

• 药剂与工艺 •

PEG 修饰姜黄素固体脂质纳米粒的制备、表征及溶出特征

侯文书¹, 张丹参^{2*}, 张 力^{1*}, 武春阳¹, 任 婧², 张 楠²

1. 河北北方学院, 河北 张家口 075000

2. 河北科技大学, 河北 石家庄 050000

摘要:目的 制备具有缓释作用的姜黄素固体脂质纳米粒 (curcumin solid lipid nanoparticles, Cur-SLN) 和长循环固体脂质纳米粒 (long-circulating solid lipid nanoparticles, LSLN), 并对 2 种纳米粒的理化性质进行考察。方法 采用乳化-超声法制备 Cur-SLN, 并对最优处方下制备的 Cur-SLN 进行包封率和载药量的测定, 采用后插法制备 Cur-LSLN, 并考察 Cur-SLN 和 Cur-LSLN 的粒径、Zeta 电位, 差示扫描量热法 (DSC) 分析姜黄素在纳米粒中的存在状态, 透射电镜观察两者的形态, 透析法进行体外释放实验。结果 最优处方下制备的 Cur-SLN 和 Cur-LSLN 的外观为球形及类球形, 包封率分别为 $(89.15 \pm 0.66)\%$ 、 $(92.97 \pm 0.27)\%$, 载药量分别为 $(1.72 \pm 0.08)\%$ 、 $(1.98 \pm 0.08)\%$, 粒径分别为 (144.5 ± 4.1) 、 (155.0 ± 2.6) nm, Zeta 电位分别为 (-23.6 ± 0.2) 、 (-47.8 ± 1.8) mV, 通过 DSC 检测, 可确定纳米粒中的 Cur 已转变为无定形态, 体外释放实验结果显示, 2 种制剂的药物释放分为突释期和缓释期, 均在 12 h 内释放较快, Cur-SLN 在 96 h 累积释放 86.63%, Cur-LSLN 在 96 h 累积释放 76.98%, Cur-LSLN 表现出更好的缓释效果。结论 采用乳化-超声法可成功制备 Cur-SLN 和 Cur-LSLN, PEG 修饰后的纳米粒有更好的缓释性能, 可延长药物在体内存在的时间, 为靶向药物的开发做了铺垫。

关键词: 姜黄素; 固体脂质纳米粒; 乳化-超声法; PEG 修饰; 缓释作用

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)08-1927-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.08.023

Preparation, characterization and dissolution characteristics of curcumin solid lipid nanoparticles modified with PEG

HOU Wen-shu¹, ZHANG Dan-shen², ZHANG Li¹, WU Chun-yang¹, REN Jing², ZHANG Nan²

1. Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China

2. Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050000, China

Abstract: Objective The sustained release curcumin solid lipid nanoparticles (Cur-SLN) and long circulating solid lipid nanoparticles (LSLN) were prepared, and the physicochemical properties of the two nanoparticles were investigated. **Methods** Cur-SLN was prepared by emulsification ultrasonic method, and then the entrapment efficiency and drug loading of Cur-SLN prepared under the optimal formulation were determined. Cur-LSLN was prepared by back-extrapolation method, and the physicochemical properties of Cur-SLN and Cur-LSLN were evaluated by entrapment efficiency, drug loading, particle size, and Zeta potential; DSC was used to analyze, *in vitro* release characteristics and the transmission electron microscope (TEM) was used to observe particle appearance. **Results** Based on the optimal conditions, TEM showed that the appearance of Cur-SLN and Cur-LSLN were spherical or nearly spherical, the entrapment efficiency respectively were $(89.15 \pm 0.66)\%$ and $(92.97 \pm 0.27)\%$, drug loading were $(1.72 \pm 0.08)\%$ and $(1.98 \pm 0.08)\%$, average diameters of particles were (144.5 ± 4.1) nm and (155.0 ± 2.6) nm, and the mean Zeta potential were (-23.6 ± 0.2) mV and (-47.8 ± 1.8) mV. Through DSC detection, it can be determined that Cur in nanoparticles had been transformed into amorphous state. *In vitro* release test showed that the drug release of the two preparations

收稿日期: 2018-08-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81202192); 河北省中医药管理局项目 (2013075); 河北省卫生厅项目 (20130034)

作者简介: 侯文书, 女, 硕士研究生, 研究方向为神经药理学、药物制剂学。E-mail: houws0506@163.com

*通信作者 张丹参, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为神经药理学。E-mail: zhangds2011@126.com

张 力, 教授, 硕士生导师, 主要研究方向为神经药理学。E-mail: hbnulzhang@126.com

was divided into two stages: burst release phase and sustained released stage, the release rate was fast in 12 h, and the cumulative release of Cur-SLN in 96 h was 86.63%, and Cur-LSLN was 76.98%, so Cur-LSLN showed better sustained-release effect. **Conclusion** Cur-SLN and Cur-LSLN can be successfully prepared by emulsification ultrasonic method, and PEG modified nanoparticles have better sustained-release properties and prolong the time of the presence of drug *in vivo*, providing reference for the development of targeted drugs.

