

熊果酸纳米粒的乳化溶剂蒸发制备工艺、表征及溶出特征

邱琳, 赵修华*, 祖元刚*, 张印, 刘艳杰, 吴微微, 李媛媛

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 优化熊果酸纳米粒(ursolic acid nanoparticles, UANs)的制备工艺, 对其进行表征, 并考察其溶解度和溶出速率的改善情况。方法 采用乳化溶剂蒸发法, 以氯仿-乙醇(7:3)为有机相、超纯水为水相、泊洛沙姆 188 为表面活性剂和冻干保护剂制备 UANs。利用单因素实验筛选制备 UANs 的最优条件, 并以粒径大小作为单因素实验的考察条件。影响 UANs 粒径大小的因素包括表面活性剂浓度、有机相与水相的体积比、匀浆速度和匀浆时间、均质压力和均质次数。利用激光粒度仪、扫描电镜(SEM)、X 射线衍射(XRD)和差示扫描量热法(DSC)对 UANs 进行表征。并就熊果酸(UA)原粉和 UANs 冻干粉的饱和溶解度和溶出速率进行对比测试。结果 制备 UANs 的最优工艺: 泊洛沙姆 188 的质量分数为 0.05%, 有机相和水相的比为 1:4, 匀浆速度为 7 000 r/min, 匀浆时间为 2 min, 均质压力为 50.0 MPa, 均质次数为 6 次。在最优条件下制备 UANs 的粒径为 (157.5 ± 28.0) nm, 电位为 (20.33 ± 1.67) mV。根据粒径正态分布曲线, UANs 粒径分布均一; 由 SEM 图像可知, UANs 的形态近球形。通过 XRD 和 DSC 检测, 可以确定纳米粒中 UA 已转变成无定形态。UANs 冻干粉在人工胃液(SGF)、人工肠液(SIF)和去离子水中的饱和溶解度分别是原粉的 13.48、11.79 和 23.99 倍。UANs 冻干粉在 SGF 和 SIF 2 种介质中的溶出速率分别比原粉提高了 14.72 倍和 74.35 倍。结论 利用乳化溶剂蒸发法制备的 UANs 改善了 UA 的水溶性, 有利于提高 UA 的生物利用度。

关键词: 熊果酸; 纳米粒; 乳化法; 单因素优化; 饱和溶解度; 溶出速率; 冻干粉

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)10-2387-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.10.021

Preparation, characterization, and dissolution characteristics of ursolic acid nanoparticles prepared by emulsion solvent evaporation method

QIU Lin, ZHAO Xiu-hua, ZU Yuan-gang, ZHANG Yin, LIU Yan-jie, WU Wei-wei, LI Yuan-yuan

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

Abstract: **Objective** To prepare and characterize ursolic acid nanoparticles (UANs), and to investigate its improvement of equilibrium solubility and dissolution rate. **Methods** UANs were prepared by emulsion solvent evaporation method, and followed by freeze-drying. The organic phase was trichloromethane containing 30% ethanol, the aqueous phase is ultrapure water, poloxamer 188 was as surfactant and cryoprotectant. The optimal conditions for preparing nanoparticles were screened out using single-factor experiment. The particle size was used as the basis for optimization experiment. The following six main parameters had significant influences on particle size were picked out, including the concentration of poloxamer 188, volume ratio of organic to water phase, homogenate speed and homogenate time, as well as homogenization pressure and cycles. And then, dynamic light scattering equipment was used to analyze the mean particle size, the morphology of UANs powder obtained was presented by scan electronic micro-scope (SEM). The UANs weather and how changes in surface chemical character and physical structure was estimated by using X-ray diffraction (XRD) and differential scanning calorimetry (DSC). The equilibrium solubility study and dissolution test were carried on raw ursolic acid (UA) and UANs. **Results** The optimal conditions of preparation UANs: 0.05% of poloxamer 188, 1:4 of volume ratio of organic to water phase, 7 000 r/min of homogenate speed for 2 min and a homogenization pressure of 50.0 MPa for 6 times. Based on the optimal conditions, the mean particle size was (157.5 ± 28.0) nm and Zeta potential of (20.33 ± 1.67) mV. Particle

收稿日期: 2018-01-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(21473023); 中央高校基本科研业务费专项资金项目(2572017EA03)

作者简介: 邱琳(1993—), 女, 硕士研究生, 研究方向为植物化学与植物药。Tel: 18645322007 E-mail: 361937487@qq.com

*通信作者 赵修华, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为植物化学与植物药。E-mail: xiuhua Zhao@nefu.edu.cn

祖元刚, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为植物化学与植物药。E-mail: yuangangzu@163.com

distribution of UANs illustrated that UA had been nanoscale with uniform particle size distribution. SEM showed that UANs were nearly spherical. By the XRD and DSC, we could acquaint UA in UANs had the same chemical structure as the raw UA but had been amorphous state. The result of solubility test figured that the equilibrium solubility of UANs was 13.48 times in SGF, 11.79 times in SIF and 23.99 times in deionized water than raw UA. The dissolution rate of UANs prepared by ESE method has been up to 14.72 times in SGF and 74.35 times in SIF. **Conclusion** This study indicates that the emulsion solvent evaporation method has an array of valued on improving water solubility of UA, and it will have benefit on enhancing oral bioavailability.

