

反溶剂法制备叶黄素酯纳米粒

冯子奇, 刘佳莹, 桑 梅, 祖元刚, 赵修华*, 邓怡平, 刘艳杰

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 优化叶黄素酯 (LE) 纳米粒 (NPs) 的制备工艺, 并对其水溶性的改善程度进行测试。方法 以四氢呋喃为溶剂, 去离子水为反溶剂, 泊洛沙姆 188 作为表面活性剂, 通过反溶剂法制备 LE-NPs, 采用单因素实验设计法优化 LE-NPs 制备工艺。并综合利用扫描电子显微镜、激光粒度仪、X 射线衍射、差示扫描量热法等分析方法对获得的 LE-NPs 理化性质进行表征; 采用气相色谱 (GC) 进行溶剂残留测定; 并进行了体外溶出对比实验。结果 LE-NPs 的最优制备条件为沉积时间 10 min, 叶黄素酯质量浓度 50 mg/mL, 溶剂反溶剂体积比为 1 : 7, 泊洛沙姆 188 质量分数 0.5%, 搅拌速率 950 r/min, 沉积温度 25 ℃; 所得 LE-NPs 为球形, 平均粒径为 164 nm, 其中四氢呋喃残留量为 344.3 μg/g, 低于人用药物注册技术要求国际协调会 (ICH) 要求的最低标准 (0.780 mg/g); 在人工胃液环境中 LE-NPs 的饱和溶解度和溶出速率分别是原药的 2.91 倍和 9.65 倍。结论 反溶剂法制备的 LE-NPs 具有较好水溶性, 在口服制剂中具有潜在的用途。

关键词: 叶黄素酯; 纳米粒; 反溶剂法; 单因素优化; 粒径; 饱和溶解度; 溶出

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253 - 2670(2017)14 - 2870 - 07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.14.011

Optimization of preparation, characterization, and dissolution characteristics of lutein ester nanoparticles by anti-solvent method

FENG Zi-qi, LIU Jia-ying, SANG Mei, ZU Yuan-gang, ZHAO Xiu-hua, DENG Yi-ping, LIU Yan-jie

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

Abstract: Objective To prepare lutein ester (LE) nanoparticles (LE-NPs) by anti-solvent method using tetrahydrofuran as solvent, deionized water as antisolvent and Poloxamer 188 as surfactant, and to optimize the process of getting LE-NPs. **Methods** The concentration of LE, ratio of solvent to solvent, type and dosage of surfactant, precipitation time and stirring speed were investigated factors affecting the particle size of LE-NPs. The raw LE and LE-NPs were observed and analyzed by scanning electron microscopy, laser particle size analyzer, X-ray diffraction, and differential scanning calorimetry; Solvent residue was tested by GC method. What's more, the solubility and dissolving capability of raw LE and LE-NPs also were detected *in vitro* in this study. **Results** The optimized preparation conditions of LE-NPs were as follows: 10 min of stirring time, 50 mg/mL of LE concentration, 1 : 7 of the volume ratio of solvent to antisolvent, 0.5% at mass fraction of poloxamer 188, 950 r/min of stirring speed, 25 ℃ of precipitation temperature. The mean particle size of spherical LE-NPs was 164 nm. XRD and DSC results showed that LE-NPs had lower crystallinity compared to raw drug, and mainly in amorphous state. The solvent residue result showed that tetrahydrofuran residue content in LE-NPs was 344.3 μg/g. Furthermore, the solubility and dissolution rate of LE-NPs were about 2.91 times and 9.65 times of raw LE. **Conclusion** LE-NPs prepared by antisolvent method could become a new formulation, which has higher solubility and bioavailability than raw LE. **Key words:** lutein esters; nanoparticles; antisolvent method; single factor optimization; particle size; saturation solubility; dissolution

叶黄素酯 (lutein ester, LE) 是一种重要的类胡萝卜素脂肪酸酯。LE 广泛存在于蔬菜、花卉、水果等植物中, 属于类胡萝卜素族天然物质, LE 在体内代谢过程中转化为叶黄素^[1-2]。其主要的构型为全

反式, 具有 C=C 长链的发色基团, 表现出艳丽的金黄色。LE 是一种性能优异的抗氧化剂, 能够有效预防细胞和机体器官衰老^[3], 同时能有效预防老年白内障以及老年性眼球视网膜黄色斑所导致的视力

收稿日期: 2017-03-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (21473023)

作者简介: 冯子奇 (1992—), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为植物化学与植物药。E-mail: 6453531@qq.com

*通信作者 赵修华, 男, 教授, 博士生导师, 主要从事药物新剂型研究。E-mail: xiuhuazhao@nefu.edu.cn

下降^[4]。视网膜（尤其是黄斑）的光辐射损伤已经成为威胁我国国民眼健康严重眼疾。视网膜中黄斑色素的密度与血浆中叶黄素的水平呈正相关^[5]。此外愈来愈多的流行病学调查和实验研究结果表明，摄入叶黄素可以降低癌症的发生率^[6-7]。天然 LE 可替代化学合成着色剂应用于食品、饮料、化妆品等领域，提高人们的健康水平^[8]。但是 LE 水溶性差，口服生物利用度低，使其应用受到了限制^[9-10]。

