

## 鬼臼毒素硬脂酸固体脂质纳米粒的制备

谢方明<sup>1</sup>, 曾抗<sup>1</sup>, 李国锋<sup>2</sup>, 林中方<sup>1</sup>, 孙乐栋<sup>1</sup> (南方医科大学南方医院<sup>1</sup> 皮肤科, <sup>2</sup> 药学部, 广东 广州 510515)

**摘要:**目的 为提高鬼臼毒素(PPT)制剂的疗效,降低毒副作用,以硬脂酸为载体材料制备 PPT 固体脂质纳米粒。方法 采用改良的微乳技术制备 PPT 固体脂质纳米粒;用透射电镜考察了纳米粒的形态;用高效液相色谱法测定 PPT 固体脂质纳米粒的包封率。结果 PPT 固体脂质纳米粒基本呈圆球状或椭圆球状,粒径为(56.5±25.8)nm,包封率 85.6%。结论 PPT 固体脂质纳米粒包封率高,粒径分布较均匀,具有较好的稳定性,是有希望的表皮靶向制剂。

**关键词:**固体脂质纳米粒;鬼臼毒素;酊剂;尖锐湿疣

中图分类号:R979.19;R986 文献标识码:A 文章编号:1000-2588(2005)01-0099-03

## Preparation of stearic acid solid lipid nanoparticles containing podophyllotoxin

XIE Fang-ming<sup>1</sup>, ZENG Kang<sup>1</sup>, LI Guo-feng<sup>2</sup>, LIN Zhong-fang<sup>1</sup>, SUN Le-dong<sup>1</sup>

Department of Dermatology<sup>1</sup>, Department of Pharmacy<sup>2</sup>, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

**Abstract: Objective** To improve the therapeutic efficacy and reduce the adverse effect of podophyllotoxin (PPT) by wrapping it in stearic acid solid lipid nanoparticles. **Methods** Stearic acid solid lipid nanoparticles containing podophyllotoxin was prepared using modified microemulsion technique, whose morphology was examined by transmission electron microscope. High-performance of liquid chromatography was employed to determine the entrapment efficiency of PPT in the nanoparticles. **Results** The entrapment efficiency of PPT in the nanoparticles was 85.6% and the mean diameter of the particles was 56.5±25.8 nm. **Conclusion** The stearic acid solid lipid nanoparticles has high entrapment efficiency for PPT and is homogeneous in size, which can be a promising targeted preparation for epidermal delivery.

**Key words:** solid lipid nanoparticle; podophyllotoxin; tincture; condyloma acuminatum

鬼臼毒素(podophyllotoxin, PPT)是鬼臼类植物的主要有效成分,0.5%的 PPT 酊剂是世界卫生组织推荐的治疗尖锐湿疣的一线外用药物<sup>[1]</sup>。由于 PPT 酊剂对人乳头瘤病毒(HPV)潜伏感染难以奏效,故不能预防尖锐湿疣的复发,且大面积使用时易产生吸收毒性,因此限制了它的使用<sup>[2]</sup>。固体脂质纳米粒(solid lipid nanoparticle, SLN)是近年正在发展的一种新型纳米粒类给药系统,以固态的天然或合成的脂类,如硬脂酸、三酰甘油等为载体,将药物包裹于脂核中制成粒径约为 50~1 000 nm 的固体胶粒给药体系,具有可以控制药物的释放、避免药物的降解或泄漏以及良好的靶向性等优点<sup>[3-5]</sup>。本实验以改良的微乳技术<sup>[6]</sup>制备了 PPT 固体脂质纳米粒混悬液,以期提高药物疗效,降低药物不良反应,并为深入进行 PPT 固体脂质纳米粒的表皮靶向性研究打下基础。

### 1 材料与方法

收稿日期:2004-05-09

基金项目:广东省科技计划项目(C104034)

Supported as a Science and Technological Development Program of Guangdong Province (C104034)

