

## 黄芩素固体脂质纳米粒冻干粉的制备及体外释药性质的研究

于桐<sup>1</sup>, 吴超<sup>1</sup>, 季鹏<sup>1</sup>, 徐杰<sup>1</sup>, 赵颖<sup>1</sup>, 郝艳娜<sup>1</sup>, 赵文明<sup>1\*</sup>, 王铁良<sup>2\*</sup>

1. 辽宁医学院药学院, 辽宁 锦州 121000

2. 辽宁医学院畜牧兽医学院, 辽宁 锦州 121000

**摘要:** **目的** 制备黄芩素固体脂质纳米粒并冻干, 考察其理化性质及体外释药特性。 **方法** 采用乳化蒸发-低温固化法, 以包封率为考察指标, 正交试验优化其处方并考察其粒径、形态、电位、多分散系数(PDI)及体外溶出。以外观、色泽、再分散性为考察指标筛选最佳冻干保护剂, 利用差示扫描量热(DSC)、X射线衍射(XRD)、傅里叶红外光谱(FT-IR)分析药物在纳米粒中的存在状态。 **结果** 黄芩素固体脂质纳米粒外观呈球状体, 分布均匀, 平均粒径为(82.64±6.78) nm, PDI为0.242±0.013, Zeta电位为(-25.7±0.5) mV, 包封率为(81.3±1.2)%, 载药量为(7.16±0.14)% (n=3), 以5%甘露醇作冻干保护剂效果较好, 药物以无定形状态分散在脂质载体中, 体外溶出实验表明黄芩素固体脂质纳米粒与原料药相比具有明显的缓释作用。 **结论** 乳化蒸发-低温固化法制得的黄芩素固体脂质纳米粒, 粒径小, 包封率高, 稳定性好, 工艺简单。

**关键词:** 黄芩素; 乳化蒸发-低温固化; 体外释放; 固体脂质纳米粒; 冻干粉

**中图分类号:** R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2015)18-2720-07

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.18.009

## Preparation and *in vitro* release of lyophilized powder of baicalein solid lipid nanoparticles

YU Tong<sup>1</sup>, WU Chao<sup>1</sup>, JI Peng<sup>1</sup>, XU Jie<sup>1</sup>, ZHAO Ying<sup>1</sup>, HAO Yan-na<sup>1</sup>, ZHAO Wen-ming<sup>1</sup>, WANG Tie-liang<sup>2</sup>

1. College of Pharmacy, Liaoning Medical University, Jinzhou 121000, China

2. College of Animal Husbandry and Veterinary, Liaoning Medical University, Jinzhou 121000, China

**Abstract: Objective** To prepare lyophilized powder of baicalein solid lipid nanoparticles (Ba-SLNs) and investigate its physicochemical properties and release characteristics. **Methods** Ba-loaded SLN was prepared by solvent emulsification-evaporation method, the formulation was optimized by orthogonal design, with encapsulation efficiency (EE) as reference, the measurement of particle size, morphology, Zeta potential, the polydispersity index (PDI), and *in vitro* drug release behavior. The lyophilized powder of appearance, color, redispersibility as indexes, the differential scanning calorimetry (DSC), X-Ray diffraction (XRD), Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) were used to analyze its material phase of the drug in nanoparticles. **Results** The Ba-SLNs assumed a spherical shape with an even distribution of diameter and particle size was (82.64 ± 6.78) nm, the PDI was 0.242 ± 0.013, Zeta potential was (-25.7 ± 0.5) mV, EE was (81.3 ± 1.2)%, and drug loading was (7.16 ± 0.14)% (n = 3). The 5% mannitol was the best protective agent for lyophilized powder of Ba-SLNs. Through the characterization indicated that the drug to amorphous state dispersed in a lipid. *In vitro* dissolution experiments showed Ba-SLNs compared with pure drugs had obviously sustained release. **Conclusion** The technique of preparing Ba-SLN by solvent emulsification-evaporation has small particle size, high EE, and good stability, and the process is simple.

**Key words:** baicalein; solvent emulsification evaporation method; *in vitro* release; solid lipid nanoparticles; lyophilized powder

黄芩素(baicalein, Ba)为黄酮类化合物, 是抗肿瘤、保肝利胆、抗微生物、抗病毒等多种药理学唇形科植物黄芩的主要活性成分, 具有抗菌消炎、作用, 具有广泛的临床应用前景<sup>[1-3]</sup>。但是黄芩素具

收稿日期: 2015-05-09

基金项目: 校长基金-奥鸿博泽基金-医药创新专项(XZJJ20130104-02)

作者简介: 于桐(1987—), 男, 在读硕士, 主要从事药物新剂型的研究。Tel: 18841609266 E-mail: yutongsuccess@163.com

\*通信作者 赵文明, 男, 教授, 主要从事药物新剂型的研究。Tel: (0416)4673469 E-mail: zhaowenming1957@163.com

