

• 制剂与质量 •

大黄酚聚氰基丙烯酸丁酯纳米囊的制备工艺及质量研究

黄红娜, 张丹参, 郑晓霞, 张力*, 薛贵平
(河北北方学院 药理教研室, 河北 张家口 075000)

摘要:目的 采用界面聚合法制备大黄酚聚氰基丙烯酸丁酯纳米囊, 筛选其最佳制备工艺, 并进行质量考察。方法 在单因素法筛选制备工艺的基础上, 以包封率为指标, 采用 $L_9(3^4)$ 正交设计法对处方中搅拌速度、水相 pH 值、 α -氰基丙烯酸丁酯用量和醋酸乙酯用量进行筛选, 以优化该制备工艺。对其进行包封率、载药量、粒径和粒度分布等的质量考察。结果 确定大黄酚投药量为 5 mg 时, 最佳制备工艺: 搅拌速度为 800 r/min, 水相 pH 值为 2, α -氰基丙烯酸丁酯用量为 13 μ L, 醋酸乙酯用量为 0.6 mL。采用最佳工艺制备的大黄酚纳米囊平均包封率为 82.19%, 平均载药量为 21.48%, 平均粒径为 246 nm, 电镜照片显示粒度分布均匀。结论 采用界面聚合法制备的聚氰基丙烯酸丁酯大黄酚纳米囊粒径小, 包封率和载药量高, 粒度分布均匀, 制备工艺稳定可行, 可用于静脉注射给药。

关键词: 大黄酚; 聚氰基丙烯酸丁酯; 纳米囊

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)04-0547-04

Preparation of chrysophanol loaded polybutylcyanoacrylate nanocapsules and its quality inspection

HUANG Hong-na, ZHANG Dan-shen, ZHENG Xiao-xia, ZHANG Li, XUE Gui-ping
(Department of Pharmacology, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China)

Abstract: Objective To optimize the preparation technology of chrysophanol loaded polybutylcyanoacrylate nanocapsules by interfacial polymerization, sieve the optimal technology conditions of preparation, and study its quality. **Methods** Based on the single factor experiment, the formulation was optimized by $L_9(3^4)$ orthogonal design with entrapment efficiency as reference index. The factors including agitating speed, pH value of aqueous phase, amount of α -butylcyanoacrylate (BCA) and of ethyl acetate were screened. At last, its shape, particle size, the encapsulation efficiency, and the drug loading were investigated as its quality inspection. **Results** When the amount of chrysophanol was 5 mg, the optimum preparation conditions were established as follows: the agitating speed was 800 r/min, the pH value of aqueous phase was 2, the amount of α -BCA was 13 μ L and ethyl acetate was 0.6 mL. Under this optimum condition, the mean entrapment ratio was 82.19%, and the mean drug loading was 21.48%, the mean diameter of the nanocapsule was 246 nm. The particle size was well-distributed showed by electron microscope pictures. **Conclusion** The prepared chrysophanol loaded polybutylcyanoacrylate nanocapsules has small size, high encapsulation efficiency, and drug loading. The preparation technique established in this study is stable and feasible. It also can be used for iv injection.

Key words: chrysophanol; polybutylcyanoacrylate; nanocapsules

大黄酚是从大黄中提取的蒽醌类化合物, 以往的实验已证明大黄酚对记忆障碍具有改善作用^[1], 并有抗衰老的作用^[2], 能抑制肝、脑的脂质过氧化反应, 减少丙二醛的水平^[3]。但由于大黄酚水溶性差,

导致生物利用度低, 且对胃肠有刺激作用, 限制了进一步应用^[4]。聚氰基丙烯酸丁酯载药纳米囊具有载药量大, 被包裹的药物不易失活, 可用于静脉给药等优点。目前证实聚氰基丙烯酸丁酯纳米囊是少数可

①收稿日期: 2009-08-12

基金项目: 河北省自然科学基金资助项目(C2009001026)

作者简介: 黄红娜(1982-), 女, 河北省保定市人, 硕士研究生, 研究方向为神经药理学和药动学。E-mail: huanghongna0601@163.com

