

柚皮素纳米结构脂质载体的处方优化和初步评价

李静静¹, 贾运涛², 田睿³, 邓萍¹, 李腾¹, 张良珂^{1*}

1. 重庆医科大学 重庆市生物化学与分子药理学重点实验室, 重庆 400016

2. 重庆医科大学附属儿童医院 药剂科, 重庆 400010

3. 重庆医科大学 实验教学中心, 重庆 400016

摘要: 目的 制备一种具有缓释作用的柚皮素(NG)新型纳米结构脂质载体(NG-NLC), 并对其理化性质进行初步考察。方法 以乳化蒸发-低温固化法制备 NG-NLC。采用星点设计-效应面法考察柚皮素-脂质材料比、单硬脂酸甘油酯-辛酸甘油酯比, 以及乳化剂用量对包封率和载药量的影响。通过包封率、载药量、粒径、DSC 分析以及体外释放度来评价 NG-NLC 的特性。结果 经过处方优化, 确定 NG-NLC 最佳工艺条件为柚皮素-脂质材料比为 20.77, 单硬脂酸甘油酯-辛酸甘油酯比为 1.85, 乳化剂用量为 58.45 mg, 制备的 NG-NLC 包封率为 (80.13±1.45)%, 载药量为 (3.59±0.06)%, 平均粒径为 (134.1±9.1) nm, 多分散系数 (PDI) 为 0.152±0.044; 体外释放实验表明, NG-NLC 在 pH 7.4 的缓冲溶液中前期有突释现象, 后期则有缓释特征。结论 采用乳化蒸发-低温固化法成功制备了 NG-NLC, 为柚皮素的临床应用奠定了基础。

关键词: 柚皮素; 纳米结构脂质载体; 乳化蒸发-低温固化法; 星点设计-效应面法; 缓释作用

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)02-0211-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.02.011

Optimization and evaluation of naringenin loaded nanostructured lipid carriers

LI Jing-jing¹, JIA Yun-tao², TIAN Rui³, DENG Ping¹, LI Teng¹, ZHANG Liang-ke¹

1. Chongqing Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Pharmacology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

2. Department of Pharmacy, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China

3. Experimental Teaching Centre, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Abstract: Objective To prepare novel naringenin-loaded nanostructured lipid carriers (NG-NLC) and investigate their physicochemical properties. **Methods** The NG-NLC were prepared by emulsion-evaporation-solidified at low temperature (EESLT) method. Central composite design-response surface methodology (CCD-RSM) was used to optimize the formulation of NG-NLC. Naringenin/lipid materials ratio, glycerol monostearate (GMS)/medium chain triglycerides (MCT) ratio, and emulsifier concentration were identified as key factors which were responsible for entrapment efficiency (EE) and drug loading (LD) of NG-NLC. The mean diameter, DSC analysis, and *in vitro* release characteristics of NG-NLC were investigated to evaluate their physicochemical properties. **Results** After the formulation optimization, the naringenin/lipid materials ratio was 20.77, GMS/MCT ratio was 1.85, and emulsifier concentration was 58.45 mg. The EE of NG-NLC was (80.13 ± 1.45)%, LD was (3.59 ± 0.06)%, average diameter of particles was (134.1 ± 9.1) nm, and polydispersity index (PDI) was 0.152 ± 0.044. *In vitro* release test revealed that the drug could be sustained-released from NG-NLC in buffer solution (pH 7.4) after a burst release in initial phase. **Conclusion** The EESLT method could be employed to prepare NG-NLC, which may lay the foundation for its further clinical application.

