

高压均质法制备载有维甲酸的纳米结构脂质载体

张晓佳¹, 夏强¹, 马全红^{1,2}, 段磊¹, 顾宁¹

(1. 东南大学分子与生物电子学教育部重点实验室, 纳米科学与技术研究中心, 江苏 南京 210096;

2. 东南大学化学化工系, 江苏 南京 210096)

摘要:采用高压均质法制备了载有维甲酸(RA)的纳米结构脂质载体(Nanostructured Lipid Carriers, NLC),并用透射电镜(TEM)、粒度分析仪、 ζ 电位仪和高效液相色谱仪(HPLC)对其进行了表征.结果表明,随高压均质循环次数的增加,NLC的均粒径从120 nm减小到10 nm,同时单分散性变差;NLC的微观形貌呈球形,表明其未结晶具有较好的载药能力;NLC将维甲酸浓度从20 $\mu\text{g/mL}$ (溶解于硅油)提高到56.26 $\mu\text{g/mL}$,并能提高其光稳定性;NLC体系的稳定性良好, ζ 电位高达 (-30.9 ± 0.6) mV,于4 \times 10000 r/min冷冻离心120 min或避光保存6个月后粒径分布仍然基本不变,且可冷冻干燥(-40 $^{\circ}\text{C}$, 0.01 Pa)后长期保存.

关键词:纳米结构脂质载体(NLC);高压均质;维甲酸(RA)

中图分类号:R9;TQ46 文献标识码:A 文章编号:1009-606X(2005)01-0054-04

1 前言

固体脂质纳米粒(SLN)是在20世纪90年代初发展起来的一种载体系统,用以替代一些传统的载体系统,如乳液、脂质体和聚合物纳米粒.但SLN也存在一些问题,由于单一固体脂质基质会形成脂质晶体,限制了它的载药能力,并且会逐渐向完美晶体转变,从而导致贮存过程中药物被排挤出晶格^[1].这些缺点导致了纳米结构脂质载体(Nanostructured Lipid Carrier, NLC)的出现.与SLN的单一固体脂质基质相比,NLC由几种熔点不同的固液脂质混合物作为基质,可以避免结晶,从而容纳更多的药物.维生素A在SLN系统中仅占脂质基质的1%,而在NLC系统中可以提高到5%^[1].同时NLC也继承了SLN的一些优点,如生理相容性好、保护药物不受化学降解、可大规模制备、成本低廉,并可将其制成片剂、丸剂、胶囊以及粉剂以满足各种需要^[2].

维甲酸(Retinoic Acid, RA)是维生素A的衍生物,有全反式和顺式两种同分异构体,对上皮及间隙来源的正常细胞及肿瘤细胞的分化及增殖产生作用,有望用于增殖性疾病防治,受到广泛关注^[3].口服给药所需药物剂量大,可能将对全身造成不良影响.有研究者发现口服40 mg的全反式维甲酸(ATRA)可出现发热、呼吸困难、肺间质浸润、心包积液、肢体水肿等被称之为“ATRA综合征”的现象.另外全身应用ATRA还有潜在的致畸危险性,故局部给药是较为理想的给药途径^[4].但维甲酸是脂溶性药物,不溶于水,难以局部给药.有研究将ATRA溶于硅油中以用于眼内给药,经16 d溶解达到饱

和,溶解度为20 $\mu\text{g/mL}$ ^[5],但它在光照及高温下可向顺式转化^[3],顺式维甲酸则作用微弱^[5],所以药效很短.对于像眼内这样不宜重复给药的局部,即使长期保持有效药物浓度,也会因为过高的初始浓度而导致副作用.这些都限制了它的临床应用,因此需要一种合适的剂型来提高ATRA的浓度和稳定性.这种剂型本身不能有毒性.

NLC有望用作RA的载体系统.高压均质法是大规模制备SLN的一种方法,易于工业化生产.本实验用高压均质法制备载有RA的NLC,并对其进行了一些表征.

2 材料与方法

2.1 实验材料

药品:维甲酸(纯度99.3%,上海第六制药厂)、甘露醇(分析纯,中国医药集团上海化学仪器公司)、甲醇(高效液相色谱专用)、乙腈(色谱纯)、硬脂酸(化学纯,上海凌峰化学试剂公司)、大豆油(红灯牌,深圳南顺油脂有限公司)、Span 80(化学纯,上海化学试剂公司)、Tween 80(化学纯,上海申宇医药化工有限公司).