Key words: ursolic acid; nanoparticles; emulsion solvent evaporation; single-factor experiment; equilibrium solubility; dissolution rate; lyophilized powder

熊果酸 (ursolic acid, UA) 又名乌索酸 (乌苏酸), 属于五环三萜类化合物, 在自然界中主要存在于毛泡桐的叶、女贞的叶和熊果的叶、果实中^[1]。UA 具有广泛的生物学效应, 在抗菌^[2]、抗氧化^[3]、抗肝脂肪变和纤维化^[4]、降血压^[5]、降血糖、调血脂^[6]和抗肿瘤^[7]等方面作用明显。但是, 由于 UA 水溶性差, 生物利用性低, 导致其应用受到限制^[8]。目前通过研究已经制备出了各种 UA 制剂, 包括 γ -环糊精包合物^[9]、固体分散体^[10-11]、UA 脂质体^[12-13]和 UA 口服自微乳^[14]。本实验则采用乳化溶剂蒸发法制备 UA 纳米粒 (UA nanoparticles, UANs) 冻干粉, 并对其进行表征, 通过实验确定其与 UA 原粉相比水溶性的改善情况。

1 仪器与材料

FSH-2A 可调高速匀浆机, 江苏金怡仪器科技有限公司; AH100D 高压均质机, ATS 工业系统有限公司; 旋转蒸发仪, 上海申胜生物技术有限公司; Scientz-18N 型冷冻干燥机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; Zeta Potential Analyzer 激光粒度仪, 美国 Brookhaven 公司; Waters 高效液相色谱仪, 美国 Waters 公司; S4800 扫描电子显微镜 (SEM), 日本 Hitachi 公司; Philips X 射线衍射仪 (XRD), 荷兰 Philip 公司; 204F1 差示扫描仪 (DSC), 德国 Netzsch 公司。

UA 对照品, 质量分数为 99%, 批号 Z110742, 上海源叶生物科技有限公司; UA 原粉, 质量分数 $\geq 98\%$, 批号 BCSW170809-1, 西安百川生物科技有限公司; 氯仿、乙醇, 天津市天力化学试剂有限公司, 分析纯; 冰乙酸, 天津市致远化学试剂有限公司, 分析纯; 盐酸, 新乡市宏盛化工有限公司, 分析纯; 泊洛沙姆 188, 天津市天力化学试剂有限公司; KH_2PO_4 , 天津天大化学试剂有限公司; NaOH, 天津市天力化学试剂有限公司; 甲醇、乙腈, 山东禹王实业有限公司, 色谱纯; 水为去离子水。

2 方法与结果

2.1 乳化溶剂蒸发法制备 UANs

在预试验中, 根据 UA 原粉在有机溶剂中的溶解度, 将由氯仿-无水乙醇 (7:3) 组成的混合溶剂作为有机相, 并且确定质量浓度为 6 mg/mL, 超纯水为水相, 泊洛沙姆 188 为表面活性剂和冻干保护剂。称取一定量的 UA 原粉, 加入一定体积的氯仿和无水乙醇的混合溶剂溶解, 使溶液质量浓度为 6 mg/mL。将溶液转移到含有一定质量分数的泊洛沙姆 188 水溶液中后, 放置在 45 °C 的水浴锅中加热 5 min。然后使 UA 混合溶液用高速匀浆机高速搅拌一段时间, 对匀浆后成乳化状态的 UA 纳米初乳进行高压匀质, 得到半透明呈淡白色乳光的均一体系, 即 UA 纳米乳剂。然后通过旋转蒸发仪去除有机溶剂 (氯仿和无水乙醇), 得到了 UA 纳米混悬液, 将 4 倍 UA 质量的泊洛沙姆 188 加入到混悬液中混合均匀, 然后放到 -40 °C 的冰箱中预冻干 2 h, 再放置在冻干机中 72 h 进行冷冻干燥, 即得到 UANs 冻干粉。

