

pH 依赖的溶解/沉淀法制备美洛昔康纳米混悬剂

连王权^{1,2}, 申宝德^{1,2}, 沈成英², 徐方楚², 袁海龙^{1,2*}

(1. 江西中医药大学药学院, 江西南昌 330004; 2. 空军总医院, 北京 100142)

摘要: 为提高美洛昔康(**1**)的溶出度, 采用 pH 依赖的溶解/沉淀法制备其纳米混悬剂。以 **1** 纳米混悬剂的平均粒径、多分散性指数(PDI)及稳定性为指标, 采用单因素法优化其处方和工艺。所得最优处方和工艺为: 使用泊洛沙姆 407(P407)和 Tween-80(T80)(1:1, w/w)作 **1** 纳米混悬剂的稳定剂, 用量与主药 **1** 的比例为 1:2(w/w); 以 13 000 r/min 的速率高速剪切 2 min。验证试验显示, 3 批 **1** 纳米混悬剂的平均粒径均在 200 nm 以内, PDI 值约 0.2; 室温放置 7 d 后, 平均粒径的波动在 30 nm 内, PDI 波动在 0.03 以内。采用扫描电镜对其形态进行观察, 结果显示 **1** 纳米混悬剂呈不规则的椭圆形小颗粒, 表面光滑。体外溶出度显示, **1** 纳米混悬剂在磷酸盐缓冲液(pH 7.4)中 5 min 即可溶出(91.68±3.26)%, 而 **1** 粗混悬液 60 min 时溶出率仅为(50.45±3.13)%。结果表明将 **1** 制成纳米混悬剂后, 其溶出度得到显著改善。

关键词: 美洛昔康; 纳米混悬剂; pH 依赖的溶解/沉淀法; 溶出度

中图分类号: R944.9 文献标志码: A 文章编号: 1001-8255(2018)02-0192-06

DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.02.012

美洛昔康(meloxicam, **1**)是一种新型的烯醇酰胺类非甾体抗炎药, 具有良好的解热、镇痛、消炎等作用, 主要用于类风湿性关节炎、骨关节炎等疾病的治疗^[1-2]。同时, 它也是术后镇痛的常用药, 有文献报道 **1** 在骨科、整形等手术镇痛或肿瘤镇痛等领域取得了较好的疗效^[3-5]。但 **1** 属于生物药剂学分类系统(BCS) II 类药物, 即水溶性差而渗透性好的药物, 水溶性差导致其溶出慢, 从而影响其吸收和起效速度。

纳米混悬剂(nanosuspensions)是近年来针对难溶性药物开发的一种新型纳米给药系统^[6]。纳米混悬剂是一种仅由药物和少量稳定剂组成的纯药物粒子分散在水溶液中的亚微米胶体分散体系, 载药量高^[7-8]。由于粒径小、分散度高、比表面积大, 所以能显著提高难溶性药物的溶出度、生物利用度及

药效^[9]。

本试验拟将 **1** 制备成纳米混悬剂, 以提高其溶出度, 加快药物的吸收。由于 **1** 的分子结构中含有酚羟基, 属弱酸性化合物, 溶解度受 pH 值影响, 因此采用 pH 依赖的溶解/沉淀法制备其纳米混悬剂。以纳米混悬剂的粒径、多分散性指数(polydispersity index, PDI)及稳定性为考察指标, 通过单因素试验优化其处方和工艺, 并对最佳处方和工艺条件下所制得的 **1** 纳米混悬剂进行理化性质表征和体外溶出行为考察。

1 仪器与试剂

Zetasizer Nano ZS 型粒度分析仪(英国 Malvern 公司); B25 型实验室分散乳化均质机(上海贝而特流体设备有限公司); 1260 型高效液相色谱仪(配有四元泵、在线脱气机、自动进样器、紫外可变波长检测器, 美国 Agilent 公司); S-4800 型冷场发射扫描电镜(日本株式会社日立制作所); 2RS-8G 型智能溶出试验仪(天津市天大天发科技有限公司)。

1 原料药(武汉荆楚陈氏医药化工有限公司, 含量 100.46%, 批号 MLAH003041617); **1** 对照品(中国食品药品检定研究院, 含量 99.9%, 批号 100679-201102); Tween-80(T80)、泊洛沙姆 188(P188)、泊洛沙姆 407(P407)、D- α -生育酚聚乙二醇 1000 琥珀酸酯(TPGS)均购自北京凤礼精求医药股份有限公司; 十二烷基磺酸钠(SDS, 西陇化工股

