

• 药剂与工艺 •

波棱甲素纳米混悬剂胶囊的制备及体外溶出度测定

郭静静^{1,2}, 李仙义¹, 袁海龙^{1*}, 靳士晓^{1,2}, 韩 晋¹

1. 解放军第 302 医院, 北京 100039

2. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611730

摘要: 目的 研究波棱甲素纳米混悬剂的制备及其胶囊体外溶出度的测定。方法 采用高压均质法制备波棱甲素纳米混悬剂, 并分别将波棱甲素纳米混悬剂和波棱甲素物理混合物制成胶囊, 以 pH 7.5 的磷酸盐缓冲液为溶出介质, 采用桨法测定体外溶出度, 比较波棱甲素纳米混悬剂胶囊和波棱甲素物理混合物胶囊的溶出速率和溶出量。结果 采用高压均质法制备的波棱甲素纳米混悬剂胶囊的体外累积溶出度明显高于波棱甲素物理混合物胶囊 ($P < 0.01$)。结论 高压均质法制备波棱甲素纳米混悬剂的工艺简单易行, 波棱甲素纳米混悬剂能显著提高药物的体外溶出度。

关键词: 波棱甲素; 纳米混悬剂; 溶出度; 高压均质法; 桨法

中图分类号: R284.2; 286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)03-0467-04

Preparation and dissolution determination of herpetrione nanosuspensions capsule

GUO Jing-jing^{1,2}, LI Xian-yi¹, YUAN Hai-long¹, JIN Shi-xiao^{1,2}, HAN Jin¹

1. 302 Military Hospital of PLA, Beijing 100039, China

2. School of Pharmaceutical Sciences, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611730, China

Abstract: Objective To study the preparation process for herpetrione nanosuspensions and the determination of dissolution rate of the herpetrione nanosuspensions capsule. **Methods** Herpetrione nanosuspensions were prepared by the high pressure homogenization technology. Using phosphate buffer (pH 7.5) as dissolvent, the dissolution rate and the dissolution amount of herpetrione from the nanosuspensions capsule as well as the physical mixture capsule were determined and compared by the paddle method. **Results** The *in vitro* accumulated dissolution of herpetrione nanosuspensions capsule prepared by the high pressure homogenization technology is higher than that of the physical mixture capsules ($P < 0.01$). **Conclusion** The high pressure homogenization technology employed to prepare herpetrione nanosuspensions is feasible and herpetrione nanosuspensions can improve the *in vitro* dissolution rate notably.

Key words: herpetrione; nanosuspensions capsules; dissolution; high pressure homogenization technology; paddle method

波棱瓜子是葫芦科植物波棱瓜 *Herpetospermum caudigerum* Wall. 的干燥成熟种子^[1]。《中华人民共和国卫生部药品标准·藏药标准》1995 年版波棱瓜子药材项下记载, 其味苦, 性寒, 能清腑热、胆热, 具有清热解毒、去火降热、助消化的作用, 用于治疗肝热、黄疸性传染性肝炎等症^[2]。波棱瓜子现已收录进《中国药典》2010 年版一部附录。波棱甲素 (波棱瓜酮, herpetrione, 结构见图 1, 分子式为 $C_{30}H_{32}O_{10}$, 相对分子质量 552.579) 是本题组从波棱瓜子的有效部位总木脂素中分离得到的单体化

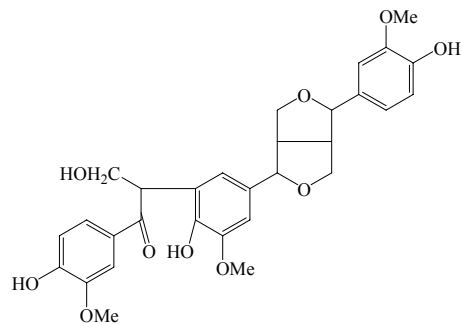


图 1 波棱甲素的结构

Fig. 1 Structure of herpetrione

收稿日期: 2011-08-20

基金项目: 国家新药创制重大专项 (2009ZX09103-349); 国家教育部留学归国人员科研启动基金 (20101561)

作者简介: 郭静静 (1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药药剂新剂型。Tel: (010)66933367 15910477121 E-mail: mizhu.guo@163.com

