

研究论文

脂质组成对硫辛酸脂质纳米粒的制备及其稳定性的影响

邹爱华¹ 郑 锴¹ 夏 强^{2,3} 叶汝强¹ 牟伯中^{1*}⁽¹⁾ 华东理工大学应用化学研究所 上海 200237; ⁽²⁾ 东南大学生物科学与医学工程学院 南京 210096;⁽³⁾ 东南大学苏州市生物医用材料与技术重点实验室 苏州 215123)

摘 要 采用高压均质法制备硫辛酸(ALA)脂质纳米粒(ALA-NLC),确定了负载 ALA 的最佳体系。通过高效液相色谱、动态光散射、流变等测试研究了脂质成分、含量对 ALA 负载、ALA-NLC 稳定性和分散液流变性质的影响,并用原子力显微镜观察了 ALA-NLC 的形貌。结果表明,脂质/ALA 质量比在 4.5:1~6:1 之间,得到的脂质纳米粒分散均匀,颗粒规则;脂质中液态油脂的增加有利于保持 ALA-NLC 的粒径,储存稳定性和分散液的低粘度,并得到两个有望用于食品工业的 ALA-NLC 配方。

关键词 脂质纳米粒 硫辛酸 脂质 高压均质

Effect of Lipid Matrix on the Preparation and Stability of α -Lipoic Acid Loaded Nanostructured Lipid Carriers

Zou Aihua¹, Zheng Kai¹, Xia Qiang^{2,3}, Ye Ruqiang¹, Mu Bozhong^{1*}⁽¹⁾ Institute of Applied Chemistry, East China University of Science and Technology, Shanghai, 200237;⁽²⁾ School of Biological Science & Medical Engineering, Southeast University, Nanjing, 210096;⁽³⁾ Suzhou Key Laboratory of Biomedical Materials and Technology, Southeast University, Suzhou, 215123)

Abstract Nanostructured lipid carriers of α -lipoic acid (ALA-NLC) were prepared by high pressure homogenization method. High efficiency liquid chromatography, dynamic light-scattering, rheological measurements were used to determine the lipid matrix effect on the load of ALA, stability of ALA-NLC and rheological property of ALA-NLC dispersions. The morphology of ALA-NLC was observed by AFM. The results showed that the ALA-NLC was the regular nanoparticle when the weight ratio of lipid matrix/ALA ranged between 4.5:1 and 6:1. Moreover, the increase of liquid lipid in the lipid matrix will lead to the improvement of the ALA load, the stability of NLC, and the lower viscosity of ALA-NLC dispersions. Two formulations for dietary supplement of ALA-NLC were obtained.

Keywords Nanostructured lipid carriers (NLC), α -Lipoic acid (ALA), Lipid matrix, High pressure homogenization (HPH)

硫辛酸(α -lipoic acid, ALA)广泛存在于自然界的原核、真核细胞中^[1],是哺乳动物细胞的必须成分,参与新陈代谢^[2],被誉为“万能抗氧化剂”^[3]。然而,ALA 是脂溶性的,且化学不稳定^[4],使其在医药用品、食品、化妆品生产中作为活性物或功效成分受到很大限制。目前保健品市场上的 ALA 主要被包埋在胶囊及片剂中,虽起到一定保护作用,但因其脂溶性的问题,大部分仍不易被消化吸收,生物利用度不高。

纳米结构脂质载体(Nanostructured Lipid Carrier, NLC)被 Müller 等^[5]称为第二代脂质纳米粒(Lipid nanoparticles)载体系统,具有良好的生物相容性及生物利用度^[6],常被用于药物负载。与第一代固体脂质纳米粒(Solid Lipid Nanoparticles, SLN)一样,都是通过将油/水(O/W)型乳状液中液态脂质替换为固

