

制剂与质量

水飞蓟素固体脂质纳米粒载药机制的研究

何 军^{1,2}, 奉建芳^{1*}, 庞家忠^{1**}, 陆伟根¹, 侯世祥^{2*}

(1. 上海医药工业研究院 药物制剂部, 上海 200437; 2. 四川大学华西药学院, 四川 成都 610041)

摘要:目的 对水飞蓟素固体脂质纳米粒的载药机制进行研究。方法 采用膜滤法和凝胶柱色谱法对不同方法制备的水飞蓟素固体脂质纳米粒的载药形式进行研究。结果 采用不同的制备方法以及不同分散溶剂均对纳米粒的载药形式有较大的影响,冷压-匀质法制备的纳米粒药物以包裹或吸附的形式存在,以无水乙醇为分散溶剂时,药物以包裹为主;热融-匀质法主要形成以脂质为核、药物吸附于表面的纳米粒。结论 不同制备方法对水飞蓟素固体脂质纳米粒的载药形式有显著性影响。

关键词:水飞蓟素;固体脂质纳米粒;冷压-匀质法;热融-匀质法

中图分类号:R283.6; R286.02 文献标识码:A 文章编号:0253 2670(2004)08 0864 03

Drug-loaded mechanism of solid lipid nanoparticles loading with silymarin

HE Jun^{1,2}, FENG Jian-fang¹, PANG Jia-zhong¹, LU Wei-gen¹, HOU Shi-xiang²

(1. Pharmaceutical Division, Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 200437, China;

2. West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: Object To study the drug-loaded mechanism of solid lipid nanoparticles loading with silymarin (SM-SLN). Methods The separation technique of membrane-filtering and gel chromatography was used to inspect drug-loaded mechanism of SM-SLN prepared by different methods. Results Different preparation and dispersion solvent have different drug-loaded types. Drug in nanoparticles by cold-homogenization existed in two patterns: Encapsulation and adsorption, while nanoparticles prepared by melt-homogenization mainly formed lipid core and drug was absorbed in surface. Conclusion Different preparation methods have distinct effect on drug-loaded types of SM-SLN.

Key words: silymarin; solid lipid nanoparticles (SLN); cold-homogenization; melt-homogenization

固体脂质纳米粒(solid lipid nanoparticles, SLN)是一种以固态的天然或合成的类脂,如卵磷脂、三酰甘油酯等为载体,将药物包裹于类脂核中制成粒径为10~1 000 nm的固体胶粒给药体系。近年来,SLN已成为药剂学中纳米释药系统的研究热点之一。目前,国内外开展的相关研究已涉及制备工艺、体内外释药、物理化学稳定性等方面^[1],但对于纳米粒的载药形式研究尚少。本实验采用不同的制备方法制备了水飞蓟素固体脂质纳米粒,并采用两种方法测定固体脂质纳米粒的包封率,对纳米粒的载药形式进行了研究,结果与国外文献基本一致^[2]。

1 材料与仪器

水飞蓟素(silymarin, SM, 辽宁盘锦华成制药厂),大豆磷脂(上海太伟药业有限公司,注射级),

Compritol 888 ATO(上海卡乐康包衣技术有限公司,药用级),葡萄糖凝胶(瑞典 Pharmacia 公司),水飞蓟宾对照品(中国药品生物制品检定所,纯度>98%,批号 0856-9902),Poloxamer 188, Compritol 888 ATO 等辅料由上海浦力膜制剂辅料科技合作公司提供,均符合《中华人民共和国药典》2000年版有关规定。

HP1100 型高效液相(美国 Aglient), NS1001L PANDA2K 型高压匀质机(意大利 Niro Soavi), Nicomp/ Pss ZW380 型粒度仪(美国)。

2 药物含量的 HPLC 测定

2.1 色谱条件:保护柱:SupelguardTM Discovery C₁₈(20 mm ×4.0 mm, 5 μm); 色谱柱:Kromasil C₁₈(250 mm ×4.6 mm, 5 μm); 流动相:甲醇-0.1 mol/L

