

## 1,3-二羟基异丙氧基-琥珀酸-8-莪术醇酯纳米混悬剂的制备及其性能研究

王 义<sup>1,2</sup>, 王文倩<sup>3</sup>, 尹 萌<sup>1</sup>, 孙忠浩<sup>2</sup>, 张泉洋<sup>1,2</sup>, 田 瑜<sup>2\*</sup>, 许旭东<sup>2\*</sup>

1. 哈尔滨商业大学 生命科学与环境科学研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076

2. 中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所, 北京 100193

3. 天津药物研究院, 天津 300193

**摘要:** 目的 制备 1,3-二羟基异丙氧基-琥珀酸-8-莪术醇酯纳米混悬剂 (Cur-p-NS), 并考察其一般特性、载药量和体外释放特性。方法 采用超声-溶剂沉淀法制备 Cur-p-NS, 考察其粒度大小, 多分散系数和 Zeta 电位。结果 Cur-p-NS 的平均粒径为  $162.60 \pm 2.12$  nm, 多分散系数为  $0.182 \pm 0.002$ , Zeta 电位为  $-24.60 \pm 8.97$  mV, 平均载药量为 0.942 mg/mg, 累积释放率可达到 77%。结论 Cur-p-NS 制备工艺简单和效果好, 具有持续释放的特性。

**关键词:** 1,3-二羟基异丙氧基-琥珀酸-8-莪术醇酯; 纳米混悬剂; 溶剂沉淀法; 粒径; 体外释放特性

中图分类号: R944 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2017)04-0579-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2017.04.006

## Preparation of 1,3-dihydroxyisopropoxy-succinic acid-8-curcumol ester nanosuspensions and its properties

WANG Yi<sup>1,2</sup>, WANG Wen-qian<sup>3</sup>, YIN Meng<sup>1</sup>, SUN Zhong-hao<sup>2</sup>, ZHANG Quan-yang<sup>1,2</sup>, TIAN Yu<sup>2</sup>, XU Xu-dong<sup>2</sup>

1. Research Center on Life Sciences and Environmental Sciences, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

3. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

**Abstract: Objective** To prepare 1,3-dihydroxyisopropoxy-succinic acid-8-curcumol ester nanosuspensions (Cur-p-NS) and study their general characteristics, drug loading, and drug release characteristics *in vitro*. **Methods** Cur-p-NS was prepared by ultrasonic-solvent precipitation. And the particle size, polydispersion index, and Zeta potential of the nanosuspension were studied. **Results** The particle size, polydispersion index, Zeta potential, the drug-loading content, and the cumulative release rate of the nanosuspension were  $162.60 \pm 2.12$  nm,  $0.182 \pm 0.002$ ,  $-24.60 \pm 8.97$  mV, 0.942 mg/mg, and 77%, respectively. **Conclusion** Cur-p-NS has simple preparation and good effect, which has characteristic of sustained release.

**Key words:** 1,3-dihydroxyisopropoxy-succinic acid-8-curcumol ester; nanosuspensions; solvent precipitation; particle size; release characteristics *in vitro*

莪术醇是莪术挥发油中主要成分之一<sup>[1]</sup>。有文献报道, 莪术醇在纯水中的溶解度仅为 0.3%<sup>[2]</sup>, 这极大地限制和影响其在临床上的广泛应用和治疗效果。本课题组对莪术醇进行了结构修饰, 得到衍生物 1,3-二羟基异丙氧基-琥珀酸-8-莪术醇酯 (1,3-dihydroxyisopropoxy-succinic acid-8-curcumol ester, Cur-p), 结构见图 1。通过对 Cur-p 溶解度的测定,

其在纯水中的溶解度为 4.4%, 相对提高了莪术醇的水溶性, 但其水溶性还是很差<sup>[3]</sup>。纳米混悬技术提供了改善难溶性药物溶解性的新方法, 提高了口服药物的生物利用度, 同时具有良好的生物相容性和释放持续性<sup>[4]</sup>。为了改善其溶解性, 进一步提高其生物利用度, 本实验拟将 Cur-p 制备成 1,3-二羟基异丙氧基-琥珀酸-8-莪术醇酯纳米混悬剂 (Cur-p-

