

达那唑-酪蛋白酸钠复合纳米粒的制备及其形成机制研究^Δ

李佳雯*, 曹文峰, 徐浩, 冯予涵, 冷钰婷, 景秋芳, 任福正[#](华东理工大学上海市新药设计重点实验室, 上海 200237)

中图分类号 R944 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)10-1213-08
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.10.10



摘要 目的 制备并表征达那唑(DAZ)-酪蛋白酸钠(SC)复合纳米粒,探讨“自下而上(bottom-up)”工艺中纳米粒形成的机制。方法 以SC作为调控纳米粒的稳定剂,通过反溶剂沉淀法制备DAZ-SC复合纳米粒,对其粒径、Zeta电位、微观形态、稳定性、封装率、载药量、体外溶出度等进行表征,进一步利用荧光光谱、红外光谱和在线粒子监测等方法分析DAZ与SC的相互作用机制。结果 DAZ-SC复合纳米粒的粒径为 (223.7 ± 12.5) nm,多分散性指数为 0.274 ± 0.012 ,Zeta电位为 $-(17.81 \pm 1.63)$ mV($n=3$);纳米混悬液的稳定性良好,DAZ的固态性质明显改善,溶出度显著提高。SC在DAZ的作用下发生静态淬灭,二级结构有所改变;在SC的作用下,DAZ的结晶过程得到控制;DAZ与SC之间的相互作用主要为氢键和范德华力。结论 本研究成功制备了DAZ-SC复合纳米粒;在“bottom-up”工艺中,因SC与DAZ之间氢键和范德华力引起的相互作用抑制了药物晶体的生长与团聚。**关键词** 达那唑;酪蛋白酸钠;稳定剂;形成机制;纳米粒

Study on preparation and formation mechanism of danazol-sodium caseinate composite nanoparticles

LI Jiawen, CAO Wenfeng, XU Hao, FENG Yuhan, LENG Yuting, JING Qiufang, REN Fuzheng (Shanghai Key Laboratory of New Drug Design, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To prepare and characterize danazol (DAZ)-sodium caseinate (SC) composite nanoparticles, and to study the mechanism of preparing nanoparticles in “bottom-up” technology. **METHODS** SC was used as a stabilizer for regulating nanoparticles, so that DAZ-SC composite nanoparticles were prepared by anti-solvent precipitation method. The particle size, Zeta-potential, micro-morphology, stability, encapsulation efficiency, drug loading and *in vitro* dissolution rate were characterized. Fluorescence spectra, IR spectra, FBRM and other methods were used to analyze the interaction mechanism between DAZ and SC. **RESULTS** The particle size of DAZ-SC composite nanoparticles was (223.7 ± 12.5) nm, and the polydispersity index was 0.274 ± 0.012 . Zeta-potential was $-(17.81 \pm 1.63)$ mV ($n=3$). The stability of nano-suspension was good, the solid properties of DAZ were greatly improved, and the dissolution rate was significantly increased. SC was statically quenched under the action of DAZ and the secondary structures of SC were changed. The crystallization process of DAZ was controlled under the action of SC, and the interaction between DAZ and SC was mainly hydrogen bond and van der Waals force. **CONCLUSIONS** In this study, DAZ-SC composite nanoparticles are successfully prepared. In the “bottom-up” technology, the interaction between SC and DAZ caused by hydrogen bond and van der Waals force inhibits the growth and agglomeration of drug crystals.

KEYWORDS danazol; sodium caseinate; stabilizer; formation mechanism; nanoparticles

根据Noyes-Whitney方程可知,难溶性药物颗粒尺寸的减小可提高其溶出度^[1],因此减小粒径的方法被广泛应用于难溶性药物的制剂领域^[2]。微纳尺度粒子的制备工艺主要分为“自上而下(top-down)”与“自下而上(bottom-up)”2类^[3]。“top-down”主要通过高压均质、研磨等手段使材料破碎以减小尺寸,在工业化生产中应用广泛^[4]。“bottom-up”是基于药物过饱和溶液沉淀的原理,控制微粒生长和团聚以获得单分散颗粒,适用于热敏感药

物,对设备的要求低^[5]。为实现精细控制药物颗粒大小的目标,使用“bottom-up”工艺制备纳米混悬液时,可加入蛋白质作为稳定剂,以调控药物的结晶过程。玉米蛋白^[6]、牛血清白蛋白^[7]、酪蛋白^[8]和胶原蛋白^[9]等都曾被报道用来制备药物微粒。Shinde等^[10]曾使用玉米蛋白和酪蛋白的可溶性钠盐——酪蛋白酸钠(sodium caseinate, SC)制备木犀草素纳米颗粒,提高了木犀草素的水溶性和口服生物利用度。相比于血清白蛋白,SC的成本低,应用潜力巨大。然而,到目前为止,对在“bottom-up”工艺中使用SC调控纳米粒形成机制的研究较少,使该方法难以应用于工业化生产。

达那唑(danazol, DAZ)常被用于治疗子宫内膜异位

Δ 基金项目:上海市新药设计重点实验室项目(No.17DZ2271000)

* 硕士研究生。研究方向:药物新剂型和制剂工艺技术研发。

E-mail: lihuayiac@163.com

[#] 通信作者:副教授,硕士生导师,博士。研究方向:药物新剂型和制剂工艺技术研发。E-mail: fzren@ecust.edu.cn

症、子宫肌瘤等妇科疾病,后亦被用于自身免疫性贫血等血液病的治疗,疗效确切^[11-12]。Liversidge等^[13]曾制备了一种DAZ纳米粒,经比格犬体内实验发现其生物利用度显著提高,说明减小粒径的方法对改善DAZ的溶出度、提高生物利用度十分有效。因此,可尝试探索SC作为稳定剂时DAZ的“bottom-up”改善工艺。

