

诺氟沙星-固体脂质纳米粒的制备及体外释药特性研究^Δ

郭杰^{1*}, 乔瑾¹, 闫明明², 郑文君¹, 许蕊¹, 隋小宇^{1#} (1. 齐齐哈尔医学院药学院, 黑龙江齐齐哈尔 161006; 2. 国药一心制药有限公司, 长春 130600)

中图分类号 R944.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)22-3068-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.22.10

摘要 目的: 优化诺氟沙星-固体脂质纳米粒的制备工艺, 并考察其体外释药特性。方法: 采用紫外分光光度法测定诺氟沙星的含量; 采用超声-高压均质法制备诺氟沙星-固体脂质纳米粒。以包封率和粒径为指标, 采用评分法对制备工艺进行单因素试验, 并采用 Box-Behnken 响应面法优化制备工艺; 通过透射电镜法观察诺氟沙星-固体脂质纳米粒的形态; 通过体外释放试验考察其释药特性。结果: 诺氟沙星检测质量浓度线性范围为 0.2~1.2 μg/mL ($r=0.9995$)。最优制备工艺脂质材料为三硬脂酸甘油酯, 表面活性剂为大豆卵磷脂: 泊洛沙姆 188=1:2 (m/m), 剪切速度为 15 000 r/min, 脂药比为 7.67:1 (m/m), 药物质量浓度为 8.91 mg/mL, 超声时间为 4.80 min, 超声温度为 65 °C, 均质压力为 120 MPa, 冻干保护剂为 10% 海藻糖。所得诺氟沙星-固体脂质纳米粒形态近似于球形, 大小均一, 平均粒径为 (168.0 ± 4.8) nm, 平均包封率为 $(86.8 \pm 5.1)\%$; 1 h 内有突释现象, 8 h 内的累积释放度为 $(75.7 \pm 8.1)\%$ 。结论: 制得的诺氟沙星-固体脂质纳米粒形态良好, 粒径适宜, 具有较好的体外缓释性。
关键词 诺氟沙星; 固体脂质纳米粒; 响应面法; 超声-高压均质法; 体外释放试验; 包封率; 粒径

Study on the Preparation and *in vitro* Release Characteristics of Norfloxacin Solid Lipid Nanoparticles

GUO Jie¹, QIAO Jin¹, YAN Mingming², ZHENG Wenjun¹, XU Rui¹, SUI Xiaoyu¹ (1. College of Pharmacy, Qiqihar Medical University, Heilongjiang Qiqihar 161006, China; 2. Sinopharm A-Think Pharmaceutical Co., Ltd., Changchun 130600, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the preparation technology of Norfloxacin solid lipid nanoparticles and investigate its drug release characteristics *in vitro*. METHODS: The content of norfloxacin was determined by UV spectrophotometry. Norfloxacin solid lipid nanoparticles were prepared by ultrasound-high pressure homogenization. Using encapsulation rate and particle size as indexes, single factor tests of preparation technology were conducted by using the scoring method, and the Box-Behnken response surface method was used for optimization. TEM was used to observe its morphology of Norfloxacin solid lipid nanoparticles. The release characteristics were investigated by release test *in vitro*. RESULTS: The linear range of norfloxacin were 0.2-1.2 μg/mL ($r=0.9995$). The optimal technology was glycerol tristearate as lipid material, fabaceous lecithin: poloxamer 188 (1:2, m/m) as surfactant, shearing velocity of 15 000 r/min, lipid-drug ratio of 7.67:1, drug concentration of 8.91 mg/mL, ultrasonic time of 4.80 min, ultrasonic temperature of 65 °C, homogeneous pressure of 120 MPa, freeze-dried protective agents of 10% trehalose. Norfloxacin solid lipid nanoparticles were nearly spherical in shape and uniform in size with average particle size of (168.0 ± 4.8) nm. Average encapsulation rate was $(86.8 \pm 5.1)\%$; burst release appeared within 1 h, and accumulative release rate was $(75.7 \pm 8.1)\%$ within 8 h. CONCLUSIONS: The prepared Norfloxacin solid lipid nanoparticles have good shape, suitable particle size and good sustained-release characteristics *in vitro*.

KEYWORDS Norfloxacin; Solid lipid nanoparticles; Response surface methodology; Ultrasonic-high pressure homogenization; Release test *in vitro*; Encapsulation rate; Particle size

诺氟沙星(Norfloxacin)是第三代喹诺酮类抗菌药物,其抗菌谱广,抑菌作用强^[1],但该药存在脂溶性和水溶性均较差、生物膜穿透能力弱、生物利用度低、口服吸

收不好且生物半衰期仅有3~4 h等缺点^[2-3]。固体脂质纳米粒(Solid lipid nanoparticles, SLN)以类脂为载体,将药物镶嵌在脂质材料表面或包裹于脂质核中,形成粒径

年版.北京:中国医药科技出版社,2015:202.

