

· 制剂与质量 ·

薄膜-超声分散法制备 β -榄香烯固体脂质纳米粒

刘红梅, 褚惠媛*, 崔金霞*, 吴琳华

(哈尔滨医科大学附属第二医院 药学部, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要: 目的 制备 β -榄香烯固体脂质纳米粒, 并对其粒径和包封率进行考察。方法 采用薄膜-超声分散法制备, 并以包封率为指标采用正交设计法优化 β -榄香烯固体脂质纳米粒的制备工艺。结果 所得 β -榄香烯固体脂质纳米粒的最佳制备条件是 β -榄香烯 20 μL , 卵磷脂 90 mg, 硬脂酸 90 mg, 2.5% 聚山梨酯 80 5 mL, 2.5% 泊洛沙姆 188 5 mL。结论 该处方可用于 β -榄香烯固体脂质纳米粒的制备, 工艺可行。

关键词: β -榄香烯固体脂质纳米粒; 薄膜-超声分散法; 制备

中图分类号: R 284.2; R 286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)02-0193-03

Preparation of β -elemene solid lipid nanoparticles by film-ultrasonic wave dissolving techniques

L U Hongmei, CHU Huiyuan, CUI Jin-xia, WU Lin-hua

(Department of Pharmacy, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, China)

Abstract: **Objective** To prepare β -elemene solid lipid nanoparticles and investigate their particle size diameter and entrapment efficiency. **Methods** The β -elemene solid lipid nanoparticles were prepared by film ultrasonic wave dissolving techniques. And the optimum formula was selected through orthogonal design test according to the entrapment efficiency. **Results** The optimizing technique was β -elemene (20 μL), stearic acid (90 mg), lecithin (90 mg), Tween80 (2.5%, 5 mL) and Poloxamer 188 (2.5%, 5 mL). **Conclusion** The technique of preparing β -elemene by film-ultrasonic wave dissolving technique is feasible

Key words: β -elemene solid lipid nanoparticles; film-ultrasonic wave dissolving technique; preparing

β -榄香烯是从姜科植物温莪术的根茎中分离提取的倍半萜烯类化合物, 具有抗肿瘤和提高机体免疫力的作用^[1], 同时还具有抗菌、抗病毒、活血祛瘀、改善微循环等作用^[2]。目前临床上多采用 β -榄香烯注射剂、乳注射剂、冻干粉、气雾剂应用于宫颈癌和肝癌的治疗, 在抑制瘤体增殖、改善临床症状、提高生存质量、防止复发转移以及提高机体免疫功能均有明显的效果^[3]。但现有的制剂都具有药物用量较多, 不良反应较大等缺点, 尤其是注射剂在使用时刺激血管给病人带来不便。将 β -榄香烯制备成固体脂质纳米粒, 不仅能减少用药量, 降低刺激性和不良反应, 还能改变药物在体内器官的分布, 选择性治疗癌症, 而且便于保存和使用。因此本实验以硬脂酸为载体, 以包封率为评价指标, 采用单因素试验初选, 再以正交试验法优选各因素的条件, 确定了薄膜-超声法制备 β -榄香烯固体脂质纳米粒的制备工艺。

1 仪器与材料

Waters 高效液相色谱仪 (Millennium 32 色谱管理系统, 510 泵, U6K 手动进样器, 486 紫外检测器); JEM-1220 电子显微镜 (日立电子); Zetasizer 激光粒径分析仪 (Malvern 公司); KQ-3200E 医用超声波清洗器。

β -榄香烯对照品 (大连远大制药有限公司, 质量分数为 99.2%, 批号 040308), 泊洛沙姆 188 (Poloxamer 188, BASF 公司), 聚山梨酯 80 (长沙市有机试剂厂), 蛋黄卵磷脂 (北京奥博星生物技术责任有限公司), 硬脂酸 (分析纯, 沈阳新西试剂厂), 二氯甲烷 (天津市和密欧化学试剂开发中心), 乙腈 (色谱纯, 山东禹王实业有限公司禹城化工厂), 无水乙醇 (天津市东丽区天大化学试剂开发中心), 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 β 榄香烯固体脂质纳米粒的制备^[4]: 将一定比例的卵磷脂和硬脂酸溶于二氯甲烷内, 置于旋转蒸发器中, 减压回收二氯甲烷成膜。另取 10 mL 聚山梨酯 80 与泊洛沙姆 188 的混合溶液, 置于成膜的梨形烧瓶中, 旋转将膜洗下, 加入适量 β 榄香烯, 超声处理 50 min。超声后的溶液置 4℃ 冰箱中保存。

2.2 β 榄香烯的 HPLC 法测定^[5]

2.2.1 色谱条件: 色谱柱为 ODS C₁₈ (200 mm × 4.6 mm, 5 μ m), 柱温为 30℃, 流动相为乙腈-水 (88:12), 检测波长为 210 nm, 体积流量为 1 mL/min, 进样量为 20 μ L。

