

## 西罗莫司纳米结构脂质载体分散液的制备及其体外释放度考察

吴昊<sup>1,2</sup>, 宋洪涛<sup>2</sup> (1. 福建医科大学福总临床医学院, 福建 福州 350025; 2. 南京军区福州总医院药学科, 福建 福州 350025)

**[摘要]** 目的 优化西罗莫司纳米结构脂质载体 (sirolimus nanostructured lipid carriers, SRL-NLC) 分散液的处方, 并考察其体外释放度。方法 采用星点设计-效应面法 (central composite design-response surface methodology, CCD-RSM) 优化 SRL-NLC 分散液的处方, 并以粒径、分布系数、载药量和包封率作为评价指标, 采用正相透析袋法考察 SRL-NLC 分散液在 0.4% SDS (十二烷基硫酸钠) 溶液中的释放度。结果 经优化的 SRL-NLC 分散液平均粒径 82.54 nm、分布系数 0.207, Zeta 电位 -18.0 mV、载药量 1.829% 和包封率 91.3%, SRL-NLC 分散液在 0.4% SDS 溶液中能持续释放 120 h, 累积释放量为 60.1%。结论 经优化的处方可行性和重现性均较好, SRL-NLC 分散液在 0.4% SDS 溶液中累积释放度为 60.1%。

**[关键词]** 纳米结构脂质载体; 制备; 表征; 正相透析袋法; 体外释放

**[中图分类号]** R927.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2012)03-0189-05

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2012.03.009

## Preparation and *in vitro* releasing of sirolimus-nanostructured lipid carriers dispersion

WU Hao<sup>1,2</sup>, SONG Hong-tao<sup>2</sup> (1. Department of Pharmacy, Fuzhou General Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350025, China; 2. Department of Pharmacy, General Hospital of Nanjing Military Region, Fuzhou 350025, China)

**[Abstract]** **Objective** To optimize the preparation and study *in vitro* releasing of SRL-NLC dispersion. **Methods** Central composite design-response surface methodology was used to optimize dispersion formulation, then *in vitro* releasing in 0.4% SDS (sodium lauryl sulfate) solution was explored by normal phase dialysis bag method. **Results** The optimal dispersion had PS (particle size): 82.54 nm, PI (polydispersity index): 0.207, Zeta potential: -18.0 mV, DL (drug-loading): 1.829%, and EE (entrapment efficiency): 91.3%; SRL-NLC dispersion had a characterization of 60.1% accumulated releasing in 0.4% SDS solution. **Conclusion** The optimal formulation had good feasibility and reproducibility, *in vitro* releasing curve showed SRL-NLC dispersion had a characterization of 60.1% accumulated releasing in 0.4% SDS solution.

**[Key words]** NLC; preparation; characterization; normal phase dialysis bag method; *in vitro* releasing

西罗莫司 (sirolimus, SRL) 是大环内酯类的免疫抑制剂, 临床上用于器官移植抗排斥作用, 美国惠氏公司的西罗莫司纳米结晶片, 口服生物利用度仅为 17%, 由于该药属于药物生物药剂学分类系统 (BCS) II 类药物<sup>[1]</sup>, 即溶解度差 (37 °C 溶解度为 0.572 6 μg/ml), 膜通透性好, 因此限制其口服吸收的主要因素是溶解度。本实验以固态和液态脂质为药物载体制备 NLC, 它是一种平均粒径在纳米级别, 粒径分布窄的载药脂质纳米粒, 口服能提高药物的溶解度和溶出速率<sup>[2]</sup>, 并且脂质载体能增强淋巴转运, 促进药物经淋巴转运途径吸收<sup>[3,4]</sup>, 因此具有改善难溶性药物口服生物利用度的潜质。本实验采

