

# 枸橼酸西地那非纳米结构脂质载体的制备及体外释放研究

李泽荣<sup>1</sup>, 吴赵莉<sup>2</sup>, 乔文梅<sup>3</sup>, 唐景玲<sup>2</sup>

1. 深圳市第二人民医院 (深圳大学第一附属医院) (广东深圳 518025)
2. 哈尔滨医科大学药学院 (哈尔滨 150076)
3. 深圳市第三人民医院 (南方科技大学第二附属医院) (广东深圳 518112)

**【摘要】目的** 制备枸橼酸西地那非纳米结构脂质载体 (SC-NLCs), 考察其理化性质, 并评价其体外释放行为。**方法** 采用薄膜超声分散法制备 SC-NLCs, 并对制得的 SC-NLCs 进行理化性质考察; 建立 HPLC 法测定 SC-NLCs 体外释放中枸橼酸西地那非的含量, 利用动态膜透析法对 SC-NLCs 与枸橼酸西地那非溶液的体外释放性能进行考察。**结果** SC-NLCs 在水中分散为乳白色且可见乳光的胶体溶液, 具有良好的分散特征, 透射电镜观察显示 SC-NLCs 外观较为圆整, 分布均匀。平均粒径、包封率、电位、多分散系数分别为 66.96 nm、(69.26 ± 0.73)%、(18.00 ± 4.84) mV 和 0.247。体外释放试验结果显示, 枸橼酸西地那非溶液在 pH 5.5 的磷酸缓冲盐溶液中 4 h 后累积释放的枸橼酸西地那非达 (97.32 ± 3.14)%, 而 SC-NLCs 在 4 h 累积释放的枸橼酸西地那非约 (72.16 ± 2.51)%, 在 24 h 后达到释放平台, 累积释放的枸橼酸西地那非约 (84.29 ± 2.00)%。**结论** 制备的 SC-NLCs 粒径大小均一, 分散均匀; 在体外释放行为方面, 亦具有良好的缓释特性。

**【关键词】** 枸橼酸西地那非; 纳米结构脂质载体; 薄膜超声分散法; 体外释放

## Preparation and *in vitro* release of sildenafil citrate loaded nanostructured lipid carrier

Ze-Rong LI<sup>1</sup>, Zhao-Li WU<sup>2</sup>, Wen-Mei QIAO<sup>3</sup>, Jing-Ling TANG<sup>2</sup>

1. Shenzhen Second People's Hospital (The First Affiliated Hospital of Shenzhen University), Shenzhen 518025, Guangdong Province, China

2. College of Pharmacy, Harbin Medical University, Harbin 150076, China

3. Shenzhen Third People's Hospital (The Second Affiliated Hospital of South University of Science and Technology), Shenzhen 518112, Guangdong Province, China

Corresponding author: Jing -Ling TANG, Email: yaoji636@126.com

**【Abstract】Objective** To prepare sildenafil citrate loaded nanostructured lipid carriers (SC-NLCs), characterize their physical and chemical properties, and evaluate their *in vitro* release. **Methods** SC-NLCs were prepared by thin film ultrasonic dispersion method, and their physical and chemical properties were investigated. The content of sildenafil citrate in SC-NLCs released *in vitro* was determined by HPLC. The release properties of SC-NLCs

DOI: 10.19960/j.issn.1005-0698.202307007

基金项目: 哈尔滨医科大学药学院杰出青年人才基金 (2019-JQ-03); 广东省医院药学研究基金 (澳美基金) (2022A43)

通信作者: 唐景玲, 博士, 教授, 硕士研究生导师, Email: yaoji636@126.com

and sildenafil citrate solution *in vitro* were investigated by dynamic membrane dialysis. Results SC-NLCs were dispersed in water as milky white and visible colloidal solution and had good dispersion characteristics. The transmission electron microscope observation showed that SC-NLCs were relatively round and evenly distributed. The average particle size, encapsulation efficiency, potential and polydispersity coefficient of SC-NLCs were 66.96 nm, (69.26±0.73)%, (18.00±4.84) mV and 0.247, respectively. The results of *in vitro* release test showed that the cumulative release of sildenafil citrate in the sildenafil citrate solution group was reached (97.32±3.14)% after 4 hours in PBS (pH 5.5), while the cumulative release of sildenafil citrate in the SC-NLCs group was about (72.16±2.51)% after 4 hours, then reaching the release platform after 24 hours with the cumulative release of (84.29±2.00)%. Conclusion The prepared SC-NLCs have uniform particle size and uniform dispersion. In terms of *in vitro* release behavior, SC-NLCs also have good sustained-release properties.