2.2 单因素考察

2.2.1 表面活性剂泊洛沙姆 188 质量分数 保持其他实验工艺条件不变 (药物质量浓度 6 mg/mL、有机相与水相体积比 1:5、匀浆速度 8 000 r/min、匀浆时间 4 min、均质压力 50.0 MPa、均质次数 8) 的情况下, 考察泊洛沙姆 188 质量分数分别为 0.05%、0.10%、0.20%、0.30%、0.40%、0.50%、0.60% 时对 UA 纳米乳剂平均粒径的影响, 得到平均粒径分别为 (121.7 ± 7.0) 、 (116.1 ± 9.8) 、 (97.3 ± 4.2) 、 (95.9 ± 0.9) 、 (83.9 ± 3.9) 、 (85.9 ± 0.1) 、 (81.4 ± 7.5) nm。在泊洛沙姆 188 的质量分数从 0.05% 增加到 0.60% 的过程中, UA 的平均粒径逐渐减小, 但是平均粒径变化范围仅从 (121.7 ± 7.0) nm 降低到 (81.4 ± 7.5) nm, 变化并不明显, 因此, 根据降低辅料含量的原则, 泊洛沙姆 188 的质量分数选择 0.05%。

2.2.2 有机相与水相的体积比 其他工艺条件保持不变(药物质量浓度 6 mg/mL、泊洛沙姆 188 质量分数 0.05%、匀浆速度 8 000 r/min、匀浆时间 4 min、均质压力 50.0 MPa、均质次数 8)的条件下,考察有机相与水相的体积比为 1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8 时 UA 纳米乳剂平均粒径的变化情况,得到平均粒径分别为(126.7±11.3)、(131.6±11.5)、(120.7±4.2)、(135.2±18.6)、(133.5±7.8)、(144.6±22.8)、(168.6±27.5) nm。体积比从 1:2 增加到 1:4 时,UA 的平均粒径变化很小,从(120.7±4.2) nm 增大到(168.6±27.5) nm,也就是说,水溶液的增加,不利于形成较小的粒径。因此,有机相和水相的体积比确定为 1:4。

2.2.3 匀浆速度 当其他工艺条件不变(药物质量浓度 6 mg/mL、泊洛沙姆 188 质量分数 0.05%、有机相和水相的体积比 1:4、匀浆时间 4 min、均质压力 50.0 MPa、均质次数 8)时,考察匀浆速度为 5 000、6 000、7 000、8 000、9 000、10 000、11 000 r/min 时,对 UA 纳米乳剂平均粒径的影响,并得到平均粒径分别为(191.8±27.0)、(115.7±1.9)、(98.7±0.9)、(105.1±4.4)、(111.5±5.3)、(114.9±9.9)、(122.9±9.7) nm。当匀浆速度从 5 000 r/min 增加到 7 000 r/min 时,UA 的平均粒径从(191.8±27.0) nm 减小到(98.7±0.9) nm,当匀浆速度从 7 000 r/min 增加到 11 000 r/min 时,平均粒径开始逐渐升高,说明提高匀浆速度不仅对减小粒径没有效果,甚至会破坏已成型的乳滴。因此,确定 7 000 r/min 为最优的均浆速度。

2.2.4 匀浆时间 保持其他工艺条件不变(药物质量浓度 6 mg/mL、泊洛沙姆 188 质量分数 0.05%、有机相和水相的体积比 1:4、匀浆速度 7 000 r/min、均质压力 50.0 MPa、均质次数 8)的情况下,考察匀浆时间为 0.5、1、2、4、6、8、10 min 时对 UA 纳米乳剂平均粒径的影响,得到结果分别为(130.0±3.7)、(123.0±28.2)、(99.0±4.2)、(109.3±3.7)、(112.2±17.8)、(112.3±3.1)、(122.4±10.4) nm。匀浆时间从 0.5 min 增加到 2 min 的过程中,UA 的平均粒径从(130.0±3.7) nm 减小到(99.0±4.2) nm,当匀浆时间延长到 10 min 时,平均粒径逐渐增大。因此,匀浆时间 2 min 为最优选择。

2.2.5 均质压力 在经过高速匀浆之后,UA 的粒径已经变小,但是还不够稳定。高压均质可以使 UA 纳米乳变得均一稳定。于是,使其他工艺条件相同

(药物质量浓度 6 mg/mL、泊洛沙姆 188 质量分数 0.05%、有机相和水相的体积比 1:4、匀浆速度 7 000 r/min、匀浆时间 2 min、均质次数 8),考察均质压力为 20.0、30.0、40.0、50.0、60.0、70.0、80.0 MPa 时 UA 纳米乳剂的平均粒径的变化情况,得到平均粒径分别为(106.2±5.9)、(107.1±25.1)、(98.3±5.2)、(70.2±9.2)、(74.7±0.1)、(165.2±4.5)、(170.3±10.0) nm。当均质压力从 20.0 MPa 增加到 50.0 MPa 时,UA 的平均粒径在(106.2±5.9) nm 到(70.2±9.2) nm 之间浮动。当均质压力超过 50.0 MPa 时,平均粒径开始变大。所以,最佳均质压力为 50.0 MPa。