收稿日期: 2017-06-16

基金项目: 后勤科研重点项目(BKJ16J011)、全军重大科研计划(BKJ16J025)

作者简介: 连王权(1991—), 男, 硕士研究生, 专业方向: 中药新型给药系统。

Tel: 010-66928506

E-mail: 1007756897@qq.com

通信联系人: 袁海龙(1970—), 男, 研究员, 博士生导师, 从事新制剂、新剂型、新技术研究。

Tel: 13501202387

E-mail: yhlpharm@126.com

份有限公司)；羟丙甲纤维素 E5(HPMC E5, 安徽山河药用辅料股份有限公司)；甲醇为色谱纯, 其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 1 纳米混悬剂的制备

取 1 0.825 g 和一定量的稳定剂加至 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液 50 ml 中超声溶解, 得到溶液 a; 另取 1 mol/L 盐酸 5 ml, 作为溶液 b。在高速剪切的作用下将溶液 b 迅速加入到溶液 a 中, 以一定转速剪切一定的时间后即得 1 纳米混悬剂。

2.2 1 纳米混悬剂的处方和工艺优化

2.2.1 1 纳米混悬剂稳定性评价指标的建立

粒径与 PDI: 取一定量的 1 纳米混悬剂, 以蒸馏水作分散介质 (介质折光率: 1.330, 介质黏度: 0.887 2 Pa·s), 将其稀释 200 倍配制成均匀的待测混悬液, 再通过粒度仪测定其粒径与 PDI, 测试温度为 25 °C, 重复 3 次求平均值。

稳定性: 将制得的 1 纳米混悬剂密封保存于 25 °C, 分别于 0、1、3、7 d 测定粒径和 PDI, 通过对测定结果的比较分析来评价样品的稳定性。

2.2.2 稳定剂种类的影响

固定处方中稳定剂的用量为 165 mg, 剪切速率为 10 000 r/min, 剪切时间为 3 min, 选用 6 种不同的稳定剂 (T80、P188、P407、SDS、HPMC E5 及 TPGS) 分别制备 1 纳米混悬剂, 测定其放置 0、1、3、7 d 的粒径和 PDI, 结果见图 1。可见, 在 0 d 时, 除 HPMC E5 外, 其余稳定剂制备的 1 纳米混悬剂的粒径均在纳米级别, 但是不同稳定剂制备的纳米混悬剂的 7 d 稳定性相差较大; SDS 作稳定剂时, 稳定性最差, 从 0 d 的 109 nm 增大到 7 d 的 7 μm; P188 和 TPGS 作稳定剂制备的 1 纳米混悬剂在放置 7 d 后, 粒径均增大至 1 μm 以上, 且 PDI 波动较大; 选用 T80 或 P407 作稳定剂时, 1 纳米混悬剂的粒径、PDI 及稳定性均较好。因此, 继续考察两者联合应用的情况。

2.2.3 P407 与 T80 不同比例的影响

固定 P407 和 T80 总量为 165 mg, 其他条件不变, 按照 10 : 0、8 : 2、5 : 5、2 : 8、0 : 10 的质量比分别制备 1 纳米混悬剂, 结果见图 2。可见, 当 P407 : T80 为 5 : 5 时, 1 纳米混悬剂的粒径

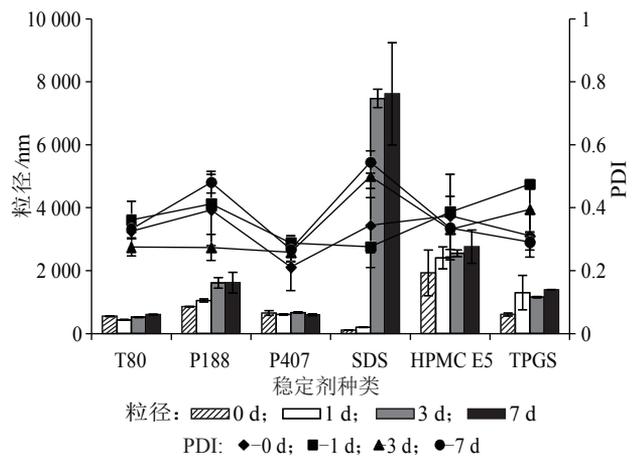


图 1 稳定剂种类对 1 纳米混悬剂的粒径、PDI 及稳定性的影响 (n=3)