纳米化技术是提高难溶性药物溶解度的有效途径，纳米药物的平均粒径基本都在 1~1 000 nm，因其粒径超小、比表面积大，吸附能力通常比较强，具有提高水溶性、增加靶向性、减少毒副作用、更容易穿透血管而又不会损伤血管、提高药物吸收效率、保护药物不能够被酶解和增长药物在机体内的半衰期等众多优点^[11-12]。目前常用的方法有湿磨法、气流粉碎法、高压均质技术、超临界流体技术和反溶剂法等^[11-12]，其中机械粉碎法目前应用十分广泛，其缺点是耗能大、效率低和粒径分布不均匀^[13]。高压均质技术和超临界流体技术存在投资大、产率低、不易在工业中放大等缺点^[14-15]。而反溶剂法^[16-19]是把药物溶于它的良溶剂中后，加入到它的不良溶剂中，从而通过降低良溶剂的溶解能力，使药物迅速达到过饱和状态而结晶析出的一种微粉化技术。与传统药物微粉化技术相比较，具有成本低、易操作及易实现工业化等优点^[20]而显现出良好的应用前景。目前，通过该方法已成功制备得到了多种难溶性口服药物^[21-22]。谢玉洁等^[23]研究了采用反溶剂重结晶的方法制备青蒿素超细粉体的工艺，得到的青蒿素超细粉体粒径小，比表面积是原药的 26.4 倍，超细粉体的体外溶出速率也要远远高于青蒿素原药的溶出率。

本实验使用反溶剂结晶法^[13]制备叶黄素酯纳米粒（LE-NPs）以期提高 LE 的溶解度，进而提高其生物利用度。首先通过单因素优化制备工艺获得粒度分布均匀的 LE-NPs，并综合扫描电子显微镜（SEM）、激光粒度法、X 射线衍射（XRD）和差示扫描量热分析法（DSC）对形貌、粒径和晶体结构进行分析，在此基础上进行了模拟胃液的溶解度和溶出速率的测定。

1 仪器与材料

SHJ-A4 水浴恒温磁力搅拌器，常州华奥仪器制造有限公司；ZetaPALS 激光粒度仪，美国布鲁克海文；Quanta-200 扫描电子显微镜（SEM），荷兰 FEI

公司；Scientz-18N 型冷冻干燥机，宁波新芝生物科技股份有限公司；LXJ-IIB 型离心机，上海安亭科学仪器厂；Waters1525 高效液相色谱仪，美国 Waters 公司；3k-15 型高速离心机，德国 Sigma 公司；BS110 型电子分析天平，德国 Sartorius 公司；KQ-250DE 型超声机，昆山市超声仪器有限公司。

LE 原药，质量分数 95.0%，陕西百威生物科技有限公司；LE 对照品，质量分数≥98%，上海同田生物技术有限公司，批号 510324；泊洛沙姆 188（Poloxamer188，P188）、甲醇、三氯甲烷、正己烷、乙醇、丙酮、二氯甲烷、四氢呋喃，分析纯，天津光复精细化工研究所；乙腈、醋酸乙酯，色谱级，山东禹王实业有限公司；模拟胃液和去离子水，实验室自制。

2 方法与结果

2.1 LE 的定量测定

2.1.1 HPLC 分析条件^[14] 色谱柱为迪马公司生产的 Diamonsil C₁₈ 反相柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相 A 为乙腈-水（9：1），B 为醋酸乙酯；线性梯度洗脱为 B 在 20 min 内由 0 增加至 100%；体积流量为 1.0 mL/min；检测波长为 450 nm；进样量为 20 μL。理论板数以 LE 计为 2 381。

2.1.2 LE 标准曲线的绘制 精密称取 LE 对照品 5 mg，加甲醇溶解，置于 25 mL 量瓶中定容，得到 200 μg/mL 对照品母液，使用倍半稀释法配制，配制出质量浓度分别为 100、50、25、12.5、6.25、3.125、1.562 5 μg/mL 的对照品溶液，通过 HPLC 检测各个质量浓度的峰面积，横坐标为对照品质量浓度，纵坐标为峰面积，拟合计算回归方程，所得回归方程为 $Y=380.49X+160.07$ ， $R^2=0.9997$ ，线性范围为 1.562 5~100 μg/mL。