* 通讯作者 张力 T: (0313) 4029188 E-mail: zmchl@hotmail.com

通过血脑屏障的纳米粒之一^[5]。因此,本实验采用界面聚合法制备大黄酚聚氰基丙烯酸丁酯纳米囊,以期拓展大黄酚的给药途径,广泛应用于临床。

1 仪器和试剂

Waters600 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司), LabTech 全自动紫外可见分光光度计(北京莱伯泰科仪器有限公司), Sigma3K30 超速冷冻离心机(德国 Sigma 公司), 85-2A 型数显恒温测速磁力搅拌器(江苏省金坛市金南仪器厂), WLB-78-A 电子微量泵(浙江新昌国康仪器厂), KS-6000 超声波清洗机(宁波科生仪器厂)。

α -氰基丙烯酸丁酯(北京瞬康医用胶有限责任公司), 泊洛沙姆-188(德国 Sigma 公司), 大黄酚对照品(质量分数>98%, 南京泽朗医药公司), 甲醇为色谱纯, 丙酮、无水乙醇、乙醚、醋酸乙酯等均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 大黄酚纳米囊的制备方法: 取大黄酚 5 mg 溶于 5 mL 丙酮中, 加入到一定量的 α -氰基丙烯酸丁酯(α -BCA) 的醋酸乙酯溶液中, 使体系混合均匀形成油相。在一定转速的磁力搅拌下, 在 18 °C 时, 将油相用电子微量泵低速均匀地滴加到呈酸性的含 0.5% 泊洛沙姆-188 的水相中, 约 20 min 滴加完毕, 再继续磁力搅拌反应 2 h, 得含大黄酚的聚氰基丙烯酸酯纳米囊的半透明乳黄色混悬液, 然后再将此纳米囊体系在 30 °C 用真空旋转蒸发除去丙酮, 并将整个体系浓缩, 得到均匀的不含丙酮的大黄酚聚氰基丙烯酸酯纳米囊混悬液。

2.2 单因素法筛选制备工艺

2.2.1 油相溶剂的选择: 分别以丙酮、无水乙醇、乙醚和乙腈为有机溶剂制备大黄酚纳米囊, 根据纳米囊成囊时的直观现象和显微镜下观察到的微观现象进行判断。结果发现用丙酮时得到乳黄色混悬液, 显微镜下观察成均匀小粒径囊状分布; 用无水乙醇时会出现白色沉淀, 形成的囊状物大且不规则; 用乙醚时会出现大黄酚团聚的现象, 观察药物没有被包裹进囊中; 用乙腈时不会出现混悬液, 最后得到的溶液是黄色澄清的液体, 显微镜下观察没有囊状物形成, 因此选用丙酮作为有机溶剂。

2.2.2 搅拌时间的选择: 根据纳米囊制备方法, 在其他条件不变的情况下分别选择搅拌时间为 2、3、4 h, 测定包封率发现无明显区别, 故选择搅拌时间为 2 h。

2.3 正交设计法筛选制备工艺: 在确定大黄酚的投药量为 5 mg 时, 以搅拌速度(A)、水相 pH 值(B)、

α -氰基丙烯酸丁酯用量(C)、醋酸乙酯用量(D)为考察因素, 每个因素选择 3 个水平, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计表优化处方, 以包封率为指标筛选最佳处方, 见表 1。方差分析见表 2。

表 1 正交试验结果

Table 1 Results of orthogonal test

水平	A/(r·min ⁻¹)	B	C/ μ L	D/mL	包封率/%
1	800	2	10	0.2	82.07
2	800	4	13	0.4	81.86
3	800	6	16	0.6	81.69
4	1000	2	13	0.6	77.55
5	1000	4	16	0.2	69.79
6	1000	6	10	0.4	67.23
7	1200	2	16	0.4	71.64
8	1200	4	10	0.6	78.45
9	1200	6	13	0.2	78.29
K_1	81.873	77.087	75.917	76.717	
K_2	71.523	76.700	79.233	73.577	
K_3	76.127	75.737	74.373	79.230	
极差 R	10.350	1.350	4.860	5.653	

表 2 方差分析

Table 2 Analysis of variance

方差来源	离均差平方和	自由度	F 比	显著性
A	161.337	2	8.087	$P < 0.05$
B	2.900	2	0.145	
C	37.002	2	1.855	
D	48.137	2	2.413	
误差	39.900	4		
总和	249.376	8		

$F_{0.05}(2, 2) = 6.940$

经直观分析用极差确定主次影响因素: $A > D > C > B$, 其中 A 因素: $K_1 > K_3 > K_2$, B 因素: $K_1 > K_2 > K_3$, C 因素: $K_2 > K_1 > K_3$, D 因素: $K_3 > K_1 > K_2$, 因此确定 $A_1B_1C_2D_3$ 为最佳处方。