用 CCD-RSM 法筛选最优处方, 并对其体外释放度进行初步研究。

### 1 材料与仪器

**1.1 材料** SRL 对照品 (纯度: 99.9%)、SRL 原料药 (纯度: 99.6%, 批号: 100401) 均由福建科瑞药业有限公司提供, 西罗莫司纳米结晶片 (commercial sirolimus tablet, CST, 美国惠氏公司), 44/14 (Gelucire 44/14, 月桂酸聚乙二醇甘油酯, 法国嘉法赛, 批号 122189), GTCC (crodamol GTCC, 中碳链脂肪酸甘油酯, 英国 Croda, 批号 15013), Tween-80 (聚山梨酯 80, 湖南尔康制药有限公司, 批号 20100402), SDS (十二烷基硫酸钠, 湖南尔康制药有限公司, 批号 20101104), MD34-14 型透析袋 (分子量: 14 000, 美国 Union Carbide 公司)。甲醇, 乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

**[基金项目]** 福建省自然科学基金 (2010J01218)。

**[作者简介]** 吴昊 (1986-), 男, 硕士研究生。Tel: (0591) 22859972, E-mail: woohau123@163.com。

**[通讯作者]** 宋洪涛。Tel: (0591) 22859459, E-mail: sohoto@vip.sohu.com。

**1.2 仪器** Agilent1200 高效液相色谱系统 (UV 检测器, 美国 Agilent 公司), 高压匀质机 (NS1001L2K, 意大利 Niro Soavi 公司), 分析天平 (AL204, 梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司), 集热式磁力搅拌器 (HT-8, 常州国华电器有限公司), 纳米激光粒度测定仪 (NICOMP 380ZLS, 美国 NICOMP 公司)。

**2 方法与结果**

**2.1 含量测定**

**2.1.1 色谱条件<sup>[5]</sup>** Agilent1200 高效液相色谱系统 (UV 检测器, 美国 Agilent 公司), 色谱柱: Eclipse XDB-C<sub>18</sub> (150 mm × 4.6 mm, 5 μm, 美国 Agilent 公司), 以乙腈-甲醇-水 (45 : 34 : 21) 为流动相, 流速为

1 ml/min, 检测波长为 277 nm; 柱温 50 °C; 进样量为 20 μl。理论塔板数为 1 999, 最低检测限 20 ng/ml。

**2.1.2 对照品溶液的配制** 取 SRL 对照品适量, 精密称定, 加甲醇溶解稀释至刻度, 摇匀, 即得对照品溶液。

**2.1.3 供试品溶液的配制** 精密称定供试品置于容量瓶中加入适量甲醇超声处理 15 min, 放冷至室温, 继续加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得供试品溶液。

**2.1.4 方法专属性考察** 按照“2.1.2”项和“2.1.3”项配制 SRL 的对照品溶液, 供试品溶液和空白 NLC 分散液的供试品溶液, 分别进液相。结果表明辅料对 SRL 测定无干扰, 峰形好, 保留时间 6.6 min, 结果见图 1。