2.2 LE 的溶剂与反溶剂筛选

称取过量的 LE 原药分别加入到备选溶剂中，超声 10 min，使用磁力搅拌器连续搅拌 6 h，将得到的过饱和溶液 4 000 r/min 离心 10 min 去除沉淀，取 20 μL，按“2.1”项方法测定上清液药物质量浓度，结果 LE 在三氯甲烷、四氢呋喃、正己烷、乙醇、丙酮、醋酸乙酯、二氯甲烷、水中溶解度分别为 46.16、68.43、12.52、0.31、17.29、26.86、53.58、0.042 mg/mL。可以得出 LE 在四氢呋喃中具有较大的溶解度，在水中溶解度最小，且四氢呋喃与水能够互溶，因此本实验选择四氢呋喃作为溶剂，水作为反溶剂进行 LE 结晶。

2.3 LE-NPs 反溶剂法制备

通过预试验,确定了以四氢呋喃作为溶剂、水作为反溶剂、P188 作为稳定剂具有较好的纳米化效果。LE-NPs 制备流程如下:将一定质量的 LE 溶解在适量的四氢呋喃中,在频率 40 kHz、功率 250 W 条件下超声 10 min,然后以 4 000 r/min 离心 10 min 去除杂质,取上清。在磁力搅拌器搅拌下,将 LE 四氢呋喃溶液匀速加入含有 P188 的水溶液中,搅拌 5 min,得到 LE 的混悬液,将混悬液用旋转蒸发器进行旋蒸,去除溶剂四氢呋喃,将混悬液放入 -40 °C 冰箱中预冻 12 h,再将其放入冻干机中进行冷冻 (-80 °C) 干燥 48 h,最后得到 LE-NPs。

预试验结果表明对 LE 粒径影响较大因素有药物质量浓度、表面活性剂 P188 用量、四氢呋喃-水体积比、搅拌速率、沉积温度和沉积时间,由于单因素实验方便易行,本实验选择单因素实验设计进行粒径优化。根据 Noyes-Whitney 方程,粒径越小,溶出率就越高,但过小的粒径 (<100 nm) 会导致体系稳定性变差。综合考虑溶出率和稳定性,在文献调研的基础上,确立以粒径 (>100 nm) 作为优化指标^[24]。因素范围设置如下:沉积时间为 1~25 min,溶剂和反溶剂的比例为 1:3~1:15,搅拌速率为 500~1 400 r/min,LE 质量浓度为 20~60 mg/mL,反应温度为 4~35 °C,表面活性剂 P188 用量为 0.1%~0.5%。每组实验重复 3 次,得到的 LE-NPs 混悬液通过激光粒度仪检测粒径,计算平均值。

2.4 影响 LE-NPs 平均粒径的主要因素考察

2.4.1 表面活性剂 P188 用量对 LE-NPs 平均粒径的影响 保持其他实验工艺条件不变(LE 质量浓度为 30 mg/mL、反溶剂与溶剂比例为 1:9、沉积时间为 10 min、搅拌速率为 950 r/min,温度为 25 °C) 的情况下考察表面活性剂 P188 用量分别为 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5% 对得到的 LE-NPs 混悬液平均粒径的影响,结果平均粒径分别为 (432.2±4.3)、(322.9±4.5)、(295.0±4.1)、(225.5±5.3)、(189.3±6.7) nm。当表面活性剂 P188 用量从 0.1% 增加到 0.5% 时(按 P188 水溶液计算),LE-NPs 混悬液的平均粒径从 432.2 nm 降低至 189.3 nm,即平均粒径随着表面活性剂用量增加而减小,其原因是 P188 作为非离子型表面活性剂,随着用量增加时它的亲水能力就会增强,从而增强 LE 在水中的分散性,所以会使得 LE-NPs 混悬液的平均粒径减小,

在 P188 用量为 0.5% 时,平均粒径最小。如果继续增加 P188 用量粒径可能会更小,但会引起最终获得的冻干粉中 LE 量降低及制备成本增加。综合考虑上述因素,确定 0.5% 为表面活性剂 P188 用量。

2.4.2 沉积时间对 LE-NPs 平均粒径的影响 其他实验工艺条件不变(表面活性剂用量为 0.5%、LE 质量浓度为 30 mg/mL、反溶剂与溶剂比例为 1:9、搅拌速率为 950 r/min,温度为 25 °C) 的情况下考察沉积时间在 1、3、5、10、15、20、25 min 对得到的 LE-NPs 混悬液平均粒径的影响,结果平均粒径分别为 (182.0±3.6)、(166.3±3.1)、(145.6±3.5)、(132.3±4.7)、(143.6±4.5)、(155.3±4.2)、(162.2±4.1) nm。沉积过程中,1~10 min,随着时间延长平均粒径逐渐减小,10 min 后平均粒径又开始逐渐增大。这是因为 LE 在重结晶过程中,在较短的时间内未完全沉积,粒径偏大。沉积完成后,体系过饱和最大,粒径变小。由于奥斯瓦尔德 (Ostwald) 熟化效应,随着时间延长,溶质中较小的结晶或者溶胶颗粒会溶解并再次沉积成大的结晶或者溶胶颗粒上,小粒子会相互碰撞并聚集生长为大颗粒。所以当沉积时间超过 10 min 后粒径会增大。沉积时间为 10 min 时粒径最小,所以确定最佳的沉积时间为 10 min。