收稿日期: 2017-01-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81302656); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程经费资助项目 (2016-I2M-1-012)

作者简介: 王 义 (1989—), 男, 硕士研究生, 从事创新药物研究。Tel: 18004515698 E-mail: 18004515698@163.com

\*通讯作者 田 瑜 (1983—), 女, 博士, 副研究员, 研究方向为天然产物的结构改造及生物活性研究。E-mail: ytian@implad.ac.cn

许旭东 (1968—), 男, 北京人, 博士, 研究员, 博士生导师, 从事中药及天然药物研究与开发。E-mail: xdxu@implad.ac.cn

NS), 并对其表征和体外释放进行研究, 为 Cur-p 的口服纳米混悬剂给药提供可能。

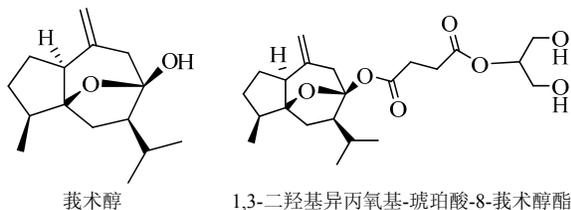


图 1 莪术醇和 1,3-二羟基异丙氧基-琥珀酸-8-莪术醇酯的结构式

Fig. 1 Structure of curcumol and 1, 3-dihydroxyisopropoxy-succinic acid-8-curcumol ester

## 1 仪器与材料

Waters ACQUITY 超高效液相色谱仪, 光电二极管阵列 (PDA) 检测器, Empower 3 工作站, 自动进样; KQ3200E 型超声波清洗器 (昆山超声波仪器有限公司); Mettler ToledoAL104 电子天平 (南京晓晓仪器设备有限公司); SHZ-A 水浴恒温振荡器 (常州诺基仪器有限公司); TGL16M 高速低温冷却离心机 (常州诺基仪器有限公司); Tecan M1000 多功能连续波长酶标仪 (上海艾研生物科技有限公司); JEM-1400 透射电子显微镜 (日本电子株式会社); Zetasizer Nano ZS 型粒度仪 (英国 Malvern Instruments 公司); SCIOGEX MX-S 型漩涡混合器 (北京科博赛尔科技有限公司); LGL-10B 冷冻干燥机 (北京四环科学仪器厂有限公司)。

Cur-p 对照品 (质量分数 98.2%)、Cur-p (质量分数 95.3%) 均为自制; MD 34mm 透析袋 (截留相对分子质量 8 000~14 000, 北京索莱宝科技有限公司, 批号 20150120); 甲醇 (色谱纯, Fisher); 葡萄糖 (质量分数 99.8%, 北京博奥拓达科技有限公司, 批号 20160915); 蒸馏水 (杭州娃哈哈集团有限公司); 磷酸缓冲液 (PBS, 北京博奥拓达科技有限公司, 批号 AAL208993); 胰酶 (批号 20160930)、胃蛋白酶 (批号 20160917) 购自上海如吉科技发展有限公司; 超高效液相色谱所用试剂均为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

健康 Wistar 雄性大鼠 2 只, 体质量 180~200 g, 购于军事医学科学院实验动物中心, 动物使用许可证编号: SCXX-(军)2012-0004。

## 2 方法与结果

### 2.1 超声-溶剂沉淀法制备 Cur-p-NS

精确称量 Cur-p 5 mg, 溶解于 0.5 mL 甲醇中,

待完全溶解后, 在超声的条件下, 将 Cur-p 甲醇溶液用注射器缓慢注入 5 mL 去离子水中, 在超声的作用下乳化, 形成水包油乳液, 超声 5 min 后, 于通风橱内常压下搅拌至完全除去有机溶剂, 即得 Cur-p-NS。

