

· 论 著 ·

姜黄素纳米混悬液的制备及体内药动学

彭一凡¹, 王荣荣^{1,2}, 庄笑梅¹, 张文鹏¹, 邓耀辰³, 高 静¹, 张 慧¹, 郑爱萍¹

(1. 军事科学院军事医学研究院毒物药物研究所, 北京 100850; 2. 华北理工大学药学院, 河北 唐山 063210; 3. 广东医科大学药学院, 广东 东莞 523822)

摘要:目的 优化处方工艺, 制备稳定的姜黄素纳米晶混悬液, 以提高溶出和生物利用度。方法 通过 Box-Behnken 设计优化姜黄素纳米晶混悬液的处方工艺, 并监测粒度和电位的稳定性, 通过差示扫描量热分析(DSC)和 X 射线粉末衍射分析(XRPD)考察研磨前后晶型变化, 并通过体外溶出和大鼠体内药动学评价该制剂的体内外释放特征。结果 最佳处方工艺确定为姜黄素质量百分比为 30%, 研磨转速 $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 辅料与原料药质量比为 1:10, 制得的姜黄素纳米晶粒度和 Zeta 电位均维持稳定, 且研磨前后晶型无显著变化。与原料药混悬液相比, 将姜黄素制成粒径为 200 nm 的纳米晶能显著提高溶出速率和溶出度, 其大鼠体内峰浓度(C_{max})和血浆药物浓度曲线下面积(AUC_{0-1})均显著提高($P < 0.01$), 相对生物利用度可达 461%。且研磨前后姜黄素晶型无显著变化。结论 确定了姜黄素纳米晶混悬液的最优处方工艺, 所制备的姜黄素纳米晶性质稳定, 显著提高其体外溶出度和体内生物利用度。

关键词: 姜黄素; 纳米晶; Box-Behnken 设计; 生物利用度

中图分类号: R94; R969.1

文献标志码: A

文章编号: 1000-3002-(2022)01-0054-08

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2022.01.008

热射病是一种严重的中暑, 主要临床表现为核心体温 $> 40^\circ\text{C}$, 皮肤干热, 中枢神经系统异常, 严重时可出现多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)^[1]。热射病发病急骤, 临床表现凶险, 病死率和病残率极高, 目前国内外均无用于该病治疗的特效药上市。

姜黄素(curcumin)是一种从姜黄中提取的酸性酚类化合物, 在抗炎、抗氧化、抗感染、抗肿瘤和降血脂等方面有很好的疗效, 且尚未发现明显的不良反应, 具有广阔的开发前景^[2-7]。研究表明, 姜黄素对热射病引起的肺损伤^[8,12]、心肌损伤^[9,18]、肝损伤^[11]、肾损伤^[15]、脑损伤^[13]和肠黏膜病理损伤^[10,17]均有良好的改善作用, 并能维持血液指标稳定^[14], 纠正电解质紊乱^[16], 是防治热射病的良好药物。然而, 姜黄素属于生物药剂学分类系统 4 类药物(水中溶解度仅为 $11 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[19]), 其难溶性严重制约了其临床应用。

纳米晶制剂具有可提高药物饱和溶解度和溶

出速率、降低食物效应、药物剂量调整范围宽、不良反应轻、易于工业化生产和剂型多样化等优势^[20-28]。为解决溶解度低的问题, 本研究采用目前上市纳米晶药物最常用的介质研磨技术, 选用硬度高、杂质残留少、符合美国 FDA 认证的氧化锆珠进行介质研磨^[29], 制备稳定的姜黄素纳米晶混悬液, 以提高姜黄素的溶解度和溶出速率, 进而提高生物利用度, 为其临床应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 药品、试剂和主要仪器

姜黄素(批号: 20201027), 陕西亿康龙生物技术有限公司。吐温 80(批号: 20180801), 江西益生药业有限公司; 十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS, 批号: WXBC1167V), 上海麦克林生化科技有限公司; 冰醋酸(批号: 20190325), 国药集团化学试剂有限公司。激光粒度仪(Nano-ZS90), 英国 Malvern 公司; 研磨机(DYNO[®]-MILL ECM-AP05), 华尔宝机械有限公司; 溶出试验仪(RC806D), 天津市天大天发科技有限公司; 磁力搅拌器(HJ-3), 常州金坛晨阳电子仪器厂; 冷冻干燥机(LGJ-18C), 北京四环科学仪器厂; 真空干燥箱

基金项目: 国家自然科学基金(81573357); 国家自然科学基金(82073793)

作者简介: 彭一凡, 硕士研究生, 主要从事纳米技术药物研究, E-mail: 941389252@qq.com

通讯作者: 郑爱萍, E-mail: apzheng@163.com; 张 慧, E-mail: zhhui58@126.com

(DZF-6050), 上海一恒科学仪器有限公司; 高效液相色谱仪 (UltiMate 3000), 美国 Thermo 公司; X 射线衍射仪 (D8 advance), 德国布鲁克公司; 差示扫描量热仪 (DSC 200F3), 德国 NETZSCH 公司; 场发射扫描电子显微镜 (JSM-7900F) 和透射电子显微镜 (JEM-1400Plus), 日本电子株式会社; 电子分析天平 (BT-25S), 德国 Sartorius 公司。

1.2 动物

12 只 SD 大鼠, 雄性, 体重 200 ~ 230 g, 购自北京科宇动物养殖中心, 许可证号: SCXK(京)2018-0010。大鼠置于温控 22~25℃、相对湿度 40%~50%、12/12 h 昼夜明暗交替环境中饲养 7 d, 自由饮水摄食。本研究涉及的动物实验经军事医学研究院实验动物伦理委员会批准, 审查编号 IACUC-DWZX-2020-639。

