

诺米林固体脂质纳米粒及其冻干工艺研究

陈慧¹ 郝林娜² 杨琼³ 阮仕洋¹ 廖尚高¹ 杨军⁴ 罗喜荣^{1*}

(1. 贵州医科大学药学院, 贵州 贵阳 550025; 2. 黔西南州人民医院药剂科, 贵州 兴义 562400; 3. 习水县回龙镇卫生院, 贵州 遵义 564613; 4. 中国科学院地球化学研究所, 贵州 贵阳 550081)

摘要 目的: 制备诺米林固体脂质纳米粒(NML-SLN)及其冻干粉, 进行体外释药研究。方法: 薄膜超声分散法制备 NML-SLN, 以包封率、载药量、粒径分布为指标, 确定最优处方, 考察各冻干支架剂对其冻干效果的影响, 确定最佳冻干工艺, 绘制诺米林释药曲线。结果: NML-SLN 的最佳制备工艺为: 卵磷脂 50 mg、单硬脂酸甘油酯 25 mg、二氯甲烷 20 mL、2% 泊洛沙姆 188 水溶液 13 mL、超声功率 350 W、超声时间 4 min, 所得 NML-SLN 包封率、载药量及粒径分别为 96.27%、8.73%、189.3 nm, 5% 甘露醇为最佳冻干保护剂, NML-SLN 冻干粉为质地疏松的白色固体, 表面光洁、平整, 复现性良好, 能有效延缓诺米林释放。结论: 该研究制备的 NML-SLN 粒径较小, 载药量、包封率高, 所得 NML-SLN 冻干粉复现性良好, 具有良好的缓控释效果。

关键词 诺米林; 薄膜超声分散法; 固体脂质纳米粒; 冻干粉

中图分类号: R283.6 文献标识码: A 文章编号: 1001-4454(2023)02-0442-05

DOI: 10.13863/j.issn1001-4454.2023.02.030

诺米林(Nomilin, NML)是一种常见的柠檬苦素类化合物, 为中药橘核的主要有效成分, 具有抗炎镇痛、驱虫、抗病毒、抗肿瘤、抗氧化、抑菌及抑制骨裂变等药理作用, 但由于水溶性差、生物利用度低而制约了其药效发挥和临床应用⁽¹⁻⁵⁾。课题组前期研究发现诺米林属于生物药剂学分类系统的 II 类药物, 适合制成口服制剂。固体脂质纳米粒(Solid Lipid Nanoparticles, SLN)系以毒性低、生物相容性好、生物可降解的固态天然或合成的类脂(如卵磷脂、三酰甘油等)为骨架材料, 将药物包裹或夹嵌于类脂核中制成的固体胶粒给药系统, 能延长药物半衰期, 有缓控释作用, 系难溶性药物的新型给药载体。笔者以诺米林为模型药物, 通过薄膜超声分散法制备诺米林固体脂质纳米粒(NML-SLN), 并研究其冻干工艺, 阐明其释药机制, 旨在改善诺米林的溶解度, 为其新药开发提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器 安捷伦 1260 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司); TGL-46G 型高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂); JY92-HIDN 型超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司); Nano ZSE + MPT2 粒度检测仪(英国马尔文公司); Lab-1C-50 真空冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司); JSM-6460LV 扫描电镜(日本 JEOL 公司); Teenai G2 F20 S-Twin 场发射透射电镜(美国 FEI 公司)。

1.2 材料 诺米林对照品(NML 批号: Y06J7C8327),

上海源叶生物科技有限公司; 诺米林原料药, 贵州医科大学天然产物制备实验室; 卵磷脂(批号: 228B021)、泊洛沙姆 188(批号: 416E021)、麦芽糖(批号: 730F064), 北京索莱宝科技有限公司; 单硬脂酸甘油酯(批号: 20111010)、葡萄糖(批号: 20120314)、甘露醇(批号: 20110411), 天津市科密欧化学试剂有限公司; 十二烷基硫酸钠(SDS, 批号: 2BN106100), 北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司; 吐温-80(批号: 20090914), 重庆川东化工(集团)有限公司化学试剂厂; 海藻糖(批号: Y18M9Y61746), 上海源叶生物科技有限公司; 蔗糖(批号: 1202172), 西陇化工股份有限公司; 乙腈为色谱纯; 其他试剂均为分析纯; 水为纯净水。