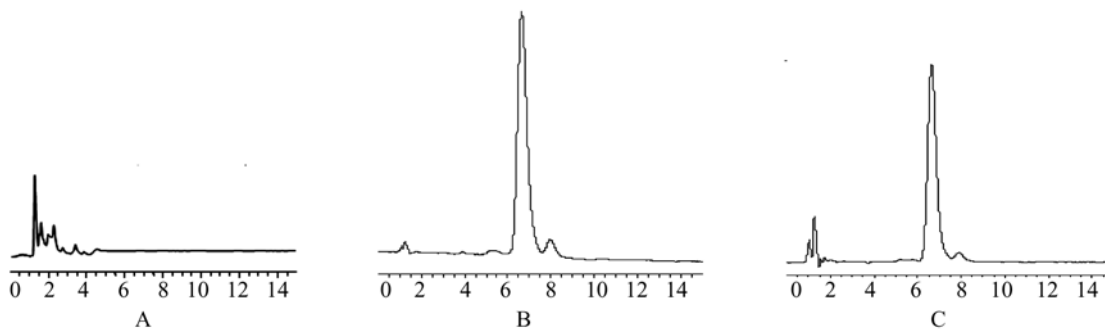


图 1 高效液相色谱图

A-空白 NLC 分散液; B-SRL 对照品溶液; C-SRL-NLC 分散液

**2.1.5 线性范围** 精密称取 SRL 对照品 5.0 mg, 置 50 ml 量瓶中, 加适量甲醇超声溶解, 稀释至刻度, 得浓度为 100 μg/ml 对照品溶液, 分别移取 0.1、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 ml 置 10 ml 容量瓶中, 加甲醇稀释成 1、4、8、12、16、20 μg/ml 的对照品溶液, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液按“2.1.1”项测定, 以浓度 X (μg/ml) 为横坐标, 峰面积 Y 为纵坐标

进行线性回归, 得回归方程  $Y = 52.979X - 9.9533$  ( $r = 0.9999$ ), 说明在 1 ~ 20 μg/ml 浓度范围内 SRL 峰面积与浓度呈良好的线性关系。

**2.1.6 精密度** 配制浓度为 5、10 和 15 μg/ml 样品溶液, 均连续进样 5 次, 计算日内精密度, 以后连续 5 d 测定并计算日间精密度, 结果见表 1, 日内和日间相对标准偏差 RSD 均小于 2%, 精密度良好。

表 1 日内日间精密度测定结果 (n = 3)

项目	浓度 (μg/ml)	编号					平均值 (μg/ml)	RSD (%)
		1	2	3	4	5		
日内	5	4.99	4.97	4.93	4.95	4.90	4.95	0.70
	10	10.1	10.0	10.0	10.0	10.1	10.0	0.55
	15	14.9	15.0	15.1	15.0	15.0	15.0	0.47
日间	5	4.96	4.99	4.94	4.91	4.92	4.94	0.65
	10	10.0	10.0	10.1	10.0	10.1	10.0	0.55
	15	15.1	15.2	15.1	15.1	15.2	15.1	0.36

**2.1.7 加样回收率** 精密移取 100 μg/ml 对照品溶液 0.5、1、1.5 ml 分别到 10 ml 空白 NLC 分散液中进行加样回收率试验, 测得平均加样回收率为 (99.5 ± 0.89)%、(100.0 ± 0.80)%、(100.4 ±

0.46)%。  
**2.1.8 Zeta 电位和平均粒径及其分布系数的测定** 将 SRL-NCL 分散液用蒸馏水稀释为载体含量约 1% 的溶液, 用纳米激光粒度仪测定 Zeta 电位,

平均粒径及其分布系数。

**2.1.9 载药量和包封率** 采用 Sephadex G50 凝胶柱(15 mm × 70 mm)测定 NLC 分散液的载药量和包封率,均匀上样体积 V(ml)的 NLC 分散液,用流速为 1.0 ml/min 的蒸馏水洗脱,1 min 收集一管,并用适量甲醇溶解稀释,超声 15 min 后按照“2.1.1”法测定峰面积,以峰面积-时间做洗脱曲线,如图 2。

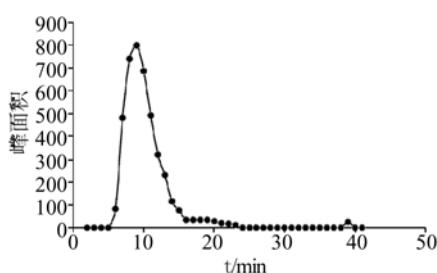


图2 峰面积-时间洗脱曲线

由上图 2 可知,收集 5 ~ 16 min 的洗脱液可计算得体积 V(ml) NLC 分散液的药物包载量  $M_{\text{包载}}$  (g),测定分散液的总密度为  $\rho$  (g/ml),故 NLC 分散液脂质含量  $M_{\text{脂质}}$  (g) =  $0.1\rho V$  (脂质总用量:10%),载药量  $DL(\%) = 10 M_{\text{包载}}/\rho V$ 。测定体积 V(ml) NLC 分散液中 SRL 总浓度 C ( $\mu\text{g/ml}$ ),计算包封率  $EE(\%) = 10^5 M_{\text{包载}}/CV$ 。