[12] 刘思峰,杨英杰,吴利丰.灰色系统理论及其应用[M].7

^Δ基金项目:黑龙江省自然科学基金资助项目(No.H2016097);
黑龙江省大学生创新创业训练计划项目(No.201511230043)

*本科生。研究方向:药物新剂型与新技术。E-mail:18855055784@163.com

#通信作者:副教授,博士。研究方向:药物新剂型与新技术。电话:0452-2663160。E-mail:suixiaoyu@outlook.com

版.北京:科学出版社,2014:63-83.

[13] 周刚,吕庆红.牡丹皮不同部位有效成分含量测定及指纹图谱化学成分研究[J].中国中药杂志,2008,33(8):2070-2073.

[14] 吕文海,张欣,宋磊,等.山东菏泽牡丹皮产地加工品的定量分析[J].中成药,2005,27(10):1162-1165.

(收稿日期:2018-05-13 修回日期:2018-09-17)

(编辑:陈宏)

为 10 nm~1 μm 的纳米给药体系,具有生物相容性好、毒性低、缓释性好等优点^[4-5]。

目前,最常用的制备 SLN 的方法为高压乳匀法^[6],该法又分为热匀法和冷匀法:热匀法是在特殊装置辅助下保持高温(高于脂质熔点 5 ℃ 以上),使载体熔融并进行高压乳匀,耗能较大;冷匀法是指在形成固态含药脂质过程中涉及骤冷过程,并需要低温研磨,易导致药物晶型转化,所得粒子的粒径大且分布宽^[7]。为克服上述两种方法的不足,本研究以诺氟沙星为模型药物,采用超声-高压均质法制备诺氟沙星-SLN,并采用 Box-Behnken 响应面法优化其工艺,同时对制得的诺氟沙星-SLN 的体外释放特性进行考察。

1 材料

1.1 仪器

T6 型紫外-可见分光光度(UV)计(北京普析通用仪器有限公司);DF-101S 型集热式恒温加热磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限责任公司);AL-204 型电子天平[梅特勒-托利多(上海)有限公司];MT-30K 型手持均质仪(杭州米欧仪器有限公司);KQ-600V 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);AH100D 型高压均质机(加拿大 ATS 工业系统有限公司);5430R 型台式高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);Amicon Ultra-0.5 型超滤管(美国 Millipore 公司,截留分子量:10 kD);ZS-90 型纳米粒度仪(英国 Malvern 公司);微孔滤膜(北京百灵威科技有限公司,孔径:0.22 μm);SJIA-12N 型冷冻干燥机(宁波市双嘉仪器有限公司);透析袋(美国 Union Carbide 公司,截留分子量:8 000~14 000 Da);HT7700 型透射电子显微镜(日立高新技术公司)。

1.2 药品与试剂

诺氟沙星对照品(大连美仑生物技术有限公司,批号:A0727A,纯度:>99%);三硬脂酸甘油酯(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号:C10036477);大豆卵磷脂(S100,德国 LIPOID 公司,批号:579010-1150048-01);泊洛沙姆 188(德国 BASF 公司,批号:20130907);蔗糖、甘露醇、海藻糖(国药集团化学试剂有限公司,批号分别为:10021418、20160927、20140901);其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

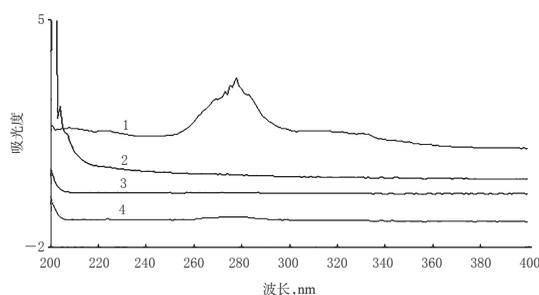
2 方法与结果

2.1 超声-高压均质法制备诺氟沙星-SLN 冻干粉

分别称取处方量的诺氟沙星对照品、三硬脂酸甘油酯,置于同一烧杯中,于 85 ℃ 熔融得油相;另分别称取处方量的泊洛沙姆 188、大豆卵磷脂,置于另一烧杯中,加入水 25 mL,于 85 ℃ 溶解得水相;在保温状态下将油相加至水相中,后高速剪切乳化 3 min,超声(功率:600 W,频率:40 kHz)处理 4~12 min,高压均质 3 min,得诺氟沙星-SLN 混悬液。将诺氟沙星-SLN 混悬液于 -20 ℃ 冰箱中预冻 5 h 后,再于 -50 ℃ 下冷冻干燥 24 h,得诺氟沙星-SLN 冻干粉。