2 方法与结果

2.1 NML-SLN 与空白 SLN 的制备 采用薄膜超声法, 精密称取适量诺米林 10 mg、卵磷脂 50 mg、单硬脂酸甘油酯 25 mg, 加入二氯甲烷超声溶解, 将二氯甲烷旋转蒸发后, 制得 NML-SLN 脂质薄膜, 加入 2% 泊洛沙姆 188 水溶液 13 mL 与脂质薄膜充分水合, 细胞粉碎机探头 350 W 条件超声 4 min, 即得。同法制备空白固体脂质纳米粒, 4℃保存, 备用。

2.2 诺米林分析方法的建立

2.2.1 色谱条件: WondaSil C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水 = 45: 55; 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 210 nm; 柱温: 30℃; 进样量: 20 μL。

收稿日期: 2022-03-12

基金项目: 贵州省科学技术基金项目[黔科合 J 字(2013)2037]; 贵州省科技计划课题项目[黔科合 SY 字(2015)3032]; 贵州省联合基金项目[黔科合 LH 字(2014)7091]

作者简介: 陈慧(1993-), 女, 硕士, 研究方向: 药物制剂新剂型、新技术及药物代谢动力学研究; Tel: 13017457480 E-mail: 1947532542@qq.com。

* 通讯作者: 罗喜荣 E-mail: 1341323603@qq.com。

2.2.2 对照品溶液的制备:精密称取诺米林对照品 0.0113 g 置 10 mL 量瓶中,加入适量甲醇超声促溶,定容,摇匀,制得诺米林对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备:精密吸取 NML-SLN 胶体溶液 1 mL 于离心管,以石油醚破乳,分离下层沉淀,以 2 mL 甲醇溶解,0.22 μm 滤膜过滤,即得。

2.2.4 专属性试验:结果表明,该条件下 NML 色谱峰与其他色谱峰的分离度符合相关要求,空白 SLN 溶液不影响 NML 的测定。

2.2.5 线性关系考察:取“2.2.2”项下对照品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样检测,记录峰面积。以 NML 峰面积(A)对质量浓度(C)进行回归分析,得回归方程: $A = 8.9054C - 26.7890$ ($r = 0.9999$) 表明 NML 在 4.41 ~ 1 130.0 μg/mL 质量浓度范围内线性关系良好。

2.2.6 精密度试验:取“2.2.3”项下供试品溶液适量,按“2.2.1”项下色谱条件连续进样检测 6 次, NML 峰面积的 RSD 为 0.58% 表明仪器精密度良好。

2.2.7 准确度试验:精密量取已知 NML 含量的供试品溶液,分别加入 NML 标准溶液,按“2.2.1”项

下色谱条件进样,记录峰面积。平均加样回收率为 99.65% (RSD < 2% $n = 3$)。

2.2.8 重复性试验:取 NML-SLN 混悬液 6 份,分别以甲醇超声溶解后进样检测,计算 NML 峰面积的 RSD 为 1.24%,该方法重复性良好。

2.2.9 稳定性试验:取 NML-SLN 混悬液适量,放置于室温,在 0、2、4、8、12、24 h 进样检测, NML 峰面积的 RSD 为 1.99% 样品在 24 h 内稳定性良好。

2.3 质量评价 精密量取 NML-SLN,以石油醚脱脂后离心,分离游离 NML 以甲醇溶解,按“2.2.1”项下色谱条件进样,记录峰面积,并计算游离 NML 含量。

2.4 处方筛选与优化 根据所得处方筛选单因素实验结果,选择卵磷脂用量(A)、单硬脂酸甘油酯用量(B)、泊洛沙姆浓度(C)、泊洛沙姆体积(D)、超声功率(E)、超声时间(F)和二氯甲烷体积(G)为考察因素,采用归一化法,以总评“归一值”(OD)为响应指标($OD = d_{Y_1} \times 0.4 + d_{Y_2} \times 0.3 + d_{Y_3} \times 0.3$, Y_1 为包封率, Y_2 为载药量, Y_3 为粒径)进行处方筛选,试验因素编码及水平见表 1,试验设计与结果见表 2,方差分析结果见表 3。

表 1 因素与水平

水平	A/mg	B/mg	C/%	D/mL	E/W	F/min	G/mL
-1	50	25	2	10	150	4	10
0	62.5	37.5	4	15	250	6	15
1	75	50	6	20	350	8	20

