

葛根素纳米结构脂质载体的制备及理化性质考察

于莲*, 刘洋, 杨金儒, 周彤, 匡宇明

(佳木斯大学药学院, 黑龙江省高校重点实验室, 黑龙江 佳木斯 154007)

[摘要] **目的:**制备用于脑靶向给药的葛根素纳米结构脂质载体(Pue-NLC)并考察其理化性质。**方法:**采用乳化-超声分散法制备 Pue-NLC;以包封率为指标,通过正交试验考察固体脂质材料用量、豆磷脂与泊洛沙姆-188 的比例、脂质材料与乳化剂的比例及药物用量对方工艺的影响,确定最佳制备工艺;通过透射电镜观察粒子形态,分别用 Zeta 电位及粒度分析仪测定表面电位和粒径,离心超滤法测定包封率,透析法考察其体外释药特性,HPLC 测定葛根素含量。**结果:**最佳制备工艺为脂质材料用量 400 mg,豆磷脂与泊洛沙姆-188 的比例 1:3,脂质材料与乳化剂的比例为 1:2,药物用量 10 mg。制备的 Pue-NLC 外形呈类圆球状,粒径分布均匀,平均粒径(89 ± 7) nm,包封率(91.33 ± 1.2)%,平均 Zeta 电位(-22 ± 0.4) mV;Pue-NLC 中葛根素在 24 h 累积释放率 69.25%,且无突释效应。**结论:**采用乳化-超声分散法制备的 Pue-NLC 粒径大小分布均匀,药物包封率高,具有明显的缓释效果。

[关键词] 葛根素; 纳米脂质载体; 理化性质; 包封率; 缓释效果

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)10-0007-05

[doi] 10.11653/syfy2013100007

Preparation and Physico-chemical Properties Investigation of Puerarin Nanostructured Lipid Carriers

YU Lian*, LIU Yang, YANG Jin-ru, ZHOU Tong, KUANG Yu-ming

(Key University Laboratory of Heilongjiang Province, School of Pharmaceutical Sciences, Jiamusi University, Jiamusi 154007, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare an appropriate puerarin-loaded nanostructured lipid carriers (Pue-NLC) for brain targeted drug delivery, and investigate its physicochemical properties and *in vitro* release. **Method:** Pue-NLC was prepared by emulsion-ultrasonic dispersion method. With encapsulation efficiency as index, single factor test and orthogonal test was adopted to optimize preparation technology with the amount of solid lipid material, ratio of soybean lecithin and poloxamer-188, ratio of lipid material and emulsifier, the amount of drug as factors; Particle morphology of dispersion was observed by transmission electron microscopy, surface potential and particle size were determined by Zeta potential and particle size analyzer, entrapment efficiency was determined by centrifugation ultrafiltration method. *In vitro* drug release behavior was studied by dialysis, the content of puerarin was determined by HPLC. **Result:** Optimum preparation technology was as following: the dosage of solid lipid material 400 mg, ratio of soybean lecithin and poloxamer-188 = 1:3, ratio of lipid material and emulsifier 1:2, the amount of drug 10 mg. Under transmission electronic microscope, Pue-NLC assumed spherical shape. Its distribution of particle size was even with the average value of (89 ± 7) nm. Entrapment efficiency was (91.33 ± 1.2)%. The average Zeta potential was (-22 ± 0.4) mV; Cumulative release of puerarin was 69.25% in 24 h without burst effect. **Conclusion:** These prepared Pue-NLC had uniform particle

[收稿日期] 20121122(011)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81274101);佳木斯大学研究生创新科研项目(YJSCX2012-033JD)

[通讯作者] * 于莲,教授,硕士生导师,从事靶向、缓控释给药系统研究,Tel:0454-8610166,E-mail:jdyulian@163.com

size distribution, high encapsulation efficiency, sustained release effect.

[**Key words**] puerarin; nanostructured lipid carrier; physicochemical properties; encapsulation efficiency; sustained-release effect

阿尔茨海默病(AD)是当今老年人群中常见的一种脑部疾病。目前,国内外尚无根本治疗 AD 的药物,多数药物须进入脑内才能发挥疗效,但由于血脑屏障的存在,常规途径给药后脑内的药物浓度均较低,从而限制了该类药物的治疗作用,故脑靶向给药日益受到重视^[1-2]。

