

难溶性药物姜黄素作为纳米晶稳定剂制备 Pickering 乳剂的研究

冉 娅, 张良珂*

重庆医科大学药学院 重庆高校药物工程研究中心, 重庆 400016

摘要:目的 使用姜黄素纳米晶(curcumin nanocrystalline, Cur-NC)作为固体颗粒稳定剂,制备 Cur-NC 自稳定 Pickering 乳剂(Cur-NC self-stabilized Pickering emulsion, Cur-NCSPE)。方法 采用高压均质机制备 Cur-NCSPE;比较不同的均质压力对 Cur-NC 粒径的影响,考察 Cur-NC 的加入量对 Cur-NCSPE 形成的影响,用光学显微镜、扫描电子显微镜观察乳剂的形态与结构,对 Cur-NCSPE 的稳定性及体外药物释放进行考察。结果 随着高压均质压力的增加, Cur-NC 的粒径逐渐减小,当高压均质压力大于 100 MPa 后, Cur-NC 的粒径变化趋于平稳;随着姜黄素(curcumin, Cur)投入量的增加, Cur-NC 对油滴的包裹量增大,乳滴的粒径逐渐减小,当加入的药物量能够将油滴完全包裹时,继续增大药物量对乳滴粒径的影响不再明显。Cur-NCSPE 的稳定性比 Cur-NC 和 Cur 高, Cur-NCSPE 的体外释放速率比 Cur-NC 和 Cur 的释放速率显著加快。结论 成功制备了 Cur-NCSPE,有望为中药难溶性成分提供新的口服给药技术平台。

关键词:姜黄素; Pickering 乳剂; 纳米晶; 自稳定; 固体颗粒稳定剂; 高压均质; 稳定性; 体外释放; 难溶性成分

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)09-1773-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.09.012

Preparation of poorly soluble drug curcumin nanocrystalline self-stabilized Pickering emulsion

RAN Ya, ZHANG Liang-ke

Chongqing Research Center for Pharmaceutical Engineering, School of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Abstract: **Objective** To prepare curcumin nanocrystalline (Cur-NC) self-stabilized Pickering emulsion (Cur-NCSPE). **Methods** Cur-NCSPE was prepared by high pressure homogenization. The influences of homogenization pressure on Cur-NC size and drug content on Cur-NCSPE formation were studied. The morphology and structure of emulsion droplets were observed by optical microscope and scanning electron microscope. Furthermore, the stability and *in vitro* release properties of Cur-NCSPE were evaluated. **Results** The particle size of Cur-NC was slightly changed when homogeneous pressure was greater than 100 MPa. With the increase of Cur, the amount of Cur-NC on the surface of oil droplets increases, and the particle size decreases. When the amount of drug added can completely cover the surface of oil droplets, increasing the amount of drug had little effect on the particle size. Cur-NCSPE was more stable than Cur-NC and Cur, and the *in vitro* release rate of Cur-NCSPE was significantly higher than that of Cur-NC and Cur coarse power. **Conclusion** The Cur-NCSPE is prepared successfully, which is expected to provide a novel oral administration technology platform for the poorly soluble drugs.

Key words: curcumin; Pickering emulsion; nanocrystalline; self-stabilizing; solid particle stabilizer; high-pressure homogenization; stability; *in vitro* release; insoluble ingredients

姜黄素(curcumin, Cur)是从姜科植物郁金、天南星科植物菖蒲以及姜黄等的根茎中提取的一种二酮类化合物,具有调血脂、抗肿瘤、抗炎、利胆、抗氧化等作用^[1-3]。Cur 在水中的溶解度低,限制了

其临床应用^[4]。Pickering 乳剂是使用固体颗粒代替表面活性剂作为乳化剂所制备的一种乳剂。最早于 1903 年 Walter Ramsden 首先发现, Pickering 在 1907 年进一步描述了该现象,后来称这类由固体颗粒稳

收稿日期: 2016-12-16

基金项目: 重庆市自然科学基金资助项目(cstc2016jcyjA0068)

作者简介: 冉 娅(1992—),女,硕士生,主要从事中西药物新型给药系统研究。Tel: (023)68485161 E-mail: 819275092@qq.com

