

## - 实验研究 -

## 激光粒度仪制纳米结构脂质载体

杨磊<sup>1</sup>, 史朝晖<sup>2</sup>, 邱立朋<sup>1</sup>, 李琳<sup>1</sup>, 王东凯<sup>1</sup>

(1 沈阳药科大学药学院药剂学系, 沈阳 110016; 2 海南碧凯药物研究所有限公司, 海口 570216)

**[摘要]** 目的: 制备奥扎格雷纳米结构脂质载体(ozagrel-loaded nanostructured lipid carriers, OZ-NLC), 并考察其理化性质及体外释放。方法: 采用熔融-超声乳化法制备 OZ-NLC, 通过正交设计法优化处方与制备工艺, 使用透射电镜(TEM)、美国 PSS 激光粒度仪、差示扫描量热仪(DSC)及 X-射线衍射仪(XRD)考察 OZ-NLC 的理化性质, 通过溶出试验评价其体外释放效果。结果: 所制备的 OZ-NLC 呈球形或类球形; 平均粒径为  $(115 \pm 10)$  nm; Zeta 电位为  $(-37.6 \pm 8.9)$  mV; 平均包封率为  $(61.3 \pm 5.2)\%$ ; XRD 与 DSC 表明药物以无定形形式分散于 OZ-NLC 中。与奥扎格雷混悬液相比, OZ-NLC 的体外溶出量明显提高且具有很好的缓释效果。结论: 熔融-超声乳化法制备的 OZ-NLC 对促进难溶性药物奥扎格雷的口服吸收具有一定的指导价值。

**[关键词]** 奥扎格雷; 纳米结构脂质载体; 熔融-超声乳化法; 体外释放

**[中图分类号]** R943.41; R972.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2012)11-1301-05

## Preparation and in vitro evaluation of ozagrel-loaded nanostructured lipid carriers

YANG Lei<sup>1</sup>, SHI Zhao-hui<sup>2</sup>, QIU Li-peng<sup>1</sup>, LI Lin<sup>1</sup>, WANG Dong-kai<sup>1</sup>

(1 Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 2 Hainan Bikai Medicine Co., Ltd., Haikou 570216, China)

**[Abstract]** Objective: To prepare and characterize ozagrel-loaded nanostructured lipid carriers (OZ-NLC) and evaluate their release quality in vitro. Methods: OZ-NLC was prepared by melt-ultrasonic emulsification and the formulations were optimized by the orthogonal design. The morphology of OZ-NLC was evaluated by the transmission electron microscopy (TEM). The mean size and zeta potential were determined by laser particle size analyzer. Drug release behaviors were investigated using a dialysis method. Results: The morphology of OZ-NLC was spherical or approximately spherical with the mean size of  $(115 \pm 10)$  nm and the zeta potential of  $(-37.6 \pm 8.9)$  mV, respectively. The encapsulation efficiency was  $(61.3 \pm 5.2)\%$ . XRD and DSC showed that ozagrel was encapsulated in OZ-NLC as amorphous. As compared with ozagrel suspension, OZ-NLC significantly improved drug dissolution and enhanced sustained-release behavior. Conclusion: OZ-NLC prepared by melt-ultrasonic emulsification offers a promising delivery system to reach high oral bioavailability for poorly soluble drugs.

**[Key words]** ozagrel; nanostructured lipid carriers; melt-ultrasonic emulsification; in vitro release

奥扎格雷(ozagrel, OZ)是目前上市的第1个血栓素合成酶 A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) 抑制剂。药理学研究表明,

**[作者简介]** 杨磊,男,硕士研究生。联系电话:(024) 23986963, E-mail: yangleisypu@163.com。

**[通讯作者]** 王东凯,男,教授,主要从事药物制剂新剂型及缓控释制剂研究。联系电话:(024) 23986310, E-mail: wangdksy@126.com。

本品能强力抑制 TXA<sub>2</sub> 的活性,从而抑制血小板聚集,同时提高前列环素 PGI<sub>2</sub> 的浓度,扩张血管,增加血流量,有效抑制脑血栓的形成,临床上用于治疗急性血栓性脑梗死及其所伴随的运动障碍和支气管哮喘<sup>[1-3]</sup>。但目前奥扎格雷只有其钠盐注射液上市,直接口服给药时存在严重的肝脏首过效应,生物利



