

超临界辅助喷雾法用于固体脂质纳米粒的制备

叶邦阜^{1,2}, 袁弘¹, 杜永忠¹, 胡富强^{1*} (1.浙江大学药学院, 杭州 310058; 2.杭州盛友医药技术开发有限公司, 杭州 310018)

摘要: 目的 采用超临界辅助喷雾制粒法制备固体脂质纳米粒, 并考察工艺与处方因素对纳米粒理化性质的影响。方法 采用自制超临界喷雾制粒设备, 制备硬脂酸脂质纳米粒, 考察硬脂酸浓度、超临界流体 CO₂ 与载体溶液流量比、喷嘴孔径等对固体脂质纳米粒粒径的影响, 筛选合适的处方工艺参数; 以亲水性大分子药物胰岛素为模型药物, 制备载药固体脂质纳米粒, 评价纳米粒的粒径、电位、包封率、释放度等理化性质。结果 制备得到的纳米粒粒径与载体浓度、超临界流体 CO₂ 与载体溶液流量比、喷嘴孔径有关, 通过处方工艺的调节, 可制得平均粒径<300 nm 的固体脂质纳米粒; 制得的胰岛素固体脂质纳米粒的平均粒径约 300 nm, 包封率 72.2%, 载药量为 3.44%, 载药纳米粒在体外可实现 12 h 缓慢释放; 处方中加入泊洛沙姆可减小纳米粒粒径和粒度分布, 但药物的包封率降低, 并且突释现象更明显。结论 超临界辅助喷雾制粒法可用于固体脂质纳米粒的制备, 并能够对亲水性药物实现有效的包封和释放的调节。

关键词: 超临界辅助喷雾法; 固体脂质纳米粒; 固体脂质微粒; 胰岛素; 硬脂酸

中图分类号: R943.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2011)03-0247-05

Supercritical Assisted Atomization for Preparation of Solid Lipid Nanoparticles

YE Bangfu^{1,2}, YUAN Hong¹, DU Yongzhong¹, HU Fuqiang^{1*} (1.College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2.Hangzhou Sunyou Pharma-tech Co., Ltd., Hangzhou 310018, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To prepare the solid lipid nanoparticles(SLN) via supercritical assisted atomization(SAA) and investigate the effect of formulation and process on physicochemical characteristics of nanoparticles (NPs). **METHODS** With self-made SAA particle-producing equipment, stearic acid(SA) based SLN was produced, and the effect of SA concentration, flow ratio of supercritical CO₂ and material solution, pore size of nozzle, on particle size of SLN were investigated to discover the appropriate process conditions. SLN loading insulin, a hydrophilic macromolecule drug, was produced and their physicochemical characteristics was observed, such as size, zeta-potential, entrapment efficiency(EE) and drug-loading ratio(DL). **RESULTS** Particle size of NPs was depended on material concentration, flow ratio of supercritical CO₂ and material solution, pore size of nozzle. SLN with mean size <300 nm were obtained through formulation and process adjustment during preparation. Insulin-loaded SLN with mean size of about 300 nm, EE 72.2% and DL 3.44% was obtained, which released drug slowly during 12 h *in vitro*. Poloxamer-modified formulation made SLN with reduced size and distribution range, meanwhile the drug EE was decreased and burst-release was significant. **CONCLUSION** SAA is successfully applied to produce SLN and hydrophilic-drug-loaded SLN with modified releasing profile.

KEY WORDS: supercritical assisted atomization; solid lipid nanoparticles; solid lipid microparticles; insulin; stearic acid

与聚合物纳米粒、乳剂、脂质体等微粒给药系统相比, 固体脂质纳米粒(solid lipid nanoparticles, SLN)具有特有的优势, 包括可避免药物降解、控制药物释放以及良好的靶向性等^[1], 能够口服或注射给药。目前 SLN 的制备多采用高压乳匀法、乳化法、溶剂扩散法等, 这些制备方法还存在制备过程长、工艺过程复杂、对水溶性药物包封效率低、药物突释等缺点; 因此, SLN 制备新方法的研究一直是药剂学研究热点之一。

超临界流体法制备微粒和结晶是近十几年来国际上积极开发的新技术, 与传统的粉碎及结晶技术相比, 本法可避免大量使用有机溶剂及由此而造成的环境污染和除去产品中残留有机溶剂的繁琐步骤, 并可用于热敏感、结构不稳定及易失活变性的蛋白质、多肽类药物^[2], 因此近年来广受关注。目前发展的以超临界流体技术为基础的微粒化技术大致上可将其分为 5 类^[3]: ①超临界溶液快速膨胀法(rapid expansion of supercritical

