

以甘草酸为稳定剂制备黄芩苷固体纳米晶体

刘罗娜, 李小芳*, 仲 粒, 廖艳梅, 赵甜甜, 马祖兵

成都中医药大学药学院 四川省中药资源系统研究与开发利用重点实验室 省部共建国家重点实验室培育基地, 四川 成都 611137

摘要: **目的** 制备以甘草酸为稳定剂的黄芩苷固体纳米晶体 (baicalin solid nanocrystal, BCN-SN), 并考察其体外释放特性。**方法** 采用高速剪切-高压均质法制备黄芩苷纳米混悬剂, 并进一步冷冻干燥得 BCN-SN, 以平均粒径及多分散指数 (PDI) 为指标采用单因素实验优化处方及工艺参数, 对所得 BCN-SN 进行理化性质表征, 并测定其体外溶出度。**结果** 以甘草酸为稳定剂, 甘露醇-甘草酸为冻干保护剂制备的 BCN-SN 平均粒径为 (478.0 ± 6.5) nm, PDI 为 0.230 ± 0.015 。扫描电镜显示 BCN-SN 呈不规则球形, 大小较均匀; 差式扫描量热法表明黄芩苷制备成固体纳米晶体后, 以无定形态存在; 体外释放结果表明 BCN-SN 的溶出速率和溶解度显著高于物理混合物。**结论** 以甘草酸作为天然稳定剂的固体纳米晶体制备方法简便, 能显著改善难溶性药物的溶解性, 具有广阔的应有前景。

关键词: 黄芩苷; 甘草酸; 天然稳定剂; 固体纳米晶体; 体外释放

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)09-2057-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.09.008

Preparation of baicalin solid nanocrystal using glycyrrhizic acid as a natural stabilizer

LIU Luo-na, LI Xiao-fang, ZHONG Li, LIAO Yan-mei, ZHAO Tian-tian, MA Zu-bing

Sichuan Key Laboratory of Systematic Research & Development and Utilization of Chinese Medicine Resources, Province and Ministry Co-Established State Key Laboratory Cultivation Base, Pharmacy College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: Objective To prepare baicalin solid nanocrystal (BCN-SN) stabilized by glycyrrhizic acid (GA) and determine its *in vitro* release characteristics. **Methods** The high-speed shearing-high pressure homogenization technology was adopted in the preparation of BCN nanosuspension, and then BCN nanosuspension was solidified into BCN-SN by freeze-drying. The formula and process of BCN-SN were optimized by the single factor experiment with average particle size and polydispersity index (PDI) as indicator. BCN-SN were prepared under the optimal conditions and characterized for crystal-linity and particle size. *In vitro* release of BCN-SN was also determined. **Results** The particle size of BCN-SN stabilized by GA and protected by mannitol-GA was (478.0 ± 6.5) nm, and the polydispersity index (PDI) was 0.230 ± 0.015 , respectively. The results of SEM showed that BCN-SN was irregular spherical and DSC showed that BCN-SN was amorphous after being prepared into solid nanocrystal. In the *in vitro* dissolution test, BCN-SN showed a significantly increased dissolution. **Conclusion** The method employed to prepare the BCN-SN stabilized by GA is simple and low-cost. BCN-SN can significantly improve the dissolution of BCN, which has a broad application.

Key words: baicalin; glycyrrhizic acid; natural stabilizer; solid nanocrystal; *in vitro* release

黄芩苷 (baicalin, BCN) 是黄芩的主要药效成分, 具有解热、抗炎、抗肿瘤、广谱抑菌、保肝、抗氧化、降糖等作用^[1-5], 但其水溶性和稳定性均较差, 生物利用度低, 使其药效发挥及临床应用均受

到极大限制。目前已有通过制备纳米胶束、纳米结构脂质载体等剂型来提高黄芩苷的溶解性^[6-7], 但均存在载药量低、辅料用量大等问题。

纳米混悬剂是一种仅由药物和少量稳定剂组成

收稿日期: 2019-01-24

基金项目: 四川省中医药管理局科研项目 (2018YY001)

作者简介: 刘罗娜, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药新制剂、新剂型、新技术研究。Tel: 13183923570 E-mail: 232792928@qq.com

*通信作者 李小芳, 女, 博士生导师, 研究方向为中药新制剂、新剂型、新技术研究。Tel: 13808195110 E-mail: lixiaofang919@163.com

的亚微米胶体分散体系,其载药量高、制备工艺简单,能显著改善难溶性药物溶出度,以提高生物利用度^[8-11]。常用稳定剂包括泊洛沙姆 188 (P188)、十二烷基硫酸钠 (SDS)、聚维酮 K30 (PVP K30) 等^[11-12],然而长期使用这些合成类稳定剂易对人体造成刺激^[13-14],因此寻找天然表面活性剂作为新型稳定剂是纳米混悬剂相关研究中亟待解决的问题。