用度低,极大限制了其临床应用。

纳米结构脂质载体(nanostructured lipid carriers, NLC)是在固体脂质纳米粒(SLN)基础上发展而来的一种新型纳米载体系统,采用2种或2种以上的固-液脂质材料经过加热后冷却而制得。NLC具有良好的生物相容性、长期稳定性等优点,且可避免SLN存在的负载药物泄漏的问题<sup>[3-5]</sup>。本研究采用熔融-超声乳化法制备OZ-NLC,以单硬脂酸甘油酯为固态脂质,中链甘油三酸酯为液体脂质,将药物包裹于类脂核中,提高了OZ的体外释放,为开发奥扎格雷新型给药系统提供实验依据。

## 材料与amp;方法

### 1 仪器与amp;试剂

LC 10AT 高效液相色谱仪(LC 10AT 泵, SPD 10A 紫外检测器,日本岛津公司);JY92 II 超声细胞粉碎机(宁波新芝科器研究所);DSC 60 差热分析仪(日本岛津公司);美国 PSS 激光粒度仪(美国 PSS 公司,上海惠同);TECNAI20 型透射电镜(美国 FEI 公司);超滤器(美国 Pall 公司);透析袋(截留相对分子质量  $M_r$  为 12 000 ~ 14 000,上海绿鸟科技发展有限公司);RCZ 6B 药物溶出度仪(上海黄海药检仪器厂)。

奥扎格雷原料药(沈阳沃森药物研究所,含量 99.5%,批号:20100612)。单硬脂酸甘油酯(GMS,天津市博迪化工有限公司);中链甘油三酸酯(MCT,北京凤礼精求商贸有限责任公司);聚山梨酯-80(Tween-80,天津市博迪化工有限公司);聚氧乙烯(35)蓖麻油(EL-35,德国 BASF 公司);甲醇(色谱纯,天津康科德科技有限公司);纯化水。

### 2 OZ-NLC 的制备

2.1 OZ 在不同介质中平衡溶解度的测定 取过量奥扎格雷原料药置于具塞锥形瓶中,分别加入 100 mL 纯化和 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液,超声至药物不再溶解,放入空气恒温振荡器中,37 °C 下振荡 72 h。将饱和奥扎格雷溶液以 15 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min 后,取上层澄清溶液稀释至适当质量浓度后,20 μL 直接进样测定。另取对照溶液,同法测定,按外标法以峰面积计算。结果 OZ 在水中与缓冲液中的平衡溶解度分别为 152.3 和 298.6 mg·L<sup>-1</sup>。

2.2 熔融-超声乳化法制备 OZ-NLC 称取处方量的 EL-35 溶于纯化水中,作为水相;另称取处方量的 GMS, MCT 和 Tween-80, (75 ± 3) °C 加热熔融后加入

OZ, 搅拌溶解作为油相;水相加热至相同的温度,注入油相中,恒温搅拌,制成初乳。趁热将初乳超声,冰水浴冷却,0.45 μm 微孔滤膜过滤即得。

2.3 OZ-NLC 的处方优化 在单因素考察的基础上,筛选出对 OZ-NLC 包封率影响较大的因素,运用正交设计法,按照 L<sub>9</sub>(3<sup>3</sup>) 设计表,以包封率为评价指标对各个处方进行评定。

### 3 OZ-NLC 表征与amp;体外评价

3.1 形态学研究 取 OZ-NLC 混悬液加适量纯化水稀释,滴至铺有碳膜的铜网上,静置 2 min,滤纸吸干混悬液,再滴加质量浓度 2% 的磷钨酸负染 2 min,透射电镜下观察纳米粒形态并拍照。