本研究通过反溶剂沉淀法制备DAZ-SC复合纳米粒,考察药物复合纳米粒的固态性质;同时,为了研究在“bottom-up”工艺中DAZ-SC复合纳米粒的形成机制,本研究从分子水平分析DAZ与SC之间的相互作用,探讨SC对药物结晶过程的影响,以期为难溶性药物纳米粒的制备提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有G400型聚焦光束反射测量仪[简称“FBRM”,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司],FP-8300型荧光光谱仪(日本分光株式会社),MOS-500型多功能圆二色光谱仪(法国Bio-Logic公司),Agilent Cary 630型傅里叶变换红外吸收光谱仪(简称“FTIR”)、1260 Infinity II型高效液相色谱仪[安捷伦科技(中国)有限公司],Ultima IV型X射线粉末衍射仪(简称“XRPD”,日本理学电机株式会社),JEM-1400型生物透射电子显微镜(简称“TEM”,日本电子株式会社),JSM-6360型扫描电子显微镜(简称“SEM”,日本HITACHI公司),NICOMP 380 Z3000型动态光散射纳米粒度分析仪(美国PSS粒度仪公司),MS 2000型激光粒度测定仪(英国马尔文仪器有限公司),RCZ-8M型溶出度仪(天津市天大天发科技有限公司),FDU-2110型冷冻干燥机(东京理化器械株式会社)等。

1.2 主要药品与试剂

SC(批号P1076952,试剂级)、DAZ原料药(批号P154975,纯度>99%)、无水乙醇(批号P1950536,分析纯)均购自上海泰坦科技股份有限公司;十二烷基硫酸钠(批号20121018)、磷酸二氢钾(批号20201110)、溴化钾(批号20170828)均购自国药集团化学试剂有限公司;氢氧化钠(批号U5510030)购自上海安谱实验科技股份有限公司;乙腈和甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 DAZ-SC复合纳米粒制备处方工艺的单因素考察

本课题组在预实验中筛选了对DAZ-SC复合纳米粒形成影响较大的因素,分别为DAZ与SC的质量比、有机相与水相的体积比以及反应体系pH值。本研究以DAZ-SC复合纳米粒粒径为筛选指标,对这些因素进行单因素考察。

2.1.1 DAZ与SC的质量比 在反应温度为25℃、搅拌速度为800 r/min、反应体系pH值为7.0、有机相与水相

体积比为1:30的条件下,将1 mL DAZ乙醇溶液(20 mg/mL)分别注入到0.33、0.67、2.00、4.67、9.33、14.00 mg/mL的SC水溶液中,搅拌30 min后测定复合纳米粒粒径。图1展示了DAZ与SC的质量比分别为1:0.5、1:1、1:3、1:7、1:14和1:21时形成的复合纳米粒粒径。可以看出,随着SC质量的增加,复合纳米粒粒径逐渐减小,说明稳定剂SC可有效控制DAZ粒径;当SC质量达到DAZ的3倍时,可形成200 nm左右的复合纳米粒;SC质量继续增加,复合纳米粒的粒径不再显著变动,故确定DAZ与SC的质量比为1:3。

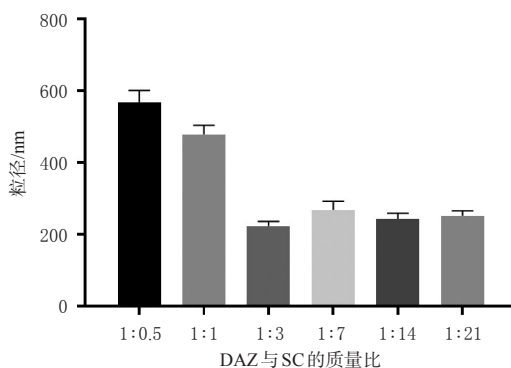


图1 DAZ与SC不同质量比条件下形成的纳米粒粒径

2.1.2 有机相与水相的体积比 在反应温度为25℃、搅拌速度为800 r/min、反应体系pH值为7.0、DAZ与SC质量比为1:3的条件下,按有机相与水相体积比1:10、1:20、1:30和1:40将1 mL DAZ乙醇溶液(20 mg/mL)注入到SC水溶液中,制备得到复合纳米粒后测定粒径,结果分别为(567.2 ± 8.9)、(307.3 ± 10.6)、(223.7 ± 12.5)和(234.3 ± 16.7) nm。这表明,当有机相与水相体积比为1:30时,复合纳米粒的粒径最小,故确定有机相与水相的体积比为1:30。

2.1.3 反应体系pH值 通过在复合纳米粒制备过程中添加酸或碱来调节反应体系的pH值。经实验发现,当pH值<6.5时,会产生沉淀,推测该现象与酪蛋白析出有关;而当pH过高时会影响药物的稳定性,故将反应体系的pH值控制在7.0左右。

综合以上单因素考察结果,确定DAZ-SC复合纳米粒的处方工艺为:DAZ乙醇溶液质量浓度20 mg/mL,DAZ与SC的质量比1:3,有机相与水相的体积比1:30,反应温度25℃,反应体系pH值7.0,搅拌速度800 r/min。