Key words: curcumin; solid lipid nanoparticles; emulsification-ultrasonic method; PEG modification; sustained-release effect

姜黄素 (curcumin, Cur) 是从姜科植物姜黄中提取出来的一种黄色植物多酚, 是姜黄中的主要活性成分之一。研究表明, Cur 具有抗肿瘤、抗氧化、抗炎、神经保护等广泛的药理作用^[1-7], 而且由于毒副作用小的优点, 使其在临床上有很大的应用潜力^[8]。但 Cur 本身存在水溶性差、受光受热易分解、生物利用度低、不易被机体吸收, 大部分以原形排出体外的缺点^[9], 使得 Cur 的临床应用受到限制。因此, 需要开发 Cur 新剂型, 从而提高其生物利用度, 改善水溶性及稳定性, 增强其药效, 为 Cur 的临床应用打下基础。

固体脂质纳米粒 (SLN) 是近些年来正在发展的一种新型的纳米给药系统, 它是以天然或合成的固体脂质材料为载体, 将药物包载于脂质或类脂核中制备成固态胶粒^[10]。SLN 既具有聚合物纳米粒的缓释作用和良好的靶向性, 又具有脂质体的生理相容性和耐受性好的优点, 而且比脂质体稳定^[11-16]。因此, 本实验研制的 Cur 固体脂质纳米粒 (Cur-SLN) 是将 Cur 包裹在类脂核中, 避免了 Cur 与外界环境的接触, 同时增强了 Cur 的稳定性, 并尝试用 DSPE-PEG₂₀₀₀ 修饰 Cur-SLN 增加 SLN 表面的亲水性, 形成立体位阻, 从而延长药物在血液中的滞留时间, 避免网状内皮系统巨噬细胞的吞噬, 使药物有充足时间到达病灶部位^[17]。本研究采用乳化-超声法^[18]制备 Cur-SLN, 微柱离心法^[19]分离游离和包裹于 SLN 中的 Cur, 通过紫外分光光度法^[20]测定 2 种纳米粒的包封率和载药量, 以包封率为指标对 Cur-SLN 进行处方优化, 在最优条件的基础上, 采用后插法加入不同比例的 DSPE-PEG₂₀₀₀ 制备 Cur-LSLN, 并对最优条件下制备的 2 种纳米粒进行理化性质和体外释药特性的评价。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Waters e2695 高效液相色谱仪, 美国 Waters 公司; UV.9100 全自动紫外分光光度计, 北京莱伯泰科公司; 高速离心机, 美国 Sigma 公司; DF-101S 型集热式恒温加热磁力搅拌器, 巩义市英峪华仪器

厂; 马尔文粒度仪, 英国 Malvern 公司; H-7650 透射电子显微镜 (TEM), 日本日立公司; RC8MD 溶出实验仪, 天津市天大天发科技有限公司; KQ-5200DV 超声波清洗仪, 昆山市超声仪器有限公司; ME235P 电子天平, 德国 Sartorius 公司。

1.2 药品与试剂

Cur 对照品, 批号 110823-201405, 质量分数 99.1%, 中国食品药品检定研究院; Cur 供试品, 质量分数 95.6%, 批号 XC20170820, 西安小草植物有限公司; 蛋黄卵磷脂 (PC-98T), 日本丘比株式会社; 泊洛沙姆 188 (P188), 德国巴斯夫公司; 单硬脂酸甘油酯, 上海源叶生物科技有限公司; DSPE-PEG₂₀₀₀, 日本精化株式会社; 葡聚糖 G-50 凝胶, 北京索莱宝公司; 乙腈, 色谱纯; 无水乙醇、甲醇均为分析纯; 水为自制纯化水。

2 方法与结果

2.1 Cur-SLN 的制备

称取处方量的单硬脂酸甘油酯, 加热到 (78±2) °C 使其熔解, 将溶于少量无水乙醇的 Cur 分散于磁力搅拌下的单硬脂酸甘油酯中混合均匀作为油相; 称取处方量的蛋黄卵磷脂、P188 溶于 10 mL 超纯水中作为水相。将水相加热到相同的温度, 在 1 000 r/min 磁力搅拌下, 水相以 10 mL/min 的体积流量滴加到油相中, 继续磁力搅拌 6 min 制备成初乳。趁热将制备完成的初乳在超声仪中超声 12 min, 冰水浴固化, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 加超纯水补至 10 mL, 即得 Cur-SLN。

2.2 Cur 含量测定方法的建立

2.2.1 专属性考察 分别称取一定量的 Cur 和空白载体材料用无水乙醇稀释适当倍数, 无水乙醇作为空白溶液, 于波长 200~600 nm 进行紫外光谱扫描。由图 1 可知, Cur 在 428 nm 有最大吸收峰, 而空白载体材料在此波长下无紫外吸收, 故空白载体材料对 Cur 的含量测定无影响, 专属性良好。

2.2.2 标准曲线的建立 精密称取 Cur 对照品溶于无水乙醇并定容, 配制成质量浓度为 1 mg/mL 的储备液。精密量取储备液适量, 配成 1.0、2.0、3.0、

