

· 制剂与质量 ·

水飞蓟宾纳米粒的制备及其理化性质研究

胡霓霓¹, 谭群友², 魏农农³, 杨帆², 张景勃^{1*}

(1. 重庆医科大学 生物化学与分子药理学重点实验室, 药物高校工程研究中心, 重庆 400016; 2. 第三军医大学大坪医院野战外科研究所, 重庆 400042; 3. 国家食品药品监督管理局 国家新药评审中心, 北京 400010)

摘要:目的 制备水飞蓟宾纳米粒并对其进行质量评价。方法 采用乳化-蒸发-固化法制备水飞蓟宾纳米粒, 以包封率、多分散指数、载药量等为评价指标优化制备工艺。考察体外释药规律, 考察 3~5、15~25、37 (相对湿度为 75%) 条件下纳米粒的稳定性。结果 以硬脂酸和表面活性剂为载体材料, 优化工艺制备的水飞蓟宾纳米粒包封率为 96.88%, 多分散指数为 0.168, 载药量为 7.55%。差示量热分析确证形成了纳米粒, 水飞蓟宾以无定形态分散在纳米粒内。纳米粒体外释放缓慢, 可用 Higuchi 方程拟合。纳米粒静置观察具有良好的稳定性。结论 采用乳化-蒸发-固化法可制备得到水飞蓟宾纳米粒, 工艺简便, 粒径和分散度小, 包封率和载药量高, 体外释药缓慢, 稳定性好。

关键词:水飞蓟宾纳米粒; 差示量热扫描仪; 稳定性

中图分类号:R286.02 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2009)09-1384-04

Preparation and physicochemical characterization of silibinin nanoparticles

HU Ni-ni¹, TAN Qun-you², WEI Nong-nong³, YANG Fan², ZHANG Jing-qing¹

(1. Chongqing Key Laboratory of Biochemical & Molecular Pharmacology, Medicine Engineering Research Center in University, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 2. Institute of Surgical Field, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China; 3. Center for Drug Evaluation, State Food and Drug Administration, Beijing 100810, China)

Abstract: **Objective** To prepare silibinin nanoparticles and investigate their properties. **Methods** Silibinin nanoparticles were prepared by the emulsion evaporation-solidification method at low temperature. The entrapment efficiency, polydispersity index, drug loading were set as evaluation indexes to optimize the preparation processing. Drug release from nanoparticles and the stability of nanoparticles were investigated at the different temperatures of 3 - 5, 15 - 25, and 37, respectively, and with the relative humidity of 75%. **Results** Taking stearic acid and surfactant Brij 78 as carrier, the entrapment efficiency of silibinin nanoparticles prepared by optimized technology was up to 96.88%, the dispersion index of the smallest was 0.168, and drug loading was 7.55%. Analysis by using differential scanning calorimetry showed that silibinin was dispersed in the nanoparticles at an amorphous state. The *in vitro* silibinin released slowly from nanoparticles and the release profile fitted well into Higuchi equation. Nanoparticles were stable under storage conditions. **Conclusion** Silibinin nanoparticles could be prepared by the emulsion evaporation-solidification method, with the advantages of techniques simple, diameter and dispersion small, entrapment efficiency and drug loading high, *in vitro* release slow, and stability good.

Key words: silibinin nanospheres; differential scanning calorimetry (DSC); stability

水飞蓟宾是由菊科植物水飞蓟 *Silybum marianum* (Linn.) Gaertn. 种皮中提取精制而得的天然黄酮木质素类化合物, 抗氧化性强, 可促进细胞蛋

白再生和修复, 在保肝、调血脂、保护心肌、保护脑缺血、抗血小板聚集、防治动脉粥样硬化等方面显示出良好的治疗效果。由于水飞蓟宾难溶于水, 口服吸

* 收稿日期: 2008-12-06

基金项目: 重庆市首批高等学校优秀人才资助计划项目; 重庆医科大学创新基金项目

作者简介: 胡霓霓(1986→), 女, 重庆人, 硕士研究生, 研究方向为药物新型递药系统与新技术。

*通讯作者 张景勃 Tel:(023)68485816 E-mail: zjqrae01@163.com

收差,生物利用度低,影响了其临床疗效^[1,2]。纳米粒载药系统具有增加药物的吸收和生物利用度,控制药物的释放,提高药物的稳定性等优点。由于通常的药物纳米粒容易被网状内皮系统识别而从体内迅速清除,本研究选用内源性的脂质硬脂酸和非离子性表面活性剂苜泽制备纳米粒^[3,4],苜泽 78 是硬脂酸与聚乙二醇 1000 的缩合物^[5],亲脂端为硬脂基,与载体材料硬脂酸一致,亲水端为聚乙二醇 1000 长链,亲水性的聚乙二醇长链有效地结合在纳米粒的表面,保护纳米粒不与血液中的调理素结合,血药浓度长时间保持较高水平。本实验优化了水飞蓟宾纳米粒的制备工艺,考察了其体外释药特性及初步稳定性,为开发临床可供选择的水飞蓟宾新型给药系统提供参考。

1 仪器与材料

Hitachi S-2600N 扫描电镜、DSC-50 型差示量热扫描仪(日本日立公司);3000HS 激光粒度电位仪(英国马尔文公司);UV5130 型紫外分光光度计(日本岛津公司)。

