文章编号:1000-5404(2008)11-1043-03

论著

甘草酸固体脂质纳米粒的处方及制备工艺

侯 君,周世文 (第三军医大学新桥医院临床药理基地,重庆 400037)

摘 要:目的 制备甘草酸固体脂质纳米粒(GL-SLN)。方法 用旋转蒸发薄膜超声法制备 GL-SLN,在单因素考察的基础上,通过正交设计优选该纳米粒的处方及制备工艺,并对优化条件下制备的 GL-SLN 进行质量评价。结果 制备的 GL-SLN 大小较均匀,平均粒径为 75.8 nm,zeta 电位 -19.7 mV,载药量 8.27%,包封率 91.76%。结论 薄膜超声分散法优化工艺制备得到的 GL-SLN 包封率较高,稳定性好,方法可靠。

关键词:甘草酸;固体脂质纳米粒;正交设计;包封率;载药量
中图法分类号:R282.71;R943;R944.9 文献标识码:A

Formulation and preparation of glycyrrhizic acid solid lipid nanoparticles

HOU Jun, ZHOU Shi-wen (State Base for Clinical Pharmacology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To prepare the glycyrrhizic acid solid lipid nanoparticles (GL-SLN). Methods GL-SLN was prepared by conventional rotary-evaporated film-ultrasonication method. Based on the single-factor experiment, GL-SLN was prepared using orthogonal design for optimization of formulation and technology. The obtained GL-SLN was also evaluated. Results GL-SLN had even and regular appearance and the average diameter was 75.8 nm. Zeta potential was -19.7 mV. The drug loading was 8.27% and the entrapment ratio was 91.76%. Conclusion The entrapment ratio of GL-SLN and the stability of GL-SLN prepared by conventional rotary-evaporated film-ultrasonication method are high and good.

Key words: glycyrrhizic acid; solid lipid nanoparticle; orthogonal design; encapsulation; drug loading

甘草是我国传统的中药,其主要活性成分甘草酸具有显著的肾上腺皮质激素样作用,具有抗炎、降压、增强机体免疫力、抑制癌细胞的生长等作用[1],并可以明显促进肝细胞的再生。目前临床上使用的甘草酸注射液不良反应发生的机率大[2,3],长期大量使用甘草酸制剂可引起浮肿、钠水潴留等副反应。

固体脂质纳米粒(solid lipid nanoparticles, SLN)是一种可替代乳剂、脂质体和聚合物纳米粒的新型胶体给药系统。甘草酸水溶性较低,为提高甘草酸水溶性以及在治疗肝炎方面的疗效,我们将其制成 SLN[4],以促进药物吸收,提高生物利用度,降低副反应。

1 材料与方法

1.1 仪器

RE200 旋转蒸发仪、BM100 恒温水浴锅均购于日本 YAMATO 公司,SHZ 型真空干燥箱(北京科伟永鑫试验仪器设备厂),As 3120A 超声波清洗器(天津 Autosciences),Sc 2 型电子天平(德国 Sartorius),Zetasizer 3000 粒度分析与电势分析仪(英国 Malvern),tec-10 型透射电子显微镜(荷兰 Philips),超纯水发生器(Millipore),JY-92-超声波细胞粉碎机(宁波新芝科器研究所),高效液相色谱仪(美国 Beckman)。

1.2 试药

甘草酸(四川什邡健福植物原料有限公司,纯度 > 95.6%),卵磷脂(SCRC 上海化学试剂公司,纯度 > 95%),甘露醇(温州东升化工试剂厂),葡聚糖凝胶 G-50(上海摩速科学器材有限公司),有机微孔滤膜(0.45 μm,上海新亚净化器件厂),甲醇为色谱纯,氯仿、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾(川东化工厂)均为分析纯。

1.3 方法

1.3.1 甘草酸含量测定 采用反向高效液相色谱(RP-HPLC)法测定甘草酸的含量。

色谱条件:色谱柱:Hypersil ODS2 柱(416 mm × 150 mm, 5 μm)流动相:甲醇-磷酸盐缓冲液(50 mmol/L)(65∶35)流速:1 ml/min 紫外检测波长为 254 nm 进样量为 20 μl 柱温 室温。

1.3.2 正交设计法优化处方 在单因素制备 GL-SLN 的基础上,对在制备过程中影响茄形瓶脂质薄膜的均匀性、水和的难易程度、纳米粒的稳定性、SLN 的形态以及纳米粒的包封率的 3 种因素,即甘草酸与卵磷脂的质量比 A、甘露醇的用量 B、超声时间 C,采用正交设计法进行处方优选,每个因素选择 3 个水平,按照 L9(3^4)进行实验。以包封率为主要评价指标确定最佳处方。见表 1。