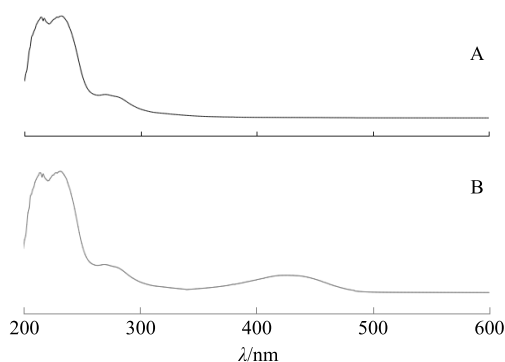


图 1 空白载体材料 (A) 和 Cur (B) 紫外可见吸收光谱扫描图谱

Fig. 1 UV-Vis spectrogram: absorption spectrum of adjuvant (A) and Cur (B)

4.0、5.0 $\mu\text{g/mL}$ 的系列对照品溶液。以无水乙醇作为空白对照,在 428 nm 波长下测定吸光度 (A) 值。以 Cur 质量浓度 (C) 作为横坐标, A 值为纵坐标,进行线性回归分析,得到回归方程 $A=0.168\ 3\ C-0.000\ 2$, $r^2=0.999\ 1$ 。结果表明 Cur 在 1.0~5.0 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

2.2.3 精密度试验 取“2.2.2”项下的 1.0、3.0、5.0 $\mu\text{g/mL}$ 对照品溶液,于室温避光放置,在 428 nm 波长下测定 A 值,分别在 1 d 内连续测定 5 次,求得日内精密度 RSD 分别为 1.83%、0.80%、0.21%,每天测定 1 次,连续测定 5 d,求得日间精密度 RSD 分别为 1.85%、1.13%、0.68%,RSD 均小于 2%,说明该方法的精密度良好。

2.2.4 重复性试验 按照“2.1”项下方法制备 Cur-SLN 供试品溶液使 Cur 质量浓度为 2.0 $\mu\text{g/mL}$,制备 6 份,分别测定其 A 值为 0.342、0.344、0.335、0.340、0.339、0.343,RSD 为 0.96%,说明此方法的重复性良好。

2.2.5 稳定性试验 制备 Cur-SLN 供试品溶液使 Cur 质量浓度为 3.0 $\mu\text{g/mL}$,分别于 0、2、4、6、8、10、12 h 测定其 A 值, A 值分别为 0.518、0.516、0.528、0.525、0.529、0.519、0.531,RSD 为 1.14%,小于 2%,说明 Cur 供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.2.6 回收率试验 精密称取适量的 Cur-SLN 供试品,在该供试品中加入 Cur 对照品溶液适量,制备供试品溶液,配制成低、中、高质量浓度分别为 1.0、3.0、5.0 $\mu\text{g/mL}$ 的无水乙醇溶液各 3 份,在 428 nm 下测定 A 值,计算回收率和 RSD 值。测得的回收率均在 99%~101%,RSD 均小于 1%,说明辅料对药物的含量测定无干扰。

2.3 包封率和载药量的测定

2.3.1 微柱的制备 称取一定量的葡聚糖凝胶 Sephadex G-50 干粉,用超纯水溶解并使其充分溶胀 24 h 后,装入 2.5 mL 的注射针筒中(底部放 2 张略小于针筒内径的圆形滤纸),再将针筒放入离心管中以 3 000 r/min 离心 3 min,除去多余的超纯水,得到微柱以备用。

2.3.2 洗脱曲线的考察 精密吸取一定质量浓度的 Cur 溶液 200 μL ,缓慢加于微柱顶端中心,注意勿滴加到微柱边缘,3 000 r/min 离心 3 min,由柱顶端缓缓加入 200 μL 超纯水,继续以 3 000 r/min 离心 3 min,收集滤液,再于柱顶端缓缓加入 200 μL 超纯水,重复此操作,并收集每次离心后得到的滤液。每次收集的滤过液用无水乙醇定容至 10 mL,采用紫外分光光度法,于 428 nm 下测定收集滤液的 A 值,并绘制洗脱曲线,由图 2 可以看出,第 8 次离心后的过滤液中检测到游离的 Cur,说明 Sephadex G-50 凝胶柱对游离 Cur 有一定的吸附作用。

精密吸取 Cur-SLN 混悬液 200 μL ,缓慢加于微柱顶端中心,3 000 r/min 离心 3 min,收集滤过液,由柱顶端缓缓加入 200 μL 超纯水,继续以 3 000 r/min 离心 3 min,重复此操作,并收集每次得到的滤过液,采用紫外分光光度法,于 428 nm 下测定收集的滤过液的 A 值,并绘制洗脱曲线,由图 2 结果可知,1~4 管为 Cur-SLN,8~14 管为游离的 Cur,说明微柱能够将 Cur-SLN 和游离 Cur 很好地分离,此方法可行。

2.3.3 包封率和载药量的测定 精密移取 200 μL 的 Cur-SLN 混悬液滴加于 Sephadex G-50 凝胶柱顶端,按照“2.3.2”项下操作,收集、合并 1~4 管含 Cur-SLN 的滤液,用无水乙醇破乳定容至 10 mL,采取紫外分光光度法在 428 nm 测定 A 值,计算纳

