

doi: 10.3969/j.issn.0253-2417.2016.02.016

姜黄素纳米混悬剂的制备及其表征



ZHANG Sheng-wei

张盛伟¹, 李湘洲^{1,3*}, 李文生^{1,2}, 顾胜华¹

(1. 中南林业科技大学 材料科学与工程学院, 湖南 长沙 410004; 2. 湖南大学 化学化工学院, 湖南 长沙 410082; 3. 南方林业生态应用技术国家工程实验室, 湖南 长沙 410004)

摘要: 为了提高姜黄素的水溶性, 采用高压均质法制备姜黄素纳米混悬剂, 优化了姜黄素纳米混悬剂的制备工艺。利用红外光谱(IR)、紫外光谱(UV)、X射线衍射(XRD)、透射电镜(TEM)和高效液相色谱(HPLC)对姜黄素纳米混悬剂进行了理化性质和化学结构的分析。结果表明: 当均质压力100 MPa, 循环次数30次时, 姜黄素纳米混悬剂的平均粒径为 (171.00 ± 8.56) nm, 一致性系数为 (0.69 ± 0.05) ; IR、UV、XRD、TEM和HPLC分析表明, 姜黄素纳米混悬剂冻干粉的化学结构未见明显改变, 姜黄素纳米粒子为不规则的球状晶体, 结晶度显著降低。姜黄素纳米混悬剂冻干粉在水中的溶解度达62.85 mg/L, 比姜黄素原粉提高了90.48倍; 姜黄素纳米混悬剂冻干粉体外溶出速率也明显提高, 120 min时溶出度已达80%。研究表明高压均质法适用于姜黄素纳米混悬剂的制备。

关键词: 姜黄素纳米混悬剂; 高压均质; 理化性质; 制备; 表征

中图分类号: TQ35; TQ460.6

文献标识码: A

文章编号: 0253-2417(2016)02-0109-06

引文格式: 张盛伟, 李湘洲, 李文生, 等. 姜黄素纳米混悬剂的制备及其表征[J]. 林产化学与工业, 2016, 36(2): 109-114.

Preparation and Characterization of Curcumin Nanosuspensions

ZHANG Sheng-wei¹, LI Xiang-zhou^{1,3}, LI Wen-sheng^{1,2}, GU Sheng-hua¹

(1. College of Material Science and Engineering, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China; 2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan University, Changsha 410082, China; 3. State Engineering Laboratory of Ecological Applied Technology in Forest Area of South China, Changsha 410004, China)

Abstract: In order to improve the water solubility of curcumin, curcumin nanosuspensions were prepared by high pressure homogenization technology, and the preparation process was optimized. The physicochemical properties and chemical structure of curcumin nanosuspensions were investigated by UV spectrometry, infrared spectrometry (IR), X-ray diffractometry (XRD), transmission electron microscopy (TEM) and high performance liquid chromatography (HPLC). The results showed that the mean particle size of curcumin nanosuspension was (171.00 ± 8.56) nm, and the PI was (0.69 ± 0.05) under optimal conditions of 100 MPa and 30 cycles. UV, IR, XRD, TEM and HPLC results showed that the chemical structures of curcumin nanosuspensions were not obviously changed, the curcumin nanoparticles were irregular spherical form, and the crystallinity decreased. The water solubilities of curcumin nanopowder were 62.85 mg/L enhanced by 90.48 times compared with curcumin powder. The dissolution velocities were significantly improved, and the dissolution rate reached up to 80% at the time of 120 min. The research indicated that high pressure homogenization technology could be successfully used to prepare curcumin nanosuspensions.