注: A. 卵磷脂用量, B. 单硬脂酸甘油酯用量, C. 泊洛沙姆浓度, D. 泊洛沙姆体积, E. 超声功率, F. 超声时间, G. 二氯甲烷体积

表 2 试验设计与结果

编号	A	B	C	D	E	F	G	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$	Y_3/nm	OD
1	0	1	1	1	1	1	1	44.43	4.16	667.8	0.1831
2	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	35.96	3.52	246.5	0.3979
3	1	0	1	-1	1	-1	-1	67.04	6.28	617.8	0.4295
4	-1	0	-1	1	-1	1	1	49.93	4.70	295.3	0.4881
5	1	-1	0	-1	1	1	1	54.06	5.14	315.4	0.5151
6	-1	1	0	1	-1	-1	-1	75.98	7.13	377.2	0.6721
7	1	1	1	0	-1	1	-1	71.01	6.52	457.8	0.5669
8	-1	-1	-1	0	1	-1	1	99.40	9.48	261.6	0.9707
9	1	-1	-1	1	0	1	-1	23.13	2.33	217.6	0.3000
10	-1	1	1	-1	0	-1	1	46.22	4.52	412.8	0.3830
11	1	1	-1	-1	-1	0	1	62.50	5.93	257.5	0.6309
12	-1	-1	1	1	1	0	-1	51.31	4.99	410.4	0.4310
13	1	1	-1	1	1	-1	0	73.02	6.90	276.9	0.7139
14	-1	-1	1	-1	-1	1	0	90.37	8.68	444.3	0.7681
15	1	-1	1	1	-1	-1	1	31.97	3.08	425.5	0.2392
16	-1	1	-1	-1	1	1	-1	68.50	6.55	223.7	0.7109
17	0	0	0	0	0	0	0	71.59	6.63	317.4	0.6681

注: A. 卵磷脂用量, B. 单硬脂酸甘油酯用量, C. 泊洛沙姆浓度, D. 泊洛沙姆体积, E. 超声功率, F. 超声时间, G. 二氯甲烷体积, Y_1 . 包封率, Y_2 . 载药量, Y_3 . 粒径, OD. 归一值

表 3 OD 回归模型的方差分析

方差来源	自由度	平方和	均方	F	P
模型	8	0.6489	0.0811	17.14	<0.001
A	1	0.0755	0.0755	15.96	0.004
C	1	0.1049	0.1049	22.15	0.002
D	1	0.0466	0.0466	9.85	0.014
E	1	0.0026	0.0026	0.55	0.479
F	1	0.0054	0.0054	1.13	0.318
DD	1	0.0593	0.0593	12.54	0.008
DF	1	0.2144	0.2144	45.30	<0.001
EF	1	0.0933	0.0933	19.72	0.002
误差	8	0.0379	0.0047	$r=0.9721$	
合计	16	0.6868	-	$r_{Ad}=0.9432$	

由表 3 可知,DF、C、EF、A 和 DD 对 NML-SLN 的 OD 影响极显著、D 对 NML-SLN 的 OD 影响显著。应用 Minitab 18 软件响应优化器对方剂及工艺进行处理,得最佳处方及工艺为:卵磷脂用量为 50 mg、单硬脂酸甘油酯用量为 25 mg、2% 泊洛沙姆 188 水溶液体积为 13.33 mL、超声功率为 350 W、超声时间为 4 min、二氯甲烷体积为 20 mL、投药量为 10 mg。为便于操作,将处方及工艺优化为:卵磷脂用量为 50 mg、单硬脂酸甘油酯用量为 25 mg、2% 泊洛沙姆 188 水溶液体积为 13 mL、超声功率为 350 W、超声时间为 4 min、二氯甲烷体积为 20 mL、投药量为 10 mg。

2.5 优化处方验证 按优化处方及工艺平行制备 3 份 NML-SLN,分别考察包封率、载药量及粒径,见表 4,NML-SLN 的包封率、载药量及粒径的实测值与预测值偏差较小,说明本工艺重现性好。

表 4 NML-SLN 优化处方验证($n=3$)

响应指标	预测值	实测值	偏差/%
包封率/%	98.72	96.27	2.48
载药量/%	8.71	8.73	0.23
粒径/nm	185.9	189.3	1.83

2.6 NML-SLN 的表征

2.6.1 粒子形态:肉眼观察 NML-SLN 为乳白色半透明混悬液,无混浊、结块、沉淀、分层现象,色泽均一,晃动可见蓝色乳光。透射电镜观察 NML-SLN 粒子微观形态,显示 NML-SLN 呈球形及类球形,形态较为圆整。