3.2 粒径分布及 Zeta 电位的测量 将纳米粒混悬液以纯化水适当稀释,用美国 PSS 激光粒度仪测定纳米粒的粒径和 Zeta 电位。

3.3 DSC 对冻干 OZ-NLC 的考察 取 OZ, GMS 与 OZ 的物理混合物,冻干后的纳米粒粉末样品进行差示扫描量热,升温速率为 10 °C·min<sup>-1</sup>,升温范围为 30 ~ 300 °C。

3.4 XRD 对冻干后纳米粒的考察 为了考察纳米粒中药物的分散状态,对药物粉末、物理混合物及冻干后的 OZ-NLC 样品进行了 X-射线衍射分析。

3.5 包封率的测定 取纳米粒混悬液 5 mL 置超滤器中,密闭后氮气加压,弃去初滤液,收集续滤液;另精密量取 OZ-NLC 1 mL 于 50 mL 量瓶中,加乙醇超声后定容,0.45 μm 微孔滤膜过滤,收集续滤液, HPLC 法分别测定这 2 种样品中奥扎格雷的含量,色谱条件为: ODS C<sub>18</sub> 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm, 迪马公司);流动相: 甲醇-0.5% 乙酸溶液(12:88);流速: 1.0 mL·min<sup>-1</sup>;检测波长: 273 nm;温度: 25 °C;进样量: 20 μL,以峰面积定量,计算包封率。

3.6 体外释放试验 采用文献[6]报道的膜透析法测定 OZ 混悬液和 OZ-NLC 的体外释药特性。分别精密移取新制备的 OZ 和 OZ-NLC 混悬液 3 mL,放入透析袋( $M_r$ : 12 000 ~ 14 000)中,将含药透析袋置于 100 mL pH 7.4 磷酸盐缓冲液透析介质中, (37.0 ± 0.5) °C, 100 r·min<sup>-1</sup> 搅拌。分别于 5, 10, 15, 30, 45 min, 1, 1.5, 2, 2.5, 4, 6, 8, 12 h 定时取样 5 mL,立即补加等量同温释放介质,样品用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液 1 mL 加适量的流动相稀释,混合均匀后 HPLC 法测定奥扎格雷的浓度,计算药物释放量。色谱条件同包封率测定。

## 结 果

### 1 正交设计优化处方

脂质材料、乳化剂的种类及用量、制备工艺参数等都会影响 NLC 的质量及稳定性。在单因素考察基础上,确定 GMS 为固体脂质, MCT 为液体脂质, Tween-80 为表面活性剂, EL-35 为乳化剂。选择 GMS 与 MCT 的比(A)、乳化剂浓度(B)、表面活性剂浓度(C)和超声时间(D)为考察因素,进行 4 因素 3 水平 L (3<sup>4</sup>) 正交试验,以包封率(EE)为评价指标,筛选最佳处方。因素水平见表 1,正交试验结果见表 2。

表 1 因素水平表

水平	A	B(w/w) /%	C(w/w) /%	D/min
1	3:2	2	1	2
2	3:4	3	1.5	3
3	4:3	4	2	4

表 2 正交试验结果

编号	A	B	C	D	EE /%
1	1	1	1	1	50
2	1	2	2	2	52
3	1	3	3	3	60
4	2	1	2	3	35
5	2	2	3	1	41
6	2	3	1	2	43
7	3	1	3	2	57
8	3	2	1	3	46
9	3	3	2	1	58
K <sub>1</sub>	54.0	47.3	46.3	49.7	—
K <sub>2</sub>	39.7	46.3	48.3	50.7	—
K <sub>3</sub>	53.7	53.7	52.7	47.0	—
R	14.3	7.3	6.3	3.7	—