仪器设备:JEM-2000EX型透射电镜、PE200型高效液相色谱、N4 plus型粒度分析仪(Beckman Coulter)、Delsa 440SX型 ζ 电位分析仪(Beckman Coulter)、LGJ-1C型医用冷冻干燥机(上海医用分析仪器厂)、FA25型高剪切分散乳化机(上海弗鲁克机电设备有限公司)、GYB40-10S型高压均质机(上海东华高压均质机厂)、Eppendorf Centrifuge 5804 R型冷冻离心机.

2.2 载有维甲酸的NLC的制备

避光条件下,将0.4 g大豆油、0.1 g硬脂酸、0.5 g

收稿日期:2004-01-12,修回日期:2004-04-05

基金项目:江苏省计划发展委员会资助项目(编号:7607038009),国家自然科学基金资助项目(编号:60371027)

作者简介:张晓佳(1981-),女,江苏省南通市人,硕士研究生,生物医学工程专业;顾宁,通讯联系人,E-mail:guning@seu.edu.cn.

Span 80 和一定量的维甲酸 65 熔融 ,高剪切制得初乳 ,混入 65 溶有 1.5 g Tween 80 的蒸馏水后 ,高压均质 12 次循环 ,均质压力为 80 MPa ,在每次循环之后取出少量样品 ,自然冷却至室温即制得载有维甲酸的纳米结构脂质载体(NLC).

2.3 粒径分布和ζ电位的测量

NLC 的粒径分布由粒度分析仪测量 ,测试角为 90° ,测试温度为 20 ,其中均粒径采用体积分布(Volume distribution)的结果 ,多分散性指数(Polydispersity Index, P.I.)采用单峰分布(Unimodal distribution)的结果. ζ电位由ζ电位分析仪测得 ,测试温度为 25 .

2.4 电镜观察

用移液器取 NLC 少许 ,滴加在覆盖了方华膜的铜网上 ,用 2%的磷钨酸溶液进行负染 ,在透射电镜下观察粒子大小和形态 .

2.5 高效液相色谱法(HPLC)测量维甲酸浓度

流动相甲醇:乙腈:4% HAC=59.5:30:10.5(摩尔比) ,

流速 0.8 mL/min ,电子束波长λ=340 nm ,测试温度均为 20 ,分析柱为 C₁₈-ODS ,进样量 20 μL ,运行时间 15 min.

2.6 冷冻干燥

在制得的 NLC 中加入 2.5%(ω)的冷冻保护剂甘露醇后冷冻干燥 ,温度为-40 ,真空度为 0.01 Pa ,30 h 后取出冻干粉 ,置于干燥器中避光保存.

3 结果及讨论

3.1 高压均质循环次数对制备 NLC 的影响

Muller 等^[6]比较了 50 和 150 MPa 压力对高压均质法制备纳米悬液(Nanosuspension)的影响 ,结果表明随压力增大和循环次数增多 ,均粒径趋于减小 ,而 Lim 等^[7]则采用了 100 MPa 的压力. 通常工业上达不到那么高的压力 ,因此本实验采用 80 MPa 压力 ,使初乳循环不同次数 ,测其粒径分布 ,图 1 是均粒径和分散性指数 P.I. 的变化. 随循环次数增加 ,均粒径从 120 nm 降到 10 nm ,

