

## 柠檬苦素固体脂质纳米粒冻干粉的制备及质量评价

阮仕洋<sup>1</sup>, 陈慧<sup>1</sup>, 曾凡丽<sup>1</sup>, 刘兴赋<sup>1</sup>, 廖尚高<sup>1,2,3</sup>, 杨军<sup>4</sup>, 罗喜荣<sup>1</sup> (1. 贵州医科大学药学院, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州医科大学药学院/省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室, 贵州 贵阳 550025; 3. 贵州医科大学民族药与中药开发应用教育部工程研究中心/贵州省药物制剂重点实验室, 贵州 贵阳 550004; 4. 中国科学院地球化学研究所, 贵州 贵阳 550081)

**[摘要]** 目的: 制备柠檬苦素固体脂质纳米粒(LM-SLN)及冻干粉, 并考察其体外释药性能。方法: 采用薄膜超声法制备 LM-SLN, 以载药量及包封率为指标, 借助均匀设计联合 Box-Behnken 法优化处方; 采用 Nano ZSE+MPT2 粒度检测仪观测形态与粒径; 透析法研究冻干粉体外释药行为。结果: 处方工艺为柠檬苦素-硬脂酸-卵磷脂-4.5%泊洛沙姆 188(10:30:35:10), 超声功率 300 W, 超声时间 4 min; 以 5%甘露醇为冻干保护剂, 于-20℃预冻 12 h, 转至-40℃以下冷冻干燥 22 h。LM-SLN 冻干粉呈类球形, 结构均匀, 包封率为 79.38%、载药量为 10.88%, 平均粒径(182.4±0.2) nm, 多分散系数(PDI)为 0.290±0.013, Zeta 电位为(-14.5±0.1)mV; 原药 12 h 累积释放率为 89.31%, LM-SLN 冻干粉 48 h 为 85.21%, 48 h 后释放趋于平缓。结论: LM-SLN 处方工艺简单且重复性好, 体外释放结果表明, LM-SLN 冻干粉具有一定缓释作用。

**[关键词]** 柠檬苦素; 薄膜超声法; 响应曲面设计; 固体脂质纳米粒; 冻干粉

**[中图分类号]** R943 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-5213(2022)23-2493-07 **DOI:** 10.13286/j.1001-5213.2022.23.10

### Preparation and quality evaluation of limonin solid lipid nanoparticles lyophilized powder

RUAN Shi-yang<sup>1</sup>, CHEN Hui<sup>1</sup>, ZENG Fan-li<sup>1</sup>, LIU Xing-fu<sup>1</sup>, LIAO Shang-gao<sup>1,2,3</sup>, YANG Jun<sup>4</sup>, LUO Xi-rong<sup>1</sup> (1. School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guizhou Guiyang 550025, China; 2. School of Pharmacy, Guizhou Medical University/State Key Laboratory for Functions and Applications of Medicinal Plants, Guizhou Guiyang 550025, China; 3. Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and TCM, Ministry of Education/Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics, Guizhou Medical University, Guizhou Guiyang 550004, China; 4. Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guizhou Guiyang 550081, China)

**ABSTRACT:OBJECTIVE** To prepare limonin solid lipid nanoparticles (LM-SLN) and freeze-dried powder, and investigate their drug release properties *in vitro*. **METHODS** LM-SLN was prepared by a thin-film ultrasonic method, and the drug loading and encapsulation efficiency were used as the indicators to optimize the formulation by means of uniform design combined with Box-Behnken method; the morphology and particle size were observed by a Nano ZSE+MPT2 particle size detector; the *in vitro* drug release behavior of freeze-dried powder was studied by dialysis. **RESULTS** The formulation and preparing process were as follows: the ratio of limonin-stearic acid-lecithin-4.5% Poloxamer 188 was 10:30:35:10, the ultrasonic power was 300 W and the ultrasonic time was 4 min; 5% mannitol was used as a freeze-drying protective agent, and the samples were pre-frozen at -20℃ for 12 h and then transferred to -40℃ for 22 h. The LM-SLN freeze-dried powder was spherical and uniform in structure. The encapsulation efficiency was 79.38% and the drug loading was 10.88%, the average particle size was (182.4±0.2) nm, and the polydispersity coefficient (PDI) was 0.290±0.013. The Zeta potential was (-14.5±0.1) mV; the *in vitro* release showed that the cumulative release of the original drug in 12 h was 89.31%, that of LM-SLN freeze-dried powder was 85.21% in 48 h and the release tended to be slower after 48 h. **CONCLUSION** The LM-SLN formulation and preparing process are simple, and the repeatability is good, and the *in vitro* release results show that the LM-SLN freeze-dried powder has a certain sustained release effect.

