

桦木酸纳米粒的制备与表征

吴铭芳*, 许文佳, 祖元刚, 赵修华[#](东北林业大学森林植物生态学教育部重点实验室, 哈尔滨 150040)

中图分类号 R943 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)31-4445-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.31.32

摘要 目的:制备桦木酸纳米粒,并对其进行表征。方法:以乙醇为溶剂、水为反溶剂,采用反溶剂重结晶法制备桦木酸纳米粒。以粒径为指标,采用单因素试验与正交试验优化桦木酸纳米粒处方工艺中桦木酸溶液质量浓度、反溶剂-溶剂体积比、反溶剂滴加速度、反应温度和搅拌速度,并进行验证试验。采用扫描电子显微镜、激光粒度仪、傅里叶红外光谱仪和质谱分析仪对所制得的桦木酸纳米粒进行表征。结果:最优处方工艺为桦木酸溶液质量浓度为3 mg/mL、反溶剂-溶剂体积比为1:1、反溶剂滴加速度为8 mL/min、反应温度为20 ℃、搅拌速度为900 r/min;所制桦木酸纳米混悬液粒径为(156.0±8.6) nm($n=3$),冻干后粒径为(235.0±12.2) nm($n=3$),外观近球形、大小均匀、形态较规整;与桦木酸原料药比较,所制桦木酸纳米粒的化学结构没有发生改变,分子量和质荷比无明显变化。结论:成功制得桦木酸纳米粒。

关键词 桦木酸;纳米粒;反溶剂重结晶法;单因素试验;正交试验;表征

Preparation and Characterization of Betulinic Acid Nanoparticles

WU Mingfang, XU Wenjia, ZU Yuangang, ZHAO Xiuhua (Key Laboratory of Forest Plant Ecology, Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To prepare the betulinic acid nanoparticles, and characterize them. METHODS: Using ethanol as solvent and water as anti-solvent, anti-solvent recrystallization method was used to prepare betulinic acid nanoparticles. Using particle size as indicator, single factor test and orthogonal test were adopted to optimize the mass concentration of betulinic acid solution, anti-solvent-solvent volume ratio, anti-solvent drip rate, reaction temperature and stirring speed in formulation technology of betulinic acid nanoparticles, and verification test was conducted. The betulinic acid nanoparticles were characterized by scanning electron microscopy, laser particle size analyzer, Fourier infrared spectrometer and mass spectrum analyzer. RESULTS: The optimal technology was as follow as betulinic acid solution mass concentration of 3 mg/mL, anti-solvent-solvent volume ratio of 1:1, anti-solvent drip rate of 8 mL/min, reaction temperature of 20 ℃ and stirring speed of 900 r/min. The average size of prepared betulinic acid nanosuspension was (156.0±8.6) nm ($n=3$) and the particle size was (235.0±12.2) nm ($n=3$) after freeze-drying, with nearly spherical appearance, uniform size and regular form. Compared with raw material of betulinic acid, the chemical structure of prepared betulinic acid nanoparticles did not change, and there were no significant changes in molecular weight and mass ratio. CONCLUSIONS: Betulinic acid nanoparticles are successfully prepared.

KEYWORDS Betulinic acid; Nanoparticles; Anti-solvent recrystallization method; Single factor test; Orthogonal test; Characterization

桦木酸(Betulinic acid)又称白桦酯酸,是从白桦树皮中萃取得到的一种五环三萜类化合物,具有抗肿瘤^[1]、抗人类免疫缺陷病毒^[2]、抗炎^[3-4]和抗疟疾^[5]等药理活性。研究发现,桦木酸能够抑制肿瘤细胞生长和对抗血管新生,从而诱导癌细胞凋亡,对癌细胞具有靶向作用,且毒性很小,是最有前途的抗癌药物前体之一。但由于桦木酸水溶性差、口服生物利用度低^[6],其应用受到了限制。为了提高难溶性药物的生物利用度,可将其制备成粒径小、粒度分布均匀的纳米粒。药物纳米化的常用方法有气流粉碎法、机械粉碎法、高压均质技术、超临界流体技术和反溶剂重结晶法等。目前应用最广泛的是机

