吲哚美辛微观结晶机制及纳米包衣的影响

欧阳辉1,易 涛^{1,2*},郑 琴1,刘 峰1

(1. 西南大学药学院, 重庆 400715; 2. 澳门科技大学澳门药物及健康应用研究所, 澳门 000853)

摘要:药物的无定形状态比晶态具有更大的溶解度,可以促进吸收,提高口服生物利用度,但是稳定性差, 易转变为晶体状态。本文采用偏光显微镜、扫描电子显微镜、差示扫描量热法、X-射线衍射法和拉曼光谱法等 研究无定形吲哚美辛的微观结晶机制,并对药物表面进行喷金包衣,厚度为10 nm,研究结晶行为变化。结果发 现,无定形吲哚美辛自由表面的结晶速率远大于其内部,金包衣可显著抑制自由表面的结晶。这提示,自由表面 的结晶是影响无定形药物稳定性的关键因素,纳米包衣可用于增强无定形药物的稳定性。

关键词:无定形;结晶;表面;纳米包衣;吲哚美辛

中图分类号: R943 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870 (2011) 06-0707-06

Microcosmic mechanisms of amorphous indomethacin crystallization and the influence of nano-coating on crystallization

OU-YANG Hui¹, YI Tao^{1, 2*}, ZHENG Qin¹, LIU Feng¹

(1. College of Pharmaceutical Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2 Macau Institute for Applied Research in Medicine and Health, Macau University of Science and Technology, Macau 000853, China)

Abstract: Amorphous drugs have higher solubility, better oral bioavailability and are easier to be absorbed than their crystalline counterparts. However, the amorphous drugs, with weak stability, are so easy to crystallize that they will lose the original advantages. Polarization microscope, scanning electron microscope, differential scanning calorimetry, X-ray diffractomer and Raman spectroscopy were used to study the microcosmic crystallization mechanisms of amorphous indometacin and the performance of the drug crystals. The results showed that the growth rate of amorphous indometacin crystals at the free surface was markedly faster than that through the bulk, and that the crystal growth rate decreased observably after spraying an ultrathin melting gold (10 nm) at the free surface of the drug. These results indicated that the high growth rates of amorphous drugs crystals at the free surface were the key to their stability and that an ultrathin coating could be applied to enhance the stability of amorphous drugs.

Key words: amorphou; crystallization; surface; nano-coating; indomethacin

一般情况下,药物无定形状态比晶态具有更大的溶解度和更好的吸收特性。将生物药剂学分类系统 II 类和 IV 类药物转变成无定形状态,可以提高溶解

收稿日期: 2010-11-23.

E-mail: konglingwater@hotmail.com

度和溶出速度,促进口服吸收,而且还能快速起效^[1]。 但是无定形药物的单位表面自由能很大,容易释放 能量,转变为晶体^[2,3]。一旦结晶后,无定形药物就会 失去原有高溶解度和高溶出率等优点。因此研究无定 形药物的结晶机制,探讨增强其稳定性的方法具有 重要意义。

以往无定形药物常常被视为一个均一的整体来 研究,如将药物分散于载体中制成固体分散体,依靠 高分子材料或表面活性剂来抑制其结晶^[4]。但目前仍

基金项目: 国家大学生创新性实验计划 (101063514); 重庆市自然科 学基金项目 (CSTC2009BB5106); 中央高校基本科研业务 费专项资金资助 (XDJK2009C076); 西南大学博士基金项 目 (SWUB2008032). *通讯作者 Tel / Fax: 86-23-68251225,

然没有理想的方法能有效抑制结晶,维持无定形药物的稳定性。这限制了无定形药物在药物制剂中的应用,上市药品中无定形药物很少。

本研究区分无定形药物的自由表面和内部,以 无定形吲哚美辛 (indomethacin, IMC) 为模型药,采 用偏光显微镜、扫描电子显微镜、差示扫描量热法、 X-射线衍射法和拉曼光谱法等研究其表面和内部的 结晶行为差异,由此探讨微观结晶机制,并进一步研 究表面纳米包衣对无定形药物结晶的影响。