作者简介: 叶邦阜, 男, 硕士生 Tel: (0571)86737983
Tel: (0571)88208439 E-mail: hufq@zju.edu.cn

E-mail: yetseng@163.com

*通信作者: 胡富强, 男, 博士, 教授

solution, RESS); ② 气体饱和溶液沉析法 (precipitation from gas saturated solution, PGSS); ③ 超临界流体抗溶剂沉淀(结晶)法 (supercritical anti-solvent, SAS); ④ 超临界流体辅助雾化法 (supercritical assisted atomization, SAA); ⑤ 超临界流体乳剂萃取法 (supercritical fluid extraction of emulsions, SFEE)。其中前 3 种方法发展较早, 应用较多, 但在制药领域应用的局限性也是显著的, 如 RESS 要求使用的药物或载体材料能够溶解于超临界流体中、而 SAS 需将超临界流体溶解于熔融的药物液体中, 这 2 种方法均受到药物本身理化性质与稳定性的限制; SAS 工艺周期较长、制备量小, 无法满足工业化连续生产的要求。SAA 和 SFEE 是近年国外提出的新应用方法, 国内文献报道较少。其中 SAA^[3]将超临界流体溶解或乳化于药物溶液中, 在混合液喷出后, 在超临界流体膨胀作用下形成微细的液滴, 液滴再经干燥得到微粒; 其超临界流体与药物溶液的混合可采用饱和器或微型三通的方式。该制备方法目前主要应用于实验研究, 但对于连续制备条件下, 粒子的收集与溶剂的排除尚缺乏有效的手段, 而其应用也主要在于药物微粒的制备^[3-6], 其中 Reverchon 等^[6]尝试从实验室小规模到实现中试规模 SAA 制备硝酸氧锆微粒以及利福平微粒。近两年国外有少数涉及超临界流体技术制备聚合物微粒^[7]、脂质体^[8]方面的研究, 但并未见载药固体脂质纳米粒方面的研究报道。

本研究根据 SAA 的原理, 自行设计并制造了超临界辅助喷雾制粒设备, 通过该设备能够精密控制制备过程中温度、压力、超临界流体流量比等工艺参数。利用该设备, 本研究对 SAA 制备 SLN 的工艺参数和亲水性大分子药物胰岛素 SLN 的制备进行了初步的探索。

1 材料与仪器

1.1 材料

硬脂酸(stearic acid, SA, 湖州展望药业有限公司); 卵磷脂(soya lecithin, SL, 上海太伟药业有限公司); 胰岛素(insulin, 江苏徐州万邦制药有限公司); 泊洛沙姆[Poloxamer 188, PO, 药用辅料, 巴斯夫(中国)有限公司]; Cremophor EL[聚氧乙烯醚(35)蓖麻油, Cremophor, 药用辅料, 巴斯夫(中国)有限公司]; 其他试剂为分析纯或色谱纯试剂。

1.2 仪器

超临界流体辅助喷雾造粒仪(自制); 3000HS 微粒粒度与 Zeta 电位测定仪(Malvern, UK); 3K30 型高速离心机(Sigma 公司); XW-80A 旋涡振荡仪(上海医科大学仪器厂); PVDF 微孔滤膜(0.1 μm , 密理博中国有限公司); HZ-8812S 型恒温振荡仪(太仓市科教器材厂); JW92-II 型超声波细胞粉碎仪(宁波新芝科器研究所); Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司)。

2 方法与结果

2.1 硬脂酸脂质纳米粒的制备

采用自制的超临界辅助喷雾造粒仪, 仪器结构见图 1, 制备硬脂酸纳米粒。具体操作方法: 开启抽风机, 空气经净化、加热后进入干燥箱, 控制干燥箱的进风口温度约为 80 $^{\circ}\text{C}$ 。称取硬脂酸 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5 g, 分别溶解于 100 mL 无水乙醇中, 取硬脂酸乙醇溶液加入溶剂储液罐中, 预热至 65 $^{\circ}\text{C}$, 通过恒流泵输送至气液混合室, 流速 10 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 二氧化碳经冷却、加压后形成超临界流体, 加热至 65 $^{\circ}\text{C}$ 后, 送入气液混合室, 超临界 CO_2 的输送速度为 30 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 气液混合室的温度控制在 65 $^{\circ}\text{C}$, 当混合室的压力达到 9 MPa 时, 开启阀门, 使混合液通过 0.2 mm 孔径的喷嘴喷入干燥箱, 喷雾完成后, 在收集罐中收集粒子。