2.2.6 均质次数 其他工艺条件保持不变(药物质量浓度 6 mg/mL、泊洛沙姆 188 质量分数 0.05%、有机相和水相的体积比 1:4、匀浆速度 7 000 r/min、匀浆时间 2 min、均质压力 50.0 MPa)的情况下,考察均质次数为 2、4、6、8、10、12、14 时,对 UA 纳米乳剂平均粒径的影响,得到平均粒径依次为(199.4±26.9)、(182.6±8.6)、(66.2±6.6)、(83.7±14.8)、(111.4±13.5)、(115.8±0.3)、(120.8±21.8) nm。随着均质次数从 2 增加到 6 时,UA 的平均粒径从(199.4±26.9) nm 减小到(66.2±6.6) nm。当均质次数超过 6 时,平均粒径随着均质次数的增加而增加,因此,选定 6 次为制备 UANs 的最优均质次数。以上每个影响因素均进行 3 次重复实验。

2.3 最优化验证

根据单因素实验得到的最佳条件进行 3 次验证实验。利用最佳条件制备 UA 纳米乳的平均粒径为(69.7±15.6) nm,多分散系数(PDI)为 0.005,通过旋转蒸发法除去 UA 纳米乳中的有机溶剂,得到 UA 纳米悬浮剂的平均粒径为(100.2±12.1) nm, PDI 为 0.005;旋蒸后粒径变大,可能是因为在除去油相的过程中,UA 纳米粒子发生团聚^[15]。冷冻干燥后得到的 UANs 冻干粉的平均粒径为(157.5±28.0) nm, PDI 为 0.005,电位为(20.33±1.67) mV。后续研究中的 UANs 冻干粉均按以上方法制得。

2.4 UANs 冻干粉表征

2.4.1 粒径检测 本研究使用 Zeta PALS 激光粒度仪对 UANs 进行粒径检测。称取 3 mg UANs 冻干粉,将其溶解在 3 mL 去离子水中,超声 30 s 后倒入比色皿中,将比色皿置于激光粒度仪中进行检测,每个样品重复测定 3 次。UANs 冻干粉粒径检测结果

见图 1, 其平均粒径为 (157.5 ± 28.0) nm, PDI 为 0.005, 粒径分布均匀。也就是说, 通过乳化溶剂蒸发法制备得到了纳米级 UA。

2.4.2 SEM 本研究使用 S4800 型扫描电镜对 UA 原粉和 UANs 冻干粉进行观察分析。将干燥的样品用双面导电胶粘到样品台上, 用离子溅射镀膜机喷金, 获得均匀的细颗粒薄金属镀层, 即可通过仪器观察样品形貌和大小。UA 原粉和 UANs 冻干粉的 SEM 图见图 2。图 2-a 显示 UA 原粉呈现出大小不一的不规则块状, 粒径在 $20 \sim 100 \mu\text{m}$ 。而图 2-b 显示 UANs 冻干粉呈大小均一的球形, 并且彼此独立。

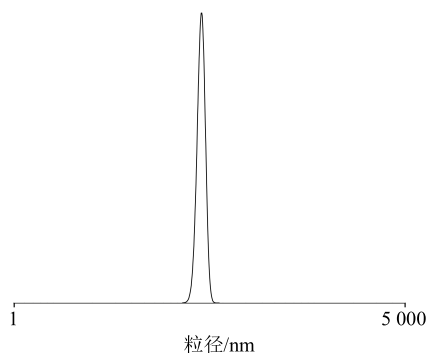


图 1 UANs 粒径分布

Fig. 1 Particle distribution of UANs

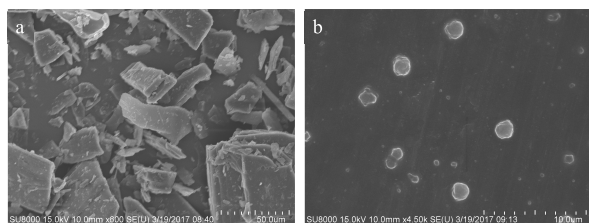


图 2 UA 原粉 (a) 和 UANs 冻干粉 (b) 的 SEM 图

Fig. 2 SEM images of raw UA (a) and UANs (b)