材料与方法

试剂与仪器 IMC (含量>99.5%, 北京紫竹药 业有限公司), XP200B 双目型偏光显微镜 (上海万衡 精密仪器公司), DSC200PC (上海耐驰仪器有限公司), E-1010 离子镀膜机 (日本日立公司), S-3000 扫描电 镜 (日本日立公司), XD-2/3 多晶 X-衍射粉末衍射仪 (北京普析通用仪器有限责任公司), 傅里叶变换拉曼 光谱仪 (德国 Bruker 公司)。

模型药物的选择 Zhou 等^[5]研究表明, 无定形 药物的物理稳定性与位形熵和分子迁移率紧密相关, 具有高熵垒和低分子迁移率的药物不易结晶。预实验 中, 采用 DSC 法分别测得尼莫地平和 IMC 的熔融熵 和熔融焓, 计算结晶熵垒据此选择适宜的模型药物。 尼莫地平结晶熵垒高于 IMC, 结晶速率明显较慢。无 定形状态的尼莫地平和 IMC 相同条件下保存 3 d 后, 在偏光显微镜下可见, IMC 与尼莫地平相比晶体更分 散, 晶体的数目和大小更易观察 (图 1)。因此, 选择 无定形 IMC 作为模型药物。

结晶模型的制备 精密称取 IMC 3~5 mg 置于 干燥洁净的载玻片上,在 175 ℃条件下熔化至熔融 态,历时 2 min,此时药物由白色晶体转化为黄色熔 融态。立即用洁净的盖玻片盖于熔融的药品上,再将 其置于冰冷的两铝片之间,迅速冷却至室温,以得无 定形药物。冷却至室温后,移开铝片,得到模拟无定 形药物内部的模型;再移开盖玻片露出表面,得到模 拟无定形药物自由表面的模型;采用以离子镀膜机 对自由表面进行真空喷金,持续喷金 120 s,金包衣 的厚度控制在 10 nm,模拟对无定形药物自由表面进 行纳米包衣的模型。

结晶行为考察 以上 3 种模型均置于 55 ℃、相 对湿度 50%下保存,采用偏光显微镜 (POM)、扫描 电子显微镜 (SEM) 观察不同时间 3 种模型的结晶状 态,同时采用差示扫描量热法 (DSC)、X-射线衍射法 (XRD) 和拉曼光谱法 (RS) 检测。

DSC 测试条件: 样品在 N₂ 保护下开始检测, 以 10 ℃·min⁻¹ 的速度从 40 ℃加热至 175 ℃, 恒温 5 min 后, 以 10 ℃·min⁻¹的速度降温至 50 ℃。

XRD 测试条件: X 射线管为 Cu 靶; 单色化方法 为石墨单色器; 等电压 36 kV, 等电流 30 mA; 狭缝 DS = SS =1°、RS = 0.3 mm; 采样步宽: 0.02 度; 扫描 速度 2 deg·min⁻¹; 扫描的角度范围 2°~50°。

RS测试条件: RS 的激光强度为 200 mW, 扫描次数为 200, 扫描范围在 0~4 000 cm⁻¹之间, 分辨率为 4 cm⁻¹。

结果

1 POM 观察

POM 的工作原理是检测偏振光通过透明光学晶体材料后偏振态的变化,进而检测样品的偏振特性来确定样品的结构^[6]。因此采用 POM 可以检测无定形 IMC 的 3 种模型不同的偏振特性,直观地观察其表面结晶结构的差异。利用 POM 观察相同保存条件下无定形 IMC 自由表面、内部以及纳米包衣等 3 种模型不同时间的结晶状况,定性判断 3 种模型结晶行





以上偏光显微镜拍摄的相片均采用同一滤光条件,但是由于 C 组所镀金膜的滤光作用造成 C 组与 A、B 两组的背景颜色略有不同,但是这并不影响观察 晶体。

在图2的A组图片中可见,无定形药物自由表面的结晶程度随时间延长显著增加,晶体也明显增大, 到第5天视野几乎完全被晶体占据(A5)。B组图片 中可见无定形药物内部的结晶情况几乎保持不变, 前4天几乎不结晶(B1-B4),直至第5天才有很小的 晶粒出现(B5)。C组图片中可见无定形药物纳米包 衣处理后5天内几乎没有晶体出现。