1.3 姜黄素纳米晶混悬液制备工艺

采用介质研磨法制备姜黄素纳米晶混悬液。称取处方量的吐温 80 加蒸馏水溶解, 获得稳定剂溶液, 将适量姜黄素原料药均匀分散于稳定剂溶液中, 然后将混悬液转移到研磨机中 (填充 60% 0.3 mm 氧化锆珠), 开启研磨机将转速升至 3000 r·min⁻¹, 研磨得到目标粒径的纳米混悬液。

1.4 Box-Behnken 实验优化姜黄素纳米晶处方工艺

预实验研究发现, 研磨转速、姜黄素用量和稳

定剂与药物的比例是影响纳米晶粒径的关键参数。本研究采用 Box-Behnken 设计系统研究 3 种关键参数对纳米晶粒径的影响, 根据预实验对 3 个关键参数范围的筛选, 确定稳定剂与原料药质量比 (A) 为 1:10 ~ 1:2, 姜黄素质量百分比 (B) 为 10% ~ 30%, 转速 (C) 为 1500 ~ 3000 r·min⁻¹。使用软件 Design-Expert 8.0.6 进行实验设计, 共进行 17 次实验, 每次研磨 30 min, 设计方案见表 1。对实验结果进行统计分析, 预测最优处方工艺。

1.5 姜黄素纳米晶混悬液粒度和 Zeta 电位测定

纳米晶混悬液在不同温度下储存, 监测放置期间的稳定性。定期取适量姜黄素纳米晶混悬剂, 蒸馏水稀释至 40 mg·L⁻¹, 采用 Nano-ZS90 粒度分析仪测定姜黄素纳米晶的粒度、多分散系数和 Zeta 电位, 测定温度 25℃, 平衡时间 60 s, 每个样品测量 3 次。

1.6 姜黄素纳米晶形态观察

分别采用扫描电镜 (scanning electron microscope, SEM) 和透射电镜 (transmission electron microscope, TEM) 观察姜黄素纳米晶混悬液的形态及分布特征。取 1 滴稀释后的纳米晶混悬液滴于 SEM 样品台上, 自然晾干后喷金进行 SEM 观察; 取 1 滴稀释后的纳米晶混悬液滴于载样铜网上, 室温置 5 min 后用滤纸吸干, 加 3% 磷钨酸负染 5 min, 自然晾干后在加速电压 100 kV 下进行 TEM 观察。

Tab.1 Design and result data on Box-Behnken test for optimizing formation process of curcumin nanocrystal-line suspensions

| No | Stabilizer: API (m:m) | Curcumin mass percentage | Grinding speed/r·min ⁻¹ | Grinding time/min | Size (Y)/nm |
|----|-----------------------|--------------------------|------------------------------------|-------------------|-------------|
| 1 | 1:10 | 10 | 2250 | 30 | 243.1 |
| 2 | 1:2 | 10 | 2250 | 30 | 245.1 |
| 3 | 1:10 | 30 | 2250 | 30 | 244.9 |
| 4 | 1:2 | 30 | 2250 | 30 | 258.6 |
| 5 | 1:10 | 20 | 1500 | 30 | 331.1 |
| 6 | 1:2 | 20 | 1500 | 30 | 340.9 |
| 7 | 1:10 | 20 | 3000 | 30 | 206.2 |
| 8 | 1:2 | 20 | 3000 | 30 | 225.1 |
| 9 | 3:10 | 10 | 1500 | 30 | 282.4 |
| 10 | 3:10 | 30 | 1500 | 30 | 362.0 |
| 11 | 3:10 | 10 | 3000 | 30 | 212.3 |
| 12 | 3:10 | 30 | 3000 | 30 | 220.3 |
| 13 | 3:10 | 20 | 2250 | 30 | 246.4 |
| 14 | 3:10 | 20 | 2250 | 30 | 244.0 |
| 15 | 3:10 | 20 | 2250 | 30 | 249.3 |
| 16 | 3:10 | 20 | 2250 | 30 | 259.4 |
| 17 | 3:10 | 20 | 2250 | 30 | 255.1 |

API: active pharmaceutical ingredients of curcumin; the independent variables used to evaluate the preparation effect were the mass ratio of the stabilizer to API, curcumin mass percentage and grinding speed. Grinding time was maintained at 30 min.

1.7 X-射线粉末衍射分析(X-ray powder diffraction, XRPD)姜黄素纳米晶制剂晶型

取姜黄素原料药、空白辅料(吐温 80)、物理混合物(姜黄素原料药和吐温 80)、纳米晶混悬液冻干粉和纳米晶混悬液真空干燥粉末各适量,进行 XRPD 测定。工作条件为管电压 40 kV,管电流 40 mA,扫描范围 3~40°,扫描速度每步停 0.1 s,步长 0.02°。所得结果绘制 XRPD 曲线图,根据姜黄素衍射峰变化判断晶型的变化。

1.8 差示扫描量热分析(differential scanning calorimetry, DSC)姜黄素纳米晶制剂晶型

取姜黄素原料药、空白辅料(吐温 80)、物理混合物(姜黄素原料药和吐温 80)、纳米晶混悬液冻干粉和纳米晶混悬液真空干燥粉末各适量于铝坩埚中,盖上扎孔,进行测试。工作条件为氮气流速 20 mL·min⁻¹,以 10°C·min⁻¹的速度由 28°C 升至 300°C,测得结果绘制 DSC 曲线图,根据姜黄素吸热峰位和强度的变化判断晶型的变化。

1.9 体外溶出实验

参考 2020 版《中华人民共和国药典》收录的姜黄素高效液相色谱(HPLC)法,结合本研究的特点,对流动相比例进行了相应调整,建立 HPLC 法测定姜黄素含量。色谱条件:色谱柱为 Phenomenex Luna C18 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-4% 冰醋酸溶液(55:45, V/V);检测波长 430 nm;柱温 30°C;流速为 1 mL·min⁻¹;进样量 10 μL。