Key words: curcumin nanosuspensions; high pressure homogenization; physicochemical property; preparation; characterization

姜黄素(1,7-二(3-甲氧基-4-羟基苯基)-1,6-庚二烯-3,5-二酮)是从姜科植物的根茎中提取出的一种天然的食品添加剂,具有抗肿瘤^[1]、抗炎^[2]、抗氧化^[3]和抗微生物^[4]等多种生物活性。姜黄素因其成分天然、毒性低^[5]而广泛用于食品、医药和化妆品等领域,但是由于姜黄素是脂溶性成分,水溶性差,导

收稿日期: 2015-01-23

基金项目: 林业公益性行业科研专项(201204811)

作者简介: 张盛伟(1988—),男,湖南郴州人,硕士,研究方向为天然产物化学与利用

* 通讯作者: 李湘洲(1965—),女,教授,博士生导师,研究方向为天然产物化学与利用; E-mail: rxz@163.com。

致了其生物利用度低,而且体内组织代谢转化迅速^[6],很大程度上限制了姜黄素的推广应用。因此,如何增加姜黄素在水中的溶解度、提高其体外溶出速率已成为姜黄素急需解决的重要课题。减小姜黄素颗粒的粒径是实现上述目的的技术手段之一^[7]。纳米混悬剂是采用少量表面活性剂稳定药物粒子所形成的一种亚微米胶体分散体系。研究表明,当药物粒径减小到亚微米级别时,其溶解行为会显著改善^[8]。纳米混悬剂分散程度高、一致性好,有利于药物的溶出和吸收,能极大地提高药物的生物利用度^[9-10]。王丽丽^[11]将多西他赛制成纳米混悬剂后,与多西他赛本身相比,溶解度提高了 52 倍。赵先英等^[12]制备的度他雄胺纳米混悬剂,在水中的溶解度较原药提高了 12 倍。为提高姜黄素的溶解性,本研究采用高压均质法制备了姜黄素纳米混悬剂,考察了均质压力和均质次数对姜黄素纳米混悬剂平均粒径的影响,并利用 IR、UV、XRD、TEM 和 HPLC 对姜黄素纳米混悬剂的理化性质和化学结构进行了分析。

1 实验

1.1 材料与仪器

姜黄素(>95%),河南中大生物工程有限公司;其它试剂均为分析纯。DIAX900 匀浆机,德国 IKA 公司;NanoGenizer 高压均质机,苏州微流纳米生物技术有限公司;UV-2600 分光光度计,上海天美科学仪器有限公司;Nicomp380Z3000 激光粒度仪,苏州微流纳米生物技术有限公司;JEM-1200EX 透射电子显微镜(TEM),日本电子公司;傅里叶转换红外光谱(FT-IR)仪,美国 Thermo Electron 公司;多晶粉末 X 射线衍射(XRD)仪,北京普析通用仪器有限责任公司;10ATVP-ODS 高效液相色谱(HPLC)仪,日本岛津。

1.2 姜黄素标准曲线的绘制

1.2.1 色谱条件 色谱柱为 HyperClone C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相为乙腈/4%冰醋酸(体积比 45:55);流量 1.0 mL/min;检测波长 430 nm;柱温 30℃;进样量 10 μL。

1.2.2 标准曲线的绘制 精密称取姜黄素对照品 25.0 mg,用适量甲醇溶解,再转移到 100 mL 的容量瓶中,并用甲醇溶液稀释至刻度,得 250 mg/L 的姜黄素对照品储备液。

精密移取质量浓度为 250 mg/L 的姜黄素对照品储备液 0.5 mL,用甲醇溶液稀释成 1.0、5.0、15.0、30.0 和 60.0 mg/L 的姜黄素对照品溶液,各取 10 μL 注入高效液相色谱仪中,按 1.2.1 节条件测定峰面积,并以峰面积为纵坐标(Y),姜黄素质量浓度为横坐标(X)进行线性回归分析,绘制姜黄素标准曲线。

1.3 姜黄素纳米混悬剂的制备

1.3.1 姜黄素纳米混悬剂 称取 200 mg 的姜黄素和 10 mg 表面活性剂,溶于 250 mL 的蒸馏水中,超声波处理 10 min,使姜黄素充分分散于水中。开启高剪切分散乳化仪,在 10 000 r/min 条件下分散 3 min,形成初乳。将制得的初乳加入到高压均质机中,通过调节 2 级调节阀逐渐增大均质压力,进行一定次数的循环均质,制备姜黄素纳米混悬剂。