Key words: naringenin; nanostructured lipid carriers; emulsion evaporation-solidified at low temperature method; central composite design-response surface method; sustained-release

收稿日期: 2014-07-11

基金项目: 重庆市自然科学基金项目 (cstc2012jjA10021); 高等学校博士学科点专项科研基金 (20125503120003); 重庆市卫生局医学科研项目 (2013-2-060); 重庆医科大学大学生科学研究与创新实验项目 (201432, 201244, 201217); 重庆市教育委员会科学技术研究项目 (KJ120307); 海扶之星学生科研基金项目 (XS201309)

作者简介: 李静静 (1990—), 女, 硕士研究生, 主要从事药物新型给药系统的研究。E-mail: 492557417@qq.com

*通信作者 张良珂, 男, 博士, 教授。Tel: (023)68485161 E-mail: zlkdyx@126.com

纳米结构脂质载体 (nanostructured lipid carrier, NLC) 是在固体脂质纳米粒 (solid lipid nanoparticles, SLN) 的基础上发展起来的第 2 代新型胶体载药系统, 是一种由固液脂质和表面活性剂组成的具有晶格缺陷的纳米载药系统。它的不同之处在于将化学性质差异很大的液态脂质加入到固态脂质中, 打破了固体脂质原有的整齐规则的晶格排列, 从而使得载体具有较高的晶体缺陷, 可提供更多的空间容纳药物, 提高了载体的载药能力且可控制药物的释放^[1-3], 同时也保持了 SLN 给药系统较好的生理相容性。

柚皮素 (naringenin, NG) 是从芸香科植物中提取的黄酮类化合物, 广泛存在于蔷薇科植物如樱花、梅花、橙中, 具有抑制肿瘤形成与生长、降血糖、抑制血小板凝聚、抗动脉粥样硬化、解痉和利胆^[4]等生物活性。但柚皮素水溶性较差, 生物利用率较低, 严重限制了其在医药领域的应用。本实验以柚皮素为模型药物, 采用乳化蒸发-低温固化法制备柚皮素纳米结构脂质载体 (NG-NLC), 优化其制备工艺, 为柚皮素的临床应用奠定基础。

1 仪器与材料

UV/Vis-2600 型紫外分光光度计, 日本岛津公司; AR 2140 精密电子天平, 美国 Ohaus 公司; 85-2 恒温磁力搅拌器, 上海司乐仪器公司; DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器, 巩义市予华仪器有限责任公司; Zetasizer Nano ZS90 激光粒径分析仪, 英国马尔文公司; SHZ-88 台式水浴恒温振荡器, 江苏太仓市试验设备厂; 耐驰 TG-DSC 同步热分析仪 STA 449C, 德国 Netzsch 公司。

柚皮素, 质量分数 98%, 批号 XC20140322, 西安小草植物科技有限公司; 柚皮素对照品, 质量分数 98%, 批号 N107346, 阿拉丁试剂 (上海) 有限公司; 辛酸甘油酯, 浙江省建德市千岛精细化工实业有限公司; 单硬脂酸甘油酯 (GMS)、大豆卵磷脂, 成都市科龙化工试剂厂; 泊洛沙姆 188 (Pluronic® F68), 德国 BASF 公司; 葡聚糖凝胶 G-50, 上海如吉生物科技发展有限公司; 乙醇为分析纯, 实验用水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 NG-NLC 的制备

采用乳化蒸发-低温固化法制备 NG-NLC^[5-6]。精密称取处方量大豆卵磷脂、GMS、辛酸甘油酯及柚皮素, 溶于无水乙醇, 构成有机相; 另称取处

方量泊洛沙姆 188 于 50 mL 圆底烧瓶中, 加入适量蒸馏水, 构成水相。将加热至 75 °C 的有机相缓慢滴入 75 °C 的水相中, 并于 75 °C 恒温搅拌 2 h。将所得半透明乳液快速倒入 0~2 °C 冰水中, 继续搅拌 1 h, 即得 NG-NLC 混悬液。除不加辛酸甘油酯, 同法制备柚皮素固体脂质纳米粒 (NG-SLN) 混悬液。

