

• 药剂与工艺 •

反溶剂法制备甘草酸纳米粒的表征与体外透皮特性研究

许文佳, 赵修华, 祖元刚*, 李娜, 吴薇薇

东北林业大学 森林植物生态学教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要: 目的 以乙醇为溶剂, 醋酸乙酯作为反溶剂制备甘草酸纳米粒 (GAN), 考察 GAN 作为皮肤给药载体的渗透情况。方法 分别利用扫描电镜、激光粒度仪、红外光谱、溶出度等分析方法对原粉及纳米粒的性质进行表征; 应用透皮扩散仪, 采用改良 Franz 扩散池法, 以离体大鼠皮肤进行体外经皮渗透实验, 并以 HPLC 法测定接收液和皮肤组织中的药物浓度。结果 获得的 GAN 为球形, 平均粒径为 220 nm; 纳米化后甘草酸的释药速率得到极大提高; GAN 同原粉相比, 透皮性能大大增强, 12 h 的单位累积透过量分别是 78.51、9.792 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。结论 制备后的甘草酸粒径变小、分布均匀, 化学结构未发生变化, 而体外释药率和体外透皮性能均有提高, 在医药产品开发上具有潜在的应用价值。

关键词: 甘草酸; 纳米粒; 反溶剂; 皮肤渗透; 释药率

中图分类号: R283.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2014)08-1068-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.08.006

Representation and *in vitro* transdermal characteristics of glycyrrhizic acid nanoparticles prepared by antisolvent recrystallization method

XU Wen-jia, ZHAO Xiu-hua, ZU Yuan-gang, LI Na, WU Wei-wei

Key Laboratory of Forest Plant Ecology, Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: Objective To prepare glycyrrhizic acid nanoparticles (GAN) using ethanol as solvent and ethyl acetate as the antisolvent, and to investigate the osmosis of GAN as carrier of dermal administration. **Methods** Using scanning electron microscope (SEM), laser particle size analyzer, Fourier transform-infrared spectroscopy (FT-IR), and release rate analysis, the untreated glycyrrhizic acid (GA) and GA powder were characterized; *In vitro* cutaneous permeation experiments were carried out on modified Franz diffusion cells, using excised mouse skin. The concentration of diammonium glycyrrhizinate in the receptor compartments and skin were determined by HPLC. **Results** The GAN was spherical, the average particle size was 220 nm, and the dissolution rate of nanosized glycyrrhizinate was improved obviously. The transdermal rate of nanosized glycyrrhizinate was better than the original glycyrrhizin, and the 12 h unit accumulation transmissibility of GAN and GA was 78.51 and 9.792 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectively. **Conclusion** After preparing, the particle size becomes smaller, the chemical structure does not change significantly, and both of dissolution rate and *in vitro* transdermal performance have been improved. The GAN has the potential application values in the development of pharmaceutical industry.

Key words: glycyrrhizic acid; nanoparticles; antisolvent recrystallization; cutaneous penetration; release rate

甘草酸 (glycyrrhizic acid, GA) 属于五环三萜类化合物, 系由萜元上 $\text{C}_3\text{-OH}$ 与吡喃糖醛酸的端基碳原子缩合而成的酸性皂苷, 是甘草中重要的化学成分, 纯品 GA 为无色柱状晶体, 不溶于冷水但易溶于热水, 故溶于热水后, 一经冷却即呈胶体状沉

淀析出。中药现代研究表明, 甘草中含有皂苷类、三萜类、黄酮类、香豆素、生物碱、挥发油、有机酸、氨基酸等多种化学成分^[1]。GA 分子中含有亲水性和亲油性基团, 能降低水溶液表面张力, 有很强的发泡力, 具有乳化、分散、保湿润发、软化皮肤、

收稿日期: 2013-12-15

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2012BAD21B05)

作者简介: 许文佳 (1988—), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为植物化学与植物药。E-mail: mingcongtian_xia@163.com

*通信作者 祖元刚 E-mail: yuangangzu@163.com

抗皱、抗皮脂、防治色素沉淀、抗炎止痒及洗涤去污的效果,其消炎、抗菌、治疗皮肤病等功能尤为显著^[2-4]。虽然 GA 在医药及化妆品领域有广泛的应用价值,但其水溶性差的特性导致了透皮率低,不能很好地发挥疗效。药物纳米化是增强难溶性药物分子透皮率的有效途径,其制备方法形式多样。