可知搅拌速度对药物的包封率有显著影响, 其余 3 种因素都无显著影响。因此制备大黄酚纳米囊的最佳工艺是: 当大黄酚投药量为 5 mg 时, 搅拌速度为 800 r/min, 调节 pH 值为 2, α -氰基丙烯酸丁酯用量 13 μ L, 醋酸乙酯用量为 0.6 mL。

2.4 大黄酚纳米囊冻干粉的制备: 在制备好的大黄酚纳米囊混悬液中加入 20% 的甘露醇, 使其体积分数为 5%, 然后分装到 2 mL 小安瓿瓶中, 在 -80 °C 冰箱中预冻 10 h。然后进行真空冷冻干燥, 得到纳米囊的白色粉末冻干粉, 用熔口机封口备用。

2.5 样品中大黄酚的 HPLC 法测定

2.5.1 测定波长的选择: 配制一定质量浓度的大黄酚对照品甲醇溶液, 以甲醇为空白, 在 200~500 nm 扫描, 大黄酚在 200~500 nm 有 4 个吸收峰, 分别是 224、254、278、428 nm, 根据灵敏度最佳原则, 选择

最佳波长 254 nm。

2.5.2 色谱条件: Thermo BDS Hypersil C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇水 (95:5); 体积流量: 1.0 mL/min; 检测波长: 254 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 20 μL。

2.5.3 对照品溶液制备: 精密称取干燥至恒重的大黄酚对照品 1.13 mg, 加甲醇溶解并定容至 10 mL。分别取该质量浓度的溶液加配制成一系列质量浓度分别为 0.113、0.565、1.13、5.65、11.3、22.6、56.5 μg/mL 的对照品溶液。

2.5.4 供试品溶液的制备: 将浓缩后的大黄酚纳米囊混悬液转移至 10 mL 量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 轻摇混匀, 精密取出 1 mL 置离心瓶中, 设置超速冷冻离心机为 4 °C, 18 000 r/min, 离心 1 h^[6]。离心完成后取出, 弃去沉淀, 得到上清液, 用 0.45 μm 针筒式微孔滤膜滤过, 即得。

2.5.5 标准曲线的建立: 分别吸取大黄酚对照品溶液进样用 HPLC 法测定, 得到一系列的峰面积, 以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 进行回归分析, 绘制标准曲线, 得线性回归方程: $A = 44\,504X + 3\,440.3$, $r = 0.9998$, 表明大黄酚在 0.113~56.5 μg/mL 线性关系良好。

2.5.6 阴性对照试验: 制备不加大黄酚的纳米囊药品和供试品溶液, 进样测定, 结果大黄酚出峰时间处无峰, 说明辅料对测量没有影响, 结果见图 1。

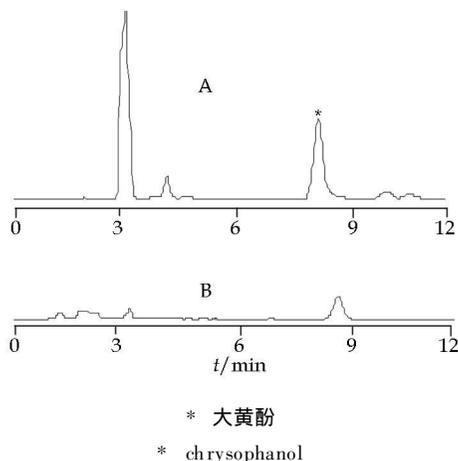


图 1 大黄酚对照品 (A) 和阴性溶液 (B) 色谱图
Fig 1 Chromatograms of chrysophanol reference substance (A) and negative solution (B)

2.5.7 精密度试验: 取供试品溶液, 连续进样 5 次, 记录大黄酚峰面积, 根据线性回归方程计算出大黄酚的质量浓度, 结果其 RSD 为 0.8%。

2.5.8 回收率试验: 取大黄酚质量浓度为 4.63 μg/mL 的供试品溶液, 各加入 51 μg/mL 大黄酚对

照品溶液 0.3、0.2、0.1 mL, 混合均匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 进样测定, 计算得其 RSD 为 2.04%。