2.2 DAZ-SC复合纳米粒的制备

采用反溶剂沉淀法制备DAZ-SC复合纳米粒。以无水乙醇制成20 mg/mL的DAZ乙醇溶液作为有机相,以去离子水制成2 mg/mL的SC水溶液为水相。在机械搅拌状态下,将1 mL有机相以12 mL/min的速度注入至30 mL水相中,以800 r/min的速度持续搅拌30 min,得到DAZ的纳米混悬液,于-80℃预冻4 h后,在真空条件下干燥24 h,即得DAZ-SC复合纳米粒。冷冻干燥后

的样品用于理化性质表征。

2.3 DAZ分析方法的建立

2.3.1 色谱条件 色谱柱为Diamonsil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-甲醇-水(30:40:30, V/V/V), 流速为1 mL/min, 检测波长为270 nm, 进样量为20 μL, 柱温为25 ℃。

2.3.2 溶液制备 精密称量14.8 mg DAZ原料药, 用流动相溶解并稀释成148 μg/mL的DAZ储备液, 再取DAZ储备液适量并用流动相稀释至30 μg/mL, 作为对照品溶液。取“2.2”项下制备的DAZ-SC复合纳米粒适量, 置于25 mL量瓶中, 加入流动相, 超声(频率40 kHz, 功率500 W, 下同)溶解并定容, 用0.45 μm滤膜过滤, 得供试品溶液。取适量SC, 按供试品溶液的配制方法制备得到阴性对照溶液。

2.3.3 方法学考察 (1) 专属性考察: 分别取“2.3.2”项下供试品溶液、阴性对照溶液和对照品溶液适量, 按“2.3.1”项下色谱条件进样检测。结果显示, DAZ对照品溶液与供试品溶液在相同的保留时间存在相同的色谱峰, 且SC对纳米粒中DAZ的检测无干扰(图略)。(2) 线性关系考察: 精密量取“2.3.2”项下DAZ储备液适量, 用流动相分别稀释成质量浓度为0.59、1.56、5.92、11.80、29.60、59.20 μg/mL的对照品溶液, 按“2.3.1”项下色谱条件进样检测。对DAZ的峰面积(A)和质量浓度(C)进行线性回归, 得线性回归方程为 $A=26.808C-13.451$ ($r=0.9999$)。该结果说明, DAZ的质量浓度在0.59~59.20 μg/mL范围内与峰面积的线性关系良好。(3) 精密度试验: 取“2.3.2”项下对照品溶液, 按“2.3.1”项下色谱条件连续进样6次, 得DAZ峰面积的RSD为0.27% ($n=6$), 说明仪器精密度良好。(4) 重复性试验: 按“2.3.2”项下方法平行制备6份供试品溶液, 按“2.3.1”项下色谱条件进样检测, 得DAZ含量的RSD为0.18% ($n=6$), 说明方法重复性良好。(5) 稳定性试验: 按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液, 分别于室温下放置0、2、4、8、12、24 h时按“2.3.1”项下色谱条件进样检测, 得DAZ峰面积的RSD为0.87% ($n=6$), 说明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。(6) 加样回收率试验: 精密称量9份SC, 分别按照处方原料量的120%、100%和80%加入DAZ对照品溶液, 混合, 按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液, 各浓度平行制备3份, 按“2.3.1”项下色谱条件进样检测, 计算样品中DAZ的加样回收率。结果显示, 平均加样回收率分别为100.10%、100.40%、99.94%, RSD分别为0.28%、0.66%、0.33% ($n=3$), 说明方法准确度良好。

2.4 DAZ-SC复合纳米粒的表征

2.4.1 粒径、Zeta电位的考察 取适量DAZ-SC复合纳米粒, 以水稀释后使用动态光散射纳米粒度分析仪测定其粒径与Zeta电位, 测定3批样品取平均值。结果显示, DAZ-SC复合纳米粒的粒径为 (223.7 ± 12.5) nm, 多分散

性指数为 0.274 ± 0.012 , Zeta电位为 $-(17.81 \pm 1.63)$ mV ($n=3$)。粒径分布结果见图2。

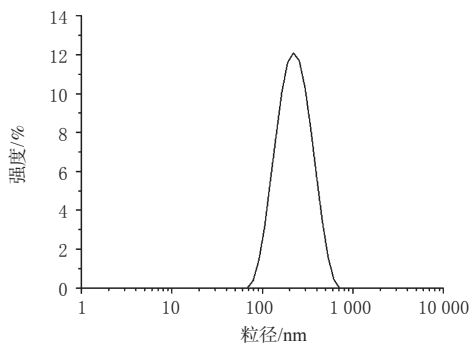


图2 DAZ-SC复合纳米粒的粒径分布

2.4.2 纳米混悬液稳定性的考察 取DAZ-SC复合纳米粒适量, 分散于去离子水中形成纳米混悬液, 保存在 (25.0 ± 0.5) ℃条件下, 于不同时间点测定其粒径与Zeta电位。结果显示, 14 d内纳米混悬液外观不变, 粒径与Zeta电位也基本无变化(图3), 证明DAZ-SC纳米混悬液的稳定性良好。