目前,根据不同的分类标准,可以有多种分类方法^[5-10],根据反应环境可分为液相法、气相法、固相法,根据反应性质可分为化学制备法、化学物理制备法、物理制备法等。其中的反溶剂重结晶法(antisolvent recrystallization method)是利用活性物质与溶剂分子间相互作用力的差异,通过改变溶剂的极性来调整活性物质的过饱和度从而达到对活性物质的可控结晶的一种药物纳米化技术。在制备超细化药物领域的应用也越来越广泛。目前,通过该方法已成功制备得到了多种难溶性口服药物^[11-12]。例如,张纪尧等^[13]采用水溶胶冻干法制备辛伐他汀微粉,杨芳等^[14]利用重结晶原理,得到粒度分布均匀的萘普生颗粒。

本实验以提高 GA 的水溶性和透皮率为目的,尝试采用反溶剂法制备 GA 纳米粒(glycyrrhizic acid nanoparticles, GAN),并表征其理化特征,验证其水溶性和体外透皮率,为其在医药产品开发上的应用提供数据支持。

1 仪器与材料

78HW—1 数显磁力搅拌器,杭州仪表电机有限公司;水浴锅,北京赛多利斯仪器系统有限公司;GZX—9240—MBE 数显鼓风干燥箱,上海博讯实业有限公司医疗设备厂;美国布鲁克海文高分辨率 Zeta 电位及 Zeta PALS 粒度分析仪;BS—110 型电子分析天平,德国 Sartorius 公司;Quanta—200 型扫描电子显微镜(SEM),美国 FEI 公司;8700 型傅里叶红外光谱仪,美国 Nicolet 公司;有机微孔滤膜(0.45 μm),上海新亚净化器件。

市售 GA,分子式为 $\text{C}_{42}\text{H}_{62}\text{O}_{16}$,相对分子质量为 822.93, CAS: 1405-86-3,质量分数为 98%,由陕西慧科生物科技有限公司提供;无水乙醇,天津市天力化学试剂有限公司;去离子水为实验室自制;醋酸乙酯,扬州艾力克化工有限公司提供。

2 方法与结果

2.1 反溶剂重结晶

通过预试验,反溶剂重结晶过程中以乙醇作为溶剂、醋酸乙酯为反溶剂。参考课题组前期的实验

条件进行^[15],具体操作步骤和参数如下:将反溶剂加入带有控温水浴的烧杯中,在数显磁力搅拌器下控制搅拌速度为 1 105.98 r/min,温度为 30.34 $^{\circ}\text{C}$ 时搅拌,按照反溶剂/溶剂体积比为 9.96:1 迅速加入质量浓度为 275 mg/mL 的 GA 乙醇溶液,由于 GA 不溶于醋酸乙酯,因此瞬间形成乳白色的混悬液,沉积 5.52 min 后终止,取 1 mL 混悬液用相同体积比的溶剂与反溶剂混合液稀释 3 倍,置于激光粒度仪中检测颗粒大小。同时将剩余混悬液用有机微孔滤膜滤过,滤过后用醋酸乙酯多次洗涤,滤饼放入 110 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱下干燥 12 h 后收集,即可获得 GAN。

2.2 分析测试方法

2.2.1 激光粒度检测 采用激光粒度分析仪进行反溶剂重结晶后 GAN 的粒度检测。将所得 GA 纳米混悬液以 3 倍体积的相应溶剂与反溶剂体积比下混合液进行稀释,超声 30 s 直接置于美国布鲁克海文公司 Zeta PALS 型激光粒度仪中进行检测,每个样品重复测定 3 次。激光粒度检测 GA 粒径分布见图 1,其平均粒径为 203 nm,粒径分布较窄,说明通过反溶剂重结晶法已经成功将 GA 制备成纳米级。