2.2 检测波长的确定

精密称取适量柚皮素对照品溶于乙醇中并定容至刻度, 作为对照品储备液 (1 mg/mL)。取适量储备液于 10 mL 量瓶中, 乙醇稀释定容。用紫外分光光度计在 200~600 nm 内扫描。结果表明柚皮素在 294 nm 处有最大吸收, 而相关辅料在此处基本无干扰, 故本实验选 294 nm 作为检测波长。

2.3 标准曲线的绘制

精密吸取适量对照品储备液 (1 mg/mL), 用乙醇稀释得到质量浓度为 20.0 μg/mL 的溶液, 分别吸取不同体积上述溶液于 5 mL 量瓶中, 得到质量浓度为 2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0、14.0 μg/mL 的系列对照品溶液。以吸光度 (*A*) 值为纵坐标, 质量浓度 (*C*) 为横坐标进行线性回归, 得到回归方程 $A=0.057 C+0.017 7$ ($r=0.999 9$), 表明柚皮素在 2.0~14.0 μg/mL 线性关系良好。

2.4 包封率的测定

2.4.1 NG-NLC 洗脱曲线的绘制 取适量 NG-NLC 胶体溶液上葡聚糖凝胶 G-50 柱, 以蒸馏水为洗脱剂, 体积流量为 0.5 mL/min, 每 2 毫升接 1 管, 用乙醇稀释适当倍数, 测定 *A* 值, 绘制出 NG-NLC 洗脱曲线 (图 1), 由图 1 可以看出 NG-NLC 和游离药物可以完全分开。

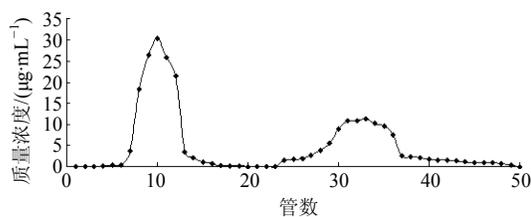


图 1 柚皮素纳米结构脂质载体洗脱曲线
Fig. 1 Elution curve of NG-NLC in column

2.4.2 样品的测定 取适量 NG-NLC 上葡聚糖凝胶 G-50 柱, 以蒸馏水为洗脱剂, 体积流量为 0.5 mL/min, 收集并合并带乳光部分洗脱液, 加乙醇溶解定容; 另取适量上柱前的样品加乙醇溶解定容, 采用紫外分光光度法于 294 nm 处测定 *A* 值, 代入

线性回归方程计算药物的质量浓度，并计算包封率和载药量。

$$\text{包封率} = W_0/W_1$$

$$\text{载药量} = W_0/(W_1+W_2)$$

W_0 为纳米粒中包裹柚皮素的质量， W_1 为纳米混悬液中柚皮素的质量， W_2 为开始称取的柚皮素的质量， W_3 为脂质材料的质量

2.5 处方优化实验

2.5.1 实验设计 采用星点设计-效应面法考察柚皮素-脂质材料比 (X_1)、GMS-辛酸甘油酯比 (X_2) 以及乳化剂用量 (X_3) 对包封率 (Y_1) 和载药量 (Y_2) 的影响。每个因素取 5 个水平，实验安排及结果见表 1。