**2.2 SRL-NLC 分散液的制备** 称取处方量的固态脂质 44/14 和液态脂质 GTCC 在 75 °C 水浴条件下加热至脂质完全熔融后,加入 SRL 原料药搅拌均匀成澄清油相,再将同温度 Tween-80 的水溶液迅速倒入油相,在 300 r/min,30 min 条件下磁力搅拌制备初乳,经高压匀质机 90MPa 乳匀 5 次,最后于 4 °C 下冷藏得 SRL-NLC 分散液。同法不加药制得空白 NLC 分散液。

**2.3 处方优化**

**2.3.1 星点设计** 根据单因素考察试验结果,已经确定处方中固体脂质:44/14,液体脂质:GTCC,脂质总用量为 10%,工艺条件:300 r/min,30 min 磁力搅拌,高压匀质机 90 MPa 乳匀 5 次。由于固液脂质比例,投药量和乳化剂用量对粒径及其分布系数,载药量和包封率的影响显著,且这三个因素确定,处方组成就基本确定,因此,以固液脂质比 ( $X_1$ ),投药量 ( $X_2$ ),乳化剂 ( $X_3$ ) 作为自变量,平均粒径 ( $Y_1$ ),粒径分布 ( $Y_2$ ),载药量 ( $Y_3$ ) 和包封率 ( $Y_4$ ) 为因变量,采用三因素五水平的星点设计进行处方优化,因素的极大值和极小值已由单因素试验结果确定,其代码和水平设计见表 2,按照星点设计安排 20 个试验,每个样品做 3 次,结果见表 3。

表 2 各因素水平代码及试验操作值

因素	水平				
	-1.732	-1	0	1	1.732
$X_1$	1.328	2	3	4	4.682
$X_2$	0.22	0.2	0.3	0.4	0.38
$X_3$	0.03	0.05	0.075	0.1	0.12

表 3 试验设计及各指标测定结果 (n=3)

Run	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$Y_1$ (PS)	$Y_2$ (PI)	$Y_3$ (DL)	$Y_4$ (EE)
1	4	0.2	0.1	79.2	0.407	1.34	66.8
2	3	0.3	0.075	108.9	0.548	2.88	95.8
3	3	0.3	0.075	110.6	0.472	2.3	76.1
4	4.682	0.3	0.075	126.8	0.621	2.16	71.7
5	3	0.22	0.075	71.5	0.212	1.09	84.3
6	3	0.3	0.075	105.5	0.486	1.8	60.4
7	2	0.4	0.05	92.5	0.36	1.51	37.7
8	3	0.3	0.075	114.8	0.543	1.8	59.4
9	3	0.38	0.075	98.3	0.489	1.7	36.2
10	3	0.3	0.075	108.9	0.548	2.88	95.8
11	4	0.4	0.05	68.2	0.253	1.4	35.2
12	2	0.2	0.1	91.6	0.282	1.75	87.2
13	3	0.3	0.12	101.1	0.607	2.2	73.9
14	4	0.4	0.1	203.2	0.958	3.1	77.8
15	4	0.2	0.05	85.8	0.428	1.58	78.9
16	2	0.2	0.05	84.9	0.247	1.8	90.1
17	1.328	0.3	0.075	100.7	0.279	1.9	63.1
18	3	0.3	0.03	84.1	0.323	1.57	52.2
19	3	0.3	0.075	108.9	0.548	2.88	95.8
20	2	0.4	0.1	95.3	0.314	1.74	43.6

**2.3.2 模型拟合** 用 Design Expert 8.0.5.0 软件对表 3 中的试验数据进行多元线性和非线性拟合,模型如下:

多元线性方程:  $Y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2$

二次多项式:  $Y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_1 X_2 + b_4 X_1^2 + b_5 X_2^2$