**KEY WORDS:** limonin; membrane ultrasound; response surface design; solid lipid nanoparticles; lyophilized powder

固体脂质纳米粒(solid lipid nanoparticles, SLN)是将药物内置或包裹于脂质材料的一类新型给药方式, 骨架载体多为生物毒性低、降解性优良、

相容性良好的固态天然或合成类脂; SLN 常作为难溶性药物的给药载体, 具有延长药物半衰期、防止药物降解、减少泄漏量、优良靶向性及强控释作用

**[基金项目]** 贵州省科学技术基金项目(编号:黔科合 J 字[2013]2037); 贵州省社发攻关项目(编号:黔科合 SY 字[2015]3032); 贵州省联合基金项目(编号:黔科合 LH 字[2014]7091); 贵州省中药、民族药活性物质筛选新技术开发应用科技创新人才团队项目(编号:黔科合平台人才[2020]5006); 贵州省高层次创新型人才项目(编号:黔科合平台人才[2020]6011) **[作者简介]** 阮仕洋, 男, 硕士, 研究方向: 天然药物活性成分 **[通讯作者]** 罗喜荣, 女, 硕士, 教授, 研究方向: 药物新剂型、新技术及药动学

等特性<sup>[1-6]</sup>。此外,SLN 还能减少用药频率和服药水平剂量,改善患者顺应性,减少不良反应,常用于制备水溶性较差的药物<sup>[7]</sup>。

柠檬苦素(limonin, LM)是楝科或芸香科植物中广泛存在的一种天然三萜类化合物,也是植物中重要的次生代谢活性产物;LM 又名黄柏内酯或吴茱萸内酯,普遍存在于食用蔬菜及水果中,其生物活性对人类具有重要意义,在生物制剂及药食两用等方面的发展前景较为广阔<sup>[8-10]</sup>。据研究报道,LM 药理活性突出,具有抗肿瘤、抗过敏、抗癌、抗炎镇痛、抗菌、抗骨质疏松、神经保护、抗氧化及保肝等多种生物学活性<sup>[11-17]</sup>。研究表明 LM 属中等极性,不溶于水并且稳定性较差,致使其口服生物利用度不理想,因此临床应用受到较大约束<sup>[10]</sup>,故将其研制为安全有效的口服制剂具有较大的研究意义。本实验制备了柠檬苦素固体脂质纳米粒(LM-SLN)及其冻干粉,借助均匀设计联合 Box-Behnken 法优化处方制备工艺,并进行质量初步评价,为 LM 下一步制剂开发利用提供试验基础。

## 1 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-16G 型高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂);JY92-IIDN 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);BSA224S 型电子天平[梅特勒-托利仪器(上海)有限公司];80-2B 型离心机(湖南星科科学仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂 LM 对照品(成都德思特生物技术有限公司,批号 20190519,纯度>98%);LM(贵州医科大学天然产物实验室制备,纯度≥99%);吐温-80(天津市东丽区天大化学试剂厂,批号 20110328);泊洛沙姆 188(湖北恒硕化工有限公司);葡萄糖(天津市科密欧化学试剂有限公司,批号 20120314);海藻糖(上海源叶生物科技有限公司,批号 Y18M9Y61746);蔗糖(西陇化工股份有限公司,批号 1202172);甘露醇(天津市科密欧化学试剂有限公司,批号 20110411),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 含量测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱:Dikma C<sub>18</sub>(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相:乙腈-水(45:55);流速:1.0 mL·min<sup>-1</sup>;检测波长:210 nm;柱温:30 ℃;进样量:20 μL。该条件下,LM 色谱峰峰形及分离度较好,

无杂质干扰峰,见图 1。

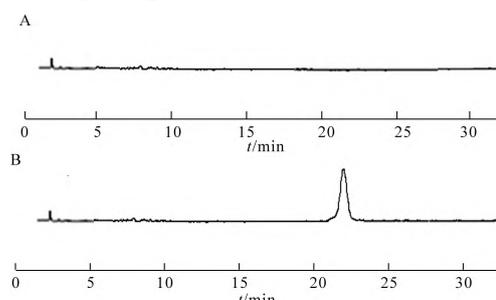


图 1 空白对照(A)及 LM(B)色谱图

Fig 1 Chromatograms of the blank control(A) and LM(B)

2.1.2 线性关系 取对照品适量,甲醇超声溶解,过 0.22 μm 微孔滤膜,进样检测,记录峰面积,结果表明 LM 在 1~20 μg·mL<sup>-1</sup> 质量浓度范围内,峰面积(Y)与药物浓度(X)有良好线性,回归方程为  $Y = 15.841X + 6.7052$ ,  $R^2 = 0.9992$ 。

2.1.3 精密度考察 取高、中、低浓度的 LM 对照品溶液,过 0.22 μm 滤膜,按“2.1.1”项下色谱条件 1 d 内连续进样 5 次,RSD 分别为 0.27%、0.18%、0.22%;连续进样检测 6 d,RSD 分别为 0.58%、0.71%、0.49%,表明方法日内、日间精密度良好。

2.1.4 准确度考察 按处方配比制备空白脂质纳米粒,加入适量 LM,甲醇溶解定容后精密移取一定量至量瓶,配制系列浓度,测定其回收率。结果显示,高、中、低 3 种浓度下 LM 溶液的回收率分别为:(96.9±2.3)%、(103.4±1.8)%、(94.4±3.5)%( $n=3$ );加样回收率分别为(99.5±3.8)%、(92.4±1.5)%、(93.7±1.2)%( $n=3$ ),表明该方法测定脂质纳米粒中药物的含量准确可靠,符合测定要求。

2.1.5 重复性考察 分别测定 LM-SLN 在甲醇、无水乙醇和丙酮中的平衡溶解度,并进样检测,记录峰面积,计算 RSD 分别为 0.24%、0.49%、0.18%( $n=6$ ),表明重复性良好。