以上 POM 结果显示,无定形药物自由表面的结 晶明显快于其内部,而表面 10 nm 的金包衣可以显著 抑制无定形药物自由表面的结晶。

2 SEM 分析

SEM 的工作原理是以电子束扫描样品,使得样品表面发出次级电子,次级电子的数量与电子束入射角有关,与样品的表面结构有联系。因此采用 SEM

可以直观地观察无定形 IMC 的 3 种模型表面结晶结构的差异,进而验证 POM 观察结果的准确性。

图 3A 所示为无定形 IMC 自由表面结晶模型, 图 中晶体粒度分布较宽, 表面不光滑、疏松, 结构为不 规则柱体, 像花蕾一样聚集成大小不等的团簇状, 尺 寸在 30 μm 左右。图 3B 所示为无定形 IMC 内部结 晶模型, 图中呈现的是比较均匀的玻璃态^[7], 在玻璃 结构中只有两个较明显的晶粒 (尺寸在 5 μm 左右)。 图 3C 所示为无定形 IMC 自由表面经纳米包衣处理后 的结晶模型, 图中呈现的是完整均匀的玻璃态, 只有 一处不明显的晶粒。SEM 观察结果与 POM 一致, 都 显示出无定形药物内部和自由表面结晶行为有明显 差异, 而纳米包衣可以抑制自由表面的结晶。

3 DSC 检测

DSC 的原理是利用物质在加热的过程中所显示的热效应改变,来判断样品的主要物相组成。无论样品是晶态还是非晶态,只要在加热过程中有明显的热效应变化,即可通过 DSC 加以鉴定或测定其主要成分。具体的说, DSC 图谱中吸热峰的大小反映着样



Figure 2 POM photomicrographs of IMC crystals grown (A) at the free surface, (B) in the bulk and (C) the sample coated with 10 nm of gold in 5 days



Figure 3 SEM photomicrographs of IMC crystals grown (A) at the free surface, (B) in the bulk and (C) the sample coated with 10 nm of gold

品中晶体的含量^[8]。因此,可采用 DSC 法定量地测 定无定形 IMC 的 3 种模型的结晶度,研究其结晶行 为的差异。相同保存条件下,无定形药物 IMC 自由 表面、内部和纳米包衣模型第 3 天的 DSC 检测结果 见图 4。



Figure 4 DSC traces of IMC crystals grown at the free surface, in the bulk and the sample coated with 10 nm of gold

由于表面纳米包衣的材料金和模型药物 IMC 的 熔点相差极大,在 DSC 图谱中金对 IMC 的吸热峰不 会有干扰,因此对 3 种模型结晶度的计算没有影响。 根据 DSC 法测得的吸热峰,按式 (1) 计算 3 种模型 的结晶度。以结晶度为纵坐标,保存时间为横坐标, 绘制 3 种模型的结晶度时间曲线 (图 5)。

$$F_{C} = \frac{\Delta H_{A}}{\Delta H} = \frac{kA/m}{k(A+B)/m} = \frac{A}{A+B} \qquad \vec{x} \quad (1)$$

其中, *F*_C为样品药物的结晶度, Δ*H*_A为样品中晶体物质的熔融焓即样品的熔融焓 (其大小由吸热峰面积决定), Δ*H* 为 IMC 原料晶体药物的熔融焓, *A* 为相应 DSC 曲线吸热峰面积, *A*+*B* 为 IMC 原料晶体药物吸热峰的总面积 (参考值为 109.073 8), *k* 为由实验



Figure 5 Crystallinities of IMC crystals grown at the free surface, in the bulk and the sample coated with 10 nm of gold