三次多项式:  $Y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_1^2 + b_4 X_2^2 + b_5 X_1 X_2 + b_6 X_1^2 X_2 + b_7 X_1 X_2^2 + b_8 X_1^3 + b_9 X_2^3$

以方程的回归系数 r 最大且 p 最小为原则,结果二次多项式拟合最好,得拟合方程如下:

$Y_1 = 109.48 + 8.49X_1 + 11.92X_2 + 12.19X_3 + 11.89X_1X_2 + 14.86X_1X_3 + 17.21X_2X_3 + 2.26X_1^2 - 7.94X_2^2 - 5.22X_3^2$  ( $r = 0.8931$ ,  $P = 0.0245 < 0.05$ )

$Y_2 = 0.52 + 0.10X_1 + 0.072X_2 + 0.084X_3 + 0.029X_1X_2 + 0.087X_1X_3 + 0.081X_2X_3 - 0.028X_1^2 - 0.063X_2^2 - 0.023X_3^2$  ( $r = 0.9217$ ,  $P = 0.0041 < 0.05$ )

$Y_3 = 1.55 + 0.022X_1 + 0.062X_2 + 0.069X_3 + 0.081X_1X_2 + 0.051X_1X_3 + 0.098X_2X_3 -$

$$0.041X_1^2 - 0.13X_2^2 - 0.061X_3^2 (r=0.8602, P=0.0436 < 0.05)$$

$$Y_4 = 80.48 + 1.07X_1 - 15.35X_2 + 5.13X_3 + 7.91X_1X_2 + 3.44X_1X_3 + 7.94X_2X_3 - 4.20X_1^2 - 6.73X_2^2 - 5.74X_3^2 (r=0.8690, P=0.0341 < 0.05)$$

**2.3.3 效应面优化** 采用 Design Expert 8.0.5.0 软件绘制以上拟合方程的效应面图和等高线,结果如图3至图7。

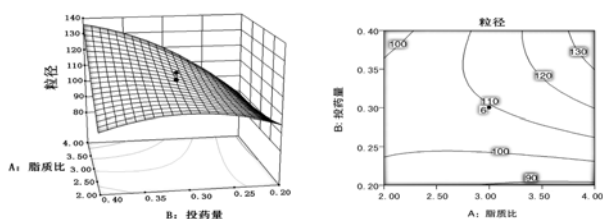


图3 粒径效应面和等高线

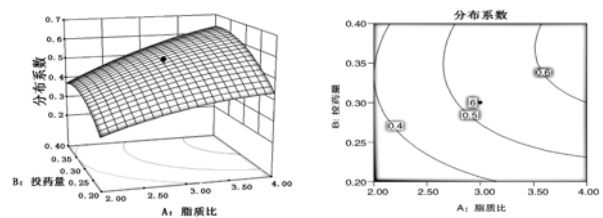


图4 分布系数效应面和等高线

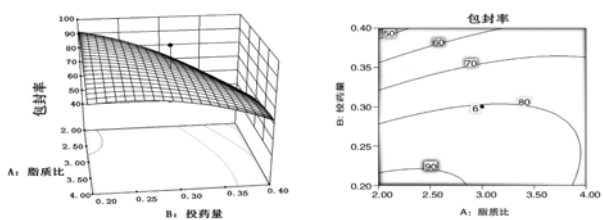


图5 包封率效应面和等高线

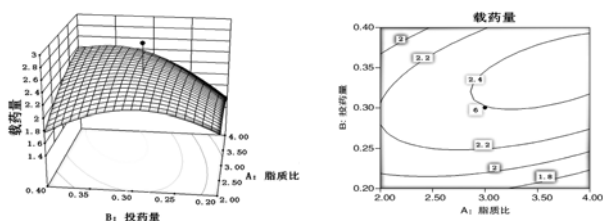


图6 载药量效应面和等高线

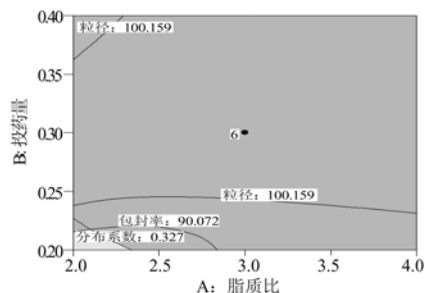


图7 最佳范围等高线

图7左下角的白色部分为最佳范围,经软件筛选最优处方: $X_1 = 2.10, X_2 = 0.21, X_3 = 7.33$ ,按照上述处方制备 SRL-NLC 分散液,比较各指标的预测值和实测值,对模型的预测能力进行验证,结果见表4。