**【Keywords】** Sildenafil citrate; Nanostructured lipid carriers; Thin film ultrasonic dispersion method; *In vitro* release

枸橼酸西地那非 (sildenafil citrate, SC) 是被批准用于治疗肺动脉高压的首个磷酸二酯酶-5 抑制剂, 可特异性地活化一氧化氮/环磷酸鸟苷通路而发挥舒张血管作用, 即 SC 主要是通过抑制磷酸二酯酶-5 对一氧化氮/环磷酸鸟苷的降解, 提高局部一氧化氮/环磷酸鸟苷的浓度, 使得肺血管平滑肌舒张<sup>[1]</sup>。磷酸二酯酶-5 主要分布在肺部, 因而磷酸二酯酶-5 抑制剂选择性扩张肺血管, 显著降低平均肺动脉压与肺血管阻力, 可有效治疗肺动脉高压<sup>[2]</sup>。然而, SC 的体内半衰期短 (约 3~4 h), 需要重复给药以维持血浆药物浓度, 对疾病的长期治疗造成不便, 且口服和静脉注射均可能导致一些严重的不良反应, 如静息性低血压、鼻出血、视力突然丧失和阴茎勃起时间延长等<sup>[3-5]</sup>。研究者正在寻找新型长效载体, 以期能够延长 SC 在体内的滞留与作用时间<sup>[6]</sup>。

纳米结构脂质载体 (nanostructured lipid carriers, NLCs) 是用表面活性剂稳定的脂核将药物包裹或使药物附着而构成的纳米递药系统<sup>[7]</sup>。NLCs 的组成包括固、液脂质与表面活性剂, 其中固、液脂质的存在使颗粒的结构为结晶缺陷型或无定形, 此种结构有以下优点: 载药增加、提高包封率、避免药物泄露、控制固液脂质比可增加缓控释效果<sup>[8-9]</sup>。NLCs 的组成生物相容、可生物降解和无毒无刺激, 并且大多数具有美国食品药品监督管理局评价食品添加剂的安全性指标 GRAS 认证<sup>[9]</sup>。所以本研究拟制备 SC-NLCs, 以期提供持续的药物释放, 提高体内的生物利用度, 减少

不良反应。本课题组建立了 NLCs 制剂中 SC 含量的 HPLC 测定法, 考察药物的体外释放行为, 为 SC 的新剂型研究提供理论依据。

## 1 仪器与试药

1260 Infinity 液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); RE-52AA 型旋转蒸发仪 (上海亚荣生化仪器厂); SHB-III 型循环水式多用真空泵 (郑州长城科工贸有限公司); 5430R 型低温超速离心机 (德国 Eppendorf 公司); KQ5200E 型超声波清洗机 (昆山市超声仪器有限公司); Infinite 200 PRO 型多功能酶标仪 (Tecan 集团奥地利有限公司); NanoZS90 型光散射粒径分析仪 (英国 Malven 公司); HZQ-C 型空气浴振荡器 (哈尔滨市东联电子技术开发有限公司)。

枸橼酸西地那非 (上海麦克林生化科技有限公司, 批号: C12190359, 纯度 > 99%); 大豆磷脂 (上海艾伟拓医药科技有限公司, 批号: SY-SO-200801); 单硬脂酸甘油酯 (上海艾研生物科技有限公司, 批号: 20180817); 油酸 (天津市致远化学试剂有限公司, 批号: 2019-042080); 吐温 80 (天津市富宇精细化工有限公司, 批号: 20201008); 乙腈和甲醇为色谱纯, 其余试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 SC-NLCs 的制备

