

文章编号: 1006-2858(2010)05-0335-04

PSS 激光粒度仪考察长春西汀固体脂质纳米粒的性质

刘少彬, 胡海洋, 赵秀丽, 乔明曦, 王文宇, 陈大为
(沈阳药科大学 药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: 目的 制备长春西汀固体脂质纳米粒, 为长春西汀新型给药系统的开发与应用提供实验基础。方法 以长春西汀为模型药物、山嵛酸甘油酯为载体材料, 采用热熔超声法制备长春西汀固体脂质纳米粒, 并通过正交试验设计对方剂进行优化。以包封率为评价指标, 对其形态、体外释放度、短期稳定性等性质进行了考察。结果 制备的纳米粒为球形及类球形, 粒径为 15213 nm, 包封率为 9316%, 72 h 体外累积释放 7118%, 4 e 下放置 2 个月稳定。结论 热熔超声法可用于制备长春西汀固体脂质纳米粒, 该纳米粒具有明显的缓释特征, 可进一步进行体内释药行为的考察。

关键词: 长春西汀; 固体脂质纳米粒; 热熔超声法; 理化性质

中图分类号: R 94 文献标志码: A

长春西汀 (vinpocetine) 是从夹竹桃科小曼长春花中提取的一种吲哚类生物碱, 为脑循环代谢改善剂。该药已用于心、脑血管疾病的治疗, 不仅可防治动脉硬化症和脑出血后遗症, 还具有抗衰老、改善老年患者听觉和视觉功能的作用, 具有广泛的应用前景^[1-2]。固体脂质纳米粒是以生理相容的高熔点脂质为骨架材料制成的纳米粒。其在室温下呈固体, 所以既具备聚合物纳米粒的物理稳定性高、药物泄漏少的优势, 又兼具脂质体、乳剂毒性低, 能大规模生产的优点, 是一种极具发展潜力的新型给药系统^[3-5]。作者以长春西汀为模型药物、山嵛酸甘油酯为载体材料, 采用热熔超声法制备固体脂质纳米粒, 并对其理化性质进行研究。与现有长春西汀注射剂相比, 可缓慢释放药物, 减少给药次数、降低毒性及不良反应, 为长春西汀新型给药系统的开发与应用提供实验基础。

1 仪器与材料

LC-10AD 高效液相色谱仪、SPD-10A 紫外检测器 (日本岛津株式会社), FA 1104 电子天平 (上海民桥精密仪器科技有限公司), DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器 (河南巩义英峪予华仪器厂), DL-180 超声波清洗机 (浙江象山石浦海天电子仪器厂), SHB-0 循环水式多用真空泵 (郑州长城科工贸有限公司), JY 92-2D 超声波细胞粉碎机

(宁波新芝科器研究所), PSS 激光粒度仪 (上海惠翼代理), M-1200EX 透射电镜 (日本电子公司)。

长春西汀对照品 (含量质量分数大于 991%, 东北制药总厂), 注射用长春西汀 (安徽威尔曼制药有限公司, 批号 0808019), 长春西汀固体脂质纳米粒 (vinpocetine solid lipid nanoparticles V N-SLN, 自制), 注射用大豆卵磷脂 (soybean lecithin 上海太伟药业有限公司), 泊洛沙姆 188 (Fluonics F-68 德国 Basf 公司), Tween-80 (天津科密欧化学试剂开发中心), 山嵛酸甘油酯 (Compritol 888 ATO, 上海卡乐康公司), 无水乙醇、四氢呋喃、碳酸铵 (分析纯, 天津博迪化工有限公司), 甲醇 (色谱纯, 天津博迪化工有限公司)。

2 方法与结果

2.1 长春西汀固体脂质纳米粒的制备

采用热熔超声法。称取处方量大豆卵磷脂、泊洛沙姆 188 和 Tween-80 置 20 mL 水中超声分散均匀, 形成水相; 将处方量长春西汀和山嵛酸甘油酯与 3 mL 无水乙醇混合, 形成油相, 在不断搅拌下, 油相置 (85 ± 2) e 熔融并混合均匀。将水相加热到与油相相同温度时注入油相中, 恒温搅拌, 制得初乳。趁热将初乳超声 (600

收稿日期: 2009-05-25

作者简介: 刘少彬 (1982-), 男 (满族), 黑龙江哈尔滨人, 硕士研究生, E-mail liushaobin731@163.com; 陈大为 (1959-), 男 (汉族), 辽宁海城人, 教授, 博士, 主要从事药物新剂型及其载体材料的研究, Tel 024-23986308, E-mail chendaw_e@syphu.edu.cn.