*通讯作者 袁海龙 Tel: (010)66933367 Fax: (010)63879589 E-mail: yhlpharm@126.com

合物^[3-5]。本课题组前期实验研究结果表明,波棱甲素的量高而且抗病毒活性强^[6],但波棱甲素在水中几乎不溶,属于难溶性药物,而难溶性药物口服生物利用度往往偏低,极大地限制了药物的应用^[7]。纳米混悬剂是近年来针对难溶性药物开发的一种新剂型,系采用少量表面活性剂稳定纯药物粒子所形成的一种亚微米胶体分散体系^[8]。与传统意义上的基质骨架型纳米体系不同,纳米混悬剂无需载体材料,它是通过表面活性剂的稳定作用,将纳米尺度的药物粒子分散在水中形成的稳定体系^[9]。口服使用的纳米混悬剂药物粒径小,对黏膜具有一定的黏附性,可使药物在胃肠道内的滞留时间延长,增加在胃肠道中的吸收,提高药物的口服生物利用度。

为了改善波棱甲素的难溶性,提高其生物利用度,本实验采用高压均质法制备了波棱甲素纳米混悬剂,并对其胶囊的体外溶出行为进行了考察,以期为其临床应用提供参考。

1 仪器与材料

GYB40—10S 高压均质机(上海东华高压均质机厂);NanoZS90 粒径测定仪(英国 Malvern 公司);ZRS—6 智能溶出仪(天津大学无线电厂);Agilent 1100 型高效液相色谱仪(Agilent Technologies);Mettler AE163 微量分析天平(瑞士 Mettler 公司)。

波棱甲素原料药(自制,含波棱甲素 90%以上,批号 101211);波棱甲素对照品(自制,质量分数超过 98%);十二烷基硫酸钠(SDS)、聚维酮 K30(PVP K30)、羧甲基淀粉钠(CMS-Na)均购于北京凤礼精求商贸有限责任公司;乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 波棱甲素纳米混悬剂的制备及验证

2.1.1 波棱甲素纳米混悬剂的制备 采用高压均质法制备波棱甲素纳米混悬剂。分别称取波棱甲素原料药 2 g (1%)、SDS 0.4 g (0.2%)、PVP K30 0.6 g (0.3%),加入 200 mL 蒸馏水,充分搅拌混匀,4 000 r/min 探头超声后,在压力为 100 MPa 条件下高压乳匀 10 圈,得波棱甲素纳米混悬液。

2.1.2 波棱甲素纳米混悬剂的粒径及 Zeta 电位测定 取波棱甲素纳米混悬液适量,加适量蒸馏水稀释后,采用粒径测定仪测定粒径和电位。粒径及电位测定结果显示,波棱甲素纳米混悬剂的平均粒径为 (279.4 ± 1.8) nm,多分散度指数为 0.192 ± 0.013 ,Zeta 电位为 (-38.44 ± 2.05) mV。

2.2 波棱甲素纳米混悬剂胶囊及物理混合物胶囊的制备

2.2.1 波棱甲素纳米混悬剂胶囊的制备 波棱甲素纳米混悬液真空干燥后,加入适量 CMS-Na、微晶纤维素,过 80 目筛,70%乙醇制粒,60 °C 下干燥,加入硬脂酸镁适量,混匀后分装胶囊,制成每粒含 100 mg 波棱甲素的纳米混悬剂胶囊。

2.2.2 波棱甲素物理混合物胶囊的制备 按波棱甲素纳米混悬剂的制备项下处方比例称取原料药及辅料,加入 200 mL 蒸馏水,充分搅拌混匀后,未经探头超声和高压乳匀工艺,混悬液直接真空干燥,加入适量 CMS-Na、微晶纤维素,过 80 目筛,70%乙醇制粒,60 °C 下干燥,加入硬脂酸镁适量,混匀后分装胶囊,制成每粒含 100 mg 波棱甲素的物理混合物胶囊。

2.3 HPLC 测定波棱甲素方法的建立

2.3.1 色谱条件 色谱柱为 Alltima C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液(25:75),体积流量 1.0 mL/min,检测波长 240 nm,柱温 30 °C。

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取波棱甲素对照品 36.0 mg,置 100 mL 量瓶中,用适量甲醇溶解,并用 pH 7.5 的磷酸盐缓冲液稀释至刻度,得 360 μg/mL 的波棱甲素对照品储备液。