* 收稿日期:2003-12-30

基金项目:国家“863”计划项目(2001AA218011);上海市纳米科技与产业发展促进中心项目(0143nm063)

作者简介:何 军(1976—),男,云南施甸人,在读博士,1997年毕业于北京医科大学药学院,从事中西药新型给药系统的研究。

E-mail: chinaynhe@163.com

* 通讯作者 Tel: (021) 55514600-118 E-mail: fengjianfang@163.net

** 广西中医学院药学 2003 届毕业生

磷酸盐缓冲液(用磷酸调 pH 3.0, 49-51); 体积流量: 1.0 mL/min; 柱温: 40℃。取水飞蓟素固体脂质纳米粒(SM-SLN)用流动相溶解后, 离心, 取上清液进样 20 μL, 测定。

2.2 标准曲线的制备: 水飞蓟宾甲醇储备液(250.4 μg/mL) 分别用流动相稀释为 100.16、50.08、25.04、12.52、1.252、0.1252、0.0626 μg/mL, 照上述色谱条件进行测定。以水飞蓟宾质量浓度(C)为横坐标, 峰面积(A)为纵坐标进行线性回归。结果, 水飞蓟宾在 0.0626~100.16 μg/mL 时与峰面积有良好的线性关系, 回归方程为 $A = 55.17 C + 6.02$, $r = 0.9999$ 。

2.3 精密度的试验: 取水飞蓟宾对照品溶液(15.8 μg/mL) 1 d 内测定 5 次和连续 5 d 测定峰面积, 结果日内、日间 RSD 分别为 0.16%、0.45% ($n = 5$)。

2.4 加样回收率试验: 将溶胀 12 h 以上 Sephadex G-25 装于树脂柱(10 cm × 1 cm)中, 精密吸取高、中、低浓度水飞蓟宾流动相溶液 0.5 mL (设含药量为 W_1) 上样, 用 80 mL 蒸馏水进行洗脱, 流速为 1.0 mL/min, 收集后 40 mL 洗脱液, 测定游离水飞蓟宾的量(W_2)。按回收率 = $W_2 / W_1 \times 100\%$ 计算, 结果, 平均回收率为 102.03%, RSD = 1.35%。

3 包封率的测定

对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, 药剂学中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、超滤等)、低温超速离心、凝胶柱色谱法。由于水飞蓟素难溶于水, 利用透析法分离游离药物, 所需时间较长, 不利于样品的快速检测; 采用低温超速离心(44 720 × g) 30 min, 未能分离出上清液。结合本实验室的条件, 采用膜滤法和凝胶柱色谱法对 SM-SLN 中的游离药物进行分离测定。

3.1 膜滤法: 针对 SM-SLN 粒径测定结果, 采用合适孔径的滤膜对游离药物进行分离测定。测定滤液中药物量, 以下式进行计算。

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

W_T 、 W_F 分别表示 SLN 胶体溶液中总药量、游离药物量

3.2 凝胶柱色谱法

3.2.1 葡聚糖凝胶的选择: 取 1.0 g 经水溶胀 12 h 以上的葡聚糖凝胶(Sephadex G-100 或 G-25) 装于色谱柱(15 cm × 1 cm)中, 上样 0.5 mL (1.027 mg/mL 甲醇溶液), 用水 1.0 mL/min 洗脱, 每 2 mL 收集一管, HPLC 法测定。结果表明用 Sephadex G-

100 时, 游离药物在第 7 管明显流出, 而用 Sephadex G-25 时, 游离药物在第 20 管时明显流出。游离药物在凝胶柱上保留时间越长, 流出越慢, 越有利于纳米粒与游离药物的分开, 因此, 选用 Sephadex G-25 对样品进行分离测定。