2.4.3 XRD 称取 UA 原粉、UANs 冻干粉、UA 原粉与辅料的物理混合物 (以下简称物理混合物) 和泊洛沙姆 188 各 10 mg, 使用 X 衍射仪对其晶体结构进行分析。检测条件为衍射角范围 $5^\circ \sim 60^\circ$, 扫描速率为 $5^\circ/\text{min}$, 电压 40 kV, 电流 30 mA。利用图 3 所示的 XRD 图谱研究 UA 原粉、UANs 冻干粉、物理混合物和泊洛沙姆 188 的晶体结构。由图 3-a 和 3-d 可以看到, UA 原粉和泊洛沙姆 188 具有明显的衍射峰, 表明它们具有较高的结晶度。图 3-c 为物理混合物的 XRD 曲线, 其既具备 UA 的衍射峰又有泊洛沙姆 188 的衍射峰。图 3-b 显示, UANs 冻干粉的衍射峰仅与泊洛沙姆 188 的衍射峰一致,

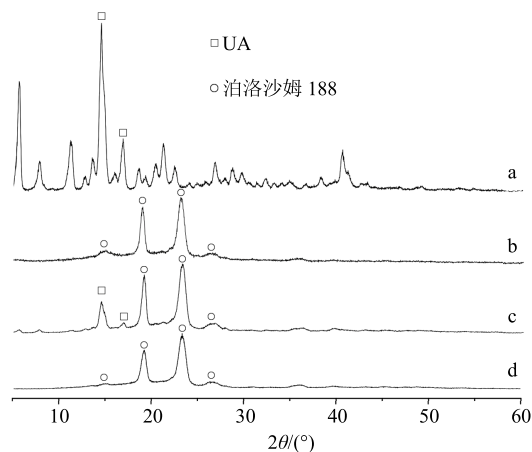


图 3 UA 原粉 (a)、UANs 冻干粉 (b)、物理混合物 (c) 和泊洛沙姆 188 (d) 的 XRD 图

Fig. 3 XRD patterns of raw UA (a), UANs (b), MIX-UA (c), and Poloxamer 188 (d)

这说明 UANs 冻干粉中的 UA 不再呈现为晶体状态, 而变成了无定形状态。

2.4.4 DSC 本研究使用差示扫描仪研究 UA 原粉、UANs 冻干粉、物理混合物和泊洛沙姆 188 的热稳定性。称取样品各 5 mg, 放入量热池内进行测试, 检测条件为升温范围 $50 \sim 300^\circ\text{C}$, 升温速率 $10^\circ\text{C}/\text{min}$ 。DSC 分析则是用来验证 XRD 的检测结果。4 种粉末的 DSC 曲线见图 4。根据图 4-a 和 4-d, UA 原粉和泊洛沙姆 188 分别在 286.73°C 和 54.51°C 时呈现出明显的熔点峰, 这些峰为晶体结构的基本特征。如图 4-c 所示, 物理混合物在 284.20°C 和 52.26°C 处均出现熔点峰, 这 2 个熔点

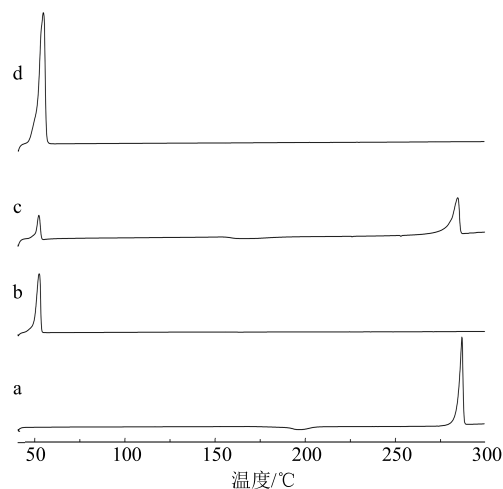


图 4 UA 原粉 (a)、UANs 冻干粉 (b)、物理混合物 (c) 和泊洛沙姆 188 (d) 的 DSC 图

Fig. 4 DSC thermograms patterns of raw UA (a), UANs (b), MIX-UA (c), and Poloxamer 188 (d)

峰与 UA 原粉和泊洛沙姆 188 的熔点峰相一致。在图 4-b 的 UANs 冻干粉的 DSC 曲线中, 在 UA 原粉出现熔点峰的位置没有出现尖峰, 而在 52.36 °C 时出现的尖峰也被证明是泊洛沙姆 188 的熔点峰。这表明 UANs 冻干粉中的 UA 已经不再为晶体状态, 而其中的泊洛沙姆 188 仍然呈现晶体状态, 以上结论符合 XRD 的结果。