**2.1.1 超声温度对粒径的影响** 按照上述方法配制有机相和水相, 在超声的作用下将有机相用注射器缓慢注入水相中, 分别在 15、25、40 °C 条件下制备纳米混悬剂, 超声 10 min 后, 于通风橱内常压下搅拌至完全除去有机溶剂, 即得 Cur-p-NS。结果发现在 25 °C 条件下制备的纳米粒的粒径最小, 结果见表 1。

表 1 超声温度对纳米混悬剂粒径的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 1 Effect of ultrasonic temperature on particle sizes of nanosuspensions ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

超声温度/°C	粒径/nm
15	170 ± 0.835
25	152 ± 1.121
40	182 ± 0.973

**2.1.2 超声强度对粒径的影响** 按照上述方法配制有机相和水相, 在温度为 25 °C 的超声的作用下, 将有机相用注射器缓慢注入水相中, 改变超声强度, 分别为 200、300、400 W, 超声 10 min 后, 于通风橱内常压下搅拌至完全除去有机溶剂, 即得 Cur-p-NS, 结果发现超声强度在 300 W 时, 制备的纳米粒粒径最小, 见表 2。

表 2 超声强度对纳米混悬剂粒径的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Effect of ultrasonic intensities on particle sizes of nanosuspensions ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

超声强度/W	粒径/nm
200	167 ± 1.232
300	145 ± 0.878
400	179 ± 1.522

**2.1.3 超声时间对粒径的影响** 按照上述方法配制有机相和水相, 在温度为 25 °C、超声强度为 300 W 的超声的作用下, 将有机相用注射器缓慢注入水相中, 改变其超声时间, 分别为 5、10、15 min, 超声后, 于通风橱内常压下搅拌至完全除去有机溶剂, 即得 Cur-p-NS, 结果发现超声 10 min 条件下, 制备的纳米粒粒径最小, 见表 3。

表3 超声时间对纳米混悬剂粒径的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Table 3 Effect of ultrasonic time on particle sizes of nanosuspensions ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

超声时间/min	粒径/nm
5	182 ± 0.642
10	149 ± 1.379
15	170 ± 0.526

2.1.4 油相与水相比比例的考察 在固定药量和其他因素不变的情况下, 按照油相与水相比比例分别为 1 : 10、1 : 15、1 : 20、1 : 25、1 : 30 时, 制备 Cur-p-NS, 结果发现油相与水相比比例为 1 : 25 时, 制备的纳米粒子粒径最小, 见表 4。

表4 油相/水相的体积比对纳米混悬剂粒径的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Table 4 Effect of oil phase/water phase on particle sizes of nanosuspensions ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

油相与水相的体积比	粒径/nm
1 : 10	183.00 ± 1.77
1 : 15	174.00 ± 0.79
1 : 20	165.0 ± 1.03
1 : 25	150.0 ± 1.21
1 : 30	168.0 ± 0.30

## 2.2 Cur-p-NS 的制备

根据以上实验的优化条件结果精确称量 Cur-p 30 mg 并溶解于 1 mL 甲醇中, 待完全溶解后, 在温度为 25 °C 与超声强度为 300 W 的超声作用下, 将 Cur-p 甲醇溶液用注射器缓慢注入 25 mL 去离子水中, 超声 10 min 后, 于通风橱内常压下搅拌至完全除去有机溶剂, 冷冻干燥, 储备液于 4 °C 保存。

## 2.3 透射电子显微镜观察 Cur-p-NS

通过透射电子显微镜观察, Cur-p-NS 呈圆球状结构, 粒径在 200 nm 左右。并在不同时间点测室温与 4 °C 下其粒径, 结果表明, 其形态稳定, 无明显变化, 见图 1。

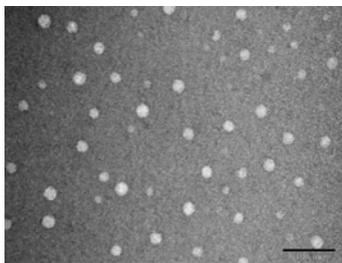


图1 Cur-p-NS 的透射电镜照片

Fig. 1 Transmission electron microscope photo of Cur-p-NS

## 2.4 Cur-p-NS 的粒度测定

通过粒度仪测定 Cur-p-NS 的粒径为 162.60 ± 2.12 nm, 见图 2。多分散系数为 0.182 ± 0.002, Zeta 电位为 -24.60 ± 8.97 mV, 见图 3。