2.2 包封率及载药量 精密移取 LM-SLN 混悬液,置于离心管,12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min,沉淀用甲醇溶解并适当稀释,测定 LM 含量,计算游离药物量,包封率及载药量计算公式如下:

$$\text{包封率(ER)} = (W_T - W_F) / W_T \times 100\%$$

$$\text{载药量(DL)} = (W_T - W_F) / W_S \times 100\%$$

其中: $W_T$ 为纳米粒溶液中总药量, $W_F$ 为游离药物量, $W_S$ 为药物与载体材料的总量。

2.3 LM-SLN 制备工艺考察 采用薄膜超声法筛选 LM-SLN 处方,精密称取处方量的 LM、脂质材料、卵磷脂,加入二氯甲烷超声溶解,挥发溶剂制得脂质薄膜,然后加入处方量表面活性剂水溶液充分水合,采用超声细胞粉碎机超声制备 LM-SLN 混悬

液。精密移取适量 LM-SLN, 加入冻干保护剂致其完全溶解, 于 -20 °C 预冻 12 h, 转至 -40 °C 以下冷冻干燥 22 h, 得 LM-SLN 冻干粉。

2.3.1 脂质材料考察 以 SLN 的形态及成膜性为考察指标, 预实验结果表明硬脂酸和卵磷脂均形成均匀的膜薄, 依次经吐温 80、泊洛沙姆 188 水合超声分散后, SLN 成形多而小且圆整、大小均一、无粘连, 结果见表 1。

表 1 LM-SLN 载体材料初选方案及结果

Tab 1 Preliminary selection program and results of LM-SLN carrier materials

实验号	脂质-1/ mg	脂质-2/ mg	表面 活性剂	成膜性	粒子 均匀性
1	-	卵磷脂 80	4%吐温 80	差	粘连严重
2	-	卵磷脂 80	4%泊洛沙姆	差	粘连严重
3	-	卵磷脂 80	4%甘露醇	差	粘连严重
4	硬脂酸 45	卵磷脂 45	4%吐温 80	良好	均匀无粘连
5	硬脂酸 45	卵磷脂 45	4%泊洛沙姆	良好	均匀无粘连
6	硬脂酸 45	卵磷脂 45	4%甘露醇	良好	不均匀有粘连
7	单硬脂酸甘 油酯 45	卵磷脂 45	4%吐温 80	较好	较均匀有粘连
8	单硬脂酸甘 油酯 45	卵磷脂 45	4%泊洛沙姆	较好	均匀无粘连
9	单硬脂酸甘 油酯 45	卵磷脂 45	4%甘露醇	较好	不均匀有粘连

### 2.3.2 均匀设计联合 Box-Behnken 优化处方工艺

(1) 专属性考察: 取适量空白 SLN 及 LM-SLN 混悬液于量瓶, 加甲醇超声破乳、定容至刻度线备用。另取空白及样品溶液, 进样检测, 结果显示辅料对药物测定无干扰, 见图 2。

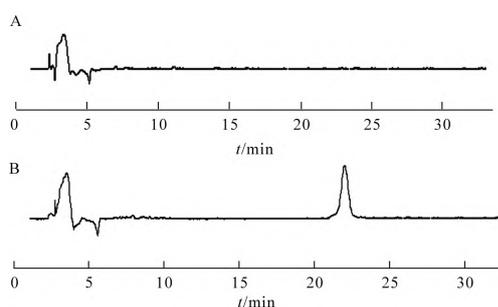


图 2 空白 SLN(A) 及 LM-SLN(B) 色谱图

Fig 2 Chromatograms of the blank SLN(A) and LM-SLN(B)

(2) 均匀设计: 据处方考察, 以包封率 ( $Y_1$ )、载药量 ( $Y_2$ ) 及综合评分 ( $Y_3$ ) 为考察指标, 综合评分 ( $Y_3$ ) = (包封率/最大包封率) × 60% + (载药量/最大载药量) × 40%, 选定硬脂酸 + 卵磷脂与药物的质量比 ( $X_1$ )、卵磷脂与硬脂酸的质量比 ( $X_2$ )、水溶液中吐温 80 浓度 ( $X_3$ )、水溶液中泊洛沙姆 188 浓度 ( $X_4$ )、超声功率 ( $X_5$ )、超声时间 ( $X_6$ ) 为考察因素, 每个因素设 5 个水平。方案见表 2, 结果见表 3。结果显示: 硬脂酸 + 卵磷脂与药物的质量比为 10、

卵磷脂与硬脂酸的质量比为 0.5, 泊洛沙姆 188 浓度为 2.5%、超声功率为 350 W、超声时间为 4 min 的条件下 LM-SLN 平均包封率及载药量均最优, 依次为 77.51%、7.19%。

表 2 均匀设计因素水平

Tab 2 Factors and levels of uniform design

水平	$X_1$	$X_2$	$X_3/\%$	$X_4/\%$	$X_5/W$	$X_6/min$
1	10	0.5	0.5	0.5	150	8
2	15	1.0	1.0	1.0	200	7
3	20	1.5	1.5	1.5	250	6
4	25	2.0	2.0	2.0	300	5
5	30	2.5	2.5	2.5	350	4