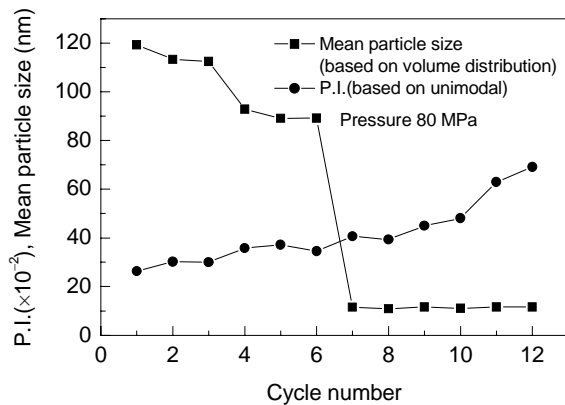


图 1 高压均质循环次数的影响分布
Fig.1 Influence of homogenization cycles

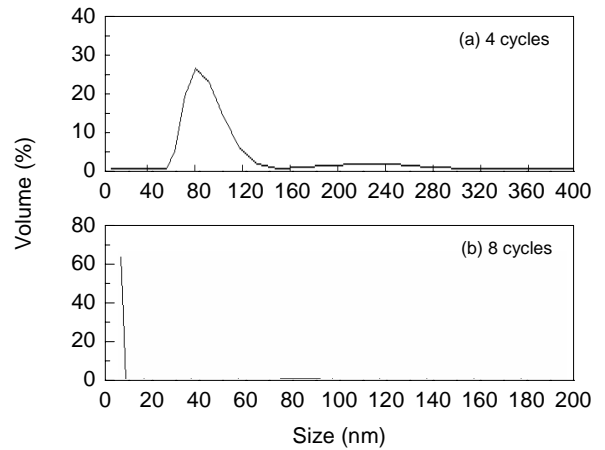


图 2 均质 4 循环和 8 循环所得 NLC 的粒径
Fig.2 Volume distributions of NLC homogenized for 4 and 8 cycles

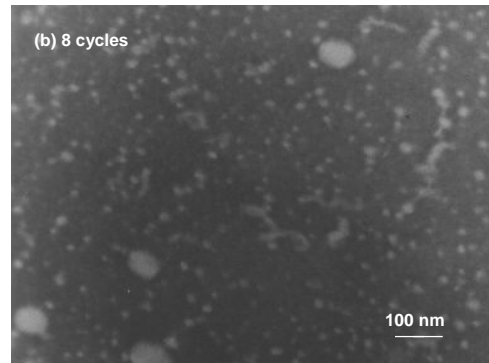
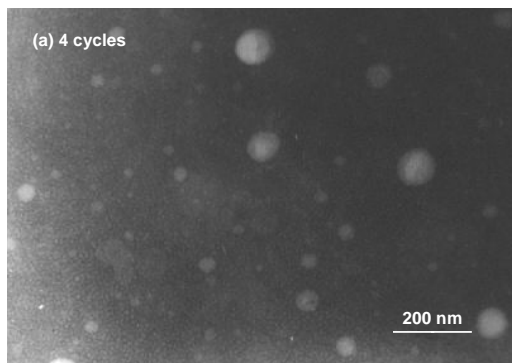


图 3 均质 4 循环和 8 循环后的电镜照片
Fig.3 TEM photos of NLC homogenized for 4 and 8 cycles

第 6~7 次循环间有一个突变; P.I. 从 0.26 逐步增大至 0.69, 即粒子趋于不均匀. 在高压均质过程中, 温度一直保持在 65°C 以上, 体系为液-液分散状态, 因此制备过程为微乳液状态. 微乳液有自发形成和能量供应两种形成方式^[8], 微乳液是基于能量供应的, 发生突变有可能与它的形成自由能 ΔG 有关^[9]. 图 2 是均质 4 循环和 8 循环所得 NLC 的粒径分布图, 可以看出制得的 NLC 体系呈双峰分布, 其中较小的 1 个峰占绝大多数, 表明较为均匀的小粒子中混有少量大粒子. 4 循环粒子较大, 2 个峰较靠近; 8 循环粒子较小, 而 2 个峰相差较大.

3.2 NLC 的微观形貌

对均质 4 循环和 8 循环的 NLC 进行电镜观察, 见图 3. 由于两者的浓度是一样的, 4 循环的粒子因为较大所以较为稀疏, 直径为几十纳米至一百多纳米. 2 个分布峰相差不大; 8 循环的粒子因为较小所以较密, 明显有 2 个相差较大的峰. 绝大多数是 10 nm 左右的小粒子, 同时存在几十纳米的大粒子, 这与粒度分析的结果是吻合的. 照片上粒子均是圆形, 可以推断 NLC 体系中的粒子是球状的, 表明脂质并未结晶, 因而药物不会被排挤出晶格, 也证实了 NLC 的载药能力是比较好的.

