

溶剂扩散法制备丙酸倍氯米松固体脂质纳米粒

张惠宏*, 胡富强, 袁弘, 方明

(浙江大学药学院, 浙江杭州 310006)

摘要: 目的 建立一种高效的固体脂质纳米粒制备与分离方法。方法 用水性溶剂扩散法, 制备得到甘油单硬脂酸酯固体脂质纳米粒。通过调节纳米粒表面 Zeta 电位, 提高纳米粒的回收率。结果 用水性溶剂扩散法可以简便、快速制备得到含药固体脂质纳米粒, 低转速离心 ($4\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$) 即可达到纳米粒与分散体系之间的分离, 回收率明显高于未调节纳米粒表面 Zeta 电位条件下的高速离心分离方法。用本法制备得到的纳米粒在最初 3 h 有药物的突释现象, 随后 4 d 药物的释放明显缓慢, 每天释放约药物总量的 6%。结论 水性溶剂扩散法适用于固体脂质纳米粒的制备, 得到的固体脂质纳米粒可实现药物的控制释放。

关键词: 水性溶剂扩散法; 固体脂质纳米粒; 丙酸倍氯米松; 甘油单硬脂酸酯

中图分类号: R943.41 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2003)04-0302-05

Preparation of solid lipid nanoparticles by solvent diffusion method

ZHANG Hui-hong*, HU Fu-qiang, YUAN Hong, FANG Ming

(College of Pharmacy, Zhejiang University, Hangzhou 310006, China)

Abstract: **Aim** To establish an efficient method for preparation of solid lipid nanoparticles with high recovery. **Methods** Monostearin solid lipid nanoparticles was prepared by solvent diffusion method in aqueous system. The recovery of the method was greatly improved by adjusting the Zeta potential. **Results** The drug-loaded solid lipid nanoparticles suspension was quickly produced and easily separated with centrifugation at $4\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ under acidic condition. Compared with the nanoparticles made without adjusting the Zeta potential, the recovery of nanoparticles prepared in this way was significantly increased. The release behavior *in vitro* showed an initial burst effect in the first 3 hours followed by a slower rate stage of 4 days with nearly 6% drug released in each day. **Conclusion** The solvent diffusion method in aqueous system might be used as a new method to prepare solid lipid nanoparticles in the future. The loaded drug can be released in a controlled manner.

Key words: solvent diffusion method; solid lipid nanoparticles; clobetasol propionate; monostearin

固体脂质纳米粒(solid lipid nanoparticles, SLN)是继乳剂、脂质体、微粒和毫微粒后,用于药物控制释放的胶团载体给药系统^[1-3]。与传统的载体相比,SLN具有聚合物纳米粒和O/W脂肪乳剂的优点;与聚酯纳米粒相比,具有优良的生物相容性,且口服给药的生物利用度高,有脑靶向作用^[4-6]。SLN常用高压乳匀法^[4]或微乳法^[7]制备,其中前者可实

现工业化规模的生产。最近几年,对SLN的研究报道明显增加。

药物包封率及释放指标是设计和评价给药系统的重要依据。但对SLN中药物释放,用乳匀法制备得到的SLN,普遍存在药物的突释现象。最早达到体外缓释目的是氢化泼尼松SLN^[8]。

突释现象产生的主要原因是现有高压乳匀法制备时的高温和使用高浓度的表面活性剂^[9],微乳法制备同样需要用高浓度的表面活性剂和辅助表面活性剂^[7]。药物突释限制了该体系的应用,因此有必

收稿日期: 2002-04-28.

* 通讯作者 Tel: 86-571-87217365(O), Fax: 86-571-87217327,

E-mail: xizilake365@sohu.com

要采用一种新的制备方法以实现药物的控制释放。

本研究的目的在于评价用新型的水性溶剂扩散法制备的 SLN 是否能延长药物释放。水性溶剂扩散法目前只用于合成的聚合物制备纳米粒^[8]。本研究采用亲脂性的丙酸倍氯米松(clobetasol propionate)为模型药物,筛选最佳的制备与分离条件,并观察载药粒子的释放行为。