王铁良, 男, 副教授。Tel: 13704061657 E-mail: zifengas123@163.com

有在体内易被氧化且水溶性差、半衰期短等缺点,导致了生物利用度低,在一定程度上制约了黄芩素的使用,因此如何提高黄芩素体内生物利用度,对其临床的进一步应用具有重要的意义<sup>[4-5]</sup>。固体脂质纳米粒(solid lipid nanoparticles, SLNs)以天然或合成的脂质作为骨架材料制成纳米给药系统,以良好的生理相容性为原则,将药物包裹于脂质中或分散在纳米粒表面形成的新型纳米给药体系,最大限度的避免药物与外界环境及水溶液接触,既增加了药物的稳定性,延长了药物的半衰期,也解决了药物水溶性差的难题,进而提高亲脂性药物的生物利用度。同时 SLNs 又具有纳米粒药物的泄露少、毒性低、操作简单等优点,可广泛应用于大规模生产的纳米给药系统<sup>[6-8]</sup>。本实验通过乳化蒸发-低温固化法制备黄芩素固体脂质纳米粒(Ba-SLNs),且筛选冻干保护剂冻干并进行质量评价。

## 1 仪器与材料

UV-9100 型紫外分光光度计,北京普析通用仪器有限公司;AL204 电子天平,梅特勒-托利多仪器有限公司;JEM-1010 透射电镜,日本电子株式会社;TJ270-30A 傅里叶红外光谱,天津市拓普仪器有限公司;DF-101S 恒温磁力搅拌器,郑州市亚荣仪器有限公司;KQ-250B 型超声波清洁器,昆山市超声仪器有限公司;Nano-ZS90 激光粒度仪,英国马尔文仪器有限公司;2500 PC X 射线衍射仪,Rigaku Corporation;DSC-60 差式扫描量热仪,日本岛津公司。

黄芩素,西安瑞迪生物科技有限公司,质量分数 $\geq 98\%$ ,批号 20140129;大豆卵磷脂,上海太伟药业,批号 20141027;泊洛沙姆 188,天津市博迪化工股份有限公司,批号 20140219;单硬脂酸甘油酯,天津市博迪化工股份有限公司,批号 20130622;无水乙醇,分析纯;聚山梨酯 80,天津市永晟精细化工有限公司,批号 201320604;葡聚糖凝胶 50,上海蓝季科技发展有限公司,批号 20141220;透析袋,美国联合碳化公司,批号 20141108,截留相对分子质量 8 000~14 000;甘露醇,天津市致远化工试剂有限公司,批号 20141211;乳糖,批号 20140211,蔗糖,批号 20131026,天津市永晟精细化工有限公司。

## 2 方法与结果

### 2.1 Ba-SLNs 的制备

采用乳化蒸发-低温固化法制备 Ba-SLNs。取处

方量的黄芩素、单硬脂酸甘油酯、卵磷脂溶于 6 mL 无水乙醇中,于 80 °C 恒温水浴锅加热使其充分溶解,构成有机相。另取处方量的泊洛沙姆 188 和聚山梨酯 80 溶于 18 mL 水中构成水相,将有机相在 1 500 r/min 搅拌下缓慢注入水相中,温度维持在(80 $\pm$ 2) °C,搅拌条件下蒸发除去有机溶剂并浓缩至 10 mL,得到黄色半透明乳液。将所得乳液在 1 500 r/min 搅拌下迅速混于 0~2 °C 的 10 mL 水中,冷冻固化 2 h,0.45  $\mu$ m 微孔滤膜滤过得到 Ba-SLNs 溶液。

空白固体脂质纳米粒(BSLNs)制备时,除不加药物外,其他操作条件同 Ba-SLNs。

### 2.2 Ba-SLNs 的形态、粒径、Zeta 电位测定

Ba-SLNs 溶液用蒸馏水稀释一定倍数,滴于铜网上,2%磷钨酸染色,空气中自然晾干,在透射电镜下观测纳米粒的形态(图 1)。另取 Ba-SLNs 溶液,加蒸馏水稀释 20 倍,激光粒度仪测定粒径及 Zeta 电位(图 2)。本方法制备的纳米粒大小分布比较均匀,平均粒径(82.64 $\pm$ 6.78) nm, PDI 为 0.242 $\pm$ 0.013, Zeta 电位平均为(-25.7 $\pm$ 0.5) mV。

### 2.3 包封率和载药量的测定

**2.3.1 检测波长的选择** 精密称取黄芩素适量,以无水乙醇溶解并稀释至 5  $\mu$ g/mL,在 200~400 nm 扫描,黄芩素的最大吸收波长为 276 nm(图 3-A),而 BSLNs 在此波长处无干扰(图 3-B),因此确定检测波长 276 nm。