采用薄膜水化法制备 SC-NLCs。称取

50.0 mg SC、20.68 mg 单硬脂酸甘油酯、10.34 mg 油酸和 310.2 mg 大豆磷脂，置于盛有 10 mL 甲醇的 EP 管中加热超声处理（功率调至 25%，超声时间 2 s，间隔时间 5 s），使其成为均匀溶液；转移至茄形瓶中，于适宜温度下旋转蒸发至其形成均匀薄膜层；加入同温度下 10 mL 1.25% 吐温 80 溶液，水化 20 min 使薄膜层与水相充分混合；水化后的混合液体在冰水浴下采用超声细胞破碎仪超声分散 1 min，经 0.45 μm 微孔滤膜过滤，即得 SC-NLCs 混悬液，4℃ 条件下储存备用。

## 2.2 SC-NLCs包封率和载药量的测定

采用超滤离心法分离 SC-NLCs 中游离的 SC。选择截留相对分子质量为 100 kDa 的超滤离心管，吸取 400 μL SC-NLCs 加入超滤离心管的内管中，并组装内外管。采用高速冷冻离心机在 4℃、24 104 × g 条件下离心 40 min 进行游离药物的分离；离心后取 100 μL 滤液稀释后采用 HPLC 法测定游离药物含量；另取等量 SC-NLCs 溶液，加等体积甲醇稀释后进行 HPLC 测定，得到药物总量。计算包封率和载药量：

$$\text{包封率}(\%) = W_{\text{药物}} / W_{\text{总}} \times 100\%$$

$$\text{载药量}(\%) = W_{\text{药物}} / W_{\text{纳米粒}} \times 100\%$$

式中， $W_{\text{药物}}$  为包封药物量， $W_{\text{总}}$  为总的药物量， $W_{\text{纳米粒}}$  为载药 NLCs 的总质量。结果计算得 SC-NLCs 包封率为  $(69.26 \pm 0.73)\%$ ，载药量为  $(6.11 \pm 0.13)\%$ 。

## 2.3 SC-NLCs的形态观察

将 1 滴新鲜制备的 SC-NLCs 溶液滴到覆有支撑膜的铜网上，固定 2~3 min 后，铜网边缘多余的液体用滤纸吸干，用 1% 的磷钨酸液染色 2~3 min 后吸干多余染液，自然干燥。透射电镜下观察制剂的外观形态为类圆状颗粒，粒径小，分散性良好，且无聚集与粘连现象（图 1）。

## 2.4 粒径与Zeta电位

采用 Marlven Nano ZS90 分析仪测定 SC-NLCs 的 Zeta 电位，将样品用一次性注射器的针筒转移至样品池中，直至样品充满样品池。观察样品池中是否无气泡，若无气泡，将样品池插入插槽中，并关上仪器盖子后，即可进行测试。结果得到 SC-NLCs 粒径均值为 66.96 nm，粒径分布见图 2-A；Zeta 电位为  $(18.00 \pm 4.84)$  mV，见图 2-B，多分散系数为 0.247。

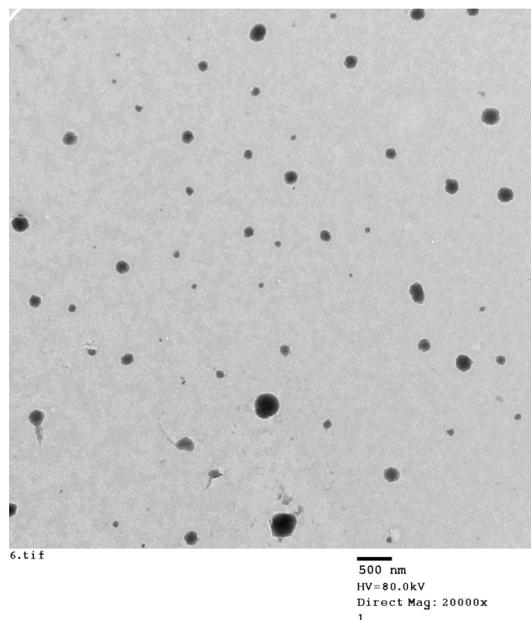


图1 SC-NLCs的透射电镜图

Figure 1. Transmission electron microscopy image of SC-NLCs

## 2.5 SC-NLCs的体外释放性质考察

### 2.5.1 色谱条件

采用 Diamonsil<sup>®</sup> C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱；流动相为 30 mmol · L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钾 [pH (5.2 ± 0.1)]- 乙腈 (62 : 38)；检测波长为 291 nm；进样量为 10 μL；流速为 1.0 mL · min<sup>-1</sup>；柱温为 25℃。