邹爱华 女,副教授,从事胶体与界面化学研究。* 联系人 Email: bzmu@ecust.edu.cn

科技部国际合作重大项目(2008DFB50060)及教育部博士点新教师基金项目(200802511024)资助

2009-11-19 收稿 2010-01-04 接受

态脂质而得到,还克服了 SLN 中活性物泄露等不足。近年来由于技术上的进展,特别是高压均质法在脂质纳米粒制备上的运用,在国外脂质纳米粒已经在化妆品领域得到工业化运用^[7,8]。2005 年,Müller 等^[8]成功制备了硫辛酸固体脂质纳米粒(ALA-SLN),对 ALA 有保护作用,又有利于皮肤吸收,但是,制备得到的 ALA-SLN 粒径较大(大部分在放置 1 个月后超过 1 μm),流变性质研究表明需在胶体或粘稠液体中才较稳定。目前国内外还鲜见有关 ALA 脂质纳米粒在食品应用上的研究报道。笔者利用食品级原料,用高压均质法制备了负载有 ALA 的纳米结构脂质载体(ALA-NLC),并通过高效液相色谱、动态光散射、流变测试研究了脂质的成分、含量及储存时间对 ALA 负载、NLC 稳定及分散液流变性质的影响,并用原子力显微镜观察了 ALA-NLC 的形貌。

1 实验部分

1.1 材料与仪器

硫辛酸(ALA, 99.5(wt%))(常熟富士莱医药化工有限公司),磷酸二氢钾(99.5(wt%))(上海睿腾化工),甲醇、乙腈(色谱纯,上海凌峰化学试剂有限公司);磷酸(分析纯,上海国药集团)。

单硬脂酸甘油酯(GMS)、单月桂酸甘油酯(GML)(河南正通化工有限公司);辛癸酸甘油酯(ODO)(杭州硕亚油脂化工厂);聚甘油脂肪酸酯(Q-12)(上海露露食品配料有限公司);大豆卵磷脂(SPC)(北京美亚斯磷脂技术有限公司)。以上皆为食品级。

苏州微流纳米生物技术有限公司 NanoGenizer 高压均质机;德国 Fluko 高速匀质机;苏州微流纳米生物技术有限公司 Nicomp380 Z3000 纳米粒度仪;日本 Jasco 公司高效液相色谱系统:配有 CO-2060 柱温箱及 UV-2075 紫外检测器;大连依利特 Hypersil ODS2 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);苏州海兹思纳米科技有限公司 Nanofirst-3100 原子力显微镜;美国博力飞 DV-III + 流变仪;上海和泰 Hitech-Kflow RO 反渗透去离子纯水机;上海瑞枫 PURIST 超纯水系统。

1.2 实验方法

1.2.1 高压均质法制备 ALA-NLC 水分散液 把 GMS、GML 和 ODO 按一定比例混合,在 GMS/GML 质量比为 3:1 不变条件下,改变液态油酯 ODO 含量,使其占总脂质含量的 10(wt%)和 40(wt%),分别作为脂质 L1 和 L2(表 1)。聚甘油脂肪酸酯 Q-12 与 SPC 以质量比 9:1 混合作为乳化剂。ALA-NLC 的配方(L1_{mn} 和 L2_{mn})如表 1 所示,剩余部分为去离子水。将 ALA 溶解在 55℃ 熔融的脂质当中,同温条件下倒入混合乳化剂水溶液后,用高速匀质机(12000 r/min)剪切 1 min 制成初乳,再倒入高压均质机料杯中,在 50 MPa 压力下做 3 循环均质。将均质后的高温乳液冷却至室温即为 ALA-NLC 水分散液。

表 1 ALA-NLC (L1_{mn}, L2_{mn}) 配方

Tab. 1 The formulations for ALA-NLC (L1_{mn}, L2_{mn})

配方	脂质	脂质用量 (m/(wt%))	ALA 用量 (n/(wt%))	乳化剂用量/(wt%)
L131	L1	3	1	3
L161	L1	6	1	3
L191	L1	9	1	3
L162	L1	6	2	3
L192	L1	9	2	3
L231	L2	3	1	3
L261	L2	6	1	3
L291	L2	9	1	3
L262	L2	6	2	3
L292	L2	9	2	3