纳米药物系用高聚物为膜材,将液体或固体药物包裹成直径在 1 ~ 1 000 nm 的固态胶体粒子,将治疗药物靶向于病灶部位,同时对非靶组织影响很小,从而达到给药精密化^[3]。纳米结构脂质载体(NLC)是 21 世纪初在固体脂质纳米粒(SLN)基础上发展起来的第二代脂质纳米粒。NLC 通过向固态脂质中加入化学性质差异很大的液态脂质,使纳米粒以结晶缺陷型或无定形结构存在,增加了对药物分子的包容性,可避免放置过程中药物的外排、封装率降低的现象,提高药物稳定性^[4-6]。与 SLN 相比,NLC 具有更高的载药量,又能减少贮存过程中药物的泄漏等优点^[7-8]。

葛根素具有扩张血管、改善微循环、修复内皮细胞损伤及抑制细胞凋亡等药理作用^[9]。其可通过下调脑组织 $\text{A}\beta_{1-40}$ 和 Bax 基因的表达,大大减轻海马神经元凋亡,从而达到对脑部神经元的保护和抗老年痴呆作用^[10]。为使葛根素能更好地用于治疗 AD,本实验拟将葛根素采用乳化-超声分散法^[11]制备葛根素纳米结构脂质载体(Pue-NLC),并对其理化性质进行考察。

1 材料

1100 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),SCIENTZ-III D 型超声细胞破碎仪(宁波新芝生物科技股份有限公司),DF-101S 型集热式恒温加热磁力搅拌器(河南省予华仪器有限公司),TGL⁻¹6M 型台式高速冷冻离心机(长沙平凡仪器仪表有限公司),AF110N4 型电子分析天平(上海民桥精密科学仪器有限公司),Zeta PALS 型高分辨率 Zeta 电位及粒度分析仪(美国布鲁克海文仪器公司),Tecnaï G2 F20 S-twin 型高分辨型透射电子显微镜(美国 FEI 公司),RC-6 型溶出测试仪(天津新天光分析仪器技术有限公司)。

葛根素(贵州迪大科技有限责任公司,纯度 90%,批号 0316-201002),葛根素对照品(天津一方

科技有限公司,纯度 98%,批号 20110409),泊洛沙姆-188(珠海远城医药化工有限公司),注射用豆磷脂(上海太伟药业有限公司),单硬脂酸甘油酯(天津市博迪化工有限公司),油酸(天津市科密欧化学试剂有限公司),枸橼酸(天津市凯通化学试剂有限公司),甲醇为色谱纯,水为自制重蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 Pue-NLC 的制备 采用乳化-超声法制备。取处方量葛根素,加少量甲醇使充分溶解,与处方量油酸、单硬脂酸甘油酯置于烧杯中,于 65 ℃ 恒温水浴锅内加热使充分溶解,构成有机相。另取处方量泊洛沙姆-188 和豆磷脂溶于 20 mL 水中,水浴加热至与有机相相同温度,构成水相。在磁力搅拌下将热的水相滴加入同温度的油相中分散成初乳,滴加速度 15 mL·min⁻¹,滴加完毕后,搅拌 10 min,将初乳超声 8 min(600 W, 3 s 间隔),过 0.22 μm 微孔滤膜,即得。同法制备不含葛根素的 NLC 分散液,作为空白对照。

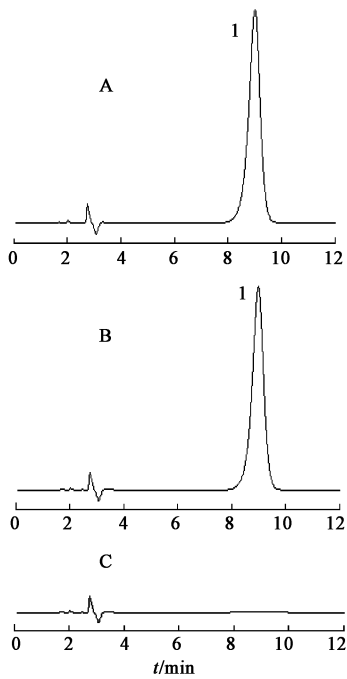
2.2 葛根素含量测定

2.2.1 色谱条件 岛津 Inertsil ODS-3 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相 0.1% 枸橼酸溶液-甲醇(65:35),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温为室温,检测波长 250 nm,进样量 10 μL。

2.2.2 专属性试验 取葛根素对照品适量,置于 10 mL 量瓶中,用甲醇定容,即得对照品溶液;取 Pue-NLC 0.5 mL 置于 10 mL 量瓶中,用甲醇定容,即得供试品溶液;取空白 NLC 0.5 mL 置于 10 mL 量瓶中,用甲醇定容,即得空白对照溶液。取 3 种溶液进行 HPLC 测定,结果见图 1,表明辅料对葛根素含量测定无干扰,该检测方法符合专属性要求。