### 2.5.2 溶液的配制

对照品溶液：取约 10 mg SC，精密称定，用 pH 5.5 磷酸盐缓冲液（释放介质）溶解后定容至 50 mL，过滤后即得 SC 标准母液，浓度为 200 μg · mL<sup>-1</sup>，将其存储于 4℃ 条件下备用。

供试品溶液：吸取 SC-NLCs 10 μL，加 pH 5.5 的磷酸缓冲盐溶液（PBS）超声破乳 2~3 min，继续加入 pH 5.5 的 PBS 溶液稀释至 2.5 mL，混匀并过滤，即得体外释放的供试品溶液，将其存储于 4℃ 条件下备用。

空白溶液：取配制的 pH 5.5 的 PBS，过滤即得。

### 2.5.3 专属性试验

取“2.5.2”项下 3 种溶液，稀释至所需浓度并过滤后进样，考察制剂的辅料和介质是否对组分的测定存在干扰。由图 3 可知，空白溶液不干扰 SC 的含量测定，且药物峰型尖锐，表明体外释放研究中 HPLC 方法测定 SC 含量的专属性良好。

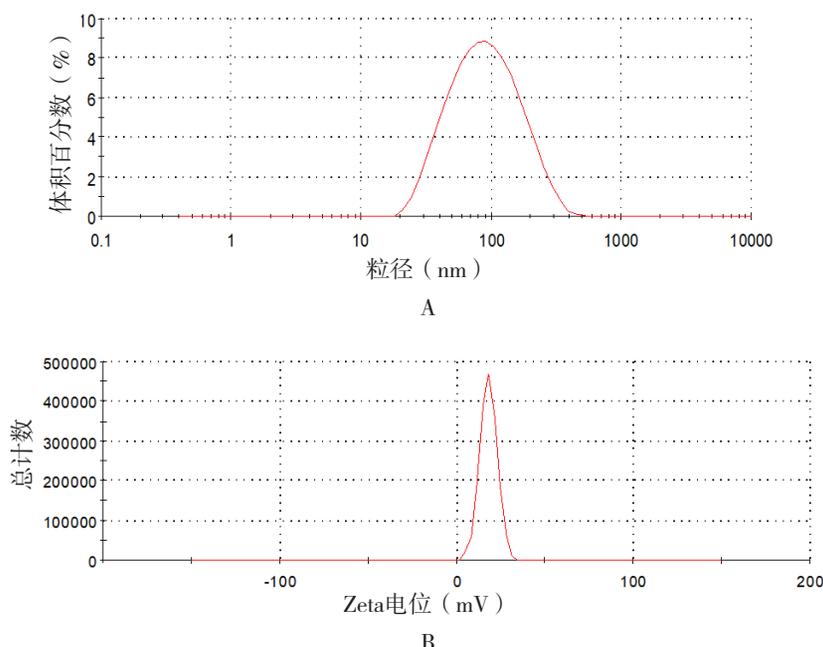


图2 SC-NLCs的粒径 (A) 和Zeta 电位 (B) 分布图

Figure 2. The particle size distribution (A) and Zeta potential distribution (B) of SC-NLCs

#### 2.5.4 线性关系考察

取“2.5.2”项下的对照品溶液，用释放介质稀释成 2.0, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0, 60.0, 80.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  系列溶液，按“2.5.1”项下色谱条件依序进样并记录峰面积，以浓度 ( $C$ ,  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 为横坐标，以峰面积 ( $A$ ) 为纵坐标绘制标准曲线，线性方程为： $A=11.458C-8.9093$ ,  $r=0.9999$ ，结果表明 SC 在 2.0~80.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的浓度范围内，与对应的峰面积呈良好的线性关系。