械粉碎法,但是其缺点是耗能大、效率低和所制纳米粒粒径分布不均匀;而高压均质技术^[7]和超临界流体技术^[8]又都存在高投资、低产率等缺点。

反溶剂重结晶法是把药物溶于溶剂中后,再加入反溶剂中,通过降低溶剂的溶解能力,使药物迅速达到过饱和状态而析出结晶的一种传统微粉化技术^[9]。此方法具有易操作、成本低及能够适应工业化大生产等优点,通过该法已成功制备了多种难溶性口服药物纳米粒^[10]。本研究拟通过反溶剂重结晶法制备桦木酸纳米粒并对其进行表征,以期提高桦木酸的口服生物利用度。

1 材料

1.1 仪器

BI-200SM型Zeta电位及粒度分析仪(美国Brookhaven公司);78HW-1型数显磁力搅拌器(杭州仪表电机有限公司);BS-110型电子分析天平(德国Sartorius公

* 博士研究生。研究方向:植物化学与植物药。E-mail: 604533864@qq.com

[#] 通信作者:教授,博士。研究方向:药物新剂型。E-mail:xiuhua-zhao@nefu.edu.cn

司);Inspect S型扫描电子显微镜(SEM,美国FEI公司);Magna-IR560ESP型傅里叶红外光谱仪(FTIR,美国Nicolet公司);6520型液相色谱质谱(LC-MS)分析仪(美国AB公司);GW-RO型超纯水器(北京普析通用仪器有限责任公司)。

1.2 药品与试剂

桦木酸原料药(陕西慧科生物科技有限公司,批号:111802-201001,纯度:98%);无水乙醇(天津市天力化学试剂有限公司,批号:20130408,分析纯);甲醇(江苏汉邦科技有限公司,批号:131583,色谱纯);溴化钾(常州市海拓实验仪器有限公司,批号:20160421,光谱纯);水为去离子水。

2 方法与结果

2.1 反溶剂重结晶法制备桦木酸纳米粒

利用一些有机溶剂对桦木酸进行溶解度测试后,选择乙醇作为溶剂,将一定质量的桦木酸原料药与一定体积的乙醇溶液放入烧杯中,置于恒温水浴锅中并在恒温磁力搅拌器下控制其搅拌的速度,使原料药充分溶解,得到桦木酸乙醇溶液。待温度稳定后,将一定体积的反溶剂(去离子水)缓慢逐滴加入到桦木酸乙醇溶液中,得到桦木酸纳米混悬液。收集桦木酸纳米混悬液,8000 r/min离心(离心半径:10 cm)10 min,弃上清,取一部分沉淀用等体积的去离子水复溶,通过Zeta电位及粒度分析仪测得粒径大小;另一部分沉淀于-40℃中预冻12 h,再冷冻48 h,即得桦木酸纳米粒。

2.2 单因素试验筛选处方工艺

本研究在预试验基础上筛选了5个对桦木酸纳米粒的形态和粒径影响较大的因素,分别为桦木酸乙醇溶液质量浓度、反溶剂-溶剂体积比、搅拌速度、反溶剂滴加速度和反应温度。每个因素设4个水平:桦木酸乙醇溶液质量浓度为0.5、1、2、3、4、5 mg/mL;反溶剂-溶剂体积比为0.5:1、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1;搅拌速度为600、700、800、900、1000、1100 r/min;反溶剂滴加速度为2、4、6、8、10、12 mL/min;反应温度为10、15、20、25、30、35℃。分别考察上述因素对桦木酸纳米粒的影响,以粒径最小原则进行筛选,每组试验重复3次。

2.1.1 桦木酸乙醇溶液质量浓度 在磁力搅拌速度为900 r/min、反应温度为25℃的条件下,按反溶剂-溶剂体积比4:1将去离子水以8 mL/min的滴加速度分别加入到质量浓度为1、2、3、4 mg/mL的桦木酸乙醇溶液中,制成桦木酸纳米粒,测定其粒径。结果显示,当质量浓度为3 mg/mL时所制桦木酸纳米粒的粒径最小,故确定桦木酸乙醇溶液质量浓度为3 mg/mL,详见图1。