*通信作者 张良珂,男,教授。Tel: (023)68485161 E-mail: zlkdyx@126.com

定的乳液为 Pickering 乳剂。Pickering 乳剂所使用的固体颗粒主要有 SiO_2 ^[5]、蒙脱土^[6-7]和其他纳米粒^[8-11]等。固体颗粒之间紧密排列在一起,起到空间位阻的作用,从而有效抑制分散液滴间的聚集^[12-13]。本实验采用 Cur 纳米晶(Cur nanocrystalline, Cur-NC)作为稳定 Pickering 乳剂的固体颗粒,制备由 Cur-NC 自稳定的 Pickering 乳剂(Cur-NC self-stabilizing Pickering emulsion, Cur-NCSPE)。该制剂不含表面活性剂,只有油相、水相和 Cur 原料药^[14]。与传统表面活性剂稳定的乳剂相比, Cur-NCSPE 的优点在于未使用表面活性剂,可避免表面活性剂对人体的潜在性危害^[15]。此外, Cur-NCSPE 使用 Cur-NC 作为稳定剂,降低了制剂的成本,同时提高了乳剂的载药量。本研究还对 Cur-NCSPE 的制备工艺、稳定性和体外释放特性进行了考察。

1 仪器与材料

1.1 仪器

H30 超高压纳米均质机, ATS 工业系统有限公司; Zetasizer Nano ZS 纳米粒度仪, 英国马尔文仪器公司; VC505 超声波破碎机, 美国 SONICS&MATERIALS 公司; MT-30K 手持式高速剪切机, 杭州米欧仪器有限公司; SHZ-88 台式恒温水浴振荡器, 江苏太仓市实验设备厂; UV-5200PC 型紫外分光光度计, 上海元析仪器有限公司; KQ-500 b 型超声波清洗仪, 昆山市超声仪器有限公司; S-3000N 扫描电子显微镜, 日本日立公司; Eclipse 50i 正置显微镜, 日本尼康公司。

1.2 药品与试剂

Cur, 批号 G1304004, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 质量分数 $\geq 98\%$; 单辛酸甘油酯, 河南正通化工有限公司; 辛葵酸甘油酯, 浙江省千岛精细化工实业有限公司; 橄榄油, 国家医药集团化学试剂有限公司; 蓖麻油, 天津复苏精细化工研究所; 菜籽油, 浙江益海嘉里食品工业有限公司; 十二烷基硫酸钠(SDS), 成都市科龙化工试剂厂, 质量分数 $\geq 85\%$; 无水乙醇; 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 油相的选择

2.1.1 Cur 检测波长的选择 精密称取 Cur 适量, 用 50%乙醇溶解并定容至 10 mL, 在波长 200~800 nm 进行扫描, 测得 Cur 的最大吸收波长为 430 nm, 且溶剂在此波长处无干扰, 因此确定 Cur 的检测波长为 430 nm。

2.1.2 线性关系考察 根据参考文献的方法^[16-18], 精密称取 Cur 10.0 mg, 用 50%乙醇溶解并定容至 50 mL 的棕色量瓶中, 稀释得到质量浓度分别为 1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5 $\mu\text{g/mL}$ 的标准溶液, 于 430 nm 处测定吸光度(A)值, 得到回归方程 $A=0.139\ 6\ C+0.009\ 6$, $r=0.999\ 8$, 结果表明 Cur 在 1.5~4.5 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。低、中、高质量浓度(1.5、3.0、4.5 $\mu\text{g/mL}$)的标准溶液日内、日间精密度的 RSD 平均值分别为 0.39%和 0.54% ($n=3$); 低、中、高质量浓度样品平均回收率分别为 98.41%、100.06%、98.49%, RSD 分别为 0.74%、0.49%、0.19% ($n=3$), 均符合分析要求。

2.1.3 Cur 在油相中的溶解度测定 分别取橄榄油、蓖麻油、菜籽油、单辛酸甘油酯和辛葵酸甘油酯各 2.0 mL 于离心管中。分别加入过量的 Cur, 涡旋 2 min 后置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床振摇 72 h。然后取出适量样品于 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 25 μL , 加入无水乙醇溶解, 用紫外分光光度计 430 nm 处测得 A 值, 代入标准曲线计算 Cur 在油相中的溶解度。结果 Cur 在橄榄油、蓖麻油、菜籽油、单辛酸甘油酯和辛葵酸甘油酯中的溶解度分别为 (0.57 ± 0.04) 、 (0.41 ± 0.12) 、 (0.52 ± 0.03) 、 (6.68 ± 0.06) 、 (3.08 ± 0.06) mg/mL ($n=3$)。可见 Cur 在单辛酸甘油酯中的溶解度最大, 因此选择单辛酸甘油酯作为油相^[19]。