表 3 均匀设计实验方案及结果

Tab 3 Experimental scheme and results of uniform design

实验号	$X_1$	$X_2$	$X_3/\%$	$X_4/\%$	$X_5/W$	$X_6/min$	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$	$Y_3$
1	10	0.5	1.0	1.5	300	4	80.72	7.47	0.83
2	10	1.0	1.5	2.5	200	4	67.80	6.35	0.49
3	15	1.5	2.5	1.0	350	5	53.38	3.44	0.28
4	15	2.0	0.5	2.5	250	5	68.43	4.36	0.35
5	20	2.5	1.0	1.0	150	6	64.88	3.14	0.29
6	20	0.5	2.0	2.0	350	6	72.93	3.52	0.47
7	25	1.0	2.5	0.5	250	7	62.78	2.45	0.25
8	25	1.5	0.5	2.0	150	7	69.44	2.70	0.46
9	30	2.0	1.5	0.5	300	8	67.53	2.20	0.32
10	30	2.5	2.0	1.5	200	8	55.84	1.83	0.80

(3) 均匀设计优化: 上述可知,  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_4$  三者为影响综合评分的关键因素, 因此对三者进行优化设计, 结果见表 4。保持其他条件不变, 当泊洛沙姆含量由 2.5% 上升至 4.0% 时, 包封率由 77.51% 上升至 82%, 载药量由 7.19% 上升至 9.34%。

表 4 均匀设计实验方案及结果

Tab 4 Experimental scheme and results of uniform design

实验号	$X_1$	$X_2$	$X_4/\%$	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$	$Y_3$
1	10	0.5	2.5	79.85	8.47	0.66
2	10	0.5	4.0	87.63	11.35	0.99
3	10	0.5	4.0	80.17	8.72	0.89
4	10	0.5	10	82.37	8.83	0.91

(4) Box-Behnken 法优化: 据上述结果, 以  $Y_1$ 、 $Y_2$  及  $Y_3$  为考察指标, 选择对 LM-SLN 性质影响较大的硬脂酸用量 ( $X_A$ )、卵磷脂用量 ( $X_B$ )、水溶液中泊洛沙姆 188 浓度 ( $X_C$ ) 为考察因素, 采用 Box-Behnken 法优化实验设计, 见表 5, 方案及结果见表 6, 图 3。

表 5 响应曲面设计实验因素编码及水平

Tab 5 Coding and levels of experimental factors in response surface design

水平	$X_A/mg$	$X_B/mg$	$X_C/\%$
1	30	30	2
2	60	60	4
3	90	90	6

表 6 响应曲面设计实验方案及结果

Tab 6 Experimental scheme and results of response surface design

实验号	X <sub>A</sub>	X <sub>B</sub>	X <sub>C</sub>	Y <sub>1</sub> /%	Y <sub>2</sub> /%	Y <sub>3</sub>
1	30	30	4	79.13	11.65	95.64
2	90	30	4	78.01	6.10	80.43
3	30	90	4	75.21	5.90	77.57
4	90	90	4	75.64	4.03	73.13
5	30	60	2	73.42	7.54	80.32
6	90	60	2	76.19	4.83	75.65
7	30	60	6	84.39	8.57	92.08
8	90	60	6	76.32	4.84	75.77
9	60	30	2	70.94	7.31	77.66
10	60	90	2	57.49	3.69	57.19
11	60	30	6	70.59	7.27	77.28
12	60	90	6	79.33	5.02	78.74
13	60	60	4	79.36	6.20	81.80
14	60	60	4	80.67	6.30	83.14
15	60	60	4	76.49	5.99	78.88

(5)模型拟合:应用 Design-Expert 12.0 软件对实验数据进行模型拟合,最优拟合方程: $Y_3 = 82.25 - 5.08X_A - 5.55X_B + 4.13X_C + 2.69X_A X_B - 2.91X_A X_C + 5.48X_B X_C + 3.84X_A^2 - 4.40X_B^2 - 5.13X_C^2$  ( $R^2 = 0.9658$ )。拟合方程相关系数  $R^2 = 0.9658$ , 模型  $F$  值较高 (32.35),  $P = 0.0006$ , 表明模型显著, 拟合程度优良, 具有较好预测性。方差分析结果见表 7。结果表明, 一次项  $X_B$  ( $P = 0.0004$ ) 对  $Y_3$  影响极显著, 较显著的是因素  $X_A$  ( $P = 0.0006$ ), 显著交互项为  $X_B X_C$  ( $P = 0.0020$ )、二次项  $C^2$  ( $P =$

0.0032)。可知, 3 个因素对  $Y_3$  的影响主次为  $X_B > X_A > X_C$ 。

表 7 方差分析结果

Tab 7 Analysis results of variance

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P
模型	1 005.29	9	111.70	32.35	0.0006
X <sub>A</sub>	206.40	1	206.35	59.77	0.0006
X <sub>B</sub>	246.20	1	246.20	71.31	0.0004
X <sub>C</sub>	136.54	1	136.54	39.55	0.0015
X <sub>A</sub> X <sub>B</sub>	29.00	1	29.00	8.40	0.0339
X <sub>A</sub> X <sub>C</sub>	33.87	1	33.87	9.81	0.0259
X <sub>B</sub> X <sub>C</sub>	120.23	1	120.23	34.82	0.0020
X <sub>A</sub> <sup>2</sup>	54.49	1	54.49	15.78	0.0106
X <sub>B</sub> <sup>2</sup>	71.35	1	71.35	20.67	0.0061
X <sub>C</sub> <sup>2</sup>	97.30	1	97.30	28.18	0.0032
残差	17.26	5	3.45		
拟失项	16.07	3	5.36	8.95	0.1022
纯误差	1.20	2	0.60		
总差	1 022.56	14			