1.3.2 姜黄素纳米混悬剂冻干粉 为了防止制备的姜黄素纳米混悬剂团聚,采用冷冻干燥法制成姜黄素纳米混悬剂冻干粉。将制得的姜黄素纳米混悬剂于 -80℃ 的条件下冷冻 4 h, -18℃ 冷冻 24 h,冷冻干燥机中冷冻干燥 48 h,制得姜黄素纳米混悬剂冻干粉。

1.4 分析与表征

1.4.1 激光粒度分析 取 10.0 mL 的姜黄素纳米混悬剂,用激光粒度分析仪测量其平均粒径与一致性,测试温度为 25℃,遮光率为 3.0%,测试角为 90°。

1.4.2 TEM 分析 取适当稀释的姜黄素纳米混悬剂适量,滴加于覆盖碳膜的铜网上,以 0.5% 磷钨酸负染,于 30℃ 的温度下干燥 30 min,在透射电镜下观察粒子的大小和形态。

1.4.3 UV 分析 分别取一定量的姜黄素原粉、姜黄素纳米混悬剂冻干粉,乙醇溶解,定容,适当稀释后,在波长 350~500 nm 范围内进行扫描。

1.4.4 IR 分析 分别取适量姜黄素原粉、姜黄素纳米混悬剂冻干粉, KBr 压片后进行红外光谱测定。

1.4.5 XRD 分析 取适量姜黄素原粉、姜黄素混悬剂冻干粉,进行 X 射线衍射,衍射角扫描范围 5~60°,管电压 36 kV,管电流 20 mA,扫描速率 4(°)/min,采样间隔 0.01°。

1.4.6 HPLC 分析 取适量姜黄素原粉、姜黄素纳米混悬剂冻干粉,乙醇溶解,各取 10 μL 注入高效液

相色谱仪中,按1.2.1节色谱条件进行分析。

1.4.7 溶解度测定 将过量姜黄素纳米混悬剂冻干粉和姜黄素原粉分别溶于10.0 mL的蒸馏水中,25℃,100 r/min连续磁力搅拌24 h,取1 mL悬浮液,10 000 r/min高速离心15 min,取上层清液,各取10 μL注入高效液相色谱仪中,按1.2.1节色谱条件测定姜黄素质量浓度。

1.4.8 溶出度测定 按照《中国药典》^[13]中“第二法浆法”测定姜黄素原粉与姜黄素纳米混悬剂冻干粉的溶出度。采用pH值6.86磷酸盐缓冲液900 mL作为溶出介质,转速50 r/min,温度(37±0.5)℃。精确称取10.0 mg的姜黄素原粉与姜黄素纳米混悬剂冻干粉分别均匀撒布在介质表面,从药物开始接触液面开始计时,分别于0、10、20、30、40、60、80和120 min取样1 mL,离心,按1.2.1节色谱条件测定姜黄素质量浓度,并同时补加相同体积、温度的溶出介质。

1.5 数据处理

应用SPSS19.0统计软件进行统计分析,数据以平均值±标准差表示。

2 结果与讨论

2.1 HPLC 分析结果

姜黄素原粉和姜黄素纳米混悬剂冻干粉在波长为430 nm的HPLC图谱分析,结果见图1。

由图1可知,姜黄素原粉与姜黄素纳米混悬剂冻干粉峰值保留时间一致。高压均质过程没有破坏姜黄素的化学结构。同时,在高压均质过程以及冷冻干燥过程所加的表面活性剂、冻干保护剂并不影响姜黄素的HPLC分析。

2.2 姜黄素标准曲线

以标准溶液的质量浓度(X)对其峰面积(Y)做线性回归(见图2),得回归方程为: $Y = 62\,525.66X + 136\,046.28$, $R^2 = 0.999\,6$,表明姜黄素在1~60 mg/L范围内,峰面积与浓度呈良好的线性关系。