2.2 诺氟沙星的含量测定

2.2.1 检测波长的确定 本研究采用 UV 法测定诺氟沙星的含量^[8]。精密称取诺氟沙星对照品、三硬脂酸甘油酯、泊洛沙姆 188、大豆卵磷脂各 10 mg,分别置于烧杯中,加入 0.1 mol/L 盐酸溶液 20 mL 溶解后,分别转移至 100 mL 量瓶中,加入 0.1 mol/L 盐酸溶液稀释至刻度,得 4 种溶液。分别取上述 4 种溶液各 1 mL,于 200~400 nm 波长范围内进行全波长扫描^[7],结果见图 1。由图 1 可知,诺氟沙星于 278 nm 波长处有最大吸收,其他成分在此波长下均无吸收,因此选择 278 nm 为检测波长。



注:1. 诺氟沙星对照品;2. 大豆卵磷脂;3. 三硬脂酸甘油酯;4. 泊洛沙姆-188

Note: 1. norfloxacin control; 2. fabaceous lecithin; 3. glycerol tristearate; 4. poloxamer-188

图 1 紫外吸收光谱图

Fig 1 UV absorption spectrograms

2.2.2 线性关系考察 精密称取诺氟沙星对照品 0.025 0 g,置于 100 mL 量瓶中,加入 0.1 mol/L 盐酸溶液溶解并稀释至刻度,精密量取 2 mL,置于 100 mL 量瓶中,加入 0.1 mol/L 盐酸溶液稀释至刻度;精密量取 0.40、0.80、1.20、1.60、2.00、2.40 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,加入 0.1 mol/L 盐酸溶液稀释至刻度,得质量浓度分别为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 μg/mL 的线性关系工作溶液。取上述线性关系工作溶液各 1 mL,于 278 nm 波长处测定吸光度。以诺氟沙星质量浓度(x, μg/mL)为横坐标、吸光度(y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程为 $y=0.1237x+0.0347$ ($r=0.9995$)。结果表明,诺氟沙星检测质量浓度线性范围为 0.2~1.2 μg/mL。

2.3 包封率和粒径的测定

采用超滤离心法测定包封率^[9]。取“2.1”项下制备的诺氟沙星-SLN 混悬液 0.2 mL,置于超滤管内管中,加入 0.1 mol/L 盐酸溶液 0.2 mL,置于高速冷冻离心机中,以 10 000 r/min 离心 15 min,上清液经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液 0.2 mL,加水稀释 2 500 倍。取上述溶液 1 mL,于 278 nm 波长处测定吸光度,并计算游离药物质量($m_{游}$),同时按理论加药量计算药物总质量($m_{总}$),进而计算包封率:包封率= $(m_{总}-m_{游})/m_{总} \times 100\%$ 。

取“2.1”项下制备的诺氟沙星-SLN 混悬液 0.2 mL,加水稀释 80 倍,于纳米粒度仪中测定粒径。

2.4 单因素试验

以包封率和粒径为指标进行单因素试验。通过评分法 $I=R_j/R_{max} \times (-0.5)+E_j/E_{max} \times 0.5$;式中,I:评分, R_j :粒

径, E_j : 包封率, R_{\max} : 每组的最大粒径, E_{\max} : 每组的最大包封率] 优化对包封率、粒径具有显著影响的因素, 分别包括脂质材料、表面活性剂、药物质量浓度(以诺氟沙星计)、脂药比(脂质材料与主药质量比)、剪切速度、超声时间、超声温度, 结果见表1。由表1可知, 以三硬脂酸甘油酯为脂质材料、大豆卵磷脂: 泊洛沙姆 188=1:2(m/m)为表面活性剂时, I 均为最高; 当剪切速度为 15 000 r/min 时, I 为最高。脂药比、药物质量浓度、超声时间、超声温度在考察范围内均存在最佳水平, 且随单因素自变量的增大其 I 先增大后减小, 符合中心设计的原理, 因此选择这4个因素进行优化。