由表 2 可知,各因素对包封率的影响顺序是 A > B > C > D,其中各因素水平分析结果为 A: 1 > 3 > 2; B: 3 > 1 > 2; C: 3 > 2 > 1; D: 2 > 1 > 3,所以最佳处方工艺应该为 A<sub>1</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub>D<sub>2</sub>,即 GMS 与 MCT 比为 3:2,乳化剂浓度 4%,表面活性剂浓度 2%,超声时间 2 min。按优化后的处方(药脂比为 1:25)自制 3 批样品,测得平均包封率为 61.3%。

### 2 OZ-NLC 的形态

OZ-NLC 的透射电子显微镜(TEM)照片见图 1。由电镜照片可见 NLC 呈球形或类球形。

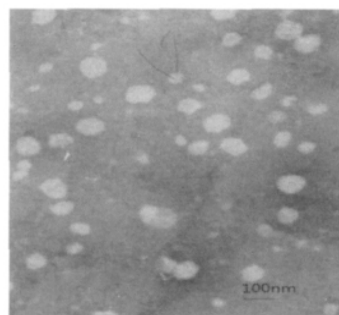


图 1 OZ-NLC 的透射电镜图(×89 000)

### 3 粒径分布及 Zeta 电位的测定

取新制备的 OZ-NLC 混悬液,加水稀释至适当浓度,测定其粒径及 Zeta 电位。结果所制得的纳米粒平均粒径为(115 ± 10) nm,基本呈正态分布,见图 2。Zeta 电位平均值为(-37.6 ± 8.9) mV,表明制备的 OZ-NLC 稳定性良好。

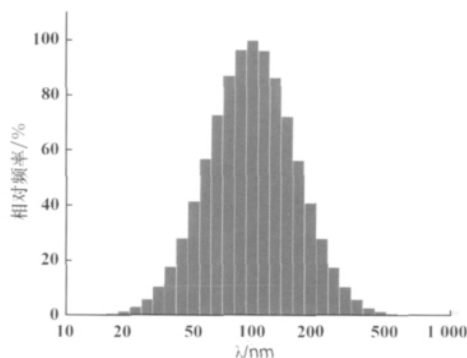
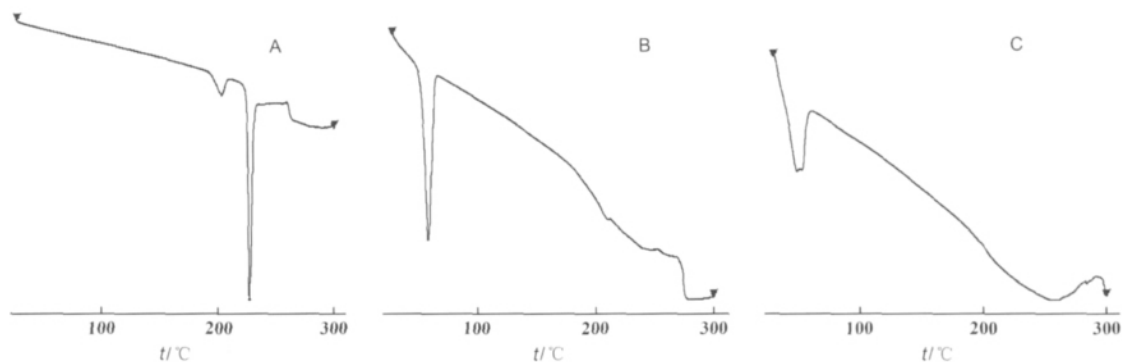


