

黄芩苷纳米结晶的制备工艺

张秋菊¹, 洪彤彤¹, 魏世杰^{1,2}, 隋宏^{1,3}, 王文革^{1,3*}

(1. 宁夏医科大学药学院, 银川 750004; 2. 宁夏医科大学附属总医院临床药理研究室, 银川 750004;
3. 宁夏回药现代化工程技术研究中心, 银川 750004)

[摘要] 目的: 优选黄芩苷纳米结晶的制备工艺并考察其稳定性。方法: 以粒径及多分散系数(PDI)为指标, 采用单因素试验优选黄芩苷纳米混悬液的制备工艺; 经离心富集和冷冻干燥制备黄芩苷纳米结晶, 观察结晶形态, 比较混悬液与冻干粉的初步稳定性; 采用摇瓶法测定平衡溶解度。结果: 最佳制备工艺为黄芩苷溶于二甲基亚砜中配成 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液, 注入20倍量0.5%卵磷脂水溶液中, 冰水浴下 $30\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 高速剪切8 min; 制备的纳米混悬液粒径 280.6 nm (PDI=0.047), 纳米结晶粒径 583.6 nm (PDI=0.12), 结晶呈类球形; 室温放置30 d后混悬液粒径急剧增大, 而冻干粉粒径无明显变化。纳米结晶溶解度较原药提高了1.64倍。结论: 沉淀法制备黄芩苷纳米混悬液简便可行且可显著提高纳米结晶中黄芩苷的溶解度, 但工艺条件对纳米结晶粒径及稳定性存在一定影响。

[关键词] 黄芩苷; 纳米结晶; 沉淀法; 稳定性考察; 冷冻干燥工艺

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)24-0014-05

[doi] 10.11653/syfj2013240014

Preparation Technology of Baicalin Nanocrystallines

ZHANG Qiu-ju¹, HONG Tong-tong¹, WEI Shi-jie^{1,2}, SUI Hong^{1,3}, WANG Wen-ping^{1,3*}

(1. School of Pharmacy, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China;

2. Institute of Clinical Pharmacology, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China;

3. Ningxia Engineering & Technology Research Center For
Modernization of Hui Medicine, Yinchuan 750004, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize preparation process of baicalin nanocrystallines and investigate its stability. **Method:** Taking mean particle size and polydispersity index (PDI) as indicators, preparation process of

[收稿日期] 20131022(012)

[基金项目] 2011年宁夏自然科学基金项目(NZ11103)

[第一作者] 张秋菊, 在读硕士, 从事新型载药材料及给药系统研究, Tel: 13629501070, E-mail: zhangqiuju00@126.com

[通讯作者] *王文革, 博士, 副教授, 从事新型载药材料及给药系统研究, Tel: 0951-6880581, E-mail: wangwenping@sina.com

[2] 王英凯, 王丹, 唐彤宇. 鳖甲为主的中药治疗肝纤维化的实验室和临床研究[J]. 临床肝胆病杂志, 2002, 18(4): 253.

[3] 高建蓉, 陶君, 张赤志, 等. 鳖甲防治肝纤维化实验研究[J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(11): 2462.

[4] 姚立, 姚真敏, 余涛. 鳖甲煎口服液对大鼠肝纤维化的影响[J]. 中药药理与临床, 2002, 18(6): 5.

[5] 高建蓉, 张赤志, 邵志华, 等. 鳖甲对肝星状细胞增殖影响的研究[J]. 实用医学杂志, 2007, 23(11): 16.

[6] 周大寨, 朱玉昌, 周毅锋, 等. 芸豆蛋白质的提取及超滤分离研究[J]. 食品科学, 2008, 29(8): 386.

[7] 郑领英, 王学松. 膜技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000: 48.

[8] 王爱华. 微滤-超滤法与醇沉法在山楂水提取液精制中的比较[J]. 湖北中医药大学学报, 2011, 13(3): 30.

[9] 盛占武, 孙志高, 黄学根, 等. 超滤法提取橙皮苷工艺研究[J]. 食品科学, 2008, 29(2): 188.

[10] 蒋菁莉, 任发政, 蔡华伟. 牛乳酪蛋白降血压肽的超滤分离[J]. 食品科学, 2006, 27(7): 124.