表1 单因素试验结果

Tab 1 Results of single factor tests

单因素	包封率, %	粒径, nm	I , 分
脂质材料			
硬脂酸	63.0	1 867.0	-0.081 1
单硬脂酸甘油酯	68.3	1 522.0	0.046 5
三硬脂酸甘油酯	75.2	691.1	0.314 9
表面活性剂			
大豆卵磷脂	60.3	457.7	-0.032 6
泊洛沙姆 188	64.0	455.0	-0.000 9
大豆卵磷脂: 泊洛沙姆 188=2:1(m/m)	62.6	302.6	0.154 7
大豆卵磷脂: 泊洛沙姆 188=1:1(m/m)	62.1	318.3	0.133 7
大豆卵磷脂: 泊洛沙姆 188=1:2(m/m)	64.5	297.2	0.175 3
药物质量浓度, mg/mL			
5	71.5	620.7	-0.025 2
6	75.3	453.0	0.135 1
7	74.1	340.8	0.217 5
8	73.2	301.7	0.243 0
9	69.9	329.6	0.198 6
脂药比(m/m)			
5:1	69.0	429.1	-0.039 4
6:1	71.3	406.5	0.002 3
7:1	74.9	342.1	0.101 4
8:1	72.2	396.5	0.020 0
9:1	73.1	379.9	0.045 3
剪切速度, r/min			
8 000	71.9	327.7	-0.019 1
10 000	73.2	329.6	-0.013 3
12 000	75.2	319.8	0.014 9
15 000	75.2	303.7	0.039 3
超声时间, min			
4	74.2	415.5	0.045 9
8	73.2	301.7	0.163 5
12	63.8	303.0	0.098 8
16	60.7	361.5	0.013 9
20	68.5	457.5	-0.038 4
超声温度, °C			
30	67.8	443.8	0.027 3
40	63.4	486.3	-0.047 8
50	69.7	455.1	0.029 2
60	70.1	380.1	0.109 2
70	69.2	482.4	-0.002 4

2.5 响应面法优化制备工艺

2.5.1 响应模型的建立与分析 在单因素试验的基础上, 采用 Box-Behnken 响应面试验设计, 以脂药比(A)、药物质量浓度(B)、超声时间(C)、超声温度(D)4个因素

为响应因子, 以包封率和粒径为响应值, 采用4因素3水平共29组试验对制备工艺进行优化。因素与水平见表2, 试验方案与结果见表3。

表2 因素与水平

Tab 2 Factors and levels

水平	因素			
	$A(m/m)$	$B, mg/mL$	C, min	$D, °C$
-1	6:1	7	4	50
0	7:1	8	8	60
1	8:1	9	12	70

表3 试验方案与结果

Tab 3 Plans and results

试验号	A	B	C	D	包封率, %	粒径, nm
1	-1	0	-1	0	63.5	309.2
2	-1	0	1	0	59.4	400.8
3	0	0	0	0	86.2	321.0
4	0	1	1	0	64.2	390.9
5	1	0	1	0	67.4	322.4
6	1	0	0	1	76.7	312.3
7	1	-1	0	0	61.4	299.1
8	0	0	1	1	71.9	429.5
9	0	-1	-1	0	76.6	277.9
10	-1	0	0	-1	61.2	246.4
11	1	0	-1	0	71.6	260.7
12	0	-1	0	-1	63.9	273.3
13	0	1	0	-1	61.2	237.8
14	0	0	1	-1	64.4	260.4
15	0	0	0	0	85.8	225.6
16	1	0	0	-1	69.2	255.5
17	0	-1	0	1	74.3	285.6
18	0	0	0	0	81.9	215.5
19	0	0	-1	1	81.1	312.9
20	-1	1	0	0	58.4	320.4
21	0	1	0	1	66.2	246.1
22	1	1	0	0	76.3	249.6
23	0	1	-1	0	73.0	238.4
24	-1	0	0	1	60.9	300.5
25	-1	-1	0	0	68.4	252.1
26	0	-1	1	0	78.0	267.6
27	0	0	0	0	72.3	230.6
28	0	0	0	0	71.3	280.2
29	0	0	-1	-1	69.2	373.3

采用 Design-Expert 8.0 软件对表3的试验数据进行回归拟合, 得包封率、粒径对 A 、 B 、 C 、 D 的数学回归模型分别为: 包封率 = $81.50 + 4.23A - 1.94B - 2.31C + 3.67D + 6.23AB - 0.02AC + 1.95AD - 2.55BC - 1.35BD - 0.60CD - 9.80A^2 - 6.36B^2 - 3.81C^2 - 6.33D^2$; 粒径 = $254.61 - 10.82A + 2.3B + 33.28C + 28.34D - 29.46AB - 7.5AC + 0.675AD + 40.7BC - 1.01BD + 82.375CD + 12.88A^2 - 10.88B^2 + 64.7575C^2 + 25.96375D^2$ 。

根据剂型设计需要, 目标处方要求粒径小的同时包封率大, 且二者赋予相同的权重, 由此对模型进行方差分析, 结果见表4(表中, “*”表示 $P < 0.05$, “**”表示 $P < 0.01$)。