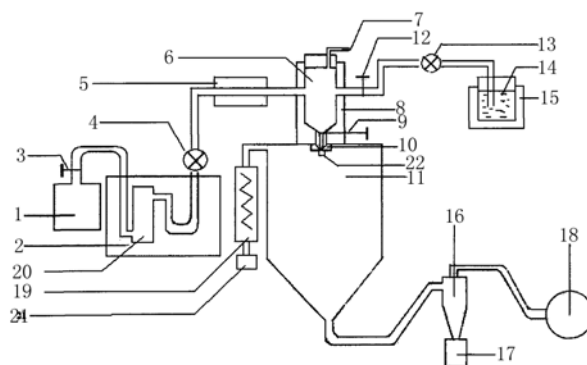


图 1 超临界流体辅助喷雾造粒设备剖面

1-二氧化碳钢瓶; 2-冷却水槽; 3-阀门; 4-柱塞泵; 5-加热器; 6-气液混合室(饱和室); 7-压力监控; 8-加热套; 9-阀门; 10-喷嘴基座; 11-干燥箱; 12-阀门; 13-恒流泵; 14-溶剂储液罐; 15-加热套; 16-旋风分离器; 17-收集罐; 18-抽气机; 19-空气加热器; 20-超临界二氧化碳储罐; 21-空气过滤器; 22-喷嘴

Fig 1 Profile of SAA particle-producing equipment

1-CO₂ cylinder; 2-cooling bath; 3-valve; 4-piston pump; 5-heater; 6-saturator; 7-pressure monitor; 8-heat-exchanger; 9-valve; 10-nozzle base; 11-dry chamber; 12-valve; 13-fluid pump; 14-solvate vessel; 15-heat-exchanger; 16-cyclone separator; 17-collector; 18-vacuum pump; 19-heat-exchanger; 20-super-critical CO₂ vessel; 21-air filter; 22-nozzle

称取硬脂酸 0.5 g, 溶解于 100 mL 无水乙醇中, 预热后通过恒流泵输送至气液混合室, 流速 $10 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 调节超临界 CO_2 的输送速度分别为 5, 10, 20, 30, $50 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 通过 0.2 mm 孔径的喷嘴喷雾制粒。

称取硬脂酸 0.5 g, 溶解于 100 mL 无水乙醇中, 预热后通过恒流泵输送至气液混合室, 流速 $10 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 超临界 CO_2 的输送速度为 $30 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 分别通过 0.08, 0.2, 0.5 mm 和 1 mm 孔径的喷嘴喷雾制粒。

2.2 胰岛素脂质纳米粒的制备

称取硬脂酸 0.9 g、卵磷脂 0.1 g, 加入无水乙醇 100 mL, 水浴超声使溶解; 精密称取胰岛素 50 mg, 溶解于少量人工胃液(1 mL)中。将上述两液混合均匀, 倒入制粒设备溶剂储液罐中。开启制粒设备, 设定超临界 CO_2 的预热温度 65°C , 硬脂酸溶液预热至 65°C , 气液混合室预热温度 65°C , 干燥热风进风温度 75°C ; 饱和压力控制在 10 MPa, 溶剂与超临界 CO_2 的流量比为 1 : 3。采用 0.2 mm 孔径的喷嘴制备, 收集制备得到的粉末, 分析。

另称取硬脂酸 0.9 g、卵磷脂 0.1 g, 泊洛沙姆 0.1 g, 加入无水乙醇 100 mL, 水浴超声使溶解; 精密称取胰岛素 50 mg, 溶解于少量人工胃液(1 mL)中。将上述两液混合均匀, 制备经泊洛沙姆修饰处方的脂质纳米粒。

2.3 脂质纳米粒理化性质测定

2.3.1 粒径分布和表面电位测定 取纳米粒粉末 25 mg, 用 0.1%泊洛沙姆溶液 25 mL 分散, 探头超声(超声强度 300 W, 工作 2 s、停 3 s)20 次分散, 取分散液 1 mL, 用蒸馏水稀释 20 倍, 测定粒径和表面电位。

