2.7 体外释放度考察 采用平衡透析法, 以 pH 7.4 的 PBS 作为溶出介质, 将乌索酸固体脂质纳米粒 3 mL 置于已活化的透析袋中, 将透析袋密封置于装有溶出介质 50 mL 的具塞锥形瓶中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴震荡, 每隔一定时间更换 1 次释放介质, 分别于

1, 2, 4, 8, 12, 16, 24, 36, 48 h 各取样品液 1 mL 置离心管中, 及时补充等量等温溶出介质, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 按 2.2.1 项下方法测定, 计算体外累积释放度, 见图 4, 结果显示乌索酸固体脂质纳米粒持续而缓慢地释放药物, 具有缓释特点且无明显突释效应, 在 48 h 时累积释放率 81.21%。

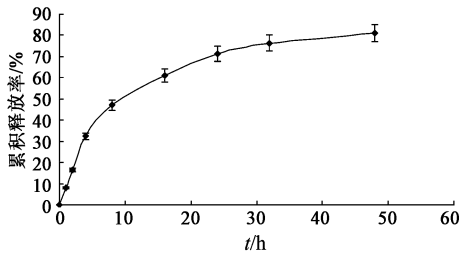


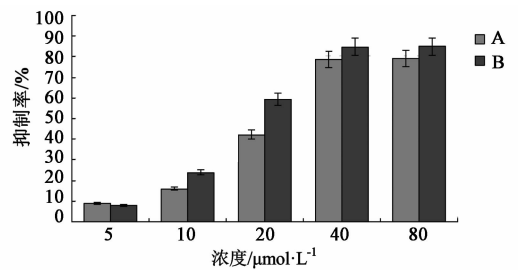
图 4 乌索酸固体脂质纳米粒体外释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.8 稳定性试验 样品按 1 mL 分装, 于 4 °C 密封保存在安瓿瓶中, 在 0, 10, 20, 30 d 时检测, 结果粒径 ($\bar{x} \pm s, n = 3$) 分别为 (185.6 ± 6.4), (186.3 ± 3.5), (183.7 ± 3.1), (184.0 ± 4.2) nm, 包封率依次为 82.76%, 81.98%, 82.03%, 81.90%, 结果发现与 0 d 相比, 样品在 10, 20, 30 d 时粒径与包封率均无明显变化, 表明制备的乌索酸固体脂质纳米粒样品在 30 d 内稳定性较好。

2.9 体外抗肿瘤活性 采用 MTT 比色法检测细胞抑制率。将人肝癌细胞株 SMMC-7721 置于含 10% 小牛血清的 PRM-1640 培养基中, 于 37 °C, 5% CO₂ 常规培养。选择对数生长期细胞, 调整细胞为 5 × 10⁵ 接种于 96 孔培养板中, 置于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养, 每孔 200 μL, 试验组分别给予终浓度为 5, 10, 20, 40, 80 μmol·L⁻¹ 的乌索酸和乌索酸固体脂质纳米粒溶液, 同时设立固体脂质纳米粒空载体、DMSO 和 RPMI-1640 液对照, 每个浓度设 6 个复孔, 分别于 48 h 时每孔加入 5 g·L⁻¹ MTT 溶液 20 μL, 孵育 4 h, 弃去上清液, 加入 DMSO 终止反应, 微振荡后用酶标仪于 570 nm 处测定每孔的吸光度 (A), 按 $(1 - A_{\text{试验组}}/A_{\text{对照组}}) \times 100\%$ 计算各组的细胞增殖抑制率, 见图 5。

3 讨论

固体脂质纳米粒的包封率与药物脂溶性密切相关。亲脂性较高的药物在水中溶解度较低, 容易与脂质材料结合, 形成纳米粒时分散在水中的比例较小, 包封率较高; 水溶性药物易分布在水相中, 与脂质材料结合程度差, 包封率低。试验结果表明乌索酸固体脂质纳米粒的包封率较高, 这与选择的模型药物具有较高脂溶性有很大关系。



A. 原料药; B. 固体脂质纳米粒

图 5 乌索酸对 SMMC-7721 细胞的增殖抑制率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

脂质材料有各自的熔点, 在制备过程中, 必须保证操作时温度在其熔点之上, 以保证脂质材料熔化为液态, 乌索酸以分子状态溶解在其中, 操作时加入乙醇可加速其溶解, 然后加热挥尽乙醇, 将同温度的水相加入, 整个操作过程应保证温度大于脂质材料的熔点, 否则超声过程中脂质材料会发生凝固, 不能形成纳米粒。

本文以卵磷脂和硬脂酸为载体制备固体脂质纳米粒。前者是由双亲性脂质双分子层构成的类脂泡囊, 具有特殊的性质, 能溶解、保护和携带亲水和亲油分子^[6], 且磷脂存在于每一个细胞中, 毒性低于合成材料, 体内可降解且具备良好生理相容性, 价廉易得^[7]; 后者则为内源性生理物质长链的饱和脂肪酸, 是机体脂肪的主要成分, 生物相容性好, 比高分子材料的毒性更低^[8]。