2.6 包封率的测定^[7]: 分别吸取大黄酚对照品溶液和大黄酚纳米囊混悬液供试品溶液进样测定, 根据线性回归方程得到大黄酚纳米囊混悬液中总的大黄酚的质量浓度 (C₁) 和上清液中游离的大黄酚的质量浓度 (C₂), 计算包封率 [包封率 = (C₁ - C₂) / C₁ × 100%]。

2.7 载药量的测定^[8]: 将大黄酚纳米囊进行冷冻干燥, 称取冻干粉适量, 测定溶解后药物中大黄酚的质量浓度, 计算载药量。

$$\text{载药量} = (W_2 - W_1) / W_{NP} \times 100\%$$

式中 W₁ 为溶液中大黄酚的质量, W₂ 为所加大黄酚的总质量, W₂ - W₁ 即为被纳米囊载带的药物量, W_{NP} 为纳米囊的总质量

2.8 大黄酚纳米囊样品的质量考察

2.8.1 包封率和载药量的测定: 色谱条件同前, 测得 3 批样品的包封率和载药量见表 3。

2.8.2 粒径的测定: 按照最佳制备工艺平行制备 3 批大黄酚纳米囊样品, 用纳米粒度分析仪测定粒径, 验证制备工艺, 测得平均粒径为 246 nm, 见图 2。

表 3 样品的包封率和载药量

样品	包封率 / %	载药量 / %
1	82.22	22.10
2	83.87	20.85
3	80.47	21.50
平均值	81.29	21.48

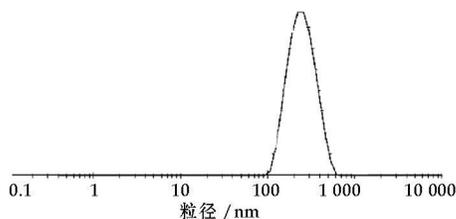


图 2 大黄酚样品的粒径分布

Fig 2 Particle size distribution of chrysophanol samples

2.8.3 纳米囊形态的观察: 取大黄酚纳米囊混悬液适量, 涂布于载玻片上, 2% 磷钨酸负染制片^[6], 滴加于镀膜后的电镜制样铜网上, 干燥后放入透射电子显微镜上观察纳米囊的形态, 见图 3。

3 讨论

根据不同制备工艺, 氰基丙烯酸烷基酯可制成纳米球和纳米囊。由于聚氰基丙烯酸烷基酯在体内的降解速度与烷链的长度成反比, 细胞毒性有随链加长而减小的趋势^[9], 且聚氰基丙烯酸丁酯 (PBCA) 具有

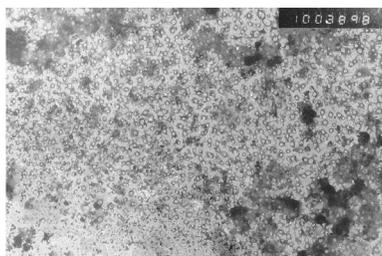


图 3 大黄酚纳米囊透射电镜照片

Fig 3 Electron microscope photograph of chrysoferanol loaded nanocapsules

遇水自动聚合、低毒、生物降解性和生物相容性等特点^[10], 因此实验以聚氰基丙烯酸丁酯作为纳米囊的封装材料, 制备大黄酚纳米囊。

由于 α -氰基丙烯酸丁酯的聚合是以 H_2O 中的 OH^- 作引发剂^[11], 所以 pH 值是影响粒径大小和分布的最关键的因素。最适合的 pH 值为 2~3, 这可能是因为 pH 值太低时, OH^- 太少, 聚合反应太慢, 不易成核; pH 值太高时, OH^- 太多, 聚合反应太快, 易结块, 故本实验中选择的 pH 值因素水平为 2、4、6。

目前制备聚氰基丙烯酸丁酯纳米囊的方法主要有两类: 一类是乳化聚合法; 另一类是界面聚合法。乳化聚合法适用于水溶性对酸稳定药物的制备, 所得纳米粒为骨架型的纳米球。而界面聚合法适用脂溶性药物的制备, 且所得纳米粒为油核型或水核型的膜核结构的纳米囊。由于大黄酚几乎不溶于水, 所以不宜用乳化聚合法制备其纳米球, 故选用界面聚合法制备大黄酚聚氰基丙烯酸丁酯纳米囊。