W, 10 min), 冰水浴冷却固化, 0122 Lm 微孔滤膜滤过, 即得。

212 长春西汀固体脂质纳米粒的包封率测定

21211 色谱条件选择

采用 HPLC 法。色谱柱为 Hypersil ODS C₁₈ 色谱柱 (150 mm @ 4.6 mm, 5 Lm), 流动相为甲醇 - 0.1 mol/L 碳酸铵水溶液 (体积比 90:10), 流速为 110 mL/min, 检测波长为 314 nm, 柱温为室温, 进样量 20 μL。

21212 标准曲线绘制

精密称取长春西汀对照品 10 mg 置于 100 mL 容量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度作为对照储备液。分别精密吸取对照储备液 0.1、0.12、0.14、0.18、0.312、0.614 mL 置于 10 mL 容量瓶中, 用甲醇定容配制系列质量浓度的标准溶液。按 21211 条色谱条件进行分析, 记录峰面积, 以长春西汀质量浓度 (Q 为横坐标, 峰面积 (A) 为纵坐标) 绘制标准曲线。标准曲线方程为: $A = 91457 @ 10^4 Q - 11099 @ 10^4$ ($r = 0.9999$)。

21213 包封率测定 将每次制备的全部长春西汀固体脂质纳米粒

置 25 mL 容量瓶中, 用水定容至刻度。取 3 mL 于 50 000 rpm 高速离心 2 h 精密量取上清液 1 mL 置 5 mL 容量瓶中, 用流动相定容至刻度,

进样测定, 得到游离药物峰面积。另精密量取长春西汀固体脂质纳米粒 0.12 mL 置 5 mL 容量瓶中, 取四氢呋喃 1 mL 超声破坏, 流动相定容至刻度, 静置取上清液进样测定, 得到总的药物峰面积。按 21211 条色谱条件进行分析, 测得的峰面积代入 21212 条标准曲线方程计算药物质量浓度。按照公式: 包封率 (EE%) = (总药物量 - 游离药物量) / 总药物量 @ 100%, 计算包封率。

213 长春西汀固体脂质纳米粒的粒径测定

采用 PSS 激光粒度仪 (上海惠翼代理) 测定粒径 (d)。取样品适量, 用注射用水稀释调至仪器显示电信号值约为 300 以测定的累积数据值 (Ch11 Data @ 1 000) 为基准, 分别记录累积数据值达到 1 000 之后的 Gaussian 分布图谱。仪器参数设置如下: 介质折光率 (n = 1.1330), 温度为 25 °C。光源为 He-Ne 激光 (λ = 632.8 nm), 自动选择道宽 (channel width), solid particle 模式, 功率为 75 mW。

214 长春西汀固体脂质纳米粒的正交优化

在单因素实验基础上, 以包封率为评价指标, 选出 4 个主要影响因素即山嵛酸甘油酯用量 (A)、大豆卵磷脂用量 (B)、泊洛沙姆 188 用量 (C) 和 Tween-80 用量 (D) 进行考察。选用 L₉(3⁴) 正交试验优化处方, 结果见表 1、2。

Table 1 Factors and levels of orthogonal design

Level	Factor			
	A m(ATO) /mg	B m(lecithin) /mg	C m(Fluronic F-68) /mg	D m(Tween-80) /mg
1	350	200	100	175
2	400	250	150	200
3	450	300	200	225

Table 2 Results of orthogonal design

No	Level				EE /%
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	891.75
2	1	2	2	2	831.07
3	1	3	3	3	771.53
4	2	1	2	3	521.84
5	2	2	3	1	821.55
6	2	3	1	2	881.29
7	3	1	3	2	671.82
8	3	2	1	3	701.38
9	3	3	2	1	771.56

(to be continued)

Continued table 2

No	Level				EE /%
	A	B	C	D	
\tilde{N}_j	831450	701137	821807	831287	
\tilde{O}_j	741560	781667	711157	791727	
\tilde{O}_j	711920	811127	751967	661917	
R_j	111530	101990	111650	161370	

对正交实验结果进行极差分析可知,各因素对包封率(EE%)的影响顺序是 D>C>A>B,所以得到各因素的优化组合是 D₁C₁A₁B₃。因此,以包封率为评价指标确定的最佳处方为长春西汀 10 mg 山嵛酸甘油酯 350 mg 大豆卵磷脂 300 mg 泊洛沙姆 188 100 mg Tween-80 175 mg 水 20 mL。

215 长春西汀固体脂质纳米粒的重复性考察

根据确定的最优处方及工艺制备 3 批长春西汀固体脂质纳米粒样品,通过测定长春西汀固体脂质纳米粒的粒径和包封率,考察其重复性,结果见表 3。

Table 3 Results of reproducibility of optimization formula (n = 3)