2.3.3 供试品溶液的制备 取波棱甲素纳米混悬剂胶囊 6 粒,按照溶出度测定法(《中国药典》2010 年版附录 XC 第二法),以 pH 7.5 的磷酸盐缓冲液 900 mL 为溶出介质,转速为 100 r/min,依法操作,45 min 时,取样 2 mL,立即滤过,取续滤液即得供试品溶液。

2.3.4 专属性考察 按处方比例配制辅料,按其工艺制成空白制剂,再按供试品溶液的制备方法制备并测定,结果空白溶液在与波棱甲素对照品相同保留时间处未显色谱峰,故认为辅料对波棱甲素的测定无干扰,其色谱图见图 2。

2.3.5 线性关系考察 精密移取质量浓度为 360 μg/mL 的波棱甲素对照品储备液适量,用 pH 7.5 的磷酸盐缓冲液稀释成 3.0、15.0、30.0、60.0、90.0、120.0 μg/mL 的系列波棱甲素对照品溶液,各取 20 μL 注入高效液相色谱仪,按上述色谱条件测定峰面积,以峰面积为纵坐标(Y),波棱甲素的质量浓度为横坐标(X)进行线性回归,得回归方程: $Y = 27.36X + 6.6816$, $r = 0.9998$,结果表明波棱甲素

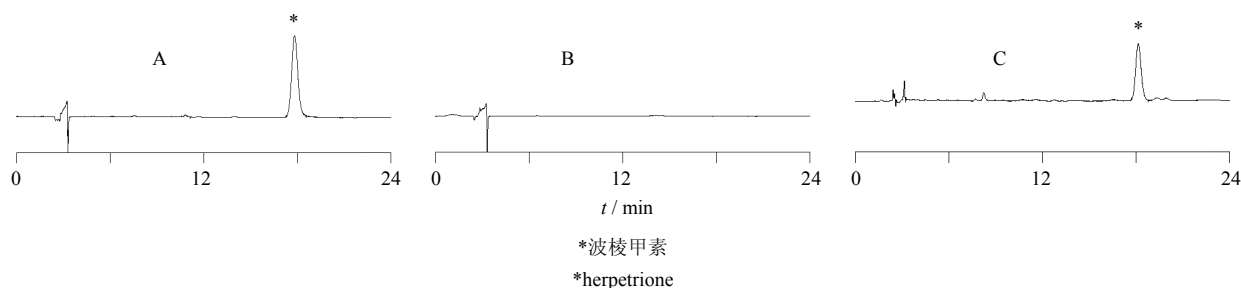


图 2 波棱甲素对照品 (A)、空白对照 (B) 和供试品 (C) 的 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of herpetrione reference substance (A), negative control (B), and sample (C)

在 3.00~120.0 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

2.3.6 精密度试验 精密吸取质量浓度为 60.0 $\mu\text{g/mL}$ 的波棱甲素对照品溶液 20 μL 注入液相色谱仪, 测定峰面积, 于同日内重复测定 5 次, 计算日内精密度; 连续测定 5 d, 计算日间精密度, 结果日内 RSD 为 0.41%, 日间 RSD 为 0.63%。

2.3.7 稳定性试验 取供试品溶液, 分别于 0、2、4、6、8 h 取样 20 μL 注入液相色谱仪, 测定峰面积, 结果 RSD 为 0.74%, 表明供试品溶液在 8 h 内稳定。

2.3.8 回收率试验 精密称取处方量 80%、100%、120% 的波棱甲素原料药各 3 份, 按处方比例加入其他辅料, 配成低、中、高 (64、80、96 $\mu\text{g/mL}$) 3 种质量浓度的溶液, 按溶出度测定项下方法测定, 计算回收率, 结果平均回收率分别为 99.18%、99.32%、98.59%, RSD 分别为 0.96%、0.82%、1.03%。