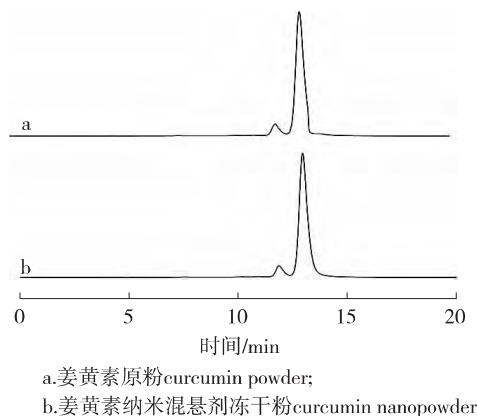


图1 HPLC 图谱
Fig.1 The HPLC spectra

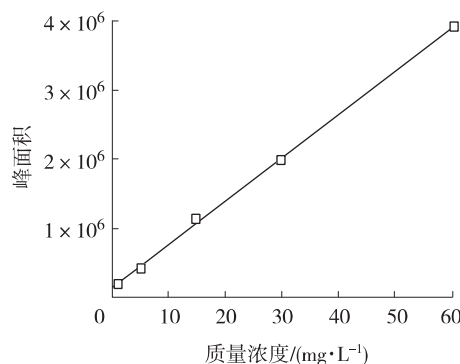


图2 姜黄素标准曲线图
Fig.2 Standard curve of curcumin

2.3 不同条件对姜黄素纳米混悬剂粒径的影响

2.3.1 均质压力 以平均粒径和一致性系数(表示粒径分布偏离中值程度的参数,PI)为考察指标,均质循环次数20次时,均质压力对姜黄素纳米混悬剂粒径的影响结果见图3(a)。由图3(a)可知,随着均质压力的增加,姜黄素纳米混悬剂的平均粒径逐渐减小,同时混悬剂中纳米粒子的一致性系数也逐渐降低。这是因为高压均质让具有一定压力的悬浮液物料通过液压装置,产生强烈的空穴作用而使液体物料中的微粒分散、破碎,作用于体系的压力越大,缝隙越小,空穴作用越强烈,获得的粒径越小^[14]。

当均质压力100 MPa、均质循环次数20次的条件下,粒径分布如图4(a)所示。此时,姜黄素纳米粒子的平均粒径已经下降到(220.0±13.34) nm,已能满足混悬剂要求,同时为了减小仪器损耗,故选取适宜均质压力为100 MPa。

2.3.2 均质循环次数的影响 以平均粒径和一致性为主要考察指标,在均质压力为100 MPa的条件下,均质循环次数对姜黄素纳米混悬剂粒径的影响见图3(b)。由图3(b)可知,在均质压力一定的条件

下,循环次数的增加,姜黄素粗颗粒不断破碎,纳米粒子的平均粒径和一致性都随之减小,粒径更均一。

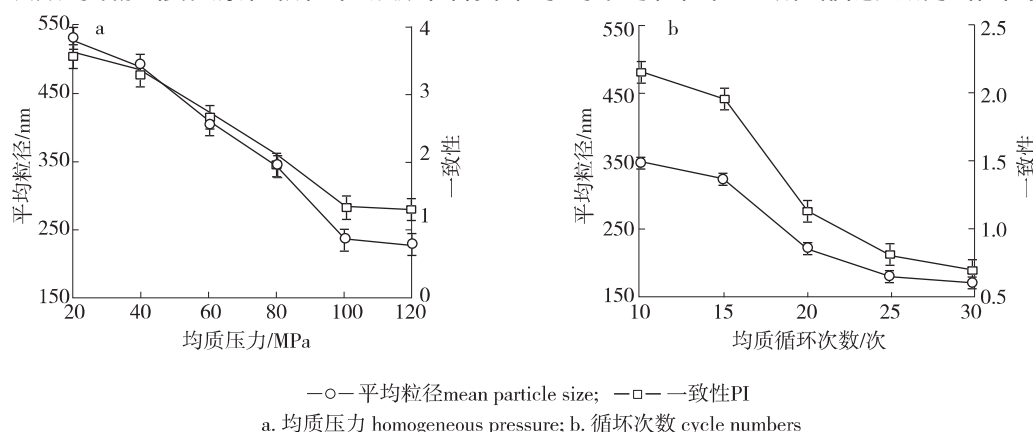


图3 不同条件对姜黄素纳米混悬剂粒径的影响

Fig. 3 Effect of different conditions on particle sizes of curcumin nanosuspensions