在加入 α -氰基丙烯酸丁酯时, 实验采用醋酸乙酯稀释后加入或预先将磁子放在一定酸度的水溶液中浸泡一段时间, 以防止 α -氰基丙烯酸丁酯加入后因局部浓度过高或磁子表面 pH 值过高, 分散不均

匀, 结成团块^[12]。

文献报道用超速离心法测定纳米粒的包封率, 通常是测定离心后的上清液中游离的药物质量浓度, 再通过总药量减去游离药物的量得包裹在纳米粒中的药量。但由于丙酮被蒸出后溶剂只有水, 而大黄酚的水溶性极差, 游离的大黄酚会在上清液水中析出。所以在浓缩后的混悬液中加入甲醇定容, 可以充分溶解未包含的大黄酚, 再测定和计算包封率。

参考文献:

- [1] 沈丽霞, 李淑娟, 张丹参, 等. 大黄酚对小鼠记忆障碍的作用及其机制分析[J]. 中国药理学通报, 2003, 19(8): 906
- [2] 桑雁, 韩清, 王宪波, 等. 大黄抗衰老作用的实验研究[J]. 新乡医学院学报, 1996, 13(1): 13-15
- [3] 张丹参, 张力. 大黄酚对大鼠肝过氧化脂质含量的影响[J]. 张家口医学院学报, 1999, 16(1): 1-2
- [4] 陆琴, 汪世龙, 姚思德. 聚氰基丙烯酸烷基酯纳米载体制备工艺的研究进展[J]. 中国医药工业杂志, 2005, 36(12): 780-783
- [5] 许利敏, 李新中, 肖菁. 齐墩果酸聚氰基丙烯酸正丁酯纳米囊在小鼠体内的肝靶向研究[J]. 中国医院药学杂志, 2007, 27(9): 1198-1200
- [6] 张丹参, 张力, 薛贵平, 等. 大黄酚的抗衰老作用[J]. 中国医院药学杂志, 2005, 25(1): 15-17
- [7] 潘见, 田甜, 陈彦. 脑靶向银杏内酯聚氰基丙烯酸正丁酯纳米球的制备方法比较[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(5): 1210-1211
- [8] 肖菁, 李新中, 刘韶, 等. 界面聚合法制备齐墩果酸聚氰基丙烯酸正丁酯纳米囊及其质量考察[J]. 中国药房, 2006, 17(20): 1551-1554
- [9] 陈岩, 陈大为, 胡海洋, 等. 布洛芬聚氰基丙烯酸烷基酯纳米粒的制备[J]. 沈阳药科大学学报, 2007, 24(12): 740-743
- [10] 胡俊, 刘玉玲. 载药纳米粒的研究进展[J]. 中国医药工业杂志, 2004, 35(5): 310-314
- [11] 李范珠, 胡晋. 阿霉素纳米囊的制备工艺及其毒性试验[J]. 中国现代应用药学杂志, 2006, 23(6): 474-477
- [12] 孟庆刚, 倪京满, 许有瑞. 氢溴酸高乌甲素聚氰基丙烯酸丁酯纳米囊的制备工艺研究[J]. 中国药学杂志, 2006, 41(7): 557-558

温度敏感型盐酸小檗碱眼用原位凝胶的制备研究

郝吉福, 赵雪梅, 王建筑, 郭丰广, 孝建华, 孔志峰

(泰山医学院药学院, 山东 泰安 271000)

摘要: 目的 制备温度敏感型盐酸小檗碱眼用原位凝胶。方法 以泊洛沙姆 407 和 188 为温敏材料, 采用搅拌子法测定溶液-凝胶相转变温度优化处方; 采用高效液相色谱法测定盐酸小檗碱。结果 温度敏感型原位凝胶的胶凝温度随泊洛沙姆 407 浓度增大而降低, 随泊洛沙姆 188 浓度增加先升高后降低, 模拟泪液的稀释可使胶凝温度升高, 建立了泪液稀释后相变温度与泊洛沙姆浓度的拟合方程, 经 Design-Expert 软件优化盐酸小檗碱温敏型眼

①收稿日期: 2009-08-27

基金项目: 山东省高等学校科技计划项目(J09LF76)

作者简介: 郝吉福(1976—), 男, 山东省泰安市人, 讲师, 现在泰山医学院从事药剂学的教学及中药与天然药物新剂型研究与开发工作。Tel: 15864769568 E-mail: haojifu@163.com