皂苷是一种存在于植物体内的天然表面活性剂,广泛用于食品行业^[15],也有学者尝试将其应用于医药行业^[16]。甘草酸 (glycyrrhizic acid, GA),又名甘草甜素,是一种含有葡萄糖醛酸的三萜皂苷,由于其甜度约为蔗糖的 250 倍而作为天然甜味剂,被广泛用于各类食品。同时甘草酸还具有表面活性,可以起到稳定剂的作用^[17],因此,本实验选取甘草酸为稳定剂通过高速剪切法联合高压均质法制备黄芩苷纳米混悬剂,进一步冷冻干燥制得黄芩苷固体纳米晶体 (solid nanocrystal, SN),并比较甘草酸与合成类稳定剂对制备、固化过程的影响,通过单因素实验优化处方及工艺参数,对最佳处方及工艺所得黄芩苷固体纳米晶体 (BCN-SN) 进行理化性质表征,并测定其体外溶出度。旨在解决稳定剂潜在的安全性问题,扩宽天然稳定剂的适用范围,为制备安全有效的口服制剂奠定基础。

1 仪器与试药

Nicomp 380ZLS 型激光粒度分析仪,美国 PSS 公司;高剪切分散乳化均质机 C25,上海恒川机械设备有限公司;AH-100D 型高压均质机,加拿大 ATS 公司;SJIA-10N-50 型冷冻干燥机,宁波市双嘉仪器有限公司;ZRS-8G 型智能溶出试验仪,天津市天大天发科技有限公司;Agilent 1200 高效液相色谱仪,美国 Agilent 公司。

黄芩苷原料药 (批号 GB20181023,质量分数 85%)、甘草酸 (批号 GB20181108,质量分数 98%),西安小草植物科技有限责任公司;黄芩苷对照品,批号 MUST-16083014,质量分数 98%,成都曼思特生物科技有限公司;甘露醇、乳糖、壳聚糖、山梨醇、葡萄糖、聚乙二醇 400 (PEG400)、羟丙基纤维素 (HPMC)、SDS、P188、PVP K30,成都市科龙化工试剂厂。

2 方法与结果

2.1 纳米混悬剂的制备

采用高速剪切-高压均质法制备^[16]。称取黄芩苷 1.0 g,加入 100 mL 含 0.1 g 稳定剂 (甘草酸) 的水

中,超声,使用高速剪切机将药物粉碎得粗混悬液。将药物的粗混悬液转入高压均质机,在一定压力下均质数次,即得。

2.2 平均粒径、多分散指数 (PDI)、稳定系数 (SI) 及再分散指数 (RDI) 测定

取黄芩苷纳米混悬剂适量,用纯水稀释一定倍数,采用纳米激光粒度仪测定其粒径及 PDI,平行测定 3 次,取平均值。

取适量黄芩苷纳米混悬剂样品,转速 3 000 r/min,离心 30 min,取未沉淀部分测定粒径,重复 3 次。按公式进行计算:稳定系数 (stability index, SI) = 离心后未沉淀部分的平均粒径/离心前的平均粒径。SI 越接近 1,表明纳米混悬剂稳定性越好。

以再分散系数 (redispersibility index, RDI) 作为纳米混悬剂冻干后再分散性的评价指标之一,计算公式为 $RDI = \text{冻干再分散后测得的粒径} / \text{初始粒径}$ 。RDI 越接近 1,表明冻干后“固化损伤”越小。

2.3 工艺因素的考察

以平均粒径、PDI 为指标,分别对药物浓度、稳定剂用量、剪切转速、剪切时间、高压均质压力、均质次数 6 个工艺因素进行考察。

2.3.1 药物质量浓度 固定甘草酸用量为 0.10%,于 16 000 r/min 剪切转速下操作 2 min,置于 30 MPa 压力下均质 5 次,100 MPa 下均质 20 次,对药物质量浓度进行考察,结果见表 1。可见随着药物质量浓度的增大,平均粒径、PDI 均先减小后增大,因此确定药物质量浓度为 10 g/L。

2.3.2 稳定剂用量 固定稳定剂为甘草酸,药物质量浓度为 10 g/L,于 16 000 r/min 剪切转速下操作 2 min,置于 30 MPa 压力下均质 5 次,100 MPa 下均质 20 次,对稳定剂用量进行考察,结果见表 2。随着稳定剂用量的增加,平均粒径先减小后逐渐增大,PDI 先减小后增大,分析原因可能是稳定剂用量过

表 1 药物浓度对平均粒径及 PDI 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 1 Effect of drug concentration on average particle size and PDI ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

药物质量浓度/(g·L ⁻¹)	平均粒径/nm	PDI
6	545.9 ± 18.6*	0.258 ± 0.040
8	526.4 ± 8.9*	0.235 ± 0.022
10	493.1 ± 5.1	0.228 ± 0.008
12	529.1 ± 14.3*	0.237 ± 0.021

与 10 g·L⁻¹ 组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs 10 g·L⁻¹ group