2.2 Cur-NC 的制备及稳定性考察

称取 Cur 原料药 30 mg, 加入蒸馏水 10 mL, 探头超声 2 min 后, 使用高速剪切机(25 000 r/min)剪切 2 min, 再使用高压均质机分别在 0、50、70、90、100、110、120 MPa 下循环 10 次, 得到 Cur-NC。吸取样品 500 μL , 稀释后测定其粒径。Cur 在不同均质压力(0、50、70、90、100、110、120 MPa)下的平均粒径分别为 $(4\ 544.00\pm 523.87)$ 、 $(1\ 131.00\pm 26.21)$ 、 (721.37 ± 26.10) 、 (473.67 ± 76.33) 、 (372.87 ± 12.44) 、 (370.90 ± 16.56) 、 (310.20 ± 61.94) nm ($n=3$)。随着均质压力的增加, Cur-NC 的粒径逐渐减小, 当均质压力大于 100 MPa 以后, 粒径的变化不再具有显著性差异, 因此选择 100 MPa 作为制备 Cur-NC 的高压均质压力^[20]。

将制备好的 Cur-NC 混悬液室温下避光放置, 分别在 0、0.5、1、2、4、6、8、12 h 测其粒径, 观察其粒径的变化情况。如图 1 所示, 随着放置时间的延长, Cur-NC 的粒径逐渐增大, 说明 Cur-NC 的

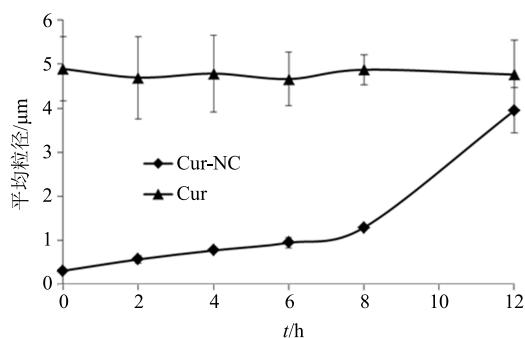


图 1 Cur-NC 和 Cur 在不同均质时间的粒径变化 ($n=3$)

Fig. 1 Changes of particle size of Cur-NC and Cur in different time ($n=3$)

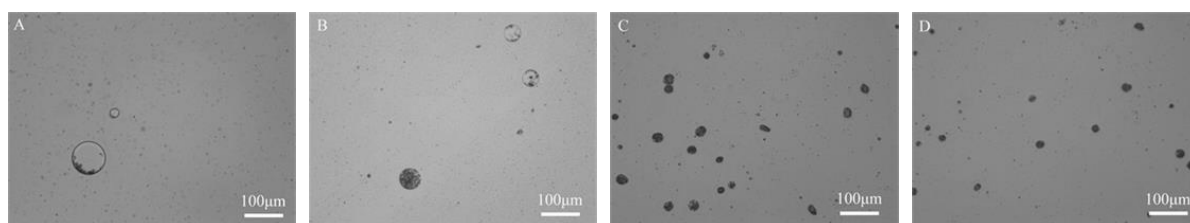


图 2 Cur-NCSPE 随着 Cur 加入量 (A 10 mg、B 20 mg、C 30 mg、D 40 mg) 变化的显微镜外观图

Fig. 2 Photographs of Cur-NCSPE with different amounts of Cur (A 10 mg, B 20 mg, C 30 mg, D 40 mg)

