

黄豆苷元固体脂质纳米粒的制备及其性质考察

周晖¹, 王东凯², 赵鹏² (1. 中国医科大学附属一院, 沈阳 110001; 2. 沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016)

摘要: 目的 制备黄豆苷元固体脂质纳米粒并考察其性质。方法 采用正交实验法优化黄豆苷元固体脂质纳米粒的最佳处方, 并测定黄豆苷元固体脂质纳米粒的粒径、 ζ 电位、包封率、稳定性和累积释放百分率。结果 黄豆苷元固体脂质纳米粒的最佳处方组合为: 单硬脂酸甘油酯用量为 2.0%, 黄豆苷元用量为 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 豆磷脂的用量为 0.4%, Pluronic F68 的用量为 1.2 %。所制得的纳米粒包封率为 84.7%、平均粒径为 170 nm、 ζ 电位为 -35.8 mV 、72 h 累积释放百分率为 90.3%。

作者简介: 周晖, 女, 硕士, 副主任药师

Tel: (024)83282495

E-mail: grace04john@yahoo.com.cn

结论 新制黄豆苷元固体脂质纳米粒的粒度分布范围窄,包封率较高,稳定性良好。

关键词: 黄豆苷元; 固体脂质纳米粒; 包封率; ζ 电位

中图分类号: R943.4

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2010)09-0817-05

Preparation and Characteristics of Daidzein Solid Lipid Nanoparticles

ZHOU Hui¹, WANG Dongkai², ZHAO Peng²(1.Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China; 2.College of pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To prepare and investigate daidzein solid lipid nanoparticles. **METHODS** The formulation of daidzein solid lipid nanoparticles were optimized by orthogonal experiments. The daidzein solid lipid nanoparticles was investigated based on the experiments of its particle size, ζ potential, entrapment efficiency, stability and cumulated released rate. **RESULTS** The most optimal formulation was as follows: content of mono-stearate was 2.0%, content of daidzein was 2.0 mg·mL⁻¹, content of soybean lecithin was 0.4%, content of Pluronic F68 was 1.2%. Entrapment efficiency of new daidzein solid lipid nanoparticles was 84.7%, ζ potential was -35.8 mV, particle size was 170 nm, cumulated released rate within 72 hours was 90.3%. **CONCLUSION** A new stable daidzein solid lipid nanoparticles is attainable.

KEY WORDS: daidzein; solid lipid nanoparticles; entrapment efficiency; ζ potential

黄豆苷元(daidzein)是中药葛根中提取的异黄酮类化合物,是我国采用化学合成及运用纯现代中药提取和分离技术精制而成的治疗高血压和心脑血管疾病的有效药物。目前国内对于黄豆苷元的研究仅限于口服给药,但由于黄豆苷元属于水难溶性药物,它在体内溶出速率低,胃肠道吸收差而影响口服给药的生物利用度^[1],严重影响了其临床应用。因此考虑将其制成黄豆苷元固体脂质纳米粒(daidzein-SLN)^[2-3],固体脂质纳米粒(solid lipid nanoparticles, SLN)是一种以生物相容的脂质材料为载体,将药物或其他生物活性物质溶解或包裹于脂质核或者是吸附、附着于纳米粒表面的新型载药系统,其平均粒径范围大约为 50~1 000 nm。与乳剂不同的是,微粒的基质材料由生物相容的固体脂质组成,所以 SLN 具有很好的耐受性和很低的体内毒性。过去对 SLN 的研究主要集中于静脉和口服给药,近来也开始用于皮肤和黏膜给药系统,并呈现出良好的发展趋势^[4]。和普通制剂相比,理想的 SLN 具有较高的载药量和包封率、低毒性和较高的生物利用度等优点^[5]。本试验采用超声乳化法制备黄豆苷元固体脂质纳米粒,优化黄豆苷元固体脂质纳米粒的处方,并测定其粒径、 ζ 电位、包封率、稳定性和体外释放性能。