**2.3.2 线性关系考察** 精密称取黄芩素对照品 10 mg 于 10 mL 量瓶中,无水乙醇溶解并稀释至 10 mL 作为贮备液,分别精密吸取 20、30、40、50、60、70、80  $\mu$ L 于 10 mL 量瓶中,加无水乙醇稀释至刻度制得质量浓度(C)分别为 2、3、4、5、6、7、8  $\mu$ g/mL 的系列对照品溶液,276 nm 波长处测定吸光

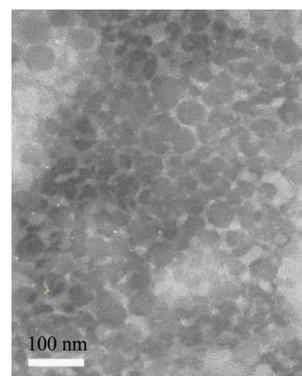


图 1 Ba-SLNs 透射电镜图

Fig. 1 TEM photograph of Ba-SLNs

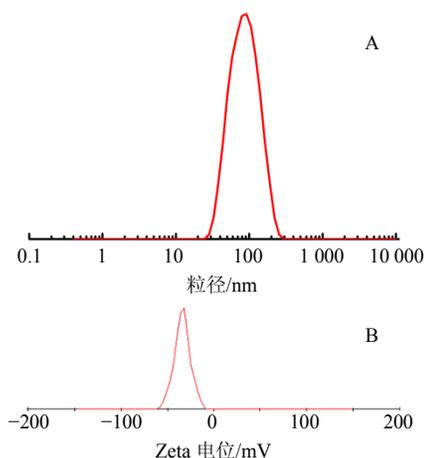


图2 Ba-SLNs的粒径分布(A)和Zeta电位(B)  
Fig. 2 Size distribution (A) and Zeta potential distribution (B) of Ba-SLNs

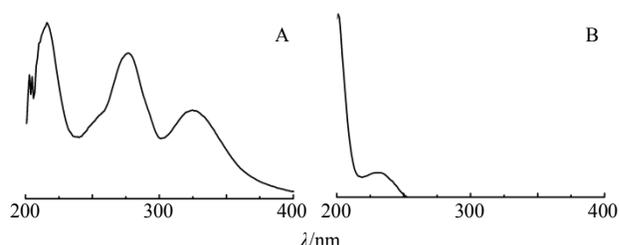


图3 黄芩素(A)和BSLNs(B)的紫外扫描图谱  
Fig. 3 UV spectra of Ba (A) and BSLNs (B)

度(A)值,得回归方程 $A=0.1008C+0.1006$ , $r=0.9997$ ,表明黄芩素在 $2\sim 8\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。低、中、高质量浓度(2、5、 $8\mu\text{g/mL}$ )的对照品溶液日内、日间RSD平均值分别为0.25%和0.51%( $n=3$ );低、中、高样品回收率分别为101.16%、100.07%、99.28%,RSD分别为1.69%、0.82%、1.05%( $n=3$ ),均符合分析要求。

**2.3.3 色谱柱的制备** 选择Sephadex G-50色谱柱(20 cm×1.5 cm)分离Ba-SLNs和游离Ba,取Sephadex G-50适量,置于烧杯中 $100\text{ }^\circ\text{C}$ 煮3 h,在蒸馏水中放置冷却,将其缓慢倒入色谱柱中,适量蒸馏水冲洗,放置备用<sup>[9]</sup>。

**2.3.4 洗脱曲线的建立** 精密移取Ba-SLNs溶液0.5 mL上样,洗脱液为蒸馏水,室温下洗脱,体积流量控制在1 mL/min,收集1 mL/管,总共20管,分别用无水乙醇稀释至5 mL,涡旋2 min,在276 nm下紫外分光光度仪测定其A值。Ba-SLNs中3~9管有黄色乳光的溶液,对应的A值(图4)较大,是含有药物的固体脂质纳米粒,12~15管应为洗脱下来的游离药物,9~12管为药物尚未洗脱下来的中间空白,分离度 $R_f=2.63$ ,说明二者分离较完全。

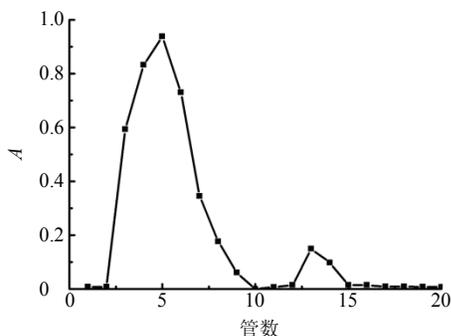


图4 Ba-SLNs洗脱曲线  
Fig. 4 Elution curve of Ba-SLNs

**2.3.5 包封率和载药量的测定** 精密吸取0.5 mL Ba-SLNs溶液上样,以蒸馏水为洗脱液,收集带乳光的部分,无水乙醇定容至10 mL,破乳,再精密吸取1 mL,定容至5 mL;另精密吸取Ba-SLNs混悬液0.5 mL,无水乙醇直接定容至10 mL,破乳,精密吸取1 mL,定容至5 mL,使用紫外分光光度仪测定2种样品,利用外标一点法测定其量。利用公式计算包封率及载药量。

$$\text{包封率} = W_{\text{包}} / W_{\text{总}}$$

$$\text{载药量} = W_{\text{包}} / W_{\text{脂质}}$$

$W_{\text{包}}$ 为Ba-SLNs通过Sephadex G-50色谱柱的黄芩素的质量, $W_{\text{总}}$ 为Ba-SLNs乙醇破乳后黄芩素的总质量, $W_{\text{脂质}}$ 为单硬脂酸甘油酯的质量