2.4 溶出度的测定

2.4.1 溶出介质的选择 根据人体胃肠道环境的特点, 选用 4 种不同的溶出介质: pH 1.0 的盐酸溶液、pH 4.5 的磷酸盐缓冲液、pH 6.8 的磷酸盐缓冲液和 pH 7.5 的磷酸盐缓冲液进行试验, 按溶出度的测定项下方法操作, 经不同时间取样 (并同时补液) 测定溶出量, 计算累积溶出率。结果显示以 pH 7.5 的磷酸盐缓冲液作为溶出介质时, 溶出最好 (图 3), 故确定以 pH 7.5 的磷酸盐缓冲液作为溶出介质。

2.4.2 溶出度的测定 取波棱甲素纳米混悬剂胶囊 6 粒, 按《中国药典》2010 年版二部附录 XC 溶出度测定法第二法, 以 pH 7.5 的磷酸盐缓冲液 (0.05 mol/L 磷酸二氢钾与 0.05 mol/L 磷酸二氢钠等量混合, 用 1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 值至 7.5) 900 mL 为溶出介质, 转速为 100 r/min, 依法操作, 分别于 5、10、15、20、30、45、60 min 时取样 2 mL (并同时补液), 滤过, 取续滤液, 作为供试品溶液; 分别吸取供试品溶液、对照品溶液各 20 μL 注入高效液相色谱仪, 记录色谱峰面积, 按外标法计算供

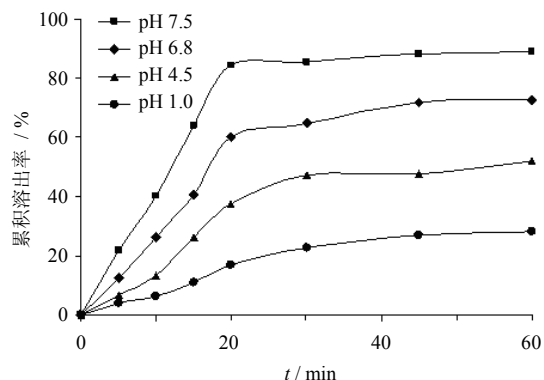


图 3 4 种不同溶出介质下波棱甲素纳米混悬剂胶囊的溶出曲线图

Fig. 3 Dissolution curves of herpetrione nanosuspensions capsules in four different dissolvents

试品溶液中波棱甲素的质量浓度, 并计算其体外累积溶出率。

2.4.3 样品测定 取波棱甲素纳米混悬剂胶囊及波棱甲素物理混合物胶囊, 按溶出度测定项下方法进行测定, 并对数据进行 One-way ANOVA。结果见图 4, 可见波棱甲素纳米混悬剂胶囊的溶出速率及溶出量明显优于波棱甲素物理混合物胶囊 ($P < 0.01$)。

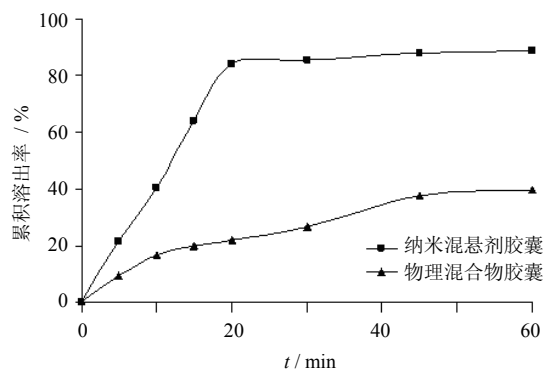


图 4 波棱甲素纳米混悬剂胶囊和物理混合物胶囊的溶出曲线图

Fig. 4 Dissolution curves of herpetrione nanosuspensions capsules and physical mixture capsules

3 讨论

溶出度是指药物在规定溶剂中于一定条件下,从片剂或胶囊剂等固体制剂中溶出的速度和程度,是一种控制药物制剂质量的体外检测方法^[10-11]。溶出度试验可部分反映固体制剂中主药的某些理化性质、处方组成、辅料品种及性质、生产工艺等方面的差异。目前,体外溶出试验已作为化学药固体制剂的质控手段之一,传统的中药制剂多以煎剂为主,不存在溶出度问题,而经过工艺技术制成的现代中药多以片剂、胶囊剂、丸剂等固体制剂为主,其有效成分的溶出是体内吸收的必要前提,也必将影响其药效的发挥^[12]。为了改善波棱甲素的难溶性,本实验采用高压均质法制备了波棱甲素纳米混悬剂,并建立了其胶囊的体外溶出度测定方法,对其体外溶出性能进行了考察。