由图 3A、图 3B、图 3C 可知, 泊洛沙姆对包封率影响最大, 卵磷脂及硬脂酸影响较小; 硬脂酸对载药量影响最大, 卵磷脂及泊洛沙姆次之; 硬脂酸对综合评分影响最高, 泊洛沙姆及卵磷脂相对较小。对上述因素综合考察, 以综合评分为指标的最佳优化处方为:  $X_A$ 、 $X_B$  分别为 30, 32.03 mg、 $X_C$  为 4.46%, 为便于实际操作修正为:  $X_A$  为 30 mg、 $X_B$  为 32 mg、 $X_C$  为 4.5%。综上优化处方工艺为: LM-硬脂酸-卵磷脂-4.5%泊洛沙姆 188(10:30:35:10), 超声功率 300 W, 超声时间 4 min。

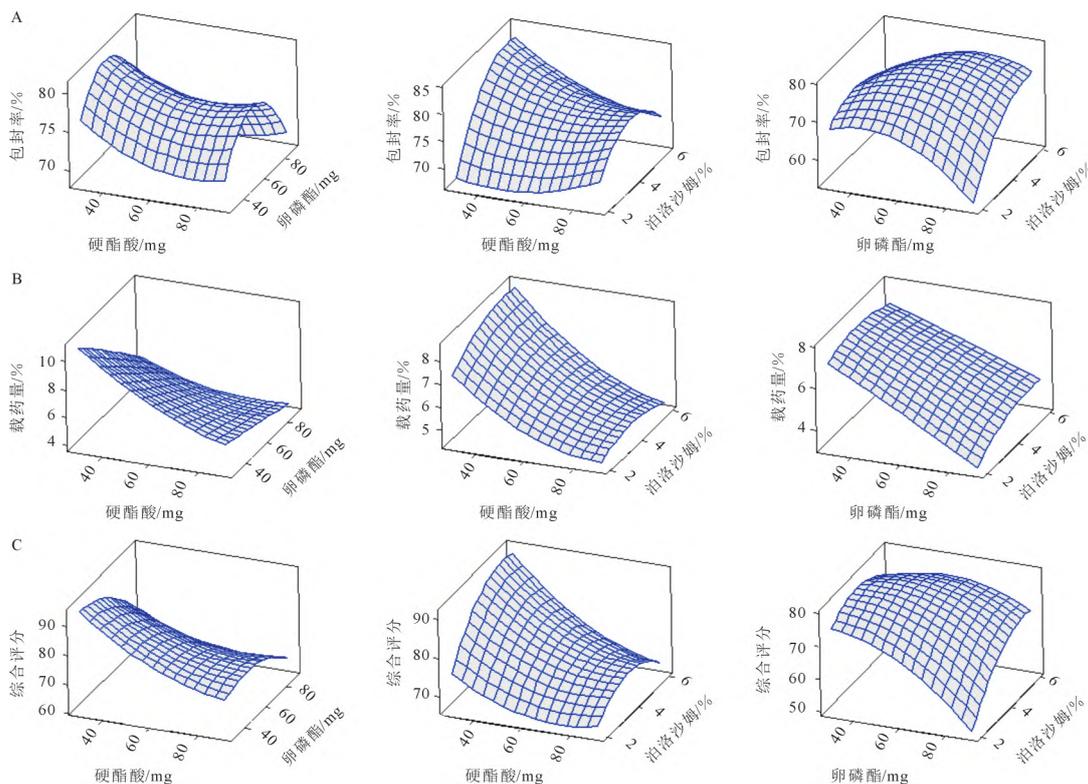


图 3 响应曲面分析

Fig 3 Response surface analysis

(6)验证试验:精密称取处方量药物及辅料,于优化处方下平行制备 3 份 LM-SLN,计算其包封率、载药量及综合评分,结果见表 8。此条件下 LM-SLN 平均包封率为 80.45%、平均载药量为 11.03%,优化后 LM-SLN 包封率和载药量较高,重现性较好。

表 8 修正后的 3 次平行条件的方案与结果

Tab 8 Schemes and results of the modified three parallel conditions

试验号	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	Y <sub>1</sub>	Y <sub>2</sub>	Y <sub>3</sub>
1	10	30	32	15	12	350	4	81.24	11.07	0.98
2	10	30	32	15	12	350	4	79.87	11.04	0.99
3	10	30	32	15	12	350	4	80.23	10.98	0.99
空白	0	30	32	15	12	350	4	0	0	0

## 2.4 LM-SLN 冻干粉制备及表征

### 2.4.1 冻干保护剂考察

分别以葡萄糖、乳糖、甘露醇、蔗糖和海藻糖作为冻干保护剂,按“2.4”项方法制备 LM-SLN 冻干粉,以外观、色泽及再分散性为评价指标,评分标准见表 9。依次考察上述保护剂在不同质量分数时对冻干粉质量的影响,进而确定保护剂处方。按以下进行综合评分:(1)外观以维持原液体积不变、表面光洁、不塌陷皱缩、可整块脱落但不散碎为佳;(2)色泽以粉体无花斑、整体色泽均匀、质地细腻为佳;(3)再分散性以分别取适量冻干粉加入一定量纯水振摇后能迅速完全分散为最佳。平行实验 3~5 次取评分均值,结果见表 10,表 11。由表 10 可知,冻干粉色泽均一,未加保护剂的冻干粉外观和色泽均最优,但再分散性较差。以冻干效果较好、用量较少、成本较低计,初选处方 4,10,18 进一步优化,优化结果由表 11 可知,处方 6~10 综合评分略优于处方 11~15,但处方 6~10 有轻度萎缩,不符合生产要求,故选用 5%甘露醇作为 LM-SLN 冻干保护剂。