采用 2020 版《中华人民共和国药典》中的桨法考察不同粒径姜黄素混悬液的溶出特性。取含姜黄素 90 mg 的各混悬液,加入 900 mL 溶出介质(1%SDS 水溶液)中,转速 75 r·min⁻¹,温度为 37°C。分别于 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120 和 180 min 取样 10 mL,用 0.22 μm 聚四氟乙烯滤膜过滤,收集滤液,HPLC 法测定其中姜黄素浓度,计算累积溶出度并绘制溶出曲线。累积溶出计算公式: X_i 累积= $X_i+(X_1+X_2+X_{i-1})V_2/V_1$ 。其中, X_i 为第 i 次实际测得的相对百分溶出度, X_i 累积为第 i 次经校正后的累积百分溶出度, V_1 为溶出介质总体积, V_2 为每次取样后的补液体积。

1.10 药动学实验

将 12 只健康雄性 SD 大鼠随机分为 2 组,分别 ig 给予姜黄素原料药混悬液和姜黄素纳米晶混悬液,给药前禁食 12 h,自由饮水。按照剂量为 200 mg·kg⁻¹ ig 给药后,分别于 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12 和 24 h 大鼠眼眶采血 0.5 mL,置 EDTA-K2 抗凝管中,2500×g 离心 5 min,取上清液

转移至空白 Ep 管中,-20°C 保存。

采用 HPLC-质谱联用法测定每个时间点的血药浓度。分析条件:流动相 A 相为水(含 0.1% 甲酸),B 相为乙腈(含 0.1% 甲酸);梯度洗脱:0~0.3 min, 10% B;0.3~2.5 min, 10% B→95% B;2.5~3.0 min, 95% B;3.0~4.0 min, 10% B;流速为 0.7 mL·min⁻¹;柱温 40°C;采用多反应监测模式测定姜黄素(m/z 为 369.3/177.1)的浓度,普萘洛尔作内标(m/z 为 260.1/116.1),离子源为电喷雾离子源。准确度、精密性、基质效应、回收率和稳定性等均符合要求。

取待测血浆样本 25 μL,加 β-葡萄糖醛酸苷酶 2.5 μL,混匀后 37°C 孵育 1 h,再加 100 μL 内标工作液(50 μg·L⁻¹),混匀后于 4°C,2500×g 离心 10 min;取上清液 70 μL,加 50% 乙腈 210 μL 混匀,于 4°C,2500×g 离心 2 min,取上清液进样分析。

1.11 统计学分析

采用 DAS 2.0 软件以非房室模型分析方法计算药代动力学参数,由 IBM SPSS 23.0 软件进行统计分析,组间比较采用独立样本 t 检验。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 优化的姜黄素纳米晶处方工艺

按 Box-Behnken 设计实验优化纳米晶混悬剂的处方工艺,通过 Design-Expert 8.0.6 软件进行回归拟合,得各实验因子对粒径影响的回归方程: $Y=250.84+5.55A+12.86B-56.56C+2.92AB+2.28AC-17.90BC+1.83A^2-4.75B^2+23.16C^2$,其中 A : 稳定剂与原料药质量比; B : 姜黄素质量百分比; C : 研磨转速,方差分析结果见表 2。回归方程拟合模型 P 值为 0.0002,表明模型有效可靠,失拟项 $P>0.05$,表明模型与实际值差异较小,采用该实验设计优化处方工艺可信度高。除线性关系外,各参数间还存在交互影响,其中 B, C, BC 和 C^2 对粒径的影响最为显著,所考察参数与粒径关系的响应面分析见图 1。由图 1 可知,稳定剂与原料药质量比-姜黄素质量百分比的响应面图坡度平缓,表明二者交互作用弱,对粒径影响小;稳定剂与原料药质量比-转速的响应面图较陡,但作用主要体现在转速方面;姜黄素质量百分比-转速响应面图坡度较陡,说明转速、姜黄素质量百分比以及二者的交互作用对粒径影响显著。根据软件分析结果,得制备姜黄素纳米晶口服混悬剂的最优参数为:稳定剂与原料药质量比 1:10,姜黄素质

Tab.2 Results obtained from ANOVA of Box-Behnken experiment design

| Source | Sum of squares | df | Mean square | F | P |
|----------------|----------------|----|-------------|--------|---------|
| Model | 30845.53 | 9 | 3427.28 | 25.54 | 0.0002 |
| A | 246.42 | 1 | 246.42 | 1.84 | 0.2175 |
| B | 1323.55 | 1 | 1323.55 | 9.86 | 0.0164 |
| C | 25594.53 | 1 | 25594.53 | 190.75 | <0.0001 |
| AB | 34.22 | 1 | 34.22 | 0.26 | 0.6290 |
| AC | 20.70 | 1 | 20.70 | 0.15 | 0.7062 |
| BC | 1281.64 | 1 | 1281.64 | 9.55 | 0.0176 |
| A ² | 14.10 | 1 | 14.10 | 0.11 | 0.7553 |
| B ² | 94.80 | 1 | 94.80 | 0.71 | 0.4284 |
| C ² | 2257.49 | 1 | 2257.49 | 16.82 | 0.0046 |
| Residual | 939.23 | 7 | 134.18 | | |
| Lack of fit | 778.94 | 3 | 259.65 | 6.48 | 0.0514 |
| Pure error | 160.29 | 4 | 40.07 | | |
| Cor total | 31784.76 | 16 | | | |

A: stabilizer:API(m:m); B: curcumin mass percentage; C: grinding speed.