2.4.3 溶剂与反溶剂体积比对 LE-NPs 平均粒径的影响 在其他工艺条件不变(表面活性剂用量为 0.5%、LE 质量浓度为 30 mg/mL、沉积时间为 10 min、搅拌速率为 950 r/min,温度为 25 °C) 的情况下考察溶剂与反溶剂体积比分别为 1:3、1:5、1:7、1:9、1:11、1:13、1:15 对得到的 LE-NPs 混悬液平均粒径的影响,结果平均粒径分别为 (157.2±2.6)、(143.3±3.2)、(123.6±2.5)、(167.2±3.7)、(165.6±4.3)、(168.3±5.2)、(176.2±3.2) nm。当体积比从 1:3 增加到 1:7 时,粒径从 157.2 nm 减小到了 123.6 nm,但是随着体积比增大到 1:15 平均粒径又增大到 176.2 nm。这是因为随着反溶剂比例的增加,会使得药物短时间内达到饱和,这时溶液中的 LE 就会迅速的结晶析出,从而产生 LE 微粒,但是随着反溶剂的量继续增加,产生的小微粒不稳定,会产生团聚或者聚合的现象而导致粒径的增大^[13]。所以最优的体积比为 1:7。

2.4.4 搅拌速率对 LE-NPs 平均粒径的影响 在其他工艺条件不变(表面活性剂用量为 0.5%、LE 质量浓度为 30 mg/mL、沉积时间为 10 min、反溶剂与

溶剂比例为1:7, 温度为25℃)的情况下考察搅拌速率分别为500、650、800、950、1100、1250、1400 r/min对得到的LE-NPs混悬液平均粒径的影响, 结果平均粒径分别为 (187.8 ± 5.6) 、 (161.3 ± 4.3) 、 (146.9 ± 3.3) 、 (120.2 ± 3.6) 、 (121.6 ± 2.9) 、 (119.3 ± 3.3) 、 (122.6 ± 4.3) nm。搅拌速率500~950 r/min时, 平均粒径逐渐从187.8 nm减小至120.2 nm; 随着转速继续增加到1400 r/min, 平均粒径基本上处于一个稳定的区间, 平均粒径变化不大。原因是低速率搅拌下, 沉积出来的LE粒子不能够均匀地分散开, 而从出现团聚的现象, 导致平均粒径偏大。如果开始就高速搅拌会使得粒子不会发生团聚, 防止其聚合, 继续搅拌会使得整个体系更加均匀, 最后粒子的平均粒径最小。因为搅拌速率为950 r/min时粒子平均粒径最小, 而且增加转速后平均粒径没有明显地改善, 所以950 r/min为最佳的搅拌速率。

2.4.5 LE质量浓度对LE-NPs平均粒径的影响 在其他工艺条件不变(表面活性剂用量为0.5%、沉积时间为10 min、反溶剂与溶剂比例为1:7、搅拌速率为950 r/min, 温度为25℃)的情况下考察LE质量浓度分别为20、25、30、35、40、50、60 mg/mL对得到的LE-NPs混悬液平均粒径的影响, 平均粒径分别为 (165.4 ± 5.4) 、 (161.3 ± 5.3) 、 (154.9 ± 4.3) 、 (135.2 ± 3.4) 、 (124.6 ± 2.9) 、 (115.3 ± 2.3) 、 (132.6 ± 4.7) nm。当LE质量浓度从20 mg/mL增加到50 mg/mL时, LE平均粒径在逐渐减小, 而当质量浓度增加到60 mg/mL时粒径开始增大。这是因为LE的四氢呋喃溶液质量浓度过大的时候沉积出来的微粒数量增加, 从而增加了微粒之间的碰撞及团聚的几率。所以在沉积过程中会产生大量的微粒团聚物, 导致了平均粒径的增大。而药物质量浓度过小会导致最后的得率过低, 所以最佳的质量浓度为50 mg/mL。

2.4.6 沉积温度对LE-NPs平均粒径的影响 在其他工艺条件不变(表面活性剂用量为0.5%、沉积时间为10 min、反溶剂与溶剂比例为1:7、搅拌速率为950 r/min, LE质量浓度为50 mg/mL)的情况下考察体系温度分别为4、10、15、20、25、30、35℃对得到的LE-NPs悬浊液平均粒径的影响, 结果平均粒径分别为 (109.4 ± 3.5) 、 (110.3 ± 4.3) 、 (108.9 ± 4.3) 、 (112.2 ± 3.4) 、 (108.6 ± 3.9) 、 (111.3 ± 2.9) 、 (112.6 ± 3.3) nm。沉积时的温度从4℃升到35℃