以往难溶性药物的溶出度试验中,溶出介质经常会选用部分有机溶剂或含有增溶剂的水溶液,而人体内并不含有有机溶剂或增溶剂,此方法不能很好预测其体内的生物利用度,体内外相关性较差。在本实验中,根据人体胃肠道环境的特点,选用了pH 1.0的盐酸溶液(模拟胃液)、pH 4.5的磷酸盐缓冲液(模拟十二指肠液)、pH 6.8的磷酸盐缓冲液(模拟小肠液)和pH 7.5的磷酸盐缓冲液(模拟结肠液)4种溶出介质,并对这4种溶出介质进行了考察,结果显示以pH 7.5的磷酸盐缓冲液作为溶出介质时,溶出最好,因此最终确定以pH 7.5的磷酸盐缓冲液作为溶出介质。从样品测定结果得知,波棱甲素的物理混合物最大累积溶出率只有39.85%,无法达到溶出度要求,而制备成纳米混悬剂后,波棱甲素的累积溶出率20 min时就能达到84.31%,可见波棱甲素纳米混悬剂胶囊的体外累积溶出率明显优于波棱甲素物理混合物胶囊($P<0.01$)。分析原因可能如下:①纳米混悬剂使药物的粒径减小,表面积增大,药物的渗透性强,从而使药物的饱和溶解度和溶出率都得到了提高。②纳米混悬剂可改变药物的晶型,增加药物中无定型态晶型的比例或完全转换成无定型态,提高药物的溶解度。③当药物粒子小于1 μm 时,其内在溶出速率会发生突然增大的现象^[13]。因此,将难溶性药物波棱甲素制成纳米

混悬剂后,其体外溶出速度和程度可得到明显改善。

本实验对波棱甲素纳米混悬剂的研究结果表明,纳米混悬剂可以显著改善难溶性药物的体外溶出速度和程度,适合作为难溶性药物波棱甲素的给药系统。

参考文献

- [1] 丛龙波,王琪,李仙义,等.藏药波棱瓜子抗肝炎药效物质基础研究[J].医学研究杂志,2007,36(8): 75-76.
- [2] 中华人民共和国卫生部药品标准·藏药(第1册)[S]. 1995.
- [3] Yuan H L, Liu Y, Zhao Y L, et al. Herpetin, a new bioactive lignan isolated from *Herpetospermum caudigerum* [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2005, 14(3): 140-143.
- [4] Yuan H L, Yang M, Li X Y, et al. Hepatitis B virus inhibiting constituents from *Herpetospermum caudigerum* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2006, 54(11): 1592-1594.
- [5] 吕俊兰,李仙义,袁海龙,等.波棱甲素纳米混悬剂对D-半乳糖胺诱导的小鼠急性肝损伤的保护作用[J].中国药理学杂志,2011,46(24): 1898-1901.
- [6] 袁海龙,郭静静,李仙义,等.一种制备 Herperione 的方法及其应用、其胶囊剂及胶囊剂的制备方法和应用[P].中国专利:201110072191.9,2011-03-24.
- [7] 王懿睿,杜光.难溶性药物纳米混悬剂制备工艺及其应用[J].中国医院药学杂志,2007,27(11): 1573-1576.
- [8] Chingunpituk J. Nano suspension technology for drug delivery [J]. *Walailak J Sci & Tech*, 2007, 4(2): 139-153.
- [9] 熊若兰,陆伟根.纳米混悬剂研究进展[J].世界临床药物,2007,28(2): 117-121.
- [10] Ansel H C, Allen L V, Popovich N G. 药物剂型和给药体系[M].北京:中国医药科技出版社,2003.
- [11] 钟大放,李高,刘昌孝.药物制剂生物利用度和生物等效性试验指导原则(草案)[J].药物评价研究,2011,34(5): 321-334.
- [12] 危华玲,陈晓宇,李懿,等.HPLC法测定复方黄酮胶囊的溶出度[J].中国药房,2007,18(27): 2117-2119.
- [13] Müller R H, Benita S, Böhm B H L. *Emulsions and Nanosuspensions for the Formulation of Poorly Soluble Drugs* [M]. Stuttgart: Medpharm Scientific Publisher, 1998.