当循环次数30次、均质压力100 MPa的条件下,粒径分布如图4(b)所示。此时,姜黄素纳米粒子的平均粒径为 (171.0 ± 8.56) nm,一致性系数为 (0.69 ± 0.05) ,分布更窄,故选取适宜循环次数为30次。

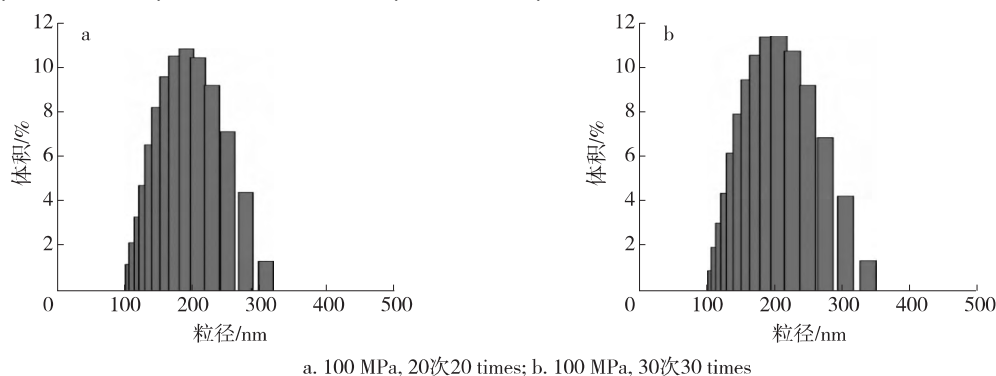


图4 不同条件下姜黄素纳米混悬剂的粒径分布

Fig. 4 Particle size distributions of curcumin nanosuspensions under different conditions

2.4 姜黄素纳米混悬剂的理化性能

2.4.1 TEM 分析 由图5可知,姜黄素纳米混悬剂中纳米粒子在透射电子显微镜下呈不规则的球状晶体,姜黄素纳米混悬剂中粒子的粒径为200 nm左右,与激光粒度仪分析结果相符合。

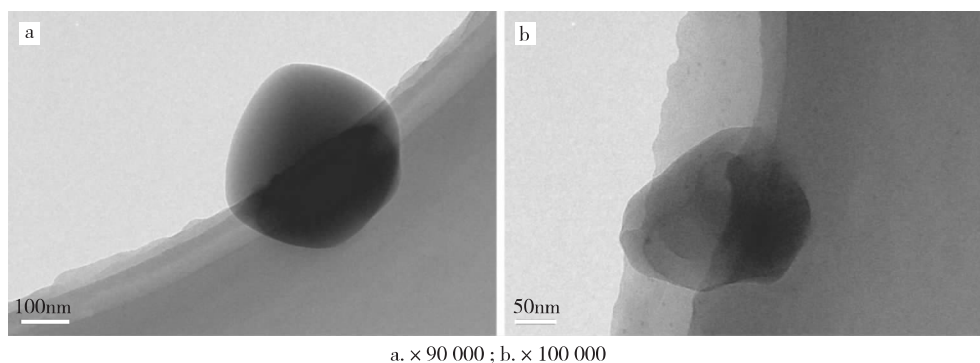


图5 姜黄素纳米混悬剂 TEM 图

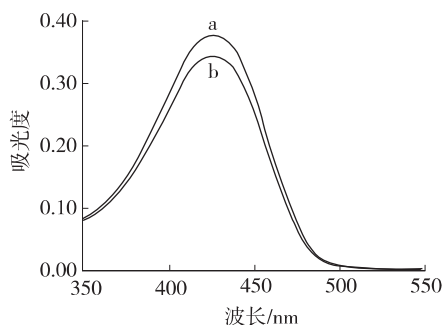
Fig. 5 The TEM images of curcumin nanosuspensions