的过程中, LE的平均粒径并未发生明显的改变, 稳定的维持在110 nm左右, 由此可见温度对LE平均粒径的影响较小, 考虑到节约能源的问题, 25℃为室温, 所以选择25℃作为沉积的最佳温度。

2.5 最优化工艺验证

基于以上单因素试验, 确定LE反溶剂重结晶的最佳条件: 沉积时间为10 min, LE质量浓度为50 mg/mL, 溶剂反溶剂体积比为1:7, 表面活性剂P188用量为0.5%, 搅拌速率为950 r/min。在此条件下进行3次验证实验, 所得LE-NPs混悬液的粒径为109 nm, 冻干后即得LE-NPs。后续研究中的LE-NPs均是该条件下制备所得。

2.6 LE-NPs表征

2.6.1 SEM检测 用SEM分析纳米化前后LE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LE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。

如图1所示, 从原粉与纳米粒的电镜照片可以看出, 原粉颗粒形态不规则, 有破碎的片状、圆球等各自的形貌, 颗粒粒径在3~50 μm变化, 粒度分布不均匀; LE-NPs冻干粉呈规则的均匀球状结构, 粒径大概在160 nm左右, 与原粉相比粒径明显减小且更加均匀。

2.6.2 粒径分布检测 取在最优条件下制得的LE-NPs, 使用激光粒度仪检测粒径, 得出的正态分布曲线见图2, LE-NPs混悬液平均粒径为 (109.0 ± 3.4) nm, LE-NPs冻干粉复溶液平均粒径为 (164.0 ± 4.3) nm, 通过激光粒度仪测得的LE-NPs冻干粉的粒径和SEM所得出的结果是一致的, 冻干粉的粒径要稍高于LE-NPs混悬液, 是因为在冷冻干燥的期间, 粒子会有少量团聚, 导致粒径增大。

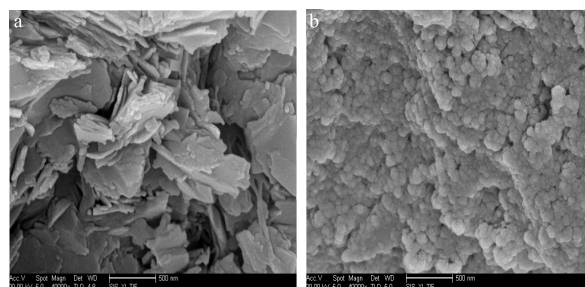


图1 LE原粉(a)和LE-NPs冻干粉(b) SEM图谱

Fig. 1 SEM images of raw LE (a) and LE-NPs lyophilized powder (b)

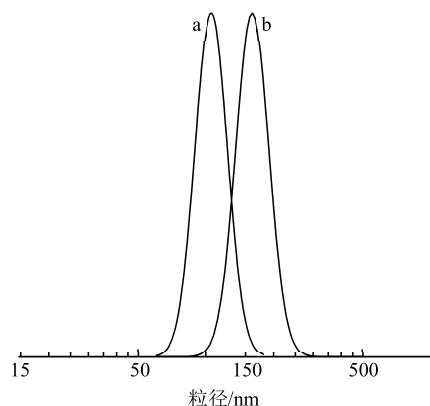


图 2 LE-NPs 混悬液 (a) 和 LE-NPs 冻干复溶液 (b) 平均粒径正态分布曲线

Fig. 2 Size normal distribution curves of LE-NPs suspension (a) and reconstruction solution of LE-NPs lyophilized powder (b)

2.7 晶体结构分析

2.7.1 XRD 分析 称取样品 10 mg, 扫描步长为 0.02° , 扫描范围 $5^\circ \sim 60^\circ$, 电压 40 kV, 电流 30 mA。结果如图 3 所示, LE 原药为晶体状态, 在 2θ 17.8° 和 22.4° 处均有明显的吸收峰; P188 也为晶体状态, 在 2θ 20.3° 和 24.5° 处有极强的吸收峰。而 LE-NPs 在 2θ 20.3° 和 24.5° 处有极强的吸收峰, 这主要是 P188 的特征峰, 这说明 LE 在制备成纳米粉后晶体结构发生了变化, 由晶体态转变为了无定形态。

2.7.2 DSC 分析 称取样品 5 mg, 放入量热池内进行测试, 温度 $40 \sim 280^\circ\text{C}$, 升温速度 $10^\circ\text{C}/\text{min}$ 。结果如图 4 所示, LE 原药在 55.5°C 和 130.0°C 处有熔点峰, 为晶体状态; 而 P188 在 56.34°C 处的峰形具有明显的晶体特征峰; LE-NPs 在 56.34°C 处