2.2.3 标准曲线的制备 精密称取葛根素对照品溶液适量,用甲醇溶解并稀释,分别配置成质量浓度为 2.55, 5.10, 10.20, 20.40, 30.60, 40.80, 51.00, 102.00 mg·L⁻¹ 的系列对照品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件进行测定。以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,得线性方程 $Y = 38.854X + 16.569$ ($R^2 = 0.9998$),表明葛根素在 2.55 ~ 102.00 mg·L⁻¹ 线性关系良好。

2.2.4 精密度试验 分别配制高、中、低 3 种不同



A. 对照品; B. 供试品; C. 空白对照; 1. 葛根素

图1 葛根素纳米结构脂质载体 HPLC

质量浓度的葛根素对照品溶液,于1 d内各平行测定5次,连续测定5 d,结果日内RSD依次为0.83%,0.24%,1.18%,日间RSD分别为1.81%,1.39%,1.72%,说明仪器精密度良好。

2.2.5 回收率试验 精密量取3份空白纳米粒溶液,分别加入10,51,102 mg·L⁻¹的葛根素对照品溶液0.5 mL,加甲醇超声溶解并定容至10 mL,静置,用0.22 μm微孔滤膜滤过,取续滤液10 μL注入液相色谱仪($n=3$)。结果平均回收率分别为97.84%,97.51%,98.98%,RSD依次为2.60%,0.84%,0.54%,表明该方法稳定可靠。

2.3 包封率测定 取Pue-NLC分散液0.5 mL,置于离心超滤管内管(Millipore 10 KD),于5 000 r·min⁻¹离心10 min,外管滤液置于10 mL量瓶内,用甲醇溶解定容至刻度;另取分散液0.5 mL置于10 mL量瓶内,用甲醇超声溶解30 min,定容至刻度,过滤,取滤液10 μL进样,按2.2.1项下色谱条件进行测定。按下式计算包封率为(91.33 ± 1.2)%。

$$\text{包封率} = (W_{\text{总}} - W_{\text{离}}) / W_{\text{总}} \times 100\%$$

2.4 正交试验优选 在预试验基础上,选取固体脂质材料的用量、豆磷脂与泊洛沙姆-188的比例、脂质材料与乳化剂的比例及药物用量为考察因素,每个因素设3个水平。以包封率为指标,按L₉(3⁴)正交设计表进行处方筛选。因素水平见表1,试验安排及结果见表2,方差分析见表3。

表1 葛根素纳米结构脂质载体的制备工艺
优选正交试验因素水平

水平	A 脂质材料用量 /mg	B 豆磷脂:泊洛 沙姆-188	C 脂质材料- 乳化剂	D 药物用量 /mg
1	0.4	1:2	1:2	8
2	0.6	1:3	3:4	10
3	0.8	1:7	1:1	12

表2 葛根素纳米结构脂质载体的制备工艺优选正交试验安排

No.	A	B	C	D	包封率/%
1	1	1	1	1	78.68
2	1	2	2	2	91.23
3	1	3	3	3	83.14
4	2	1	2	3	73.22
5	2	2	3	1	86.56
6	2	3	1	2	91.36
7	3	1	3	2	69.51
8	3	2	1	3	88.62
9	3	3	2	1	86.53
K ₁	253.05	221.41	258.66	251.77	
K ₂	251.14	266.41	250.98	252.10	
K ₃	244.66	261.03	239.21	244.98	
R	2.80	15.00	6.48	2.37	

表3 正交试验包封率方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	12.89	402.63	63.98	10.77	>0.05
B	2.00	2.00	2.00	2.00	>0.05
C	6.45	201.32	31.99	5.38	>0.05
D(误差)	1.20	37.39	5.94	1.00	

由直观分析可知,各因素对制备工艺的影响顺序为B>C>A>D。以极值最小的D因素为误差项进行方差分析,结果表明其他各因素对制备工艺的饿影响均不显著。初步确定最佳处方为A₁B₂C₁D₂,即脂质材料用量400 mg, $m_{\text{豆磷脂}}:m_{\text{泊洛沙姆-188}}=1:3$,脂质材料-乳化剂1:2,药物用量10 mg。

2.5 Pue-NLC的物理性质考察 吸取Pue-NLC分散液适量,滴加在覆盖碳膜的铜网上,用2%磷钨酸负染,室温干燥0.5 h,置于透射电镜下观察纳米粒的外部形态,结果见图2。吸取Pue-NLC分散液1 mL,用重蒸水稀释5倍后,放入Zeta电位及粒度分析仪的样品池中测定粒径及Zeta电位,粒径分布见图3。