[责任编辑 全燕]

baicalin nanosuspensions was optimized by single factor tests. Baicalin nanocrystallines was then collected by centrifugation and freeze-dried, morphology of obtained nanocrystals were analyzed, initial stability of nanosuspensions and its freeze-dried powder were also observed. Equilibrium solubility of coarse baicalin and nanocrystals was compared by shaking flask method. Result: Nanosuspensions were prepared by injecting 1 mL of baicalin solution in DMSO ($50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) into 20 mL of 0.5% lecithin solution by a high shear of $30\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ for 8 min under ice-water bath. These obtained nanocrystals showed an average particle size of 280.6 nm (PDI = 0.047) and that of 583.6 nm (PDI = 0.12) after freeze-drying, these nanocrystals were investigated as spherical particles; Particle size of nanosuspensions increased up to 672.0 nm after stored at room temperature for 30 d, but no significant change was found for freeze-dried powder of nanocrystals. Equilibrium solubility of nanocrystals showed as 1.64-fold of coarse baicalin. Conclusion: Precipitation method showed to be a simple and feasible approach to prepare baicalin nanosuspensions with solubility increased, but more attention should be paid to collection and drying process which affect particle size and stability of nanocrystals.

[**Key words**] baicalin; nanocrystals; precipitation technique; investigation of stability; freeze-drying technology

黄芩苷为黄芩的主要有效成分,属黄酮类化合物,难溶于水及大多数有机溶剂。现代药理研究表明黄芩苷具有广谱抑菌、利尿、抗炎、抗变态及解痉等作用^[1],但由于其溶解性和稳定性不佳,临床应用受到极大限制,尝试利用 β -环糊精包合、固体分散体、磷脂复合物、纳米粒等新技术解决该问题,但存在工艺复杂、载药量低等局限^[2]。

纳米混悬液技术可降低药物的粒径,改善溶解度和加速溶出以达到提高生物利用度等目的^[3-5]。岳鹏飞等^[6]利用高速剪切将黄芩苷原料分散后,利用高压均质机于 850 bar 循环均质 25 次,制得平均粒径 483.4 nm 的黄芩苷纳米结晶,体内外评价结果表明纳米结晶的溶解、溶出、吸收均得到显著改善。本实验拟采用沉淀法制备黄芩苷纳米结晶,通过单因素试验优选工艺参数并对制备的纳米结晶进行初步评价,为黄芩苷纳米结晶作为中间体的新剂型开发提供参考。

1 材料

Nicomp 380 ZLS 型 Zeta 电位/粒度分析仪(美国 PSS 公司),RCT basic 型磁力搅拌器(德国 IKA 公司),Z323K 型离心机(德国赫默),FD-1C 型冷冻干燥机(北京德天佑仪器有限公司),THZ-100B 型恒温培养摇床(上海一恒科学仪器有限公司),ABS210S 型电子天平(德国 Sartorius 公司),QL-861 型涡旋仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司)。

黄芩苷原料药(上海标准品物质研究中心,含量 90.5%),泊洛沙姆 188(德国 BASF),聚乙烯醇(上海阿拉丁试剂公司),卵磷脂(大豆)/SPC(上海楷洋生物技术有限公司),聚山梨酯-80(美国

Amresco 公司),丙三醇、聚乙二醇(PEG400)、二甲基亚砜(DMSO)(天津市大茂化学试剂厂),水为纯化水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 黄芩苷纳米结晶的制备 采用沉淀法制备。量取一定量溶剂将药物配制成 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液,以 0.5% 稳定剂水溶液作为不良溶剂,于 $30\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的高速剪切作用下将一定量黄芩苷溶液缓慢注入至一定体积的不良溶剂中,持续剪切 8 min,即得。

2.2 单因素试验考察

2.2.1 溶剂^[7] 黄芩苷在丙三醇、PEG400 和 DMSO 中溶解度分别为 21 000,27 317,409 370 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,远高于其他有机溶剂。综合考虑溶剂残留毒性等因素,选用丙三醇、PEG-400、丙三醇-PEG400 (1:1)及 DMSO 作为良溶剂溶解黄芩苷,以水为不良溶剂,固定药物溶液与水的体积比 1:20,考察不同溶剂对结晶粒径及其分布的影响,结果见图 1,表明随着黄芩苷在溶剂中溶解度的增大,制备的纳米结晶粒径逐渐减小,以 DMSO 为良溶剂时样品粒径最小(474.7 nm)且较均匀,多分散系数(PDI) = 0.151。