2.1.2 反溶剂-溶剂体积比 在磁力搅拌速度为900 r/min、反应温度为25℃的条件下,按反溶剂-溶剂体积

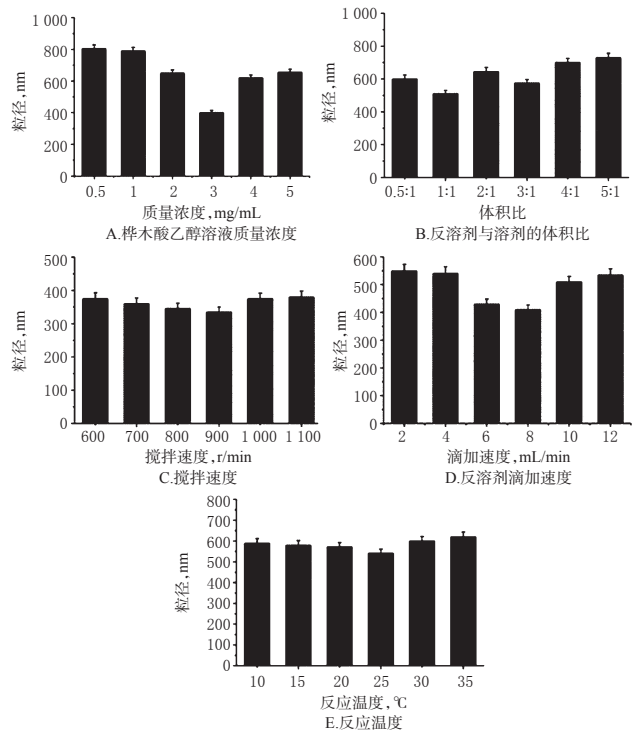


图1 单因素试验结果

Fig 1 Results of single factor test

比分别为1:1、2:1、3:1、4:1将去离子水以8 mL/min的滴加速度分别加入到质量浓度为3 mg/mL的桦木酸乙醇溶液中,制成桦木酸纳米粒,测定其粒径。结果显示,当反溶剂-溶剂体积比为1:1时所制桦木酸纳米粒的粒径最小,故确定反溶剂-溶剂体积比为1:1,详见图1。

2.1.3 搅拌速度 在磁力搅拌速度分别为700、800、900、1000 r/min,反应温度为25℃的条件下,按反溶剂-溶剂体积比为1:1将去离子水以8 mL/min的滴加速度加入到质量浓度为3 mg/mL的桦木酸乙醇溶液中,制成桦木酸纳米粒,测定其粒径。结果显示,搅拌速度为900 r/min时所制桦木酸纳米粒的粒径最小,故确定搅拌速度为900 r/min,详见图1。

2.1.4 反溶剂滴加速度 在磁力搅拌速度为900 r/min、反应温度为25℃的条件下,按反溶剂-溶剂体积比为1:1将去离子水以4、6、8、10 mL/min的滴加速度分别加入到质量浓度为3 mg/mL的桦木酸乙醇溶液中,制成桦木酸纳米粒,测定其粒径。结果显示,反溶剂滴加速度为8 mL/min时所制桦木酸纳米粒的粒径最小,故确定反溶剂滴加速度为8 mL/min,详见图1。

2.1.5 反应温度 在磁力搅拌速度为900 r/min,反应温度分别为15、20、25、30℃的条件下,按反溶剂-溶剂体积比为1:1将去离子水以8 mL/min的滴加速度加入到质量浓度为3 mg/mL的桦木酸乙醇溶液中,制成桦木酸纳米粒,测定其粒径。结果显示,反应温度为25℃时所制桦木酸纳米粒的粒径最小,故确定反应温度为25℃,详见图1。

综上单因素试验结果,桦木酸纳米粒的处方工艺条件为:桦木酸乙醇溶液质量浓度为3 mg/mL,反溶剂-溶剂体积比为1:1,搅拌速度为900 r/min,反溶剂滴加速度为8 mL/min,反应温度为25 ℃。