Cur-NC 迅速溶解在油相中,当溶解达到饱和后,随着 Cur-NC 加入量的增加,Cur-NC 逐渐吸附在油滴表面,形成对油滴的包裹,使油滴分散在水相中,形成 Cur-NCSPE。如图 2 所示,当药物为 10 mg 时,油滴表面只覆盖很少的 Cur-NC,未能够形成对油滴的包裹,使用光学显微镜进行图片采集,利用 Image Pro Plus 6.0 进行粒径分析,其粒径为 $(117.35 \pm 23.45) \mu\text{m}$;当药物加入量为 20 mg 时,Cur-NC 对油滴的覆盖面积有所增加,但仍只有部分油滴被完全包裹,还有较多油滴未被完全包裹,其粒径为 $(71.81 \pm 5.98) \mu\text{m}$;当药物的加入量达到 30 mg 时,Cur-NC 能够完全包裹油滴,其粒径为 $(22.43 \pm 8.13) \mu\text{m}$;继续增大药物的加入量,40 mg Cur 时,Cur-NC 对油滴的包裹状态相比于 30 mg Cur 的样品组,没有明显的变化,其粒径为 $(21.58 \pm 7.39) \mu\text{m}$ 。

由上述结果可知,随着药物量的增加,所制得的 Cur-NCSPE 粒径逐渐减小,药物加入量为 30 mg 时,相比于药物加入量为 10 mg 和 20 mg 时的粒径有明显的减小,继续增大药物量为 40 mg 时,Cur-NCSPE 粒径并没有明显的变化。因此确定 Cur-NCSPE 的最佳制备处方为 30 mg Cur、10 mL 水、0.5 mL 单辛酸甘油酯,测得乳剂的载药量为 2.09 mg/mL。将 Cur-NC 作为固体颗粒稳定 Pickering 乳

稳定性较差,容易聚集,经过 12 h 之后 Cur-NC 的粒径接近 Cur。

2.3 Cur-NCSPE 的制备

分别称取 Cur 原料药 10、20、30、40 mg 于 10 mL 的离心管中,加入 5 mL 蒸馏水,探头超声 2 min 后,使用高速剪切机 (25 000 r/min) 剪切 2 min,加蒸馏水定容到 10 mL,在 100 MPa 条件下均质循环 10 次制得 Cur-NC。将所制得的 Cur-NC 与 0.5 g 单辛酸甘油酯混合,使用高压均质机在 100 MPa 条件下循环 10 次,制得 Cur-NCSPE。将制得的乳剂样品用正置显微镜观察,结果见图 2。初始加入的

剂,一方面增大了乳剂中 Cur 的载药量,另一方面还可抑制 Cur-NC 自身的聚集^[19]。

2.4 Cur-NCSPE 的稳定性考察

将 Cur-NCSPE 和 Cur-NC 混悬液 2 种制剂置于 4 °C、避光静置,分别于 0、3、7、15、30、45 d 观察外观变化。Cur-NCSPE 在 45 d 内都能保持相对稳定,没有出现分层的现象;而 Cur-NC 混悬液在第 3 天开始出现分层的现象,随着放置时间的延长,其分层现象更加明显,15 d 时上层澄清,45 d 时,Cur-NC 几乎完全沉淀。Cur-NCSPE 的稳定性较 Cur-NC 混悬液有明显的提高,Cur-NC 吸附在液滴表面形成一个致密的壳状结构,一方面能够保证油滴的充分分散,阻止其合并;另一方面也避免了其自身的聚集。

2.5 体外释放考察

采用动态透析法考察体外释放,选取含 1% 的 SDS 的 pH 7.4 磷酸盐缓冲溶液为释放介质。分别精密量取 1.0 mL 的 Cur-NCSPE、Cur-NC、Cur 各 3 份,置于透析袋内,排除气泡后密封,置于 50 mL 释放介质中 $(37.0 \pm 0.5) ^\circ\text{C}$ 恒温水浴振荡 (100 r/min),0.16、0.5、1、2、4、6、8、12、24、48、60、72、84、96 h 准确取样 4.0 mL,并立即补加等量同温新鲜释放介质,用紫外分光光度计测量 Cur

量, 计算累积释放率 (Q)。

药物的体外释放结果如图3所示, 前4 h 3个样品的释放速度相近, 4 h后释放速度的累积释放度差异明显。Cur-NCSPE 释放最快, 最大累积释放度达到82.01%, 而Cur-NC的释放最大累积释放度仅达到48.08%, Cur的最大累积释放度也只有34.44%。Cur-NCSPE的释药速度相对于Cur-NC和Cur有较大的提高。由于Cur-NC的稳定性较差, 在较短时间内就会聚集, 粒径接近Cur原料药, 因此, 在体外释放中Cur-NC的释放速度仅略快于Cur。