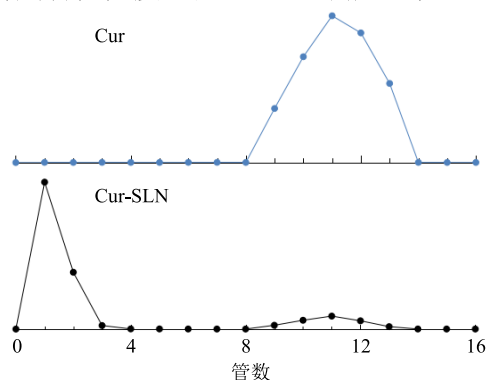


图 2 微柱洗脱曲线

Fig. 2 Elution curves of micro-columns

米粒中 Cur 的质量。另取不过柱的 Cur-SLN 200 μL ，无水乙醇破乳定容至 10 mL，在 428 nm 测定 A 值，计算体系中总的 Cur 质量，并计算包封率和载药量。

包封率 = 纳米粒中 Cur 质量 / 体系中总的 Cur 质量

载药量 = 纳米粒中 Cur 质量 / (纳米粒中 Cur 质量 + 载体材料的质量)

2.4 正交试验优化制剂配方

在预试验及单因素考察结果的基础上，选择对 Cur-SLN 制备工艺及理化性质影响较大的 4 个因素 P188 质量浓度 (A)、卵磷脂质量浓度 (B)、单硬脂酸甘油酯的质量分数 (C)、投药量 (D) 作为考察因素，4 个因素均选择 3 个水平，以包封率为指标，进行 $L_9(3^4)$ 正交试验，试验设计及结果见表 1。方差分析结果见表 2。

通过极差分析的结果可以看出，各个因素对纳米粒包封率的影响程度由大到小为 $C > A > D > B$ ，

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/ (mg·mL ⁻¹)	B/ (mg·mL ⁻¹)	C/%	D/mg	包封率/%
1	15 (1)	15 (1)	0.8 (1)	1.0 (1)	73.71
2	15 (1)	18 (2)	1.0 (2)	1.5 (2)	80.43
3	15 (1)	21 (3)	1.2 (3)	2.0 (3)	76.05
4	18 (2)	15 (1)	1.0 (2)	2.0 (3)	78.44
5	18 (2)	18 (2)	1.2 (3)	1.0 (1)	71.25
6	18 (2)	21 (3)	0.8 (1)	1.5 (2)	68.84
7	21 (3)	15 (1)	1.2 (3)	1.5 (2)	73.30
8	21 (3)	18 (2)	0.8 (1)	2.0 (3)	82.96
9	21 (3)	21 (3)	1.0 (2)	1.0 (1)	88.09
K_1	230.19	225.45	225.51	233.05	
K_2	218.53	234.64	246.96	222.57	
K_3	244.35	232.98	220.60	237.45	
R	25.82	9.19	26.36	14.88	

表 2 方差分析

Table 2 Analysis of variance

方差来源	离差平方和	自由度	F 值	P 值
A	111.459 3	2	222.586	<0.01
B	15.990 3	2	31.947	<0.01
C	131.006 7	2	261.826	<0.01
D	38.956 1	2	77.868	<0.01
误差	4.505 0	9	—	—

$F_{0.01}(2, 9) = 8.02$

由方差分析 (表 2) 可以看出，4 个因素对纳米粒的包封率均具有显著影响 ($P < 0.01$)。结合极差和方差分析结果，得出最优处方为 $C_2A_3D_3B_2$ ，即 P188 的质量浓度为 21 mg/mL，蛋黄卵磷脂的质量浓度为 18 mg/mL，单硬脂酸甘油酯的质量分数为 1.0%，投药量为 2.0 mg。

2.5 验证实验

按照“2.4”项下纳米粒制备的最优处方制备 3 批样品，分别测定粒径、Zeta 电位、包封率和载药量，结果见表 3。

2.6 Cur-LSLN 的制备

在制备 Cur-SLN 最优处方的基础上，按照 DSPE-PEG₂₀₀₀ 的用量分别为蛋黄卵磷脂的 3%、4%、5%、6%、7% (物质的量百分比) 加入 DSPE-PEG₂₀₀₀，在 50 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 90 min，制备成 Cur-LSLN。在室温放置 7 d，观察各组包封率的变化，选择 7 d 内包封率降低最小的一组为 DSPE-PEG₂₀₀₀ 最佳加入量^[21]，结果见表 4。可以看出，DSPE-PEG₂₀₀₀ 加入量为 5% 时 Cur-LSLN 的包封率下降最小，也就是说纳米粒最稳定，因此，确定 DSPE-PEG₂₀₀₀ 的加入量为 5%。

2.7 Cur-LSLN 的验证实验

按照“2.6”项下纳米粒制备的最优处方制备 3

表 3 验证实验结果 ($n = 3$)

Table 3 Results of validation ($n = 3$)

批次	粒径/nm	Zeta 电位/mV	包封率/%	载药量/%
1	140.4	-23.4	88.81	1.81
2	144.5	-23.6	89.91	1.70
3	148.5	-23.8	88.73	1.66

表 4 Cur-LSLN 的包封率随 DSPE-PEG₂₀₀₀ 用量的变化

Table 4 Encapsulation efficiency of Cur-LSLN varies with dosage of DSPE-PEG₂₀₀₀

t/d	包封率/%				
	3%	4%	5%	6%	7%
0	90.88	90.47	93.79	91.07	89.75
1	89.69	89.58	93.09	90.96	87.68
2	86.80	87.96	92.56	89.73	87.04
3	86.74	86.75	92.08	87.60	86.24
4	80.25	84.96	90.87	87.35	85.44
5	78.37	81.74	89.08	86.33	82.08
6	74.89	81.70	89.05	85.98	76.95
7	74.05	79.38	88.73	81.49	71.80
降低值	16.83	11.09	5.06	9.58	17.95