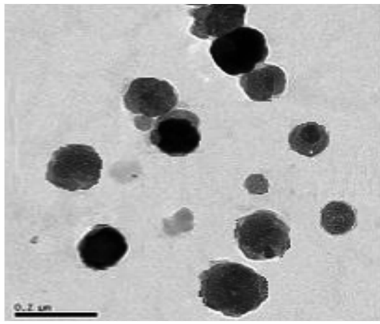


图 2 葛根素纳米结构脂质载体透射电镜(标尺 0.2 μm)

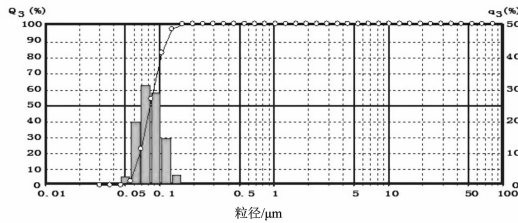


图 3 葛根素纳米结构脂质载体粒径分布

由以上结果可知, Pue-NLC 形状大多呈类圆球状,大小均匀,表面圆整;粒度分布均匀,平均粒径(89 ± 7) nm。测得 Pue-NLC 的平均 Zeta 电位值(-22 ± 0.4) mV,属热力学稳定体系。

2.6 体外释放度考察 取 Pue-NLC 和 Pue 溶液各 3 mL,平行 3 组,置于透析袋内,悬置于 500 mL 的 PBS 7.4 释放介质中,温度控制在(37 ± 0.5) °C,进行体外释药试验,分别于 0.083,0.17,0.25,0.42,0.5,1,1.5,2,4,6,8,10,12,16,18,24 h 吸取透析液 5 mL,补加等体积的释放介质。取出的透析液于 0.22 μm 微孔滤膜滤过,按 HPLC 测定葛根素含量,计算药物的累积释放率见图 4,拟合方程见表 4。结果表明在释放介质条件下,葛根素原料药在 8 h 内基本全部释放完全,Pue-NLC 在 24 h 累积释放率 69.25%,无突释效应,且具有良好的缓释特性,拟合后符合双相动力学方程。

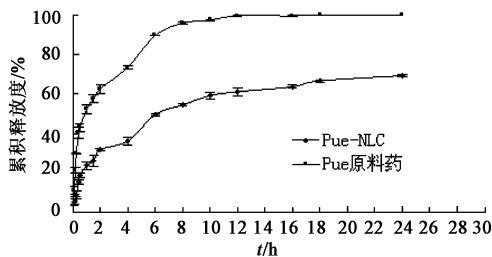


图 4 葛根素原料药和葛根素纳米结构脂质载体的体外释放曲线(n = 3)

3 讨论

常用于制备 NLC 的方法主要有高压匀质法、熔融超声法、溶剂挥散法、微乳法等^[12-14]。熔融超声法

表 4 葛根素纳米结构脂质载体累积释药曲线的拟合方程

模型	方程	R ²
零级	$Q = 0.192\ 04t + 0.027\ 77$	0.800 9
一级	$Q = 1 - e^{-0.08524t}$	0.763 8
Higuchi	$Q = 0.168\ 90t^{1/2}$	0.926 9
双相动力学	$Q = 0.707\ 21 - 0.180\ 32e^{-3.082\ 74t} - 0.537\ 41e^{-0.142\ 64t}$	0.993 0

制备纳米粒时脂质材料黏度大,很难同药物混合均匀,加入水相后有块状物体析出。微乳法在熔融状态下脂质材料仍不能同药物混合均匀,且包封率较低。而乳化超声法是将脂质材料与药物一起加入有机溶剂中溶解,使之混合均匀,与上 2 种方法比较,大大的提高包封率,且通过超声破碎,降低了粒径。

曾考虑选用超速离心法测定包封率,在 20 000 r·min⁻¹离心 4 h 的条件下,制剂不能分层,无法测得结果。最终选用离心超滤法进行包封率的测定,且该方法操作简单、耗时短。

采用乳化-超声法制备的葛根素纳米结构脂质载体,其制备工艺流程简单、理化性质理想,但葛根素纳米结构脂质载体对 Aβ₂₅₋₃₅ 诱导的 PC12 细胞损伤的保护作用还有待于进一步研究,使其能够成为治疗阿尔茨海默病的前景性药物。

[参考文献]