1 材料与仪器

LC-10A 高效液相色谱系统(日本岛津); Coulter delsa 440SX Zeta 电位测定仪(美国贝克曼); JY92-II 超声细胞粉碎机(宁波新芝科器研究所);

TECNAI20 型透射电镜(美国贝克曼); LS 230 型激光粒度仪(美国贝克曼); 单硬脂酸甘油酯(长沙市有机试剂厂,批号:061102); 注射用豆磷脂(上海太伟药业有限公司,批号:060213); Pluronic F-68(poloxamer 188,德国 BASF); 黄豆苷元原料(辽宁颐和药业有限公司,批号:071127,纯度:98%); 黄豆苷元对照品(科祥生物科技有限公司,批号:070322;纯度:99.9%); daidzein-SLN(沈阳药科大学药剂教研室自制,批号:080520,080521,080522)。

2 方法与结果

2.1 正交实验设计

经单因素考察脂质材料和乳化剂对粒径的影响,选用单硬脂酸甘油酯作为脂质材料,以豆磷脂 SL/Pluronic F68(重量比 1:3)为复合乳化剂,采用优化的工艺(超声乳化法:功率 500 W,温度 70 ℃,超声 5 min)制备固体脂质纳米粒,以单硬脂酸甘油酯的浓度、黄豆苷元的药物浓度、SL/Pluronic F68(1:3)的用量为 3 个因素,每种因素分 3 个水平,以包封率为筛选指标,用 L₉(3⁴)正交设计表进行处方筛选。考察因素水平见表 1,实验方案和结果见表 2。

表 1 正交设计的因素与水平

Tab 1 The factors and levels of orthogonal experiments

水	因素		
	A 单硬脂酸甘油酯浓度/%	B 黄豆苷元浓度/mg·mL ⁻¹	C 豆磷脂 PluronicF68 %
1	1.0	2.0	1.2
2	1.5	2.5	1.6
3	2.0	3.0	2.0

表2 正交设计与结果

Tab 2 Designs and results of orthogonal experiments

	A	B	C	包封率/%
1	1	1	1	82.6
2	1	2	2	79.1
3	1	3	3	68.2
4	2	1	2	83.4
5	2	2	3	82.2
6	2	3	1	77.7
7	3	1	2	84.6
8	3	2	1	83.0
9	3	3	3	83.3
Ij	229.90	250.60	243.30	
IIj	243.30	244.30	245.80	
IIIj	250.90	229.20	235.00	
极差值	7.00	7.13	3.60	

根据表2中极差值(Rj)可知,各因素影响的主次顺序是B>A>C,说明制备阶段药物用量、脂质材料用量、乳化剂用量对包封率的影响依次减弱,其中药物用量和脂质材料用量的影响较大,由此得出各因素的最优化组合为A₃B₁C₂,即单硬脂酸甘油酯用量为2.0%,黄豆苷元用量为2.0 mg·mL⁻¹,豆磷脂的用量为0.4%,Pluronic F68的用量为1.2%。该处方制得的SLN在4℃放置稳定性较好。

2.2 制备工艺

按上述处方将单硬脂酸甘油酯置于250 mL烧杯中加热至70℃融化,加入黄豆苷元,搅拌使其均匀分散于单硬脂酸甘油酯中,加入同温度含豆磷脂和Pluronic F68的水溶液,磁力搅拌(180 r·min⁻¹, 5 min),形成初乳。在500 W的功率下探头超声分散5 min,0.45 μm微孔滤膜过滤,加注射用水补充体积至处方量,冷却至室温即可制得黄豆苷元SLN。

2.3 含量测定

2.3.1 色谱条件 Spherigel C₁₈柱(4.6 mm×300 mm, 10 μm, 大连中汇达科学仪器有限公司);流动相:水-乙腈溶液(65:35);流速:1.3 mL·min⁻¹;柱温:30℃;检测波长:249 nm;进样量:20 μL。