批样品, 分别测定粒径、Zeta 电位、包封率和载药量, 结果见表 5。

2.8 Cur-SLN 和 Cur-LSLN 理化性质考察

2.8.1 透射电镜法观察形态 将纳米粒稀释到适当浓度, 然后滴在喷碳铜网表面, 放置适当时间使纳米粒吸附于其上, 使用 1% 磷钨酸将纳米粒染色 2 min 后, 置于透射电镜下观察形态。由透射电镜图 (图 3) 可以看出 Cur-SLN 和 Cur-LSLN 2 种纳米粒的外观呈球形或类球形, 形态较为圆整, Cur-LSLN 的外层可见清晰的膜结构。

表 5 验证试验结果 ($n=3$)

Table 5 Results of validation ($n=3$)

批次	粒径/nm	Zeta 电位/mV	包封率/%	载药量/%
1	152.5	-45.7	92.71	1.89
2	155.1	-48.9	93.25	2.00
3	157.4	-48.8	92.96	2.04

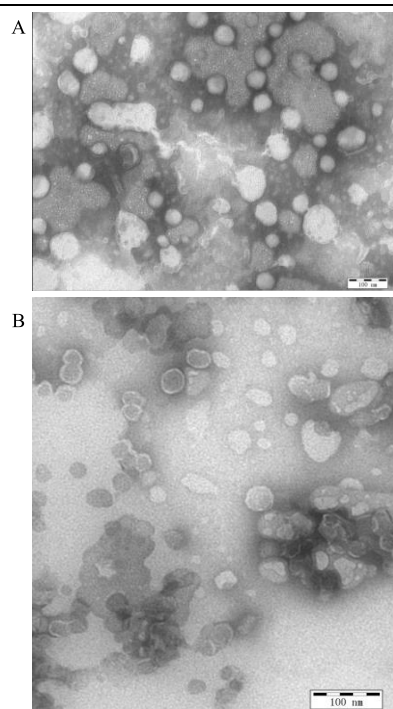


图 3 Cur-SLN (A) 和 Cur-LSLN (B) 的透射电镜图 ($\times 30\,000$)

Fig. 3 Transmission electron microscopy image of Cur-SLN (A) and Cur-LSLN (B) ($\times 30\,000$)

2.8.2 粒径及其分布、Zeta 电位考察 粒径是评价纳米粒子的一项重要指标。它的大小及其分布影响着整个分散体系的物理稳定性。本实验制备的 Cur-SLN 和 Cur-LSLN 的粒径分别为 (144.5 ± 4.1) 、 (155.0 ± 2.6) nm ($n=3$), 多分散指数 (PDI) 分别为 0.156 ± 0.010 、 0.158 ± 0.011 ($n=3$), 说明粒径

较小, 分布较均匀。结果见图 4。

Zeta 电位可用来预测固体脂质纳米粒胶体分散体系的物理稳定性, 电位绝对值越高表示体系越稳定, 本实验测得的 Cur-SLN 和 Cur-LSLN 的 Zeta 电位分别为 (-23.6 ± 0.2) 、 (-47.8 ± 1.8) mV ($n=3$), 说明所制得的 Cur-LSLN 具有较强的电荷排斥力, 物理稳定性良好, 而 Cur-SLN 的稳定性稍差。结果见图 5。

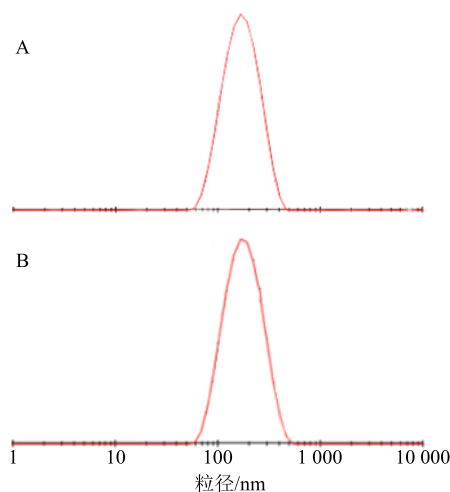


图 4 Cur-SLN (A) 和 Cur-LSLN (B) 的粒径分布

Fig. 4 Particle distribution of Cur-SLN (A) and Cur-LSLN (B)

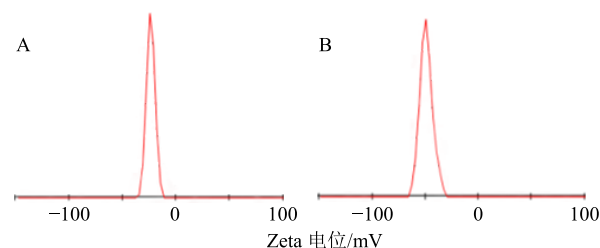


图 5 Cur-SLN (A) 和 Cur-LSLN (B) 的 Zeta 电位分布

Fig. 5 Zeta potential distribution of Cur-SLN (A) and Cur-LSLN (B)