Batch	d /nm	EE /%
1	15213	93168
2	14517	93163
3	16913	95181

结果表明,按最优处方制备的长春西汀固体脂质纳米粒的粒径和包封率变化不大,重复性良好。

216 长春西汀固体脂质纳米粒的形态观察

取最优处方制备的长春西汀固体脂质纳米粒适量,加水稀释,滴加在覆盖碳膜的铜网上,以质量分数 2% 磷钨酸钠负染,在透射电镜下观察纳米粒形态,可见球形及类球形实心粒子,结果见图 1。

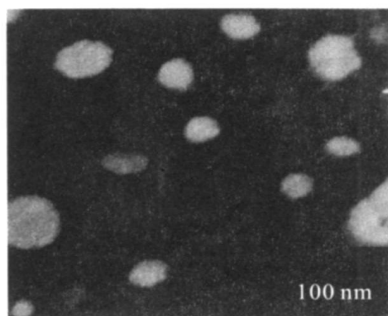


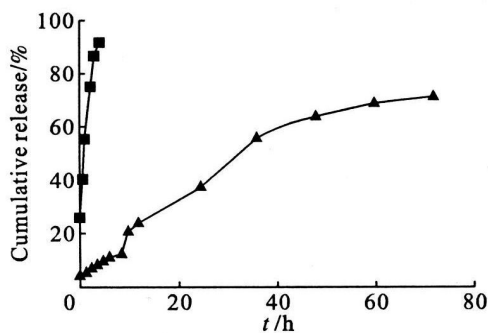
Fig 1 Transmission electron micrographs of VN-SLN

上海惠翼流体设备工程有限公司

Market@nanofluidizer.com TEL: 18516292305

217 长春西汀固体脂质纳米粒体外释放度测定

分别取长春西汀固体脂质纳米粒 2 mL 及等含量的市售长春西汀注射剂,照释放度测定方法(5 中华人民共和国药典 6 2005 版二部附录 XD) 依法操作,采用第一法装置测定释放度。释放介质为 pH 值 7.14 磷酸盐缓冲液(PBS) + 质量分数为 1% 的 Tween-80 释放体积为 100 mL,转速为 50 #m n⁻¹,介质温度为 37 e,平行制备 3 份。定时取样 110 mL,同时补充等体积同温的释放介质。样品用 0.45 Lm 微孔滤膜滤过,取续滤液按 / 212110 条色谱条件进行分析,测得的峰面积代入 / 212120 条标准曲线方程计算长春西汀质量浓度,计算累计释放度,结果见图 2。



w) VN-SLN; u) VN injection

Fig 2 The release profile in pH 7.14 PBS+ 1% Tween-80

218 长春西汀固体脂质纳米粒的稳定性考察

按照最优处方制备长春西汀固体脂质纳米粒并平均分为 2 份,分别置于 4 e 和室温下保存。于 0、0.15、1、2 个月分别取样观察 VN-SLN 外观并测定 pH 值、粒径以及包封率。结果见表 4。

3 讨论

a1 在测定包封率时,分离游离药物的方法常用葡聚糖凝胶柱法、微柱离心法、低温超速离心法、透析法、膜超滤分离法等。作者考察了膜超滤分离法、微柱离心法、低温超速离心法测定 VN-SLN 包封率。结果显示,由于超滤膜对药物的吸附性较大,微柱离心法中脂溶性强的游离药物难

Table 4 Stability of VN-SLN dispersions at 4 °C and room temperature

H _{stab} /e	t/month	Appearance	pH	d/nm	EE/%
4	1	Sam itransparent	61.70	1521.3	931.68
	15	Sam itransparent	61.68	1531.7	951.81
	10	Sam itransparent	61.66	1541.0	931.06
	10	Sam itransparent	61.72	1621.2	921.21
Room temperature	1	Sam itransparent	61.70	1521.3	931.68
	15	Sam itransparent	61.71	1631.5	911.99
	10	Sam itransparent	61.69	1681.0	891.43
	10	C ludy	61.67	2491.0	701.38

以洗脱及重现性较差,导致膜超滤分离法和微柱离心法不能作为测定 VN-SLN 包封率的方法。而低温超速离心法测定 VN-SLN 包封率的重现性良好,最终确定采用低温超速离心法测定 VN-SLN 包封率。

b1 常用的经典乳化剂,如泊洛沙姆系列、聚山梨醇酯系列、豆磷脂、去氢胆酸钠等都可以用来稳定固体脂质纳米粒。根据文献 [6] 报道,乳化剂的联合使用更有利于固体脂质纳米粒的稳定。作者拟将长春西汀固体脂质纳米粒制成注射剂型,所以选用了适合静脉注射的大豆卵磷脂和泊洛沙姆 188 作为复合乳化剂联合使用,后来又发现 Tween-80 可有效降低粒径,而在纳米制剂中粒径的控制至关重要。经实验,以豆磷脂、泊洛沙姆 188 和 Tween-80 作为复合乳化剂所制备的 VN-SLN 的粒径范围可控制在 100~200 nm。因此,选择豆磷脂、泊洛沙姆 188 和 Tween-80 联合使用作为 VN-SLN 的复合乳化剂。