Fig.1 Effect of Stabilizer Type on Particle Size, PDI and Stability of 1 Nanosuspensions (n=3)

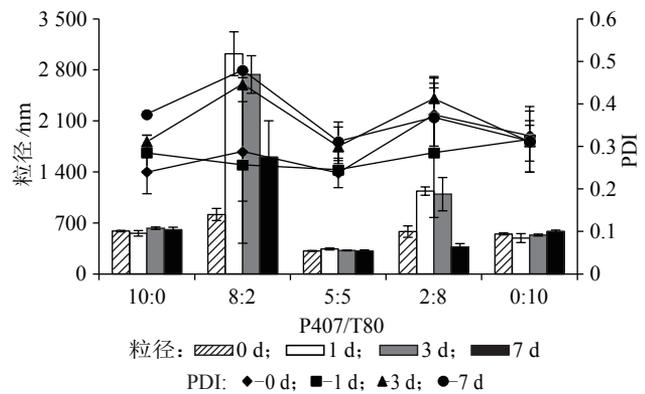


图 2 P407 与 T80 不同比例对 1 纳米混悬剂的粒径、PDI 及稳定性的影响 (n=3)

Fig.2 Effect of Ratio of P407 to T80 on Particle Size, PDI and Stability of 1 Nanosuspensions (n=3)

和 PDI 最小, 稳定性也最好。

2.2.4 主药与稳定剂不同比例的影响

固定其他条件不变, 按 1 与稳定剂质量比为 10 : 1、10 : 2、10 : 4、10 : 5、10 : 6 分别制备 1 纳米混悬剂, 结果见图 3。随着稳定剂用量的增加, 粒径降低, 当 1 与稳定剂的比例为 10 : 5 和 10 : 6 时, 两者的粒径无显著性差异, 由 PDI 的变化可见, 前者的稳定性更好一些, 所以选择 1 与稳定剂的比例为 10 : 5。

2.2.5 剪切时间的影响

依据上述处方筛选结果确定使用 P407 和

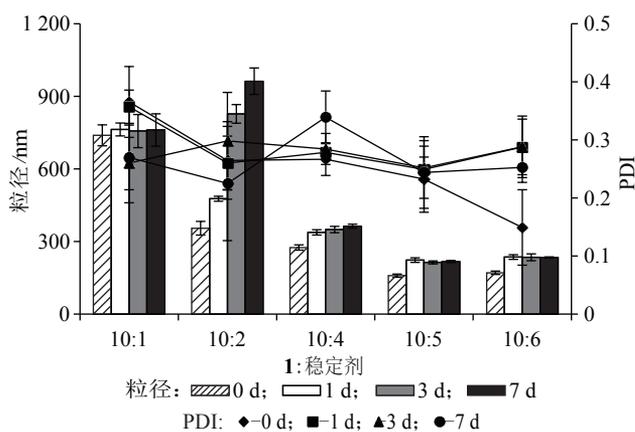


图3 主药与稳定剂的不同比例对1纳米混悬剂的粒径、PDI及稳定性的影响 (n=3)

Fig.3 Effect of Ratio of 1 to Stabilizers on Particle Size, PDI and Stability of 1 Nanosuspensions (n=3)

T80(1 : 1) 作 1 纳米混悬剂的稳定剂, 与主药 1 的比例为 1 : 2。进一步考察剪切时间对其粒径、PDI 及稳定性的影响, 固定剪切转速为 10 000 r/min, 分别剪切 1、2、3、4、5 min 得到 1 纳米混悬剂, 结果见图 4。随着剪切时间的延长, 粒径没有进一步降低反而略有升高, 但无显著性影响, PDI 先降低后升高, 在剪切 2 min 时, PDI 和 7 d 稳定性结果显示均较好, 综合考虑, 剪切时间选择 2 min。