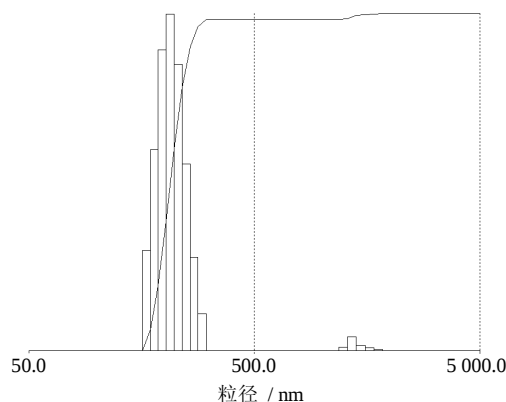


图1 GAN 粒径分布图

Fig. 1 Particle size distribution of GAN

2.2.2 SEM 检测 用 SEM 分析纳米化前后 GA 的形貌及大小,具体步骤如下:在样品台上粘上双面铜导电胶,然后在此导电胶上黏附少量 GA 粉体,将制备好的样品进行喷金:电流为 3 mA、时间为 6 min 或电流为 50 mA、时间为 30 s,将喷金处理后的样品置于样品室中观察。从原粉与纳米粒的 SEM 照片可以看出,原粉颗粒(图 2-a)形态不规则,有破碎的片状、空心皱缩圆球等各异的形貌,颗粒粒径在 3~50 μm 变化,粒度分布不均匀。从图 2-b 可见,GAN 呈分布均匀、形态规则的球状体,平均粒径约 220 nm,这也与激光粒度仪测定的数据相吻合。

2.2.3 红外光谱 (FT-IR) 检测 采用 FT-IR 进行化学结构分析: KBr 压片, 用日本岛津 XRD—6000 型 X 射线衍射仪在 $4\ 000\sim 500\ \text{cm}^{-1}$ 进行红外扫描分析。将所得纳米粒和原粉进行 FT-IR 对比分析, 结果如图 3 所示, 两者的红外吸收峰位置完全相同, 这说明反溶剂重结晶法所制得的 GAN 与 GA 原粉相比化学结构没有变化, 从而为其活性的发挥提供了物质基础。

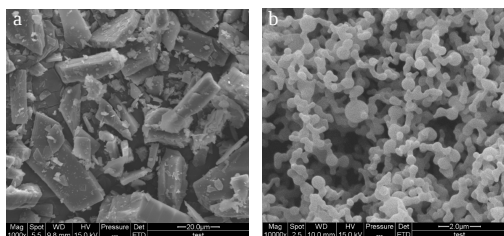


图 2 GA 原粉 (a) 与 GAN (b) 的 SEM 图

Fig. 2 SEM photographs of untreated GA powder (a) and GAN (b)

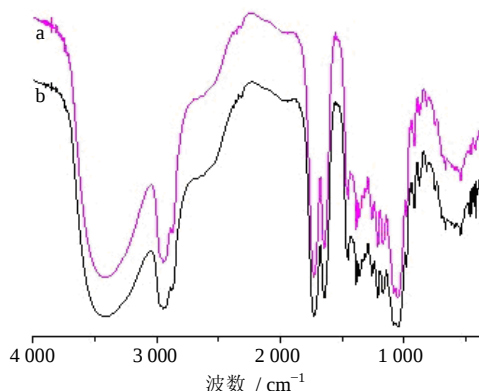


图 3 GA 原料 (a) 及 GAN (b) 的 FT-IR 图

Fig. 3 FT-IR spectra of GA powder (a) and GAN (b)

2.2.4 体外释药检测 称取 GA 原粉和纳米粒各 1 g, 精密称定, 分别置于 40 mL 摇瓶中, 加 10 mL 蒸馏水作为溶出介质, 恒温 $37.5\ ^\circ\text{C}$, 搅拌转速为 75 r/min, 分别于 1、2、3、5、10、15、20、30、40、50、60 min 定时定位吸取 1 mL, 离心, 取上清液用 $0.45\ \mu\text{m}$ 滤膜滤过, 同时将同温的 1 mL 蒸馏水和离心的沉淀物一起补充到溶出体系中, 按流动相为甲醇- (0.02 mol/L 醋酸铵溶液-冰醋酸 33:1) (64:36), 检测波长为 254 nm, 进样量为 $10\ \mu\text{L}$, 进样温度为室温, 体积流量为 1 mL/min 的色谱条件进行测定^[16]。测得不同时间 GA 的累积释放率, 并计算各时间的相对累积释放率 (相对累积释放率 = 某时间段内已经释放的药物量 / 投入药物总量)。所得 GA 原粉和纳米化 GA 的 HPLC 谱图见图 4, 其