2.6.2 粒径及 Zeta 电位:采用 Nano ZSE + MPT2 粒度检测仪测定 NML-SLN 平均粒径和 Zeta 电位。NML-SLN 的平均粒径为 (189.3 ± 0.3) nm,多分散系数为 0.261 ± 0.015 ,Zeta 电位为 $-(14.9 \pm 0.1)$ mV,见图 1,表明 NML-SLN 的粒径较小、分布较均匀且物理稳定性较好。

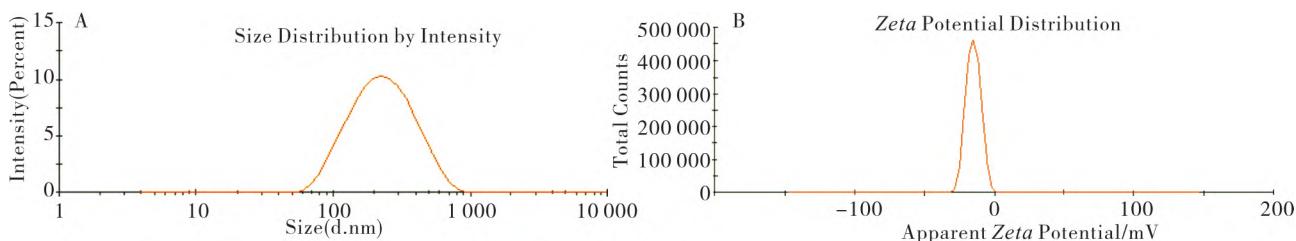


图 1 NML-SLN 的粒径(A)和 Zeta 电位(B)分布图

2.7 NML-SLN 冻干工艺考察

2.7.1 冻干工艺:精密移取 NML-SLN 1 mL,加入冻干保护剂,使完全溶解, -20 °C 冰箱预冻 12 h,转至 -40 °C 以下冻干机冷冻干燥 22 h,对 NML-SLN 冻干粉外观、色泽及再分散性进行综合评分,平行试验 3~5 次取评分均值。

2.7.2 评价指标:外观:NML-SLN 冻干粉可维持 NML-SLN 原液体积不变、冻干表面光洁、不塌陷、不皱缩、可整块脱落但不散碎的 NML-SLN 冻干粉为

佳;色泽:粉体无花斑、整体色泽均匀、质地细腻为佳;再分散性:分别取各 NML-SLN 冻干粉加水 1 mL 振摇 30 s 内可完全溶解且均匀、振摇次数少为佳。各指标优劣程度分四等级,满分 10 分,评分标准见表 5。

2.7.3 冻干支架剂的初筛:预试验通过对 NML-SLN 冻干粉的外观、色泽及再分散性进行综合评分,考察甘露醇、蔗糖、乳糖、麦芽糖、葡萄糖和海藻糖作为冻干支架剂的冻干效果,试验平行 3 次,取评分均

值 确定甘露醇冻干效果最佳,见表 6。考察 1% ~ 15% 的甘露醇作为支架剂的冻干保护效果,确定 3% ~ 7% 甘露醇评分较高,见表 7。

表 5 指标评分标准

评分	外观	色泽	再分散性
0~2	萎缩+++	分层,上下色差明显+++	>90 s
3~5	萎缩++	分层,上下色差明显++	60~90 s
6~8	萎缩+	上下色差不明显	30~60 s
9~10	饱满	均匀,无色差	<30 s

表 6 不同支架剂的冻干保护效果评分

编号	支架剂	外观	色泽	再分散	总分
1	5% 葡萄糖	4	6	9	19
2	5% 蔗糖	5	7	7	19
3	5% 甘露醇	9	9	10	28
4	5% 乳糖	6	7	9	22
5	5% 麦芽糖	5	7	8	20
6	5% 海藻糖	8	8	10	26

表 7 1% ~ 15% 甘露醇的冻干保护效果

编号	甘露醇/%	外观	色泽	再分散	总分
1	1	10	7	9	26
2	3	10	8	9	27
3	5	10	8	10	28
4	7	10	9	10	29
5	10	8	8	10	26
6	15	8	8	5	21

2.7.4 冻干支架剂的优化:以 0.5% 质量浓度为梯度,分别选取 3% ~ 7% 甘露醇为冻干支架剂制备 NML-SLN 冻干粉,评分结果见表 8,结果表明 5% 甘露醇作为冻干支架剂冻干效果最佳。