材料与方法

材料和仪器 甘油单硬脂酸酯(monostearin)购自上海化学试剂有限公司;丙酸倍氯米松由杭州华东制药有限公司赠送;聚乙烯醇 PVA04-86 (polyvinyl alcohol)购自北京化学有限公司;乙醇、丙酮和其他试剂均为分析纯。磁力加热搅拌器(南通科学仪器厂);JY92-II 超声细胞粉碎机(宁波新芝科技研究所);HZ-8812S 恒温振荡器(华利达公司);LXF-64-01 离心机(北京医疗仪器修理厂);高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);色谱柱为 Hypersil C₈ 柱(150 mm × 3.9 mm);低温冰箱(日本三洋公司);LGJ0.5-II 冷冻干燥机(军事医学科学院实验仪器厂);JEM1200EX 透射电子显微镜(日本电子公司);3000HS 微粒粒度与 Zeta 电位测定仪(英国 Malvern 公司);高速离心机(德国 Sigma 公司)。

水性溶剂扩散法制备甘油单硬脂酸酯固体脂质纳米粒 取甘油单硬脂酸酯 396 mg,丙酸倍氯米松 4 mg,精密称定。加入丙酮 12 mL 和乙醇 12 mL,水浴 50 °C 使完全溶解。在 400 r·min⁻¹ 机械搅拌条件下,将所得的混合物溶液加入到含 1% PVA 的酸性水溶液(用 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸调至 pH 1.2) 240 mL 中,室温搅拌 5 min,得 SLN 分散液。SLN 分散液用 4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,所得沉淀用适量蒸馏水超声分散。

本制备方法是以前水中乳化溶剂扩散法为基础^[8],聚合物如 DL-丙交酯/乙交酯聚合物(PLGA)通常能溶解在有机相中。但甘油单硬脂酸酯在室温下不能完全溶解在有机相中,因此,采用 50 °C 水浴溶解脂质。另外,脂质的密度很小而 PVA 的分子量较高,用超速离心和超滤的方法很难将 SLN 从其分散液中分离得到,因此采用酸性条件调节分散体系 Zeta 电位的方法,使在水相中形成 SLN 凝聚,从而达到易于离心分离的目的。

固体脂质纳米粒分散液冷冻干燥 将 SLN 超声分散液于 -75 °C 低温预冻 5 h,然后控制冷冻干燥条件冷冻干燥 72 h,得到 SLN 固体粉末。

固体脂质纳米粒的形态测定 用透射电子显微镜(TEM)观察 SLN 的形态。固体样品用 2% 磷钨酸染色,然后滴至铜筛网上,室温放置至形成薄膜后观察。

固体脂质纳米粒 Zeta 电位和粒径分布测定 SLN 分散液用蒸馏水稀释 20 倍,用微粒粒度与 Zeta 电位测定仪测定 SLN 的平均粒径和 Zeta 电位。

药物包封率和药物含量的测定 取冻干得到的 SLN 固体粉末适量,于 65 °C 水浴 30 min 使完全熔化或溶解在甲醇中,然后冷却至室温使脂质沉淀。4 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, HPLC 法测定上清液中的药物浓度。HPLC 法的检测波长 240 nm,流动相为甲醇-水(74:26)。

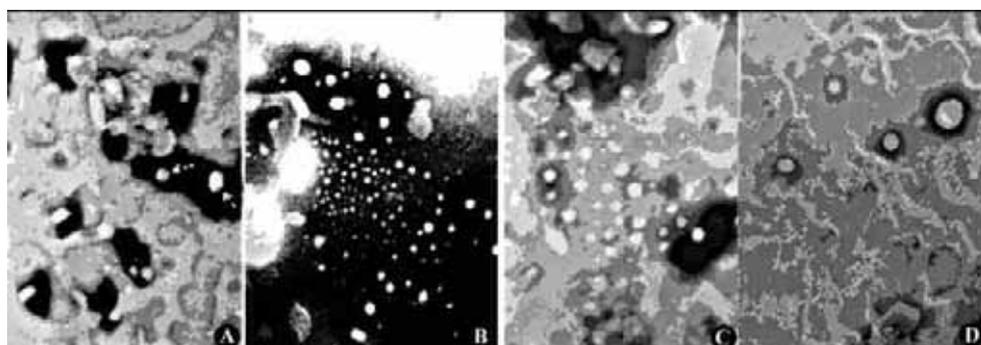
固体脂质纳米粒体外释药 取 SLN 冻干粉末 30 mg,精密称定。将固体粉末分散在装有 30 mL 释放介质(40% PEG 400 水溶液和 0.5% 吐温 80 组成)的 50 mL 玻璃试管中,37 °C 恒温振荡水浴,振荡频率为 60 次·min⁻¹。间隔一定时间从试管中吸取分散液 1 mL,20 000 r·min⁻¹ 高速离心除去大部分 SLN,上清液用孔径 220 nm 的微孔滤膜过滤, HPLC 法测定续滤液中的药物浓度,计算药物的释放量。