方差分析结果显示, 本试验所建模型的 P 小于 0.05, 表明该模型具有显著性; 模型失拟项的 P 分别为 0.919 9

表4 方差分析结果

Tab 4 Analysis results of variance

误差来源	包封率					粒径				
	均方差	自由度	离均差平方和	F	P	均方差	自由度	离均差平方和	F	P
A	215.05	1	215.05	7.69	0.015 0*	1 405.09	1	1 405.09	0.90	0.358 6
B	45.24	1	45.24	1.62	0.224 2	63.48	1	63.48	0.041	0.843 0
C	73.51	1	73.51	2.63	0.127 3	7 470.03	1	7 470.03	4.79	0.046 1*
D	147.00	1	147.00	5.25	0.037 9*	4 806.00	1	4 806.00	3.08	0.101 0
AB	155.00	1	155.00	5.54	0.033 7*	3 472.16	1	3 472.16	2.23	0.157 9
AC	2.50×10^{-3}	1	2.50×10^{-3}	8.94×10^{-5}	0.992 6	225.00	1	225.00	0.14	0.709 8
AD	15.21	1	15.21	0.54	0.473 1	1.82	1	1.82	1.17×10^{-3}	0.973 2
BC	26.01	1	26.01	0.93	0.351 3	6 625.96	1	6 625.96	4.25	0.058 4
BD	7.29	1	7.29	0.26	0.617 7	4.10	1	4.10	2.63×10^{-3}	0.959 8
CD	4.84	1	4.84	0.17	0.683 8	13 167.56	1	13 167.56	8.44	0.011 5*
A ²	492.85	1	492.85	17.62	0.000 9**	1 886.84	1	1 886.84	1.21	0.289 9
B ²	180.78	1	180.78	6.46	0.023 5*	292.34	1	292.34	0.19	0.671 6
C ²	57.57	1	57.57	2.06	0.173 4	20 650.94	1	20 650.94	13.24	0.002 7**
D ²	195.62	1	195.62	6.99	0.019 2*	2 016.20	1	2 016.20	1.29	0.274 6
模型	96.06	14	96.06	3.43	0.013 8*	4 357.70	14	61 007.81	2.79	0.032 2*
残差	27.98	14	391.67			1 559.62	14	2 834.71		
失拟	18.22	10	182.25	0.35	0.919 9	1 383.38	10	13 833.79	0.69	0.710 9
净误差	52.36	4	209.42			2 000.23	4	8 000.93		
总和		28	1 736.55				28	82 842.52		

和0.710 9,均大于0.05,不具有显著性。这提示模型与实际情况吻合好,试验误差较小。一次项中,A、D对包封率的线性效应影响显著,C对粒径的线性效应影响显著($P < 0.05$);二次项中,当以粒径为指标时,C与D的交互作用显著($P < 0.05$),其原因可能为温度会影响超声波声速(与超声波能量呈正比)和空化泡溃灭周期^[10-11],导致C对SLN的空化效应和机械粉碎作用也受到相应影响,最终对SLN的粒径产生影响。

2.5.2 各因素交互作用分析 采用Design-Expert 8.0软件绘制各因素对响应值影响的响应面图,通过响应面图来评价各因素与响应值之间的关联,以分析两个独立因素对响应值的响应情况(保持第三个因素为常数),详见图2。由图2可知,以包封率为响应值时,包封率随因素A、D的增加呈现先增加后降低的趋势;以粒径为响应值时,粒径随因素C的增加呈现先降低后增加的趋势,该结果与单因素试验的结果基本一致。响应面图的分布规律和间隔距离可反映出两个独立因素间交互作用的强弱及其对响应值的影响程度,底部等高线为椭圆形时表示两个独立因素间交互作用显著^[12]。当以包封率为指标时,因素A与B的等高线呈椭圆形,说明A与B交互作用显著;当以粒径为指标时,因素C与D的等高线呈椭圆形,说明C与D交互作用显著。

2.5.3 软件设计的最优条件 按照Design-Expert 8.0软件设计的最优条件:脂药比为7.67:1、药物质量浓度为8.91 mg/mL、超声时间为4.80 min、超声温度为65℃,制备3批诺氟沙星-SLN混悬液。结果,以包封率为响应值时,实测值为75.5%,预测值为78.9%,偏差为4.3%;以粒径为响应值时,实测值为223.3 nm,预测值为215.5 nm,偏差为-3.5%,上述偏差的绝对值均小于5%。这

提示模型的预测性能良好。

2.6 不同均质压力的考察

按照Design-Expert 8.0软件设计的最优条件:脂药比为7.67:1、药物质量浓度为8.91 mg/mL、超声时间为4.80 min、超声温度为65℃,制备3批诺氟沙星-SLN混悬液,考察不同均质压力对包封率和粒径的影响,结果见表5。

表5 不同均质压力的考察结果

Tab 5 Results of different homogeneous pressure scores

均质压力,MPa	包封率,%	粒径,nm	I,分
40	78.9	276.9	-0.001 9
60	69.0	166.0	0.135 9
80	73.5	120.1	0.247 2
100	69.7	99.9	0.259 6
120	79.2	79.9	0.355 7
140	69.5	94.9	0.267 4