2.8 NML-SLN 冻干粉质量评价

2.8.1 外观:取适量 NML-SLN 冻干粉用水复溶,其外观为淡蓝色半透明液体,包封率、载药量、粒径皆无明显改变,再分散性良好,结果见表 9、图 2。

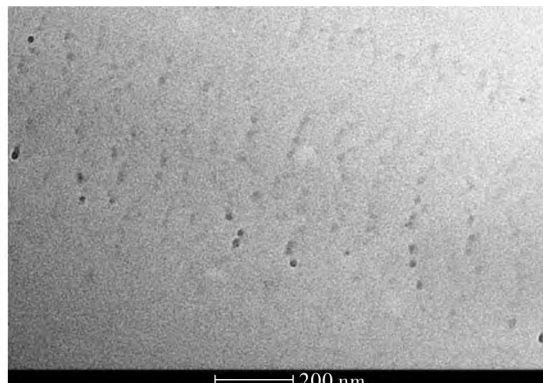
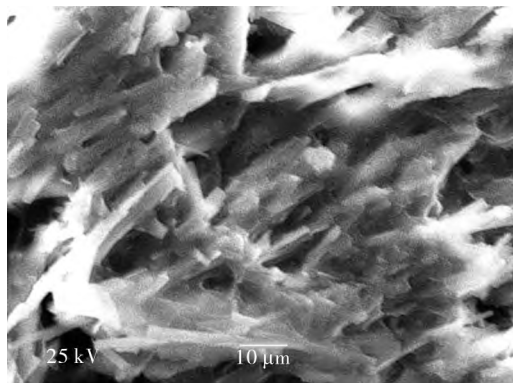


图 3 NML-SLN 冻干粉扫描和透射电镜图

2.9 体外释药 分别将含有诺米林原药 1 mg、NML-SLN(含诺米林原药 1 mg)、NML-SLN 冻干粉

表 8 3% ~ 7% 甘露醇的冻干保护效果

编号	甘露醇/%	外观	色泽	再分散	总分
1	3	9	8	7	24
2	3.5	9	9	8	26
3	4	9	8	9	26
4	4.5	10	8	10	28
5	5	10	9	10	29
6	5.5	9	8	10	27
7	6	9	9	9	27
8	6.5	9	7	9	25
9	7	9	7	8	24

表 9 NML-SLN 冻干粉复溶前后对比

样品名称	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
NML-SLN	98.82	9.18	216.6
NML-SLN 冻干粉	99.28	9.22	235.8



图 2 NML-SLN 冻干粉复溶前后对比

2.8.2 形态: NML-SLN 冻干粉的扫描和透射电镜结果见图 3,扫描电镜结果显示 NML-SLN 冻干粉为针状晶体,呈层状叠加的空间网状结构,较为紧密,未见诺米林结晶;透射电镜结果显示在 NML-SLN 冻干粉水分散体中,NML-SLN 被嵌于甘露醇中,粒径细小,分布广泛,表明甘露醇对 NML-SLN 有良好的保护作用。

(含诺米林原药 1 mg) 的透析袋置烧杯,分别加入 250 mL 经超声脱气的人工胃液、人工肠液,袋上沿

距液面约 1 cm,以 1 000 r/min 的速度搅拌,在 37 ± 1 °C 条件下动态透析,在不同时间点取样 2 mL 溶液进行测定,每次取液后应及时补充等体积释药介质。累计释放百分率 $Q = C_t/C_0 \times 100\%$ (C_t 为释放药物量; C_0 为初始药物量),以时间 (t) 对累计释放百分率 (Q) 进行拟合,得累计释药曲线,见图 4。

将所得数据以零级动力学、一级动力学、Higuchi、Weibull、Ritger-peppas 模型进行拟合,相关系数 r 越接近 1 模型拟合效果越好,见表 10。