仪器与实验参数决定的仪器常数 (不影响计算结果), m 为测量样品的质量 (不影响计算结果)。

由图 5 可见, 无定形 IMC 自由表面和内部结晶 模型的结晶度相差很大。以第 1 天为例, 自由表面的 结晶度已达 21.87%, 而内部的结晶度仅为 10.31%。 对自由表面进行纳米包衣处理后结晶度明显下降, 如第 1 天的结晶度为 13.90%, 已与内部模型的结晶 度接近。随着保存时间的延长, 自由表面与内部及 纳米包衣模型之间的结晶度差异更加明显, 如第 15 天时 3 种模型的结晶度分别是 81.68%、39.69% 和 48.34%。

参照文献[9]对结晶度时间曲线进行数学处理, 以时间的对数值为横坐标,结晶度为纵坐标,绘制 半对数图 (图6),图中直线的斜率表示各模型的结晶 速率。



Figure 6 Growth rates of IMC crystals at the free surface, in the bulk and the sample coated with 10 nm of gold

由图 6 可见, 无定形 IMC 自由表面的结晶速率 比其内部结晶速率快得多, 而对表面纳米包衣处理 后, 结晶速率明显下降, 接近内部模型的结晶速率。

4 XRD 检测

由于晶体具有周期结构,使入射到晶体上的电磁辐射的方向和强度发生改变。衍射的方向和强度取决于晶体的对称、空间点阵的类型、晶胞参数和晶胞中所有原子的分布。因此,利用衍射效应可以区别结晶质与非晶质,也可以对样品结晶度进行分析。利用XRD 法检测无定形 IMC 自由表面、内部和纳米包衣3 种模型相同条件下保存第 3 天的结晶状态。20 为衍射角。结果显示,无定形 IMC 自由表面模型与内部模型、纳米包衣模型的结晶状态有明显差异,与 DSC 的检测结果一致。

由 3 种模型的 XRD 图 (图 7) 可见在 2°<2θ<50° 之间,自由表面模型的衍射峰很明显,不仅数目多, 而且峰值较大。而内部模型出现了较大较宽的晕,并 且没有尖峰存在,显示其结晶度很小,大部分是非结 晶态组成^[10]。纳米包衣模型与内部模型相似,呈现较 大的晕 (强度略低于内部模型),而且也没有尖峰。这 说明,无定形药物的自由表面经过纳米包衣处理后, 结晶率明显下降,无定形态的稳定性提高。



Figure 7 XRD patterns of IMC crystals grown at the free surface, in the bulk and the sample coated with 10 nm of gold

5 RS 检测

RS 的谱峰位置是样品分子电子能级基态的振动 态性质的反映,峰位的移动与样品的分子结构有关。 拉曼散射强度与产生谱线的特定物质的浓度有关, 呈正比。因此采用 RS 可以比较无定形 IMC 的 3 种 模型结晶行为的差异,通过比较同一峰位峰值的大 小可以分析三者的结晶度的差异。由图 8 可见,自由 表面模型的拉曼光谱图呈现一系列明显的基团频率 振动峰,尤其是 1 800 cm⁻¹和 3 000 cm⁻¹处的尖峰; 内部模型的拉曼光谱图中也有相同波数下的峰,但 是峰值要小很多;而纳米包衣模型的拉曼光谱图中 只显示一荧光包^[11]。这反映 3 种结晶模型中结晶态 IMC 的比例大小不同,即无定形 IMC 自由表面模型



Figure 8 Raman spectra of IMC crystals grown at the free surface, in the bulk and the sample coated with 10 nm of gold

的结晶度要比内部模型明显高很多, 而经过纳米包 衣处理后其结晶度显著降低。

讨论

无定形药物结晶是一个非常复杂的过程,其影响因素主要有两个:晶核的形成和晶体的生长^[12]。这两个因素与温度的相关性很明显:一般条件下,低温 有利于晶核的形成,而高温有利于晶体的生长。因此,最有利于无定形或者其他亚稳态转变成晶体的 温度介于这两个温度之间。本实验采用高温熔化晶 体制得无定形态 IMC,将无定形态 IMC 放在冰冷 的两铝片之间,迅速冷却至室温,以获得良好的晶 核胚。