2.5.2 模型拟合 以 Y_1 和 Y_2 为因变量，分别对各

表 1 实验设计及结果

Table 1 Experimental design and results

试验号	X_1	X_2	X_3/mg	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$	试验号	X_1	X_2	X_3/mg	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$
1	9.23 (-1)	1.85 (-1)	58.45 (-1)	55.19	5.64	11	15.00 (0)	1.00 (-1.732)	70.00 (0)	50.60	3.26
2	20.77 (+1)	1.85 (-1)	58.45 (-1)	80.66	3.61	12	15.00 (0)	5.00 (+1.732)	70.00 (0)	43.12	2.79
3	9.23 (-1)	4.15 (+1)	58.45 (-1)	43.06	4.46	13	15.00 (0)	3.00 (0)	50.00 (-1.732)	47.83	3.09
4	20.77 (+1)	4.15 (+1)	58.45 (-1)	51.79	2.43	14	15.00 (0)	3.00 (0)	90.00 (+1.732)	40.10	2.60
5	9.23 (-1)	1.85 (-1)	81.55 (+1)	49.05	5.05	15	15.00 (0)	3.00 (0)	70.00 (0)	55.50	3.57
6	20.77 (+1)	1.85 (-1)	81.55 (+1)	59.50	2.78	16	15.00 (0)	3.00 (0)	70.00 (0)	54.67	3.52
7	9.23 (-1)	4.15 (+1)	81.55 (+1)	34.86	3.64	17	15.00 (0)	3.00 (0)	70.00 (0)	53.37	3.50
8	20.77 (+1)	4.15 (+1)	81.55 (+1)	40.63	1.92	18	15.00 (0)	3.00 (0)	70.00 (0)	53.91	3.47
9	5.00 (-1.732)	3.00 (0)	70.00 (0)	24.24	4.62	19	15.00 (0)	3.00 (0)	70.00 (0)	52.54	3.39
10	25.00 (+1.732)	3.00 (0)	70.00 (0)	54.80	2.15	20	15.00 (0)	3.00 (0)	70.00 (0)	53.74	3.46

因素 (自变量) 进行多元线性回归和二次多项式拟合，最终根据决定系数来判断模型的好坏，拟合方程如下：多元线性回归方程 $Y_1 = 74.585 07 + 1.321 08 X_1 - 5.594 88 X_2 - 0.392 67 X_3$ ($r = 0.807 8$, $P = 0.000 6$); $Y_2 = 8.439 14 - 0.149 06 X_1 - 0.354 0 X_2 - 0.023 99 X_3$ ($r = 0.904 7$, $P < 0.000 1$)。二次多项式方程 $Y_1 = -48.694 95 + 8.346 95 X_1 - 2.987 38 X_2 + 1.621 62 X_3 - 0.465 94 X_1 X_2 - 0.040 144 X_1 X_3 + 0.106 59 X_2 X_3 - 0.093 933 X_1^2 - 0.513 33 X_2^2 - 0.012 371 X_3^2$ ($r = 0.883 5$, $P = 0.021 6$); $Y_2 = 6.043 13 - 0.216 61 X_1 - 0.532 48 X_2 + 0.067 257 X_3 + 5.062 50 \times 10^{-3} X_1 X_2 - 3.937 50 \times 10^{-4} X_1 X_3 + 3.468 75 \times 10^{-3} X_2 X_3 + 2.664 29 \times 10^{-3} X_1^2 - 0.023 393 X_2^2 - 6.839 29 \times 10^{-4} X_3^2$ ($r = 0.915 7$, $P = 0.005 7$)。

从拟合方程的判定系数 r 值可以看出 3 个指标采用二次多项式方程拟合效果较好。 X_1 、 X_2 、 X_3 对包封率、载药量均有显著影响。

运用 Design-Expert 软件绘制星点设计实验结果的三维效应图 (图 2)。由图 2 可知，随着药脂比的增加，包封率先增加然后逐渐趋于平稳，而载药量逐渐减少；固定药脂比，包封率和载药量随液态脂质减少而逐渐降低；随乳化剂用量增加，包封率

和载药量都是先增加后逐渐降低。根据二次多项式拟合方程、三维效应图及二维等高线图综合分析评价，以包封率和载药量为指标，并结合实际情况的可行性，确定最优处方为 $X_1 = 20.77$, $X_2 = 1.85$, $X_3 = 58.45 \text{ mg}$ 。按最优处方制备 3 批样，计算出包封率为 $(80.13 \pm 1.45)\%$ ，预测值为 74.27%，偏差为 -7.89%；而载药量为 $(3.59 \pm 0.06)\%$ ，预测值为 3.31%，偏差为 -8.31%。绝对值都小于 10%，表明建立的数学模型预测性良好，因此可用于 NG-NLC 处方预测和优化。