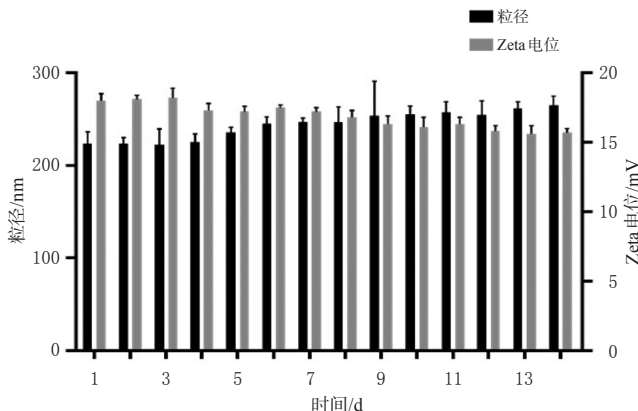


图3 DAZ-SC纳米混悬液的稳定性情况

2.4.3 溶解度的测定 分别取适量的DAZ原料药和DAZ-SC复合纳米粒样品粉末, 投入2 mL水中, 封装于截留分子量14 000 Da的透析袋内, 将透析袋置于200 mL水中, 于25 ℃恒温摇床中振摇72 h后, 取样经0.45 μm滤膜过滤, 按“2.3.1”项下色谱条件进样测定续滤液中DAZ的含量并计算溶解度。结果, DAZ原料药在水中的溶解度为 (2.80 ± 0.02) μg/mL, 而DAZ-SC复合纳米粒在水中的溶解度为 (126.94 ± 0.19) μg/mL, 比原料药提高了约45倍, 说明SC的存在较大地提升了DAZ的溶解度。

2.4.4 微观形态的考察 使用TEM观察DAZ-SC复合纳米粒在冻干前的微观形态: 将样品滴加于铜网上, 自然晾干后置于显微镜内观察。使用SEM观察DAZ-SC复合纳米粒冻干后的尺寸和外观形态: 用双面铜导电胶将样品黏于铝块上, 喷涂金层后选择合适的放大倍数观察。TEM观察发现, DAZ-SC复合纳米粒冻干前为双层的球状结构。SEM观察发现, DAZ-SC复合纳米粒冻干

后为粒径较小的近球形结构。结果见图4、图5。

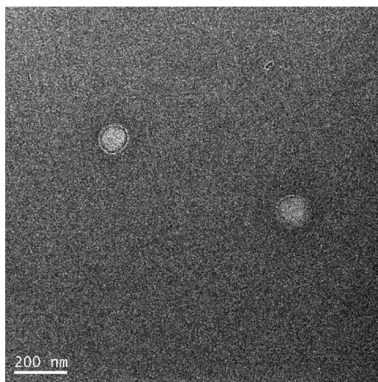


图4 DAZ-SC复合纳米粒冻干前的TEM图

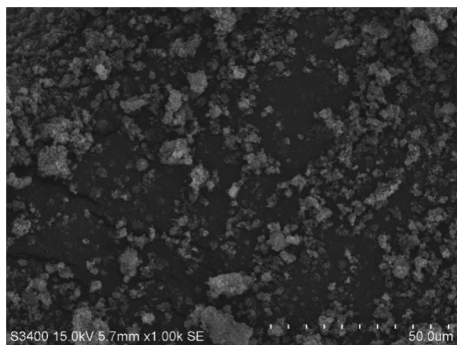


图5 DAZ-SC复合纳米粒冻干后的SEM图

2.4.5 晶型的考察 分别取适量SC、DAZ原料药和DAZ-SC复合纳米粒样品粉末进行XRPD测试,实验采用Cu-K α 射线,扫描速度为20°/min,步宽为0.02°,扫描范围为5°~45°。图6为各样品的XRPD对比图谱。由图6可知,SC为无定形态,DAZ原料药和DAZ-SC复合纳米粒在13.62°、15.66°、16.98°、18.82°(2 θ)处均有明显的特征衍射峰。这表明SC未改变DAZ的晶型,只是影响了晶体的大小和形态。

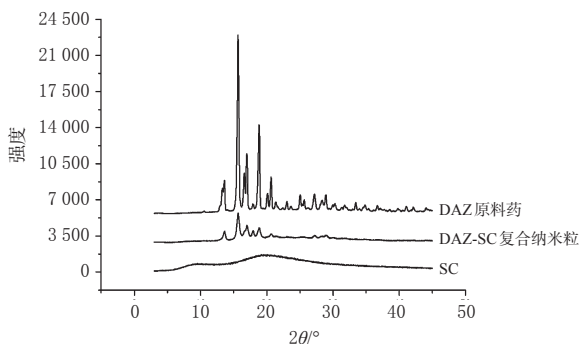


图6 SC、DAZ原料药、DAZ-SC复合纳米粒的XRPD对比图谱

2.4.6 包封率与载药量的测定 精密称取质量为 W_1 的DAZ-SC复合纳米粒,将其分散于10 mL去离子水中形成纳米混悬液。精密量取该纳米混悬液2 mL置于超滤离心管(100 kDa)中,在4 °C、4 000 r/min条件下离心20 min,取外管内离心液1 mL,用流动相稀释至2 mL,按

“2.3.1”项下色谱条件进样检测,计算复合纳米粒中游离药物的质量,记作 W_2 。另取该纳米混悬液2 mL,加流动相稀释并定容至10 mL,超声2 min后,经0.45 μ m滤膜过滤,取续滤液按上述色谱条件进样检测,计算复合纳米粒中药物的总量,记作 W_3 。实验平行进行3次。按公式计算DAZ-SC复合纳米粒的包封率与载药量:包封率(%)=($W_3 - W_2$)/ $W_3 \times 100\%$;载药量(%)=($W_3 - W_2$)/ $W_1 \times 100\%$ 。结果显示,DAZ-SC复合纳米粒包封率为(98.78 \pm 0.31)%,载药量为(24.70 \pm 0.19)%。