作者简介:谢方明(1971-),男,南方医科大学在读博士研究生,主治医师,电话:020-61641984

#### 1.1 实验材料和仪器

硬脂酸(上海永华精细化学品有限公司);大豆卵磷脂、胆固醇(荷兰进口分装);myrj53(辽宁奥克纳米材料有限公司,药用规格);PPT 标准品(Sigma 公司,纯度 99%);二氯甲烷(汕头市光华化学品厂,分析纯);乙腈(美国 Fisher 公司);HP1100 高效液相色谱分析仪(美国);SephadexG50(瑞典进口分装);Zetasizer3000HS 型粒径分析仪(英国 Malvern 公司);JB-3A 型定时恒温磁力搅拌器(上海雷磁新泾仪器有限公司);TMP-1 型电子天平(德国制造);H-600 型透射电镜(日本日立公司)。

#### 1.2 实验方法

1.2.1 PPT 硬脂酸固体脂质纳米粒的制备 对 PPT 硬脂酸固体脂质纳米粒的制备进行单因素考察和正交试验设计优化,确立以微乳技术为基础并按相关文献进行改良的制备方法<sup>[7]</sup>。制备方法如下:取 20 mg PPT、处方量的硬脂酸、卵磷脂和二氯甲烷 10 ml,加入 25 ml 带塞梨形瓶中,构成有机相。另取处方量的 myrj53 加入 30 ml 双蒸水中,超声使其充分溶解,构成水相。将有机相缓慢注入 1 000 r/min 搅拌的(75±2)℃的恒温水相中形成微乳,继续搅拌约 2~3 h,使有机溶媒完全蒸发并使体系浓缩至约 5 ml。将所得的半透明微乳快速混于另一 0~2℃的 1 000 r/min 搅拌

的 10 ml 的冰水相中,继续搅拌 2 h,即得 PPT 硬脂酸纳米粒混悬液。

1.2.2 纳米粒外观及稳定性观察 取 PPT 硬脂酸纳米粒及空白的 SLN 混悬液样本各 10 份,其中 5 份放置于室温,另外 5 份放置于 4℃冰箱内,观察 24 h、1 个月、3 个月、6 个月时其外观的变化。观察 4 000 r/min 离心 15 min 混悬液是否分层或出现沉淀。

1.2.3 纳米粒粒径分布 取硬脂酸纳米粒混悬液适量加双蒸水稀释,用 Zetasizer3000HS 型粒径分析仪测定纳米粒混悬液的粒径分布。

1.2.4 纳米粒形态学 取硬脂酸纳米粒混悬液适量加双蒸水稀释,然后滴加在覆盖碳膜的铜网上,以 2% 的磷钨酸钠液负染,在透射电镜下照片,观察其粒径大小和形态。

1.2.5 纳米粒包封率的考察 取 200 μl 纳米粒混悬液上样于 Sephadex G50 凝胶柱上,以蒸馏水为洗脱液,接取不同体积的洗脱部分,用高效液相法检测其中 PPT 的含量。另取 200 μl 纳米粒混悬液直接用 30% (体积分数) 乙腈定容至 10 ml,高效液相法测定其 PPT 含量。色谱柱:Whatman PartiSHERE C18(150 mm×4.6 mm,粒径 5 μm),液相条件:流动相,乙腈:水=7:3 (体积比),检测波长=270 nm,流速=1.0 ml/min,柱温:30℃。高效液相色谱法测量 3 份纳米粒样本对 PPT 的包封率,取平均值。

## 2 结果

### 2.1 PPT 纳米粒的形态学观察

制备的 PPT 纳米粒混悬液是外观均一、稳定的胶体状分散体系,体系中可见略带银白色金属光泽的乳光带。纳米粒粒径为(56.5±25.8)nm,最大的粒子粒径不超过 150 nm,分布较均匀(图 1)。

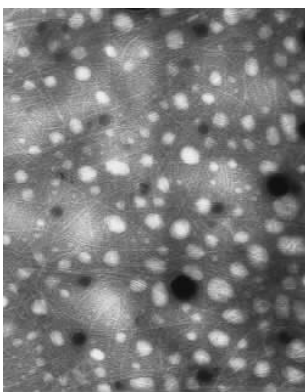


图 1 PPT 纳米粒透射电镜照片(原放大倍数:×40 000)

Fig.1 Transmission electron micrograph of the nanoparticles containing podophyllotoxin

(Original magnification: ×40 000)