2.6 NG-NLC 及相关制剂粒径分析

取适量 NG-SLN 和 NG-NLC，采用马尔文 Zetasizer Nano ZS90 激光粒径测定仪测定粒径分布及 Zeta 电位，结果见表 2，NG-NLC 平均粒径为 $(134.1 \pm 9.1) \text{ nm}$ ，多分散系数 (PDI) 为 0.152 ± 0.044 ，表明制备的纳米粒粒径分布均匀，基本呈正态分布。与 NG-SLN 相比，NG-NLC 的平均粒径小，Zeta 电位的绝对值略高，更稳定。

2.7 NG-NLC 的 DSC 分析

分别取适量柚皮素、卵磷脂、GMS 和 NG-NLC 冻干粉末置于坩埚内，在 $30 \sim 300 \text{ }^\circ\text{C}$ 以 $10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ 升温速率做差示扫描量热分析，结果见图 3。可知，

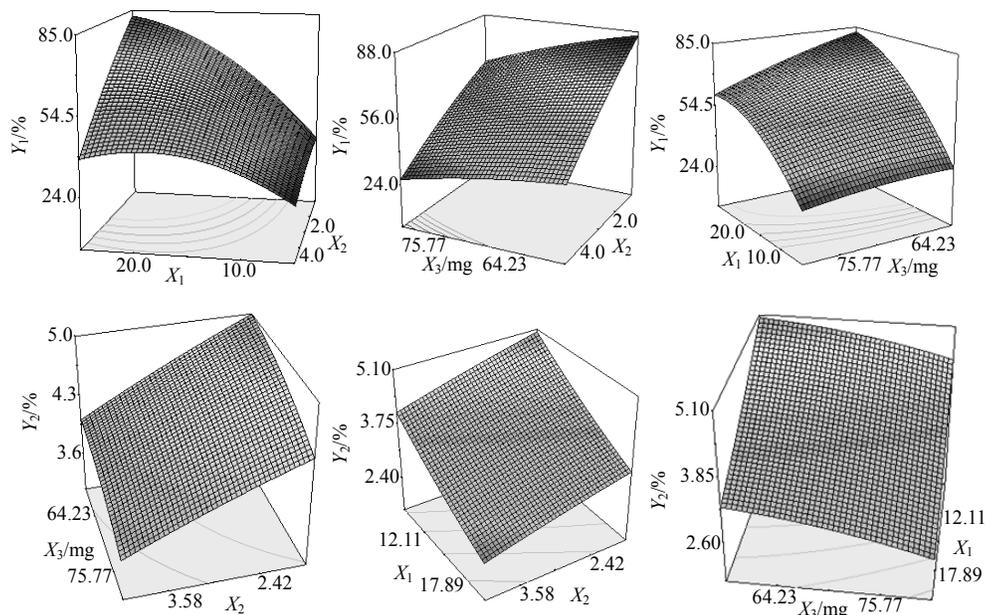


图 2 Y_1 和 Y_2 对 $X_1 \sim X_3$ 的三维效应图和等高线图

Fig. 2 3D Response surface graph and contour maps displaying three variables influence of Y_1 and Y_2 on $X_1 \sim X_3$

表 2 NG-SLN 和 NG-NLC 粒径、PDI 和 Zeta 电位的比较
Table 2 Particle size, PDI, and Zeta potential of NG-SLN and NG-NLC

制剂	粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV
NG-SLN	306.7±12.3	0.560±0.064	-10.9±1.66
NG-NLC	134.1± 9.1	0.152±0.044	-25.5±1.98