从结果可知气液混合室中负载硬脂酸的浓度对最终制得微粒的粒径产生显著的影响, 见图 2。随着载体浓度的提高(0.1%~5%), 制得粒子的平均粒径由约 50 nm 上升至约 $3.5 \mu\text{m}$, 当载体浓度在 $1 \text{ g} \cdot (100 \text{ mL})^{-1}$ 乙醇溶液以下时制得粒径 $<1 \mu\text{m}$ 的亚微粒, 载体浓度在 $0.5 \text{ g} \cdot (100 \text{ mL})^{-1}$ 以下时可制得 500 nm 以下的纳米粒。

在固定辅助溶剂通过恒流泵输入气液混合室速度的前提下, 随着泵入超临界 CO_2 流体速度的加快, 气液混合室中溶剂与超临界流体的比例逐步下降, 导致制得的硬脂酸纳米粒的粒径呈相应下降的趋势。当超临界流体泵入速率为 10

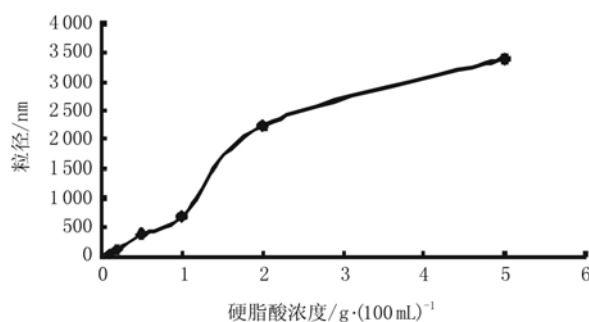


图 2 载体浓度对制备粒子粒径的影响

Fig 2 Effect of material concentration on size of particles

$\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 以上时, 制得的固体脂质微粒粒径约为 $1 \mu\text{m}$ 或更大, 当超临界流体速率提高至 $30 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 以上时, 可制得平均粒径 500 nm 以下的固体脂质纳米粒, 结果见图 3。

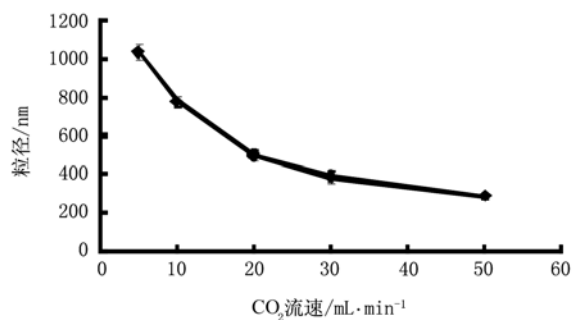


图 3 二氧化碳流速对硬脂酸微粒粒径的影响

Fig 3 Effect of flow rate of CO_2 on size of particles

喷嘴孔径对制得纳米粒的粒径有较大的影响。当喷嘴的孔径由 0.08 mm 增加至 1 mm 过程中, 所得脂质微粒的平均粒径同步增大, 孔径 0.08 mm 和 0.2 mm 的喷嘴制得的粒径均 $<400 \text{ nm}$, 结果见图 4。

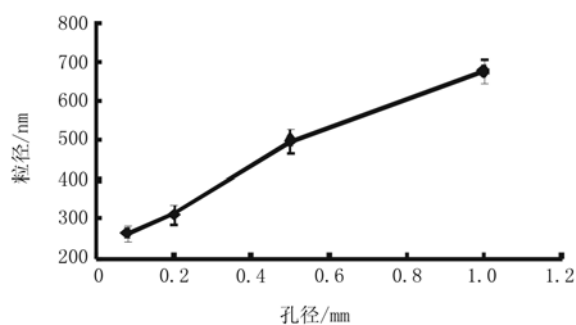


图 4 喷嘴孔径对载药微粒粒径的影响

Fig 4 Effect of pore size of nozzle on size of particles

胰岛素脂质纳米粒的粒径与电位见表 1。制得的胰岛素 SLN 呈 130 nm 和 322 nm 双峰分布, 而

加入亲水性表面活性剂泊洛沙姆 188 后, 制得纳米粒的粒径明显减小, 纳米粒呈单峰分布, 粒度分布更均匀。

表 1 载药纳米粒的理化性质评价

Tab 1 Determination of physicochemical characteristics of drug-loaded nanoparticles

处方组成	平均粒径		聚合指数	电位/mV	包封率/%	载药率/%
	面积/%	平均/nm				
INS-SA-SLN	55.3	130.1±66.3	0.484	-22.8±1.2	72.2	3.44
	44.7	322.1±178.3				
INS-SA-SLN (PO 修饰)	100.0	173.7±90.0	0.605	-14.8±0.4	63.9	2.78

