

白藜芦醇纳米混悬液的制备及固化

刘凯, 童达君, 何媛

(江苏恒瑞医药股份有限公司, 国家靶向药物工程技术研究中心, 江苏 连云港 222047)

摘要: 目的 制备并固化白藜芦醇纳米混悬液。方法 采用反溶剂沉淀法和高压均质法制备白藜芦醇纳米混悬液, 冷冻干燥法进行固化。结果 采用反溶剂沉淀法制备了粒径为 120.3 nm 的白藜芦醇纳米混悬液, 固化后的释放度实验结果表明, 白藜芦醇的纳米化有力地促进了其体外释放速度。结论 制备的纳米混悬液处方简单, 可固化并进一步制备为胶囊剂或片剂等其他固体制剂。

关键词: 白藜芦醇; 纳米混悬液; 固化; 高压均质

中图分类号: R944.1⁺6 文献标识码: A 文章编号: 2095-5375(2016)04-0222-004

doi: 10.13506/j.cnki.jpr.2016.04.010

The preparation of resveratrol nano-suspensions and its solidification

LIU Kai, TONG Dajun, HE Yuan

(Jiangsu Hengrui Medicine Co., Ltd., Lianyungang 222047, China)

Abstract: Objective To prepare resveratrol nano-suspensions and solidify the suspensions. **Methods** Resveratrol nano-suspensions were obtained by anti-solvent precipitation and high pressure homogenization and the suspensions were solidified by freezing-drying process. **Results** Anti-solvent precipitation was chosen to prepared resveratrol nano-suspensions with mean particle size of prepared nanoparticle was 120.3 nm. After solidification, the dissolution rate of resveratrol was significantly improved using in vitro experiment assay. **Conclusion** The method used to prepare resveratrol nano-suspension was simple. It was suitable for preparing capsules or tablets after solidification.

Key words: Resveratrol; Nanosuspension; Solidification; High pressure homogenization

白藜芦醇(Resveratrol), 又称虎杖苷元, 是一种非黄酮类的多酚化合物。近些年来的研究结果证实, 白藜芦醇具有抗肿瘤、降低血小板聚集、预防动脉粥样硬化、预防高血脂、抗氧化、抗炎、提升免疫系统活性等多种药理活性^[1-2]。尤其白藜芦醇的抗肿瘤活性已成为今年的研究热点, 研究发现, 白藜芦醇对激素依赖性肿瘤有明显的预防作用, 也对卵巢癌、结肠癌、胃癌、肝癌、前列腺癌、白血病等肿瘤细胞具有不同程度的抑制作用, 其广谱抗肿瘤活性使得白藜芦醇具有广阔的发展前景^[3-4]。但白藜芦醇难溶于水, 口服生物利用度极低, 只有 1% 左右, 其血药浓度远远低于体外实验的有效浓度^[5]。因此, 为了提高其体内药理活性, 如何利用现代制剂学手段提高其溶解度和溶出速率, 是当前白藜芦醇口服制剂研究面临的主要问题。

在所有的纳米药物载体系统中, 纳米结晶混悬液具有最高的载药量。与传统意义上的基质骨架型纳米体系相比, 纳米混悬液不需要载体材料, 通过表面稳定剂的稳定作用, 将纳米级药物粒子分散在水中形成稳定的体系。纳米混悬液有以下的优势: 载药量高、粒径小、比表面积大, 与生物膜有较强的黏附作用, 不易被清除, 能够提高难溶性药物的生物利用度。

根据 Noyes-Whitney 方程, 增加药物的表面积和药物溶解度将增加其溶出速度, 进而提高生物利用度。现采用反溶剂沉淀法和高压均质技术制备白藜芦醇纳米混悬剂, 以增加其表面积, 从而增加其溶解度。以粒径和 Zeta 电位为指标, 研究了不同的处方及工艺对纳米混悬剂的影响, 并采用冷冻干燥法实现纳米混悬液的固化, 并考察其对溶出速度的

作者简介: 刘凯, 男, 博士研究生, 主管药师, 研究方向: 新药制剂研发, E-mail: hrsluikai@163.com

通信作者: 童达君, 男, 博士研究生, 研究方向: 新型制剂技术研究, Tel: 0518-81220136, E-mail: 9954141@qq.com

影响。

1 仪器与试剂

AL104 电子天平(Mettler Toledo 仪器上海有限公司); 高速剪切机(德国 IKA 公司); DF - 101S 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); Nicomp380 Z3000 激光粒度测定仪(苏州微流纳米生物技术有限公司); 冷冻干燥机(E - 1000, Tokyo Rikakikai 公司); KQ - 100 型超声波清洗器(美国 Santa Barbara 公司) NanoGenizer 高压均质机(苏州微流纳米生物技术有限公司)。