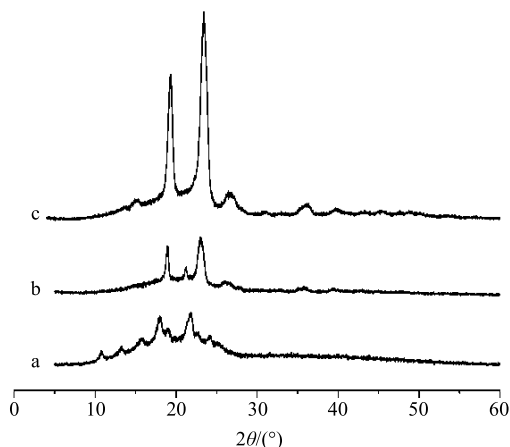


图 3 LE 原药 (a)、LE-NPs (b) 和 P188 (c) XRD 图

Fig. 3 XRD results of raw LE (a), LE-NPs (b), and poloxamer 188 (c)

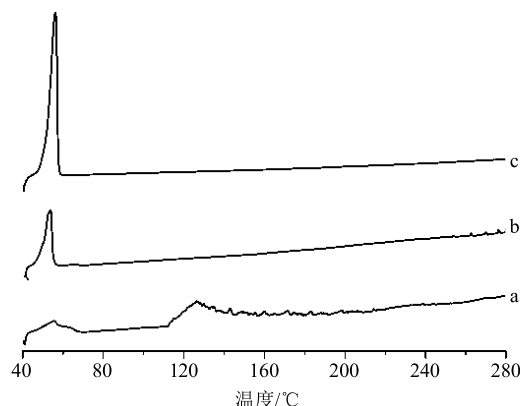


图 4 LE 原药 (a)、LE-NPs (b) 和 P188 (c) DSC 图

Fig. 4 DSC results of raw LE (a), LE-NPs (b), and poloxamer 188 (c)

有熔点峰, 而在 130.0°C 熔点消失, 这都说明 LE 在制备成纳米粉后晶体结构发生了变化, 由晶体态转变成了无定形态, 这一结果与 XRD 结果相互印证。一般来讲, 无定形态或低结晶度的药物具有更好的溶出度和生物利用度。

2.8 溶剂残留检测

为了分析 LE-NPs 中溶剂残留量, 本实验使用气相色谱 (GC) 来检测溶剂残留。其中 GC 的参数设置为初始柱温保持在 40°C 下 2 min, 以 $2^\circ\text{C}/\text{min}$ 的速度升温到 70°C , 保持这个温度 1 min; 再以 $15^\circ\text{C}/\text{min}$ 的速度升温到 200°C 保持 2 min。进样针和检测器的温度分别为 200°C 、 280°C , 氮气作为载气, 其体积流量 $25\text{ mL}/\text{min}$, 氢气和空气的体积流量分别为 30 、 $400\text{ mL}/\text{min}$, 分流比为 $20:1$ ^[25]。精密的称取四氢呋喃 44.6 mg 加入乙醇溶解, 置于 10 mL 量瓶中定容, 得到 $4.46\text{ mg}/\text{mL}$ 标准母液, 母液稀释 100 倍后, 使用倍半稀释法配制, 配制质量浓度 $1.393\text{ } 75 \sim 44.6\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ 的对照品溶液。GC 检测 LE-NPs 中四氢呋喃溶剂残留的结果见图 5。拟合方程为 $Y=372.1X+24.038$, $R^2=0.9997$, Y 为峰面积, X 为质量浓度, 经过计算得出 LE-NPs 中四氢呋喃的溶剂残留量为 $344.3\text{ }\mu\text{g}/\text{g}$, 此残留量要低于人用药物注册技术要求国际协调会 (ICH) 要求的最低标准 ($0.780\text{ mg}/\text{g}$)。

2.9 体外溶出特征

2.9.1 饱和溶解度 将过量的 LE 原药、LE-NPs 和物理混合物 (LE、P188 的比例与 LE-NPs 相同) 分别加入到 2 mL 溶出介质人工胃液中, 水浴温度 $(37.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$, 搅拌速率 $100\text{ r}/\text{min}$, 连续搅拌 48 h 后, 取 1 mL 样品, 再以 $10\text{ } 000\text{ r}/\text{min}$ 的速率离心

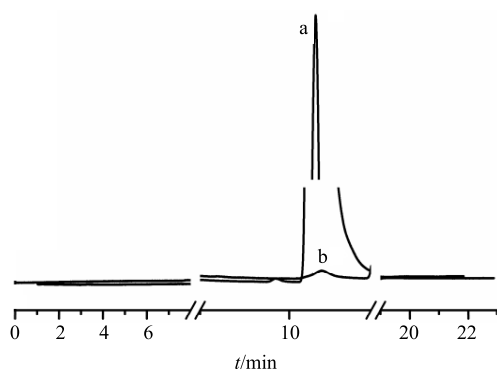


图 5 四氢呋喃对照品 (a) 和 LE-NPs 样品中四氢呋喃残留 (b) GC 检测结果

Fig. 5 GC results of tetrahydrofuran standard solution (a) and tetrahydrofuran residual in LE-NPs (b)