3.3 NLC 中 ATRA 的浓度及光稳定性

体外实验表明, 10^{-8} ~ 10^{-5} mol/L (3×10^{-3} ~ $3 \mu\text{g/mL}$) 维甲酸可以有效地抑制体外培养的人成纤维细胞的生长, 10^{-6} mol/L ($0.3 \mu\text{g/mL}$) 维甲酸可有效抑制视网膜色素上皮细胞的生长, 10^{-5} mol/L ($3 \mu\text{g/mL}$) 维甲酸能抑制 50% 鼠成纤维细胞的增殖^[10]. ATRA 在硅油中浓度达到 $20 \mu\text{g/mL}$ ^[3], 但不稳定, 所以药效很短. NLC 体系中 ATRA 的浓度提高至 $56.26 \mu\text{g/mL}$, 又因光照的影响是主要的^[3], 所以对 ATRA 载入脂质载体和溶解于甲醇中的光稳定性进行了比较, 如图 4 所示. 可以看出, 载入脂质载体的 ATRA 比溶解状态转化要慢. 这是由于纳米粒子对光有散射作用, 脂质载体也会阻挡一部分光线.

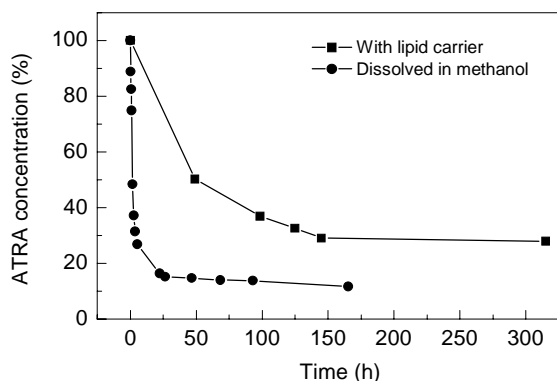


图 4 两种形式维甲酸的光稳定性比较

Fig.4 Photostability of the two forms of ATRA

NLC 既提高了 ATRA 的初始浓度, 又能提高它的光稳定性, 因此可以更好地满足临床需求.

3.4 NLC 的稳定性

NLC 的稳定性可由粒子的表面电势 ζ 电位预测, 它是判断粒子稳定性的一个重要指标. 本体系的 ζ 电位为 (-30.9 ± 0.6) mV, 有利于长期稳定.

对体系施加外力以观察其稳定性. 在 -4 及 10000 r/min 条件下冷冻离心后测其粒径分布, 如表 1 所示. 可以看出, 即使冷冻离心 120 min 之后, 样品几乎不变.

将体系在室温避光的条件下保存 6 个月后测试其粒径分布的变化情况, 见表 2, 粒子的均粒径稍有增大, 单分散性也有点变差. 总体来说, 体系的变化较小.

表 1 NLC 的离心稳定性

Centrifugation time (min)	Mean particle size (nm)	P.I.
0	85.8	0.338
30	90.7	0.331
120	94.2	0.400

表 2 NLC 的时间稳定性

Time	Mean particle size (nm)	P.I.
0	77.8	0.271
6 months	89.9	0.350

为了使 NLC 能长期保存, 将均粒径为 10.6 nm 的 NLC 在 -40 及 0.01 Pa 的条件下冷冻干燥, 观察其粒径分布的变化, 如表 3 所示. 此体系在冷冻干燥后, 粒子均粒径增大到 182.6 nm, 但仍在所需的粒径允许范围之内, 同时分布变窄. 有关 SLN 的研究表明, 冻干可以通过 Ostwald 催熟和水解作用提高 SLN 的稳定性, 也使 SLN 混进药丸、药片、胶囊成为可能^[7]. 因此将 NLC 冷冻干燥也可以作为提高其长期稳定性的手段.

表 3 冷冻干燥后粒径分布的变化

	Mean particle size (nm)	P.I.
Before	10.6	0.341
After	182.6	0.270

4 结论

(1) 随高压均质循环次数的增加, 均粒径从 120 nm 变化到 10 nm, 同时单分散性变差. 因此改变循环次数可获得不同粒径分布的 NLC.

(2) NLC 的微观形貌呈球形, 表明其未结晶, 不会将药物排挤出晶格.

(3) 此体系能将维甲酸浓度从 $20 \mu\text{g/mL}$ (溶解于硅油) 提高到 $56.26 \mu\text{g/mL}$, 并能提高载入维甲酸的光稳定性, 有利于长期保持药物的有效浓度和减少副作用.