结果与讨论

1 固体脂质纳米粒的透射电镜观察

用酸性和中性水性溶液制备得到的丙酸倍氯米松固体脂质纳米粒的透射电子显微镜(TEM)照片见图 1,由电镜照片中可见 SLN 呈类球形或椭圆形。在聚合物纳米粒的水性溶剂乳化扩散法制备中,与水易混合的有机溶剂扩散到水相中的速率很快,由于搅拌可引起乳化液滴界面骚动^[11],水相中的 PVA 分子很快吸附到乳化液滴上,引起直径在纳米粒范围液滴的自发形成。由于在形成的乳化液滴界面过程中,脂质和药物溶解度同步快速降低,导致脂质与药物以混合物形式同步形成纳米粒“沉淀”。

所形成的 SLN 的不规则形状主要由脂质的性质决定,包括脂质的溶解性质、熔点和形成乳化液滴的能力。另外,也会受到所选择的溶剂或表面活性剂的影响。在最初研究中,曾使用多种表面活性剂,如在油相或/和水相中分别使用 Pluronic F68 和胆酸钠,研究发现所形成 SLN 的大小并没有太大的改变。而用高压乳匀法制备 SLN 时,大量的表面活性剂也被同时包裹入脂质内,导致了药物突释现象的产生^[9]。因此,在本研究中选择不含表面活性剂的处方。



A: Drug-free SLN made in neutral condition; B: Drug-load SLN made in neutral condition; C: Drug-free SLN made in acid condition; D: Drug-load SLN made in acid condition

Figure 1 Transmission electron microscopy micrographs (TEM) of monostearin solid lipid nanoparticles

2 固体脂质纳米粒的粒径分布

用酸性或中性的 1 %PVA 水溶液所制备得到的

SLN 的粒径大小分布见表 1。从表中可以看到粒径的分布有两个范围,多数为小于 100 nm 的粒子。

Table 1 Size of solid lipid nanoparticles prepared by the solvent diffusion method in an aqueous system

Dosage form	Number average/nm			Volume average/nm			Mean volume average/nm	Polydispersity
	Area	Mean	Width	Area	Mean	Width		
Drug free *	75.8	117.3	8.5	13.8	117.3	8.5	289.4	0.25
	24.2	316.1	48.0	86.2	316.8	48.8		
Drug loading *	97.2	43.5	22.9	11.8	46.5	25.7	312.2	0.22
	2.8	252.9	271.9	88.2	347.9	200.1		
Drug free **	100.0	89.0	44.5	100.0	138.2	115.7	138.2	0.27
Drug loading **	92.7	116.2	69.2	20.0	143.3	89.7	381.1	0.22
	7.3	418.4	158.8	80.0	432.4	231.5		

* Prepared under neutral pH condition for comparison; ** Prepared under acidic condition

3 固体脂质纳米粒的分离与 Zeta 电位

低密度的脂质用水性溶剂扩散法可以制备得到的 SLN 分散液。通常用超速离心或超滤的方法实现 SLN 从分散液中分离。但是,在本研究过程中,用 45 000 r·min⁻¹ 超速离心 1 h,在上清液中仍有大量的 SLN,回收率相当低,不能达到使 SLN 从分散液完全分离的目的。这种现象可能是由于脂质的密度很低或 SLN 的粒径很小引起,在多数纳米粒的分离中存在同样的问题。用超滤法分离 SLN 时,发现冻干后 SLN 的回收率大于 100%,表明在超滤液中仍有 PVA 分子残余。用该法还存在耗时长、分离效率低等问题。