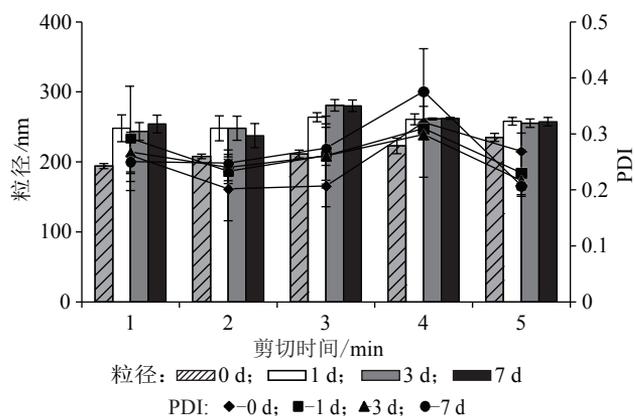


图4 不同剪切时间对1纳米混悬剂的粒径、PDI及稳定性的影响 (n=3)

Fig.4 Effect of Time of High Speed Shearing on Particle Size, PDI and Stability of 1 Nanosuspensions (n=3)

2.2.6 剪切速率的影响

固定其他条件不变, 以剪切速率 10 000、13 000

和 16 000 r/min 分别制备 1 纳米混悬剂, 结果见图 5。随着剪切速率的增加, 粒径和 PDI 都先降后升, 当速率为 13 000 r/min 时, 粒径和 PDI 分别为 (185.9±5.1) nm 和 0.189±0.012, 7 d 内稳定性也最好, 因此, 剪切速率定为 13 000 r/min。

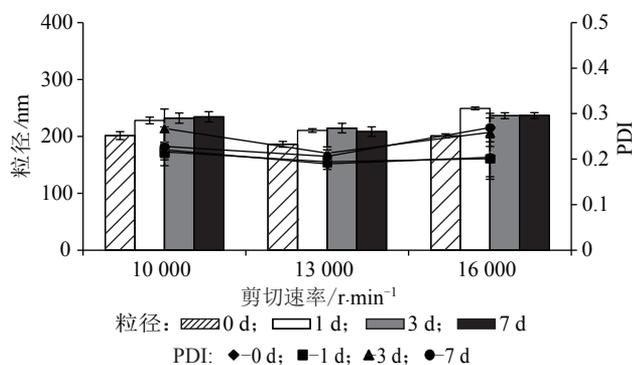


图5 不同剪切速率对1纳米混悬剂的粒径、PDI及稳定性的影响 (n=3)

Fig.5 Effect of Speed of High Speed Shearing on Particle Size, PDI and Stability of 1 Nanosuspensions (n=3)

2.2.7 最佳工艺的验证

照上述优化的处方比例称取 1 与稳定剂各 3 份, 再按上述确定的最佳工艺制备 3 批 1 纳米混悬剂进行验证试验, 测定 1 纳米混悬剂的粒径、PDI 及稳定性。结果显示, 3 批 1 纳米混悬剂的粒径分别为 (183.7±2.4)、(177.2±7.2)、(175.0±4.2) nm, PDI 值分别为 0.213±0.012、0.185±0.024 和 0.192±0.038, 7 d 稳定性考察中, 粒径波动在 30 nm 内, PDI 波动在 0.03 内, 说明本制备工艺稳定、可行。继续用该处方制品进行以下试验。

2.3 1 纳米混悬剂的表征

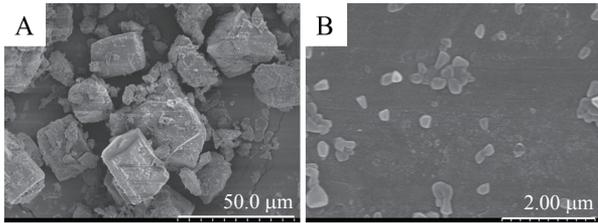
2.3.1 粒度分布和 ζ 电位分析

取一定量的 1 纳米混悬剂, 照“2.2.1”项下方法测得 1 纳米混悬剂的粒径、PDI 及 ζ 电位分别为 (179.3±4.5) nm、0.189±0.023 及 (-23.9±0.6) mV (n=3)。

2.3.2 1 纳米混悬剂的形态观察

将 1 纳米混悬剂适当稀释后滴在锡箔纸上, 室温下自然干燥后置扫描电镜 (SEM) 下观察其形态, 结果见图 6。由图 6 可知, 原料药在 SEM 下呈不

规则的棱柱形，表面粗糙，粒径在 5 ~ 40 μm；而 1 纳米混悬剂呈不规则的椭圆形小颗粒，表面光滑，粒径在 200 ~ 400 nm。



A : 1 原料药 (×1 000) ; B : 1 纳米混悬剂 (×20 000)