表 2 稳定剂用量对平均粒径及 PDI 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 2 Effect of dosage of stabilizer on average particle size and PDI ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

稳定剂用量/%	平均粒径/nm	PDI
0.05	528.7±6.2*	0.259±0.031
0.10	482.5±4.4	0.221±0.017
0.15	493.1±5.1	0.228±0.008
0.20	502.8±6.3*	0.242±0.011
0.25	519.2±8.8*	0.252±0.027
0.30	536.4±7.6*	0.250±0.027
0.35	556.1±5.0*	0.249±0.012
0.40	588.9±7.4*	0.281±0.034*

与 0.10% 组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs 0.10% group

多, 超过其临界胶束浓度时, 多余的稳定剂会形成胶束与药物纳米粒竞争吸附稳定剂, 使药物混悬液稳定性降低, 加快粒子的聚集和沉降^[19], 因此确定稳定剂用量为 0.10%。

2.3.3 剪切转速 固定甘草酸用量为 0.10%, 药物质量浓度为 10 g/L, 高速剪切 2 min, 置于 30 MPa 压力下均质 5 次, 100 MPa 下均质 20 次, 对剪切转速进行考察, 结果见表 3。随着剪切转速的增加, 黄芩苷纳米混悬剂的平均粒径及 PDI 减小, 当转速高于 16 000 r/min 时, PDI 及平均粒径均增大。因此选取剪切转速为 16 000 r/min。

2.3.4 剪切时间 固定甘草酸用量为 0.10%, 药物质量浓度为 10 g/L, 剪切转速为 16 000 r/min, 置于 30 MPa 压力下均质 5 次, 100 MPa 下均质 20 次, 对剪切时间进行考察, 结果见表 4。当剪切时间达 2 min 后延长剪切时间对粒径影响不大, PDI 略微增大, 并且剪切时间过长会产生大量气泡不利于下一步高压均质操作, 故最终选取剪切时间为 2 min。

2.3.5 均质压力 按“2.1”项下方法制备黄芩苷粗

表 3 剪切转速对平均粒径及 PDI 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 3 Effect of shearing speed on average particle size and PDI ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

剪切转速/(r·min ⁻¹)	平均粒径/nm	PDI
10 000	547.8±9.3*	0.259±0.022*
13 000	512.7±8.6*	0.236±0.014
16 000	482.5±4.4	0.221±0.017
19 000	503.5±11.0*	0.228±0.017

与 16 000 r·min⁻¹ 组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs 16 000 r·min⁻¹ group

表 4 剪切时间对平均粒径及 PDI 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 4 Effect of shearing time on average particle size and PDI ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

剪切时间/min	平均粒径/nm	PDI
1	511.5±7.5*	0.250±0.024
2	482.5±4.4	0.221±0.017
3	484.9±8.7	0.223±0.006
4	479.7±6.0	0.241±0.020

与 2 min 组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs 2 min group

混悬液, 置于 30 MPa 压力下均质 5 次, 于 60、80、100、120 MPa 压力下均质 20 次, 测定平均粒径及 PDI, 结果见表 5。随着均质压力升高, 纳米混悬剂粒径及 PDI 先减小后增大, 分析原因可能是均质压力过大会破坏稳定剂的保护层, 使粒子发生聚集, 从而使得粒径增大。由于低压有利于破坏大颗粒, 而高压在加速稳定剂扩散同时又能使粒径减小^[20]。因此, 本实验采用高、低压力联合, 即先在 30 MPa 下均质 5 次, 再在 100 MPa 下均质 20 次。

表 5 均质压力对平均粒径及 PDI 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 5 Effect of homogeneous pressure on average particle size and PDI ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

均质压力/MPa	平均粒径/nm	PDI
60	676.0±16.3*	0.302±0.025*
80	558.6±6.2*	0.251±0.015
100	482.5±4.4	0.221±0.017
120	525.4±9.2*	0.225±0.012

与 100 MPa 组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs 100 MPa group

2.3.6 均质次数 按“2.1”项下方法制备黄芩苷粗混悬液, 置于 30 MPa 压力下均质 5 次, 再置于 100 MPa 压力下均质 5、10、15、20、25 次, 测定平均粒径及 PDI, 结果见表 6。随着均质次数增多, 纳米混悬剂平均粒径及 PDI 逐渐降低; 当达到 20 次后, 均质次数对两者影响不大。从工作效率和能源节约角度考虑, 确定均质次数为 20 次。

2.4 稳定剂种类的考察

按“2.1”项下方法制备黄芩苷纳米混悬剂, 以平均粒径、PDI、SI 以及体系外观为评价指标, 考察天然稳定剂甘草酸及常用合成类稳定剂 SDS、P188、PVP K30、PEG-400、HPMC 对黄芩苷纳米混悬剂的影响。由表 7 可知, 甘草酸作为稳定剂时, 制得的纳米混悬剂粒径小, 体系能保持长时间稳定,

表 6 均质次数对平均粒径及 PDI 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 6 Effect of homogeneous times on average particle size and PDI ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