2.3.2 包封率测定

2.3.2.1 色谱条件^[9] 色谱柱: ZORBAX 300SB-C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相: 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钠溶液(磷酸调节 pH 至 3.0)-乙腈(730:275)(含 0.1 mol·L⁻¹ 无水硫酸钠), 检测波长: 214 nm, 柱温: 40 °C, 流速: 1.0 mL·min⁻¹, 进样量: 20 μL。

2.3.2.2 胰岛素(INS)标准曲线的制备 精密称取 INS 10.0 mg, 溶于 50 mL 的流动相中。依次用流动相稀释得到系列浓度的标准溶液(100, 80, 40, 20, 10, 5, 1 μg·mL⁻¹), 照上述条件测定。由药物浓度(C, μg·mL⁻¹)对峰面积(A)回归, 得标准曲线: $C=7.9487A-4.2615(r=0.9999)$, 在 1~100 μg·mL⁻¹ 内, 峰面积与浓度之间线性关系良好。

2.3.2.3 检测限 采用逐步稀释法, 当信噪比 S/N≥3 时, 测定药物的最低检测限。本法的药物最低检测限为 0.1 μg·mL⁻¹。

2.3.2.4 包封率与载药量测定 取各处方的载药脂质纳米粒 10 mg, 加入含 0.1% Cremophor 的 pH 7.2 PBS 25 mL, 旋涡振荡 3 min 分散, 分散液用 0.1 μm 微孔滤膜过滤, HPLC 测定滤液中胰岛素含量, 计算纳米粒中胰岛素的包封率和载药量, 结果见表 1。包封率(EE)%=(投药量-游离药物)/投药量×100%; 载药量(DL)%=(投药量-游离药物)/(投药量+脂质材料总量)×100%。

测定结果显示, INS-SA-SLN 的包封率和载药率分别为 72.2%和 3.44%, 当处方中加入泊洛沙姆后, 虽然制得的纳米粒粒径较小, 分布较均匀, 但胰岛素的包封率均有所降低(63.9%), 这可能是由于泊洛沙姆的亲水性导致包封在 SLN 浅表层的药物与释放液接触后迅速游离有关, 而释放试验中胰岛素在 0.5 h 的突释也说明了这一情况。

2.4 胰岛素脂质纳米粒的体外释放

称取胰岛素脂质纳米粒 20 mg, 加入 50 mL pH 6.8 PBS(含 1.5 %甘氨酸、0.08% Cremophor)溶液^[9]中, 旋涡震荡分散, 将释放管置于 37 °C 恒温振荡仪中, 振荡频率 60 次·min⁻¹, 定时(0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12 h)取样 1 mL, 于 20 000 r·min⁻¹ 下离心 15 min, 取上清液经 0.1 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液进行 HPLC 测定, 计算药物经时累积的释放度, 结果见图 5。

释放结果显示, 经本法制得的纳米粒有效抑制了胰岛素的释放, 实现胰岛素在脂质纳米粒中约 12 h 缓慢释放, 同时未经修饰的 INS-SA-SLN (R1)释放速率较慢(尤其在前 4 h 内), 经泊洛沙姆修饰的纳米粒(R2)在初始 0.5 h 内呈现明显的突释现象, 提示加入亲水性表面活性剂对纳米粒的释放产生明显的影响, 因此采用亲水性表面活性剂修饰 SLN, 材料的用量和品种尚需进一步探讨。

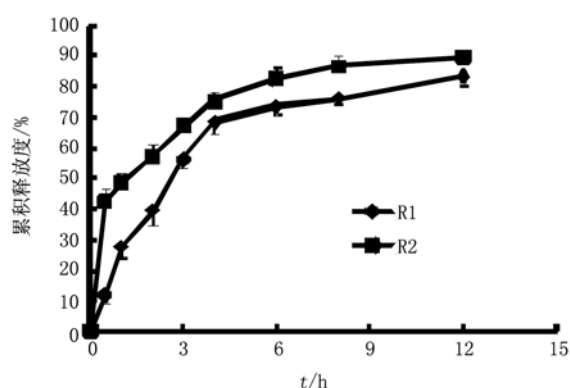


图 5 载药固体脂质纳米粒释放

R1-胰岛素固体脂质纳米粒; R2-泊洛沙姆修饰的胰岛素固体脂质纳米粒

Fig 5 Releasing profile of drug-loaded solid lipid nanoparticles

R1-insulin loaded solid lipid nanoparticles; R2-poloxamer modified insulin loaded solid lipid nanoparticles