表 9 指标评分标准

Tab 9 Indicator scoring criteria

评分/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

### 2.4.2 冻干工艺

结合本课题组前期相关工作及 LM-SLN 冻干工艺预实验结果,表明冻干工艺为 -20 °C 预冻 12 h,转至 -40 °C 以下冷冻干燥 22 h 时,冻干效果最为理想。

## 2.5 质量评价

### 2.5.1 LM-SLN 粒径及 Zeta 电位

采用 Nano

表 10 冻干保护剂处方筛选

Tab 10 Screening of lyoprotectant formulation

实验号	保护剂/%					外观	色泽	再分散性	总分
	葡萄糖	乳糖	甘露醇	蔗糖	海藻糖				
1						9	9	2	20
2	1					7	9	0	16
3	3					7	9	7	23
4	5					8	9	8	25
5	7					7	9	8	24
6	10					6	9	8	23
7	15					5	9	8	22
8		1				7	9	3	19
9		3				9	9	5	23
10		5				8	9	8	25
11		7				7	9	8	24
12		10				7	9	0	16
13		15				8	9	4	21
14			1			8	9	0	17
15			3			8	9	0	17
16			5			8	9	7	24
17			7			7	9	6	22
18			10			8	9	9	26
19			15			8	9	5	22
20				1		7	9	2	18
21				3		6	9	5	20
21				5		7	9	7	23
23				7		6	9	6	21
24				10		6	9	6	21
25				15		5	9	1	15
26					1	6	9	4	19
27					3	5	9	7	21
28					5	6	9	9	24
29					7	6	9	9	24
30					10	7	9	9	25
31					15	6	9	8	23

表 11 冻干保护剂处方优选

Tab 11 Preferred formulation of lyoprotectant

实验号	保护剂/%			外观	色泽	再分散性	总分
	葡萄糖	乳糖	甘露醇				
1	5			4	9	10	23
2	5			3	9	9	21
3	5			3	9	9	21
4	5			4	9	10	23
5	5			4	9	10	23
6		5		8	9	10	27
7		5		8	9	10	27
8		5		7	9	10	26
9		5		8	9	10	27
10		5		7	9	10	26
11			5	10	9	7	26
12			5	10	9	8	27
13			5	9	9	7	25
14			5	9	9	7	25
15			5	10	9	8	27

ZSE+MPT2 粒度检测仪测定 LM-SLN 冻干粉平均粒径和 Zeta 电位。结果平均粒径为 (182.4 ± 0.2) nm,多分散系数(PDI)为 0.290 ± 0.013,Zeta 电位为(-14.5 ± 0.1)mV。

### 2.5.2 外观形态

取适量 LM-SLN 混悬液及冻干

复溶液于量瓶中, 甲醇定容, 超声 30 min, 进样测定, 并测定 pH 值, 考察两者 pH 值、包封率、载药量之间的差异, 结果表明差异较小, 见表 12。

表 12 LM-SLN 冻干粉复溶前后对比

Tab 12 LM-SLN before and after resolving

样品	pH	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
LM-SLN	6.1	81.26	11.11	215.4
LM-SLN 冻干粉复溶液	6.2	79.38	10.88	234.7

将 LM-SLN 冻干粉用扫描电镜观察冻干粉表面及内部结构形态, 操作电压为 25 kV, 结果表明以 5% 甘露醇为保护剂的 SLN 呈类球形, 结构均一, 表面光滑, 甘露醇晶体均匀镶嵌在脂质材料的层状结构中, 见图 4。

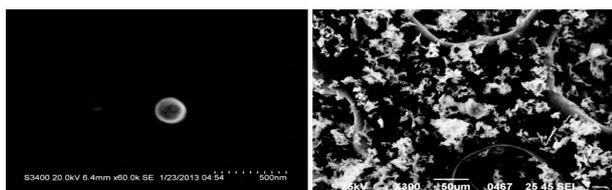


图 4 LM-SLN 冻干品的粒子形态和粉末形态  
Fig 4 Particle morphology and powder morphology of LM-SLN freeze-dried powder

## 2.6 LM-SLN 体外释药性能考察

2.6.1 释药介质 根据实验室前期 LM 平衡溶解度测定结果, 选用 1% 吐温 80 作为释药介质。

2.6.2 释放曲线 于烧杯中加入脱气释药介质, 将含有 LM 及 LM-SLN 混悬液与复溶液的透析袋在  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  下动态透析, 系列时间点取样。HPLC 检测 LM 浓度, 计算累积释放百分率(Q):  $Q = C_t / C_0 \times 100\%$  ( $C_t$  为释放药物量;  $C_0$  为初始药物量) 并绘制累积释药曲线, 结果图 5。结果表明在 1% 吐温 80 释放介质中, LM 于 8 h 累积溶出达 71.28%, 12 h 大于 85%; 而 LM-SLN 及冻干粉 24 h 大于 71%, 48 h 大于 85%, 且释放趋于平缓。由此可见, 将 LM