1.2.2 ALA 含量的高效液相色谱(HPLC)测定 色谱条件:采用美国药典(USP30: Alpha-lipoic acid)色谱分析方法,以甲醇/乙腈/0.005 mol/L 磷酸二氢钾水溶液(配比为 1160/920/180,用磷酸水溶液调

pH 至 3.0 ~ 3.1) 为流动相,柱温为 35℃,检测波长为 215nm,进样量 20μL。ALA 及 ALA-NLC 样品皆用乙腈/0.005 mol/L 磷酸二氢钾水溶液(1/1,用磷酸水溶液调 pH 至 3.5 ~ 3.7)标准溶剂溶解。

ALA 标准曲线:分别配制 ALA 浓度为 0.25、0.50、0.75、1.00、1.25 mg/mL 的标准溶液进行进样,以所得峰面积为横坐标,以浓度为纵坐标,绘制 ALA 标准曲线。

样品浓度的测定:精确称取一定质量的 ALA-NLC 分散液,用标准溶液定容后进样,将所得峰面积通过 ALA 标准曲线计算即可求得样品中 ALA 的浓度。

1.2.3 ALA-NLC 的动态光散射(DLS)测定 采用 Nano ZS90 纳米粒度仪,在测试温度 25℃、测试角度 90°和平衡时间 4min 的条件下,测定 ALA-NLC 水分散液的平均粒径及多分散指数(PDI)。

1.2.4 流变分析 采用博力飞 DV-III + 流变仪 SC4-48 号转子,在 25℃ 温度下测定样品表观粘度及剪切率与粘度关系曲线。

1.2.5 原子力显微镜(AFM)测定 取经超纯水稀释后的 ALA-NLC 分散液 2 滴滴至新鲜剥离的云母片上,采用旋涂法制备样品,经真空干燥后进行 AFM 测试,测试模式为轻敲模式。

2 结果与讨论

2.1 脂质对 ALA-NLC 负载的影响

NLC 比 SLN 的优点在于不用单一油脂作为脂质,而是通过固/固或固/液混合的形式克服 SLN 载药量低及在结晶过程药物泄露等不足。本文在固定乳化剂含量不变的条件下,采用在熔融条件(或高于脂质熔点 5 ~ 10℃的制备温度)下能较好溶解 ALA 的 2 种固态油脂以及 1 种液态油脂以一定比例混合作为脂质,通过改变液态油脂含量、脂质/ALA 质量比来达到最佳负载结果并提高样品在储存过程中的稳定性。

2.1.1 ALA-NLC 水分散液中 ALA 含量变化及脂质/ALA 质量比 图 1 为根据美国药典(USP30: Alpha-lipoic acid)方法测定得到的 ALA 的液相色谱图,其保留时间为 6.8min。通过 0.25、0.50、0.75、1.00、1.25mg/mL 的 ALA 标准溶液及相应的 HPLC 的积分面积结果,以积分面积为自变量 x ,以浓度为因变量 y 得到标准曲线方程: $y = 2 \times 10^{-7}x - 0.0221$ ($R^2 = 0.9996$),再通过 HPLC 测得表 1 中所列配方样品所对应的积分面积,计算得到在室温储存 1 天和 1 个月的 ALA-NLC 分散液中 ALA 含量变化(如图 2 所示)。