出峰时间为 12.4 min。以峰面积为纵坐标 (Y), 质量浓度为横坐标 (X) 进行线性回归, 得回归方程为 $Y=6\times 10^6 X+4\ 977.9$, $r=0.999\ 0$, 结果表明 GA 在 $0.1\sim 0.6\ \text{mg/mL}$ 线性关系良好。

体外释放结果见图 5, 随着溶出时间的延长, GAN 和 GA 原粉的累积溶出量升高, 溶出 25 min 后, 纳米化药物释放率达到 93.97%, 而原药的释放率仅为 52.84%, 这表明 GA 纳米化后药物的释放得到极大地改善, 其主要原因是粒径降低导致比表面积增加从而提高了药物的释放速度, 累积释放率的增加也有助于提高其体内生物利用度。

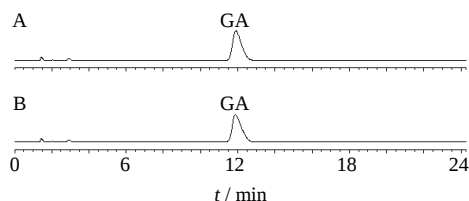


图 4 GA 对照品 (A) 和 GAN 体外释药 5 min 时释放介质 (B) 的 HPLC 色谱图

Fig. 4 HPLC of GA reference substance (A) and GAN for 5 min *in vitro* released media (B)

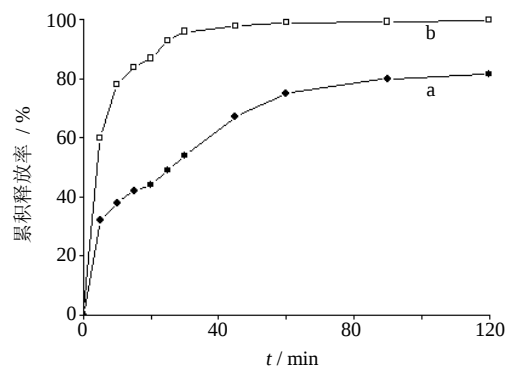


图 5 GA 原料药 (a) 与 GAN (b) 的累积释放率

Fig. 5 Cumulative release rates of untreated GA powder (a) and GAN (b)

2.2.5 体外透皮检测 应用透皮扩散仪, 采用改良 Franz 扩散池法, 接收池体积 5 mL, 有效面积 $0.785\ \text{cm}^2$ 。取体质量 200 g 左右的 Wistar 大鼠, 处死后用刀片剔除腹部的鼠毛, 剪下腹部皮肤, 仔细剥离皮下脂肪层和结缔组织, 用生理盐水冲洗干净, 用打孔器将大鼠的皮肤打成面积一致的圆片 2 片, 将鼠皮角质面向供给室, 固定于扩散池中间, 分别将供给室加入 GA 原粉蒸馏水溶液 ($5\ \text{mg/mL}$)、GAN 蒸馏水溶液 ($5\ \text{mg/mL}$) 各 1 mL, 接收室中加入接收液蒸馏水 5 mL, 使真皮层与接受液完全接触, 扩

散池恒温夹套内循环水温为 $(37 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ ，搅拌子加入接收室中，900 r/min 恒速搅拌，加样平衡 15 min 后开始计时，分别在 0.5、1、2、3、4、6、8、12 h 精密吸取接受液 5 mL，同时补充等量接受液。样品经离心取上清液，根据色谱条件〔色谱柱为迪马 C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)；流动相为色谱级甲醇-去离子水-冰醋酸溶液 (70:25:5)；检测波长为 254 nm；体积流量 1.0 mL/min；进样量 20 μL〕进行 HPLC，检测 GA 量，并计算累积透过量 (Q_n , μg/cm²)。GA 离体鼠皮的透皮结果见图 6，12 h 后皮肤中 GAN 和原药的 Q_n 分别为 78.51、9.792 μg/cm²，前者是后者的 8 倍，GAN 在一定程度上促进药物的经皮渗透。