制成 LM-SLN 可有效延长其释放速率。

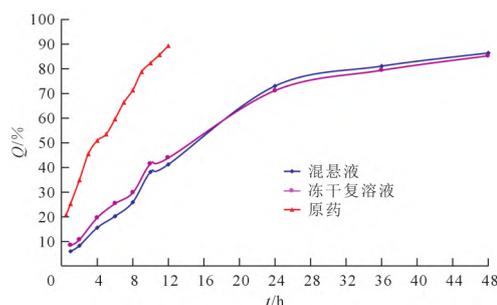


图 5 体外释药曲线  
Fig 5 In vitro drug release curve

2.6.3 释放模型拟合 利用 1stOpt 1.5 软件分别以零级、一级动力学方程、Higuchi 方程等对 LM、LM-SLN 在各时间点的 Q 进行拟合, 拟合优度以相关系数( $r^2$ )、赤池信息准则(AIC)值进行综合判断,  $r^2$  越接近 1, AIC 值越小, 表明拟合效果越好。结果显示 LM、LM-SLN 及冻干粉的体外释放过程均最接近一级动力学方程  $\ln(100-Q) = 4.5542 - 0.1663t$ , 可见药物从纳米粒中释放的方式以扩散为主, 见表 13。

2.7 稳定性考察 取脂质体混悬液及冻干粉于  $4^\circ\text{C}$  放置 0, 15, 30 d 后, 观察其外观, 并测定粒径、PDI 和包封率, 结果见表 14。结果表明 15 d 后脂质体混悬液包封率降低 1.69%, 清晰可见少量沉淀; 30 d 后包封率降低 4.91%, 粒径显著增大 ( $P < 0.05$ ), 发现大量沉淀并产生团聚现象。而冻干粉则平整饱满、无塌陷现象产生, 且粒径及包封率都无明显变化, 说明将液体脂质体制成冻干粉后, 其稳定性明显增强。

## 3 讨论

研究报道, 药物吸收和药物本身的油水分配系数及溶解度关系密切, 对制剂优化设计的指导意义不言而喻, 因此研究前, 应考虑采用摇瓶法及 HPLC

表 13 体外释药模型拟合结果

Tab 13 Fitting results of in vitro drug release model

溶液	释放模型	拟合方程	$r^2$	AIC
LM 原药	零级释放	$Q = 23.0972 + 5.8964t$	0.980673	32.9739
	一级释放	$\ln(100-Q) = 4.5542 - 0.1663t$	0.999979	-55.9475
	Higuchi	$Q = -0.2711 + 25.5926t^{1/2}$	0.992945	19.8739
	Weibull	$\ln \ln[100/(100-Q)] = -1.2207 + 0.7181 \ln t$	0.999958	-45.6309
LM-SLN	零级释放	$Q = 10.3201 + 1.8791t$	0.914843	51.2467
	一级释放	$\ln(100-Q) = 4.5915 - 0.0441t$	0.999991	-49.1993
	Higuchi	$Q = -11.2596 + 14.9789t^{1/2}$	0.972659	38.7496
	Weibull	$\ln \ln[100/(100-Q)] = -2.9183 + 0.9244 \ln t$	0.999970	-35.0004
LM-SLN 冻干粉	零级释放	$Q = 15.7156 + 1.6982t$	0.907225	45.9982
	一级释放	$\ln(100-Q) = 4.5318 - 0.0408t$	0.999992	-47.0979
	Higuchi	$Q = -7.4493 + 14.2938t^{1/2}$	0.978173	31.5280
	Weibull	$\ln \ln[100/(100-Q)] = -2.6761 + 0.8619 \ln t$	0.999983	-39.4595

表 14 4 °C 下 30 d 内稳定性试验结果 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab 14 Results of 30-day stability test at 4 °C ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

样品	时间/d	外观	粒径/nm	PDI	包封率/%
混悬液	0	淡蓝色乳光、均一透明	180.30±0.39	0.263±0.003	81.26±1.20
	15	少量沉淀	182.44±0.62 <sup>b</sup>	0.271±0.100 <sup>a</sup>	79.57±1.96 <sup>a</sup>
	30	大量沉淀且团聚	190.16±2.39 <sup>b</sup>	0.308±0.025 <sup>b</sup>	76.35±1.00 <sup>b</sup>
冻干粉	0	平整饱满、无塌陷	182.40±0.2	0.290±0.013	79.38±0.85
	15	平整饱满、无塌陷	181.75±0.06	0.293±0.012	79.41±0.88
	30	平整饱满、无塌陷	182.29±0.16	0.30±0.012	79.16±1.84

注(note):与混悬液放置 0 d 比较(compared to suspension stored for 0 d),<sup>a</sup> $P<0.05$ ,<sup>b</sup> $P<0.01$ 。