3.2.2 不同色谱柱内径的选择: 取 1.0 g 经水溶胀 12 h 以上的葡聚糖凝胶 Sephadex G-25 装于不同色谱柱(10 cm × 1.0 cm, 20 cm × 1.5 cm)中, 上样 0.5 mL (1.027 mg/mL 甲醇溶液), 用水 1.0 mL/min 洗脱, 每 2 mL 收集一管, HPLC 法测定。洗脱曲线见图 1。可见, 不同色谱柱内径对游离药物洗脱有较大影响, 选择内径为 1.0 cm 的色谱柱更有利于分离。

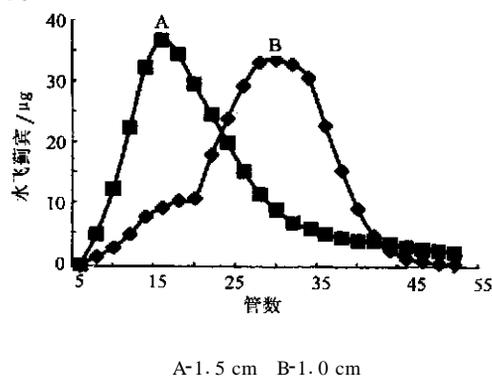


图 1 不同内径色谱柱中游离药物的洗脱曲线
Fig. 1 Elution curve of free drug in different column inside diameter

3.2.3 葡聚糖凝胶对药物的吸附: 精密量取已知质量浓度的药物溶液 20 mL 置具塞三角瓶中, 加入 1.0 g Sephadex G-25(用水浸泡 12 h 以上)中, 室温下, 磁力搅拌 30 min, 取上清液进行测定。结果表明葡聚糖凝胶 Sephadex G-25 对药物吸附可达 553.04 μg/g ($n = 3$), 说明 Sephadex G-25 对药物具有较强的吸附作用, 可见 Sephadex G-25 对 SM-SLN 分离存在吸附和分子筛两种作用机制。

根据以上结果可见, 如果药物主要是以吸附的形式存在于纳米粒表面, 采用 Sephadex G-25 对纳米粒包封率进行测定时, 表面药物有可能被完全洗脱下来, 所测包封率结果就会较低, 而通过膜滤法测到的结果则较高。因此, 可以预测, 如果纳米粒是基质型或镶嵌型, 两种方法的测定结果差别应该基本一致, 反之, 吸附型则结果应该相差较大。

4 不同制备方法对纳米粒载药方式的影响

4.1 热融-匀质法: 取处方量的水飞蓟素、ATO、大豆磷脂, 在 (80 ± 5) ℃ 水浴下, 使其完全呈熔融液或溶解于适量的有机溶剂中, 作为有机相; 取一定量的

Poloxamer 188 和甘油分散于同温度的水中,作为水相。在 1 800 r/min 搅拌的条件下,将有机相缓慢注入(80 ±5) 水相中,持续搅拌 2 h,形成初乳。初乳在室温下,100 MPa 高压乳匀 5 次,迅速冷至室温,即得。同时采用膜滤法、葡聚糖凝胶柱色谱法对纳米粒的包封率进行测定,结果见表 1。

表 1 不同分散方法对 SLN 载药的影响

Table 1 Effect of different dispersing methods on drug-loading of SLN

分散方法	平均粒径/ nm	包封率/ %	
		膜滤法	葡聚糖凝胶柱色谱法
熔融液	69.6	99.24	8.36
无水乙醇	99.7	99.90	21.53
异丙醇	85.6	99.62	66.95
醋酸乙酯	64.5	99.59	0.63
丙酮	50.6	98.25	0.42

可见,以异丙醇为分散溶剂,药物包裹在纳米粒中最多,无水乙醇其次。因异丙醇毒性较大,不利于工业化生产,所以本试验选择包封率较好的无水乙醇和较差的醋酸乙酯为分散溶剂,进一步考察该方法对纳米粒载药方式的影响。