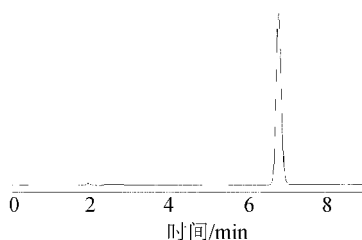


图 1 ALA 液相色谱图

Fig. 1 HPLC measurement for ALA

由图 2 可知,在 ALA 负载不变(1(wt)%)而增加脂质含量(以下皆以 L1 脂质为例,L2 脂质类同)的情况下,1 个月后 ALA 含量 L131 < L161(0.93(wt)%,L261 同),继续增加脂质含量,ALA 的负载只是微弱提高(L191(0.94(wt)%));而且,新鲜制备的 L161 配方 ALA 含量为 0.94(wt)%,1 个月后只降 0.01(wt)%(L191 类同)。因此,适度增加脂质含量有利于 ALA 的负载及稳定。在保持脂质量不变而增加 ALA 的负载的情况下,1 个月后,L162 的 ALA 含量(1.11(wt)%)只是比 L161 略高些,但 L192(1.74(wt)%)近于 L191 的 2 倍,这说明提高 ALA 的负载量需要更大的脂质/ALA 质量比,至少不小于 4.5:1(L192 的脂质/ALA 质量比)。此外,液态油脂含量不同的两组配方(L1mn 和 L2mn)间的 ALA 含量差异都不是很明显,除了 1 个月后 L192 配方 ALA 含量较 L292(1.41(wt)%)大些,对此将在流变测试分析中进一步解释。综合以上分析,脂质/ALA 质量比在 4.5:1 到 6:1 之间有利于 ALA 负载。

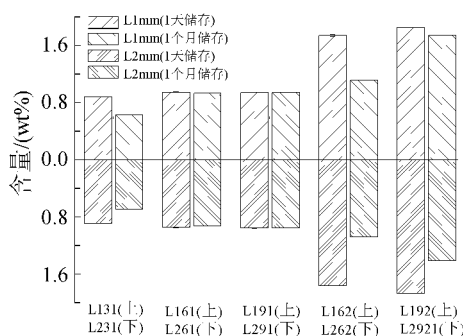


图 2 表 1 中所列 ALA-NLC 样品储存 1 个月的 ALA 含量变化

Fig. 2 The content changes of α -lipoic acid in ALA-NLC samples (Tab. 1) by 1 month storage

2.1.2 ALA-NLC 水分散液的粒径随时间的变化 粒径变化是衡量 NLC 储存时间稳定性的重要参数之一^[9]。一般,随着储存时间的增加,粒径会增加,越稳定的配方,粒径变化越小。图 3 示出了不同配方样品在储存 1 个月后的平均粒径变化情况。从图 3 可以看出,脂质含量及 ALA 负载量的增加,平均粒径都相应增大。从时间稳定性上看,经过 1 个月的储存,平均粒径变大。这一变化趋势与文献报道的硫辛酸固体脂质纳米粒 (ALA-SLN) 的结果是一致的。Souto 等^[8]对硫辛酸固体脂质纳米粒 (ALA-SLN) 的化妆品配方进行粒径测试表明,在 60℃ 条件下制备的 ALA-SLN 在 20℃ 储存 1 天后的粒径就由原先的 717.5nm 变为 1386.9nm,1 个月后为 1649.0nm。

笔者在实验中还发现,液态油脂 ODO 含量高的脂质 L2 所制备的样品粒径比 L1 的要小,平均粒径随时间变化的幅度也较小,稳定性更好些。图 3 中 L192 粒径在 1 个月内从 $433.8 \pm 12.6\text{nm}$ 变化到 $2187.7 \pm 135.6\text{nm}$,而 L292 只是从 $342.7 \pm 11.0\text{nm}$ 变化到 $417.9 \pm 3.5\text{nm}$,这也证实了 Üner^[9]指出的制备样品的粒径大小和稳定性还与所选脂质有关的观点。他指出,胶体颗粒体系的粒径超过 $1\mu\text{m}$ 且随时间不断增加则配方是非物理稳定的。因此,从液态油脂含量不同的两组配方 (L1mn 和 L2mn) 间颗粒粒径变化及差异可知,脂质中液态油脂含量的增加有利于减小样品的颗粒粒径及改善其储存稳定性。

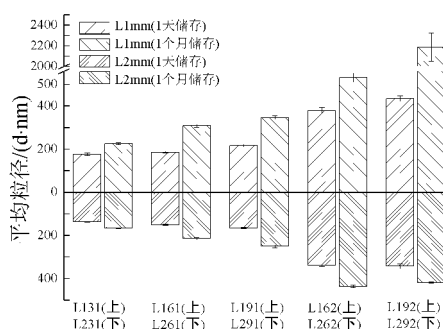


图 3 表 1 中所列样品储存 1 个月的平均粒径变化

Fig. 3 The change of mean particle size for ALA-NLC samples (Tab. 1) by 1 month storage