法测定药物在不同介质中的平衡溶解度和表观油水分配系数<sup>[18-21]</sup>,LM 此处内容课题组前期已作研究报道<sup>[21]</sup>。均匀设计实验过程中,一方面,包封率及载药量随超声功率增大而增大,但后期变化趋于平缓,基于生产成本考虑,超声功率不必过大;另一方面,随超声时间延长,包封率和载药量呈现下降趋势,可能是由于超声时间太久从而产生了金属污染,破坏并扰乱粒子本身的成型性<sup>[22]</sup>。实验过程中,发现包封率及载药量随吐温 80 浓度增大呈下降趋势,可能是吐温 80 对 LM 脂质薄膜乳化能力弱,因此考虑在 LM-SLN 制备处方中不加入吐温 80。载体材料筛选过程中,单用卵磷脂难以形成 SLN,可能是 LM 在卵磷脂中溶解度较低,使药物多分散在水中;选用甘露醇制备的 SLN 稳定性差,可能是甘露醇降低了体系中颗粒间的静电斥力,加速了脂质骨架晶型的转变<sup>[22]</sup>。体外释药研究表明,LM 原药 12 h 几乎释药完全;而 LM-SLN 该过程符合双向动力学释药规律,其释药行为由初始较快的释放及后面的缓慢释放组成。体外释药模型拟合结果表明,LM 原药、LM-SLN 及冻干粉的体外释放过程均最接近一级动力学方程。本研究系统优化了 LM-SLN 的处方及制备工艺,下一步拟对其体内药效学作进一步评价<sup>[23]</sup>,从而更好地开发利用该制剂。

参考文献:

[1] 谢燕,崔晓鸽,张智强. 延胡索乙素固体脂质纳米粒缓释片制备及工艺优化[J]. 中国医院药学杂志, 2019, 39(21): 2134-2140.

[2] 郭留城,杜利月,郝海军,等. 青藤碱固体脂质纳米粒凝胶骨架缓释片的制备及处方优化[J]. 中国医院药学杂志, 2018, 38(18): 1893-1897.

[3] 张喜武,朱健,李永吉,等. 丁香苦苷固体脂质纳米粒冻干粉的体外释放研究[J]. 现代中药研究与实践, 2020, 34(1): 46-49.

[4] 邓艳平,刘岳金,戴雅彬,等. 雷公藤内酯醇固体脂质纳米粒的制备及理化性质[J]. 中国医院药学杂志, 2017, 37(9): 797-803.

[5] Rodenak-Kladniew B, Islan GA, de Bravo MG, et al. Design, characterization and *in vitro* evaluation of linalool-loaded solid lipid nanoparticles as potent tool in cancer therapy[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2017, 154: 123-132.

[6] 朴林梅,金勇,崔艳琳,等. 月见草油固体脂质纳米粒的制备及质量评价[J]. 中药材, 2015, 38(6): 1290-1294.

[7] 严俊丽,李婉蓉,杨佳佳,等. 氧化苦参碱磷脂复合物固体脂质纳米粒冻干粉的制备与质量评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(7): 146-152.

[8] 赖庆茹,杨锦棉,何沁儒,等. 柠檬苦素的提取工艺研究进展[J]. 轻工科技, 2021, 37(11): 4-6.

[9] 尤文挺,王洒,何龙,等. 柠檬苦素单体的药理活性研究进展[J]. 中药材, 2017, 40(1): 242-246.

[10] 卞明. 甘草次酸、补骨脂酚和柠檬苦素衍生物的设计合成及其抗炎活性研究[D]. 延吉: 延边大学, 2021.

[11] 张群琳,何雅静,李甜,等. 柠檬苦素类化合物抗病毒作用及机制研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(6): 1078-1085.

[12] 卢小锋,林鹏程,菅佳辰,等. 印楝种子中柠檬苦素类成分及其抗菌活性研究[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(22): 4864-4873.

[13] Fan SM, Zhang CL, Luo T, et al. Limonin: a review of its pharmacology, toxicity, and pharmacokinetics[J]. Molecules, 2019, 24(20): 3679.

[14] 季林子,胡文敏,唐靓,等. 柠檬苦素对自然衰老大鼠抗氧化和学习记忆能力的影响[J]. 中国食品卫生杂志, 2016, 28(1): 22-27.

[15] Mahmoud MF, Hamdan DI, Wink M, et al. Hepatoprotective effect of limonin, a natural limonoid from the seed of *Citrus aurantium* var. *bigaradia*, on D-galactosamine-induced liver injury in rats[J]. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 2014, 387(3): 251-261.

[16] Das A, Miller R, Lee P, et al. A novel component from *Citrus*, ginger, and mushroom family exhibits antitumor activity on human meningioma cells through suppressing the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway[J]. Tumour Biol, 2015, 36(9): 7027-7034.

[17] Yang Y, Wang XH, Zhu QH, et al. Synthesis and pharmacological evaluation of novel limonin derivatives as anti-inflammatory and analgesic agents with high water solubility[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2014, 24(7): 1851-1855.

[18] 周建文,佟瑶,王皓,等. 岩大戟内酯 B 平衡溶解度与油水分配系数的测定[J]. 广东化工, 2021, 48(12): 196-197, 188.

[19] 王雪,陈华,尹婕,等. 磷酸可待因平衡溶解度及油水分配系数的测定[J]. 药物分析杂志, 2019, 39(4): 749-754.

[20] 金诚,陈丽英,吴飞,等. HPLC 法测定胡黄连苷 I 的表观油水分配系数和平衡溶解度[J]. 药物分析杂志, 2019, 39(4): 744-748.

[21] 罗喜荣,任荣,钱志瑶,等. HPLC 法测定柠檬苦素的平衡溶解度和表观油水分配系数[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(10): 1711-1714.

[22] 侯君. 盐酸小檗碱固体脂质纳米粒的制备[D]. 重庆: 第三军医大学, 2008.

[23] 陈奋,杨月,张玲,等. 姜黄素纳米制剂在肿瘤治疗中的研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(21): 2731-2737.

[收稿日期]2022-03-24