2.3 正交试验优化处方工艺

2.3.1 正交试验 在单因素试验结果的基础上,确定以桦木酸乙醇溶液质量浓度(A, mg/mL)、反溶剂-溶剂体积比(B)、反溶剂滴加速度(C, mL/min)和反应温度(D, ℃)为因素,按 $L_{16}(4^5)$ 表设计正交试验,每个因素设4个水平:A为1、2、3、4 mg/mL,B为1:1、2:1、3:1、4:1,C为4、6、8、10 mL/min,D为15、20、25、30 ℃。以纳米混悬液粒径为指标,以粒径最小原则进行筛选,每组试验重复试验3次,采用正交试验优化桦木酸纳米粒处方工艺。因素与水平见表1,正交试验设计与结果见表2,方差分析结果见表3。

表1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

水平	因素			
	A,mg/mL	B	C,mL/min	D,℃
1	1	1:1	4	15
2	2	2:1	6	20
3	3	3:1	8	25
4	4	4:1	10	30

表2 正交试验设计与结果

Tab 2 Orthogonal test design and results

序号	A,mg/mL	B	C,mL/min	D,℃	粒径($\bar{x} \pm s, n=3$), nm
1	1	1	4	15	342.6 ± 18.3
2	1	2	6	20	423.1 ± 19.3
3	1	3	8	25	566.3 ± 24.6
4	1	4	10	30	921.1 ± 42.3
5	2	1	6	25	244.0 ± 13.3
6	2	2	4	30	873.3 ± 45.1
7	2	3	10	15	123.8 ± 7.5
8	2	4	8	20	367.6 ± 19.4
9	3	1	8	30	234.3 ± 13.2
10	3	2	10	25	321.2 ± 14.2
11	3	3	4	20	167.2 ± 4.2
12	3	4	6	15	467.3 ± 22.4
13	4	1	10	20	188.9 ± 12.3
14	4	2	8	15	302.5 ± 14.6
15	4	3	6	30	645.3 ± 24.2
16	4	4	4	25	463.3 ± 22.3
平均值1	563.250 ± 26.13	252.450 ± 14.28	461.600 ± 22.48	309.050 ± 15.70	
平均值2	402.175 ± 21.33	480.025 ± 23.30	444.925 ± 19.80	286.700 ± 13.80	
平均值3	297.475 ± 13.50	375.650 ± 15.13	367.675 ± 17.95	398.700 ± 22.73	
平均值4	400.000 ± 18.35	554.830 ± 26.60	388.750 ± 19.08	670.750 ± 31.20	
R	265.775 ± 12.63	302.380 ± 12.32	93.925 ± 4.53	384.050 ± 17.40	

由表2和表3结果可知,各因素对桦木酸纳米粒粒径大小的影响程度依次为反应温度>反溶剂-溶剂体积比>桦木酸乙醇溶液质量浓度>反溶剂滴加速度,其中反溶剂-溶剂体积比、反应温度、桦木酸乙醇溶液质量浓度对粒径有显著影响($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。综合考虑,确定木酸纳米粒的最优处方工艺条件为 $A_3B_1C_3D_2$,即桦

表3 方差分析结果

Tab 3 Results of variance analysis

方差来源	离均差平方和	自由度	F	P
A	144 575.52	3	5.57	<0.05
B	206 509.37	3	7.96	<0.01
C(误差)	23 974.44	3	0.92	
D	380 901.48	3	14.68	<0.01

注: $F_{0.05}(3,12)=3.49$; $F_{0.01}(3,12)=5.59$

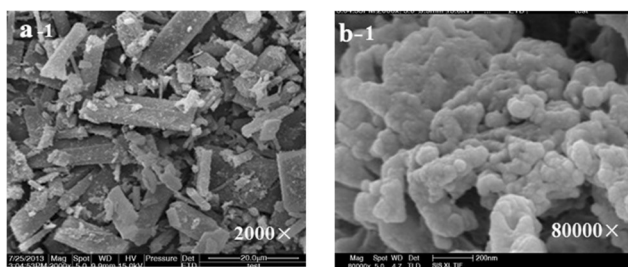
Note: $F_{0.05}(3,12)=3.49$; $F_{0.01}(3,12)=5.59$