2.6 Cur-NCSPE 的表面形态分析

Cur-NCSPE的光镜图如图4所示, 能够清楚地观察到Cur-NC包裹在油滴的表面。扫描电子显微镜图像如图5所示, 镜下乳滴呈球形或类球形的状态, 说明Cur-NC能够很好的稳定乳剂。

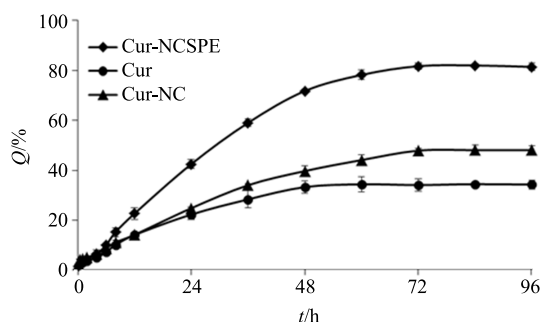


图3 Cur-NCSPE、Cur和Cur-NC的体外释放曲线 ($n=3$)
Fig. 3 *In vitro* release profiles of Cur-NCSPE, Cur, and Cur-NC ($n=3$)

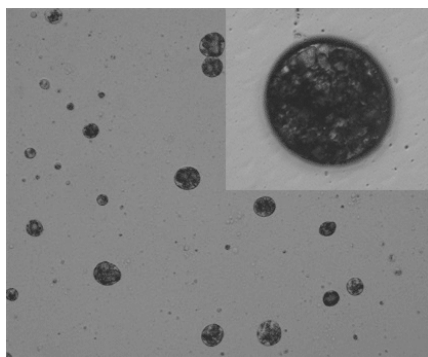


图4 Cur-NCSPE光镜图 ($\times 400$)
Fig. 4 Optical micrograph of Cur-NCSPE ($\times 400$)

3 讨论

本实验以Cur为模型药物, 采用其纳米晶作为稳定剂, 用高压均质法成功制备Cur-NCSPE。在该系统中, Cur一部分溶解在油相内, 另一部分以纳米晶的形式吸附在油滴表面, 形成一层壳状结构, 有效阻止乳滴的合并, 形成稳定的乳剂^[21-22]。

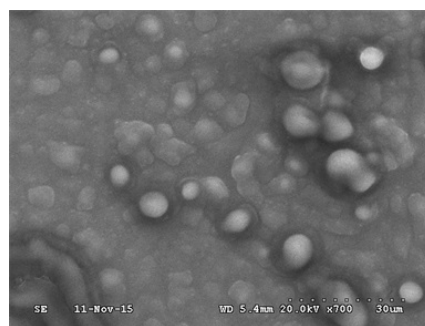


图5 Cur-NCSPE扫描电镜照片
Fig. 5 Scanning electron micrograph of Cur-NCSPE

Pickering乳剂没有使用表面活性剂, 避免了表面活性剂的毒副作用。一方面乳剂中的油相载药, 另一方面使用药物纳米晶作为稳定剂, 这2种途径增大了乳剂的载药量。难溶性药物纳米晶自稳定Pickering乳剂是一种潜在的难溶性药物新型口服给药系统, 有望为中药难溶性成分提供新的口服给药平台^[23], 有关该剂型在体内的吸收机制还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Qian H R, Yang Y, Wang X F. Curcumin enhanced adriamycin-induced human liver-derived Hepatoma G2 cell death through activation of mitochondria-mediated apoptosis and autophagy [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2011, 43(3): 125-131.
- [2] 孙绍璞, 牛建昭. 姜黄素联合雷帕霉素诱导去势难治性前列腺癌 Pten-CaP8 细胞自噬及凋亡研究 [J]. *中草药*, 2012, 43(3): 520-523.
- [3] 狄建彬, 顾振纶, 赵笑东, 等. 姜黄素的抗氧化和抗炎作用研究进展 [J]. *中草药*, 2010, 41(5): 18-21.
- [4] Anand P, Kunnumakkara A B, Newman R A, *et al.* Bioavailability of curcumin: Problems and promises [J]. *Mol Pharm*, 2007, 4(6): 807-818.
- [5] Tikekar R V, Pan Y J, Nitin N, *et al.* Fate of curcumin encapsulated in silica nanoparticle stabilized Pickering emulsion during storage and simulated digestion [J]. *Food Res Int*, 2013, 51(1): 370-377.
- [6] Nonomura Y, Kobayashi N. Phase inversion of the Pickering emulsions stabilized by plate-shaped clay particles [J]. *J Colloid Interface Sci*, 2009, 330(2): 463-466.
- [7] Wang Y Q, Wang X Q, Duan Y F, *et al.* Modification of monotmoillontie with poly (oxypropylene) amine hydrochlorides: basal spacing, amount intercalated, and thermal stability [J]. *Clays Clay Miner*, 2011, 59(5): 507-517.
- [8] Wu J D, Shi M X, Li W, *et al.* Pickering emulsions