2.8.3 差示扫描量热法 (DSC) 分析 取 Cur 原料药、空白 SLN、空白 LSLN、Cur 与空白 SLN 的物理混合物、Cur 与空白 LSLN 的物理混合物、Cur-SLN 和 Cur-LSLN 适量, 进行 DSC 分析。扫描温度 $25 \sim 250$ $^{\circ}\text{C}$, 扫描速度 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 。由图 6 可知, Cur 原料药在 177 $^{\circ}\text{C}$ 处有 1 个很明显的放热峰, 对应于 Cur 的熔点; 而且 Cur 与空白 SLN、空白 LSLN 的物理混合物, 在 177 $^{\circ}\text{C}$ 处也有 1 个很明显的 Cur 的放热峰; 而 SLN 和 LSLN 在 177 $^{\circ}\text{C}$ 没有 Cur 的峰, 而且也无新的峰出现。由此说明, Cur 在 2 种纳米粒中可能不再以结晶状态存在, 可能以无定形

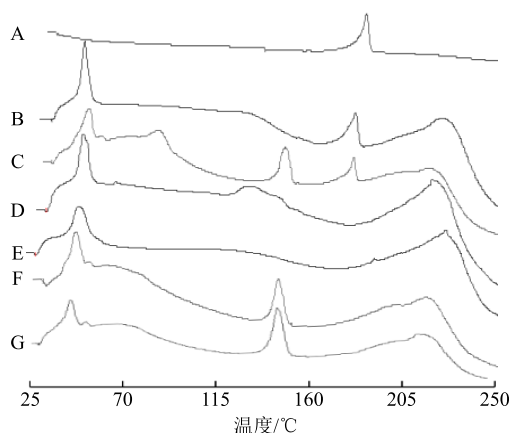


图 6 Cur 原料药 (A)、空白 SLN 与 Cur 物理混合物 (B)、空白 LSLN 与 Cur 物理混合物 (C)、空白 SLN (D)、Cur-SLN (E)、空白 LSLN (F)、Cur-LSLN (G) 的 DSC 图

Fig. 6 DSC of Cur (A), physical mixture of blank SLN and Cur (B), physical mixture of blank LSLN and Cur (C), blank SLN (D), Cur-SLN (E), blank LSLN (F), Cur-LSLN (G)

状态分散于基质中。

2.9 Cur-SLN 和 Cur-LSLN 体外释药特性

本实验选用透析法进行 3 种制剂的体外释药特性研究, 设定溶出仪循环水浴温度为 37 °C, 转速设为 100 r/min, 1% 聚山梨酯-80 生理盐水作为溶出介质。按照“2.1”和“2.6”项下的方法分别制备 Cur-SLN 和 Cur-LSLN, 取 Cur 含量相同的 Cur-SLN 和 Cur-LSLN 各 5 mL, 以 5 mL 相同原料药的甲醇溶液做对照, 分别置于透析袋中, 将透析袋置于 200 mL 溶出介质, 于 1、2、3、4、6、8、10、12、24、36、48、72、96 h 分别取样 2 mL, 每次取样后立即补充等体积的溶出介质, 以保持溶出介质的体积不变, 样品用 0.22 μm 微孔滤膜滤过。HPLC 色谱条件为色谱柱 Thermo-BDS 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-4% 冰乙酸水溶液 (48:52); 体积流量 1 mL/min; 柱温为室温; 检测波长 430 nm; 进样量 20 μL。在上述色谱条件下进行测定, 计算累积释放率, 并绘制释药曲线, 结果见图 7。

由图 7 可知, Cur 原料药在 12 h 内基本释放完全, 累积释放率为 94.06%; 而 Cur-SLN 在 12 h 的累积释放率为 55.44%, 96 h 累积释放率为 86.63%; Cur-LSLN 在 12 h 的累积释放率 41.02%, 96 h 累积释放率为 76.98%。由释放曲线可知, 最优处方下制备的 Cur-SLN 和 Cur-LSLN 的药物释放分为 2 个阶段: 突释期和缓释期。二者在 12 h 内释放较快, 可能是因为少量的 Cur 分布在 Cur-SLN 和 Cur-

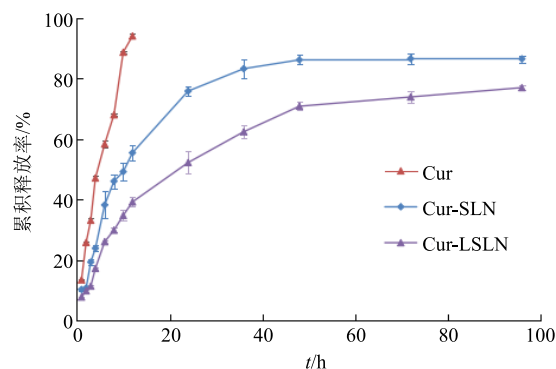


图 7 Cur 的体外释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 7 Cur *in vitro* release curve ($\bar{x} \pm s, n=3$)

LSLN 的表面引起的, 12 h 后 2 种制剂均缓慢释放药物, 而且 Cur-LSLN 有更好的缓释性能, 原因可能是 PEG 在纳米粒的表面形成一层水化膜, 可有效阻止药物的释放^[22]。