图 6 扫描电镜照片
Fig.6 SEM Images

2.4 1 纳米混悬剂的体外溶出度

色谱条件：色谱柱 Inertsil® ODS-SP 柱 (4.6 mm×150 mm, 5 μm)；流动相 甲醇：乙酸钠缓冲液 (pH 4.5) (52 : 48)；流速 1 ml/min；柱温 25 °C；检测波长 355 nm；进样量 10 μl。

对照品溶液：精密称取 1 对照品 25 mg，置 50 ml 量瓶中，用 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液溶解，并用流动相定容，得 500 mg/L 的对照品贮备液。继而用流动相稀释成 20、40、75、100、150 和 200 mg/L 的对照品溶液。

供试品溶液：精密量取以最优处方和工艺制得的 1 纳米混悬液 1 ml，用流动相溶解并稀释 200 倍，配得浓度为 75 mg/L 的供试品溶液。

阴性对照溶液：将处方量的空白辅料以相同的最优工艺制备成不含原料药的阴性对照品溶液，并采用供试品溶液的配制方法得到。

线性范围及方法学研究：1 浓度 *c* 在 20 ~

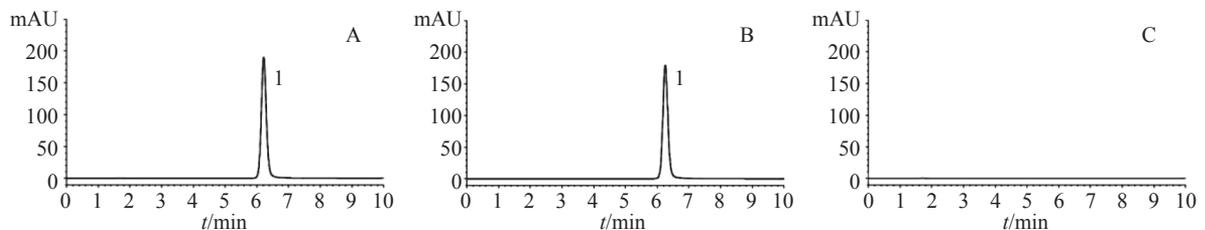
200 mg/L 范围内与峰面积 *A* 呈良好的线性关系 (标准曲线方程为 $A=28.97c-13.08$, $R^2=0.9997$)；专属性试验结果表明其他成分对 1 的测定无干扰，结果见图 7；日间 RSD 为 0.11% ($n=6$)，重复性 RSD 为 0.69% ($n=6$)，24 h 稳定性的 RSD 为 0.13%；低、中、高浓度的加样回收率分别为 (98.63±1.10)%、(99.51±0.21)% 和 (99.17±0.41)% ($n=3$)。

粗混悬剂的制备：按 1 纳米混悬剂最优处方比例称取稳定剂置烧杯中，加水溶解后，向其中加入 1 原料药，搅拌使其分散均匀，即得浓度为 15 mg/ml 的 1 粗混悬剂。

分别取上述 1 纳米混悬剂和 1 粗混悬液，按中国药典 2015 年版四部通则 0931 第三法 (小杯法)，以 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4，取磷酸二氢钾 1.36 g，加 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液 79 ml，用水稀释至 200 ml，即得) 为溶出介质，体积为 200 ml，转速为 100 r/min，温度为 (37±0.5) °C，分别在 5、10、15、30、45 和 60 min 时取样 2 ml (同时补加同温等量介质)，经 0.45 μm 微孔滤膜过滤。照上述色谱条件进样分析，计算溶出率，绘制溶出曲线，结果见图 8。由图 8 可知，1 粗混悬液 60 min 时的溶出率为 (50.45±3.13)%，而 1 纳米混悬剂在 5 min 时溶出率即达到 (91.68±3.26)%，溶出效果明显优于粗混悬液，说明将 1 制备成纳米混悬剂后，溶出度得到显著改善。