市售白藜芦醇胶囊(北京龙兴科技股份有限公司 批号: 20140707, 300 mg/粒); 聚乙烯吡咯烷酮(PVP K30)、PVP - VA64、泊洛沙姆 407(F127)、F68、Soluplus(德国巴斯夫公司); 甘露醇、麦芽糖、蔗糖、PE/4000 和 HPMC E5(天津博迪化工有限公司); 乳糖(德国美剂乐公司); 海藻糖(南宁市海江贸易有限公司); 十二烷基硫酸钠(SDS)(中国禹王化工有限公司)。

2 方法与结果

2.1 白藜芦醇纳米混悬液的制备

2.1.1 反溶剂沉淀法 稳定剂种类的影响: 分别选用不同类型的稳定剂, 包括 PVP K30、PVP - VA64、F127、SDS、PEG4000、HPMC E5、Soluplus, 考察其制备白藜芦醇纳米混悬液时对粒径的影响。具体制备过程为, 首先配制浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的白藜芦醇乙醇溶液; 然后用注射器将 2 mL 的上述溶液快速注入转速为 200 rpm 的稳定剂溶液(100 mL 稳定剂与药物质量比为 1.5:1) 中, 持续搅拌 5 min, 得到白藜芦醇纳米混悬液。

以 Soluplus 作为稳定剂制备的纳米混悬液呈现明显的蓝色透明乳光, 而以 HPMC E5 和 F127 作为稳定剂制备的混悬液呈现不透明乳白色。其他稳定剂如 PVP K30、PVP - VA64、F68、SDS、PEG4000 所得的混悬液均呈现不透明乳白色, 粒径均在 350 nm 以上(见图 1)。因此, 使用 Soluplus 作为纳米混悬液的稳定剂进行后续研究。

稳定剂与药物比例的影响: 分别配制浓度为 0.2、0.3、0.4 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ Soluplus 溶液各 100 mL。控制反应条件: 制备温度为 $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 搅拌速度为 200 rpm, 将浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的白藜芦醇乙醇溶液 2 mL 注入 Soluplus 溶液中, 持续搅拌 5 min 得到纳米混悬液。结果 Soluplus 浓度为 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 混悬液为乳白色, 平均粒径为 353.6 nm, 粒径分布不均匀; 当 Soluplus 浓度分别为 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 0.4

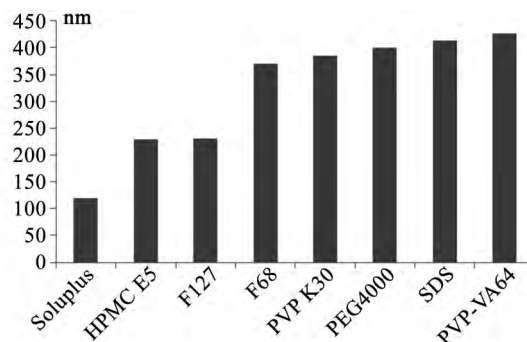


图 1 不同稳定剂制备的白藜芦醇纳米混悬剂平均粒径测定结果

$\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 所制得的白藜芦醇纳米混悬液的粒子平均粒径分别为 128.3 nm 和 122.2 nm, 粒径分布均一, 呈现明显的蓝色乳光。由此可见, 稳定剂与药物的比例从 1.5:1 增加到 2:1 时, 白藜芦醇纳米混悬液的粒径变化不大, 从进一步提高载药角度考虑, 确定 Soluplus 与白藜芦醇比例为 1.5:1。

搅拌速度的影响: 白藜芦醇乙醇溶液浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 稳定剂 Soluplus 浓度为 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 制备温度为 $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 搅拌速度为 200、400、600、800 rpm 时, 将 2 mL 白藜芦醇乙醇溶液快速注入 100 mL Soluplus 溶液中, 继续搅拌 5 min, 得到纳米混悬液。