作者简介:侯 君,女,重庆市人,硕士研究生,主要从事靶向制剂方面的研究。电话:(023)68755311,E-mail:crystal_jessie@163.com
通信作者:周世文,电话:(023)68755311,E-mail:yljd@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2007-09-22 修回日期:2007-11-12

表1 正交设计表

水平	因素		
	A	B	C
1	1∶8	10	60
2	1∶9	15	90
3	1∶10	20	120

1.3.3 GL-SLN 的制备工艺 精密称取处方量的卵磷脂于茄型烧瓶中，然后加入氯仿使其充分溶解后再加入甘草酸，将烧瓶放在超声清洗器上，超声使药品完全溶解后，再经旋转蒸发仪 40 ℃旋转蒸发除去氯仿（旋转蒸发薄膜分散法），可看见在烧瓶上形成 1 层半透明的薄膜，将烧瓶放在真空干燥箱中干燥后，加入甘露醇溶液进行水合，再用带探头的超声细胞粉碎机超声得乳白色半透明液体，经 0.45 μm 微孔滤膜过滤，分装于适合的安瓿中。精密量取 0.5 ml 混悬液，加于 Sephadex G-50 凝胶柱顶部，以 PBS 溶液洗脱，流速 1 ml/min，收集中间段 4 ~ 11 ml 洗脱液，加甲醇定容至 25 ml，摇匀。精密吸取 20 μl 溶液，进样。再精密量取 0.5 ml 混悬液，直接加甲醇定容至 25 ml 摇匀。精密吸取 20 μl 溶液，进样，以测定甘草酸脂质体的包封率。包封率（ER，%） = $W_{包}/W_{总} \times 100\%$。式中 $W_{总}$ 表示总药物含量，$W_{包}$ 表示包封药物量。载药量（DL，%） = $W_{包}/Wc \times 100\%$。式中 Wc 为卵磷脂用量。

1.3.4 GL-SLN 的电镜观察 吸取 2 滴 GL-SLN，加水稀释到 5 ml 的离心管中，取滴于点滴反应瓷板的凹槽内，并将喷碳铜网放于试液上（膜面向下），1 ~ 2 min 后取出铜网，用滤纸小片从铜网边缘吸干多余液体；按上述同样方法，将该铜网放在染液（20 g/L 磷钨酸溶液，pH 7.0）上约 30 s，用滤纸小片从铜网边缘吸干多余染液，干燥。在透射电镜下观察脂质体的形态及分布，并在激光粒度仪和电位仪上测量其粒径和电位。

1.3.5 GL-SLN 的体外释药 精密吸取载药纳米粒 1 ml，转入经蒸馏水浸泡处理过的透析袋中，将透析袋两端扎紧，悬置于盛有 100 ml 磷酸盐缓冲溶液（pH7.4）的溶出介质中，保持漏槽状态，（37.0 ± 1.0）℃、70 r/min 恒速搅拌，于 0.5、1、1.5、2、3、4、5、6、8、10、20、24、36、48 h 取样 5 ml，同时补加同体积的释药介质。所取样品根据标准曲线计算不同时间取样的药物浓度，再计算出累积释药百分数。

2 结果

2.1 甘草酸标准品含量测定结果

含量测定时以峰面积 A 与浓度 C 进行线性回归，其回归方程为 $C = 0.110\,5 \times 10^{-3} A + 66.914 \times 10^{-3}$（$r = 0.999\,9$，$n = 5$）（图1）。

2.2 处方优化

通过正交设计法优化实验，结合类脂质膜的均匀性，载药纳米粒的稳定性及形态、包封率、载药量等因素确定制备 GL-SLN 的处方，由表 2 可知，以 ER（%）为衡量指标进行直观分析，由极差 R 确定主次因素顺序：A > C > B。其中，A 因素：K2 > K1 > K3；C 因素：K1 > K2 > K3；B 因素：K1 > K2 > K3。因此，确定 A2C1B1 为较优处方。由此可知，影响包封率的主要因素为甘草酸与卵磷脂的质量比，其实为超声时间和甘露醇的用量。由表 3 可知 A、C、B 因素对药物的包封率均有显著影响（$P < 0.05$），即甘草酸与卵磷脂的质量比、超声时间分别为 1∶8、60 s，60 g/L 甘露醇用量 10 ml 时制得的 SLN 具有较高的包封率。因此，确定最优处方为 A2C1B1。按此处方制得的 GL- SLN 包封率为 91.76%，载药量为 8.20%。