2.5 饱和溶解度测定

本实验研究 UA 原粉、UANs 冻干粉和物理混合物在人工胃液 (SGF)、人工肠液 (SIF) 和去离子水中的饱和溶解度。SGF 的配制方法如下: 取 5 mL 37% 的浓盐酸, 先加约 800 mL 的去离子水, 摇匀后, 加水稀释成 1 000 mL。SIF 的配制方法为将 6.8 g 的 KH_2PO_4 用 500 mL 去离子水溶解, 然后用 0.1 mol/L 的 NaOH 水溶液将 pH 调至 6.8, 再加水定容至 1 000 mL。首先, 将 UA 原粉 (15 mg)、UANs 冻干粉 (15 mg) 和物理混合物 (15 mg) 分别且依次加入到装有 3 mL SGF、SIF 和去离子水的小瓶中, 将 9 个小瓶放入水浴锅中 48 h, 搅拌速度为 100 r/min, 温度设为 $(37.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 。48 h 后, 从每个小瓶中分别取出 1 mL 样品, 以 $10\,000 \times g$ 离心 10 min 后取出上清。取 500 μL 上清液加入等量的甲醇稀释, 涡旋 30 s 并且超声 5 min 使其充分混合, 再将溶液以 $10\,000 \times g$ 离心 10 min 后, 取 10 μL 上清注入高效液相色谱仪检测 UA 浓度。该实验重复 3 次。

液相色谱条件: 色谱柱为 Diamonsil C_{18} (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μL), 参考文献方法^[16]和预试验结果, 确定以乙腈-水 (93:7, 含 0.5% 冰乙酸) 为流动相, 体积流量 1 mL/min, 进样量为 10 μL , 柱温为 30 °C, 检测波长为 216 nm。

UA 原粉、UANs 冻干粉和物理混合物的饱和溶解度见图 5。在 SGF 中, UA 原粉、物理混合物和 UANs 冻干粉的饱和溶解度分别为 (1.89 ± 0.16) 、 (2.80 ± 0.51) 、 (25.48 ± 2.36) mg/L; 在 SIF 中, 三者的饱和溶解度分别为 (4.24 ± 0.06) 、 (8.42 ± 0.36) 、 (50.02 ± 1.94) mg/L; 在去离子水中, 结果分别为 (1.95 ± 0.13) 、 (6.52 ± 0.45) 、 (46.79 ± 2.78) mg/L。物理混合物的饱和溶解度在 SGF 中是 UA 原粉的 1.48 倍, 在 SIF 中是 UA 原粉的 1.99 倍, 在去离子水中是 UA 原粉的 3.44 倍; 而 UANs 冻干粉的饱和溶解度在 SGF 中是 UA 原粉的 13.48 倍; 在 SIF 中是 UA 原粉的 11.79 倍, 在去离子水中是 UA 原粉

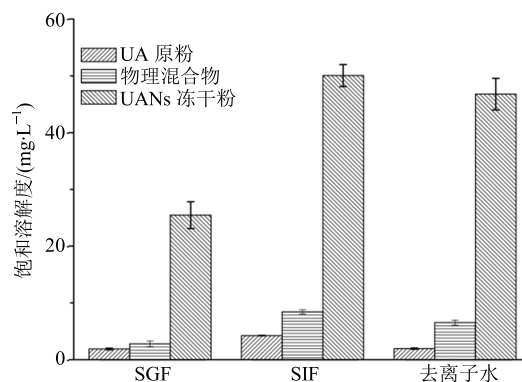


图 5 UA 原粉、UANs 冻干粉和物理混合物在人工肠液、人工胃液和去离子水中的饱和溶解度

Fig. 5 Equilibrium solubility of raw UA, UANs, and MIX-UA in SGF, SIF, and deionized water

的 23.99 倍。结果表明, 泊洛沙姆 188 在一定程度上起到了增溶的作用, 但纳米粉在提高饱和溶解度方面的优势更加突出。这是因为利用乳化溶剂蒸发法改善了 UA 的粒径, 并且使 UANs 冻干粉转化为无定形状态, 所以提高了其在 3 种介质中的饱和溶解度。因此可以证明, 纳米级粒径有助于提高药物的饱和溶解度。