- [1] William M Partridge. Drug targeting to the brain[J]. Pharm Res,2007,24(9):1733.
- [2] 刘宝峰. 阿尔茨海默病的中药治疗研究进展[J]. 天津药学,2011,23(1):65.
- [3] 陈振振,陆洋,杜守颖. 脑靶向制剂的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(19):307.
- [4] Jnana P, Aiman H, Rainer H, et al. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products [J]. Int J Pharm,2009,366(1/2):170.
- [5] Muller R H, Radtke M, Wissing S A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations[J]. Adv Drug Deliv Rev,2002,54(1):131.
- [6] Zhang X X, Gan Y, Yang X G, et al. Preparation of PEG-modified nanostructured lipid carriers loaded with hydroxycamptothecin and tissue distribution in mice [J]. Acta Pharm Sin,2008,43(1):91.
- [7] Kalariya M, Padhi B K, Chougule M, et al. Clobetasol propionate solid lipid nanoparticles cream for effective treatment of eczema: formulation and clinical implications[J]. Indian J Exp Biol,2005,43(3):233.

不同孔径超滤膜对栀子苷热原去除工艺的影响

陈伟^{1,2}, 张鹏^{1*}, 彭国平², 郑云枫², 李贺敏²

(1. 中国中医科学院西苑医院实验研究中心, 北京 100091; 2. 南京中医药大学药学院, 南京 210029)

[摘要] 目的: 考察不同孔径超滤膜对去除栀子苷热原工艺的影响。方法: 考察不同孔径超滤膜去除栀子苷中热原的效果, 以鲎试剂动态浊度法定量测定超滤前后栀子苷原料中内毒素含量, 筛选去除栀子苷中热原的最佳工艺。结果: 100 kDa 孔径的超滤膜可较好地去除栀子苷药液中热原, 对栀子苷成分的影响较小。结论: 采用超滤法去除栀子苷中热原的工艺可行, 可为其他中药注射剂及原料生产工艺中热原去除提供参考。

[关键词] 超滤; 栀子苷; 细菌内毒素

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)10-0011-03

[doi] 10.11653/syjf2013100011

Effects of Different Aperture Ultrafiltration Membranes on Removal Process of Pyrogen for Geniposide

CHEN Wei^{1,2}, ZHANG Peng^{1*}, PENG Guo-ping², ZHENG Yun-feng², LI He-min²

(1. Research and Development Centre, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China; 2. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate effects of different aperture ultrafiltration membranes on removal technology of pyrogen for geniposide. **Method:** Effect of removal process of pyrogen in geniposide with different aperture ultrafiltration membranes was investigated, kinetic turbidimetric limulus reagent method was adopted to quantitative determine the content of endotoxin in raw material of geniposide before and after ultrafiltration, in order to screen the best removal process of pyrogen in geniposide. **Result:** The 100 kDa aperture ultrafiltration

[收稿日期] 20121202(008)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30772755, 81073060); 国家科技重大专项(2009ZX09103-317)

[第一作者] 陈伟, 硕士, 从事中药化学研究, E-mail: 540584399@qq.com

[通讯作者] * 张鹏, 博士, 副研究员, 从事药物化学研究, Tel: 010-62835640, E-mail: onflown@sina.com

- [8] Sanna V, Gavini E, Cossu M, et al. Solid lipid nanoparticles(SLN) as carriers for the topical delivery of econazole nitrate: *in-vitro* characterization, *ex-vivo* and *in-vivo* studies [J]. J Pharm Pharmacol, 2007, 59(8):1057.
- [9] 侯永春, 严孜. 葛根素对慢性脑缺血大鼠海马 CA1 区 NGF 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(3):184.
- [10] 闫福岭, 鲁国, 王雅琼, 等. 葛根素对 AD 大鼠脑内 $A\beta$ (1-40) 和 Bax 表达的影响[J]. 中华神经医学杂志, 2006, 5(2):158.
- [11] 叶峻. 乳化-超声法纳米氧化锌的制备[J]. 四川师范大学学报:自然科学版, 2009, 32(5):654.
- [12] 陈锋, 金日显, 陈燕军, 等. 纳米结构脂质载体的研究[J]. 中国新药杂志, 2008, 17(6):456.
- [13] 陈燕军, 金日显, 周雅琴, 等. 芎归散超临界 CO_2 萃取物固体脂质纳米粒的制备及体外释药特性评析[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(5):326.
- [14] 杨勇, 奉建芳, 张慧, 等. 星点设计-效应面法优化蟾酥固体脂质纳米粒制备工艺[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(8):650.

[责任编辑 仝燕]