c1 市售长春西汀注射剂溶液体外释放 4 h 累积释放 911.23%, 而纳米粒在 pH 值 7.4 磷酸盐缓冲液中体外释放 72 h 累积释放 711.84%, 由此可以说明纳米粒可以延长药物的释放,具有一定缓释作用。

d1 固体脂质纳米粒研究中,纳米粒的稳定性是重要方面。作者将按最优处方制备的 VN-SLN 分别置于 4 °C 和室温下保存,从外观、pH 值、粒径和包封率等方面考察了其短期稳定性。结果显示, VN-SLN 在 4 °C 下保存 2 个月内稳定,而室温放置时稳定性下降,只在 1 个月内保持稳定。

4 结论

采用热熔超声法制备长春西汀固体脂质纳米粒,以包封率为指标,通过正交实验对方进行了优化。制备的纳米粒为球形和类球形,包封率为 931.68%, 平均粒径为 1521.3 nm。72 h 体外释放累积释放率为 711.84%。4 °C 下放置 2 个月稳定,室温放置 1 个月稳定。热熔超声法可用于长春西汀固体脂质纳米粒的制备。

参考文献:

- [1] 韦敏,肖亿. 长春西汀的临床应用进展 [J]. 海峡药学, 2006, 18(2): 119-120
- [2] SZAK#CST, VERES Z, VERECZKEY L. In vitro-in vivo correlation of the pharmacokinetics of vinpocetine [J]. *Pol J Pharmaco*, 2001, 53(6): 623-628
- [3] MBLLER R H, M' DER 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
- [4] 李欣玮,孙立新. 固体脂质纳米粒作为药物载体 [J]. 化学进展, 2007, 19(1): 87-92
- [5] MUHLEN A, SEHWARZ 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
- [6] SEKMANN B, WESTESEN K. Melt-homogenized solid lipid nanoparticles stabilized by the nonionic surfactant tyloxapol I. Preparation and particle size determination [J]. *Pharm Pharmaceutol Lett* 1994, 3(5): 194-197

上海惠翼流体设备工程有限公司

Market@nanofluidizer.com TEL: 18516292305

(下转至第 368 页)

thioamide, which was then directly cyclized with ethyl 2-chloroacetoacetate without separation to give ethyl 2-(4-hydroxyphenyl)-4-methylthiazole-5-carboxylate (2) in one-pot, then 2 was formylated with Duff reaction adopting hexamethylenetetramine in trifluoroacetic acid to give ethyl 2-(3-formyl-4-hydroxyphenyl)-4-methylthiazole-5-carboxylate (3); finally, the target compound was obtained by the treatment of 3 with hydroxylamine hydrochloride and sodium formate in formic acid. Results The key intermediate 4 for the synthesis of febuxostat was synthesized via a four-step procedure in a total yield of 2210% and its structure was confirmed by $^1\text{H-NMR}$ and ESI-MS. Conclusion The improved process does not need column chromatography to purify and the end product is very suitable for industrial preparation.

Key words febuxostat ethyl 2-(3-cyano-4-hydroxyphenyl)-4-methylthiazole-5-carboxylate synthesis

(上接第 338 页)

Preparation of vinpocetine solid lipid nanoparticles and its physico-chemical properties

LU Shao-bin HU Hai-yang ZHAO Xiu-li QIAO Ming-xi WANG Wen-yu CHEN Dawei

(School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016 China)

Abstract Objective To prepare vinpocetine solid lipid nanoparticles (SLN) and provide the basis for the development and application of new drug delivery of VN-SLN. Methods The vinpocetine solid lipid nanoparticles were prepared by melt-emulsification-ultrasound method. The formulation was optimized by the orthogonal design. With the entrapment efficiencies as reference, its morphology, drug release in vitro and short-period stability were investigated. Results The results showed that the nanoparticles were sphere and sphere-like with the mean size of 1521.3 nm and the entrapment efficiencies was 931.68%. During 72 h, the cumulative release was 711.84%. The nanoparticles were stable for 2 months at 4 °C. Conclusions Using the melt-emulsification-ultrasound method, the preparation of vinpocetine solid lipid nanoparticles is highly feasible. VN-SLN is obviously delayed release which shows it can be investigated further in vivo.

Key words vinpocetine solid lipid nanoparticle melt-emulsification-ultrasound method physico-chemical Property

上海惠翼流体设备工程有限公司

Market@nanofluidizer.com TEL: 18516292305