#### 2.5.5 精密度试验

分别配制浓度为低 (5.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )、中 (20.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 和高 (60.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 的 SC 标准液，HPLC 分析。一天内连续 5 次进样，计算日内精密度；连续进样 5 d，计算日间精密度。结果表明低、中、高药物浓度的 SC 对照品溶液的日内精密度的  $RSD$  分别为 1.06%, 0.96%, 0.30% ( $n=5$ )，日间精密度的  $RSD$  分别为 1.43%, 0.84%, 0.37% ( $n=5$ )，结果表明该方法的精密度良好。

#### 2.5.6 回收率试验

分别吸取适量不同浓度的对照品溶液加入释放液 (pH 5.5 的 PBS) 中，制备浓度为低 (17.50  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )、中 (28.00  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 和高 (35.00  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 的 SC 溶液，过滤后采用 HPLC 分析，计算回收率。结果表明低、中、高药物浓度的 SC 回收率分别为 99.56%, 100.68% 和 98.47%，均在 98%~102% 之间；且低、中、

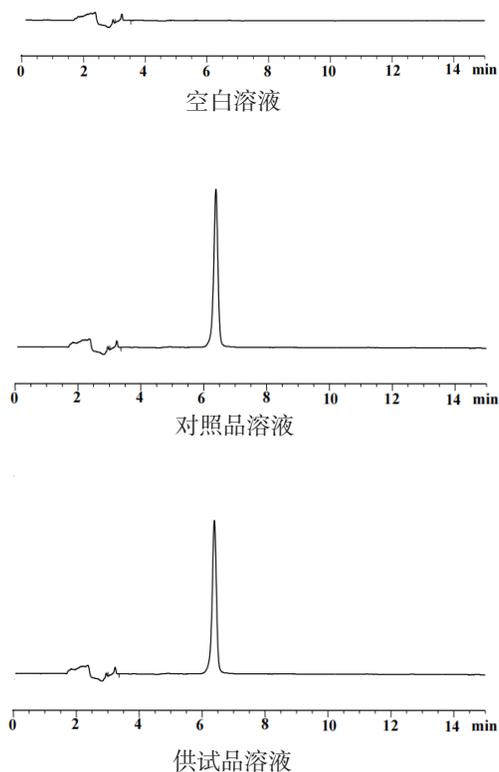


图3 专属性试验HPLC图

Figure 3. HPLC diagram of specificity experiment

高药物浓度回收率的 *RSD* 分别为 1.10%, 0.16% 和 0.44% ( $n=3$ ), 均小于 2%, 表明用于测定 SC 含量的 HPLC 法的准确性良好。

### 2.5.7 稳定性试验

将配制的供试品溶液分别放置 0, 2, 4, 6, 8, 10, 24 h 后取样, 记录峰面积, 结果得到 SC 峰面积的 *RSD* 为 0.53% ( $n=7$ ), 表明 SC 供试品溶液在室温下放置 24 h 稳定性良好。

### 2.5.8 SC-NLCs 的体外释放研究方法

采用动态膜透析法进行 SC-NLCs 体外释放试验, 精密量取 1 mL 的 SC-NLCs 溶液移入已预处理好的透析袋 (截留相对分子质量: 8 000~14 000 D) 中, 将透析袋两端用透析夹夹紧, 置于装有 200 mL 释放介质的烧杯中, 将容器口密闭, 并置于恒温空气浴振荡器中 (恒温 37°C、恒速 100 r·min<sup>-1</sup>), 于 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 24, 36, 48 h 分别从释放介质中取透析介质 1 mL, 并及时补充相同体积的释放介质; 取出的

释放介质过 0.45 μm 滤膜后利用 HPLC 测定, 计算不同取样时间点的药物累积释放量 ( $Q_n$ ) 及累积释放百分数 ( $Q\%$ ):

$$Q_n = V_0(C_n + \frac{V}{V_0} \sum_{i=1}^{n-1} C_i) = V_0 C_n + V \sum_{i=1}^{n-1} C_i$$

$$Q\% = \frac{Q_n}{Q_0} \times 100\%$$

式中,  $C_n$  为在  $t$  时刻 SC 的测定浓度,  $C_i$  为  $t$  时刻之前测定的 SC 浓度,  $V_0$  为接受池中加入的溶液体积,  $V$  为取样体积,  $Q_0$  为起始时给药池中药物总量。