## 2.4 单因素试验考察Ba-SLNs制备的影响因素

**2.4.1 因素设计** 设定乳化温度 $80\text{ }^\circ\text{C}$ ,转速1500 r/min,药脂比1:10,单硬脂酸甘油酯-卵磷脂1:2,有机相-水相体积比1:3,以包封率为考察指标,考察表面活性剂的用量及比例对纳米粒的影响,结果发现以单种表面活性剂制备的Ba-SLNs分散性不好,有絮状物的出现,以聚山梨酯80和F68的混合表面活性剂成型性好,稳定性高,聚山梨酯80-F68的混合比例为1:2,用量在1.5%时包封率最高。

在预试验的基础上,以包封率为考察指标,对制备工艺及处方进行了单因素试验考察:搅拌速度、乳化温度、有机相-水相体积比、硬脂酸-卵磷脂质量比、药脂比、纳米乳浓缩为原体积的比例等。

**2.4.2 乳化温度的选择** 设定乳化温度为65、70、75、80、 $85\text{ }^\circ\text{C}$ ,其他条件同“2.4.1”项,以包封率为考察指标,考察温度对Ba-SLNs的影响,结果发现,65 $^\circ\text{C}$ 时温度过低,乳化不彻底,Ba-SLNs成型不好;85 $^\circ\text{C}$ 温度过高,分散不均匀且不稳定;80 $^\circ\text{C}$ 所制得纳米粒包封率最高。

**2.4.3 有机相-水相体积比** 设定有机相-水相体积比为 1:1、1:2、1:3、1:4、1:5，其他条件同“2.4.1”项，以包封率为考察指标，考察有机相-水相体积比对 Ba-SLNs 的影响，结果发现，1:3 比例纳米溶液放置 1 周后依然分散均匀，稳定性好，包封率最高。

**2.4.4 单硬脂酸甘油酯-卵磷脂之比** 设定单硬脂酸甘油酯-卵磷脂之比为 1:0.25、1:0.5、1:1、1:2、1:4，其他条件同“2.4.1”项，以包封率为考察指标，考察单硬脂酸甘油酯-卵磷脂之比对 Ba-SLNs 的影响，结果发现，1:2 比例的纳米溶液包封率最高，无絮状物沉淀，体系均匀度最佳。

**2.4.5 药脂比** 设定药脂比为 1:5、1:10、1:15、1:20、1:25，其他条件同“2.4.1”项，以包封率为考察指标，考察药脂比对 Ba-SLNs 的影响，结果发现，1:10 比例的纳米溶液包封率最高。

**2.4.6 纳米乳浓缩为原体积的比例** 设定浓缩比例分别为 1/2、1/3、1/4，其他条件同“2.4.1”项，以

包封率为考察指标，考察浓缩比例对 Ba-SLNs 的影响，结果发现，浓缩体积过小，体系浑浊不稳定，纳米粒子聚集导致粒径较大，最终确定浓缩比例为 1/2，包封率最高，体系分散均匀。

**2.5 正交试验设计优化 Ba-SLNs 制备工艺**

在单因素试验的基础上，以包封率、粒径为优化指标，选择乳化温度 (A)、药脂比 (B)、混合表面活性剂的总量 (C) 及混合表面活性剂的比例 (D) 对其影响较大，按  $L_9(3^4)$  进行正交试验，筛选最佳处方。应用加权分析法对正交试验结果进行综合分析<sup>[10]</sup>，粒径 ( $y_1$ ) 和包封率 ( $y_2$ ) 分别按 55% 和 45% 的系数积分，综合评分 ( $y$ ) =  $55 \times (1 - y_1/103.9) + 45 \times y_2/81.5$ 。试验设计及结果见表 1，方差分析见表 2。

根据 R 值大小  $D > C > B > A$ ，说明了混合表面活性剂的比例、混合表面活性剂总量、药脂比、乳化温度对于包封率及粒径的影响逐步减小，参考各因素的结果，综合分析得出最佳处方  $A_3B_2C_2D_2$ ，即