- stabilized by whey protein nanoparticles prepared by thermal cross-linking [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2015, 127: 96-104.
- [9] Wen C X, Yuan Q P, Liang H, *et al.* Preparation and stabilization of *d*-limonene Pickering emulsions by cellulose nanocrystals [J]. *Carbohydr Polym*, 2014, 112: 695-700.
- [10] Li C, Li Y X, Sun P D, *et al.* Pickering emulsions stabilized by native starch granules [J]. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*, 2013, 43(33): 142-149.
- [11] Zhou J, Wang L J, Qiao X Y, *et al.* Pickering emulsions stabilized by surface modified Fe₃O₄ nanoparticles [J]. *J Colloid Interface Sci*, 2012, 367(1): 213-224.
- [12] 刘瑞雪, 段瑞卿, 岳英英, 等. 固体颗粒稳定的 Pickering 乳液及其聚合研究述评 [J]. 郑州轻工业学院学报: 自然科学版, 2014, 29(5): 17-22.
- [13] 谭伟强, 臧渡洋, 张永建, 等. SiO₂ 纳米颗粒与聚氧乙烯对 Pickering 乳液的协同稳定作用 [J]. 高等学校化学学报, 2014, 35: 85-91.
- [14] 张 焦, 王 帆, 王计瑞, 等. 葛根素纳米晶自稳定 Pickering 乳液的制备可行性研究 [J]. 中草药, 2017, 48(1): 75-84.
- [15] Xia W, Onyuksel H. Mechanistic studies on surfactant-induced membrane permeability enhancement [J]. *Pharm Res*, 2000, 17(5): 612-618.
- [16] 戴东波, 尤 佳, 何雯洁, 等. 姜黄素聚乙二醇-聚乳酸嵌段共聚物纳米粒的制备及其质量评价 [J]. 中草药, 2014, 45(2): 194-199.
- [17] 于 桐, 吴 超, 季 鹏, 等. 黄芩素固体脂质纳米粒冻干粉的制备及体外释药性质的研究 [J]. 中草药, 2015, 46(18): 2720-2726.
- [18] 黄训瑞. 姜黄素自乳化释药系统体外分析方法的建立 [J]. 中国中医药信息杂志, 2010, 17: 35-36.
- [19] 张继芬, 刘 川, 张 焦, 等. 水飞蓟宾纳米晶自稳定 Pickering 乳液的制备及评价 [J]. 药学报, 2016, 51(5): 813-820.
- [20] Binks B P, Lumsdon S O. Pickering emulsions stabilized by monodisperse latex particles: Effects of particle size [J]. *Langmuir*, 2001, 17(15): 4540-4547.
- [21] Ying T, Kun X, Cheng N, *et al.* Fabrication of starch-based nanospheres to stabilize Pickering emulsion [J]. *Carbohydr Polym*, 2012, 88(4): 1358-1363.
- [22] Li W, Zhao C H, Tan J J, *et al.* Roles of methyl orange in preparation of emulsions stabilized by layered double hydroxide particles [J]. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*, 2013, 421(11): 173-180.
- [23] Simovic S, Hui H, Song Y, *et al.* An oral delivery system for indomethacin engineered from cationic lipid emulsions and silica nanoparticles [J]. *J Control Release*, 2010, 140(3): 367-373.