均质次数	平均粒径/nm	PDI
5	941.1±39.9*	0.677±0.056*
10	764.0±20.4*	0.521±0.037
15	486.1± 8.5*	0.225±0.017
20	447.2± 4.7	0.192±0.012
25	451.0± 5.2	0.212±0.016

与 20 次组比较: * $P < 0.05$ * $P < 0.05$ vs 20 times group表 7 稳定剂种类对平均粒径、PDI、SI 及体系外观的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 7 Effect of different stabilizers on average particle size, PDI, stability and system appearance ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

稳定剂种类	平均粒径/nm	PDI	SI	体系外观
甘草酸	448.4± 5.8	0.202±0.014	0.912±0.017	能保持长时间稳定
SDS	595.5± 7.0*	0.247±0.028	0.416±0.034*	放置易沉淀, 摇之可分散
P188	495.9± 7.0*	0.258±0.034*	0.677±0.022*	放置易沉淀, 摇之可分散
PVP K30	618.8±12.9*	0.328±0.032*	0.765±0.016*	放置易沉淀, 再分散难
PEG400	698.8±21.5*	0.446±0.022*	0.482±0.005*	放置易絮凝, 再分散难
HPMC	814.7±28.7*	0.371±0.031*	0.351±0.022*	放置后药物易沉淀于杯底

与甘草酸组比较: * $P < 0.05$ * $P < 0.05$ vs GA group

表明该制备方法具有良好的重现性。

2.6 固化过程的考察

2.6.1 BCN-SN 的制备 取“2.5”项下纳米混悬剂 2 mL 于西林瓶中, 置-70 °C 冷冻干燥机中预冻 12 h, 再减压冷冻干燥 48 h, 即得 BCN-SN 冻干粉。

2.6.2 再分散性评价 取“2.6.1”项下 BCN-SN 适量, 10 mL 纯水超声复溶, 按“2.2”项下方法测定复溶后的平均粒径、PDI 及 RDI。

2.6.3 不同种类稳定剂对 BCN-SN 的影响 按“2.6.1”项下方法制备 BCN-SN, 考察甘草酸与常见

效果优于其他合成类稳定剂, 其原因可能是合成类稳定剂临界胶束浓度大于甘草酸, 因此在稳定剂用量为 0.10% 时, 合成类稳定剂并未达到其临界胶束浓度, 使得新产生的纳米粒表面无法完全被稳定剂覆盖, 从而制得粒径普遍大于甘草酸^[21-22]。同时, 因甘草酸在用量较小时表面张力小于其他合成类稳定剂, 使得体系表现出更优的稳定性^[17]。

2.5 验证试验

在工艺因素考察得出的最优处方、工艺条件下重复制备 3 批样品, 测定粒径及 PDI。结果显示平均粒径为 (446.0±4.5) nm, PDI 为 0.210±0.013,

的合成类稳定剂 SDS、P188、PVP K30、HPMC、PEG400 对固化后外观及再分散性的影响, 结果见表 8。结果显示, 以甘草酸为稳定剂的纳米混悬剂冻干后粒径及 PDI 变化不大, RDI 最小, 并未发生明显的“固化损伤”, 说明甘草酸具有作为冻干保护剂的潜力, 与文献报道相符^[17]。因此课题组进一步将甘草酸与其他冻干保护剂做对比, 考察其作为保护剂的效果。

2.6.4 冻干保护剂种类的考察 按“2.6.1”项下方法分别加入甘草酸与常用保护剂山梨醇、甘露醇、

表 8 稳定剂种类对冻干粉外观及再分散性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 8 Effects of different stabilizers on appearance and redispersibility of lyophilized powder ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

稳定剂种类	外观	再分散后平均粒径/nm	PDI	RDI
甘草酸	轻微塌陷, 疏松, 质地均一	557.5± 5.0	0.275±0.024	1.238±0.011
SDS	疏松, 塌陷	837.5±18.1*	0.353±0.046	1.410±0.037*
P188	表面皱缩, 塌陷	757.4±27.3*	0.389±0.013	1.527±0.055*
PVPK30	暗黄色, 表面皱缩, 塌陷	1 097.1±70.4*	0.660±0.057*	1.773±0.114*
HPMC	表面皱缩, 严重塌陷	2 105.5±51.6*	1.197±0.139*	2.584±0.063*
PEG400	表面严重皱缩	1 173.3±44.3*	0.660±0.034*	1.679±0.063*

与甘草酸组比较: * $P < 0.05$ * $P < 0.05$ vs GA group

壳聚糖、乳糖和葡萄糖（质量分数均为 3%）制备 BCN-SN 冻干粉。取不添加任何保护剂的样品作为空白对照，以外观、再分散性为评价指标，考察不同保护剂对 BCN-SN 冻干粉的影响，结果见表 9。未加冻干保护剂的空白对照质地相对粗糙，再分散后粒径增大最为明显。以甘草酸、甘露醇为保护剂的冻干粉外观形状良好，复溶速率较快，并且粒径增加相对较小，但前者易发生塌陷，而后者稍有皱缩，故考虑以两者联合作为保护剂。