表 1  $L_9(3^4)$  正交试验设计与结果

Table 1 Design and results of  $L_9(3^4)$  orthogonal test

试验号	A/°C	B	C/%	D	粒径/nm	包封率/%	y
1	70 (1)	1:5 (1)	1.0 (1)	1:1 (1)	86.55	51.7	37.73
2	70 (1)	1:10 (2)	1.5 (2)	1:2 (2)	62.13	61.5	56.07
3	70 (1)	1:15 (3)	2.0 (3)	1:4 (3)	86.58	40.2	31.36
4	75 (2)	1:5 (1)	1.5 (2)	1:4 (3)	102.80	80.2	44.86
5	75 (2)	1:10 (2)	2.0 (3)	1:1 (1)	65.33	66.1	56.91
6	75 (2)	1:15 (3)	1.0 (1)	1:2 (2)	103.90	71.5	39.48
7	80 (3)	1:5 (1)	2.0 (3)	1:2 (2)	77.88	80.5	58.22
8	80 (3)	1:10 (2)	1.0 (1)	1:4 (3)	107.40	68.2	35.80
9	80 (3)	1:15 (3)	1.5 (2)	1:1 (1)	89.75	81.5	52.49
$K_1$	125.16	140.81	113.01	147.13			
$K_2$	141.25	148.78	153.42	153.77			
$K_3$	146.51	123.33	146.49	112.02			
R	21.35	25.45	40.41	41.75			

表 2 方差分析

Table 2 Analysis of variance

方差来源	离均差平方和	自由度	F 值	显著性
B	112.97	2	9.05	
C	311.32	2	24.95	$P < 0.05$
D	335.54	2	28.48	$P < 0.05$
A(误差)	12.48	2		

$F_{0.05}(2, 2) = 19.00$   $F_{0.01}(2, 2) = 99.00$

温度 80 °C，药脂比 1:10，混合表面活性剂总量为 1.5%，聚山梨酯 80-F68 1:2。

**2.6 验证试验**

以最优处方制备 3 批 Ba-SLNs，分别测定粒径、Zeta 电位、包封率及载药量。结果平均粒径分别为 86.58、86.55、74.81 nm，Zeta 电位分别为 -25.3、-26.2、-25.6 mV，包封率分别为 81.3%、82.5%、80.1%，载药量分别为 7.31%、7.04%、7.13%，表

明本方法制备的 Ba-SLNs 重复性较好。

### 2.7 体外释药实验

按照《中国药典》2010 年版第三法采用透析袋法测定释放度。采用透析袋法测定 Ba-SLNs 在 PBS pH 7.4+0.2%聚山梨酯 80 中的释放行为, 释放体积为 100 mL, 取 Ba-SLNs 溶液 4 mL (相当于黄芩素质量 2 mg) 及等质量分数黄芩素溶液置于透析袋内, 转速为 100 r/min, 温度为 (37.0±0.5) °C, 在预定时间 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、4.0、6.0、8.0、12.0、24.0、36.0 h 取样 2 mL, 同时补充等体积同温的释放介质。利用外标一点法, 通过紫外分光光度仪测定药物累积释放度 (图 5)。

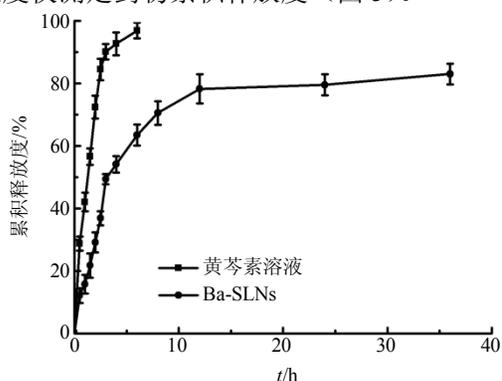


图 5 黄芩素溶液与 Ba-SLNs 体外药物释放曲线 (n = 3)

Fig. 5 *In vitro* release profile of Ba and Ba-SLNs (n = 3)

本实验为模拟此类制剂在生物体内释放条件, 选择 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液作为释放介质, 但黄芩素难溶于水, 无法满足体外释放要求的漏槽条件, 所以本实验在释放介质中加入了表面活性剂, 促进其在介质中的溶解度满足漏槽条件, 并且不含有机溶剂, 更符合生物条件。黄芩素溶液在 6 h 的累积释放度达到了 98.74%, 而 Ba-SLNs 溶液在 6 h 的累积释放度是 48.26%, 从结果中分析得出, 分散在纳米粒表面的药物分子释放较快, 主要来自吸附在纳米粒表面和游离的药物分子, 同时纳米粒巨大的比表面积及与表面结合的表面活性剂也有利于药物的释放, 所以释放前期的药物产生了突释现象<sup>[11-13]</sup>。释放后期随着脂质骨架的逐步溶解使药物不断的释放, 在 36 h 达到了 82.62%。由此可见, SLNs 可以延长药物的释放, 达到缓释效果, 分别以零级释放、一级释放、Higuchi 方程、Ritger-Peppas 方程对 Ba-SLNs 体外释药曲线进行拟合, 体外释药规律符合 Higuchi 方程:  $Q = 15.1371 t^{1/2} + 5.187$  ( $r^2 = 0.982$ )。