表2 正交实验结果

实验号	因素			包封率（%）	载药量（%）
	A	B	C		
1	0.125	10	120	76.44	6.78
2	0.125	15	90	75.27	6.32
3	0.125	20	60	76.37	6.45
4	0.111	15	120	88.32	7.93
5	0.111	20	90	82.69	7.34
6	0.111	10	60	91.76	8.20
7	0.1	20	120	61.79	5.49
8	0.1	10	90	71.46	6.27
9	0.1	15	60	75.29	6.38
K1	76.03	79.89	81.84		
K2	87.59	79.63	76.47		
K3	69.51	73.52	75.29		
R	18.08	6.27	6.32		

表3 方差分析结果

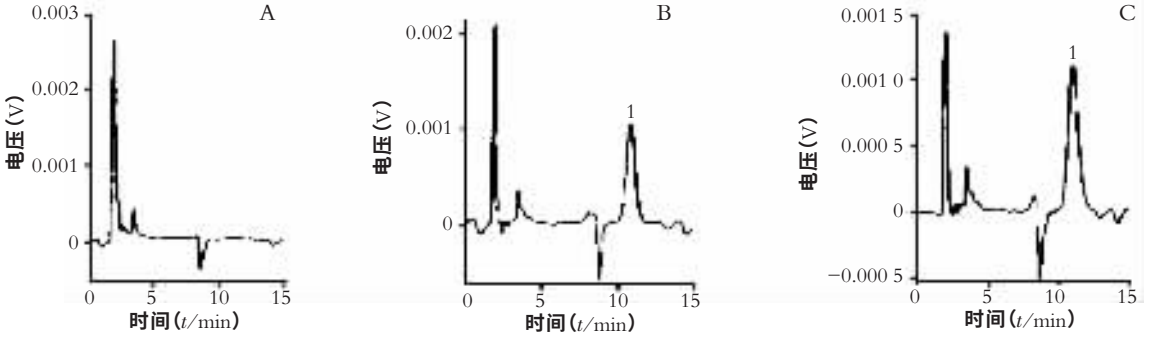
变异来源	平方和	自由度	均方	F	P
A	385.976	2	192.988	436.422	0.002
B	24.368	2	12.184	27.552	0.035
C	21.811	2	10.905	24.662	0.039
误差	0.884				

2.3 最佳工艺验证

按最优处方进行 3 次重复验证实验，即制备 3 批 SLN，结果包封率分别为 91.58%、91.69%、91.84%，表明重现性较好。

2.4 GL-SLN 形态观察

GL-SLN 为乳白色的混悬液，电镜下可见许多圆形或椭圆形的球粒，整体分布比较均匀，平均粒径为 75.8nm，zeta 电位为 -19.7 mV。见图 2 ~ 4。