2.2.2 药物溶液与水的体积比 调整黄芩苷的 DMSO 溶液和水的体积比分别为 1:10,1:20,1:40,1:60,考察样品的粒径及其分布,结果见图 2,表明随着水体积比例的降低,样品粒径逐渐减小,当比例达到 1:20 时,粒径降至最小(540.1 nm)且较均匀(PDI = 0.119),继续减少水体积则粒径再度增大。

2.2.3 稳定剂种类 分别以聚山梨酯-80、泊洛沙

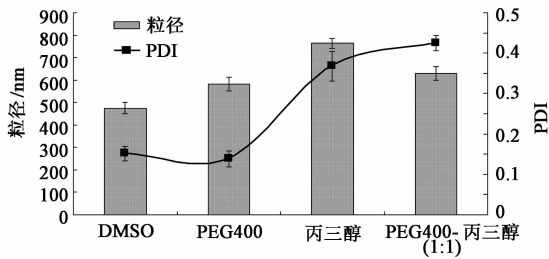


图 1 不同溶剂对黄芩苷纳米混悬液粒径及分布的影响

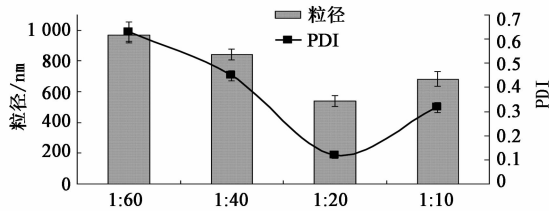


图 2 溶剂与不良溶剂的比例对黄芩苷纳米混悬液粒径及分布的影响

姆 188, 聚乙烯醇、卵磷脂为稳定剂配制成 0.5% 的水溶液作为不良溶剂, 考察纳米悬液粒径及其分布, 结果见图 3, 显示以卵磷脂为稳定剂时制备的样品粒径最小(307.76 nm)且分布均匀(PDI = 0.124)。

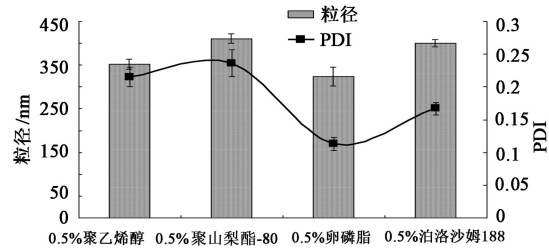


图 3 稳定剂对黄芩苷纳米混悬液粒径及分布的影响

2.2.4 操作温度 分别在室温和冰水浴中高速剪切 8 min, 考察温度对纳米悬液粒径及其分布的影响。结果显示在室温下样品粒径 348.5 nm (PDI = 0.112), 冰水浴下样品粒径较室温下剪切更小, 粒径 282.4 nm (PDI = 0.044)。随着水相温度的升高, 沉淀的粒径出现增长, 主要是由于粒径分布不均匀而引起的, 即 Ostwald 现象^[8-9]。

2.3 离心富集工艺考察 将制备的混悬液(粒径 307.2 nm, PDI = 0.112)于 4 ℃ 高速离心(10 000 r·min⁻¹)10 min, 弃去上清液; 沉淀加少量水涡旋分散, 测定粒径 586.6 nm (PDI = 0.224), 经 30 000 r·min⁻¹高速剪切 5 min, 测定粒径 379.7 nm (PDI = 0.198), 表明离心后粒径有所增大, 但经过二次高速剪切后粒径减小, 离心后粒径增大可能是在离心过程中粒子团聚, 使得颗粒粒径逐渐增大, 故离心后的纳米结晶需经二次高速剪切再分散。