2.4.2 UV 分析 姜黄素原粉、姜黄素纳米混悬剂冻干粉溶液在波长为350~500 nm进行紫外扫描,结果见图6。

姜黄素为芳香族化合物且分子具有共轭效应,在近紫外区有吸收,因此可以根据紫外光谱图上最大

吸收波长($\lambda_{\max}$)对处理前后的姜黄素进行分析。从图6可知,姜黄素原粉、姜黄素纳米混悬剂冻干粉两者 $\lambda_{\max}$ 都出现在426 nm处,表明姜黄素的化学结构在高压均质的过程中并没有改变,高压均质过程只是实现了颗粒的机械性减小和分散,这与高压均质的原理相吻合^[9]。

2.4.3 FT-IR 分析 姜黄素原粉、姜黄素纳米混悬剂冻干粉的红外光谱结果见图7。



a.姜黄素原粉curcumin powder; b.姜黄素纳米混悬剂冻干粉curcumin nanopowder

图6 紫外吸收光谱

Fig. 6 UV spectra

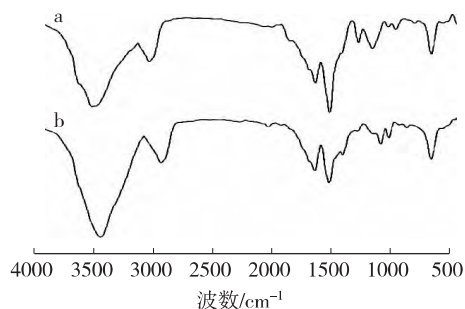


图7 红外吸收光谱

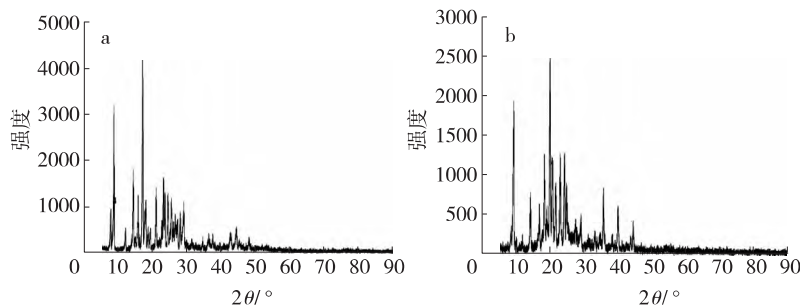
Fig. 7 FT-IR spectra

由图7可知,3426 cm^{-1} 特征吸收峰是—OH的伸缩振动,2980 cm^{-1} 特征吸收峰是C—H的伸缩振动,1642、1516 cm^{-1} 特征吸收峰是姜黄素中苯环和碳碳双键的伸缩振动,656 cm^{-1} 特征吸收峰是苯环上取代基的伸缩振动。两者的红外图谱相比,均质后的姜黄素没有发现显著特征吸收峰峰位的改变,说明在高压均质过程中纳米混悬剂冻干粉的姜黄素化学结构并没有发生改变。姜黄素纳米混悬剂冻干粉(曲线b)红外光谱的—OH特征吸收峰有偏移,可能是高压均质使姜黄素颗粒的粒径大幅度减小,导致分子之间形成了氢键,而分子间氢键的形成已经被证实能够显著改善难溶药物的溶解度和溶出度^[15]。