3 讨论

本实验的模型药物 Cur 分子结构中有双键、羟基及酚羟基等一些活性基团, 因此, 选用的辅料都不能影响 Cur 的稳定性。据文献报道^[23], 大豆卵磷脂中的不饱和脂肪酸含量和脂肪酸的不饱和度较高, 易被氧化, 对 Cur 的稳定性会产生影响, 因此本实验选用蛋黄卵磷脂。

本实验采用了乳化-超声法制备 Cur-SLN, 它的优点在于避免了有机溶剂的使用。使用单一乳化剂制备出的纳米粒粒径较大, 而且稳定性差。有研究表明^[24], 使用混合乳化剂有利于降低粒径, 同时提高 SLN 的稳定性。本实验采用 P188 和蛋黄卵磷脂共同做乳化剂的优点在于 P188 有空间位阻效应, 可有效阻止纳米粒的聚集, 提高稳定性; 蛋黄卵磷脂可显著降低油水两相的界面张力, 提高乳化效率, 有效降低粒径。

固体脂质纳米粒属于热力学不稳定分散体系, 由于分子的运动碰撞易出现聚集、沉淀、粒径增大等现象。Zeta 电位是预测 SLN 长期物理稳定性的重要参数之一, 通常体系的 Zeta 电位绝对值越高, 说明粒子之间的排斥力越强, 越不容易发生聚集、沉降, 体系越稳定。从静电排斥理论分析, Zeta 电位绝对值大于 25 mV, 说明体系处于稳定状态^[25]。本实验制备的 Cur-SLN 和 Cur-LSLN 电位分别为 -23.6 mV 和 -47.8 mV, 由此可知, Cur-LSLN 胶体体系的物理稳定性良好, Cur-SLN 的稳定性稍弱, 实验中发现 Cur-SLN 存放时间稍长就会絮凝沉淀, 因此后期实验需考察 Cur-SLN 的冻干工艺。

与普通的 SLN 相比, DSPE-PEG₂₀₀₀-SLN 稳定性好, 包封率更高, 这是因为 DSPE-PEG₂₀₀₀ 会抑制脂质多态性从 α 形式转变为稳定的 β 形式, 维持晶格缺陷, 从而包载更多的药物, 分布在 SLN 表面的 PEG 链引起空间位阻及“隐身”特性, 保持 SLN 的稳定性及延长循环时间^[26]。

PEG 是由环氧乙烷和水加聚合成的聚合物, 它具有无免疫原性、无毒和无抗原性的特点, 而且还具有高度的亲水性。本实验采用 PEG 修饰 Cur-SLN, 一方面, 经 PEG 修饰后改善了 Cur-SLN 的水溶性, 同时提高了生物相容性。另一方面, PEG 链可在纳米粒表面形成一层水化膜, 因此药物释放速度减缓, 可提高生物利用度, 增强药效^[27]。本实验的 TEM 结果显示, Cur-SLN 和 Cur-LSLN 的外观均呈类圆形, 但 Cur-LSLN 的最外层有一层膜结构, 与粒度分析仪测定的结果一致, Cur-LSLN 比 Cur-SLN 的粒径大, 电位绝对值高, 有效提高了稳定性, 并改善其在水中的水分散性。

PEG 修饰纳米粒或脂质体的方法一般分为 2 种, 分别是将长循环材料与磷脂等脂质材料一起加入的一步法和先制备普通纳米粒或脂质体, 再加入长循环材料一起孵育的后插入法^[28-29]。后插入法是在一步法的基础上进行改进, 它具有更好的长循环特性, 可使长循环材料充分裸露在纳米粒或脂质体表面, 而一步法制备时会有部分长循环材料裸露在内水相, 降低 PEG 化程度^[30]。

在研究纳米粒体外释药特性时, 为模拟体内的条件, 常采用的释放介质是生理盐水或 pH 7.4 磷酸盐缓冲溶液, 但是 Cur 在碱性条件下稳定性差^[31], 因此本实验选用的释放介质为生理盐水。由于 Cur 难溶于水的特点, 为满足漏槽条件, 在不影响 Cur 稳定性的前提下, 需要向漏槽中加入表面活性剂。综合考虑, 本实验选择 1% 的聚山梨酯-80 生理盐水作为释放介质。

纳米载药系统的发展前景越来越广阔, 应用于肿瘤靶向治疗的纳米级药物载体受到更多研究者的重视。本实验成功制备了 Cur-SLN, 相比于以 Brij78 作为乳化剂制备的 SLN, 显著降低了乳化剂的毒性^[32], 为 Cur 的临床应用打下了基础。

参考文献

[1] Li W F, Jiang J L. Research status of pharmacological action of Curcumin [J]. *J Clin Pharmacol*, 2017, 33(10): 957-960.