无定形药物在常规的保存温度下,其玻璃转换 温度如果低于60 ℃ (IMC的玻璃转换温度为42 ℃), 其表面就会呈现液态状,然而内部却是固体状^[6]。从 结晶动力学的角度分析,在常规存储过程中,无定形 药物的液体状表面具有更大的流动性、更快速的迁移 动力及更高能量等一系列不稳定因素;在液体状表 面最外层的纳米级的分子层与其他区域的低能态的 分子相比,其分子活性和分子动力更显著,因而对无 定形药物的结晶起决定性作用^[13]。

基于以上微观结晶机制,本研究对无定形药物 进行表面纳米金包衣,抑制无定形药物表面活跃的 分子层,结果显示能够有效地抑制无定形药物的结 晶;而且也有研究^[6]表明,无定形药物经过表面纳米 金包衣之后,其固有溶出速率比相对应的晶体药物 至少快5倍,能够显著提高药物溶出速率。

结论

本研究区分无定形药物的自由表面和内部,以 无定形 IMC 为模型药物,采用偏光显微镜、扫描电 子显微镜、差示扫描量热法、X-射线衍射法和拉曼光 谱法研究其表面和内部的结晶行为,发现相同保存 条件下无定形 IMC 自由表面和内部的结晶行为有明 显差异,自由表面的结晶速率远大于其内部。对自由 表面进行纳米包衣处理后,结晶速率明显下降至内 部结晶水平;而包衣的厚度仅为 10 nm,只能接触到 无定形药物液体状表面最外层的纳米级的分子层, 因而也说明通过抑制无定形药物表面的极高的结晶 速率,可以抑制无定形药物的结晶。这提示,纳米包 衣是维持无定形药物稳定的有效方法。

References

- Ying J, Lü Y, Du GH. Progress in the research of amorphous pharmaceuticals [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2009, 44: 443-448.
- [2] Johari GP, Ram S, Astl G. Characterizing amorphous and microcrystalline solids by calorimetry [J]. J Non-Cryst Solids, 1990, 116: 282–285.
- [3] Mishima O, Calvert LD, Whalley E. An apparently firstorder transition between two amorphous phases of ice induced by pressure [J]. Nature, 1985, 314: 76–78.
- [4] Andronis V, Yoshioka M, Zografi G. Effects of sorbed water on the crystallization of indomethacin from the amorphous state [J]. J Pharm Sci, 1997, 86: 346–351.
- [5] Zhou D, Zhang G, Law D, et al. Physical stability of amorphous pharmaceuticals: importance of configurational thermodynamic quantities and molecular mobility [J]. J Pharm Sci, 2002, 91: 1863–1872.
- [6] Wu T, Sun Y, Li N, et al. Inhibiting surface crystallization of amorphous indomethacin by nanocoating [J]. Langmuir, 2007, 23: 5148–5153.
- [7] Jung CK, Lim DC, Jee HG, et al. Hydrogenated amorphous and crystalline SiC thin films grown by RF-PECVD and

thermal MOCVD; comparative study of structural and optical properties [J]. Surf Coat Technol, 2002, 171: 46–50.

- [8] Yonemochi E, Hoshino T, Yoshihashi Y, et al. Evaluation of the physical stability and local crystallization of amorphous terfenadine using XRD-DSC and micro-TA [J]. Thermochim Acta, 2005, 432: 70–75.
- [9] Zhu L, Wong L, Yu L. Surface-enhanced crystallization of amorphous nifedipine [J]. Mol Pharm, 2008, 5: 921–926.
- [10] Chen XM, Bates S, Morris KR. Quantifying amorphous content of lactose using parallel beam X-ray powder diffraction and whole pattern fitting [J]. J Pharm Biomed Anal, 2001, 26: 63–72.
- [11] Savolainen M, Kogermann K, Heinz A. Better understanding of dissolution behaviour of amorphous drugs by *in situ* solidstate analysis using Raman spectroscopy [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2009, 71: 71–79.
- [12] Yu L. Amorphous pharmaceutical solids: preparation, characterization and stabilization [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2001, 48: 27–42.
- [13] Bell RC, Wang H, Iedema MJ, et al. Nanometer-resolved interfacial fluidity [J]. J Am Chem Soc, 2003, 125: 5176– 5185.