2.2 ALA-NLC 水分散液的流变性

高压均质制备所得到的新鲜样品 (表 1 中的 10 个配方) 的 ALA-NLC 水分散液表观粘度很低,样品的粘度基本不随剪切速度而变化,如图 4 所示 (其它样品曲线趋势类同于配方 L192 曲线,不再在图中添加,只将表观粘度列于表 2 中),属牛顿型流体。室温储存 1 个月后,大部分样品的表观粘度与储存 1 天无很大差别。然而, L192 样品在储存 1 个月后粘度增大,且随着剪切速率的增大出现稀化现象,由牛顿型流体转变为非牛顿型流体。Müller 等^[10,11]曾用高压均质法制备脂质含量高达 50 (wt)% 或 60 (wt)% 的脂质纳米粒分散液,尽管它们并未形成两亲的膏状结构且颗粒完整,随着脂质含量的增加,纳米粒分散液变稠,有的会形成膏状或固体形式。Souto 等^[12]采用动态振荡频率扫描实验表明,脂质中液态油脂对粘弹性影响显著,而粘弹性参数影响着粒径大小、固态油脂的结晶情况等。样品 L192 粘度

大,对药物泄露有一定的抑制作用,这也解释了 L192 中 ALA 含量比 L292 高的原因;然而脂质中液态油脂较低,结晶较快,粘度变化幅度较大,导致其在储存过程粒径变化幅度也大,颗粒不稳定。进一步比较 L292 可知,在 1 个月内,其粘度、粒径变化很小,样品相对稳定。所以脂质中液态油脂的增加,对样品在储存过程中保持流体粘度稳定有利,进而影响颗粒粒径和储存稳定性。

表 2 表 1 中所列 ALA-NLC 样品储存 1 个月的表现粘度
Tab. 2 The apparent viscosity for the ALA-NLC samples by 1 month storage

表观粘度 (S. D. = ±0.1mPa·s, 剪切速率为 40s ⁻¹)					
配方	L131	L161	L191	L162	L192
1 天储存	2.1	2.4	2.8	2.9	3.6
1 个月储存	2.4	2.6	3.7	3.7	80
配方	L231	L261	L291	L262	L292
1 天储存	2.1	2.1	2.4	3.6	3
1 个月储存	2.4	2.8	3.1	5.6	4

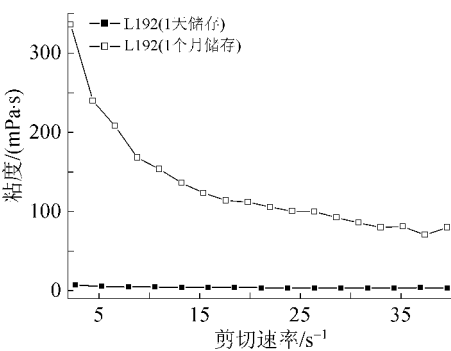


图 4 L192 样品的剪切速率-粘度曲线
Fig. 4 The shear rate-viscosity curves of the sample L192 by 1 month storage

2.3 ALA-NLC 的颗粒分散及 AFM 形貌

动态光散射(DLS)测试表明,表 1 中的 10 个配方经 1 天或 1 个月储存,PDI 值介于 0.03 ~ 0.2,基本都小于 0.3,样品颗粒分散均匀,L192 样品除外(已超过 DLS 测试精度)。就脂质纳米粒而言^[9],其目标粒径大小为 80 ~ 1000 nm,NLC 是兼顾 SLN 目标基础上进行脂质上的改进,所以 L192 配方虽然在负载 ALA 上有优势,但粒径与粘度变化过大,作为脂质纳米粒有待商榷。L292 配方在脂质及乳化剂选择上也有待进一步优化,以提高 ALA 的负载及保护作用。