由表5可知,均质压力为120 MPa时的I最高,因此均质压力选择120 MPa。

2.7 不同冻干保护剂种类及用量的考察

按照Design-Expert 8.0软件设计的最优条件:脂药比为7.67:1、药物质量浓度为8.91 mg/mL、超声时间为4.80 min、超声温度为65℃,制备3批诺氟沙星-SLN混悬液,以均质压力为120 MPa,考察不同冻干保护剂种类及用量^[13]对包封率和粒径的影响,结果见表6。

由表6可知,海藻糖用量为10%时的I最高,因此冻干保护剂选择海藻糖,用量为10%。

2.8 最优制备工艺的验证试验

最优制备工艺:脂质材料为三硬脂酸甘油酯、表面活性剂为大豆卵磷脂:泊洛沙姆188=1:2(m/m)、剪切速度为15 000 r/min、脂药比为7.67:1(m/m)、药物浓度

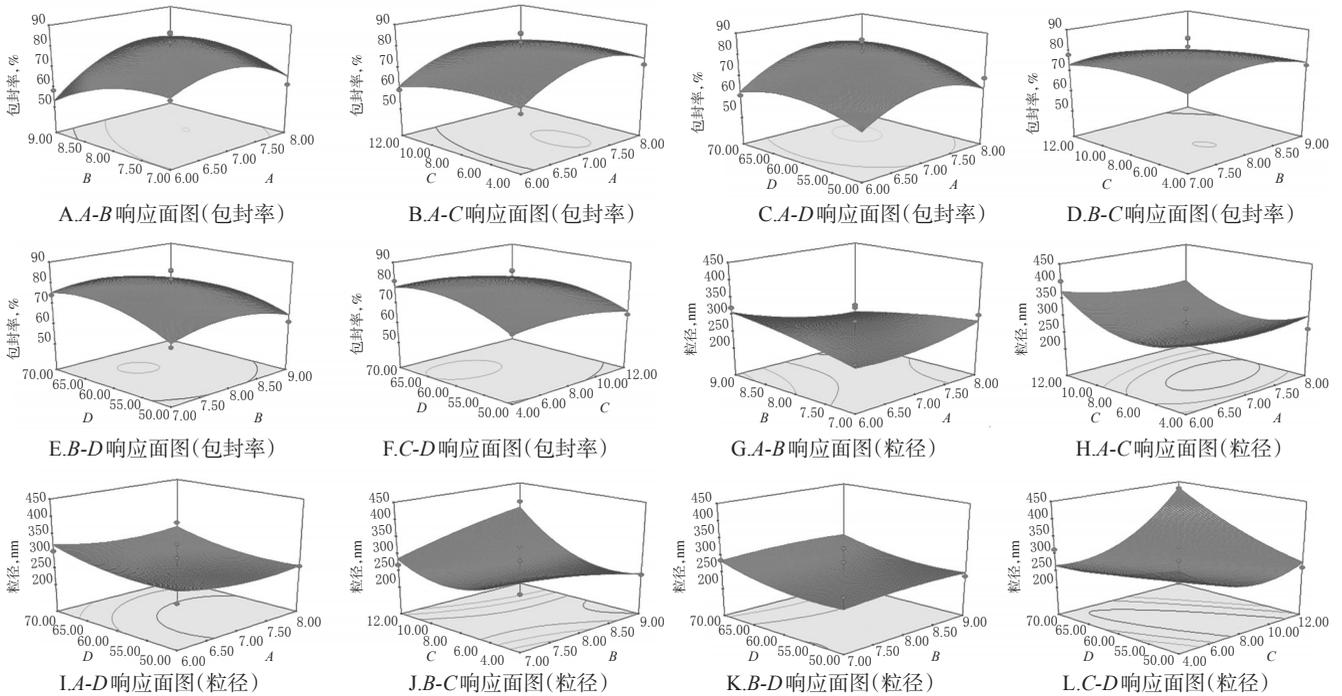


图2 各因素对包封率和粒径影响的响应面图

Fig 2 Response surface plot for the effects of each factor on encapsulation rate and particle size

表6 不同冻干保护剂种类及用量的考察结果

Tab 6 Results of different types and dosage of freeze-drying protectant

不同冻干保护剂种类及用量	包封率, %	粒径, nm	I, 分
2%蔗糖	70.6	93.5	0.148 7
5%蔗糖	74.8	84.1	0.196 7
10%蔗糖	80.1	80.5	0.235 5
2%甘露醇	77.2	191.7	-0.070 6
5%甘露醇	86.9	170.2	0.039 3
10%甘露醇	82.0	152.1	0.059 2
2%海藻糖	83.7	99.1	0.207 0
5%海藻糖	87.1	89.7	0.250 4
10%海藻糖	89.9	80.6	0.289 7

为8.91 mg/mL、超声时间为4.80 min、超声温度为65 °C、均质压力为120 MPa、冻干保护剂为10%海藻糖。按此工艺进行验证试验,平行操作3次,得诺氟沙星-SLN的平均包封率为(86.8 ± 5.1)%,平均粒径为(168.0 ± 4.8) nm。这说明所得的最优制备工艺稳定、可行。