### 2.8 Ba-SLNs 冻干粉的制备及评价<sup>[14]</sup>

分别加入 3%、5%、8% 的乳糖、甘露醇、蔗糖

与制备好的 Ba-SLNs 混匀, 取 3 mL 置于西林瓶中, -80 °C 超低温冰箱预冻 24 h 后, 冷冻干燥 24 h, 得到浅黄色疏松冻干粉, 以外观、色泽、再分散性为考察指标, 评分标准见表 3、4。实验结果表明以 5% 甘露醇为冻干保护剂效果最好, 得到的冻干粉外形饱满, 色泽均匀, 再分散性好。

表 3 指标评分标准

Table 3 Score standard of indexes

评分	外观	色泽	再分散性
0~2	皱缩多孔	分层, 上下色差明显	>90 s
3~5	皱缩多孔	分层, 上下色差不明显	60~90 s
6~8	皱缩多孔	上下色差不明显	30~60 s
9~10	致密饱满	均匀无色差	<30 s

表 4 冻干保护剂的筛选

Table 4 Screening of protective agents

试验号	保护剂的用量/%			外观	色泽	再分散性	综合评价
	乳糖	甘露醇	蔗糖				
1	3	—	—	5	6	8	19
2	5	—	—	6	7	7	20
3	8	—	—	8	8	6	22
4	—	3	—	9	7	8	24
5	—	5	—	9	9	9	27
6	—	8	—	8	8	7	23
7	—	—	3	3	5	7	15
8	—	—	5	4	6	8	18
9	—	—	8	5	7	8	20

### 2.9 冻干粉稳定性试验

将制得的冻干粉置于 4、25 °C 下存放, 40 d 后取样观察, 4 °C 存放下的冻干粉外观仍为淡黄色块状物, 表面光滑平整, 未见明显变化, 加入注射用水轻轻振摇后, 分散为黄色混悬液, 再分散性良好, 测得粒径、Zeta 电位、包封率分别为 (261.5±17.5) nm、(-22.5±1.2) mV、(74.2±3.1) %。而 25 °C 存放的冻干粉, 外观出现塌陷, 皱缩, 加入注射用水后再分散性差, 测得粒径、Zeta 电位、包封率分别为 (529.1±30.1) nm、(-12.6±0.8) mV、(47.2±5.2) %, 可能是温度升高, 体系的稳定性降低, 增加了胶体粒子碰撞的动能, 导致了纳米粒子的聚集, 促使单硬脂酸甘油酯和卵磷脂在高温下分解, 导致药物的渗漏率增加, 稳定性降低<sup>[11]</sup>。

### 2.10 差式扫描量热分析 (DSC)

将黄芩素、BSLNs、药物和 BSLNs 冻干粉按同

比例研磨后的物理混合、Ba-SLNs 冻干粉进行 DSC 分析, 氧化铝 ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) 为参比物, 升温范围: 18~285  $^{\circ}\text{C}$ , 以 10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  的速率升温扫描, 以黄芩素、BSLNs、处方比例的物理混合物、Ba-SLNs 冻干粉为样品, 分析结果见图 6。黄芩素原料药和物理混合物在 268  $^{\circ}\text{C}$  都有吸收峰, 但后者吸收峰减小, 可能是在研磨的过程中, 降低了药物的结晶度。而冻干粉的在 268  $^{\circ}\text{C}$  的吸收峰消失, 说明在制备纳米粒的过程中, 药物的晶型发生了改变, 即大部分药物以无定形态存在固体脂质纳米粒中, 而少部分药物以结晶态吸附在纳米粒表面, 也证实了体外释放初期的突释是由于吸附在纳米粒表面的药物溶解所致。

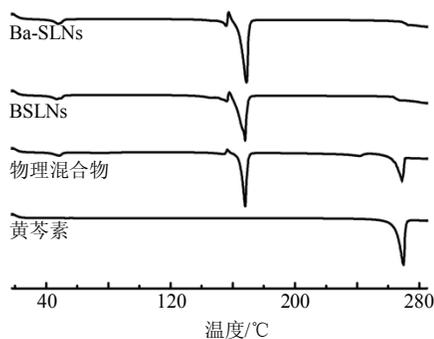


图 6 黄芩素、物理混合物、BSLNs 和 Ba-SLNs 的差示扫描量热分析

Fig. 6 DSC thermograms of Ba, physical mixture, BSLNs, and Ba-SLNs

### 2.11 X 射线衍射分析 (XRD)

通过 XRD 分别测定黄芩素、BSLNs、物理混合物、Ba-SLNs 冻干粉, 以 Cu Ka 作为辐射源, 确定扫描速度 4 $^{\circ}/\text{min}$ , 步长 0.02 及角度 5 $^{\circ}$ ~60 $^{\circ}$ , 黄芩素在 10.07 $^{\circ}$ 、11.30 $^{\circ}$ 、13.22 $^{\circ}$ 、15.36 $^{\circ}$ 、16.33 $^{\circ}$ 、24.16 $^{\circ}$  和 26.80 $^{\circ}$  有特征峰衍射 (图 7), 在物理混合物中的特征峰降低但依然存在, 而 Ba-SLNs 冻干粉的衍射峰消失, 说明在纳米粒形成的过程中, 药物以无定形态嵌入在含有有序晶格的脂质中, 限制了药物结晶的形成, 与 DSC 测试结果一致。