2.6.5 保护剂用量的筛选 以外观和再分散性为指标，考察甘草酸-甘露醇用量（0、1%、3%、5%、7%）对 BCN-SN 保护效果的影响，结果见表 10。

随着冻干保护剂用量增加，冻干粉表面逐渐平整，RDI 呈先降低后增大的趋势；当用量为 3% 时，冻干粉无塌陷现象，质地均一，流动性好，复溶后平均粒径为 (478.0 ± 6.5) nm，PDI 为 0.230 ± 0.015 ，再分散后仍能保持原有状态。

2.6.6 冻干保护剂比例的筛选 以外观和再分散性为指标，考察不同质量比（1:1、1:2、2:1）甘露醇-甘草酸联用作为冻干保护剂对 BCN-SN 保护效果的影响，不添加保护剂为空白对照，结果见表 11。随着甘草酸用量增加，BCN-SN 冻干粉逐渐疏松，当比例为 1:2 时，其质地均一，流动性好，复溶后平均粒径为 (478.0 ± 6.5) nm，PDI 为 $0.230 \pm$

表 9 冻干保护剂种类对冻干粉外观及再分散性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 9 Effects of different lyoprotectants on appearance and redispersibility of lyophilized powder ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

保护剂	外观	再分散后平均粒径/nm	PDI	RDI
空白对照	疏松多孔，质地相对粗糙	$557.5 \pm 5.0^*$	0.275 ± 0.024	$1.238 \pm 0.011^*$
甘草酸	轻微塌陷，疏松，质地均一，流动性好	500.4 ± 6.2	0.241 ± 0.017	1.111 ± 0.014
山梨醇	表面皱缩，结块严重，黏性大	$519.6 \pm 5.6^*$	0.275 ± 0.025	$1.153 \pm 0.013^*$
甘露醇	表面平整，轻微皱缩，质地均一	506.9 ± 5.8	0.258 ± 0.014	1.125 ± 0.013
壳聚糖	棕黄色，色泽不均一	$542.4 \pm 5.0^*$	0.271 ± 0.038	$1.204 \pm 0.011^*$
乳糖	不塌陷，质地均一	$521.8 \pm 5.9^*$	0.263 ± 0.013	$1.158 \pm 0.013^*$
葡萄糖	表面皱缩，少量结块，黏性大	$534.1 \pm 8.3^*$	0.260 ± 0.019	$1.186 \pm 0.019^*$

与甘草酸组比较：* $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs GA group

表 10 冻干保护剂用量对冻干粉再分散性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 10 Effect of dosage of lyoprotectant on redispersibility of lyophilized powder ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

保护剂用量/%	外观	再分散后平均粒径/nm	PDI	RDI
0	疏松多孔，质地相对粗糙	$557.5 \pm 5.0^*$	$0.275 \pm 0.024^*$	$1.238 \pm 0.011^*$
1	表面多孔	$546.2 \pm 9.2^*$	0.244 ± 0.028	$1.213 \pm 0.021^*$
3	表面较平整，质地均一	478.0 ± 6.5	0.230 ± 0.015	1.061 ± 0.014
5	表面较平整，质地均一	479.7 ± 11.1	0.267 ± 0.018	1.065 ± 0.025
7	表面平整	$508.0 \pm 5.8^*$	$0.274 \pm 0.023^*$	$1.128 \pm 0.013^*$

与 3% 组比较：* $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs 3% group

表 11 冻干保护剂比例对冻干粉再分散性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 11 Effect of lyoprotectant ratio on redispersibility of lyophilized powder ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

保护剂比例	外观	再分散后平均粒径/nm	PDI	RDI
空白对照	疏松多孔，质地相对粗糙	$557.5 \pm 5.0^*$	$0.275 \pm 0.024^*$	$1.238 \pm 0.011^*$
1:1	表面轻微皱缩	$489.1 \pm 5.6^*$	0.270 ± 0.022	$1.086 \pm 0.013^*$
1:2	疏松，不塌陷，质地均一，流动性较好	478.0 ± 6.5	0.230 ± 0.015	1.061 ± 0.014
2:1	表面多孔	$492.4 \pm 4.0^*$	0.259 ± 0.022	$1.093 \pm 0.009^*$

与 1:2 组比较：* $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs 1:2 group

0.015, 再分散后仍能保持原有的混悬状态。

2.7 扫描电镜 (SEM) 观察形态

取适量 BCN 原料药和 BCN-SN, 黏附于样品池上, 表层减压喷金处理以增加其电导率, 于 SEM 下观察其形态并拍摄照片, 见图 1。可见 BCN 原料药大小不均匀, 呈较大的块状, 而 BCN-SN 呈不规则球形, 大小较均匀。