2.4.7 体外溶出度的考察 对DAZ原料药和DAZ-SC复合纳米粒进行溶出度测定。将精确称量的样品分散在2 mL去离子水中,封装于截留分子量14 000 Da的透析袋内,将透析袋浸没于装有200 mL溶出介质的密封容器内,溶出介质为含有0.1%十二烷基硫酸钠的磷酸盐缓冲液(pH6.8)。透析装置被置于(37 \pm 0.5) °C的恒温振荡箱中,转速为100 r/min。分别于5、10、15、30、45、60 min时提取2 mL溶出液作为样品溶液,并补充等量的新鲜溶出介质。样品溶液经0.45 μ m滤膜过滤后,按“2.3.1”项下色谱条件进样检测,计算累积溶出率。图7展示了DAZ原料药和DAZ-SC复合纳米粒的累积溶出率结果。DAZ原料药在60 min时的累积溶出率为17.85%,而DAZ-SC复合纳米粒在60 min内的累积溶出率超过90%。这说明在SC的作用下,DAZ的溶出性能显著改善。

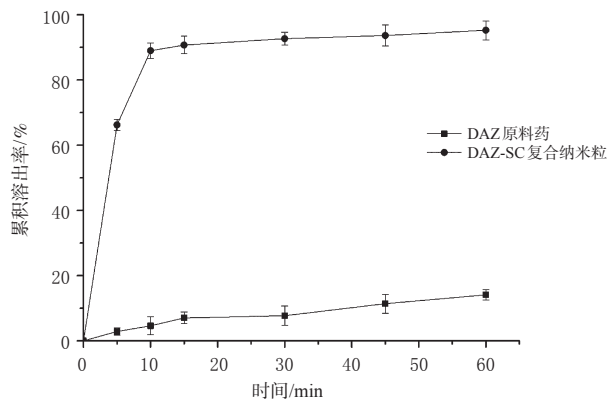


图7 DAZ原料药和DAZ-SC复合纳米粒的累积溶出曲线

2.5 DAZ与SC的相互作用机制研究

2.5.1 荧光光谱分析 在不同温度下(291、298、303 K, T/K= $t/^\circ\text{C}+273$)将1 mL SC水溶液(1 mg/mL)分别与不同质量浓度的10 mL DAZ乙醇溶液(DAZ质量浓度分别为0、10、20、30、40、50、60、70、80 μ g/mL)混合。荧光光谱仪的激发波长设定为295 nm,测定并绘制在300~400 nm波长范围内的荧光发射光谱,298 K时的结果见图8A,图中a~i分别代表DAZ质量浓度为0~80 μ g/mL时SC的荧光光谱。图8A显示,SC的荧光强度随着DAZ质量浓度的增加而减弱,最大发射波长处的荧光强度从原本的493.70减小至33.49。这说明药物的加入使

SC发生了荧光淬灭,表明DAZ与SC之间具有相互作用。此外,随着DAZ质量浓度增加,SC的最大发射波长逐步红移,提示DAZ可能还影响到SC的氨基酸残基微环境。

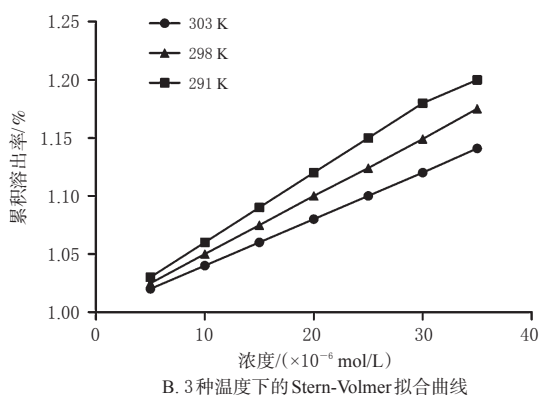
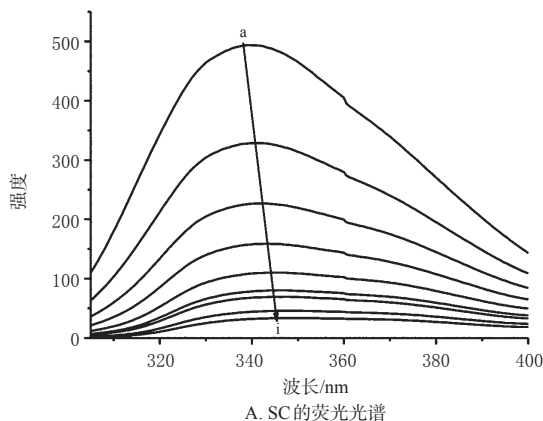


图8 DAZ对SC荧光光谱的影响

DAZ对SC的淬灭机制可通过Stern-Volmer方程进行分析^[14]: $\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv}[Q] = 1 + k_q\tau_0$ 。式中, F 和 F_0 是有无淬灭剂时SC的荧光强度, $[Q]$ 是淬灭剂浓度, K_{sv} 是Stern-Volmer淬灭常数, k_q 是淬灭过程的速率常数, $\tau_0 = 10^{-8}$ s(生物大分子的平均寿命)。 K_{sv} 和 k_q 可由方程线性拟合得到,3个温度下的拟合曲线见图8B, K_{sv} 与 k_q 的值见表1。由上述图表可知,在各个温度下曲线的线性关系良好($r > 0.999$), k_q 均大于 2.0×10^{10} L/(mol·s)(最大扩散碰撞速率常数)^[15],且其值随着温度升高而减小,证明SC的淬灭机制为静态淬灭,即SC与DAZ形成了基态复合物^[16]。

表1 SC在3种温度下的Stern-Volmer方程和淬灭常数

温度/K	Stern-Volmer方程			k_q /[L/(mol·s)]	K_{sv} /(L/mol)
	斜率	截距	r		
291	0.059	1.019 0	0.999 8	1.1×10^{11}	5.9×10^4
298	0.054	0.703 9	0.999 4	9.0×10^{10}	5.5×10^4
303	0.053	0.705 9	0.999 7	8.8×10^{10}	5.3×10^4