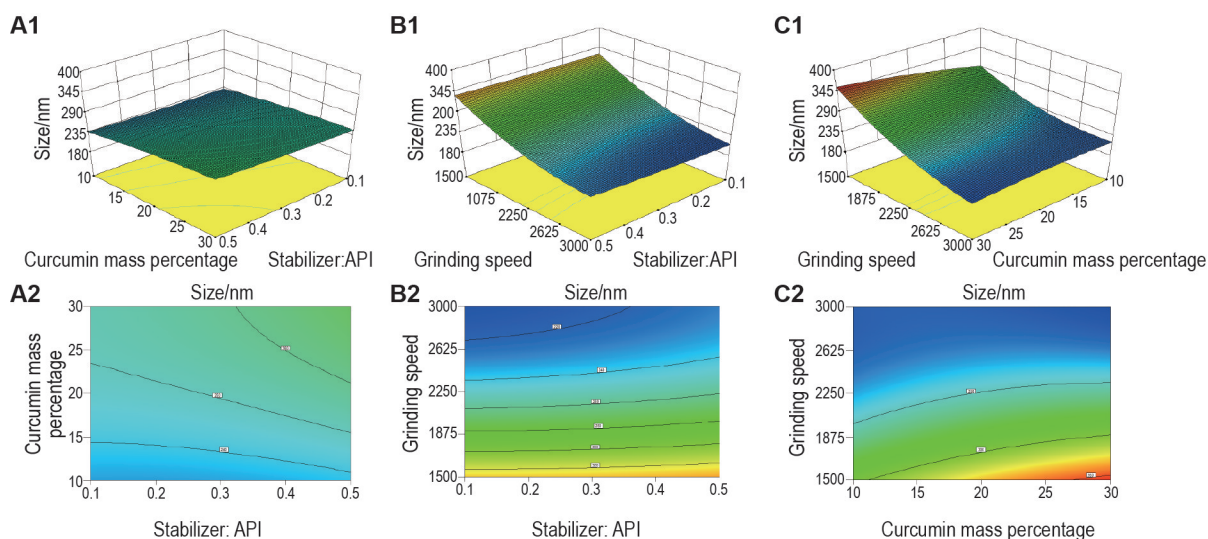


Fig.1 Response surface diagrams of three parameters and their interactions with particle size. See Tab.1 for the results of the 17 experiments designed. The response surface diagrams were drawn with Minitab software. A: the 3D surface (A1) and contour (A2) of stabilizer: API-curcumin mass percentage; B: the 3D surface (B1) and contour (B2) of stabilizer: API-grinding speed; C: the 3D surface (C1) and contour (C2) of curcumin mass percentage-grinding speed.

量百分比 30%，转速 $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ，理论上得到粒径 198.731 nm 的混悬液，按该参数制备的姜黄素纳米晶混悬液粒径实测值为 $(202.3 \pm 1.2) \text{ nm}$ ($n=3$)，与理论值极为接近，说明优化结果预测性优良。

2.2 纳米晶混悬液粒度和 Zeta 电位的稳定性

纳米晶混悬液稳定性考察结果(表 3)表明，制剂在 4、25 和 40°C 条件下，关键质量属性粒径和分散系数在 2 个月时间内均无明显变化，姜黄素颗粒尺寸始终维持在约 200 nm ，且电位无明显变化，表明处方稳定性良好，后续稳定性考察正在进行中。

2.3 姜黄素纳米晶形态

采用 SEM 和 TEM 对姜黄素纳米晶的形态及分布进行表征(图 2 和 3)。据 2 种电镜表征结果，混悬

液中姜黄素纳米晶形状不规则，实际粒径约为 200 nm ，产品粒度分布较为均一，与 2.2 稳定性考察中粒度分析仪所测结果基本相符。

2.4 姜黄素纳米晶制剂对晶型的影响

绘制姜黄素原料药、空白辅料、物理混合物和纳米晶的 XRPD 图谱(图 4)，可见稳定剂吐温 80 常温下为液体，无特征衍射峰，而姜黄素原料药在 $6 \sim 30^\circ$ 范围内有特征衍射峰，为结晶态。相比于物理混合物，制成纳米晶后衍射峰位置无显著变化，表明以吐温 80 为稳定剂的纳米晶晶型未发生显著改变。