在不同搅拌速度下, 纳米混悬液粒径在 120 nm 左右, 外观澄清, 有蓝色乳光。考虑到实验操作的简便, 选择 200 rpm 的搅拌速度。

2.1.2 高压均质法 称取白藜芦醇适量 20 mg, 加入溶有 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 Soluplus 水溶液 100 mL, 用高速剪切机以 10 000 rpm 转速乳化 3 min, 然后在高压均质机中以 50 MPa 的高压条件循环 3 次, 再以 80 MPa 循环 12 次, 样品迅速冷却固化, 即得纳米混悬液。

2.2 物理稳定性考察 将采用相同处方, 但制备工艺不同(反溶剂沉淀法和高压均质法) 所制得的白藜芦醇纳米混悬液置于室温 $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存 7 d, 观察并测定粒径变化。结果表明, 采用反溶剂沉淀法制备的白藜芦醇纳米混悬液外观澄清透明, 粒子平均粒径一直稳定在 120 nm 左右; 而采用高压均质法制得的白藜芦醇纳米混悬液, 外观由蓝色逐渐变为乳白色, 平均粒径也从 150 nm 增大至 550 nm。与高压均质法相比, 反溶剂沉淀法制备的白藜芦醇纳米混悬液更加稳定, 鉴于其相对简单的制备工艺, 因此后续研究确定采用反溶剂沉淀法制备白藜芦醇纳米混悬液。

为进一步考察制剂稳定性, 我们将反溶剂沉淀法

制备的白藜芦醇纳米混悬液置于不同的温度条件下 (4、25、37 °C) 保存 7 d, 观察并测定粒径, 结果见表 1。

表 1 白藜芦醇纳米混悬液在不同温度下放置 7 d 后的平均粒径及粒径分布

批次	0 d		7 d 25 °C		7 d 4 °C		7 d 37 °C	
	粒径 (nm)	PDI	粒径 (nm)	PDI	粒径 (nm)	PDI	粒径 (nm)	PDI
1	129.6	0.19	130.7	0.20	135.6	0.21	140.6	0.26
2	125.	0.14	126.3	0.21	139.8	0.25	142.3	0.24
3	128.6	0.15	129.6	0.16	138.6	0.23	150.6	0.21

2.1.3 最优处方和制备工艺的确定 通过上述试验, 我们确定了白藜芦醇纳米混悬液的最优处方和制备工艺: 白藜芦醇药物浓度为 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 稳定剂为 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 Soluplus 溶液, 药物与 Soluplus 的比例为 1:1.5 (W/W)。搅拌速度为 200 rpm 的条件下, 将 2 mL 白藜芦醇乙醇溶液注入 100 mL Soluplus 溶液中, 持续搅拌 5 min, 即得。

2.2 白藜芦醇混悬液的固化 为提高纳米化药物的物理稳定性, 采用冷冻干燥法将制备的白藜芦醇纳米混悬液固化。

2.2.1 冻干保护剂筛选 以复溶前后的粒径变化为指标对冻干保护剂进行筛选, 取 100 mg 甘露醇、乳糖、蔗糖、海藻糖、麦芽糖加入装有 2 mL 白藜芦醇纳米混悬液西林瓶中, 首先在 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱预冻, 于 $-30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、真空度 200 Pa 条件下冷冻干燥 36 h, 得白藜芦醇纳米冻干粉。加水复溶, 观察复溶难易程度, 并测定粒径变化。结果表明, 以甘露醇为冻干保护剂的纳米混悬剂复溶效果最好, 与冻干前相比, 粒径变化最小, 因此采用甘露醇作为冻干保护剂 (见表 2)。

表 2 不同冻干保护剂对纳米混悬液的冻干保护效果

冻干保护剂	外观形态	复溶难易程度
- ^a	粗糙, 粘附于瓶底	困难 ^d
甘露醇	蓬松, 饱满	容易 ^b
蔗糖	疏松, 有些许皱缩	较困难 ^c
乳糖	多孔	容易
海藻糖	多孔	较困难
麦芽糖	多孔	容易

注: ^a 未添加任何冻干保护剂; ^b 加水即重新分散; ^c 振摇 1 min 重新分散; ^d 振摇 3 min 后仍难分散

2.3 纳米混悬剂的表征 按照最优处方工艺制备的纳米混悬剂, 有透明淡蓝色乳光出现。使用激光粒度分析仪测定粒径、PDI 以及 Zeta 电位, 平均粒径为 120.3 nm (见图 2), PDI 为 0.16, Zeta 电位为 -7.3 mV 。