2.9 诺氟沙星-SLN形态观察

采用透射电镜法观察诺氟沙星-SLN的形态^[14]。称取“2.8”项下制备的(按最优制备工艺)诺氟沙星-SLN冻干粉适量,加水稀释5倍,分散均匀后,取少量滴于覆有碳膜的铜网上,5 min后再次同法点样,用2%磷钨酸溶液染色,置于红外光灯下烘干,于透射电子显微镜下观察其微观形态,详见图3。由图3可知,制得的诺氟沙星-SLN大小均一,形态近似于球形。

2.10 诺氟沙星-SLN体外释放试验

采用透析法考察诺氟沙星-SLN的体外释放特性^[15]。取“2.8”项下制备的(按最优制备工艺)诺氟沙星-SLN冻干粉70.8 mg(理论含药量1 mg),共3份,分别置于不同

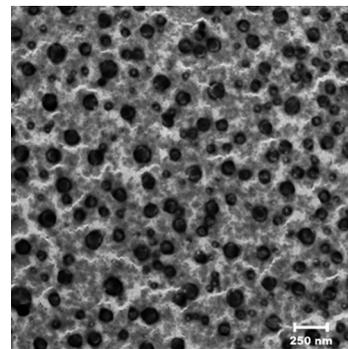


图3 诺氟沙星-SLN的透射电镜图(×10 000)

Fig 3 Transmission electron microscopy photo of Norfloxacin-SLN(×10 000)

透析袋中,加入释放介质(0.1 mol/L 盐酸溶液)100 mL,设定温度37 °C、转速100 r/min,进行体外释放试验。分别于0.5、1.0、1.5、2、3、4、5、6、8 h时取样1 mL,并立即补充等温的新鲜释放介质1 mL。将上述各时间点所取的释放液经0.22 μm微孔滤膜滤过,取续滤液于278 nm波长处测定吸光度,并计算药物累积释放度^[16]。以时间(*t*, h)为横坐标、累积释放度(*Q*, %)为纵坐标绘制体外释放曲线,详见图4。结果显示,诺氟沙星-SLN在1 h内有突释现象,1 h内的累积释放度为(53.6 ± 1.5)%,1 h后释放缓慢,8 h内的累积释放度为(75.7 ± 8.1)%,可见诺氟沙星-SLN具有较好的体外缓释性。将诺氟沙星-SLN的体外释放数据分别采用零级动力学方程、一级动力学方程、Higuchi方程和Weibull方程进行拟合,发现其符合Weibull方程,当Weibull方程中的指数*b*小于0.35时^[17](此曲线*b*为0.135),诺氟沙星-SLN释放属于无序渗流

过程,结果见表7(表中,a、b、e均为常数)。

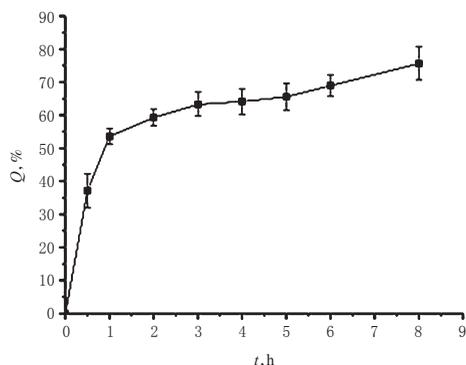


图4 诺氟沙星-SLN的体外释放曲线

Fig 4 Release curve for Norfloxacin-SLN *in vitro*

表7 诺氟沙星-SLN体外释放数据的模型拟合结果

Tab 7 Fitting results of Norfloxacin-SLN release data *in vitro*

数学模型	方程	r	拟合方程
零级动力学方程	$Q=bt+a$	0.791 4	$Q=4.002t+46.230$
一级动力学方程	$Q=a(1-e^{-bt})$	0.871 2	$Q=67.181(1-e^{-1.521t})$
Higuchi方程	$Q=bt^{1/2}+a$	0.882 0	$Q=34.08 3t^{1/2}+14.981$
Weibull方程	$Q=a\{1-e^{-[k(t-t_0)^b]}\}$	0.976 1	$Q=382.799\{1-e^{-[11.326(t-0.461)^{0.976}]\}$

3 讨论

本试验采用超声-高压均质法制备诺氟沙星-SLN。通过预试验发现,若将剪切后获得的乳液直接通过高压均质机,此时由于粒子粒径较大,容易造成高压均质机阻塞,无法完成后续操作。而先以超声处理来减小粒径,则可使粒子顺利通过高压均质机制备诺氟沙星-SLN。