### 2.2 PPT 纳米粒混悬液稳定性考察

放置于室温及 4℃冰箱内的样本,3 个月内无沉淀及药物结晶析出。4 000 r/min 离心 15 min 未发现分层现象,说明该体系具有一定的稳定性。5 个月时可见室温下的部分样本出现少量沉淀,部分散开于空气中的样本表面出现小片灰褐色霉斑。冰箱内的样本没有出现类似现象,但 6 个月后部分样本出现分层。振荡后样本立即恢复原有的均一外观。

### 2.3 PPT 纳米粒的包封率测定

在 Sephadex G50 凝胶柱上以蒸馏水为洗脱液分离 PPT 纳米粒时,可见明显呈银白色乳光的洗脱部分,即为含药的纳米粒子。根据包封率=(包封的药物量/总的药物量)×100%,以洗脱的纳米粒子中的 PPT 的含量与未过柱的纳米粒混悬液中 PPT 的含量相比较,即得 3 份样本中 PPT 纳米粒的平均包封率为 85.6%。

## 3 讨论

尖锐湿疣具有高复发性,其中潜伏感染被认为是主要的复发原因<sup>[8]</sup>。目前常用的 0.5%PPT 酊剂对潜伏感染无效。而且用药时受到部位(如宫颈粘膜)、使用面积、药物用量等多种限制。使用不慎可造成正常组织的损伤或产生系统吸收毒性。

研究表明,以特定脂质体包裹后的 PPT 制剂具有较好的皮肤靶向性,能改善 PPT 的药代动力学性质,并在减少药物浓度的情况下明显提高 PPT 外用的安全性,同时提高疗效,明显降低尖锐湿疣的复发率<sup>[9,10]</sup>。

SLN 是近年兴起的新型给药系统,被认为是脂质体的下一代替代载药技术<sup>[3]</sup>。在 PPT 硬脂酸固体脂质纳米粒的制备过程中,随着有机溶剂的挥发,硬脂酸形成微小的液滴,在表面活性剂的作用下成为稳定的微乳体系。由于 PPT 难溶于水,因此药物大部分分布于硬脂酸所形成的液滴中。当体系分散到冰水浴中,温度急剧下降到低于硬脂酸熔点时,乳滴迅速凝固成固态硬脂酸纳米粒。PPT 同时被包裹于硬脂酸纳米粒中。SLN 由耐受性很好的辅料合成,由于其粒径较小,可以在皮肤表面成为由紧密排列的球体形成的连贯性的膜,形成闭塞效应<sup>[11]</sup>。闭塞效应可以通过增加角质层的水合作用,减少水分蒸发来促进药物在皮肤的渗透。另外一个显著优点是纳米粒为固态,性质更加稳定而且可以保护药物避免化学降解,同时可以调节药物的释放,具有缓释的特点。Jenning 等<sup>[11-13]</sup>发现维生素 A 棕榈酸视黄酯 SLN 可提高药物在皮肤表层的浓度和透皮吸收,并可调控释药速率。将含药 SLN 加入 O/W 乳膏基质中,可延长药物对皮肤表层

的靶向作用,但不会增加药物在皮肤深层的浓度。以 SLN 包裹 PPT 有望明显提高药效,降低毒副作用,为尖锐湿疣复发提供可行的治疗方案。同时扩大 PPT 外用制剂的适用范围。

因为有表面活性剂的作用和纳米级的粒子,PPT SLN 具有较好的理化稳定性。但有人认为由于该分散体是热力学不稳定体系,固体脂质纳米粒混悬液仍然是可以互相碰撞聚合的,通常在短时间里就有粒径的增大、粒子聚合甚至胶凝<sup>[14]</sup>。将 SLN 混悬液采用冷冻干燥或喷雾干燥的方法干燥成固体,可能有助于纳米粒的稳定。样本放置过程中的沉淀可能与药物释放或纳米粒子聚积有关。冰箱内保存有助于保持其稳定性。