2.6 体外累积溶出率测定

本实验采用透析扩散法研究 UA 原粉和 UANs 冻干粉的溶出速率。将恒温水浴锅的温度设为 $(37.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$, 转速设为 100 r/min。SGF 和 SIF 作为 2 种溶出介质。将含有相同 UA 量的 UA 原粉 (SGF 中 3.2 mg, SIF 中 6.3 mg) 和 UANs 冻干粉 (SGF 中 16.7 mg, SIF 中 33.3 mg) 分别放入 4 个透析袋中, 各加入 5 mL 溶出介质后密封, 将透析袋浸入到相应的溶出介质 (250 mL) 中。取样时间点设为 15、30、60、90、120、180、240、360、480、720、1 440 min。取样时从溶出介质中取出 1 mL 样品, 每次取样后立即补充等体积的溶出介质, 以确保溶出介质的体积保持不变。取 500 μL 样品加入相同体积的甲醇稀释, 涡旋 30 s 并且超声 5 min 使其充分混合, 再将溶液以 $10\,000 \times g$ 离心 10 min 后, 取 10 μL 上清注入高效液相色谱仪检测 UA 浓度, 液相条件同 “2.5” 项。此实验步骤重复 3 次。

UA 原粉和 UANs 冻干粉在 SGF 和 SIF 中的溶出结果见图 6。由图 6 可知, 在 2 种介质中, UANs 冻干粉的溶出速率均有明显的提高。而从图 6-c 和 6-d 发现, 经过 24 h 后, UA 原粉在 2 种介质中的溶出量仍不足 1%。这表明 UA 原粉具有疏水性,

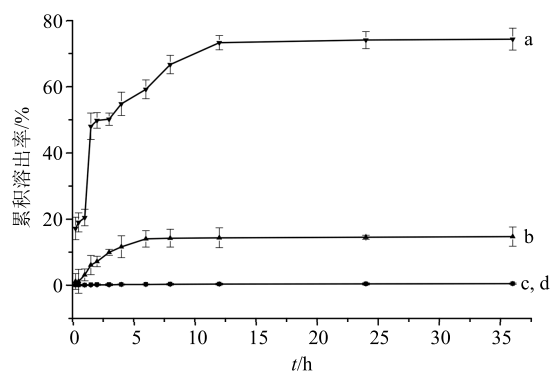


图 6 UANs 冻干粉在 SIF (a) 和 SGF (b) 及 UA 原粉在 SIF (c) 和 SGF (d) 中的累积溶出率

Fig. 6 Dissolution rate of UANs in SIF (a), UANs in SGF (b), raw UA in SIF (c), and raw UA in SGF (d)

并且几乎不溶于水, 这个结果与 Jin 等^[17]研究的结果相符。从图 6-b 可知, 在最初的 5 h 中, UANs 冻干粉在 SGF 中快速溶出, 经过更长的时间后, 溶出速度开始放缓, 并且在 6~36 h, 溶出量甚至不足 5%。而在图 6-a 中, 在 1~1.5 h, UANs 冻干粉在 SIF 中的溶出速率迅速增加, 在 12 h 时, 溶出速率已达到约 80%。由此看来, UA 原粉和 UANs 冻干粉的溶出速率差距显著, UANs 冻干粉在 2 种介质中的溶出速率均明显高于 UA 原粉, 而且在 SIF 中的溶出速率约是在 SGF 中的 5 倍。在 Pi 等^[18]的实验中, UA 纳米晶体的溶出速率也有一定程度的提高, 在盐酸溶液中提高了 1.8 倍, 在 PBS 溶液中提高了 3.3 倍; 而本实验通过乳化旋蒸法制备的 UANs 的累积溶出率, 在 SGF 中比原粉提高了 14.72 倍, 在 SIF 中比原粉提高了 74.35 倍。

3 讨论

纳米粒子体系在药物制备方面拥有巨大潜力。纳米药物与常规药物相比, 颗粒更小、比表面积更大、活性中心较多, 吸附能力更强。因此, 将具有应用价值的药物制备成纳米药, 不仅有助于提高药物的稳定性和在水中的溶解度, 而且可以减少用药量和毒副作用^[19]。随着纳米药的优势不断显现, 其制备技术也在不断丰富, 包括机械研磨法、高压均质法^[20]、超临界流体技术^[21]和反溶剂沉淀法等^[22-23]。

在本实验中, 采用乳化溶剂蒸发法制备纳米药, 获得了平均粒径为 (157.5 ± 28.0) nm 的 UANs 冻干粉。根据粒径分布图和 SEM 图谱可知, UANs 的形态近球形, 且粒径分布均一。通过 XRD 和 DSC 检测, 可以确定 UANs 冻干粉的化学结构没有发生