表4 预测值与实测值比较

指标	预测值	实测值	误差(%)
平均粒径 (nm)	90.52	83.20	8.1
分布系数	0.237	0.223	5.91
载药量 (%)	2.037	1.892	7.1
包封率 (%)	90.7	91.0	-0.33

$$\text{误差}(\%) = (\text{预测值} - \text{实测值}) / \text{预测值} \times 100$$

由表4可知,各参数预测值与实测值之间的误差均小于10%,说明建立的模型具有较好的预测能力。

**2.4 最优处方工艺的验证** 按照最优处方: $X_1 = 2.10, X_2 = 0.21, X_3 = 7.33$  制备3批 SRL-NLC 分散液,比较每批间各指标的差异,结果如下表5。

表5 3批 SRL-NLC 分散液指标考察结果 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

批号	粒径 (nm)	分布系数	载药量 (%)	包封率 (%)	Zeta 电位 (mv)
1	83.52 ± 0.24	0.198 ± 0.241	1.860 ± 0.11	90.8 ± 0.15	-17.3 ± 0.35
2	81.60 ± 0.33	0.213 ± 0.224	1.795 ± 0.24	91.8 ± 0.27	-18.9 ± 0.45
3	82.50 ± 0.36	0.210 ± 0.318	1.831 ± 0.15	91.2 ± 0.19	-17.7 ± 0.31
平均值	82.54 ± 0.78	0.207 ± 0.006	1.829 ± 0.03	91.3 ± 0.41	-18.0 ± 0.68
RSD(%)	0.94	2.90	1.64	0.45	3.78

由表5可知,按照最优处方工艺制备的3批样品各指标均较好,且RSD值均小于5%,说明该处方工艺是稳定可靠的。

### 3 体外释放度考察

精密移取 550 μl SRL-NLC(含 SRL 1.0 mg) 分散液和一片 CST 分别置于分子量 14 000 的透析袋中,按照 2010 年版中国药典溶出度测定 XC 第三法,参考已上市西罗莫司纳米结晶片的质量标准,以 0.4% SDS 溶液 250 ml 为溶出介质,转速 100 r/min,

温度(37±0.5)℃条件下进行体外释度试验。分别考察0、0.25、0.5、0.75、1、2、4、6、8、12、24、36、48、60、72、84、96、108、120 h的累积释药度,具体数据见表6。

表6 SRL-NLC分散液和CST的累积释度数据( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

取点时间(h)	累积释度(%)	
	SRL-NLC分散液	CST
0	0	22.7±0.05
0.25	0	57.4±0.09
0.5	0	79.6±0.20
0.75	0	80.1±0.23
1	0	90.2±0.15
2	0	92.6±0.22
4	9.3±1.00	98.1±0.34
6	12.9±9.100	99.2±0.51
8	15.6±10.71	99.2±0.25
12	19.8±12.32	99.2±0.16
24	35.4±13.84	99.2±0.27
36	47.8±9.830	99.1±0.17
48	52.6±7.900	99.2±0.22
60	56.8±14.62	99.2±0.14
72	57.2±13.72	98.9±0.13
84	58.1±18.91	98.8±0.10
96	59.3±17.21	98.9±0.14
108	60.1±14.94	98.7±0.15
120	60.1±18.43	98.6±0.12