姜黄素吸热峰约在 183°C ，吐温 80 常温下为液体，吸热峰 $<0^\circ\text{C}$ ，对物理混合物和纳米晶峰形无影

Tab. 3 Stability of nanocrystalline suspensions at different temperatures

| Time/d | 4℃ | | |
|--------|-----------|-------------|-------------------|
| | Size/nm | PDI | Zeta potential/mV |
| 0 | 209.3±2.7 | 0.253±0.008 | -18.40±0.27 |
| 1 | 205.4±1.6 | 0.239±0.028 | -16.80±0.62 |
| 2 | 205.2±4.0 | 0.253±0.011 | -16.50±0.62 |
| 3 | 201.6±2.8 | 0.234±0.028 | -19.00±0.32 |
| 5 | 201.3±3.5 | 0.269±0.016 | -22.60±0.90 |
| 7 | 197.8±4.0 | 0.249±0.012 | -25.70±0.56 |
| 10 | 200.1±2.8 | 0.226±0.014 | -15.10±0.42 |
| 15 | 208.7±2.5 | 0.293±0.014 | -14.70±1.26 |
| 30 | 202.7±3.4 | 0.246±0.017 | -17.90±0.21 |
| 60 | 196.8±2.7 | 0.218±0.013 | -19.00±1.90 |
| Time/d | 25℃ | | |
| | Size/nm | PDI | Zeta potential/mV |
| 0 | 209.3±2.7 | 0.253±0.008 | -18.40±0.27 |
| 2 | 204.3±2.8 | 0.246±0.038 | -14.90±0.35 |
| 3 | 204.4±2.1 | 0.257±0.030 | -19.70±0.10 |
| 4 | 202.2±2.1 | 0.251±0.008 | -19.70±1.36 |
| 5 | 203.1±0.9 | 0.270±0.009 | -20.90±0.57 |
| 7 | 200.3±5.0 | 0.229±0.017 | -26.40±1.05 |
| 10 | 205.1±1.6 | 0.223±0.008 | -20.80±0.81 |
| 15 | 207.5±3.1 | 0.307±0.024 | -13.30±0.15 |
| 30 | 206.0±3.3 | 0.232±0.008 | -17.40±0.42 |
| 60 | 201.4±3.8 | 0.236±0.006 | -19.30±1.53 |
| Time/d | 40℃ | | |
| | Size/nm | PDI | Zeta potential/mV |
| 0 | 209.3±2.7 | 0.253±0.008 | -18.40±0.27 |
| 1 | 203.1±1.4 | 0.254±0.041 | -14.20±0.45 |
| 2 | 202.4±1.2 | 0.246±0.021 | -19.60±0.59 |
| 3 | 203.1±2.0 | 0.236±0.007 | -20.40±0.46 |
| 5 | 202.8±2.8 | 0.237±0.011 | -20.60±0.96 |
| 7 | 203.8±1.8 | 0.245±0.018 | -24.60±0.81 |
| 10 | 204.1±0.7 | 0.205±0.012 | -28.50±1.08 |
| 15 | 209.7±1.5 | 0.258±0.045 | -14.20±0.27 |
| 30 | 208.2±3.7 | 0.228±0.008 | -14.20±0.61 |
| 60 | 210.4±4.2 | 0.209±0.021 | -20.50±1.68 |

The nanocrystalline suspensions were stored at 4, 25 and 40℃ for two months. Size, polydisperse index (PDI) and Zeta potential were used to evaluate the stability. $\bar{x}\pm s$, $n=3$.

响。纳米晶吸热峰位置和强度较物理混合物均无明显变化,与 XRPD 结果相印证,表明该处方晶型基本未发生改变,且干燥方式对晶型无明显影响(图 5)。

2.5 粒径对姜黄素体纳米晶混悬液外溶出的影响

利用浆法考察不同粒径姜黄素纳米晶混悬液的溶出特性,其体外溶出效果见图 6。未经研磨的姜黄素原料药 3 h 累积释放为(81.5±0.5)%,未完

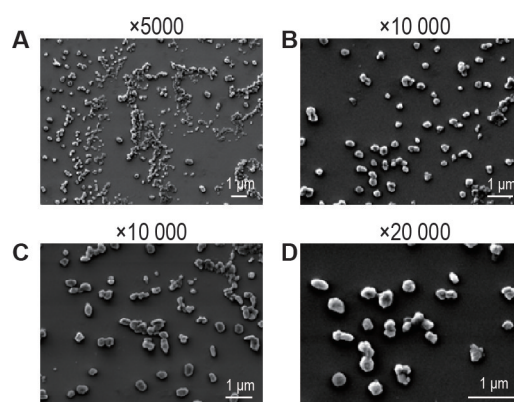


Fig. 2 Scanning electron microscope (SEM) characterization of curcumin nanocrystals. A, B, C and D were the nanocrystals observed under 5000, 10 000, 10 000, and 20 000 magnifications respectively

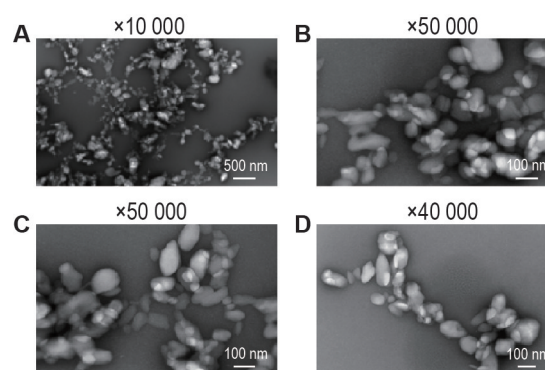


Fig. 3 Transmission electron microscope (TEM) characterization of curcumin nanocrystals. A, B, C and D were the nanocrystals observed under 10 000, 50 000, 50 000, and 40 000 magnifications respectively.

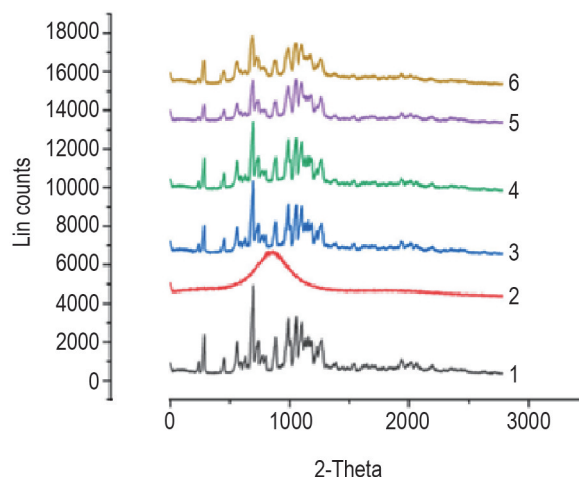


Fig. 4 X-ray powder diffraction patterns of curcumin nanocrystalline suspensions, API and preparation excipients. 1: API; 2: Tween 80; 3 and 4 were the physical mixture of vacuum drying and freeze drying respectively; 5 and 6 were vacuum-dried and freeze-dried nanocrystals, respectively.