2.4 纳米结晶的冷冻干燥 考察 2 种冻干条件对

纳米结晶粒径及 PI 的影响。①向离心后再分散的浓缩液中加入 5% 甘露醇作为冻干保护剂; ②加入 5% 甘露醇和 0.5% 卵磷脂作为稳定剂。将上述溶液立即置于 -20 ℃ 冰箱中预冻 24 h, 置于冷冻干燥机中冷干 48 h, 即得纳米结晶粉末。结果单纯以甘露醇作为保护剂制备的样品粒径 906.0 nm (PDI = 0.264), 而甘露醇与卵磷脂配合使用时样品粒径 577.6 nm (PDI = 0.165), 因为卵磷脂的加入减慢了颗粒的聚集和长大, 但经冻干后纳米结晶粒径仍显著增大。

2.5 粒径的测定 依照优选的工艺条件重复制备黄芩苷纳米混悬液 3 批, 采用粒度分析仪测定粒径, 记录平均粒径及 PDI, 纳米混悬液用适量水稀释至药物质量浓度约 0.25 g·L⁻¹ 后测定, 结果平均粒径 (280.6 ± 17) nm, PDI = 0.047 ± 0.0091。依照 2.4 项下冻干条件以 5% 甘露醇为冻干保护剂, 0.5% 卵磷脂为稳定剂制备 3 批冻干纳米结晶, 将制得的纳米结晶粉末分散于适量水中使其质量浓度与稀释后混悬液浓度一致, 涡旋分散均匀后测定, 结果冷冻干燥后纳米结晶重分散在水中后平均粒径 (583.6 ± 23.6) nm, PDI = 0.12 ± 0.014, 见图 4。

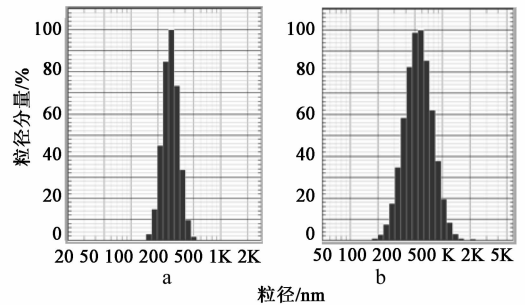


图 4 黄芩苷纳米悬液(a)和黄芩苷纳米结晶(b)的粒径分布

2.6 形态观察 取制备的黄芩苷纳米混悬液适量, 加水稀释, 滴加于铜网上, 干燥后在透射电镜下(TEM)观察并拍照, 见图 5, 结果显示黄芩苷纳米混悬液中粒子形态呈类球形。

2.7 初步稳定性考察 将黄芩苷纳米混悬液与冻干粉在室温下放置, 分别于 7, 14, 30 d 取样, 观察样品外观形态并测定粒径, 结果见表 1, 表明纳米混悬液在放置过程中粒径逐渐增大, 冻干粉则变化较小。虽然在冻干过程中颗粒粒径增大, 但冻干后在放置过程中外观和粒径均无明显变化, 故可将黄芩苷纳米结晶制成冻干粉以改善稳定性。

2.8 溶解度的测定 采用摇瓶法测定样品的平衡溶解度^[10]。分别将过量的黄芩苷原料药、黄芩苷和甘露醇的物理混合物、黄芩苷纳米结晶冻干粉置于

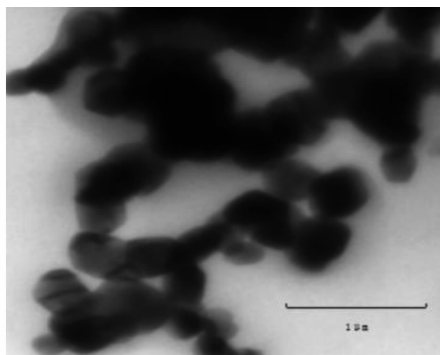


图5 黄芩苷纳米混悬液 TEM

表1 黄芩苷纳米混悬液和冻干纳米结晶的稳定性考察

样品	时间/d	外观	粒径/nm
纳米混悬液	7	黄色乳液,有少量粒子沉降	397 ± 22.7
	14	黄色乳液,有部分粒子沉降	483 ± 29.5
	30	黄色乳液,有肉眼可见的颗粒,部分沉降	672 ± 31.0
冻干纳米结晶	7	黄色粉末,表面光滑	576 ± 11.5
	14	黄色粉末,表面光滑	594 ± 16.0
	30	黄色粉末,表面光滑	615 ± 13.4