3 讨论

本试验利用 1 溶解度受 pH 值影响的特性，采用 pH 依赖的溶解 / 沉淀法制备 1 纳米混悬剂，既避免了高压均质法、介质研磨法等高能量的输入，



A : 对照品溶液, B : 供试品溶液, C : 阴性对照溶液

1-1

图 7 1 的典型 HPLC 色谱图

Fig.7 Typical HPLC Chromatograms of 1

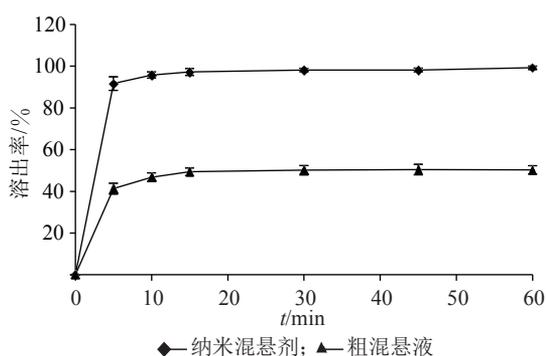


图 8 1 纳米混悬剂和 1 粗混悬液的溶出曲线 (n=3)
Fig.8 Dissolution Curves of 1 Nanosuspensions and Coarse Suspension (n=3)

又避免了沉淀法、乳化法等有机溶剂的残留，为弱酸弱碱类难溶性活性成分的纳米化提供方法^[10-12]。为了最大限度地提高 1 纳米混悬剂的载药量，预试验考察了 1 在 0.1 mol/L 的碳酸氢钠溶液、碳酸钠溶液和氢氧化钠溶液 (50 ml) 中的溶解量，结果显示 1 在 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液中溶解量最大，达到 0.825 g，故固定其为投料量进行后期的处方和工艺优化。

沉淀法制备纳米混悬液时，纳米混悬液的形成有两个阶段：晶核形成和成长。只有晶核形成快而成长慢才能得到较小粒径的稳定混悬液^[13]。本研究中，溶液 a 与溶液 b 需要快速混合才能迅速改变 pH 值，导致 1 产生高过饱和度而自发成核，随着晶核周围过饱和程度的降低，晶核成长变慢，最终得到较小粒径的稳定 1 纳米混悬液。

稳定剂种类和用量会影响纳米混悬剂的物理稳定性，其对纳米混悬剂的稳定作用主要依赖静电作用和空间位阻，不同种类的稳定剂维持纳米混悬剂稳定的原理不同。稳定剂用量过少不足以维持稳定，过多可能会发生自组装而丧失其阻止纳米粒聚集的作用^[14]。本研究联合使用的 T80 和 P407 对纳米混悬剂的稳定作用主要为空间稳定作用。随着用量的增加，粒径有所降低，稳定性提高，但并非用量越多越好。在高剪切过程中，剪切速率和时间会影响纳米混悬剂的粒径、PDI 及稳定性，随着剪切时间的延长，对纳米混悬剂粒径的影响较小，PDI 先降低后升高，适当的剪切时间可以使纳米混悬剂粒度

分布更均匀，但时间过长可能会使体系的温度升高不利于药物的稳定；随着剪切速率的增加，粒径和 PDI 都先降后升，原因是高剪切能使药物粒径减小，但剪切速率的进一步增加可能会破坏纳米粒表面吸附的稳定剂层而使其聚集，降低其稳定性。

本试验以纳米混悬剂最重要的指标——粒径、PDI 及稳定性为指标，采用单因素法优化处方和工艺。以最优处方和工艺制备得到的 1 纳米混悬剂与其粗混悬剂相比，溶出度得到明显改善，但纳米混悬剂是一种液体制剂，携带、运输及服用极为不便，且属于热力学和动力学均不稳定的体系，在贮存和运输过程中会出现粒子沉降、团聚及晶体生长的现象，因此，有必要将 1 纳米混悬剂进一步载入一种合适的口服固体制剂中，以便其发挥快速镇痛、抗炎等作用。

参考文献:

- [1] Meuwesen WP, du Plessis JM, Burger JR, et al. Prescribing patterns of non-steroidal anti-inflammatory drugs in chronic kidney disease patients in the South African private sector [J]. *Int J Clin Pharm*, 2016, 38(4): 863—869.
- [2] 曹礼华, 张东娟, 江善祥. 选择性 COX-2 抑制剂美洛昔康的药理作用、药动学及临床应用 [J]. *畜牧与兽医*, 2011, 43(7): 100—104.
- [3] Olson ME, Ralston B, Burwash L, et al. Efficacy of oral meloxicam suspension for prevention of pain and inflammation following band and surgical castration in calves [J]. *BMC Vet Res*, 2016, 12(1): 102.
- [4] 章其益, 管四炎. 美洛昔康对骨科术后的镇痛疗效及其安全性评价 [J]. *实用药物与临床*, 2014, 17(4): 448—450.
- [5] 王碧菠, 张伟滨. 美洛昔康针剂用于骨科术后镇痛效果及安全性研究 [J]. *国际骨科学杂志*, 2011, 32(1): 57—60.
- [6] Kocbek P, Baumgartner S, Kristl J. Preparation and evaluation of nanosuspensions for enhancing the dissolution of poorly soluble drugs [J]. *Int J Pharm*, 2006, 312(1-2): 179—186.
- [7] Müller RH, Gohla S, Keck CM. State of the art of nanocrystals--special features, production, nanotoxicology aspects and intracellular delivery [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2011, 78(1): 1—9.
- [8] Rabinow BE. Nanosuspensions in drug delivery [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2004, 3(9): 785—796.
- [9] 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.

- [10] Chen H, Wan J, Wang Y, *et al.* A facile nanoaggregation strategy for oral delivery of hydrophobic drugs by utilizing acid-base neutralization reactions [J]. *Nanotechnology*, 2008, **17**, **19**(37): 375104.
- [11] Xie Y, Chen Z, Su R, *et al.* Preparation and optimization of amorphous ursodeoxycholic acid nano-suspensions by nanoprecipitation based on acid-base neutralization for enhanced dissolution [J]. *Curr Drug Deliv*, 2017, **14**(4): 483—491.
- [12] Xu Y, Liu X, Lian R, *et al.* Enhanced dissolution and oral bioavailability of aripiprazole nanosuspensions prepared by nanoprecipitation/homogenization based on acid-base neutralization [J]. *Int J Pharm*, 2012, **15**, **438**(1-2): 287—295.
- [13] Sattar A, Chen D, Jiang L, *et al.* Preparation, characterization and pharmacokinetics of cyadox nanosuspension [J]. *Sci Rep*, 2017, **7**(1): 2289.
- [14] 房明明, 杨文倩, 邵靖博, 等. 尼索地平纳米混悬液的制备及其体外溶出度[J]. 沈阳药科大学学报, 2016, **33**(2): 93—97.

Preparation of Meloxicam Nanosuspensions with pH-dependent Dissolving-precipitating Method

LIAN Wangquan^{1,2}, SHEN Baode^{1,2}, SHEN Chengying², XU Fangchu², YUAN Hailong^{1,2*}

(1. College of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004; 2. Air Force General Hospital, Beijing 100142)

ABSTRACT: Meloxicam (MLX) has been considered as one of the comparatively efficient antipyretic-antipyratics. However, its poor water solubility has limited the clinical applications. Recently, nanosuspension (NS) technology has been successfully used to tackle the formulation problem of poorly soluble drugs. To improve the dissolution velocity of MLX, the MLX nanosuspension was prepared by pH-dependent dissolving-precipitating/high speed shearing method. The process and formulation parameters were optimized by a single factor test with average particle size (PS), polydispersity index (PDI) and stability as the indexes. The optimal formulation and process were as follows: poloxamer 407 (P407) and Tween-80 (T80) (1 : 1, *w/w*) was used as the stabilizers for MLX nanosuspension and the ratio of the mixed stabilizers to MLX was 1 : 2 (*w/w*); the speed and time of high speed shearing were 13 000 r/min and 2 min. The validation results of three batches of the optimal MLX nanosuspension showed that the particle size was within 200 nm and PDI was about 0.2, and the fluctuations of particle size and PDI were within 30 nm and 0.03 after storage for 7 d under room temperature. The results of scanning electron microscopy showed that MLX nanosuspension was irregular oval-shaped small particles with smooth surface. In pH 7.4 phosphate buffer, the dissolution at 5 min of the MLX nanosuspension was (91.68±3.26)%, whereas the coarse suspension of MLX was (50.45±3.13)% at 60 min. The dissolution of MLX nanosuspension was significantly higher and faster than the coarse suspension, which indicated that MLX nanosuspensions had a significant increase in the extent of dissolution.

Key Words: meloxicam; nanosuspension; pH-dependent dissolving-precipitating method; dissolution