图 2 粒径分布谱图

### 4 药物与载体的相互作用及分散状态

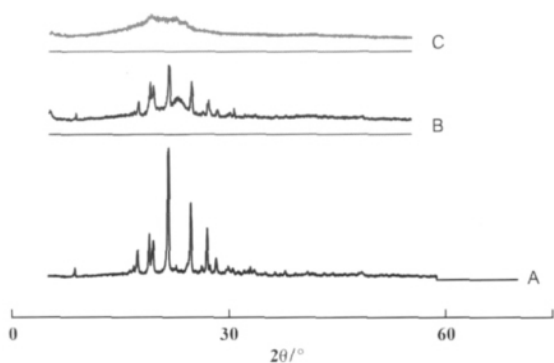
4.1 DSC 分析 OZ, OZ 与 GMS 物理混合物以及 OZ-NLC 三者的 DSC 图见图 3。由图 3 可知, OZ 熔点为 226 °C 左右; GMS 的特征峰在 58 °C 左右; 物理混合物与 OZ-NLC 的 DSC 曲线明显不同。OZ-NLC 仅在 50 °C 左右形成了一个较宽的吸热峰,其他特征峰均消失,说明将奥扎格雷制成 OZ-NLC 后其结晶状态发生了变化,以无定形式分散于载体中。



A: OZ; B: OZ 与 GMS 物理混合物; C: OZ-NLC

图3 DSC 图谱

4.2 XRD 谱图分析 为考察 NLC 中药物的分散状态,对 OZ, GMS 和 OZ 的物理混合物, OZ-NLC 样品分别进行 X-射线粉末衍射分析,结果见图 4。XRD 图谱中,某一物质特征峰位置的改变说明该物质在结晶后其晶形有所变化,峰强度的变化表明结晶度的变化。由图 4 可见, OZ 是以结晶形式存在;物理混合物中 OZ 的特征峰仍存在,但强度有所减弱;而 OZ-NLC 中药物的特征峰消失,说明药物被包裹于 NLC 内并且以无定形状态分散于纳米粒之中。



A: OZ; B: OZ 与 GMS 物理混合物; C: OZ-NLC

图4 X-射线衍射图

### 5 包封率的测定

包封率是评价脂质纳米粒质量的重要指标,测定方法包括超速离心法、透析法、凝胶柱层析法和超滤法等<sup>[7-11]</sup>,本试验采用超滤法测定纳米粒的包封率,计算公式为:  $EE / \% = (W - W_0) / W \times 100$ 。式中, W 为 OZ-NLC 中药物的总量;  $W_0$  为超滤后续滤液中药物的质量。取 3 批自制样品,测得平均包封率为  $(61.3 \pm 5.2) \%$ 。

### 6 体外释放

OZ-NLC 的体外释放曲线见图 5。由图可知, OZ-NLC 在 12 h 的溶出超过 70%,溶出药量明显提高。而且, OZ-NLC 前期释放较快,后期释放缓慢,相比 OZ 原料药具有明显的缓释效应。

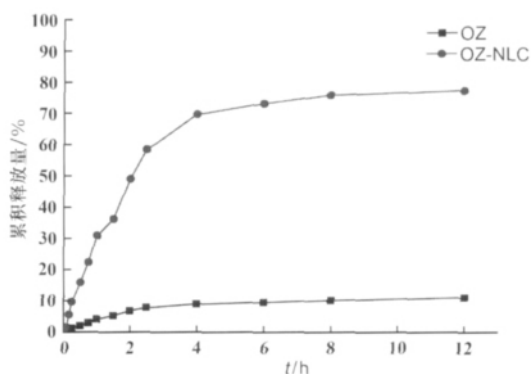


图5 OZ-NLC 与 OZ 的释放曲线

### 讨 论

奥扎格雷在水中溶解度极低,口服存在较严重的肝脏首过效应是限制其临床应用的主要原因。本研究采用熔融-超声乳化法将其制成 OZ-NLC,提高了其体外释放,且 OZ-NLC 释药特点是前期快速释放,后期缓慢释药,具有明显的缓释效果。OZ-NLC 体外释放显著提高的原因可能有两个方面: ① 降低粒径增大比表面积。从药理学来说,药物的溶出速率与药物颗粒的比表面积成正比,而比表面积与粒径成反比。因此,药物的粒径越小,其比表面积越大,接触周围介质的面积愈大,越有助于药物有效成分的溶出。OZ-NLC 粒径为 100 nm 左右,降低粒径