### 2.12 傅里叶红外光谱分析 (FT-IR)

通过 FT-IR 光谱仪测定黄芩素、BSLNs、物理混合、Ba-SLNs 冻干粉, 以 KBr 混匀, 扫描波数范围在 400~4 000  $\text{cm}^{-1}$ , 分辨率为 2  $\text{cm}^{-1}$ , 测定如图 8 所示, 通过对比黄芩素、物理混合、BSLNs 和 Ba-SLNs 冻干粉后红外光谱图, 特征吸收峰都在物混和 Ba-SLNs 冻干粉中出现, 并未发现新的特征吸收峰, 两者之间仅有微弱的范德华力和氢键的作用,

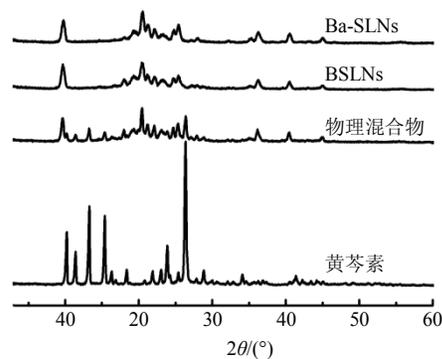


图 7 黄芩素、物理混合物、BSLNs 和 Ba-SLNs 的 XRD 图  
Fig. 7 XRD of Ba, physical mixture, BSLNs, and Ba-SLNs

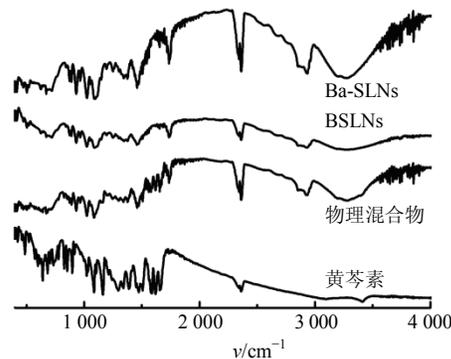


图 8 黄芩素、物理混合物、BSLNs 和 Ba-SLNs 的 FT-IR 图  
Fig. 8 FT-IR spectra of Ba, physical mixture, BSLNs, and Ba-SLNs

未发生化学反应, 故二者之间的吸附属于物理吸附。

### 3 讨论

SLNs 的制备方法有很多, 如高压均质法虽制得的纳米粒较好, 但对设备的要求较高, 是工业化大规模生产纳米粒的主要方法; 薄膜-超声分散法易于控制, 但制备过程中可能产生微米级粒子, 成膜不均匀, 易产生金属污染; 溶剂乳化法制备过程中操作简单, 不需要加热, 但是制备中一旦使用了有机溶剂, 残留的溶剂不易除去, 存在潜在毒性。经初步筛选确立了乳化蒸发-低温固化法制备 Ba-SLNs, 与其他制备方法相比, 具有设备简单易得, 成本低且制备出的 Ba-SLNs 粒度分散均匀。本实验以单硬脂酸甘油酯为载药脂质, 卵磷脂、F68 和聚山梨酯 80 组成混合表面活性剂。考虑到脂质的熔点为 70~80  $^{\circ}\text{C}$ , 乙醇的沸点为 78  $^{\circ}\text{C}$ , 乳化温度应有利于乳化, 且有机溶剂易挥发完全, 减少了潜在的危害, 同时考察了包封率、粒径、Zeta 电位, 最终确定乳化温度为 80  $^{\circ}\text{C}$ 。表面活性剂的使用不但降低了乳液的表面张力, 而且增加了药物在脂质中的溶解度, 单一表面活性剂时, 在乳化过程中乳化不彻底, 包

封率较低且稳定性不高;而混合表面活性剂的使用,可显著提高包封率,有效降低了粒径,减少纳米粒的聚集,大大增加了药物的溶解度和稳定性。

SLNs 和游离药物的分离是测定包封率和载药量的关键,本实验曾考虑采用超速离心法,18 000 r/min 离心 1 h 后仍未见分层,分析原因可能是 SLNs 粒径比较小、采用的脂质材料相对密度都低于 1。考虑到透析法耗时,超滤法和葡聚糖凝胶柱法成本较高,故采取了葡聚糖凝胶色谱柱法。