改变, 但是已经转变为无定形态。从而改善了 UA 的水溶性, 提高了其溶出速率, 使得药物可以被更好地吸收。

参考文献

- [1] 刘慧妍, 黄馨慧, 张艳海. HPLC 法快速测定 8 种中药中齐墩果酸和熊果酸 [J]. 中草药, 2017, 48(10): 1998-2001.
- [2] 熊斌, 雷志勇, 陈虹. 熊果酸药理学研究进展 [J]. 国外医学: 药学分册, 2004, 31(3): 133-135.
- [3] Antonio E, Antunes J, Osmar D R, *et al.* Poly (lactic acid) nanoparticles loaded with ursolic acid: Characterization and *in vitro* evaluation of radical scavenging activity and cytotoxicity [J]. *Mater Sci Eng C*, 2017, 71(1): 156-166.
- [4] 张明发, 沈雅琴. 熊果酸和齐墩果酸抗肝脂肪变和纤维化作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2017, 40(2): 270-278.
- [5] 张明发, 沈雅琴. 熊果酸和齐墩果酸的血管药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2017, 40(10): 1510-1519.
- [6] 杨静云, 赖永勤, 李宇兴, 等. 山楂、泽泻、决明子与曲霉毒素混合发酵制备调血脂中药工艺研究 [J]. 中草药, 2016, 47(12): 2100-2108.
- [7] Shanmugam M K, Dai X, Kumar A P, *et al.* Ursolic acid in cancer prevention and treatment: Molecular targets [J]. *Biochem Pharm*, 2013, 85(11): 1579-1587.
- [8] 祁雯, 施斌, 黄雄伟, 等. 熊果酸共晶固体分散体的体外特性研究 [J]. 中草药, 2013, 44(20): 2845-2851.
- [9] 纵伟, 张华, 袁文亮, 等. 熊果酸- γ -环糊精包合物的超声制备及特性研究 [J]. 食品工业科技, 2011, 32(3): 237-241.
- [10] 祁雯, 施斌, 黄雄伟, 等. 熊果酸共晶固体分散体的体外特征研究 [J]. 中草药, 2013, 44(20): 2845-2851.
- [11] Eloy J O, Saraiva J, Albuquerque S D, *et al.* Preparation, characterization and evaluation of the *in vivo* trypanocidal activity of ursolic acid-loaded solid dispersion with poloxamer 407 and sodium caprate [J]. *Braz J Pharm Sci*, 2015, 51(1): 101-109.
- [12] 齐娜, 刘广, 廖迎, 等. 熊果酸脂质体的制备及体外释放特性考察 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(1): 28-31.
- [13] 张婧雯, 张三奇, 文爱东, 等. 正交试验法优选齐墩果酸固体脂质纳米粒的制备工艺 [J]. 中草药, 2007, 38(5): 683-685.
- [14] 欧晓霞, 汪征明, 封亮. 熊果酸自微乳的制备及其生物利用度 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(1): 36-39.

- [15] 邓怡平, 赵修华, 祖元刚, 等. 布洛芬纳米微粉的制备、表征及体外透皮性研究 [J]. 中国药房, 2017, 28(1): 99-102.
- [16] 黄浩, 张兵锋. 不同品种苦丁茶中熊果酸和齐墩果酸的含量测定 [J]. 江苏农业科学, 2012, 40(02): 243-245.
- [17] Jin I J, Ko Y I, Kim Y M, *et al.* Solubilization of oleanolic acid and ursolic acid by cosolvency [J]. *Arch Pharm Res*, 1997, 20(1): 169-175.
- [18] Pi J X, Liu Z D, Wang H, *et al.* Ursolic acid nanocrystals for dissolution rate and bioavailability enhancement: Influence of different particle size [J]. *Current Drug Deliv*, 2016, 13(8): 1358-1366.
- [19] 柳琳, 蔡鑫君, 柴国宝, 等. 自组装纳米粒及其作为药物载体的研究进展 [J]. 中草药, 2009, 40(3): 479-483.
- [20] 刘朝勇, 肖云芝, 李瑞生, 等. 小菜蛾抗菌肽聚乳酸-羟基乙酸共聚物纳米粒的制备及体外评价 [J]. 中草药, 2015, 46(3): 348-352.
- [21] 黄岩, 祖元刚, 张琳, 等. 注射用甘草酸纳米无菌粉对大鼠慢性肝损伤的影响 [J]. 中草药, 2011, 42(10): 2060-2064.
- [22] 袁鹏群, 郭葆玉. 纳米技术在药物研究领域中的应用 [J]. 解放军药学学报, 2001, 17(1): 38-40.
- [23] 郑璐璐, 宋洪涛. 纳米药物制备技术的研究进展 [J]. 解放军药学学报, 2012, 28(6): 537-540.