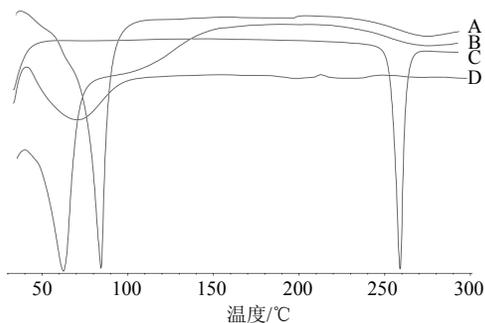


图 3 GMS (A)、NG-NLC (B)、柚皮素 (C) 和卵磷脂 (D) 的差示扫描图谱

Fig. 3 DSC of GM (A), NG-NLC (B), NG (C), and lecithin (D)

柚皮素的特征吸热峰为 259 °C，GMS 的吸热峰为 82 °C；在 NG-NLC 曲线图中，柚皮素特征吸热峰消失，且没有 GMS 和大豆卵磷脂的吸热峰，在 62 °C 处出现一新的吸热峰。由此说明，NG-NLC 形成一新的物相，柚皮素不再以结晶状态存在，可能以无定形态分布在基质中。

2.8 体外释放行为的考察

本实验采用透析袋法初步研究柚皮素混悬液

(NG-SUS)、NG-SLN 及 NG-NLC 体外释放。取适量 NG-SUS、NG-SLN 及 NG-NLC 于活化好的透析袋中，置于装有 25 mL 含 5 mg/mL 十二烷基硫酸钠的磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.4) 的具塞瓶中，在温度为 (37.0±0.5) °C，100 r/min 的水浴恒温振荡器中，按设定的时间点取样 4.0 mL，同时补加等量等温的释放介质。紫外分光光度法测定释放介质中药物的 A 值，根据回归方程计算累积释放率。结果见图 4。与 NG-NLC 及 NG-SLN 相比，NG-SUS 36 h 累积释放量达到 93%，进一步观察释放曲线，NG-SLN 前 12 h 累计释放达到 47%，48 h 后累积释放量达 79%，而 NG-NLC 释放速度略微快，可能是由于固体脂质 GMS 熔点略高，在低温固化过程中优先冷却下来形成内核，液态脂质材料辛酸甘油

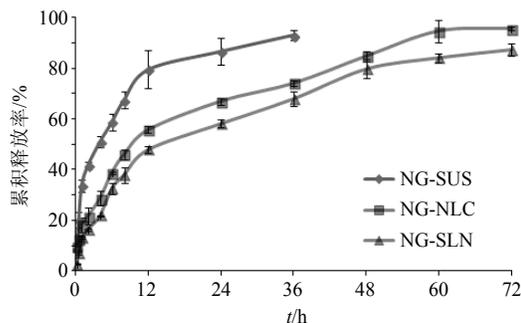


图 4 NG-SUS、NG-NLC 及 NG-SLN 在 PBS 缓冲液 (pH 7.4) 中释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 In vitro release of NG-SUS, NG-NLC, and NG-SLN in PBS buffer solution with pH 7.4 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

脂(MCT)不仅分布在外壳也分布在内核中,导致药物释放速度略快;另外也可能是因为液态脂质MCT加入到固态脂质GMS中,打破了原有的整齐规则的晶格排列,使载体具有较高的晶体缺陷,从而导致NG-NLC比NG-SLN释放速度快。

3 讨论

纳米粒包封率的测定有很多种^[7-8],如超速离心法、葡聚糖凝胶过滤法以及透析法等。本实验曾考虑采用超速离心法,15 000 r/min,离心30 min,发现NG-NLC不能离心下来,分析原因可能是采用的固液脂质材料相对密度都低于1。本实验包封率的测定不适合采用超速离心法,故选择葡聚糖凝胶过滤法。