按以下公式计算SC形成复合物时的结合位点与结合常数^[17]: $\lg \frac{F_1 - F_2}{F_2} = \lg K_b + n \lg [C]$ 。式中, F_2 和 F_1 是DAZ存在与否时SC的荧光强度, K_b 为蛋白的结合常数, n 是

结合位点数, $[C]$ 为DAZ质量浓度。由方程线性拟合得到 K_b 和 n 的值列于表2。DAZ与SC的 K_b 均大于 1×10^6 L/mol,这意味着它们之间存在较为强烈的相互作用。此外, K_b 和 n 值随温度升高而减小,这佐证了DAZ对SC为静态淬灭^[17]。

表2 DAZ与SC的结合位点和结合常数

温度/K	双对数方程			K_b /(L/mol)
	$\lg K_b$	n	r	
291	7.372 0	1.55	0.995 9	5.78×10^6
298	6.711 2	1.44	0.997 3	5.17×10^6
303	5.782 1	1.42	0.998 5	5.03×10^6

DAZ与SC之间的作用力类型可通过相互作用的热力学参数来判断,按下列公式可得到焓变(ΔH)、熵变(ΔS)和吉布斯自由能变(ΔG)值: $\ln K_c = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R}$, $\Delta G = -RT \ln K_c$ 。式中, K_c 为 T 时的结合常数, $R = 8.314$ J/(mol·K)。结果显示, $\Delta G < 0$,说明DAZ对SC的淬灭可自发进行; ΔH 值为负,表明反应过程放热; $\Delta S < 0$,说明反应后体系的混乱度减小^[18]。结果见表3。

表3 DAZ与SC相互作用的热力学参数

温度/K	ΔH /(kJ/mol)	ΔS /[J/(mol·K)]	ΔG /(kJ/mol)
291			-42.61
298	-117.10	-255.98	-40.56
303			-39.54

2.5.2 圆二色光谱分析 将1 mL SC水溶液(1 mg/mL)和20 mL DAZ乙醇溶液(50 μ g/mL)混合,测定此混合溶液及SC水溶液(1 mg/mL)的圆二色光谱。测定波长范围为190~260 nm,步长为0.1 nm,带宽为2 nm,扫描速度为100 nm/min。以无水乙醇作为参比,取3次扫描平均数值,结果见图9。相比于SC,DAZ-SC复合纳米粒在208 nm处的特征峰值减小,说明 α -螺旋的含量降低^[19],表明DAZ对SC的二级结构存在影响。采用CONTIN方程和CDNN软件并结合圆二色光谱数据,可计算得到样品中不同二级构象的含量,结果见表4。由表4可知,DAZ-SC复合纳米粒中 α -螺旋和无规卷曲含量降低, β -折叠含量上升。

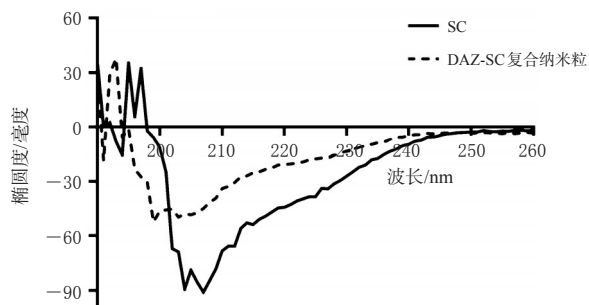


图9 SC和DAZ-SC复合纳米粒的圆二色光谱图

表4 SC与DAZ-SC复合纳米粒的圆二色光谱解析

样品	α -螺旋含量/%	β -折叠含量/%	β -转角含量/%	无规卷曲含量/%
SC	18.36	32.32	16.41	32.91
DAZ-SC复合纳米粒	14.79	40.54	16.19	28.48

2.5.3 同步荧光光谱分析 将1 mL SC水溶液(1 mg/mL)与10 mL DAZ 乙醇溶液(DAZ 质量浓度分别为0、10、20、30、40、50、60 $\mu\text{g/mL}$)混合,使用荧光光谱仪检测DAZ对SC构象的影响,仪器的扫描范围为260~400 nm。将激发波长与发射波长差值($\Delta\lambda=\lambda_{\text{em}}-\lambda_{\text{ex}}$)依次设置为60 nm和15 nm时,可分别得到SC色氨酸残基(tryptophan, Trp)和酪氨酸残基(tyrosine, Tyr)的特征光谱^[20-21],结果见图10,图中曲线a→g分别为DAZ质量浓度0~60 $\mu\text{g/mL}$ 时SC的同步荧光光谱。由图10可知,SC与DAZ相互作用后,Tyr的最大发射波长变化不大,而Trp在340 nm处的最大发射波长发生了红移。