研究表明,纳米粒子越小,释放速率和药物的量越多,透皮吸收的能力越强,这可能是由于粒径较小的纳米粒和皮肤角质层结合得更加紧密,更有利于药物的穿透<sup>[14]</sup>。我们选择 myrj53(聚氧乙烯 50 硬脂酸酯)正是因为以其为非离子表面活性剂制备的纳米粒粒径较小<sup>[15]</sup>。水浴温度、降温速度、乳化时间及搅拌速度等均可能影响 SLN 的质量。但我们在实验中观察到非离子表面活性剂的性质和浓度可能是决定纳米粒包封率、粒径及稳定性的关键因素。另外,微乳降温的过程也很重要,需要快速降温且维持足够长的时间,使纳米粒得到足够硬化,防止纳米粒之间重新聚合。降温速度太慢或者冰水浴时间太短都会导致体系的稳定性明显降低,致使实验失败。

有文献报道固体脂质纳米粒混悬液外观具有淡蓝色乳光<sup>[7]</sup>,而本实验可见为银白色乳光,可能与被包裹的药物、表面活性剂的种类及纳米粒的粒径有关。

本实验采用改良的微乳技术制备 SLN,所需设备简单,成功率较高。制备的 PPT SLN 制剂具有较高的包封率、粒径小、分布均匀、稳定性好的特点。本实验初步表明,PPT 适合进行 SLN 包裹,并具有良好的研究和应用前景。

#### 参考文献:

[1] Kinghorn GR, McMillan A, Mulcahy F, *et al.* An open comparative study of the efficacy of 0.5% podophyllotoxin lotion and 25% podophyllotoxin solution in the treatment of condylomata acumina-

ta in males and females[J]. *Int J STD AIDS*, 1993, 4(2): 194-9.

[2] Petersen CS, Weismann K, Quercetin, *et al.* An argument against the use of podophyllin[J]? *Genitourin Med*, 1995,71(2): 92-3.

[3] Muller RH, Mader K, Gohla S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2000, 50(1): 161-77.

[4] zur Muhlen A, Schwarz C, Mehnert W. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - drug release and release mechanism[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 1998, 45(2): 149-55.

[5] Dingler A, Blum RP, Niehus H, *et al.* Solid lipid nanoparticles (SLN/Lipopearls) - a pharmaceutical and cosmetic carrier for the application of vitamin E in dermal products[J]. *J Microencapsul*, 1999, 16(6): 751-67.

[6] Gasco MR. Method for producing solid lipid microspheres having a narrow distribution[P]. *USP*: 5 250 236, 1993.

[7] Chen DB, Yang TZ, Lu WL, *et al.* *In vitro* and *in vivo* study of two types of long-circulating solid lipid nanoparticles containing paclitaxel[J]. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2001, 49(11): 1444-7.

[8] Strand A, Wilander E, Zehbe I, *et al.* High risk HPV persists after treatment of genital papillomavirus infection but not after treatment of cervical intraepithelial neoplasia[J]. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 1997, 76(2): 140-4.

[9] 曾抗,李国锋,许重远,等.鬼臼毒素脂质体软膏治疗尖锐湿疣的双盲随机对照试验[J]. *第一军医大学学报*, 1998, 18(3): 246. Zeng K, Li GF, Xu CY, *et al.* Dual blinded random control experiment of podophyllotoxin liposome cream for treating condyloma acuminatum [J]. *J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 1998, 18(3): 246.

[10] 江彬彬,曾抗,张三泉,等.鬼臼毒素二棕榈酸磷脂酰胆碱脂质体局部外用的实验研究[J]. *第一军医大学学报*, 2002, 22(10): 875-7. Jiang BB, Zeng K, Zhang SQ, *et al.* Experimental study of podophyllotoxin dipalmitoylphosphatidylcholine liposome for topical skin application[J]. *J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2002, 22(10): 875-7.

[11] Jennings V, Gysler A, Schafer-Korting M, *et al.* Vitamin A loaded solid lipid nanoparticles for topical use: occlusive properties and drug targeting to the upper skin[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2000, 49(3): 211-8.

[12] Jennings V, Schafer-Korting M, Gohla S. Vitamin A-loaded solid lipid nanoparticles for topical use: drug release properties [J]. *J Control Release*, 2000, 66(2-3): 115-26.

[13] Mei Z, Chen H, Weng T, *et al.* Solid lipid nanoparticle and microemulsion for topical delivery of triptolide[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2003, 56(2): 189-96.

[14] Wang J, Chen DB, Zhang Q. Determination of surface properties and cell uptake in vivo of stearic acid solid lipid nanoparticle[J]. *Chin Pharm J*, 36(2): 102-6.