2.3.2 标准曲线的制备 取黄豆苷元对照品12.5 mg于50 mL量瓶中,加无水乙醇溶解并稀释至刻度,分别量取0.8, 1.2, 1.6, 2.0, 2.4, 2.8 mL,置10 mL量瓶中,加无水乙醇至刻度,得浓度为20, 30, 40, 50, 60, 70 μg·mL⁻¹的系列溶液,进样测定,以峰面积(A)为纵坐标,浓度(C)为横坐标进行线性回归,回归方程为A=115 069C-19 820,

r=0.999 8,结果表明黄豆苷元在20~70 μg·mL⁻¹内线性关系良好。

2.3.3 专属性 按处方比例配制空白脂质纳米粒,按“2.3.1”项下测定。结果表明其它成分对测定无干扰。

2.3.4 回收率实验 精密称取黄豆苷元对照品适量,加入相应处方量的空白纳米粒,用无水乙醇稀释至浓度分别为20.0, 50.0, 70.0 μg·mL⁻¹,进样测定,计算回收率,平均回收率为100.27%,RSD为0.99%,结果表明该方法的回收率符合方法学要求。

2.3.5 精密度试验 精密称取黄豆苷元适量,分别用无水乙醇配成浓度为20, 50, 70 μg·mL⁻¹的溶液,每个浓度平行5份,连续测定2 d,考察精密度,日内和日间RSD分别为1.09%和1.43%。结果表明,精密度符合方法学要求。

2.3.6 含量的测定 精密量取新制备的均匀的不同批号黄豆苷元SLN 3 mL,置25 mL棕色量瓶中,加乙醇适量,超声5 min,定容,摇匀。取该溶液用0.45 μm微孔滤膜过滤,弃去初滤液,取续滤液5 mL,用乙醇稀释至25 mL,摇匀后进样20 μL,测定峰面积,外标法计算样品中黄豆苷元的含量。3批样品的含量分别为1.98, 1.98, 2.01 mg·mL⁻¹;RSD分别为1.67%, 1.54%, 1.36%。

2.4 黄豆苷元SLN的性质考察

2.4.1 采用透射电镜观察固体脂质纳米粒的表面形态 取敷有支撑网的铜网沾取少量纳米混悬液在铜网上停留5 min,然后浸于2%磷钨酸染色剂中染色5 min,用滤纸吸走多余的液体,自然干燥后置于透射电镜下观察,拍照。见图1。

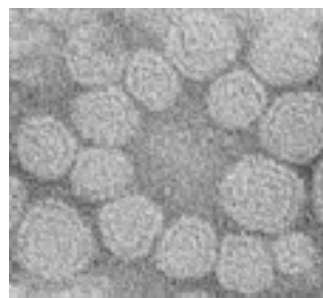


图1 超声乳化法制备黄豆苷元固体脂质纳米粒的透射电镜图谱(×50 000)

Fig 1 TEM of daidzein SLN by heat ultrasonic divergence(×50 000)

2.4.2 粒径的测定 粒子的粒径及分布对微粒分散制剂的物理稳定性有重要影响,分散体系的粒径小而均匀是该体系物理稳定性好的保证。采用

Coulter LS-230 激光粒度仪(Beckman)测定自制的 SLN 的粒径及分布, 见图 2。平均粒径为 170 nm, SD 为 1.5%。

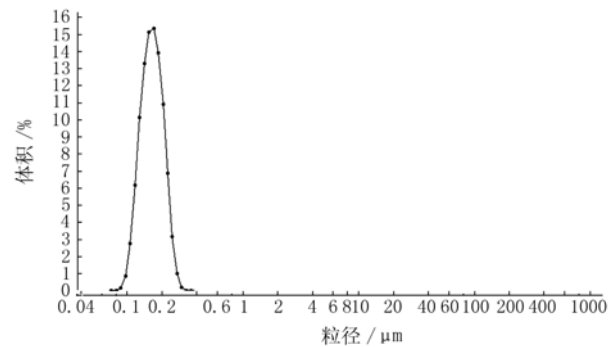


图 2 超声分散法制备的黄豆苷元固体脂质纳米粒的粒度分布图

Fig 2 The size distribution and analysis of daidzein-SLN prepared by heat ultrasonic divergence