全溶出。与原料药组比较,随着粒径减小,2 μm, 500 nm 和 200 nm 组姜黄素溶出速率显著增加($P<$

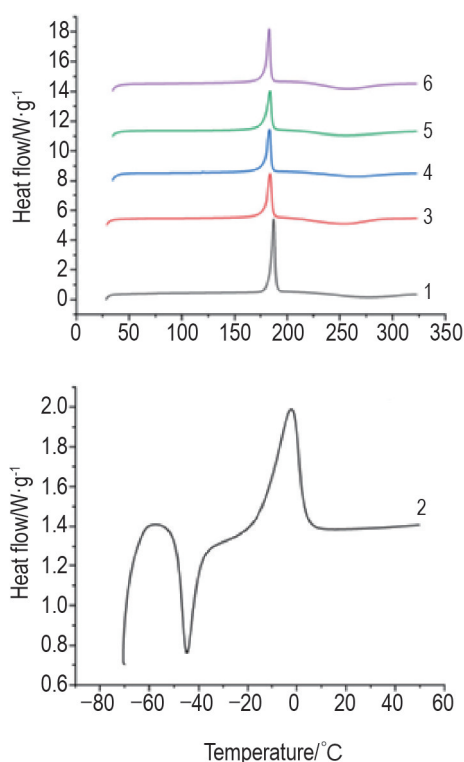


Fig. 5 Differential scanning calorimetry (DSC) thermograms of curcumin nanocrystalline suspensions, API and preparation excipients. 1: API; 2: Tween 80; 3 and 4 were the physical mixture of vacuum drying and freeze drying, respectively; 5 and 6 were vacuum-dried and freeze-dried nanocrystals, respectively.

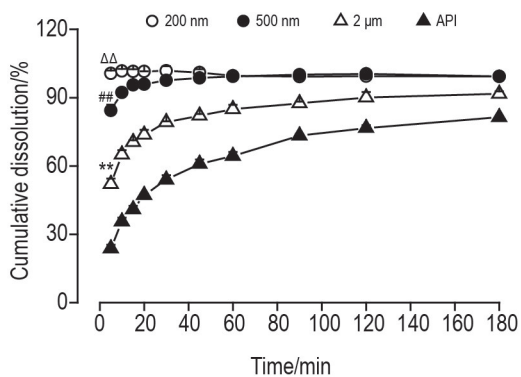


Fig. 6 In vitro dissolution curves of curcumin nanocrystalline suspensions and API of different particle sizes. The suspension samples of each group were added to 900 mL dissolution medium at a speed of $75 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ and a temperature of 37°C . The dissolution samples were collected at 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120 and 180 min, and the concentration of curcumin was determined by HPLC. $\bar{x} \pm s$, $n=3$. ** $P < 0.01$, compared with 5 min cumulative dissolution of API; ## $P < 0.01$, compared with $2 \mu\text{m}$ group; $\Delta\Delta P < 0.01$, compared with 500 nm group.

0.01), 原料药、 $2 \mu\text{m}$ 、500 nm 和 200 nm 纳米晶样品 5 min 累积溶出分别为 $(23.8 \pm 1.6)\%$ 、 $(52.1 \pm 2.3)\%$ 、 $(84.4 \pm 2.6)\%$ 和 $(100.7 \pm 1.2)\%$, 其中平均粒径 200 nm 的姜黄素纳米晶在 5 min 内即可完全溶出,

表明将姜黄素粒径减小到约 200 nm 能显著提高其溶出度及溶出速率, 促进体外释放。

2.6 姜黄素纳米晶大鼠体内药动学

2 组药动学参数见表 5, 药时曲线如图 7。姜黄素原料药组和纳米晶混悬液的 T_{max} 与 $T_{1/2}$ 均无统计学差异, 表明制成纳米晶未对姜黄素的达峰时间和半衰期产生显著影响。与原料药混悬液相比, 姜黄素纳米晶混悬液的 $\text{MRT}_{(0-t)}$ 明显降低 ($P < 0.05$), C_{max} 和 $\text{AUC}_{(0-t)}$ 均显著升高 ($P < 0.01$), 姜黄素纳米晶制剂 C_{max} 是原料药的 7.75 倍, 相对生物利用度可达 461%, 表明将姜黄素原料药制成纳米晶制剂后能显著提高姜黄素的体内生物利用度。

Tab. 5 Pharmacokinetic parameters of curcumin nanocrystalline suspension and API in rats

| Parameter | API | Nanocrystalline suspension |
|--|-----------------|----------------------------|
| $C_{\text{max}}/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ | 247 ± 67 | $1912 \pm 458^{**}$ |
| T_{max}/h | 2.67 ± 1.97 | 2.17 ± 0.98 |
| $\text{AUC}_{(0-t)}/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ | 2455 ± 1137 | $11307 \pm 3081^{**}$ |
| $\text{MRT}_{(0-t)}/\text{h}$ | 9.1 ± 2.8 | 6.1 ± 0.7 |
| $T_{1/2}/\text{h}$ | 7.2 ± 6.7 | 4.2 ± 2.0 |

Rats were randomly divided into two groups and were ig given $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ curcumin bulk drug suspension or curcumin nanocrystalline suspension, respectively. The plasma concentrations of curcumin were measured by a validated LC-MS/MS methods. C_{max} : maximum concentration; T_{max} : time of C_{max} ; AUC : area under the curve; MRT : mean residence time; $T_{1/2}$: half-time. $\bar{x} \pm s$, $n=6$. ** $P < 0.01$, compared with API group.