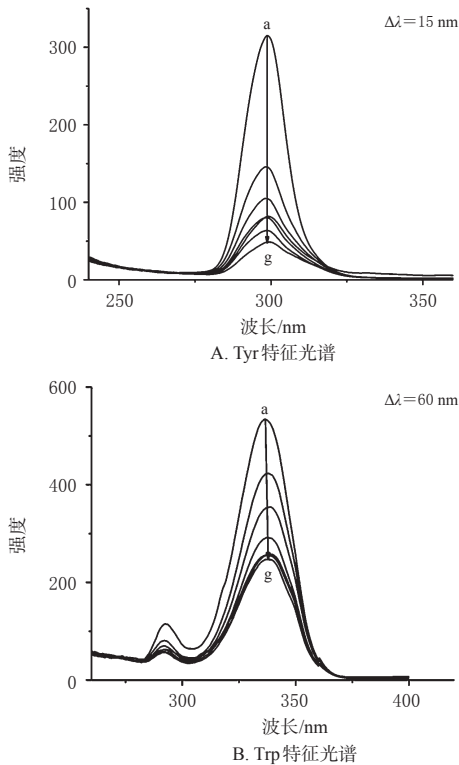


图10 SC的同步荧光光谱

2.5.4 红外光谱分析 采用溴化钾压片法^[22]对DAZ原料药和DAZ-SC复合纳米粒进行FTIR测定,扫描范围为4 000~500 cm^{-1} ,红外光谱如图11所示。在SC的影响下,3 512.71 cm^{-1} 和2 940.11 cm^{-1} 处DAZ羟基和亚甲基的伸缩振动特征峰分别蓝移至3 500.92 cm^{-1} 和2 932.27 cm^{-1} ,药物分子结构2,3号位五元环上的C=N双键伸缩振动峰从1 631.06 cm^{-1} 蓝移至1 623.22 cm^{-1} 。该结果表明,电负性强的N、O原子解离后与SC形成了氢键。

2.5.5 FBRM在线粒子监测 分别将1 mL DAZ乙醇溶液(20 mg/mL)注入20 mL SC水溶液(0.1 mg/mL)和20 mL去离子水中,使用FBRM在线监测DAZ在有无SC时的结晶过程,反应温度为25 $^{\circ}\text{C}$,搅拌转速为800 r/min。实验结果见图12,图中a、b、c、d分别代表弦长小于10 μm 、10~50 μm 、50~150 μm 之间和大于150 μm 的粒

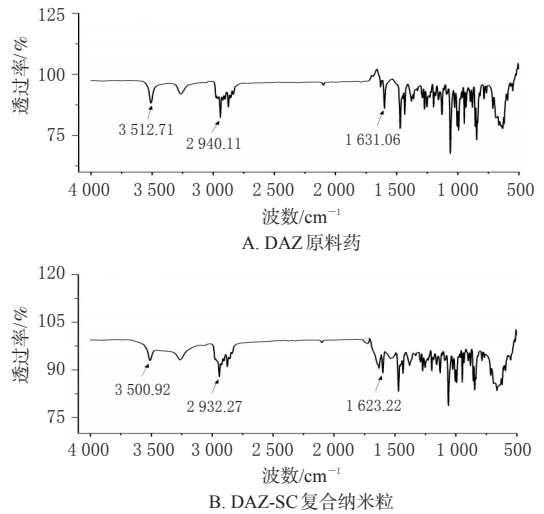


图11 DAZ原料药和DAZ-SC复合纳米粒的红外光谱图

子。图12A为无SC时DAZ在水中经历的典型反溶剂结晶过程:在反溶剂中药物立即爆发性成核,随后结晶逐渐增长,粒子的弦长大部分稳定在小于10 μm 和10~50 μm 之间,也存在部分弦长50~150 μm 的粒子。从图12B可以看出,当SC存在时,药物也发生了快速成核,但随后粒子数略有降低,10 min时的结晶过程基本稳定,溶液中的粒子数不再变化,且几乎不存在50 μm 以上的粒子。

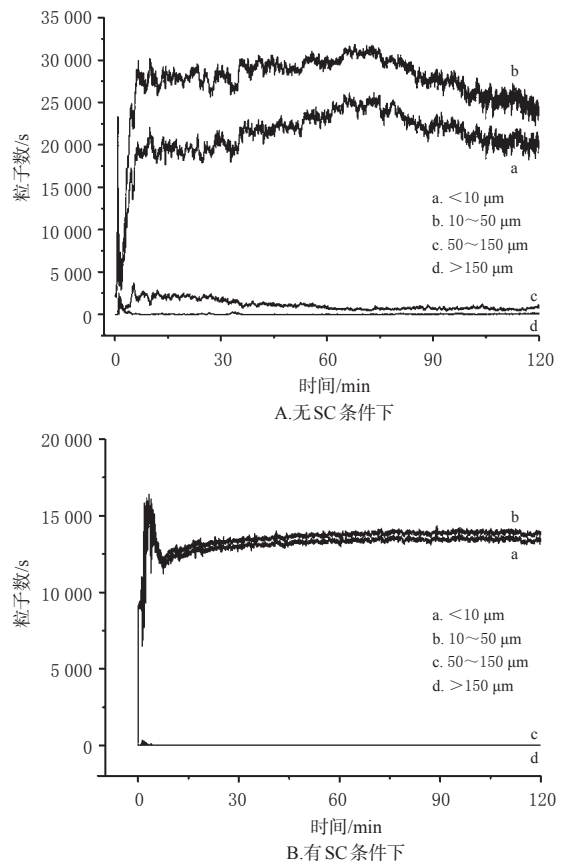


图12 有无SC条件下DAZ的FBRM在线粒子监测图谱

3 讨论

为改善难溶性药物的溶出度,使用“bottom-up”工艺来减小药物粒径是一种常用且有效的方法,而且操作过程往往简单经济、能耗低^[23]。在该工艺中加入稳定剂有助于获得大小可控的药物颗粒。SC成本低,具有丰富的氢键供体和受体,在药物结晶过程中有很多机会与药物发生相互作用,是一种应用潜力巨大的稳定剂^[24]。DAZ用途广泛,却受制于低水溶性所引起的各种副作用,故解决问题的关键在于提高溶解度。因此,本研究将DAZ作为减小粒径的药物模型,研究“bottom-up”工艺中SC作为稳定剂时DAZ-SC复合纳米粒的形成机制。