5 min, 取上清液 20 μL 进行 HPLC 检测。检测分析条件按照“2.1”项色谱条件检测。实验重复 3 次, 取平均值, 计算饱和溶解度。结果发现 LE 原药、LE-NPs 和物理混合物的饱和溶解度分别为 42.75、124.35、43.65 $\mu\text{g/mL}$, LE-NPs 饱和溶解度是 LE 原药的 2.91 倍。

2.9.2 溶出速率 以人工胃液作为溶出介质, 搅拌速度 100 r/min, 水浴温度 $(37.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 。称取 2.487 mg LE 原药和 LE 质量为 2.487 mg 的 LE-NPs 分别加入 200 mL 人工胃液中, 并且在 5、15、30、60、120、180、240、360 min 时间点上进行溶出取点。每次取出 3 mL, 每次取完样品后再加入 3 mL 溶出介质, 温度保持在 $(37.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$, 再以 10 000 r/min 的速率离心 5 min, 取上清液 20 μL 直接进行 HPLC 检测, 检测分析条件按照“2.1”项色谱条件检测。每组实验重复 3 次取平均值。然后计算出 LE 原药和 LE-NPs 在人工胃液中的累积溶出率。

$$C_i' = C_i$$

$$C_{i+1}' = C_{i+1} - (V - V_i)C_i/V$$

$$Q_i = \sum_{j=1}^i C_j' V/m$$

C_i 表示每个时间点中取样样品中的药物质量浓度, C_i' 为每个时间间隔药物质量浓度增加量, V 为溶出介质的总体积, V_i 为每次取样体积, m 为药物质量, Q_i 为每个取样时间点上的溶出率

图 6 为 LE 原药和 LE-NPs 的溶出曲线, 在溶出时间开始 2 h 内 LE 原药的溶出率为 3.24%, LE-NPs 的溶出率达到了 31.28%, 是原药的 9.65 倍。由此能够得出, P188 在反溶剂过程中为表面活性剂, 增加了粒径在体系中的分散性, 但未充当助溶剂角色。

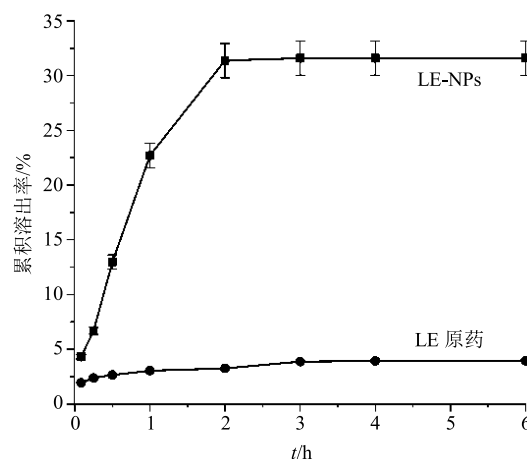


图 6 LE 原药和 LE-NPs 在人工胃液中溶出曲线

Fig. 6 Dissolution profiles of raw lutein esters and LE-NPs in simulated gastric fluid

Noyes-Whitney 方程指出, 药物的溶解速度与药物在溶剂中的表面积呈正比。所得的 LE-NPs 粒径变小从而增加了与溶出介质的接触表面积。同时, LE-NPs 中的 LE 呈无定形态, 也有助于药物的溶出。

3 讨论

在本研究中, 通过采用反溶剂重结晶法以改善 LE 的水溶性差、溶出度低的缺点, 运用单因素实验对 LE-NPs 的制备工艺进行优化获得 LE-NPs。对药物溶液质量浓度、表面活性剂用量、溶剂与反溶剂比、沉积时间、搅拌速度和沉积温度 6 个因素进行考察研究, 总结出 LE-NPs 的最优制备条件如下: 表面活性剂用量为 0.5%、沉积时间为 10 min、反溶剂与溶剂比例为 1:7、搅拌速率为 950 r/min、LE 质量浓度为 50 mg/mL、沉积温度为 25°C 。在上述最优条件下, 所得 LE-NPs 冻干粉复溶后的平均粒径为 164.2 nm。SEM 结果表明 LE 由原来的不规则的粒子, 通过反溶剂结晶变成分布均匀、颗粒较小的球形粒子。XRD 和 DSC 结果分析表明原药的晶体结构为结晶态, 纳米化的 LE 粒子为无定形态。在人工胃液溶出介质中, LE-NPs 中 LE 最大饱和溶解度是原粉的 2.91 倍, 溶出率是原粉的 9.65 倍。

本实验以难溶性药物 LE 为研究对象, 考察了反溶剂重结晶方法制备 LE-NPs 的可行性, 并确定了最佳制备工艺条件, 表征了纳米化药物的主要理化性质。所得 LE-NPs 的粒径减小, 从而增大了药物的比表面积, 由此带来了溶解度和溶出率的提高, 可使得药物更好被吸收。以上实验结果为进一步开发 LE 的药物新剂型奠定了研究基础, 具有广阔的市场前景。