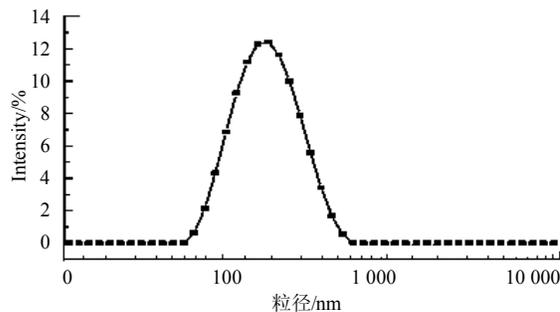


图2 Cur-p-NS 的粒度分布

Fig. 2 Particle size distribution of Cur-p-NS

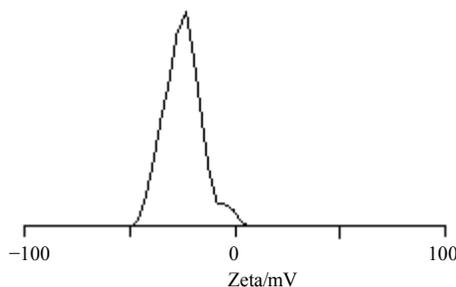


图3 Cur-p-NS 的 Zeta 电位

Fig. 3 Zeta potential of Cur-p-NS

## 2.5 Cur-p-NS 的稳定性研究

2.5.1 放置稳定性 取 Cur-p-NS, 分为 2 组, 每组 1 mL, 分别在 4、25 °C 条件下放置不同时间, 测其粒径变化, 结果表明, Cur-p-NS 在 25、4 °C 放置 9 d, 粒径变化不大, 没有出现任何浑浊和沉淀现象, 说明其稳定性良好, 见表 5。

表5 Cur-p-NS 的放置稳定性 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 5 Shelf stability of Cur-p-NS ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

放置时间/d	25 °C 粒径/nm)	4 °C 粒径/nm
1	140.60 ± 1.23	142.00 ± 1.06
3	145.80 ± 1.11	146.40 ± 1.74
6	168.00 ± 0.72	156.40 ± 0.61
9	169.60 ± 0.87	160.50 ± 1.38

2.5.2 胃肠液、葡萄糖溶液稳定性 取 Cur-p-NS, 分为 3 组, 每组 1 mL, 分别加入适量的胃液、肠液、葡萄糖溶液, 放置在 37 °C 恒温水浴中, 分别在 0、

1、3、5 h 测定 Cur-p-NS 的粒径变化。结果表明，Cur-p-NS 在胃液、肠液、葡萄糖溶液中稳定性良好，见表 6。

表 6 Cur-p-NS 在不同介质中的稳定性 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )  
Table 6 Stability of Cur-p-NS in different medium ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

t/h	粒径/nm		
	胃液	肠液	葡萄糖
0	167.10±2.79	273.90±1.89	162.60±0.73
1	169.00±4.76	278.80±0.77	175.80±1.23
3	163.20±1.03	293.90±0.13	162.90±0.88
5	162.20±1.02	267.80±0.87	174.20±1.82

### 2.6 Cur-p-NS 的溶血实验

将 1.5、0.75、0.375 mg/mL Cur-p-NS 样品等参与 5%葡萄糖溶液调配的 4%红细胞悬浮液等体积比混合作为实验组，对照组为上述不同浓度的等渗样品与 5%葡萄糖溶液混合。阴性组为 4%红细胞悬浮液与等体积 5%葡萄糖溶液混合，阳性组为 4%红细胞悬浮液与等体积等体积去离子水混合。37 °C 水浴下，孵育 4 h 后，5 000 r/min 离心 5 min，取上清，酶标仪在 210 nm 处测吸光度 (A) 值。计算溶血率。结果表明，1.5、0.75、0.375 mg/mL Cur-p-NS 等渗样品分别与葡萄糖溶液调配的 4%红细胞悬浮液等体积比混合时，都溶血，溶血率分别为 98.17%、93.69%、88.87% (n=3)。

$$\text{溶血率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{对照}} - A_{\text{阴性}}) / (A_{\text{阳性}} - A_{\text{阴性}})$$