(4) 此体系的 ζ 电位为 (-30.9 ± 0.6) mV, 有利于长期

稳定,在冷冻离心(4℃, 10000 r/min)120 min 或常温避光保存 6 个月后仍然保持稳定,此外冷冻干燥(-40℃, 0.01 Pa)也可作为提高其长期稳定性的手段。

因此,将维甲酸载入纳米结构脂质载体可以作为维甲酸的一种新剂型,使之能够用于增殖性疾病的防治,并且制备简便,可批量生产,有利于工业应用。

参考文献:

- [1] Muller R H, Radtke M, Wissing S A. Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC) in Cosmetic and Dermatological Preparations [J]. *Adv. Drug Deliver. Rev.*, 2002, 54: 131-155.
- [2] Muller R H, Radtke M, Wissing S A. Nanostructured Lipid Matrices for Improved Microencapsulation of Drugs [J]. *Int. J. Pharm.*, 2002, 242: 121-128.
- [3] 栾洁, 王文吉, 陈钦元. 维甲酸及其在眼科的应用 [J]. *国外医学眼科分册*, 1997, 21(1): 57-60.
- [4] 阎晓然. 维甲酸与增殖性玻璃体视网膜病变 [J]. *国外医学眼科学分册*, 2002, 26(3): 175-179.
- [5] 陈红红, 陈桂宝, 孙梅贞. 硅油中维甲酸的高效液相色谱测定及制剂的稳定性 [J]. *上海医科大学学报*, 1998, 25(1): 67-70.
- [6] Muller R H, Peters K. Nanosuspension for the Formulation of Poorly Soluble Drugs—I Preparation by a Size-reduction Technique [J]. *Int. J. Pharm.*, 1998, 160: 229-237.
- [7] Lim Soo-Jeong, Kim Chong-Kook. Formulation Parameters Determining the Physicochemical Characteristics of Solid Lipid Nanoparticles Loaded with All-trans Retinoic Acid [J]. *Int. J. Pharm.*, 2002, 243: 135-146.
- [8] Vandamme Th F. Microemulsions as Ocular Drug Delivery Systems: Recent Developments and Future Challenges [J]. *Progr. Retin. Eye Res.*, 2002, 21: 15-34.
- [9] 梁文平. 乳状液科学与技术基础 [M]. 北京: 科学出版社, 2001. 217-220.
- [10] 栾洁, 王文吉, 赵培泉. 体外观察维甲酸对 NIH/3T₃ 细胞的抑制作用 [J]. *铁道医学*, 2001, 29(3): 143-144.

Preparation of Nanostructured Lipid Carriers Loaded with Retinoic Acid by the High Pressure Homogenization Method

ZHANG Xiao-jia¹, XIA Qiang¹, MA Quan-hong^{1,2}, DUAN Lei¹, GU Ning¹

(1. Key Lab. Mol. Biomol. Electr., Ministry of Education, Res. Cent. Nano-scale Sci. & Technol., Southeast Univ., Nanjing, Jiangsu 210096, China;
2. Dept. Chem. Chem. Eng., Southeast Univ., Nanjing, Jiangsu 210096, China)

Abstract: The poor aqueous solubility and instability of retinoic acid (RA) have limited its clinical use. Solid lipid nanoparticles (SLN) have a potential limitation which is the drug expulsion. This study was undertaken to overcome the limitation by loading RA in nanostructured lipid carriers (NLC). RA-loaded NLC was prepared by high pressure homogenization and characterized by transmission electronic microscope (TEM), particle size analyzer, zeta potential analyzer and high-performance liquid chromatography (HPLC). The results were as follows: (1) When the homogenization cycle number varied from 1 to 12, the mean particle size decreased from 120 nm to 10 nm, while P.I. (polydispersity index) increased from 0.26 to 0.69. (2) The spherical shape observed by TEM indicated a better drug loading capacity over SLN. (3) The concentration of all-trans retinoic acid (ATRA) in NLC reached 56.26 μg/mL compared to 20 μg/mL dissolved in silicone oil and the photostability of ATRA was improved so that the effective concentration of RA could keep for a longer time. (4) As far as the stability of NLC was concerned, its ζ potential value was (-30.9±0.6) mV and it remained stable after 120 min centrifugation (4℃, 10000 r/min) or 6 month light-proof storage. Furthermore, freezing-drying (-40℃, 0.01 Pa), which increased its mean particle size and reduced its P.I., could also be used to increase the NLC stability. Taken together, RA-loaded NLC is a promising drug form for clinical use.

Key words: nanostructured lipid carriers (NLC); high pressure homogenization; retinoic acid (RA)