4.2 冷压-匀质法:称取处方量的水飞蓟素、ATO、大豆磷脂,在(80 ±5) 水浴下,使其完全溶解于适量的有机溶剂中,持续加热至挥尽溶剂,迅速于 0 中冷冻 2 h。取一定量的 Poloxamer 188 和甘油分散于 4 的水中,形成均匀的水相。将上述制备所得的固体与 4 的水相混合、研磨,至粒径 100 μm 以下,形成均匀的微粒水分散体系,室温条件下 150 MPa 高压匀化 10 次,迅速冷至室温,即得。同时采用膜滤法、葡聚糖凝胶柱色谱法对纳米粒的包封率进行测定,结果见表 2。

4.3 结果:从测定的结果可推测两种制备方法形成的纳米粒类型见图 2。

冷压-匀质法制备的水飞蓟素固体脂质纳米粒兼有两种类型纳米粒的结构特点,而以无水乙醇为分散溶剂时,固态溶液的纳米粒为主;而热融-匀质法主要形成以脂质为核、药物吸附于表面的纳米粒。

表 2 不同制备方法与不同包封率测定方法结果

Table 2 Results of different preparation and determining entrapment efficiency

方法	分散溶剂	平均粒径/ nm	包封率/ %	
			膜滤法	凝胶柱色谱法
热融-匀质法	醋酸乙酯	64.5	99.59	0.63
	无水乙醇	99.7	99.90	21.53
冷压-匀质法	醋酸乙酯	75.6	99.91	42.23
	无水乙醇	53.4	95.54	82.20

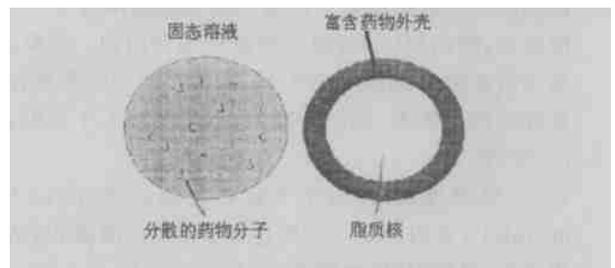


图 2 不同类型纳米粒结构图

Fig. 2 Schematic diagram of different types of nanoparticles

5 讨论

研究表明,葡萄糖凝胶对于水飞蓟素有较强的吸附作用,所以,葡萄糖凝胶分离游离药物和固体脂质纳米粒(SLN)时,不仅存在有分子筛效应,还具有吸附作用,可以用来测定包裹或镶嵌于纳米粒中的药物。而膜滤法主要是利用膜对 SLN 进行截留,达到分离的效果(不能分离表面吸附的药物)。因此,可以从两种测定方法的结果上推测纳米粒的载药类型,并可以大致计算纳米粒表面吸附的药物量。

SLN 载药的不同可以有不同的体内外释药行为^[2],此外,药物在纳米粒中的存在形式还可借助于 DSC、ESR、NMR 等手段进一步探索。

References:

- [1] Müller R H, Mader K, Gohla S. Solid lipid nanoparticles for controlled drug delivery—a review of the state of the art [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2000, 50(1): 161-177.
- [2] Muhlen A Z, Schwyz C, Mehnert W. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery—drug release and release mechanism [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 1998, 45(2): 149-155.

敬告读者

《中草药》杂志编辑部尚存部分过刊合订本,包括:1974-1975 年,1976 年,1979 年,1985~1994 年(80 元/年);1995~1997 年(110 元/年),1998 年(120 元),1999 年(135 元),2000 年(180 元),2001 年(200 元);2002 年(200 元);1996 年增刊(50 元),1997 年增刊(45 元),1998 年增刊(55 元),1999 年增刊(70 元),2000 年增刊(70 元),2001 年增刊(70 元),2002 年增刊(65 元),2003 年增刊(65 元)。欢迎订购,电话:022-27474913;022-23006821(传真)。