木酸乙醇溶液质量浓度为3 mg/mL,反溶剂-溶剂体积比为1:1,反溶剂滴加速度为8 mL/min,反应温度为20 ℃。

2.3.2 验证试验 按最优处方工艺条件,首先称取30 mg的桦木酸原料药溶于10 mL的乙醇中,充分溶解得到质量浓度为3 mg/mL的桦木酸乙醇溶液;在20 ℃温度下,向桦木酸乙醇溶液中以8 mL/min的滴加速度加入反溶剂(去离子水)10 mL,即制备出桦木酸纳米混悬液;混悬液离心后冻干制成桦木酸纳米粒。试验重复3次并测定所制桦木酸纳米粒的粒径。结果显示,桦木酸纳米混悬液平均粒径为 (156.0 ± 8.6) nm($n=3$),冻干后粒径为 (235.0 ± 12.2) nm($n=3$)。

2.4 桦木酸纳米粒表征

2.4.1 SEM分析 用SEM分析最优处方工艺所制桦木酸纳米粒和桦木酸原料药的形貌和大小。操作步骤:样品台上黏好双面铜导电胶,在此导电胶上黏附少量样品,再对样品喷金处理(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。结果显示,桦木酸原料药呈针状的晶体结构,平均粒径约在3 000~20 000 nm之间,粒度分布不均匀;桦木酸纳米粒呈近球形,大小比较均匀,形态较规整,平均粒径约为300 nm。桦木酸原料药和桦木酸纳米粒的SEM图见图2。



A.桦木酸原料药($\times 2000$)

B.桦木酸纳米粒($\times 80000$)

图2 桦木酸原料药和桦木酸纳米粒的SEM图

Fig 2 SEM pictures of betulinic acid raw material and nanoparticles

2.4.2 FTIR分析 用FTIR分析最优处方工艺所制桦木酸纳米粒和桦木酸原料药的化学结构。操作步骤:将样品与溴化钾粉末按1:100混合,研成细粉末、压片,进行红外光谱分析。结果显示,桦木酸纳米粒和桦木酸原料药的红外吸收峰位置基本相同,说明桦木酸纳米粒与桦木酸原料药对比,其化学结构没有发生改变。桦木酸的

红外特征峰为 $3\ 522\ \text{cm}^{-1}$ 为羧基的 O—H 伸缩振动吸收峰, $1\ 760\ \text{cm}^{-1}$ 为羧基的 C=O 伸缩振动吸收峰, $1\ 082$ 、 $1\ 035\ \text{cm}^{-1}$ 为 C—O 伸缩振动吸收峰。桦木酸原料药和桦木酸纳米粒的红外光谱图见图 3。

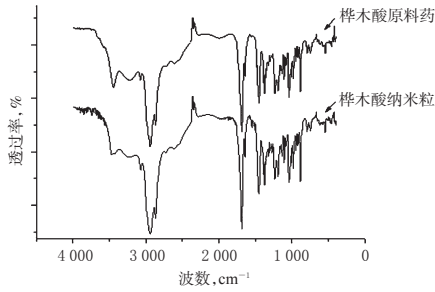


图 3 桦木酸原料药和桦木酸纳米粒的红外光谱图

Fig 3 IR pictures of betulinic acid raw material and nanoparticles

2.4.3 LC-MS 分析 采用 LC-MS 分析仪对最优处方工艺所制桦木酸纳米粒和桦木酸原料药的相对分子量进行分析。操作步骤:将样品 5 mg 溶于 10 mL 甲醇溶液中,以 10 000 r/min 离心(离心半径:10 cm)10 min,取上清进行检测。结果显示,桦木酸纳米粒的相对分子量与桦木酸原料药比较未发生明显变化,桦木酸纳米粒分子质子化之后的质荷比为 456.3,这一结果与桦木酸分子式计算出来的结果(分子量为 456.7)吻合。两种不同晶型的桦木酸具有相同的分子量,这一结果与 FTIR 结果吻合,由此判断出通过反溶剂重结晶法制得的桦木酸纳米粒的化学结构没有发生变化。桦木酸原料药和桦木酸纳米粒的 LC-MS 图见图 4。