SC-NLCs 体外释放的药物累积释放曲线如图 4 所示, SC 溶液在 pH 5.5 的 PBS 中释放 4 h 后达到释放平台, 而 SC-NLCs 则缓慢释放药物, 4 h 累积释放约 (72.16 ± 2.51)%, 而于 2 h 有突释现象, 累积释放 SC 约 (56.11 ± 3.68)%, 可能是由于部分药物吸附在载体表面所致; 在 24 h 后达到释放平台, 累积释放药物约 (84.29 ± 2.00)%, 表明将 SC 包载于 NLCs 中可起到缓慢释放 SC 的作用。

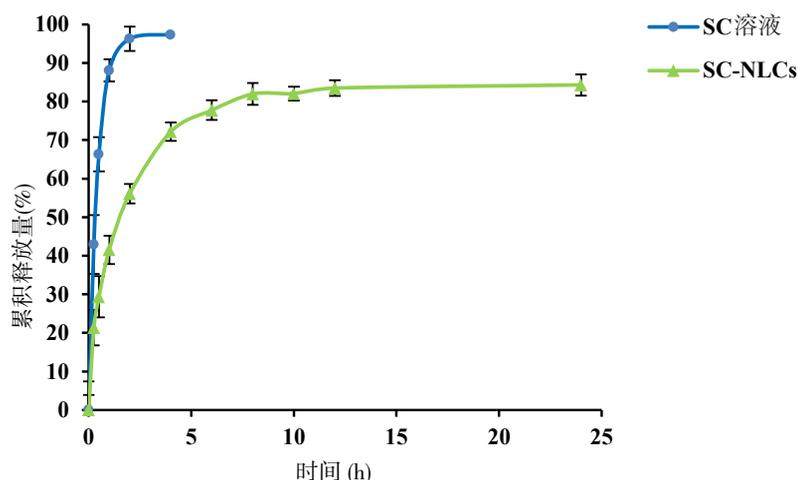


图4 体外释放曲线 ( $n=6$ )

Figure 4. *In vitro* release profiles in PBS (pH 5.5) ( $n=6$ )

## 3 讨论

目前文献<sup>[10]</sup>报道的关于研究 NLCs 的体外释放的方法有透析法、离心法、Franz 扩散池法、流通池法和基于脂解模型的体外释放研究方法等。透析法包括正向和反向两种, 正向利于交换透析膜内外的释放介质, 可避免纳米粒损失和介质 pH 的改变等, 且简单易操作, 透析膜的存在能较好地将游离药物及纳米粒分离; 而反向动态透析法复杂的操作易造成试验误差。离心法中释放介质可与药物充分接触, 不受透析膜的影响,

较适用于测定少量的纳米给药系统中的药物释放度。但对于密度较低的粒子而言, 即使增加一定程度的转速也不能沉积所有粒子, 从而影响下一个时间点的药物释放度测定的准确性, 导致累积释放度也不准确, 并且离心力还可能会造成一些纳米粒原有结构的破坏, 导致纳米粒中药物的释放受到影响。Franz 扩散池法具有成本低、操作简便的特点, 而且取样过程中避免了损失脂质纳米粒, 但由于其搅拌的控制及温度控制效果较难, 导致药物浓度分布不均。流通池法能较好地模拟体内环境, 满足释放漏槽条件, 能自动调节药物

的释放介质,可测定药物的动态释放过程。但其装置操作繁琐复杂,从而限制其在实验室条件下的应用<sup>[11]</sup>。体外脂解模型能模拟生理环境,但需恒 pH 滴定仪控制 pH 来辅助,故而试验成本较高,且试验条件还未标准化。因此本试验采用正向动态透析法考察 SC-NLCs 的体外释放。