资料显示将药物装载到脂质纳米粒中, 有利于提高药效^[9-11]。孔德新等^[10]采用超声波分散法制备低分子肝素纳米脂质粒, 结果发现用药后血凝时间明显延长。将亲脂性免疫调节剂胞壁酰二肽胆固醇包裹至纳米胶囊中, 其抗转移作用比游离药物更有效, 说明通过修饰纳米粒子可增强其对特定组织的靶向特异性。本文结果亦证明了将乌索酸装载至脂质纳米粒中, 更有利于药物抑制肿瘤细胞生长, 可为乌索酸抗肿瘤药物的研发参考。

[参考文献]

[1] Shanmugam M K, Dai X, Kumar A P, et al. Ursolic acid in cancer prevention and treatment; molecular targets, pharmacokinetics and clinical studies [J]. *Biochem Pharmacol*, 2013, 85(11): 1579.

[2] Chen G Q, Shen Y, Duan H. Anti-tumor effect and its mechanisms of ursolic acid on human esophageal carcinoma cell Eca-109 *in vivo* [J]. *Chin J Cancer Res*, 2008, 20(3): 205.

[3] 谭斐, 张阳德, 万小平, 等. 纳米脂质体的制备 [J]. *中国医学工程*, 2009, 17(5): 340.

喜树碱衍生物 CZ48 缓释纳米粒的 制备及其体外释药特性考察

李思阳^{1,2}, 孔庆新¹, 王洋^{2*}

(1. 江苏食品药品职业技术学院, 江苏 淮安 223003; 2. 东北林业大学盐碱地生物资源环境研究中心, 东北油田盐碱植被恢复与重建教育部重点实验室, 哈尔滨 150040)

[摘要] 目的: 制备喜树碱衍生物 CZ48 缓释纳米粒并考察其体外释药特性。方法: 以聚乳酸(PLA)为材料, 采用 W/O/W 型乳化溶剂挥发法制备 CZ48 缓释纳米粒, 通过透射电子显微镜观察纳米粒的微观形态, 采用粒度分析仪测定粒径并考察该制剂的体外释药特性。结果: CZ48 缓释纳米粒呈明显的球状结构, 粒度(260.6 ± 3.2) nm, 载药量(11.8 ± 1.29)%, 包封率(88.7 ± 2.55)%, 体外释放可持续 48 h, 累积释放率达 85%。结论: 制备的 CZ48 缓释纳米粒包封率和载药量高, 缓释效果明显, 为该制剂的药代动力学研究提供数据支持。

[关键词] CZ48; 缓释纳米粒; 聚乳酸; 体外释放度

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)19-0005-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014190005

Preparation and *in vitro* Release of CZ48 Sustained-release Nanoparticles

LI Si-yang^{1,2}, KONG Qing-xin¹, WANG Yang^{2*}

(1. Jiangsu Food & Pharmaceutical Science College, Huai'an 223003, China;

2. Alkali Soil Natural Environmental Science Center, Northeast Forestry University, Key Laboratory of Saline-alkali Vegetation Ecology Restoration in Oil Field, Ministry of Education, Harbin 150040, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare CZ48 sustained-release nanoparticles and investigate its *in vitro* release. **Method:** Using polylactic acid (PLA) as material, CZ48 sustained-release nanoparticles was prepared

[收稿日期] 20140218(005)

[基金项目] 国家林业局引进国际先进林业技术项目(2012-4-04); 黑龙江省留学归国基金项目(LC201004)

[第一作者] 李思阳, 硕士, 讲师, 从事新型载药系统、药剂学研究, Tel: 18751288255, E-mail: 253595136@qq.com

[通讯作者] *王洋, 教授, 博士生导师, 从事药剂学和植物次生代谢研究, Tel: 0451-82191247, E-mail: ywanga@nefu.edu.cn

- [4] 齐娜, 刘广, 廖迎, 等. 熊果酸脂质体的制备及体外释放特性考察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(2): 28.
- [5] 赵培起, 曹淑贞, 王汉杰, 等. HPLC 检测紫杉醇高分子脂质体制剂的载药量和包封率[J]. 现代仪器, 2010(3): 27.
- [6] 胡连栋, 唐星, 崔福德. 全反式维甲酸固体脂质纳米粒的制备及体内外评价[J]. 药学学报, 2005, 40(1): 71.
- [7] 彭海龙, 雷志强, 刘燕燕, 等. 槐定碱脂质体的制备及理化性质研究[J]. 中国医院药学杂志, 2009, 29(1): 32.
- [8] 张洪, 成蓓, 詹新安. 联苯双酯固体脂质纳米粒的体外释药特性评析[J]. 广东药学院学报, 2009, 25(1): 23.
- [9] Radt B, Smith T A, Caruso F. Optically addressable nanostructured capsules for controlled delivery[J]. Adv Mater, 2004, 16(23/24): 2184.
- [10] 孔德新, 张天民, 邹立家. 低分子肝素钠透皮吸收制剂的研究[J]. 中国药学杂志, 1995, 30(7): 411.
- [11] 孙学惠, 郭涛, 何进, 等. 大蒜油固体脂质纳米粒中二硫化物和三硫化物在大鼠体内的组织分布[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(23): 2772.

[责任编辑 刘德文]