冷冻固化过程时,降温必须迅速,否则易导致不能瞬时固化,使纳米粒具有一定的软黏性,在相互碰撞的过程中易粘连,使粒径增大且易沉降。而搅拌速度也是影响粒径的重要因素,如果搅拌速度过低,粒径具有增大的趋势,放置后稳定性较差。速率过快,在乳化的过程当中,产生泡沫较多且易外溅,影响了表面活性剂的乳化效果,故本实验采取 1 500 r/min<sup>[15]</sup>。

根据双分子层原理,Zeta 电位的大小与纳米粒体系的稳定性密切相关,为了得到稳定的 SLNs,Zeta 电位一般控制在-20~-45 mV,本实验所制 Ba-SLNs 平均 Zeta 电位在(-25.7±0.5) mV,纳米粒带负电荷,相互之间有较强的斥力有利于稳定,粒径分布均匀,在 4 °C 储存 30 d 后未发现明显的聚集和粘连。采用了冷冻干燥法制备冻干粉,在冻干过程会降低表面活性剂的保护作用,纳米粒容易破裂,加入冻干保护剂后,可以阻止与纳米粒的直接接触,降低药物与脂质的氧化及水解速度,外层的表面活性剂与冷冻保护剂分子间发生氢键缔合,起到了“伪水化层”的作用,与水形成了低共融物或玻璃状物质,抑制了晶型的生长,使冰晶以微晶或无定形态存在,降低其对纳米粒的挤压和机械损伤作用,可防止冻干过程中粒子的聚集且有效地抑制了药物的泄漏<sup>[16]</sup>。

#### 参考文献

- [1] 云宝仪,周磊,谢明杰,等.黄芩素抑菌活性及机制的初步研究[J].药学学报,2012,47(12):1587-1592.
- [2] 辛文好,宋俊科,何国荣,等.黄芩素和黄芩苷的药理作用及机制研究进展[J].中国新药杂志,2013,22(6):647-659.
- [3] Wang W, Xi M, Duan X Z, et al. Delivery of baicalein and paclitaxel using selfassembled nanoparticles: synergistic antitumor effect in vitro and in vivo [J]. *Int J*

*Nanomed*, 2015, 10(5): 3737-3750.

- [4] 高缘,江鲲,李莉,等.黄芩素纳米混悬液的生物利用度研究[J].中国药科大学学报,2011,42(4):314-318.
- [5] Zhang J J, Lv H X, Jiang K, et al. Enhanced bioavailability after oral and pulmonary administration of baicalein nanocrystal [J]. *Int J Pharm*, 2011, 420(1): 180-188.
- [6] Ren J G, Zou M J, Gao P, et al. Tissue distribution of borneol-modified ganciclovir-loaded solid lipid nanoparticles in mice after intravenous administration [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2013, 83(2): 141-148.
- [7] Wang S P, Chen T K, Chen R E, et al. Emodin loaded solid lipid nanoparticles: Preparation, characterization and antitumor activity studies [J]. *Int J Pharm*, 2012, 430(1/2): 238-246.
- [8] 琚辉,郝存江,尹飞,等.姜黄素固体脂质纳米粒的制备及表征[J].药物评价研究,2010,33(6):420-426.
- [9] 刘德育,罗德凤.人参皂苷 Rd 固体脂质纳米粒的制备[J].中国医学药学杂志,2010,30(1):25-30.
- [10] 夏爱晓,宋倩倩,孙渊,等.硫酸长春新碱固体脂质纳米粒的制备及其性质考察[J].中国现代应用药学,2013,30(2):163-169.
- [11] Huang X, Chen Y J, Peng D Y, et al. Solid lipid nanoparticles as delivery systems for gambogic acid [J]. *Colloids Surf B-Biointerfaces*, 102(2): 391-397.
- [12] Parveen R, Ahmad F J, Iqbal Z, et al. Solid lipid nanoparticles of anticancer drug andrographolide: formulation, in vitro and in vivo studies [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2014, 40(9): 1206-1212.
- [13] Kuhwaha A K, Vuddanda P R, Karunanidhi P, et al. Development and evaluation of solid lipid nanoparticles of raloxifene hydrochloride for enhanced bioavailability [J]. *Biomed Res Int*, 2013, doi: 10.1155/2013/584549.
- [14] 张晓娟.淫羊藿苷隐形固体脂质纳米粒冻干粉制备及质量控制[J].中国医院药学杂志,2014,34(9):732-734.
- [15] Zhang H, Zhang F M, Yan S J, et al. Preparation in vitro release, and pharmacokinetics in rabbits of lyophilized injection of sorafenib solid lipid nanoparticles [J]. *Int J Nanomed*, 2012, 7(6): 2901-2910.
- [16] Jose S, Anju S S, Cinu T A, et al. In vivo pharmacokinetics and biodistribution of resveratrol-loaded solid lipid nanoparticles for brain delivery [J]. *Int J Pharm*, 2014, 474(1/2): 6-13.