2.2.2 标准曲线的制备: 精密称取 β 榄香烯对照品 98.4 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加无水乙醇至刻度, 摇匀, 得 9.84 mg/mL 对照品储备液。精密吸取 β 榄香烯对照品储备液 5、10、20、30、40、50、60 μ L 分别置 10 mL 量瓶中, 加无水乙醇至刻度, 混匀, 进样, 测定峰面积。以峰面积(A)为纵坐标, 质量浓度(C)为横坐标进行回归分析, 得线性方程 $A = 15\,391C - 255.6$, $r = 0.999\,4$ 。结果表明 β 榄香烯在 5.0~60.0 μ g/mL 与峰面积呈良好的线性关系。

2.2.3 回收率的测定: 取不含 β 榄香烯的空白固体脂质纳米粒用注射器注入离心管中, 取 Quick sealed 封口器将管口封死, 50 000 r/min 离心 30 min。精密吸取上清液, 用水稀释 50 倍, 取上清液用 0.22 μ m 微孔滤膜滤过, 取续滤液进行测定。根据测得的 β 榄香烯的量与加入 β 榄香烯总量的比值计算回收率。结果低、中、高 3 个质量浓度的回收率分别是 93.2%、104.7%、106.8% ($n = 5$), 平均回收率为 101.6%。可见辅料对测定没有干扰, 且该方法的重现性好。

2.3 包封率的测定: 将制备好的 β 榄香烯固体脂质纳米粒用注射器注入离心管中, 取 Quick sealed 封口器将管口封死, 50 000 r/min 离心 30 min。取上清液, 用水稀释 50 倍, 取上清液, 进样测定, 计算滤液中游离 β 榄香烯的质量, 计算包封率。

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

$C_{\text{测}}$ 为上清液中测得的药物量, $C_{\text{总}}$ 为加入的药物量。

2.4 处方筛选: 以粒径、包封率为指标, 对 β 榄香烯的用量、硬脂酸与卵磷脂的比例用量、超声时间、加药方式、2.5% 聚山梨酯 80 和泊洛沙姆 188 的比例用量进行单因素试验考察。除考察的因素外, 保持其他条件不变, 测定包封率。结果显示: 超声时间的长短不同造成其包封后粒径大小不同, 超声时间长则粒径小, 时间短则粒径大, 但超声时间超过 50 min 在

对其影响粒径不大, 故将时间定为 50 min; 药物的性质不同可能对固体脂质纳米粒的物理性质产生不同的影响, 试验分别考察了将药物加入有机溶剂中成膜后再超声制备固体脂质纳米粒和将药物制备成空白固体脂质纳米粒后再加药物超声制备方法进行比较, 后者的包封率优于前者。而对 β 榄香烯的用量、硬脂酸与卵磷脂的比例用量、2.5% 聚山梨酯 80 和泊洛沙姆 188 的比例用量都对其包封率有不同程度的影响。

根据单因素考察结果, 选取影响 β 榄香烯固体脂质纳米粒的加药量(A)、磷脂和硬脂酸的比例(B)和 2.5% 聚山梨酯 80 与 2.5% 泊洛沙姆 188 的比例(C)3 个因素为主要影响因素, 每个因素选 3 个水平, 并选用 L₉(3⁴) 正交表进行正交试验设计, 因素与水平见表 1。

表 1 因素与水平

Table 1 Factors and levels

水平	因 素				
	A/ μ L	B/(mg · mL ⁻¹)		C/(mL · mL ⁻¹)	
1	20	120	60	7.5	2.5
2	30	90	90	5.0	5.0
3	40	60	120	2.5	7.5

表 2 正交试验结果

Table 2 Results of orthogonal test

试验号	A	B	C	空白	包封率/%
1	1	1	1	1	53.60
2	1	2	2	2	69.32
3	1	3	3	3	62.51
4	2	1	2	3	66.66
5	2	2	3	1	69.60
6	2	3	1	2	65.21
7	3	1	3	2	70.50
8	3	2	1	3	59.00
9	3	3	2	1	67.80
K ₁	185.43	190.76	177.81	191.00	
K ₂	201.47	197.92	203.78	205.03	
K ₃	197.3	195.52	202.61	188.17	
k ₁	61.81	63.59	59.27	63.67	
k ₂	67.16	65.97	67.93	68.43	
k ₃	65.77	65.17	67.54	62.72	
R	5.35	2.38	8.66	5.71	

由极差 R 可知影响因素的主次顺序为 C > A > B, 即 2.5% 聚山梨酯 80 与 2.5% 泊洛沙姆 188 用量比为主要影响因素, 其次为 β 榄香烯的加药量, 然后是卵磷脂和硬脂酸用量比。3 个因素对包封率的影响都不大, 没有统计学意义。所以根据外观和包封率来选择 A₁B₂C₂ 为最佳条件。