5 mL 离心管中,加入 pH 7.4 磷酸盐(PBS)缓冲液 3 mL,置于(37 ± 0.1) °C 振荡箱内 100 r·min⁻¹ 连续振荡 72 h,立即取样 2 mL 以 10 000 r·min⁻¹ 高速离心 5 min,取上清液经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,滤液用 PBS 缓冲液适当稀释,采用 HPLC 测定,计算饱和溶解度,色谱条件为检测波长 280 nm,流速 0.8 mL·min⁻¹,柱温 30 °C,进样量 20 μL,ODSC18 反相色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),流动相甲醇-0.2% 磷酸溶液(60:40)。结果发现黄芩苷制成纳米结晶后溶解度由原药的(94.02 ± 2.68) mg·L⁻¹ 提高至(154.04 ± 2.45) mg·L⁻¹,溶解度显著改善;而物理混合物溶解度(95.70 ± 1.69) mg·L⁻¹,表明辅料对原药溶解度参数几乎无影响,故推测纳米结晶溶解度的提高源于药物粒子的减小而非其他原因。

3 讨论

纳米混悬剂的主要制备方法有递质研磨法、高压均质法、沉淀法等,实际应用时常联合使用多种方法。递质研磨法适用于水溶性不佳、水和有机溶剂均难溶的药物,制品粒径分布窄、制法简单、利于推广,但该法常因研磨介质的磨损而导致有毒物质进入制剂,故不适用于静脉用注射纳米混悬剂的制备。高压均质法制备纳米混悬剂具有可控性强、重复性高、无需加入有机溶剂等优点^[11],适用于水油均难溶的药物,但药物需经预处理后微粉化、使其粒径 ≤

25 μm,且高压均质所需机械力大、设备磨损较快、设备昂贵、生产成本低,使用受限。沉淀法制备纳米混悬液的突出优势在于操作简便、耗能小,适用于稳定性较差的药物,不适于水和非水溶剂均难溶者^[12],制品一般粒径较大、分布较宽,且常用有机溶剂溶解药物、存在残留和安全性隐患^[13]。本文采用 DMSO 溶解黄芩苷,毒性极低,在离心富集纳米结晶的同时几乎可完全除去 DMSO,避免了有机溶剂残留的问题,经系统筛选最终采用沉淀法。

纳米混悬剂属热力学不稳定体系,粒子具有自发聚集的趋势以最小化其表面自由能^[14-15],因此需要加入适量、适宜的稳定剂,通过立体稳定、静电稳定和静电立体稳定^[16]等机制防止粒子聚结增长、改善再分散性。在沉淀法制备纳米混悬液过程中,卵磷脂分子可吸附在药物分子表面,产生空间位阻迫使药物分子分离,达到立体稳定的目的。

纳米混悬液物理稳定性的提高常通过冷冻、喷雾工艺将其转化成干燥粉末或进一步加工成固体制剂。本文比较了纳米混悬液和纳米冻干粉初步稳定性,结果显示冻干粉稳定性明显优于纳米混悬液。在冻干过程中甘露醇的加入可使溶质被固定在液态时的位置,有利于保持药物化学结构及其活性的完整性^[17],防止纳米颗粒的不断增大;同时应用甘露醇和卵磷脂时,其稳定效果更佳,可能是甘露醇替代了水分子与卵磷脂的头部基团形成氢键^[18],使纳米粒子周围水分子减少,从而减少了在冷冻时形成的冰晶,还可以在纳米颗粒间形成空间位阻,阻止纳米颗粒的聚合和融合。

【参考文献】

- [1] 颜耀东,黄晓洁,段亚冬,等.黄芩甙眼膏的研制及临床运用[J].中西医结合眼科杂志,1994(3):151.
- [2] 王川,赵雪梅,郝吉福,等.新技术和新剂型改善黄芩苷生物利用度的研究进展[J].中成药,2012,34(3):545.
- [3] Moschwitz J, Achleitner G, Pomper H, et al. Development of an intravenously injectable chemically stable aqueous ome-prazole formulation using nanosuspension technology[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2004,58(4):615.
- [4] Eerdenbrugh B V, Mooter G V den, Augustijns P. Top-down production of drug nanocrystals: nanosuspension stabilization, miniaturization and transformation into solid products[J]. Int J Pharm, 2008,364(1):64.
- [5] Keck C M, Müller R H. Drug nanocrystals of poorly