2.4.3 包封率的测定

2.4.3.1 方法的选择 采用葡聚糖凝胶柱法测定 SLN 的包封率, 将葡聚糖凝胶 G-50 充分溶胀后装柱, 径高比为 1:12, 洗脱液用蒸馏水, 精密移取 0.5 mL SLN 混悬液上柱, 每 2 min 收集一份洗脱液,

表 3 不同温度、不同时间下黄豆苷元固体脂质纳米粒的稳定性

Tab 3 Stability of daidzein in daidzein-SLN of different temperature at different time

时间/h	4 ℃			25 ℃			40 ℃		
	包封率/%	pH 值	粒径/nm	包封率/%	pH 值	粒径/nm	包封率/%	pH 值	粒径/nm
0	83.7	7.65	170	84.1	7.63	175	83.9	7.66	174
6	82.5	7.60	174	83.5	7.62	172	83.6	7.60	170
12	83.1	7.63	169	83.4	7.64	178	82.7	7.63	170
24	82.9	7.64	175	82.8	7.60	177	82.6	7.71	170
36	82.3	7.65	172	83.0	7.69	171	82.1	7.61	170
48	82.1	7.67	180	82.6	7.68	169	81.4	7.62	170

结果表明在不同温度条件下放置 48 h, 包封率、pH 值和粒径比较稳定, 无明显变化。

2.4.5 纳米粒混悬液 Zeta 电位的测定 采用电位测定仪测定了自制的黄豆苷元 SLN 的 ζ 电位。结果表明热熔超声分散法制备的 daidzein-SLN 的 zeta 电位均在 $-20 \sim -50$ mv 内, 平均为 -35.8 mV, 系统较稳定。

2.4.6 纳米粒混悬液体外释药性质考察

2.4.6.1 方法的选择 采用透析法测定黄豆苷元固体脂质纳米粒的体外释放, 释放介质为在 pH7.8 磷酸盐缓冲液中加入浓度为 4%的 Tween-80, 使药物的溶解度达到漏槽条件。

加无水乙醇稀释超声、过滤, 利用紫外分光光度法在 249 nm 处测定吸光度, 结果表明 SLN 集中在 16~26 mL 之间流出, 游离药物于 32 mL 开始可检测到。表明 SLN 和药物可完全分开。合并 SLN 部分洗脱液, 取适量用乙醇稀释定容, 紫外法测定得 $W_{包}$, 包封率的计算公式为 $W_{包}/W_{总} \times 100\%$ 。

2.4.3.2 测定方法回收率的考察 由于黄豆苷元在水中溶解度较小, 其水溶液上柱后的洗脱液难以精确定量, 故采用水: 丙二醇为 7:3 的混合溶液来增大其溶解度后上柱。

配制高($40 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)、中($15 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)、低浓度($5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)的黄豆苷元溶液, 每个浓度 3 份, 回收率的测定结果分别为: $(97.6 \pm 1.2)\%$, $(98.2 \pm 1.4)\%$ 和 $(97.7 \pm 0.5)\%$; 结果表明此方法适用于测定黄豆苷元固体脂质纳米粒的包封率。