在制备诺氟沙星-SLN的过程中,温度对粒径有一定影响,当温度较高时,所得粒子的粒径较小。这与粒子的粒径可随脂质材料黏性的变化而变化有关。在一定范围内温度越高,脂质材料的黏性越小,所得粒子的粒径也相应越小^[18]。均质压力对诺氟沙星-SLN的粒径也有一定的影响,随着压力的增加,所得粒子的粒径逐渐减小,但当压力增加到140 MPa后,粒径反而又增大。这可能是因为在大于50℃的温度下,当均质压力过大时,柔性固体(或半固体)态的SLN比表面积较大,表面能较高,粒子会自发地聚集,从而导致粒径有所增加^[19]。

诺氟沙星-SLN与游离药物的分离是测定包封率的关键。本试验曾考虑采用低速离心法测定包封率,但分离效果不佳,由于纳米粒下沉所需要的离心力主要取决于纳米粒的粒径大小,低速离心只能使粒径大的纳米粒沉降,而不适于沉降粒径小的纳米粒。而本研究中诺氟沙星-SLN的粒径小且分布窄,因此选择超滤离心法测定包封率。由于脂质材料不溶于0.1 mol/L盐酸溶液,而药物可溶于该溶液并以分子状态存在,因此超滤离心法可使诺氟沙星-SLN与游离药物得到良好的分离。

综上所述,制得的诺氟沙星-SLN形态良好,粒径适宜,具有较好的体外缓释性。

参考文献

- [1] 高家荣. 诺氟沙星的应用与制剂研究进展[J]. 安徽医学, 1994, 21(6): 44-45.
- [2] 陈木娟. 临床氟喹诺酮类药的药理分析[J]. 中国现代药物应用, 2016, 10(8): 271-272.
- [3] 李洪, 高玉梅, 王刚, 等. 诺氟沙星胃漂浮缓释片犬体内药动学及生物等效性研究[J]. 中国药房, 2009, 20(16): 1216-1217.
- [4] SUTER F, SCHMID D, WANDREY F, et al. Heptapeptide-loaded solid lipid nanoparticles for cosmetic anti-aging applications[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2016, 10(8): 304-309.
- [5] AMASYA G, SANDRI G, ONAYBESIKCI A, et al. Skin localization of lipid nanoparticles (SLN/NLC): focusing the influence of formulation parameters[J]. *Curr Drug Deliv*, 2016, 13(7): 1100-1110.
- [6] 夏爱晓, 宋倩倩, 孙渊. 固体脂质纳米粒的制备及应用研究进展[J]. 药学实践杂志, 2012, 30(5): 331-333.
- [7] 王影, 李京京, 陆兵. 固体脂质纳米粒的制备及应用研究进展[J]. 生物技术通讯, 2006, 17(3): 471-475.
- [8] 钟惠平, 胡世木. 紫外分光光度法测定氟哌酸胶囊[J]. 中国医院药学杂志, 1990, 10(1): 28-29.
- [9] 李翔, 陈颖, 王雅晖, 等. 多西紫杉醇纳米结构脂质载体中主药含量及包封率测定[J]. 中国药房, 2008, 19(22): 1743-1745.
- [10] 庞昊斐, 祝锡晶, 王璟, 等. 温度对超声清洗中空化泡动力学特性的影响[J]. 表面技术, 2016, 45(8): 150-155.
- [11] 江泽涛, 俞子荣, 万光逵. 温度对液体中超声速度的影响[J]. 南昌航空工业学院学报, 1998, 12(2): 47-51.
- [12] 魏磊, 李晓, 王学方, 等. 紫苏叶总三萜超声提取工艺优化及对10种常见致病菌的抑菌作用研究[J]. 中国药房, 2018, 29(16): 2193-2197.
- [13] 姚艳胜, 季鹏, 刘畅, 等. 柚皮素固体脂质纳米粒冻干粉制备及其大鼠肺部给药药动学研究[J]. 中草药, 2016, 47(4): 591-598.
- [14] 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.
- [15] 陈卫军, 袁勇, 王鲁妹, 等. 异甘草素固体脂质纳米粒包封率测定方法的研究[J]. 中国药房, 2011, 22(21): 1994-1995.
- [16] 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.
- [17] PAPAPOULOU V, KOSMIDIS K, VLACHOU M, et al. On the use of the weibull function for the discernment of drug release mechanisms[J]. *Int J Pharm*, 2006, 309(1/2): 44-50.
- [18] 张生杰. 穿心莲内酯衍生物ATC- II 固体脂质纳米粒给药系统研究[D]. 开封: 河南大学, 2012.
- [19] SINGH S, DOBHAL AK, JAIN A, et al. Formulation and evaluation of solid lipid nanoparticles of a water soluble drug: zidovudine[J]. *Chem Pharm Bull*, 2010, 58(5): 650-655.

(收稿日期:2018-04-26 修回日期:2018-09-23)

(编辑:陈宏)