3 讨论

根据文献报道的装置^[6,10], 本实验室自行设计的超临界流体辅助喷雾造粒设备, 对饱和器和干燥腔体等进行了一定程度的改良, 提高了饱和器(即气液混合室)对亲水性药物的容纳能力, 并提高喷雾微粒的干燥效率。成功应用此设备制备了以硬脂酸为载体的固体脂质微粒和包载亲水性药物(胰岛素)的固体脂质纳米粒小试样品。并且通过对气液混合室中载体材料的浓度、超临界 CO₂ 的泵

入速率以及喷嘴孔径的大小实现对最终成型粒子的粒径进行调节。试验结果显示本法制得的胰岛素固体脂质纳米粒粒径、包封率和载药率均比较理想,在以 pH 6.8 的 PBS 溶液(含 1.5%甘氨酸、0.08% Cremophor)为释放介质的条件下实现约 12 h 缓慢释放。

为改善 SLN 的粒径分布以及避免 SLN 在体内被吞噬细胞吞噬,引入具有聚氧乙烯链段的亲水性表面活性剂泊洛沙姆 188。试验结果表明,脂质材料中加入泊洛沙姆后,制得的胰岛素 SLN 具有更小的粒径和更窄的粒径分布宽度。但泊洛沙姆的加入使脂质载体对胰岛素的包封率降低并在纳米粒释放初期(0.5 h 内)出现明显的突释现象,推测泊洛沙姆的两亲性作用和其本身的水溶性,使得水分能够迅速渗入 SLN 内,加快了包封于 SLN 表层药物的溶解、释放,而泊洛沙姆本身溶解后也影响了 SLN 规则的晶体结构,从而导致载体对胰岛素的包封能力下降,并产生明显的突释现象。

根据超临界辅助喷雾原理设计的自制超临界辅助喷雾制粒装置采用气液混合室与喷嘴一体化的保温设计,有效减少二氧化碳与溶剂的混合液喷出时引起的喷嘴降温,进一步保证喷雾的顺利进行,并减少因温度波动而引起的粒子大小变化。由于该辅助喷雾装置与干燥收集装置巧妙连接,实验显示该设备可连续、高效、方便地制备与收集粒子,具备适用于纳米粒化制药工业连续生产的初步能力。

REFERENCES

- [1] MULLER R H, MADER K, GOHLA S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery-a review of the state of art [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2000, 50(1): 161-177.
- [2] CHENG Y, PING Q N. Supercritical fluid precipitation technology and its application in pharmaceuticals [J]. *Prog Pharm Sci(药学进展)*, 2004, 28(2): 63-67.
- [3] ZHANG C X, XU L Z, WU S X. Progress on preparation of drug loading microparticles by supercritical assisted atomization [J]. *Chin J Pharm(中国医药工业杂志)*, 2009, 40(11): 856-861.
- [4] CAI M Q, GUAN Y X, YAO S J, et al. Supercritical fluid assisted atomization introduced by hydrodynamic cavitation mixer for micronization of roxithromycin [J]. *J Chem Ind Eng(化工学报)*, 2008, 59(2): 293-300.
- [5] REVERCHON E, DELLA P G. Micronization of antibiotics by supercritical assisted atomization [J]. *J Supercrit Fluid*, 2003, 26(3): 243-252.
- [6] REVERCHON E, ADAMIA R, CAPUTO G. Supercritical assisted atomization: Performance comparison between laboratory and pilot scale [J]. *J Supercrit Fluid*, 2006, 37 (3): 298-306.
- [7] REVERCHON E, ANTONACCI A. Polymer microparticles production by supercritical assisted atomization [J]. *J Supercrit Fluid*, 2007, 39(3): 444-452.
- [8] RODRIGUES M A, LI J, PADRELA L, et al. Anti-solvent effect in the production of lysozyme nanoparticles by supercritical fluid-assisted atomization processes [J]. *J Supercrit Fluid*, 2009, 48(3): 253-260.
- [9] ZHANG J M, HU F Q, YING X Y, et al. Studies on insulin-loaded stearylamine nanoparticles: preparation and physicochemical properties [J]. *Chin Pharm J(中国药学杂志)*, 2004, 39(08): 349-352.
- [10] ZHU Z Q, GUAN Y X, YAO S J. Micronization of drugs suitable for aerosol delivery by supercritical fluid assisted atomization [J]. *J Chem Ind Eng(化工学报)*, 2005, 56(2): 187-196.

收稿日期: 2010-08-26