参考文献

- [1] Krinsky N I, Landrum J T, Bone R A. Biologic mechanisms of the protective role of lutein and zeaxanthin in the eye [J]. *Annu Rev Nutr*, 2003, 23(1): 171-201.
- [2] 陈龙胜, 忻 旻, 周 斌. 叶黄素酯的生物转化研究 [J]. 中草药, 2005, 36(10): 1486-1488.
- [3] 张秀娟, 安 鹏, 季宇彬. 叶黄素酯对四氧嘧啶所致小鼠氧化损伤的保护性研究 [J]. 中国微生态学杂志, 2008, 20(1): 25-27.
- [4] 孟祥河, 毛忠贵, 潘秋月. 叶黄素的保健功能 [J]. 中国食品添加剂, 2003, 10(1): 17-20.
- [5] 惠伯棣, 张凌霄, 张 艳. 叶黄素酯在体内的相对生物利用度评价 [J]. 食品科学, 2009, 30(3): 252-255.
- [6] 孙 震, 姚惠源. 叶黄素的抗癌作用及其研究现状 [J]. 生物技术通讯, 2005, 16(1): 84-86.
- [7] 李海毅. 叶黄素的质量标准研究及抗氧化活性评价 [D]. 长春: 吉林大学, 2012.
- [8] 黄 媛, 柴晓磊, 陈碧聪, 等. 叶黄素酯 CWS 微囊粉理化性质与稳定性能研究 [J]. 中国食品添加剂, 2012, 19(4): 71-74.
- [9] 姜鹏飞, 程 惠, 韩 阳, 等. 叶黄素酯肠溶微囊的制备工艺研究及性能考察 [J]. 中国食品添加剂, 2013(4): 125-129.
- [10] Amar I, Aserin A, Garti N. Solubilization patterns of lutein and lutein esters in food grade nonionic microemulsions [J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51(16): 4775-4781.
- [11] 岳鹏飞, 但济修, 谢元彪, 等. 难溶性中药成分纳米晶体给药系统的研究进展与思考 [J]. 世界中医药, 2015, 10(3): 310-314.
- [12] 谢元彪, 许俊男, 陈颖翀, 等. 纳米晶体技术在难溶性药物中的应用进展与思考 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2016, 18(10): 1788-1793.
- [13] 葛云龙, 赵修华, 祖元刚, 等. 姜黄素纳米粒冻干粉的反溶剂法制备工艺优化及溶出特征 [J]. 中草药, 2016, 47(14): 2447-2453.
- [14] 张 艳, 惠伯棣, 张凌霄. 叶黄素酯在体内消化吸收过程中水解的研究 [J]. 食品科学, 2007, 28(8): 461-465.
- [15] 李大婧, 方桂珍, 刘春泉, 等. 叶黄素酯和叶黄素稳定性的研究 [J]. 林产化学与工业, 2007, 27(1): 112-116.
- [16] 许文佳, 赵修华, 祖元刚, 等. 反溶剂法制备甘草酸纳米粒的表征与体外透皮特性研究 [J]. 中草药, 2014, 45(8): 1068-1071.
- [17] Zhang J Y, Shen Z G, Zhong J, *et al.* Preparation of amorphous cefuroxime axetil nanoparticles by controlled nanoprecipitation method without surfactants [J]. *Int J Pharm*, 2006, 323(1/2): 153-160.
- [18] Zhe W, Chen J F, Le Y, *et al.* Preparation of ultrafine beclomethasone dipropionate drug powder by antisolvent precipitation [J]. *Ind Eng Chem Res*, 2007, 46(14): 4839-4845.
- [19] 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.
- [20] 赵修华, 刘 影, 王卫国, 等. 微粉化反式肉桂酸的反溶剂重结晶法制备与表征 [J]. 中草药, 2014, 45(15): 2165-2171.
- [21] 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(2): 26-32.
- [22] Zhao H, Wang J X, Wang Q A, *et al.* Controlled liquid antisolvent precipitation of hydrophobic pharmaceutical nanoparticles in a microchannel reactor [J]. *Ind Eng Chem Res*, 2007, 46(24): 8229-8235.
- [23] 谢玉洁, 乐 园, 王洁欣, 等. 反溶剂重结晶法制备青蒿素超细粉体 [J]. 化工学报, 2012, 63(5): 1607-1614.
- [24] Dokoumetzidis A, Papadopoulou V, Macheras P. Analysis of dissolution data using modified versions of Noyes-Whitney equation and the Weibull function [J]. *Pharm Res*, 2006, 23(2): 256-261.
- [25] 付骋宇, 李 莹, 梁 靓, 等. 快速甲酯化-气相色谱法测试油脂组成 [J]. 中国粮油学报, 2014, 29(6): 104-107.