2.5 优化条件下制备的 β 榄香烯固体脂质纳米粒的理化性质

2.5.1 形态及粒度分布的测定: 取 β 榄香烯固体脂质纳米粒溶液适量, 加入一定量的重蒸水稀释, 混匀。用覆有支持膜的铜网蘸取, 停留 2~ 3 min, 浸入磷钨酸溶液中, 染色 2~ 3 min, 自然干燥, 用透射电镜观察。结果表明 β 榄香固体脂质纳米粒大小均匀呈规则球形, 其形态见图 1。另取 β 榄香烯固体脂质纳米粒稀释后, 于粒径测定仪上进行测定, 其粒度分布见图 2。

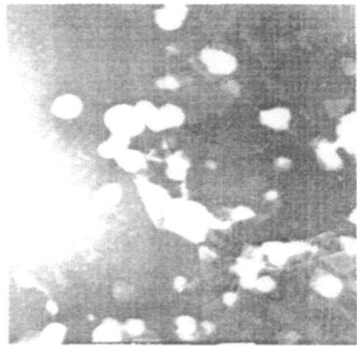


图 1 β 榄香烯固体脂质纳米粒的透射电镜图
Fig. 1 Transmission EM photograph of β -elemene solid lipid nanoparticles

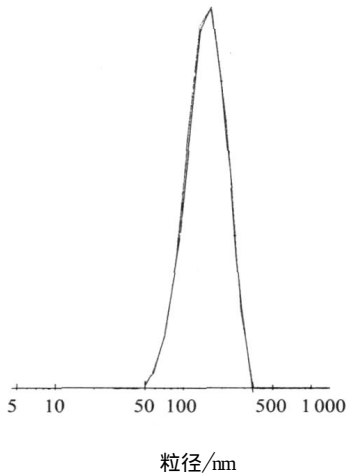


图 2 β 榄香烯固体脂质纳米粒的粒度分布图
Fig. 2 Particle size distribution of β -elemene solid lipid nanoparticles

2.5.2 包封率的测定: 取优化条件下制得的 β 榄香烯固体脂质纳米粒, 测定包封率, 结果包封率为 70.18% ($n=3$)。

2.6 稳定性考察: 将 β 榄香烯固体脂质纳米粒胶体分散液密封于 10 mL 安瓿中, 密封, 于 4℃ 避光放置 6 个月, 观察平均粒径和包封率随时间的变化情

况, 结果见表 3。

表 3 β 榄香烯固体脂质纳米粒的粒径和包封率变化
($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 3 Particle size diameter and entrapment efficiency of β -elemene solid lipid nanoparticles
($\bar{x} \pm s, n=3$)

放置时间	粒径/nm	包封率/%
0 天	251 $\pm$ 15	70.2 $\pm$ 0.3
3 个月	269 $\pm$ 18	68.2 $\pm$ 0.4
6 个月	297 $\pm$ 12	67.9 $\pm$ 0.3

3 讨论

目前制备固体脂质纳米粒的常用方法可采用超声分散法、高压均质法、溶剂挥发法、微乳分散法、溶剂分散凝聚法等, 根据现有条件实验采用超声分散法, 并对这种制备方法进行了考察, 制得的 β 榄香烯固体脂质纳米粒粒径均匀, 但较大, 包封率较好。由于时间因素未做其他方法, 因此, 采用其他方法制备 β 榄香烯固体脂质纳米粒有待进一步试验。

因为有表面活性剂的作用和纳米级的粒子, β 榄香烯固体脂质纳米粒具有较好的理化稳定性。有人认为由于该分散体是热力学不稳定体系, 固体脂质纳米粒混悬液仍然是可以互相碰撞聚合的, 通常在短时间里就有粒径的增大、粒子聚合甚至胶凝^[5]。将固体脂质纳米粒混悬液采用冷冻干燥或喷雾干燥的方法干燥成固体, 可能有助于纳米粒的稳定。

固体脂质纳米粒混悬液外观具有淡蓝色乳光^[6], 而本实验可见为白色乳光和淡黄色乳光。这可能与被包裹的药物、表面活性剂的种类及纳米粒的粒径有关。因为有白色乳光的为加硬脂酸多的, 有淡黄色乳光的为加卵磷脂多的。

参考文献:

[1] 时继慧. 温莪术挥发油的实验药理研究—— β 榄香烯抗肿瘤作用的研究[J]. 中药通报, 1981, 6(6): 32.
[2] 李大景. 榄香烯的药理研究及临床应用[J]. 时珍国医国药, 2001, 12(12): 1123.
[3] 徐英辉, 董 斌. 榄香烯抗肿瘤作用的实验研究进展[J]. 中国实用医学研究杂志, 2004, 3(2): 137.
[4] 李新中, 刘 韶, 雷 鹏, 等. 薄膜-超声法制备黄芩苷固体脂质纳米粒的工艺研究[J]. 中国医学工程, 2004, 12(5): 21.
[5] 宋笑丹, 杜 霞, 董 迪, 等. HPLC 法测定 β 榄香烯脂质体药物含量及包封率[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(8): 1222-1225.
[6] Muller R H, Mehnert W, Luck J S, et al. Solid lipid nanoparticles (SLN) — an alternative colloidal carrier system for controlled drug delivery [J]. Eur J Pharm Biopharm, 1995, 41(1): 62-69.