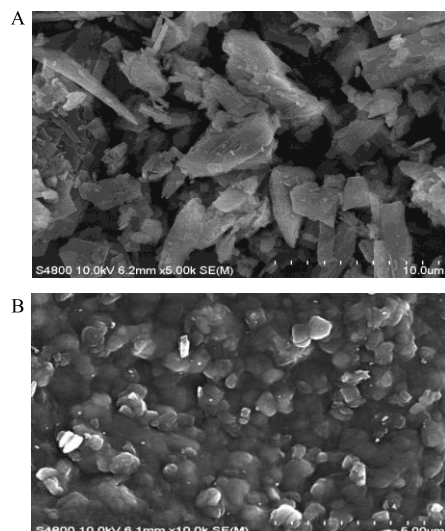


图1 BCN 原料药 (A) 和 BCN-SN (B) 的 SEM 图
Fig. 1 SEM image of raw BCN (A) and BCN-SN (B)

2.8 差式扫描量热法 (DSC)

检测条件为扫描范围 25~300 °C; 升温速率 10 °C/min, 气氛为氮气, 对物理混合物、空白辅料、BCN 原料药和 BCN-SN 进行 DSC 分析, 结果见图 2。由图可知, BCN 原料药在 207 °C 有 1 处特征吸收峰; 空白辅料在 168 °C 有 1 个吸热峰; 物理混合物在 164、198 °C 有 2 处吸收峰; BCN-SN 的 DSC 曲线图显示, 药物原来的吸热峰基本消失, 说明 BCN-SN 中的药物呈无定形态。

2.9 体外溶出实验

2.9.1 色谱条件^[23] 色谱柱为 Agilent EP-C₁₈ 柱

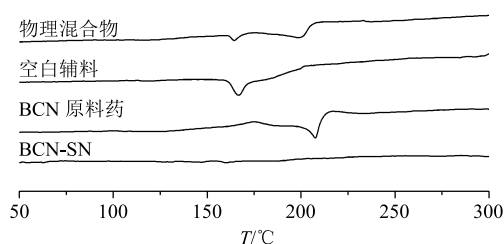


图2 物理混合物、空白辅料、BCN 原料药和 BCN-SN 的 DSC 图
Fig. 2 DSC map of physical mixture, blank accessories, BCN raw drug, and BCN-SN

(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.2%磷酸水溶液 (47:53); 检测波长 280 nm; 柱温为 30 °C; 体积流量 1.0 min/mL; 进样量 10 μL。色谱图见图 3。

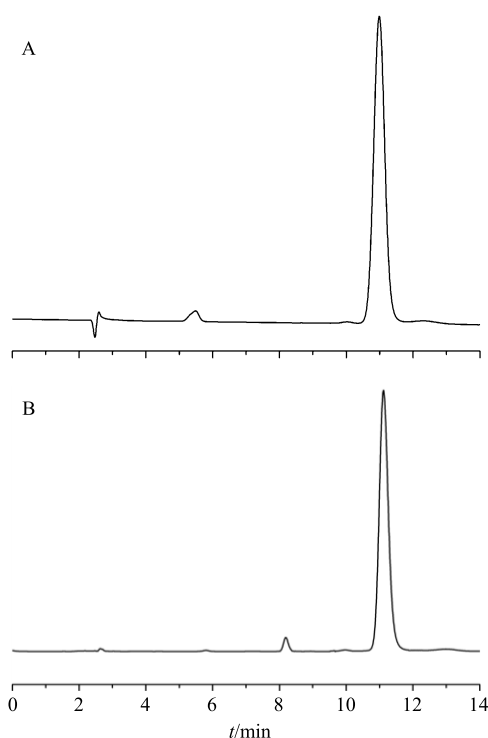


图3 黄芩苷对照品 (A) 和 BCN-SN 样品 (B) 的 HPLC 图
Fig. 3 HPLC of reference substance (A) and BCN-SN sample (B)

2.9.2 对照品溶液的配制 精密称取黄芩苷对照品 10.4 mg, 置于 50 mL 量瓶中, 加甲醇超声溶解并稀释至刻度, 配制成质量浓度为 0.208 mg/mL 的黄芩苷对照品溶液。

2.9.3 供试品溶液的配制 取 90 mg BCN-SN 冻干粉, 装入空心胶囊中, 参照《中国药典》2015 年版第四部项下第二法 (桨法), 以 900 mL 蒸馏水为溶出介质, 转速为 100 r/min, 温度为 (37.0±0.5) °C, 60 min 时取样 5 mL, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液即得。

2.9.4 线性关系考察 精密吸取质量浓度 0.208 mg/mL 的黄芩苷对照品适量, 用甲醇稀释得质量浓度为 10.4、20.8、31.2、41.6、52.0、104.0 μg/mL 对照品溶液, 在“2.9.1”项色谱条件下进样分析, 以质量浓度为横坐标 (X), 色谱峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 得到回归方程 $Y=44.489 X-28.99$, $r^2=0.9998$, 表明黄芩苷在 10.4~104.0 μg/mL 呈良好线性关系。