- soluble drugs produced by high pressure homogenisation [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2006, 62(1):3.
- [6] Yue P F, Li Y, Wan J, et al. Process optimization and evaluation of novel baicalin solid nanocrystals [J]. *Int J Nanomedicine*, 2013(8):2961.
- [7] 王雷, 王学艳, 周雪琴, 等. 黄芩苷在不同溶媒中的稳定性研究 [J]. *中国药师*, 2006, 9(2):129.
- [8] Jacobs C, Kayser O, Müller R H. Nanosuspensions as a new approach for the formulation for the poorly soluble drug tarazepide [J]. *Int J Pharm*, 2000, 196(2):161.
- [9] Hemar Y, Horne D S. A diffusing wave spectroscopy study of the kinetics of Ostwald ripening in protein-stabilised oil/water emulsions [J]. *Colloids Surf B: Biointerfaces*, 1999, 12(3/6):239.
- [10] 胡程耀, 黄培. 固体溶解度测定方法的近期研究进展 [J]. *药物分析杂志*, 2010, 30(4):761.
- [11] Grau M J, Kayser O, Müller R H. Nanosuspensions of poorly soluble drugs-reproducibility of small scale production [J]. *Int J Pharm*, 2000, 196(2):155.
- [12] Müller R H, Jacobs C, Kayser O. Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy: Rationale for development and what we can expect for the future [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 47(1):3.
- [13] Kocbek P, Baumgartner S, Kristl J. Preparation and evaluation of nanosuspensions for enhancing the dissolution of poorly soluble drugs [J]. *Int J Pharm*, 2003, 12(1/2):179.
- [14] Wong J, Brugger A, Khare A, et al. Suspensions for intravenous (IV) injection: a review of development, preclinical and clinical aspects [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, 60(8):939.
- [16] Kesisoglou F, Panmai S, Wu Y H. Nanosizing-oral formulation development and biopharmaceutical evaluation [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2007, 59(7):631.
- [17] Apte S P, Ugwu S O. A review and classification of emerging excipients in parenteral medications [J]. *Pharm Tec*, 2003, 27(3):46.
- [18] 储茂泉, 古宏晨, 刘国杰. 冷冻保护剂对丹参酮脂质体冻融后粒度分布的影响及机理考察 [J]. *中国医药工业杂志*, 2002, 33(9):445.

[责任编辑 全燕]

欢迎订阅 2014 年度《中国实验方剂学杂志》

《中国实验方剂学杂志》由国家中医药管理局主管,中国中医科学院中药研究所和中国中西医结合学会中药专业委员会主办的学术刊物,已成为“中国中文核心期刊”;“中国学术期刊综合评价数据库来源”期刊、“中国期刊网、中国学术期刊光盘版”全文收录期刊、美国《化学文摘》统计源期刊;并被评为“中国中医药优秀期刊”及“中国学术期刊优秀期刊”。本刊创刊于1995年10月,本着提高为主,提高与普及相结合的办刊方针,主要设置:工艺与制剂、化学与分析、资源与鉴定、药物代谢、药理、毒理、临床、数据挖掘、综述、学术交流、信息等栏目,交流方剂的药效学、毒理学、药物动力学、药物化学、制剂学、质量标准、配伍研究、临床研究、学术专论以及方剂主要组成药物的研究成果与最新进展。本刊的读者对象是从事中西医药,尤其是方剂教学、科研、医疗、生产的高、中级工作者,以及中医药院校的高年级学生等。

本刊现为半月刊,16开本,192页,标准刊号:ISSN1005-9903;CN11-3495/R。每期定价35元,全年840元。国内外公开发行,国内由北京市报刊发行局办理总发行,邮发代号:2-417;国外由中国国际图书贸易总公司办理发行,代号:SM4655。欢迎订阅。本刊编辑部也办理邮购。地址:北京市东直门内南小街16号,《中国实验方剂学杂志》编辑部,邮编:100700,联系电话:(010)84076882,电子邮件:syfjx_2010@188.com,网址:www.syfjxzz.com。