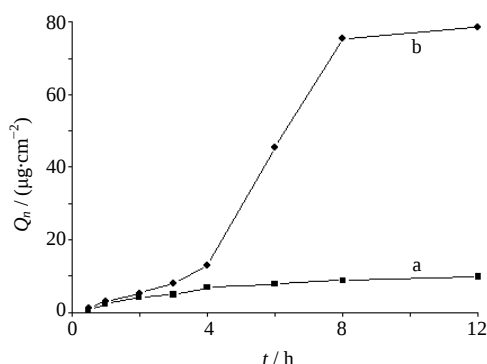


图6 GA 原粉 (a) 和 GAN (b) 的 Q_n 对比

Fig. 6 Comparison on Q_n of untreated GA powder (a) and GAN (b)

由此可见，纳米化对 GA 的经皮渗透具有明显的促进作用，原因是纳米化增加了 GA 的溶解性，同时纳米化的小尺度效应也增加了其对角质层脂质双层的渗透性。以上结果说明 GAN 在医药、化妆品领域具有潜在的应用价值。

3 讨论

药物的溶解性差异，导致制剂在体内有不同的溶出速率，直接影响制剂在体内的吸收、分布、排泄和代谢，最终因其生物利用度不同，而导致临床药效的差异。本实验采用反溶剂重结晶法制备 GAN 的过程简便易行，并且产物形貌及粒径可控。理化性质表征参数显示纳米粒的化学结构无变化，与原药相比，纳米粒形貌规则，粒径变小，极大的提高了 GA 的生物利用度。

GAN 作为一种理想的抗肝病成分或生物活性物质或天然药物的输运载体，具有性质稳定、利于

促渗速渗、透皮率高等诸多优势，具有很好的临床应用价值，在肝病治疗领域具有较大的发展潜力和广阔的应用空间。

参考文献

- [1] 惠寿年, 董阿玲. 国内对甘草化学成分的研究进展 [J]. 中草药, 1999, 30(4): 313-315.
- [2] 雷学军. 甘草酸的提取及其在化妆品工业中的应用 [J]. 香料香精化妆品, 1997(2): 35-37.
- [3] 陆海英, 霍娜, 王广发, 等. 复方甘草酸苷治疗传染性非典型肺炎 (SARS) 的临床研究 [J]. 中国药房, 2003, 10(14): 610-612.
- [4] 黄群荣, 马哲. 甘草酸的药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(5): 384-387.
- [5] Marcianò V, Minore A, Liveri V T. A simple method to prepare solid nanoparticles of water-soluble salts using water-in-oil microemulsions [J]. *Colloid Polym Sci*, 2000, 278(3): 250-252.
- [6] Mori Y, Okastu Y, Tsujimoto Y. Titanium dioxide nanoparticles produced in water-in-oil emulsion [J]. *J Nanopart Res*, 2001, 3(2/3): 219-225.
- [7] 徐辉碧. 纳米医药 [M]. 北京: 清华大学出版社, 2004.
- [8] Morey T E, Varshney M, Flint J A, et al. Activity of microemulsion-based nanoparticles at the human bio-nano interface: concentration-dependent effects on thrombosis and hemolysis in whole blood [J]. *J Nanopart Res*, 2004, 6(2): 159-170.
- [9] 王雷. 反相微乳液聚合及其磁性聚合物纳米微球的制备 [D]. 上海: 复旦大学, 2001.
- [10] 张文萍, 张志耘. 我国纳米技术在药学领域中应用现状 [J]. 天津药学, 2002, 14(5): 17-20.
- [11] 周敏毅, 陈建峰, 刘晓林. 重结晶法制备微粉化布洛芬的初步探索 [J]. 化工进展, 2003, 22(5): 524-527.
- [12] Li X S, Wang J X, Shen Z G, et al. Preparation of uniform prednisolone microcrystals by a controlled microprecipitation method [J]. *Int J Pharm*, 2007, 342(1/2): 26-32.
- [13] 张纪尧, 沈志刚, 陈建峰. 水溶胶冻干法制备微粉化辛伐他汀 [J]. 高校化学工程学报, 2006, 20(5): 814-819.
- [14] 杨芳, 沈志刚, 陈建峰. 反应结晶法制备微粉化紫普生的研究 [J]. 北京化工大学学报, 2006, 33(3): 15-18.
- [15] 祖元刚, 赵野, 赵修华, 等. 响应面设计法优化反溶剂重结晶制备甘草酸微粉 [J]. 森林工程, 2011, 27(3): 54-60.
- [16] 董德军, 刘红. 高效液相色谱法测定甘草苷和甘草酸含量的研究 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(10): 2361-2362.