2.9.5 载药量的测定 取适量冻干粉, 甲醇超声溶解, 稀释后经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 用 HPLC 测定, 计算载药量为 $(23.7 \pm 1.3)\%$ 。

2.9.6 体外溶出度的测定 按《中国药典》2015 年版四部项下第二法(桨法)进行溶出度测定, 称取等量 BCN-SN 冻干粉与物理混合物装入胶囊中, 投入 900 mL 蒸馏水中, 控制温度为 $(37.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$, 转速 100 r/min, 分别于 5、10、20、30、40、50、60 min 取样 5 mL (补足同温等量介质), 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 照 HPLC 法测定其峰面积, 计算药物溶出度, 并绘制溶出曲线, 结果见图 4。可见 BCN-SN 冻干粉在 60 min 时的溶出率达 87.4%, 而物理混合物不超过 50%, 表明将 BCN 制成 BCN-SN 能提高其体外溶出度。

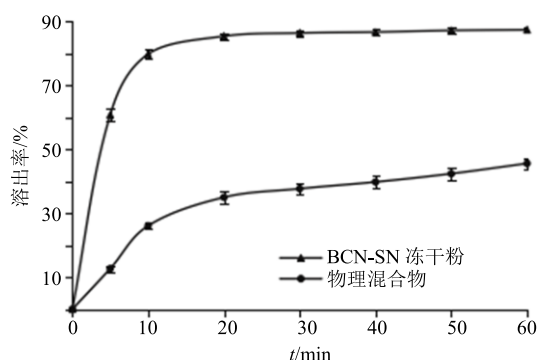


图 4 冻干粉和物理混合物的溶出曲线 ($n=3$)

Fig. 4 Dissolution curves of lyophilized powder and physical mixture ($n=3$)

3 讨论

采用高速剪切-高压均质法制备纳米混悬剂, 以避免如沉淀法使用有机溶剂溶解药物所存在的溶剂残留影响制剂安全性问题, 也弥补了仅采用高速剪切法所得产品不稳定, 易沉淀的问题, 同时制备过程耗时短, 有助于提高工作效率。本实验以纯水为溶剂, 采用高速剪切-高压均质法制备黄芩苷纳米混悬剂, 旨在探索一种低毒、简便的制备方法, 从而为纳米混悬剂的相关研究奠定基础。

纳米混悬剂能有效改善药物难溶性问题, 但其多使用合成类稳定剂, 稳定性差, 存在潜在毒性, 探寻新型稳定剂已成为相关研究的新方向^[24-25]。本实验以甘草酸作为稳定剂, 不仅可以解决稳定剂的潜在毒性问题, 并且其自身也有助于其他活性物质减毒增效^[26], 符合中药制剂“药辅合一”的传统理念, 同时制备所得的纳米混悬剂在粒径、PDI、稳定性等方面均优于合成类稳定剂。分析甘草酸可作

为稳定剂使用的原因可能为(1)两亲性: 甘草酸与传统表面活性剂一样, 具有两亲性, 即以 2 分子葡萄糖醛酸作为亲水性基团, 以三萜成分作为亲脂性基团; (2)网状结构: 甘草酸与药物分子作用, 一部分吸附于药物粒子表面, 另一部分分散于水中形成网状结构, 将药物粒子捕获, 从而阻止粒子之间发生团聚^[17]。

固化研究结果显示, BCN-SN 冻干粉复溶后粒径较固化前增大了 27.5 nm, PDI 增大 0.026, 表明以甘草酸-甘露醇联用作为冻干保护剂, 冻干效果好。进一步证明甘草酸有望成为难溶性药物纳米混悬剂的新型多功能稳定剂。同时, 黄芩苷为典型苦味成分, 而甘草酸又是天然甜味剂, 因此以甘草酸为“稳定-保护”剂还可矫黄芩苷之苦味, 实现“药之为辅”。

体外溶出试验结果表明, 纳米混悬技术能够有效提高黄芩苷的溶出度, 可为后续制剂的开发奠定基础。然而, 以甘草酸为多功能稳定剂制备的 BCN-SN 能否有效提高体内生物利用度, 甘草酸的药理活性是否会在用量过大时影响主药药效的发挥, 能否通过调节甘草酸用量使其与主药协同增效, 甘草酸与合成类稳定剂相比能否减轻细胞毒性以及其作为稳定剂是否具有普适性, 其深层稳定机制等还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 郑勇凤, 王佳婧, 傅超美, 等. 黄芩的化学成分与药理作用研究进展 [J]. 中成药, 2016, 38(1): 141-147.
- [2] 雷奇林, 黄雅兰, 钟茜, 等. 基于网络药理学的黄芩抗炎作用机制研究 [J]. 中草药, 2018, 49(15): 3523-3530.
- [3] 朱水兰, 黎宇, 严奉东, 等. 油酸诱导胰岛素抵抗 HepG2 细胞模型优化及小檗碱、黄芩苷、葛根素和甘草苷的体外降糖作用研究 [J]. 药物评价研究, 2017, 40(10): 1402-1407.
- [4] 刘仁伟, 刘冰. 黄芩苷胶囊联合胸腺法新治疗慢性乙型肝炎的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2018, 33(12): 3312-3316.
- [5] Ping Y, Yu L, Hu Y Q, et al. Study on targeting and *in vitro* anti-oxidation of baicalin solid lipid nanoparticles [J]. Chin Herb Med, 2012, 4(4): 336-340.
- [6] 赵炎军, 王建平, 吴凡, 等. 黄芩苷 PEG-PLGA 纳米胶束的制备、表征及在急性心肌缺血模型大鼠体内的组织分布 [J]. 中草药, 2018, 49(18): 4269-4276.
- [7] 吴玉梅, 李新悦, 张谦, 等. 单克隆抗体 OX26 修饰