以累积释度-时间作累积释放曲线,见图8。

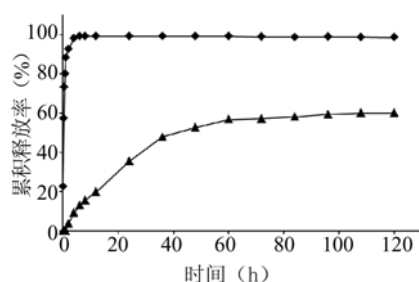


图8 累积释放曲线图

—●—CST;—▲—SRL-NLC分散液

#### 4 讨论

4.1 本考察以固液脂质比、投药量、乳化剂作为自变量,平均粒径,粒径分布,载药量和包封率为因变量,采用三因素五水平的星点设计安排试验,配以效应面法筛选SRL-NLC分散液最优处方,结果最优处方:固液脂质比为2.10,投药量为0.21%,表面活性剂用量为7.33%,且拟合方程均符合多次二项式, $P$ 值均小于0.05,拟合性良好,且预测值与实测值的误差均小于10%,说明建立的模型对粒径及其分布系数,载药量和包封率均

具有较好的预测能力。

4.2 从图4可知,在1 h内,CST的累积释度能达到90.2%,而SRL-NLC分散液在4 h时累积释度为9.3%,且120 h内的累积释放量也较CST低,分析原因是:首先,SRL从NLC中溶出需借助脂质载体的缓慢溶蚀而释放出来,药物释放速率较慢,故SRL-NLC分散液的释放速率较CST慢;其次,溶出的SRL除一部分透析外,还有一部分可能在SDS的作用下再次与脂质形成乳滴,因此SRL-NLC分散液的累积释度较低,仅为60.1%;最后,由于脂质载体经口服后,在刺激淋巴转运的同时也能刺激胆汁和消化酶的分泌,消化酶能分解脂质载体释放出其中的药物,胆汁中胆盐,磷脂等内源性表面活性剂能起到增溶药物的作用,因此与SRL-NLC借助粒径小分布广,比表面积大这种“主动”增溶的作用<sup>[2]</sup>相比,利用脂质消化过程中产生内源性表面活性剂“被动”增溶的作用也是NLC改善难溶性药物溶解度和溶出度的重要机制,这对于提高难溶性药物的“向水性”,增加其口服吸收具有重要意义<sup>[6]</sup>,因此,在0.4% SDS溶液中体外释度度的多少和释放时间的长短并不能完全评价NLC对SRL的增溶能力。CST是将SRL的纳米结晶均匀喷洒在空白乳糖片心上制得,所以漏槽条件是制剂体外释度的决定因素,这与SRL-NLC的体外释药机制不完全相同。SRL-NLC分散液在0.4% SDS溶液中的体外溶出度试验仅是SRL-NLC体外评价方法的一个初步探讨,可为后期建立SRL-NLC固体制剂体外评价方法提供参考和借鉴。

#### 【参考文献】

- [1] 梁文权.生物药剂学与药物动力学[M].第3版.北京:人民教育出版社,2007:50.
- [2] Zhuang CY, Li N, Wang M, et al. Preparation and characterization of vinpocetine loaded nanostructured lipid carriers (NLC) for improved oral bioavailability[J]. Int J Pharm, 2010(394):183.
- [3] Zhang ZW, Bu HH, Gao ZW, et al. The characteristics and mechanism of simvastatin loaded lipid nanoparticles to increase oral bioavailability in rats[J]. Int J Pharm, 2010(394):149.
- [4] Natalie LT, William NC, Christopher JHP. Lipid-based delivery systems and intestinal lymphatic drug transport: A mechanistic update[J]. Adv Drug Deli Rev, 2008(60):712.
- [5] 王娟,张晶,宋洪涛,等.西罗莫司单层高分子渗透泵控释片的制备及其体外释放特性研究[J].中国药房,2010,21(37):3503.
- [6] David JH. Oral lipid-based formulations[J]. Adv Drug Deli Rev, 2007(59):668.

[收稿日期]2012-02-14

[修回日期]2012-03-23