综合 HPLC、DLS 及流变分析的结果,可以认为在 1 (wt)% ALA 负载上有两个较好配方 L161 和 L261,它们的 AFM 照片如图 5 所示。图 5(a)中一些颗粒的水平直径为 312.5nm,图 5(b)中颗粒的水平直径为 273.4nm,该结果与 DLS 测试的平均粒径分别为 307.8 ± 7.1nm 和 215.1 ± 5.5nm 基本相符。从 PDI 值及图 5 可以看出,高压均质制备的样品颗粒分散均匀,较规则,近于椭圆形。

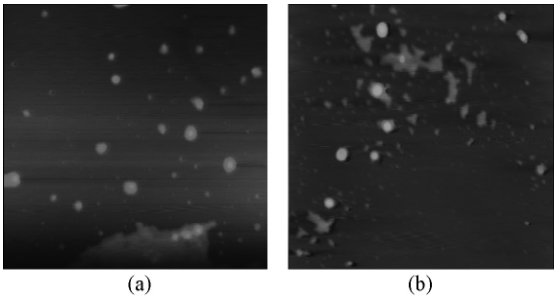


图 5 配方 L161(a)和 L261(b)样品的原子力显微镜照片
Fig. 5 AFM images of sample L161 (a) and L261 (b)

3 结论

通过高压均质法制备硫辛酸脂质纳米粒 (ALA-NLC) 水分散液, DLS 测得多分散指数 PDI 值小于 0.3 (L192 样品除外, 已超过 DLS 测试精度), 表明该制备方法得到的样品颗粒分散较均匀。HPLC 含量测试表明脂质/ALA 质量比在 4.5:1 到 6:1 间较合适。通过 DLS 及流变比较 10 个配方在 1 天和 1 个月的变化表明脂质中液态油脂含量增加有利于保持 ALA-NLC 颗粒粒径、储存稳定性及分散液的低粘度。L161 和 L162 这两个配方 1 个月后仍有 0.93 (wt)% 的 ALA 含量 (新鲜制备的含量为 0.94 (wt)%), 平均粒径分别为 307.8 ± 7.1 nm 和 215.1 ± 5.5 nm, AFM 形貌规则, 近于椭球形, 流体性质接近于水, 性能均优于 Souto 等^[8]报道的化妆品配方的 ALA-SLN (经存储其粒径超过 1 μ m, ALA 负载量较低, 样品在胶状或粘稠体系才稳定), 采用食品原料制备的 L161 和 L162 配方可添加到食品产品中。因此, NLC 是负载 ALA 的良好载体, 可改善其水溶性、提高其稳定性, 为 ALA 在食品等健康产业的运用提供理论基础。

参 考 文 献

- [1] J Fuchs, L Packer, G Zimmer. *Lipoic Acid in Health and Disease*. New York: Marcel Dekker Publications, 1997.
- [2] L Packer, M Hiramatsu, T Yoshikawa. *Antioxidant Food Supplements in Human Health*. San Diego: Academic Press, 1999.
- [3] V E Kagan, A Shvedova, E Serbinova et al. *Biochem. Pharmacol.*, 1992, 44: 1637 ~ 1649.
- [4] A F Wagner, E Walton, G E Boxer et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1956, 78(19): 5079 ~ 5081.
- [5] R H Müller. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2007, 59(6): 375 ~ 376.
- [6] M Radtke, E B Souto, R H Müller. *Pharma. Tech. Eur.*, 2005, 17(4): 45 ~ 50.
- [7] J Pardeike, A Hommoss, R H Müller. *Int. J. Pharm.*, 2009, 366: 170 ~ 184.
- [8] E B Souto, R H Müller, S Gohla. *J. Microencap.*, 2005, 22(6): 581 ~ 592.
- [9] M Üner. *Pharmazie*, 2006, 61: 375 ~ 386.
- [10] R H Müller, M Radtke, S A Wissing. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2002, 54: 131 ~ 155.
- [11] R H Müller, M Radtke, S A Wissing. *Int. J. Pharma.*, 2002, 242: 121 ~ 128.
- [12] E B Souto, S A Wissing, C M Barbosa et al. *J. Cosmet. Sci.*, 2004, 55: 463 ~ 471.