A：空白纳米粒；B：空白纳米粒 + 甘草酸对照品；C：GL-SLN；1：甘草酸

图1 甘草酸液相色谱图

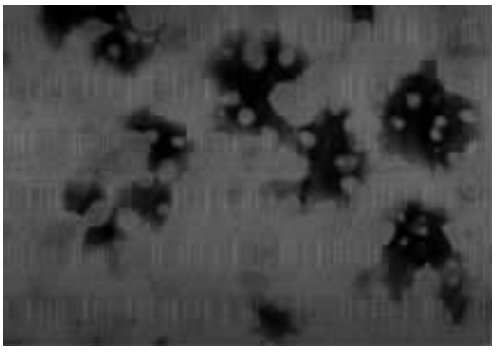


图 2　GA-SLN 的透射电镜图　（TEM × 39 000）

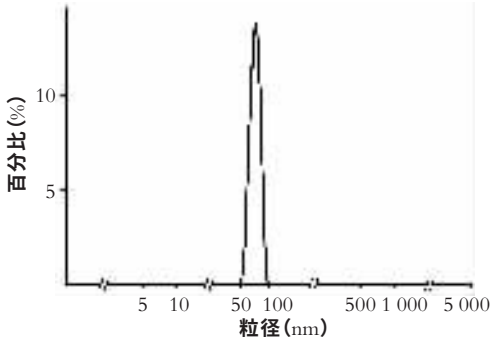


图 3　GL-SLN 粒径分布图

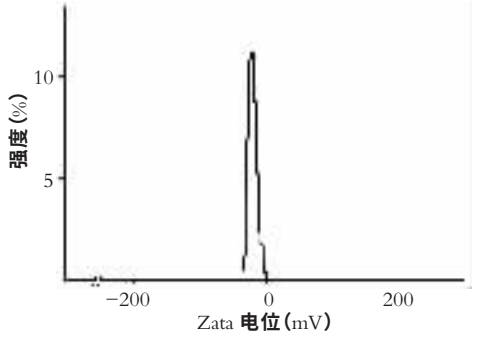


图 4　GL-SLN 电位分布图

2.5　体外释放实验

本实验结果显示 GL-SLN 在释药初期 0.5h 内释药 13.36%，随后缓慢释药，48h 累计释药 39.47%。

用线性回归的方法进行纳米粒体外释放模型的拟合。用于拟合的模型包括：零级释放模型：$Q = a + bt$；Higuchi 模型：$Q = a + bt^{1/2}$；一级释放模型 $\ln(1 - Q) = a + bt$；Weibull 分布函数模型：$\ln\ln 1/1 - Q = a + n\ln t$。将 GL-SLN 的释放曲线进行模型拟合，比较各方程的相关系数，相关系数越接近 1 的方程拟合效果越好，可以确定 Higuchi 模型为纳米粒的释放模型，R^2 为 0.991。见表 4。

表 4　释药回归方程拟合结果

模型	回归方程	R^2
零级	$Q = 0.149\,5 + 0.019\,9t$	0.964
一级	$\ln(1 - Q) = -0.153 - 0.028\,3t$	0.975
Higuchi	$Q = 0.037 + 0.098\,8t^{1/2}$	0.991
Weibull	$\ln\ln 1/1 - Q = 1.031 + 0.216t$	0.968

3　讨论

固体脂质纳米粒是一种新型的胶体给药系统，可以替代乳剂、脂质体、聚合物纳米粒，具有较好的生理相容性，可控制药物的释放以及良好的靶向性，同时可避免有机溶剂不能完全去除的缺点。目前市面上存在的甘草酸的剂型主要为注射液，长期使用其副作用和不良反应均比较大，而大多数剂型的研究均为脂质体，由于脂质体的粒径相对于固体脂质纳米粒来说相对较大，容易堵塞细小血管，而本实验所制备的 GL-SLN 的平均粒径为 75.8 nm，几乎为所有脂质体粒径的一半，可供注射用。

3.1　有机溶媒的选择

本实验使用的主要溶媒为氯仿，甘草酸是水溶性极低的药物，氯仿相对于其他溶剂来说对甘草酸的溶解比较完全，且形成的薄膜也比较好，所以我们采用氯仿作有机溶媒。

3.2　制备方法的选择

制备固体脂质纳米粒的方法很多，主要有：薄膜分散法、逆相蒸发法、高压乳匀法、乳化分散法、超声波分散法等。逆相蒸发法和超声波分散法适合于包裹水溶性药物，但甘草酸的水溶性极低，所以不宜选择。高压乳匀法、乳化分散法等需要加热到一定的温度，对 GL-SLN 的稳定性有影响。旋转蒸发薄膜分散法适合于脂溶性及水溶性低的药物且简便易行，适合于实验室制备。

3.3　分散介质的选择

我们曾选用生理盐水、6% 甘露醇以及 PBS（pH7.0）作为分散介质，实验证明，用 6% 甘露醇水溶液作为分散介质在室温放置 3 个月，制剂外观无明显变化，而生理盐水和 PBS 则很快混浊、分层，表明有药物大量泄露，卵磷脂发生凝聚，原因可能是电解质的加入改变了各种粒子之间电荷的相互作用，转变了卵磷脂的晶形。

3.4　测定包封率方法的选择

载药的纳米粒和游离的药物必须分离后才能测定包封率，常用的分离方法有凝胶层析法、离心法、透析法。而透析法所用的透析卡费用昂贵，高速离心时脂质体有可能凝聚而被破坏，因此在本次实验中采用凝胶层析法。

参考文献：

[1] 李斌霞，佟　杰. 甘草酸药理作用及机制的研究进展[J]. 数理医药学杂志，2007，20(2)：228－231.

[2] 徐会选. 甘草酸类药物的不良反应[J]. 药物不良反应杂志，2003，5(3)：166－171.

[3] 杨全良，周　彤，陆宏俊，等. 甘草酸二胺注射液治疗化疗所致药物性肝损害临床疗效观察[J]. 蚌埠医学院学报，2005，30(5)：433－434.

[4] Mehnert W，Mader K. Solid lipid nanoparticles：production，characterization and applications [J]. Adv Drug Deliv Rev，2001，47(2－3)：165－196.

（编辑　薛国文）