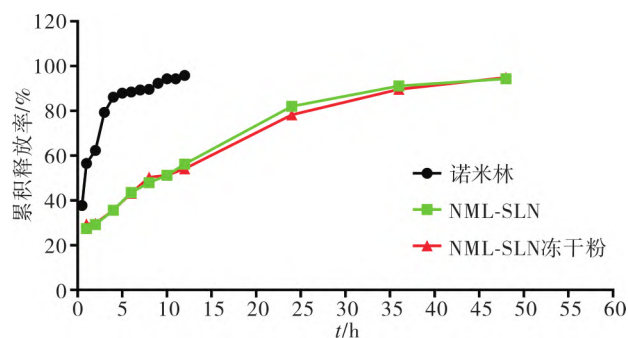


图 4 累计释药曲线

表 10 体外释药模型拟合

溶液	释放模型	拟合方程	r
诺米林	零级释放	$Q = 57.4125 + 3.9242 t$	0.8290
	一级释放	$\ln(100 - Q) = 1.4982 + 0.9683 t$	0.9850
	Higuchi	$Q = 7.8484 t^{1/2} + 57.4125$	0.8290
	Weibull	$\ln \ln Q = 1.7094 + 0.6550 \ln t$	0.9858
	Ritger-Peppas	$Q = 56.1622 t^{0.2335}$	0.9522
NML-SLN	零级释放	$Q = 33.5529 + 1.4650 t$	0.9650
	一级释放	$\ln(100 - Q) = 7.7135 - 13.0476 t$	0.9435
	Higuchi	$Q = 2.9244 t^{1/2} + 33.5529$	0.9650
	Weibull	$\ln \ln Q = -4.2357 + 1.1562 \ln t$	0.9966
	Ritger-Peppas	$Q = 22.9168 t^{0.3719}$	0.9894
NM-SLN 冻干粉	零级释放	$Q = 33.1592 + 1.5046 t$	0.9529
	一级释放	$\ln(100 - Q) = 2.7762 - 0.0959 t$	0.9950
	Higuchi	$Q = 3.0093 t^{1/2} + 33.1592$	0.9529
	Weibull	$\ln \ln Q = -4.0220 + 1.3152 \ln t$	0.9981
	Ritger-Peppas	$Q = 22.4470 t^{0.3817}$	0.9885

3 讨论

NML-SLN 的体外释药过程遵循双相动力学释药规律,其释放行为由初始较快的释放和后来的缓慢释放组成,初相为突释期,这可能是由吸附于 SLN 表面或包埋较浅的 NML 通过扩散方式快速释放引起的,后相为缓释期,此阶段被包埋的 NML 难以通过 SLN 微孔扩散。这种释药行为可使药物到达靶位后快速释放达到药效浓度,再缓慢释放剩余药物以维持药效,符合通常用药原则,有利于实现体内药效持久,提高药物治疗指数。

体外释药模型拟合结果表明,NML 原药、NML-SLN 和 NML-SLN 冻干粉的体外释放过程均符合 Weibull 模型,但 Weibull 模型是一个概率分布模型,对释药动力学性质描述不够充分,因此 NML 原药和 NML-SLN 冻干粉释药模型更接近于一级动力学方程,NML-SLN 释药模型更接近于 Ritger-Peppas 方程。Ritger-Peppas 方程中时间 t 的指数 n 分别为 0.2335、0.3719、0.3817,说明各药释药行为均符合 Fickian 扩散机制。

NML 药理作用明确,具有中药 1 类新药研发潜力。本研究通过筛选设计优化 NML-SLN 处方工艺,

优化后 NML-SLN 粒径较小且包封率较高,以 5% 甘露醇为冻干支架剂制备的 NML-SLN 冻干粉再分散性良好,具有明显的缓释作用,可延长药物在体内作用时长,增加药物的生物利用度。

参 考 文 献

- [1] Fan YW, Chen YL, Chen JX *et al.* Inhibition of cytochrome P450 by nomilin and obacunone and potential mechanism in human liver microsomes [J]. *Chinese Herbal Medicines*, 2017, 9(3): 295-298.
- [2] Kimira Y, Taniuchi Y, Nakatani S *et al.* Citrus limonoid nomilin inhibits osteoclastogenesis *in vitro* by suppression of NFATc1 and MAPK signaling pathways [J]. *Phytomedicine* 2015, 22(12): 1120-1124.
- [3] 杨毛毛, 罗花彩, 沙玫, 等. 藤茶总黄酮固体脂质纳米粒处方的优化及其体外释药行为 [J]. *中成药*, 2019, 41(8): 1941-1945.
- [4] 杨娟, 钟莹, 尚曙玉, 等. 白藜芦醇磷脂复合物固体脂质纳米粒的制备及其体内药理学研究 [J]. *中成药*, 2021, 43(4): 841-846.
- [5] 刘晓静, 贾竞夫, 孙丽芳, 等. 基于超临界 CO₂ 抗溶剂技术的姜黄素固体脂质纳米粒研究 [J]. *中药材*, 2019, 42(7): 1621-1624.