取制备的白藜芦醇纳米混悬液稀释 10~20 倍, 滴加到覆盖碳膜的铜网上, 自然挥干后, 以 1% 磷钨酸进行负染 20 s, 滤纸吸掉多余染色剂, 自然干燥。透射电镜观察白藜芦醇纳米晶的形状为球状 (见图 3)。

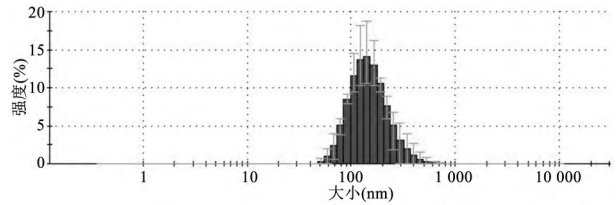


图 2 白藜芦醇纳米混悬液粒径

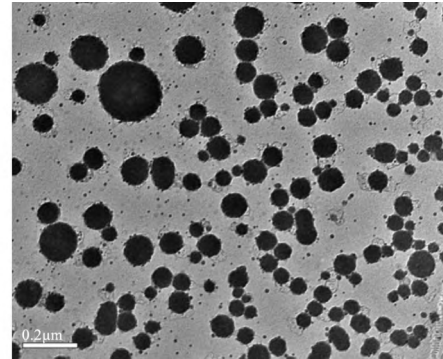


图 3 白藜芦醇纳米混悬液的透射电镜图

2.4 释放度的测定 取冻干粉装入 1 号胶囊, 用转篮法进行体外释放行为考察。以 2% SDS 磷酸盐缓冲液 900 mL 作为释放介质, 转速为 100 rpm, $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 。在 0.5、10、20、30、45、60 min 分别取介质 5 mL, 同时补加新鲜的空白介质溶液。取出液用 $0.45 \text{ } \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 取续滤液进行 HPLC 测定浓度, 计算冻干粉在不同时间的累积释放量。绘制累积释放曲线, 并与市售胶囊进行对比。参考文献^[6]所采用的色谱条件如下: 色谱柱为 Thermo Scientific Hypersil ODS-C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水 (40:60, V/V); 流速为 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 检测波长为 306 nm; 柱温为 $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$; 进样量为 20 μL。

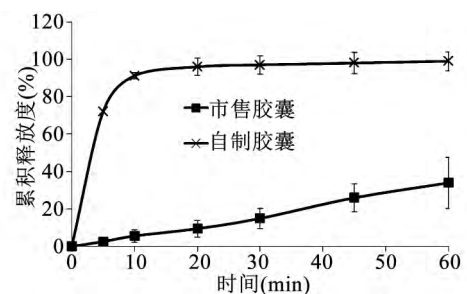


图 4 白藜芦醇在 2.0% SDS 磷酸盐缓冲液的释放行为

试验结果表明, 在 10 min 的时候, 市售胶囊的累积释放量不到 6%, 而所制备的纳米药物胶囊, 释放量已超过 90%。这可能是由于其较小的粒径增加了表面积, 极大程度地提高了白藜芦醇的溶出速度, 这必将有利于其提高药物的口服吸收。

3 讨论

纳米混悬剂具有载药量高, 毒副作用小, 生物利

用度高等优点,但是其物理稳定性差制约着其应用和产业化。通过加入稳定剂如 HPMC E5、Soluplus、泊洛沙姆类等,可以有效提高纳米混悬液的稳定性。稳定剂一般分为电荷型和空间位阻型两大类。电荷型稳定剂吸附于药物粒子的表面,通过静电斥力来防止粒子的聚集;而空间稳定型则通过空间位阻作用来使粒子分离^[7]。

本试验选用空间稳定型 Soluplus 与药物比例为 1:1 时,粒子较大,可能是因为 Soluplus 不足以完全包围白藜芦醇纳米粒子的外表面,溶解的白藜芦醇不断吸附在裸露的白藜芦醇晶体表面,导致粒子聚集长大,而当 Soluplus 与药物比例超过 1:1 时,混悬液中粒子的大小基本不变,对粒径影响较小。

纳米混悬液经过冷冻干燥后^[8]可以制备成片剂或者胶囊剂,固体制剂具有使用方便,剂量准确,患者依从性好等优点。本试验采用了冷冻干燥法进行纳米混悬液的固化,通过筛选合适的冻干保护剂以及用量,制备的冻干粉复溶后粒径与冻干前无明显变化。进一步的体外释放度试验证明了所制备的纳米药物胶囊有力地促进了其体外释放速度。

参考文献:

[1] SINGH C K, LIU X, AHMAD N. Resveratrol in its natural combination in whole grape for health promotion and dis-

ease management [J]. Ann N Y Acad Sci, 2015, 1348 (1): 150 - 160.