### 2.7 Cur-p-NS 的体外释放特性

**2.7.1 色谱条件** ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相: 甲醇-水 (70:30); 检测波长: 210 nm; 体积流量: 0.2 mL/min; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μL。

**2.7.2 标准曲线的制备** 精密称取 Cur-p 对照品 10.37 mg, 置于 50 mL 量瓶中, 加甲醇适量, 超声使溶解, 冷却到室温, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得 0.207 4 mg/mL 贮备液。分别精密量取 0.05、0.5、1、2、3、4、5 mL 母液, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得 1.037、10.370、20.740、41.480、62.220、82.960、103.700 μg/mL 标准系列溶液, 分别精密吸取 10 μL 注入色谱仪, 记录峰面积值。以峰面积对质量浓度进行线性回归, 得回归方程  $Y=7\ 803\ 261.027\ 2 X+3\ 322.385\ 1$ ,  $r=0.999\ 6$ , 结果表明 Cur-p 在 1.037~103.700 μg/mL 时峰面积与质量浓度的线性关系良好。

**2.7.3 精密度试验** 选择 103.700、41.480, 1.037 μg/mL Cur-p 对照品溶液, 1 d 内重复测定 5 次, 记录峰面积, 计算得 RSD 值分别为 0.72%、0.87%、0.55%; 每天进样 1 次, 连续进样 5 d, 计算得 RSD 值分别为 0.92%、1.09%、1.62%, 结果表明日间、日内精密度良好。

**2.7.4 稳定性试验** 分别取 0.1 mg/mL Cur-p 对照品溶液和 0.1 mg/mL Cur-p-NS, 分别于 0、2、4、6、8、12、24、48 h 进样分析, 记录 Cur-p 峰面积, 计算得 RSD 值分别为 0.99%、1.10%, 结果表明对照品溶液和 Cur-p-NS 在 48 h 内稳定性良好。

**2.7.5 回收率试验** 精密量取 Cur-p 样品 3 mg, 置于 10 mL 棕色量瓶中, 共 9 份, 分别加入 2.4、3、3.6 mg 对照品各 3 份, 甲醇稀释至刻度, 即得测试溶液; 另取对照品配制成 1.0 mg/mL 溶液。分别进样分析, 记录峰面积, 将峰面积代入标准曲线进行计算。根据测得量和加入量, 计算加样回收率, 结果平均回收率为 94.8%, RSD 值为 1.6%。

**2.7.6 载药量的测定** 精密吸取 1.2 mg/mL 储备液 Cur-p-NS 5 mL 置于西林瓶中, 冻干, 空瓶质量为  $W_1$ , 冻干后样品和瓶的质量为  $W_2$ 。取冻干后的样品粉末, 5 mL 甲醇溶解, 10 000 r/min 离心 10 min, 进样测定质量  $W$ , 平行 3 份, 计算载药量, 结果 Cur-p-NS 的平均载药量为 0.942 mg/mg, 与理论载药量 1 mg/mg 相比略低, 可能是实验过程中有损失。

$$\text{载药量} = W / (W_2 - W_1)$$

**2.7.7 体外释放的考察** 在透析袋中加入 1 mL Cur-p-NS, 扎紧, 分为 2 组, 分别投入 50 mL PBS 和纯水释放介质, 37 °C 下定时取样 1 mL, 并补充等体积释放介质。分别检测各时间点的峰面积, 由标准曲线计算药物质量浓度, 得累积释放率, 见图 4。Cur-p-NS 在 PBS 中 144 h 累积释放率可达到 77%, 明显高于水中的累积释放率, 证明 Cur-p-NS 具有持续释放的特性。