2.4.4 XRD 分析 姜黄素原粉、姜黄素纳米混悬剂冻干粉的X射线衍射光谱见图8。从图8可知,姜黄素是具有多个衍射峰的结晶型药物,同时高压均质后的姜黄素也具有多个衍射峰,且未发现新的结晶衍射峰,因此,认为在高压均质过程中姜黄素的存在状态并没有发生明显改变,均以结晶型的状态存在的。除此之外,物质结晶程度的强弱可以从衍射峰强度的大小反映出来,姜黄素纳米混悬剂冻干粉衍射峰的强度明显比姜黄素原粉衍射峰的强度低,这是由于药物经过高压均质后,粒径减小,从而结晶度显著降低。已有研究证实,粒径小、结晶度低的药物更容易溶出和吸收^[16]。

2.5 溶解度和溶出度

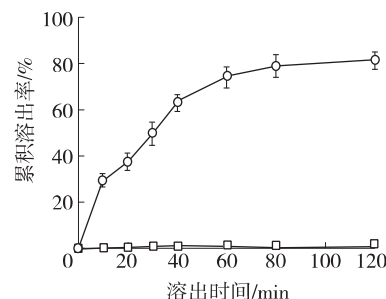
经HPLC法测得25℃时姜黄素原粉、高压均质所获得的姜黄素纳米混悬剂冻干粉在水中的溶解度分别为0.687和62.85 mg/L,溶解度提高了90.48倍。溶出度曲线如图9所示。



a.姜黄素原粉 curcumin powder;
b.姜黄素纳米混悬剂冻干粉 curcumin nanopowder

图8 X射线衍射光谱

Fig. 8 The XRD spectra



—□—姜黄素原粉 curcumin powder;
—○—姜黄素纳米混悬剂冻干粉
curcumin nanopowder

图9 溶出度曲线

Fig. 9 Dissolution curves

从图9可知,姜黄素原粉的溶出度极低,120 min时溶出率仅为3%,这与姜黄素本身溶解度极低有关。与姜黄素原粉相比,姜黄素纳米混悬剂冻干粉的溶出度明显得到改善,在10 min时,其溶出度已接

近 30% ,120 min 时 ,溶出度达 80% ,可见将姜黄素制备成姜黄素纳米混悬剂冻干粉后能显著地提高其溶出度 ,原因是姜黄素原药经高压均质处理后 ,粒径减小 ,比表面积增加 ,从而有效提高了药物的体外溶出度。

3 结 论

采用高压均质技术制备了姜黄素纳米混悬剂 ,所制备的姜黄素纳米混悬剂分散程度高、一致性好 ,经激光粒度分析仪检测 ,当均质压力 100 MPa 循环次数 30 次时 ,其平均粒径为 (171.00 ± 8.56) nm ,一致性系数为 (0.69 ± 0.05) ; IR、UV、XRD 和 HPLC 分析表明 ,处理前后姜黄素的化学结构并未发生明显的改变 ;姜黄素结晶度显著降低 ,姜黄素纳米混悬剂冻干粉在水中的溶解度达 62.85 mg/L ,比姜黄素原粉在水中的溶解度(0.687 mg/L) 提高了 90.48 倍 ;姜黄素纳米混悬剂冻干粉体外溶出速率亦明显提高 ,120 min 时溶出度已达 80% 。

参考文献:

- [1] 吴亚丽 ,谢俊霞 ,卢楠 ,等. 姜黄素对结肠癌细胞增殖抑制和凋亡诱导的作用研究[J]. 现代食品科技 2014 ,30(4) : 74-79.
WU Ya-li ,XIE Jun-xia ,LU Nan ,et al. Effects of curcumin on proliferation and apoptosis of colorectal carcinoma LoVo cells [J]. Modern Food Science & Technology 2014 ,30(4) : 74-79.
- [2] MORIYUKI K ,SEKIGUCHI F ,MATSUBARA K ,et al. Curcumin inhibits the proteinase-activated receptor-2-triggered prostaglandin E2 production by suppressing cyclooxygenase-2 upregulation and akt-dependent activation of nuclear factor- κ B in human lung epithelial cells[J]. Journal of Pharmacological Sciences 2010 ,114(2) : 225-229.
- [3] 旷春桃 ,李湘洲 ,薛海鹏 ,等. 姜黄素衍生物的合成和生物活性研究[J]. 林产化学与工业 2014 ,34(5) : 67-72.
KUANG Chun-tao ,LI Xiang-zhou ,XUE Hai-peng ,et al. Synthesis and biological activity of curcumin derivatives[J]. Chemistry and Industry of Forest Products 2014 ,34(5) : 67-72.
- [4] TANG Hong-mei ,LU Da-xiang ,PAN Rui ,et al. Curcumin improves spatial memory impairment induced by human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein 120 V3 loop peptide in rats [J]. Life Sciences 2009 ,85(1/2) : 1-10.
- [5] SA G ,DAS T. Anti cancer effects of curcumin: Cycle of life and death [J]. Cell Division 2008 ,3(1) : 14.
- [6] 余美荣 ,蒋福升 ,丁志山. 姜黄素的研究进展 [J]. 中草药 2009 ,40(5) : 828-831.
YU Mei-rong ,JIANG Fu-sheng ,DING Zhi-shan. Advances in studies on curcumin [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs 2009 ,40(5) : 828-831.
- [7] 潘艺茗. PLA/PLGA-姜黄素纳米粒的制备与性能研究 [D]. 广州: 华南理工大学硕士学位论文 2012.
PAN Yi-ming. Research on preparation and properties of curcumin-loaded PLA/PLGA nanoparticles [D]. Guangzhou: Master Degree Thesis of South China University of Technology 2012.
- [8] KOCBEK P ,BAUMGARTNER S ,KRISTL J. Preparation and evaluation of nanosuspensions for enhancing the dissolution of poorly soluble drugs [J]. International Journal of Pharmaceutics 2006 ,312(1/2) : 179-186.
- [9] MÜLLER R H ,PETERS K. Nanosuspensions for the formulation of poorly soluble drugs: I. Preparation by a size-reduction technique [J]. International Journal of Pharmaceutics 1998 ,160(2) : 229-237.
- [10] GRAU M J ,KAYSER O ,MÜLLER R H. Nanosuspensions of poorly soluble drugs-reproducibility of small scale production [J]. International Journal of Pharmaceutics 2000 ,196(2) : 155-159.
- [11] 王丽丽. 多西他赛脂质纳米混悬剂的研究 [D]. 济南: 山东大学硕士学位论文 2012.
WANG Li-li. Preliminary studies on docetaxel-lipid-based-nanosuspensions [D]. Jinan: Master Degree Thesis of Shandong University 2012.
- [12] 赵先英 ,刘毅敏 ,周小霞 ,等. 度他雄胺纳米悬浮液的制备 [J]. 西南国防医药 2013 ,23(12) : 1286-1288.
ZHAO Xian-ying ,LIU Yi-min ,ZHOU Xiao-xia ,et al. Preparation of dutasteride nanometer suspension [J]. Medical Journal of National Defending Forces in Southwest China 2013 ,23(12) : 1286-1288.
- [13] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部) [M]. 北京: 化学工业出版社 2005.
State Pharmacopoeia Committee of China. Chinese Pharmacopoeia: 2nd [M]. Beijing: Chemical Industry Press 2005.
- [14] VAN EERDENBRUGH B ,VAN DEN MOOTER G ,AUGUSTIJNS P. Top-down production of drug nanocrystals: Nanosuspension stabilization , miniaturization and transformation into solid products [J]. International Journal of Pharmaceutics 2008 ,364(1) : 64-75.
- [15] SINHA S ,ALI M ,BABOOTA S ,et al. Solid dispersion as an approach for bioavailability enhancement of poorly water-soluble drug ritonavir [J]. AAPS PharmSciTech 2010 ,11(2) : 518-527.
- [16] ZHONG Jie ,SHEN Zhi-gang ,YANG Yan ,et al. Preparation and characterization of uniform nanosized cephradine by combination of reactive precipitation and liquid anti-solvent precipitation under high gravity environment [J]. International Journal of Pharmaceutics 2005 ,301(1/2) : 286-293.