NLC的包封机制主要分为包合和吸附2种模式,在包合模式下药物可以包封在固液脂质材料的脂肪酸链、脂质层以及缺陷型结晶中。根据药脂比以及药物在脂质中的溶解度,药物可分布在固态脂质中,也可分布在液态脂质中,还可以分子状态分散于NLC的整个缺陷型基质中。而在吸附模式下药物主要集中在NLC的表面特别是脂质表面的乳化层中^[9]。药物的包封机制影响着药物的释放,故本实验在pH 7.4 PBS条件下考察了NG-NLC的释放情况。根据NG-NLC的释放结果,前12 h累计释放达到55%,可能是在75 °C条件下制备的NG-NLC,大部分液态辛癸酸甘油酯集中在NLC的外壳,导致药物释放出现突释现象;而48 h后累计释放达84%,推测可能是包裹在纳米粒骨架中的药物缓慢释放所致。

在NG-NLC制备过程中,搅拌速度1 200 r/min时会出现大量泡沫,不利于实验操作;油相加入水相的速度过慢,油相易冷却;搅拌时间过短不利于纳米粒形成;初乳冷却时间过短不利于纳米粒硬化。

本实验采用复合乳化剂,处方中F68起乳化剂的作用,而大豆卵磷脂主要起助乳化剂的作用^[10],在乳滴表面形成稳定的界面膜^[11]。辛癸酸甘油酯作为液态脂质,打破了原有的晶格序列,提高了载体容纳药物的能力^[12],改变其比例可以控制药物的释放速率。

纳米载药系统具有广阔的发展前景,尤其是用于肿瘤靶向治疗的纳米级药物载体。本实验成功制备NG-NLC,与以Brij78为乳化剂的固体脂质纳米粒相比,降低了乳化剂的毒性^[13],为柚皮素的临床应用奠定了基础。

参考文献

- [1] Müller R H, Radtke M, Wissing S A. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs [J]. *Int J Pharm*, 2002, 242(1/2): 121-128.
- [2] Müller 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(Suppl 1): 131-155.
- [3] Das S, Ng W K, Tan R B H, et al. Are nanostructured lipid carriers (NLCs) better than solid lipid nanoparticles (SLNs): development, characterizations and comparative evaluations of clotrimazole-loaded SLNs and NLCs? [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2012, 47(1): 139-151.
- [4] 杨文青, 马晶, 余华荣. 柚皮素改善阿尔茨海默病模型大鼠的认知能力及其机制研究 [J]. *中草药*, 2013, 44(6): 715-720.
- [5] Jia L J, Zhang D R, Li Z Y, et al. Preparation and characterization of silybin-loaded nanostructured lipid carriers [J]. *Drug Deliv*, 2010, 17(1): 11-18.
- [6] Jia L J, Zhang D R, Li Z Y, et al. Nanostructured lipid carriers for parenteral delivery of silybin: Biodistribution and pharmacokinetic studies [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2010, 80(2): 213-218.
- [7] Wang J W, Tang H F, Shen M, et al. Preparation and quality evaluation of oleanolic-loaded solid lipid nanoparticles [J]. *J Fourth Mil Med Univ*, 2007, 28(5): 472-474.
- [8] Li H R, Li S F. The measurement methods of the entrapment efficiency of drugs in liposomes [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2007, 27(11): 1844-1848.
- [9] 刘凯, 孙进, 何仲贵. 新型纳米结构脂质载体系统的研究进展 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2008, 25(3): 236-242.
- [10] 黄霞, 朱婷婷, 罗晴, 等. 新藤黄酸纳米脂质载体制备及其药剂学性质研究 [J]. *中草药*, 2013, 44(11): 1400-1406.
- [11] 周晖, 邱立朋, 王东凯, 等. 奥沙利铂纳米结构脂质载体的制备及表征 [J]. *药学学报*, 2010, 45(9): 1177-1182.
- [12] Han F, Li S M, Yin R, et al. Effect of surfactants on the formation and characterization of a new type of colloidal drug delivery system: Nanostructured lipid carriers [J]. *Colloids Surf A: Physicochem Eng Aspects*, 2008, 315(1/3): 210-216.
- [13] 张卿, 张良珂, 袁佩, 等. 和厚朴酚固体脂质纳米粒的制备及性质研究 [J]. *中草药*, 2011, 42(4): 691-693.