Zeta 电位常用于预测胶团分散液的稳定性^[12]。而在高电位时,由于电子斥力的存在,粒子间不会发生相互聚集^[13,14]。采用调节分散体系 Zeta 电位的方法,可以实现 SLN 的有效分离,因为稳定的纳米粒分散体系通常具有较低的 Zeta 电位,将该体系的 Zeta 电位调节到接近于零,可引起纳米粒分散体系

中纳米粒自身的凝聚。

通常,脂质粒子的表面带有负电荷^[15],通过调节分散体系的电荷,比如采用阳性聚集剂(如氯化铝)和将 pH 值调至酸性的方法,可以使分散体系得到更多的正电荷,因此整个体系的电荷将趋于中性。实验结果正如预计的那样,通过分散体系 pH 值调节至酸性,测得的分散体系的 Zeta 电位趋近于零,而与此同时实现了分散体系中 SLN 的凝聚。因此,只需要用较低的离心速度,就可将 SLN 轻易地从其分散体系中分离出来。不同 pH 条件下制备得到的药物、脂质和 SLN 的 Zeta 电位见表 2。

Table 2 Zeta potential of drug, drug-free SLN and drug load SLN prepared in different pH

pH of aqueous phase	Zeta potential width/ mV					
	Drug		Drug-free SLN		Drug-load SLN	
5.73	- 0.3	3.3	- 16.4	1.6	- 21.3	1.6
1.10	3.2	3.7	3.8	4.4	4.3	4.1

4 固体脂质纳米粒的回收率、药物包封率及药物含量

不同的分离方法对 SLN 回收率、药物包封率和 SLN 中药物含量的影响见表 3。SLN 的回收率取决于 SLN 的分离条件,酸性水相中所制备得到的 SLN 回收率大大高于中性水相条件。表明在酸性水相中 SLN 几乎全部凝聚而被分离。药物包封率也随着在酸性水相中 SLN 回收率的增加而增加。下列公式分别用于计算 SLN 的回收率、SLN 中的药物包封率和药物含量。

$$\text{回收率}(\%) = \frac{\text{SLN 粉末的重量}}{\text{系统中的物质重量}} \times 100$$

$$\text{药物包封率}(\%) = \frac{\text{SLN 中的药物重量}}{\text{投料药物量}} \times 100$$

$$\text{药物含量}(\%) = \frac{\text{SLN 中的药物重量}}{\text{回收的 SLN 重量}} \times 100$$

Table 3 Effect of different pH of the aqueous phase on solid lipid nanoparticles (SLN) recovery, drug entrapment efficiency (EE) and drug loading (DL)

pH of aqueous phase	SLN recovery/ %	EE/ %	DL/ %
Neutral	6.50	6.31	0.96
	8.22	7.98	0.96
Acidic	94.55	92.53	0.97
	93.33	92.53	0.98

5 固体脂质纳米粒中药物的释放性能

由水性溶剂扩散法制备得到的 SLN 的药物释放曲线(图 2),可以观察到初期的药物突释现象,随后 SLN 中的药物呈持续释放,符合 Higuchi 线性方程。最初 3 h 释放了药物总量的 45%,此后,药物持续释放,每天释放约总量的 5.9%(由图 2 的趋势线方程计算得到)。从这一结果可以推测,SLN 是一个药物与脂质的骨架结构,药物分散在脂质骨架中。这种骨架是一种固体溶液形式,药物可能是以分子形式分散在其中。由于纳米粒表面积很大,一些药物分子可吸附在纳米粒的表面,或者以分子形式沉淀在脂质基质的表面,从而产生释放曲线初始阶段的药物突释现象。而在此后,药物的释放具持续性和缓慢的特点,说明药物的释放速率是由药物从刚性的基质结构扩散所决定。由于在持续释药前药物的突释量是一定的,而通常药物制剂给药时需要一个首剂量,这种现象可用于控释制剂的设计。当然,也可以通过简便的方法将突释部分的药物除去,以实现真正意义上的纳米粒药物缓释。

载药量可能会影响 SLN 的释药性能,当载药量增加至总量的 10% 时,也观察到有相似的突释现象之后的持续的药物释放。差别在于药物突释的程度,用水性溶剂扩散法制备得到的高载药量(10%)的 SLN,其突释部分的药物量接近总量的 70%。