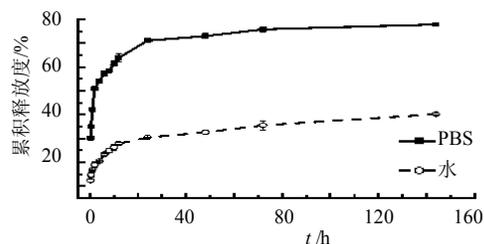


图 4 Cur-p-NS 的体外释累积释放率  
Fig. 4 In vitro release of Cur-p-NS

### 3 讨论

难溶性药物的水溶性差、生物利用度低是药物的一个难点，而纳米混悬剂能够解决这一问题<sup>[5-6]</sup>。纳米混悬剂具有载药量高、服用剂量高等特点<sup>[7]</sup>，纳米混悬剂常用的制备方法有溶剂沉淀法、高压均质法、沉淀法-高压均质联合技术、沉淀法-高剪切均质联合技术<sup>[8]</sup>。但是某些给药系统含有大量的表面活性剂和溶剂，可能会导致严重的毒副作用<sup>[9]</sup>。本实验制备的纳米混悬剂主要针对莪术醇衍生物 Cur-p 的水难溶性药物传递系统，采用单一的无表面活性剂的纯的有效组分按照溶剂沉淀法成功的制备了 Cur-p-NS，将 Cur-p 溶于少量的甲醇，形成油相，将油相缓慢注入处于超声条件下的水相中，通过控制析晶条件来形成纳米晶体，制备得到平均粒径为  $162.60 \pm 2.12$  nm，分散系数为  $0.182 \pm 0.002$ ，Zeta 电位为  $-24.60 \pm 8.97$  mV，平均载药量为 0.942 mg/mg 和累积释放率可达到 77%。由于处方中无表面活性剂，可显著降低给药时附加成分所致的不良反应，大大提高了用药的安全性<sup>[10]</sup>。

本实验对超声时间、温度、强度以及油相与水相的比例进行研究，又对无稳定剂的 Cur-p-NS 做了放置稳定性和不同介质的稳定性研究，发现其稳定性良好，故制备的纳米混悬剂为无稳定剂且选择了最佳超声条件和油水比例。

溶血实验过程中，由于 Cur-p-NS 在生理盐水中不稳定，而其在葡萄糖溶液中稳定，故选择葡萄糖溶液。

### 参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015: 412-413.
- [2] Inayama S, Gao J F, Harimaya K, *et al.* The absolute stereostructure of curcumol isolated from *Curcuma wenyujin* [J]. *Chem Pharm Bull* (Tokyo), 1984, 32(9): 3783-3786.
- [3] 中国医学科学院药用植物研究所. 莪术醇衍生物及其制备方法和应用 [P]. 中国: 201611207773.2. 2016-12-23.
- [4] Jethara S I, Patel A D, Patel M R, *et al.* Recent survey on nanosuspension: a patent overview [J]. *Recent Pat Drug Deliv Formul*, 2015, 9(1): 65-78.
- [5] Ghosh I, Bose S, Vippagunta R, *et al.* Nanosuspension for improving the bioavailability of a poorly soluble drug and screening of stabilizing agents to inhibit crystal growth [J]. *Int J Pharm*, 2011, 409(1/2): 260-268.
- [6] Rabinow B E. Nanosuspensions in drug delivery [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2004, 3(9): 785-796.
- [7] 岳鹏飞, 王勇, 万晶, 等. 固体纳米晶体给药系统构建方法的研究进展 [J]. *药学学报*, 2012, 47(9): 1120-1127.
- [8] 罗开沛, 李小芳, 罗佳, 等. 纳米混悬技术在中药制剂中的应用及发展趋势 [J]. *中草药*, 2016, 47(6): 865-871.
- [9] Fu Q, Sun J, Zhang W, *et al.* Nanoparticle albumin-bound (NAB) technology is a promising method for anti-cancer drug delivery [J]. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, 2009, 4(3): 262-272.
- [10] Liu D, Liu C, Zou W, *et al.* Enhanced gastrointestinal absorption of N<sub>3</sub>-O-toluyyl-fluorouracil by cationic solid lipid nanoparticles [J]. *J Nanoparticle Res*, 2010, 12(3): 975-984.