本研究使用动态透析法来测量 SC-NLCs 中游离 SC 的体外药物释放行为。由于 SC 在水溶液中的溶解度极低,且由于 SC-NLCs 在 pH 7.4 的 PBS 与模拟肺液中在 12 h 内易出现絮凝状物质,影响体外释放的考察,因此选择 PBS (pH 5.5) 作为接收介质以满足漏槽条件。图 4 显示了 SC 在预定时间间隔 SC-NLCs 和 SC 溶液的释放曲线。SC-NLCs 具有缓慢释放药物的特性,而 SC-NLCs 的药物释放机制可能涉及药物扩散,聚合物基质溶胀以及聚合物侵蚀或降解,预测 SC-NLCs 符合富集药物壳的核-壳模型。

本研究通过薄膜水化法成功制备 SC-NLCs,电镜下形态为类圆形且分散均一,包封率与载药量较高、稳定性良好,且具有一定的缓释作用。

## 参考文献

- 1 Mohamed NA, Abou-Saleh H, Kamen Y, et al. Studies on metal-organic framework (MOF) nanomedicine preparations of sildenafil for the future treatment of pulmonary arterial hypertension[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 4336. DOI: 10.1038/s41598-021-83423-6.
- 2 Nguyen TT, Yi EJ, Hwang KM, et al. Formulation and evaluation of carrier-free dry powder inhaler containing sildenafil[J]. *Drug Deliv Transl Re*, 2019, 9(1): 319-333. DOI: 10.1007/s13346-018-0586-5.
- 3 Shahin H, Vinjamuri BP, Mahmoud AA, et al. Formulation and optimization of sildenafil citrate-loaded PLGA large porous microparticles using spray freeze-drying technique: a factorial design and in-vivo pharmacokinetic study[J]. *Int J Pharm*, 2021, 597: 120320. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2021.120320.
- 4 Rashid J, Patel B, Nozik-Grayck E, et al. Inhaled sildenafil as an alternative to oral sildenafil in the treatment of pulmonary arterial hypertension (PAH)[J]. *J Control Release*, 2017, 250: 96-106. DOI: 10.1016/j.jconrel.2017.02.003.
- 5 Shahin HI, Vinjamuri BP, Mahmoud AA, et al. Design and evaluation of novel inhalable sildenafil citrate spray-dried microparticles for pulmonary arterial hypertension[J]. *J Control Release*, 2019, 302: 126-139. DOI: 10.1016/j.jconrel.2019.03.029.
- 6 Zauner W, Farrow NA, Haines AM. In vitro uptake of polystyrene microspheres: effect of particle size, cell line and cell density[J]. *J Control Release*, 2001, 71(1): 39-51. DOI: 10.1016/s0168-3659(00)00358-8.
- 7 Sharma G, Thakur K, Raza K, et al. Nanostructured lipid carriers: a new paradigm in topical delivery for dermal and transdermal applications[J]. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 2017, 34(4):355-386. DOI: 10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.2017019047.
- 8 Mohammadi M, Pezeshki A, Mesgari AM, et al. Vitamin D<sub>3</sub>-loaded nanostructured lipid carriers as a potential approach for fortifying food beverages; in vitro and in vivo evaluation[J]. *Adv Pharm Bull*, 2017, 7(1): 61-71. DOI: 10.15171/apb.2017.008.
- 9 Weber S, Zimmer A, Pardeike J. Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC) for pulmonary application: a review of the state of the art[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2014, 86(1): 7-22. DOI: 10.1016/j.ejpb.2013.08.013.
- 10 王岚, 刘颖, 冯年平. 脂质纳米粒给药系统体外释放方法研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(18): 350-356. [Wang L, Liu Y, Feng NP. Development of in vitro release methods in lipid nanoparticles drug delivery system[J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2013, 19(18): 350-356.] DOI: 10.11653/syjf2013180350.
- 11 D'Souza SS, DeLuca PP. Methods to assess in vitro drug release from injectable polymeric particulate systems[J]. *Pharm Res*, 2006, 23(3): 460-474. DOI: 10.1007/s11095-005-9397-8.

收稿日期: 2022 年 09 月 07 日 修回日期: 2023 年 02 月 27 日  
本文编辑: 钟巧妮 杨燕