- [2] SADI G, KONAT D. Resveratrol regulates oxidative biomarkers and antioxidant enzymes in the brain of streptozotocin-induced diabetic rats [J]. Pharm Biol, 2015(16): 1 - 8.
- [3] HOSSEINI A, GHORBANI A. Cancer therapy with phytochemicals: evidence from clinical studies [J]. Avicenna J Phytomed, 2015, 5(2): 84 - 97.
- [4] SEINO M, OKADA M, SHIBUYA K, et al. Differential contribution of ROS to resveratrol-induced cell death and loss of self-renewal capacity of ovarian cancer stem cells [J]. Anticancer Res, 2015, 35(1): 85 - 96.
- [5] AMRI A, CHAUMEIL J C, SFAR S, et al. Administration of resveratrol: What formulation solutions to bioavailability limitations [J]. J Control Release, 2012, 158(2): 182 - 193.
- [6] Pandita D, Kumar S, Poonia N, et al. Solid lipid nanoparticles enhance oral bioavailability of resveratrol, a natural polyphenol [J]. Food Res Int, 2014(62): 1165 - 1174.
- [7] RABINOW B E. Nanosuspensions in drug delivery [J]. Nat Rev Drug Discov, 2004, 3(9): 785 - 796.
- [8] BEIROWSKI J, INGHELBRECHT S, ARIEN A, et al. Freeze-drying of nanosuspensions. I: freezing rate versus formulation design as critical factors to preserve the original particle size distribution [J]. J Pharm Sci, 2011, 100(5): 1958 - 1968.

(上接第 221 页)

参考文献:

[1] 林万隆, 陈强. 奥沙利铂的药理作用及临床应用 [J]. 中国肿瘤临床, 2000, 27(11): 872 - 874.

[2] MAY J P, ERNSTING M J, JUNDZYS E, et al. Thermosensitive liposomes for the delivery of gemcitabine and oxaliplatin to tumors [J]. Mol Pharm, 2013, 10(12): 4499 - 4508.

[3] ZALBA S, NAVARRO I, TROCÓNIZ I F, et al. Application of different methods to formulate PEG-liposomes of oxaliplatin: Evaluation in vitro and in vivo [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2012, 81(2): 273 - 280.

[4] SZOKA F, PAPAHDJOPOULOS D. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1978, 75(9): 4194 - 4198.

[5] MAYER L D, BALLY M B, CULLIS P R. Strategies for optimizing liposomal doxorubicin [J]. J Liposome Res, 1990, 1(4): 463 - 480.

[6] YANG M Y, LI Y M, MEI X G. Determination of entrapment efficiency of oxaliplatin liposome and its release profile in vitro [J]. Bull Acad Mil Med Sci, 2007, 31(5):

448 - 450.

- [7] 王世亮, 叶红杨, 马晓琴, 等. 石墨炉原子吸收光谱法测定血浆中铂 [J]. 理化检验 (化学分册), 2010, 46(3): 257 - 259.
- [8] TOYOMIZU M, OKAMOTO K, AKIBA Y, et al. Anacardic acid-mediated changes in membrane potential and pH gradient across liposomal membranes [J]. Biochim Biophys Acta, 2002, 1558(1): 54 - 62.
- [9] HARRIGAN P R, WONG K F, REDELMEIER T E, et al. Accumulation of doxorubicin and other lipophilic amines into large unilamellar vesicles in response to transmembrane pH gradients [J]. Biochim Biophys Acta, 1993, 1149(2): 329 - 338.
- [10] ZALBA S, CONTRERAS A M, HAERI A, et al. Cetuximab-oxaliplatin-liposomes for epidermal growth factor receptor targeted chemotherapy of colorectal cancer [J]. J Control Release, 2015(210): 26 - 38.
- [11] NGUYEN T, ØSTERGAARD J, STÜRUP S, et al. Determination of platinum drug release and liposome stability in human plasma by CE-ICP-MS [J]. Int J Pharm, 2013, 449(1-2): 95 - 102.