本研究通过反溶剂沉淀法制备了DAZ-SC复合纳米粒,粒径为 (223.7 ± 12.5) nm, Zeta电位为 $-(17.81 \pm 1.63)$ mV,粒径分布均匀,稳定性良好。在SC的作用下,复合纳米粒的粒径减小,在水中的溶解度大幅提高,溶出情况显著改善。这与一项研究报道的球状蛋白 β -乳球蛋白包覆在紫杉醇表面抑制药物粒子生长与聚集的情况类似^[25]。DAZ-SC复合纳米粒的微观形态为双层的球状结构,由此推测SC覆盖在DAZ表面,起到抑制晶体生长的作用。

本研究进一步分析了DAZ与SC的相互作用。通过荧光光谱检测结果可知,DAZ与SC之间存在强烈的相互作用,两者形成了基态复合物,根据Ross等^[18]总结的热力学参数与相互作用力类型的对应关系,推断SC与DAZ之间的主要作用为氢键和范德华力。结合圆二色光谱结果, α -螺旋结构含量降低可归因于DAZ与SC分子间的氢键,SC分子内氢键比例降低,多肽链构象趋于去折叠化,此外范德华力的作用也会影响氨基酸的微环境,使SC的二级结构发生改变。鉴于氨基酸残基的最大发射波长对环境变化极其敏感,可通过该波长的变化分析蛋白质的构象变化^[21]。同步荧光光谱结果显示,Trp的最大发射波长发生了红移,表明Trp附近的极性增强、疏水性减小,多肽链趋于舒展,证明SC的构象在DAZ的作用下发生了变化,且作用位点更接近SC的Trp。红外光谱结果则进一步证明,SC与DAZ分子结构上3号位N和17号位O形成了分子间氢键。FBRM在线粒子监测结果表明,SC可影响小分子药物的结晶过程,抑制成核后晶体的生长和团聚,从而产生超细粒子结晶。在分子层面考察DAZ与SC的相互作用,可为DAZ-SC复合纳米粒的形成机制阐明和固态性质的改善提供理论依据。

综上所述,本研究成功制备了DAZ-SC复合纳米粒,并探索了该纳米粒的形成机制,有利于推动“bottom-up”工艺中稳定剂的选择,为难溶性药物纳米粒的制备提供参考。

参考文献

[1] GIGLIOBIANCO M R, CASADIDIO C, CENSI R, et al.

Nanocrystals of poorly soluble drugs: drug bioavailability and physicochemical stability[J]. *Pharmaceutics*, 2018, 10(3):134.

[2] KUMAR R. Nanotechnology based approaches to enhance aqueous solubility and bioavailability of griseofulvin: a literature survey[J]. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2019, 53: 101221.

[3] 卢懿,黄味子,戚建平,等.杂化纳米结晶及其体内命运研究进展[J].*药学进展*, 2020, 44(5):342-350.

[4] LI M, AZAD M, DAVÉ R, et al. Nanomilling of drugs for bioavailability enhancement: a holistic formulation-process perspective[J]. *Pharmaceutics*, 2016, 8(2):17.

[5] AHMADI TEHRANI A, OMRANPOOR M M, VATANARA A, et al. Formation of nanosuspensions in bottom-up approach: theories and optimization[J]. *Daru*, 2019, 27(1):451-473.

[6] LABIB G. Overview on zein protein: a promising pharmaceutical excipient in drug delivery systems and tissue engineering[J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2018, 15(1):65-75.

[7] PAS T, BERGONZI A, LESCRINIER E, et al. Drug-carrier binding and enzymatic carrier digestion in amorphous solid dispersions containing proteins as carrier[J]. *Int J Pharm*, 2019, 563:358-372.

[8] PEÑALVA R, ESPARZA I, MORALES-GRACIA J, et al. Casein nanoparticles in combination with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin improves the oral bioavailability of quercetin[J]. *Int J Pharm*, 2019, 570:118652.

[9] MISHRA J, BOHR A, RADES T, et al. Whey proteins as stabilizers in amorphous solid dispersions[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2019, 128:144-151.

[10] SHINDE P, AGRAVAL H, SINGH A, et al. Synthesis of luteolin loaded zein nanoparticles for targeted cancer therapy improving bioavailability and efficacy[J]. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2019, 52:369-378.

[11] AL-SAMKARI H, KUTER D J. Immune thrombocytopenia in adults: modern approaches to diagnosis and treatment[J]. *Semin Thromb Hemost*, 2020, 46(3):275-288.

[12] 张永秀.子宫内异位症腹腔镜术后联合应用亮丙瑞林、达那唑对比性分析[J/OL].*实用妇科内分泌杂志(电子版)*, 2018, 5(35):9-10[2021-11-30]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/detail.aspx?dbcode=CJFD&dbname=CJFD-LAST2019&filename=Fkdz201835005&uniplatform=NZKPT&v=SryWN8RM7LelmPCqG5ZiSsJzKIC9v9Ej9-WqjHzY0ekXhIuvoulPHimtiOD2vGcCo>. DOI: 10.16484/j.cnki.issn2095-8803.2018.35.005.

[13] LIVERSIDGE G G, CUNDY K C. Particle size reduction for improvement of oral bioavailability of hydrophobic drugs: I: absolute oral bioavailability of nanocrystalline danazol in beagle dogs[J]. *Int J Pharm*, 1995, 125(1):91-97.

(下转第1239页)