- [2] 郝东明, 张 丽. 姜黄素联合伊立替康对结肠癌 SW620 细胞的体外抑制作用 [J]. *现代药物与临床*, 2016, 31(6): 731-735.
- [3] 胡 晨, 汪玉馨, 孟长虹. 姜黄素下调 NF- κ B 信号通路抑制化学缺氧诱导的 U87 细胞炎症反应 [J]. *药物评价研究*, 2018, 41(11): 1989-1993.
- [4] 杨雪梅, 邱红梅, 田 蜜, 等. 姜黄素对人过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 1 激活作用的研究 [J]. *中草药*, 2017, 48(15): 3122-3126.
- [5] 韩 伟, 雷勇胜. 姜黄素治疗泌尿生殖系统癌症的作用机制研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2016, 31(2): 260-264.
- [6] 常明向, 吴梅梅, 李瀚旻. 姜黄素与甘草次酸联用对肝癌 HepG-2 细胞增殖的抑制作用 [J]. *药物评价研究*, 2017, 40(1): 42-47.
- [7] 赵 爽, 程学敏, 黎海娟, 等. 姜黄素干预中枢神经系统疾病生物学机制研究进展 [J]. *中草药*, 2016, 47(3): 512-518.
- [8] Yoichi S, Yasufumi K, Koji H, *et al*. Clinical applications of curcumin [J]. *Pharm Nutr*, 2015, 3(4): 131-135.
- [9] Schiborr C, Kocher A, Frank J. Curcumin fundamentals of absorption and metabolism [J]. *Ernahrungs Umschau*, 2015, 62(11): M636-M642.
- [10] Ketan H, Goutham R. A, Kanchan H, *et al*. Indomethacin-loaded solid lipid nanoparticles for ocular delivery: Development, characterization, and *in vitro* evaluation [J]. *J Ocul Pharmacol Ther*, 2013, 29(2): 216-228.
- [11] Liu K P, Wang L F, Li Y, *et al*. Preparation, pharmacokinetics, and tissue distribution properties of icariin-loaded stealth solid lipid nanoparticles in mice [J]. *Chin Herb Med*, 2012, 4(2): 170-174.
- [12] 邓向涛, 阮晓东, 郝海军. 马钱子碱固体脂质纳米粒凝胶骨架缓释片的研制 [J]. *中草药*, 2018, 49(22): 5298-5304.
- [13] Shelma R, Sharma C P. Acyl modified chitosan derivatives for oral delivery of insulin and curcumin [J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2010, 21(7): 2133-2140.
- [14] Shamji M F, Hwang P, Bullock R W, *et al*. Release and activity of anti-TNF alpha therapeutics from injectable chitosan preparations for local drug delivery [J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2009, 90(1): 319-326.
- [15] Ping Y, Yu L, Hu Y Q, *et al*. Study on targeting and *in vitro* anti-oxidation of baicalin solid lipid nanoparticles [J]. *Chin Herb Med*, 2012, 4(4): 336-340.
- [16] 谭梅娥, 姜 雯, 曾 诚, 等. 田蓟苷固体脂质纳米粒的优化及其在 Caco-2 细胞模型中的吸收和转运研究 [J]. *中草药*, 2017, 48(10): 2051-2060.
- [17] Paolino D, Accolla M L, Cilurzo F, *et al*. Interaction

- between PEG lipid and DSPE/DSPC phospholipids: An insight of PEGylation degree and kinetics of de-PEGylation [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2017, 155: 266-275.
- [18] 刘娟, 郭宇, 胡孟洋, 等. 葛根素固体脂质纳米粒制备工艺研究 [J]. 黑龙江医药科学, 2016, 39(1): 1-5.
- [19] 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.
- [20] 李静静, 贾运涛, 田睿, 等. 柚皮素纳米结构脂质载体的处方优化和初步评价 [J]. 中草药, 2015, 46(2): 211-215.
- [21] 张新科, 陈英, 李鹏, 等. PEG包衣左氧氟沙星脂质体的制备及性质 [J]. 山东大学学报: 医学版, 2017, 55(8): 42-47.
- [22] Dong Z, Guo J, Xing X, *et al.* RGD modified and PEGylated lipid nanoparticles loaded with puerarin: Formulation, characterization and protective effects on acute myocardial ischemia model [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 89: 297-304.
- [23] 林巧平, 郭仁平, 许向阳, 等. 注射用姜黄素脂质体的制备及其质量评价 [J]. 中国天然药物, 2007, 5(3): 207-210.
- [24] 卞龙艳. 柚皮素固体脂质纳米粒制剂的制备、表征及药动学评价 [J]. 中国新药杂志, 2016, 25(12): 1424-1430.
- [25] 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.
- [26] Wen Z, Su J Q, Chen Q, *et al.* Characterization and properties of solid lipid nanoparticles modified with polyethylene glycol-2000-1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine [J]. *Sci Adv Mater*, 2016, 8(8): 1617-1627.
- [27] 万小敏, 丁宇翔, 赵兵杰, 等. 载葛根素的PEG修饰介孔硅纳米粒的制备及其对急性心肌梗死大鼠的保护作用 [J]. 中草药, 2018, 49(8): 1789-1795.
- [28] Torchilin V P, Weissig V, Deng Y, *et al.* *Liposome* [M]. 2nd ed. Beijing: Chemical Industry Press, 2007.
- [29] Gabizon A, Shmeeda H, Horowitz A T, *et al.* Tumor cell targeting of liposome-entrapped drugs with phospholipid-anchored folic acid-PEG conjugates [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004, 56(8): 1177-1192.
- [30] Li C L, Cui J X, Wang C X, *et al.* Development of pegylated liposomal vinorelbine formulation using “post-insertion” technology [J]. *Int J Pharm*, 2010, 391(1/2): 230-236.
- [31] 陶慧, 余楚钦, 黄劲恒, 等. 姜黄素的增溶及稳定性研究 [J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(8): 160-165.
- [32] 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.