用高压乳匀法或微乳法制备 SLN 的主要问题是 SLN 中药物的突释,只有很少的文献^[9]中提到在用冷高压乳匀法制备时,在不使用表面活性剂条件下,SLN 中的药物实现了缓释,但这可能会限制药物在制备系统中的溶解度,减少载药量。用新型水性溶剂扩散法,可以在温和的条件下简便制备得到 SLN,不需要特别的设备,并能达到延长药物释放的目的。

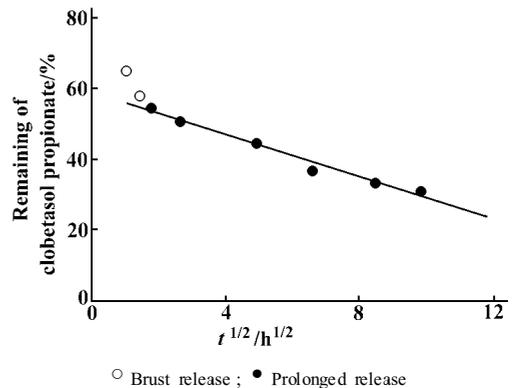


Figure 2 Release profiles of SLN in dissolution medium (composed of 40% PEG 400 aqueous solution with 0.5% Tween 80)

References:

- [1] Müller RH, Mäder 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 - 177.
- [2] Yang SC, Zhu JB, Lu Y, et al. Body distribution of camptothecin solid lipid nanoparticles after oral administration [J]. *Pharm Res*, 1999, **16**(5): 751 - 757.
- [3] Yang SC, Lu LF, Cai Y, et al. Body distribution in mice of intravenously injected camptothecin solid lipid nanoparticles and targeting effect on brain [J]. *J Controlled Release*, 1999, **59**(3): 299 - 307.
- [4] Müller RH, Maaßen S, Weyhers H, et al. Cytotoxicity of magnetite loaded polylactide, polylactide/glycolide particles and solid lipid nanoparticles (SLN) [J]. *Int J Pharm*, 1996, **138**(1): 85 - 94.
- [5] Müller RH, Lucks JS. Arzneistoffträger aus festen Lipidteilchen, Feste Lipidnanosphären (SLN) [P]. *Eur Pat*: 0605497, 1993-03-25.
- [6] Maaßen S, Schwarz C, Mehnert, et al. Comparison of cytotoxicity between polyester nanoparticles and solid lipid

- nanoparticles (SLN) [J]. *Proc Int Symp Control Release Bioact Mater*, 1993 ,**20** :490 - 491 .
- [7] Gasco MR. Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution [P]. *US Pat* : 5250236 , 1993-10-05 .
- [8] Mühlen AZ, 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 - 155 .
- [9] Mühlen AZ, Mehnert W. Drug release and release mechanism of prednisolone loaded solid lipid nanoparticles [J]. *Pharmazie* , 1998 ,**53**(8) :552 - 559 .
- [10] Kawashima Y, Yamamoto H, Takeuchi H, *et al* . Properties of a peptide containing DL-lactide/glycolide copolymer nanospheres prepared by novel emulsion solvent diffusion methods [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 1998 ,**45**(1) :41 - 48 .
- [11] Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JP, *et al* . Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement [J]. *Int J Pharm*, 1989 ,**55**(Suppl) :R1 - R4 .
- [12] Komatsu H, Kitajima A, Okada S. Pharmaceutical characterization of commercially available intravenous fat emulsions :estimation of average particle size , size distribution and surface potential using photon correlation spectroscopy [J]. *Chem Pharm Bull* , 1995 ,**43**(8) :1412 - 1415 .
- [13] Levy MY, Schutze W, Fuhrer C, *et al* . Characterization of diazepam submicron emulsion interface : role of oleic acid [J]. *J Microencapsulation* , 1994 ,**11**(1) :79 - 92 .
- [14] Takamura A, Ishii F, Noro S, *et al* . Study of intravenous hyperalimentation: effect of selected amino acids on the stability of intravenous fat emulsions [J]. *J Pharm Sci* , 1984 ,**73**(1) :91 - 94 .
- [15] Schwarz C, Mehnert W. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. II. Drug incorporation and physicochemical characterization [J]. *J Microencapsulation* , 1999 ,**16**(2) :205 - 213 .