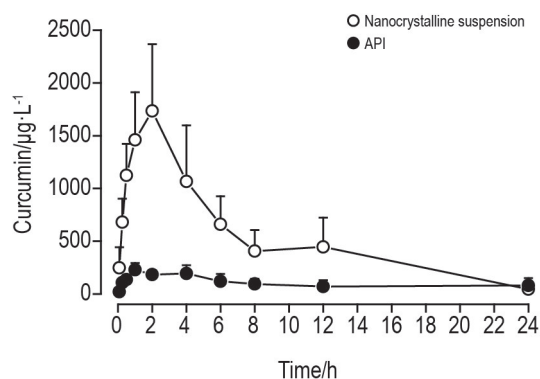


Fig. 7 Plasma concentration-time curves of curcumin nanocrystalline suspensions and API. See Tab. 5 for rat treatment. $\bar{x} \pm s$, $n=6$.

3 讨论

本研究采用介质研磨技术制备了姜黄素纳米晶混悬液。为更客观有效地评价各因素对姜黄素粒径的影响, 提高纳米晶制备效率, 采用 Box-Behnken 设计对方工艺进行了优化, 确定了最佳参数为姜黄素质量百分比 30%, 转速 $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 稳定剂与

原料药质量比为 1:10,按此处方工艺可高效稳定地制备粒度与软件预测结果相符的口服混悬剂。表明实验设计在纳米晶处方工艺优化方面有很高的应用价值,能极大提高处方工艺的筛选效率。SEM、TEM 以及粒度分析表征结果一致,表明制备的姜黄素纳米晶粒径接近 200 nm 且分布较为均一,处方在 4℃、室温和 40℃ 条件下粒度均未发生明显改变,具有良好的稳定性(>60 d)。XRPD 和 DSC 考察表明,姜黄素制成纳米晶混悬液前后晶型基本未发生改变。

通过制备不同粒径的姜黄素纳米晶混悬液,比较其体外溶出效果,表明减小姜黄素粒径能有效改善其溶出行为,研磨至 200 nm 的纳米晶增溶效果显著。本研究结果表明,姜黄素纳米晶混悬液体内吸收迅速,与体外溶出速率的增加相符,该制剂在大鼠体内的峰值浓度和生物利用度分别达到原料药的 7.75 和 4.61 倍,优势明显。

本研究制备了室温下放置稳定的姜黄素纳米晶混悬液,确定了最优的处方工艺,显著提高姜黄素的体外溶出度和体内生物利用度,为充分发挥其药理活性奠定了基础。相关研究构建的难溶性药物增溶关键技术体系具有普适性,可为后续新药研发提供新思路。

参考文献:

- [1] 荣鹏, 孟建中, 陈宇. 热射病的发病机制及防治策略的研究新进展[J]. 生物医学工程研究(*Journal of Biomedical Engineering Research*), 2010, 29(4): 287-292.
- [2] Dhillon N, Aggarwal BB, Newman RA, et al. Phase II trial of curcumin in patients with advanced pancreatic cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(14):4491-4499.
- [3] Sharma RA, Hill HR, Ireson CR. Pharmacodynamic and pharmacokinetic study of oral *Curcuma* extract in patients with colorectal cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7(7): 1894-1900.
- [4] Lao CD, Ruffin MT, Normolle D, et al. Dose escalation of a curcuminoid formulation[J/OL]. *BMC Complement Altern Med*, 2006, 6:10 [2021-03-20]. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-6-10>.
- [5] Cheng AL, Hsu CH, Lin JK, et al. Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions[J]. *Anticancer Res*, 2000, 21(4B): 2895-2900.
- [6] 沃兴德, 洪行球, 高承贤, 等. 姜黄素长期毒性试验[J]. 浙江中医学院学报(*Journal of Zhejiang Chinese Medical University*), 2000, 24(1): 61-65.
- [7] 沃兴德, 洪行球, 高承贤. 姜黄素最大耐受量试验[J]. 浙江中医学院学报(*Journal of Zhejiang Chinese Medical University*), 2000, 24(2): 55-82.
- [8] 李佳佳, 马娜, 董翔, 等. 不同浓度姜黄素对干热环境热射病大鼠肺组织炎症因子与血清内毒素变化的影响[J]. 医学研究生学报(*Journal of Medical Postgraduates*), 2018, 31(12): 1258-1261.
- [9] 马娜, 李佳佳, 宋来阳, 等. 姜黄素预处理对干热环境热射病大鼠心肌氧化应激及细胞凋亡的影响[J]. 中国比较医学杂志(*Chinese Journal of Comparative Medicine*), 2018, 28(12): 14-18.
- [10] 夏力, 董翔, 康燕, 等. 姜黄素预处理对沙漠干热环境热射病大鼠肠黏膜的损伤保护作用及对 TLR4/NF-κB 信号通路的影响[J]. 现代生物医学进展(*Progress in Modern Biomedicine*), 2017, 17(34): 6648-6652.
- [11] 夏亮, 刘江伟, 沈才福, 等. 姜黄素预处理通过保护线粒体和抗氧化应激减轻干热环境热射病大鼠肝损伤[J]. 现代生物医学进展(*Progress in Modern Biomedicine*), 2017, 17(18): 3434-3437, 3466.
- [12] 曹薇, 曹金军, 刘江伟, 等. 姜黄素预处理对沙漠干热环境热射病大鼠肺损伤及 HMGB-1 和 ICAM-1 mRNA 的影响[J]. 现代生物医学进展(*Progress in Modern Biomedicine*), 2018, 18(4): 652-656.
- [13] 赵荣, 刘江伟, 许永华, 等. 姜黄素对沙漠干热环境中暑大鼠脑损伤的保护作用研究[J]. 实验动物科学(*Laboratory Animal Science*), 2016, 33(6): 21-24.
- [14] 张东辉, 刘江伟, 许永华, 等. 姜黄素对沙漠干热环境中暑大鼠生命体征和相关血液指标的影响[J]. 实验动物科学(*Laboratory Animal Science*), 2017, 34(1): 7-10.
- [15] 肇寅辉, 敖其, 刘江伟, 等. 姜黄素预处理对干热环境下中暑大鼠肾组织 NF-κB P65 及炎症因子表达的影响[J]. 现代生物医学进展(*Progress in Modern Biomedicine*), 2017, 17(14): 2622-2626.
- [16] 许琴, 董翔, 周娇, 等. 姜黄素预处理对沙漠干热环境中暑大鼠血清及尿液电解质的影响[J]. 实验动物科学(*Laboratory Animal Science*), 2017, 34(01): 11-15.
- [17] 许琴, 董翔, 李建瑛, 等. 姜黄素预处理对沙漠干热中暑大鼠回肠、结肠内容物菌群表达量的影响[J]. 实验动物与比较医学(*Laboratory Animal and Comparative Medicine*), 2018, 38(6): 440-445.
- [18] 张立, 刘江伟, 康燕, 等. 姜黄素预处理对沙漠干热环境中暑大鼠心肌细胞凋亡和 CASPASE-3 活性的影响[J]. 现代生物医学进展(*Progress in Modern Biomedicine*), 2018, 18(21): 4022-4026.
- [19] Tonnesen HH, Masson M, Loftsson T. Studies of curcumin and curcuminoids. XXVII. Cyclodextrin complexation: solubility, chemical and photochemical stability[J]. *Int J Pharm*, 2002, 244(1): 127-135.
- [20] Junghanns JU, Müller RH, M. Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications[J]. *Int J Nanomed*, 2008, 3(3):295-309.
- [21] Nagarwal RC, Kumar R, Dhanawat M, et al. Nanocrystal technology in the delivery of poorly soluble drugs:

- an overview[J]. *Curr Drug Deliv*, 2011, 8(4): 398-406.
- [22] 钱帅, 张建军, 高缘, 等. 纳米混悬剂研究进展[J]. 药学进展(*Progress in Pharmaceutical Sciences*), 2007, (1): 9-14.
- [23] Mitri K, Shegokar R, Gohla S, *et al*. Lutein nanocrystals as antioxidant formulation for oral and dermal delivery[J]. *Int J Pharm*, 2011, 420(1): 141-146.
- [24] Huang X, Peng X, Wang Y, *et al*. A Reexamination of active and passive tumor targeting by using rod-shaped gold nanocrystals and covalently conjugated peptide ligands[J]. *ACS Nano*, 2010, 4(10): 5887-5896.
- [25] Pawar VK, Singh Y, Meher JG, *et al*. Engineered nanocrystal technology: *in-vivo* fate, targeting and applications in drug delivery[J]. *J Controlled Release*, 2014, 183: 51-66.
- [26] 郑爱萍, 石靖. 纳米晶体药物研究进展[J]. 国际药学研究杂志(*Journal of International Pharmaceutical Research*), 2012, 39(3): 177-183.
- [27] Junyaprasert VB, Morakul B. Nanocrystals for enhancement of oral bioavailability of poorly water-soluble drugs[J]. *Asian J Pharm Sci*, 2015, 10(1): 13-23.
- [28] Baek IH, Kim JS, Ha ES, *et al*. Dissolution and oral absorption of pranlukast nanosuspensions stabilized by hydroxypropylmethyl cellulose[J]. *Int J Biol Macromol*, 2014, 67: 53-57.
- [29] Stein J, Fuchs T, Mattern C. Advanced milling and containment technologies for superfine active pharmaceutical ingredients[J]. *Chem Eng Technol*, 2010, 33(9): 1464-1470.

Preparation of a curcumin nano-suspension and its pharmacokinetics *in vivo*

PENG Yi-fan¹, WANG Rong-rong^{1,2}, ZHUANG Xiao-mei¹, ZHANG Wen-peng¹, DENG Yao-chen³,
GAO Jing¹, ZHANG Hui¹, ZHENG Ai-ping¹

(1. Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China;
2. College of Pharmacy, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, China;
3. College of Pharmacy, Guangdong Medical University, Dongguan 523822, China)

Abstract: **OBJECTIVE** To prepare a stable curcumin nanocrystalline suspension by optimizing the formulation process to improve the dissolution and bioavailability. **METHODS** The formulation process of a curcumin nanocrystal suspension was optimized through Box-Behnken response surface design, and the stability of particle size and Zeta potential were monitored. The changes of the crystal form before and after grinding were analyzed with differential scanning calorimetry (DSC) and X-ray powder diffraction (XRPD). The *in vitro* and *in vivo* release characteristics of the preparations were evaluated via dissolution *in vitro* and pharmacokinetics in rats. **RESULTS** The optimal formulation process was determined to be as follows: the mass percentage of curcumin was 30%, the grinding speed was 3000 r·min⁻¹, and the mass ratio of excipients to APIs was 1:10. The particle size and Zeta potential of the prepared curcumin nanocrystals remained stable, and the crystal form did not change significantly before or after grinding. Curcumin API that was turned into nanocrystals with a particle size of 200 nm could significantly improve the dissolution rate. The C_{\max} and AUC_{0-t} in rats were significantly increased ($P<0.01$), and the relative bioavailability was as high as 461%. There was no significant change in the crystal form of curcumin before or after grinding. **CONCLUSION** The optimal formulation process of a curcumin nanocrystal suspension is determined, and the properties of the prepared nanocrystals are stable, which can significantly improve the dissolution *in vitro* and bioavailability *in vivo*.

Key words: curcumin; nanocrystals; Box-Behnken design; bioavailability

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (81573357); and National Natural Science Foundation of China (82073793)

Corresponding author: ZHENG Ai-ping, E-mail: apzheng@163.com; ZHANG Hui, E-mail: zhuhui58@126.com

(收稿日期: 2021-03-26 接受日期: 2021-08-04)

(本文编辑: 魏 霞)