- 的丹酚酸 B/黄芩苷纳米结构脂质载体研究 [J]. 中草药, 2018, 49(12): 2801-2808.
- [8] 高彩芳, 夏加璇, 朱 颖, 等. 纳米技术在改善中药有效成分成药性中的应用 [J]. 中草药, 2018, 49(12): 2754-2762.
- [9] 申宝德, 连王权, 沈成英, 等. 微型化介质研磨法制备难溶性黄酮类化合物纳米混悬剂 [J]. 中草药, 2017, 48(21): 4413-4418.
- [10] 徐 浩, 高艺璇, 王向涛. 槲皮素纳米混悬剂的制备、表征及抗乳腺癌研究 [J]. 中草药, 2019, 50(1): 42-51.
- [11] 武 娜, 张利红, 程 玲, 等. 金丝桃苷固体纳米晶体的制备及其体外释放研究 [J]. 中草药, 2015, 46(12): 1759-1763.
- [12] 靳世英, 袁海龙, 靳士晓, 等. 黄芩苷纳米晶体微丸的制备及其药代动力学初步研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(8): 1156-1159.
- [13] Wu W, He W, Tan Y, *et al.* Food protein-stabilized nanoemulsions as potential delivery systems for poorly water-soluble drugs: preparation, *in vitro* characterization, and pharmacokinetics in rats [J]. *Int J Nanomed*, 2011, 20(11): 521-532.
- [14] Hawkins M J. Protein nanoparticles as drug carriers in clinical medicine [J]. *Adv Drug Delivery Rev*, 2008, 60(8): 876-885.
- [15] Güçlü-Üstündağ Ö, Mazza G. Saponins: Properties, applications and processing [J]. *Crit Rev Food Sci*, 2007, 47(3): 231-258.
- [16] Xie Y, Ma Y, Xu J, *et al.* *Panax notoginseng* saponins as a novel nature stabilizer for poorly soluble drug nanocrystals: A case study with baicalein [J]. *Molecules*, 2016, 21(9): 1149-1160.
- [17] Chen Y, Liu Y, Xu J, *et al.* A natural triterpenoid saponin as multifunctional stabilizer for drug nanosuspension powder [J]. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2017, 18(7): 1-10.
- [18] Yue P F, Li Y, Wan J, *et al.* Study on formability of solid nanosuspensions during nanodispersion and solidification: I. Novel role of stabilizer/drug property [J]. *Int J Pharm*, 2013, 454(1): 269-277.
- [19] Zong L L, Li X H, Wang H Y, *et al.* Formulation and characterization of biocompatible and stable IV. itraconazole nanosuspensions stabilized by a new stabilizer polyethylene glycol-poly (betabenzyl-l-aspartate) (PEG-PBLA) [J]. *Int J Pharm*, 2017, 531(1): 108-117.
- [20] Xu Y, Liu X Y, Lian R Y, *et al.* Enhanced dissolution and oral bioavailability of aripiprazole nanosuspensions prepared by nanoprecipitation/homogenization based on acid-base neutralization [J]. *Int J Pharm*, 2012, 438(12): 287-295.
- [21] 汪小涵, 钟芮娜, 申宝德, 等. 落新妇苷无定型纳米混悬剂的制备及其体外评价 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(8): 1626-1632.
- [22] 杨 璇. 甘草对葛根、黄芩增溶作用和机理的研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2013.
- [23] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [24] He W, Lu Y, Qi J, *et al.* Food proteins as novel nanosuspension stabilizers for poorly water-soluble drugs [J]. *Int J Pharm*, 2013, 441(12): 269-278.
- [25] 韩宝来, 刘伟芬, 李禄辉. 应用新型稳定剂制备紫杉醇纳米混悬剂及其稳定作用评价 [J]. 国际药学研究杂志, 2018, 45(5): 393-399.
- [26] 李涯松, 杨洁红, 樊守艳, 等. 甘草酸对雷公藤多甙治疗类风湿性关节炎增效减毒作用的实验研究 [J]. 中国中医药科技, 2008, 15(4): 293-294.