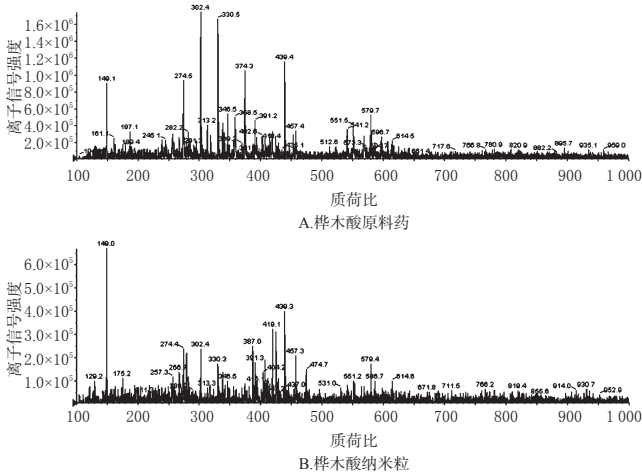


图 4 桦木酸原料药和桦木酸纳米粒的 LC-MS 图

Fig 4 LC-MS pictures of betulinic acid raw material and nanoparticles

3 讨论

本研究通过单因素试验和正交试验对桦木酸纳米粒的处方工艺进行了优化。结果显示,最优处方工艺条件为:桦木酸乙醇溶液质量浓度 3 mg/mL、反溶剂-溶剂体积比 1:1、反溶剂滴加速度 8 mL/min、反应温度 20 ℃、搅拌速度 900 r/min。所制得的桦木酸纳米混悬液粒径为 $(156.0 \pm 8.6)\ \text{nm}$ ($n=3$),冻干后粒径为 $(235.0 \pm 12.2)\ \text{nm}$ ($n=3$)。

本试验以难溶于水的药物桦木酸为研究对象,考察了反溶剂重结晶法制备桦木酸纳米粒的可行性,并对所制纳米粒进行了表征,为进一步开发桦木酸新剂型的研究奠定了良好的基础。

参考文献

- [1] 胡祥正,冯亚亚.桦木酸及其衍生物的制备与抗肿瘤作用的研究进展[J].化学通报,2016,79(7):589-596.
- [2] 易金娥,邬静,文利新,等.桦木酸的药理作用研究进展[J].中草药,2014,45(14):2118-2124.
- [3] 徐先祥,秦思,李琼.桦木酸抗炎作用与机制[J].中国现代应用药学,2014,31(10):1284-1287.
- [4] 朱利娟,向思亭,王喜红,等.桦木酸抗炎机制研究进展[J].中兽医医药杂志,2016,35(3):18-22.
- [5] 郑萍.极秃普梭木中某些化合物的抗疟和抑制胆碱酯酶的作用[J].现代药物与临床,2009,24(2):113-114.
- [6] Liu Y, Gao D, Zhang X, *et al.* Antitumor drug effect of betulinic acid mediated by polyethylene glycol modified liposomes[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2016, doi:10.1016/j.msec.2016.03.080.
- [7] 秦军,顾晓娟.药物超细微粒制备技术的概述[J].海峡药学,2013,25(1):8-10.
- [8] 张维,张志云,张志丽.超临界流体技术制备固体分散体的研究进展[J].安徽医药,2013,17(6):903-905.
- [9] de Paiva Lacerda S, Espitalier F, Hoffart V, *et al.* Liquid anti-solvent recrystallization to enhance dissolution of CRS 74, a new antiretroviral drug[J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2015,41(11):1910-1920.
- [10] 姜茹,祖元刚,赵修华,等.超临界反溶剂法制备叶酸介导吡柔比星葡聚糖纳米粒的工艺研究[J].中国药房,2011,22(21):1961-1964.

(收稿日期:2017-03-25 修回日期:2017-08-17)

(编辑:邹丽娟)

《中国药房》杂志——RCCSE 中国核心学术期刊,欢迎投稿、订阅