2.4.3.3 包封率的测定 依“2.4.3.1”项下方法测定 3 批黄豆苷元 SLN 的包封率, 经计算平均值为 84.7%。

2.4.4 稳定性考察 将新制备的黄豆苷元 SLN 混悬液分别于 4, 25, 40 ℃环境中放置, 定时取出测定其包封率、pH 值和粒径, 结果见表 3。

2.4.6.2 标准曲线绘制 以黄豆苷元原料药为对照品, 加无水乙醇制浓度为 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的储备液, 以透析介质为溶剂, 配制浓度为 $0.5 \sim 15 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的黄豆苷元溶液, 按“2.3”项下方法测定, 以峰面积为纵坐标, 浓度为横坐标进行线性回归, 回归方程为 $A=113\,925\,C-5\,069.1$, $r=0.999\,6$ 。

2.4.6.3 体外释放的测定方法及结果 精密量取新制备的黄豆苷元 SLN 3 mL 于透析袋(分子量 12 000~14 000)中, 置 500 mL 烧杯中, 加入 500 mL 透析介质, 同法制得样品 3 份。将烧杯置 37 ℃恒温磁力搅拌器中恒温搅拌, 分别于 1, 2, 4, 8, 16,

24, 36, 48, 60, 72 h 取外透析液 3 mL, 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 测定黄豆苷元含量。同时补加 3mL

透析介质。以纳米粒的含药量为 100% 计算黄豆苷元累积释放百分率。结果见表 4。

表 4 不同时间的体外累积释放百分率(%)($n=3$)

Tab 4 Cumulated released rate at different time ($n=3$)

时间/h	1	2	4	8	16	24	36	48	60	72
体外累积释放百分率/%	10.3	22.8	44.5	54.6	60.2	67.1	73.8	79.4	85.6	90.3

3 讨论

超声分散法是药剂学中广为应用的一种分散技术, 可用来制备乳剂、脂质体等, 本试验采用该法制备黄豆苷元固体脂质纳米粒。优点是操作简单, 易于控制。缺点是超声存在死角, 体系中容易出现微米级粒子, 如果超声时间过长, 还可能产生金属污染。新制黄豆苷元固体脂质纳米粒的粒度分布范围窄, 包封率较高。

脂质材料在常温下为固态, 只有在高于其熔点的制备温度下才能变成液态, 使乳化成为可能, 但是温度将影响乳化剂的乳化能力, 因此制备黄豆苷元固体脂质纳米粒过程中温度不宜过高, 应控制在脂质材料熔点以上 5~20 $^{\circ}\text{C}$ 。

一般情况下, 乳化剂用量的增加可使纳米粒粒径降低^[6], 文献报道可选用复合型乳化剂^[3], 本实验选用复合型乳化剂豆磷脂 SL 和 Pluronic F68, 实验证明 SL/Pluronic F68 为重量比 1:3 时粒径最小, 且 SLN 比较稳定, 放置半个月粒径无明显变化。

REFERENCES

- [1] QIAN Y X, HUANG Y, HE J, et al. Determination of the dissolution rate of daidzein solid dispersion capsules by HPLC [J]. J China Pharma (中国药房), 2009, 20 (16): 273-275.
- [2] SCHWARZ C, MEHNERT W, LUCKS J S, et al. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. I. Production, characterisation and sterilization [J]. J Controlled Release, 1994, 8(30): 83-96.
- [3] MÜLLER RH, MDER K, GOHLA SH. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery-a review of the state of the art [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2000, 50(1): 161-177.
- [4] MERHLEN A Z, MEHNERT W. Drug release and mechanism of prednisolone loaded solid lipid nanoparticles [J]. Pharmize, 1998, 53(3): 552-564.
- [5] CHEN Y, TU Q R. Research progress on daidzein solid lipid nanoparticles [J]. Foreign Med Sci Pharm (国外医学 药学分册), 2002, 29(4): 241-245.
- [6] LABOURET A D, THIOUNE O, FESSI H, et al. Application of an original process for obtaining colloidal dispersions of some coating polymers. Preparation, characterization, industrial scaling up [J]. Drug Dev Ind Pharm, 1995, 6(3): 229-241.

收稿日期: 2009-12-03