水飞蓟宾(质量分数 98%)、硬脂酸(质量分数 98.5%)、苜泽(美国 Sigma 公司)、丙酮(HPLC 级,美国 Spectrum 公司),其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 水飞蓟宾的测定

2.1.1 检测波长的选择:称取适量的水飞蓟宾对照品,用乙醇配成澄清溶液,在 200~400 nm 扫描,结果表明水飞蓟宾在 289 nm 处有最大吸收,而辅料和空白制剂在此处无吸收,不干扰测定,故选择 289 nm 作为水飞蓟宾的紫外检测波长^[6]。

表 1 硬脂酸用量对水飞蓟宾纳米粒参数的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Effect of varying concentration of stearic acid on parameters of silibinin nanoparticles ($\bar{x} \pm s, n=3$)

硬脂酸/mg	包封率/%	PI	载药量/%	粒径/nm	电位/mV	电位宽度/mV
150	97.53 ± 0.09	0.186 ± 0.035	5.92 ± 0.59	203.9 ± 6.6	-21.2 ± 3.36	2.1 ± 1.4
180	95.95 ± 0.34	0.238 ± 0.046	4.21 ± 0.36	221.2 ± 6.0	-27.3 ± 3.90	5.2 ± 4.0
210	97.56 ± 0.10	0.164 ± 0.060	4.03 ± 0.22	238.8 ± 6.5	-31.7 ± 3.90	1.8 ± 0.8
240	96.69 ± 0.14	0.313 ± 0.039	3.17 ± 0.11	367.7 ± 11.1	-21.2 ± 2.00	7.7 ± 4.7

表 2 苜泽用量对水飞蓟宾纳米粒参数的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effect of varying concentration of Brij 78 on parameters of silibinin nanoparticles ($\bar{x} \pm s, n=3$)

苜泽/mg	包封率/%	PI	载药量/%	粒径/nm	电位/mV	电位宽度/mV
80	98.94 ± 0.05	0.118 ± 0.096	3.92 ± 0.03	215.9 ± 23.1	-25.7 ± 5.2	2.1 ± 0.8
110	98.09 ± 0.36	0.191 ± 0.085	3.69 ± 0.18	204.7 ± 17.5	-20.5 ± 8.9	1.6 ± 0.2
140	94.84 ± 1.23	0.199 ± 0.074	3.70 ± 0.26	259.1 ± 23.1	-22.3 ± 11.2	10.8 ± 9.5
170	95.27 ± 0.31	0.313 ± 0.049	3.40 ± 0.04	269.3 ± 66.7	-20.1 ± 2.9	4.6 ± 4.2

2.2.3 投药量对纳米粒的影响:固定硬脂酸用量为 210 mg,苜泽用量为 80 mg,考察投药量对纳米粒的影响,结果见表 3。在考察范围内,水飞蓟宾投药量

2.1.2 线性回归方程的制备:精密称取水飞蓟宾对照品适量,加乙醇溶解并稀释,定容,作为储备液。精密量取储备液 2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0 mL 于 100 mL 量瓶中,加乙醇定容,在 289 nm 处测定吸光度。以质量浓度(C)对吸光度(A)进行线性回归,得 $A = 0.048\ 03\ C + 0.00\ 735, r = 0.999\ 9$ 。结果表明,水飞蓟宾在 4.6~17.0 μg/mL 呈良好的线性关系。

2.2 单因素法考察水飞蓟宾纳米粒处方:经过大量预试验确定了制备容器的形状、丙酮的用量、乳剂的浓缩时间、有机相的挥发时间、水浴温度及时间、磁力搅拌子的形状和大小、磁力搅拌的强度和时间的、固化温度和时间等。以球形粒径范围、多分散指数(polydispersity index,PI)、电位值、包封率、载药量、结构完整性和缓释特性为评价指标。其中主要考虑包封率和作为一致性指标的 PI 的大小。能够得到最大包封率和最小 PI 的处方将用于进一步的研究。

2.2.1 脂质用量对纳米粒的影响:固定苜泽用量为 100 mg,水飞蓟宾用量为 10 mg,考察脂质用量对纳米粒的影响,结果见表 1。硬脂酸用量为 210 mg 时,包封率最高,PI 值最小,此时粒径较小,电位较低,宽度最小,纳米粒较稳定,故选择硬脂酸用量为 210 mg。

2.2.2 表面活性剂和空间稳定剂用量对纳米粒的影响:固定硬脂酸用量为 210 mg,水飞蓟宾用量为 10 mg,考察表面活性剂和空间稳定剂苜泽用量对纳米粒的影响,结果见表 2。在试验范围内,苜泽用量越低,包封率越高,PI 值最小,而且苜泽的用量较低时,载药量最高,粒径较小,电位较低,宽度较小,纳米粒较稳定,故选择苜泽用量为 80 mg。

为 20 mg 时,包封率最高,PI 值最小,此时粒径最小,电位较低,宽度最小,纳米粒较稳定,故选择水飞蓟宾用量为 20 mg。

表 3 水飞蓟宾用量对水飞蓟宾纳米粒参数的影响 (x ± s, n = 3)

Table 3 Effect of varying concentration of silibinin on parameters of silibinin nanoparticles (x ± s, n = 3)

水飞蓟宾/mg	包封率/%	PI	载药量/%	粒径/nm	电位/mV	电位宽度/mV
10	95.25 ± 0.39	0.192 ± 0.012	3.91 ± 0.12	202.1 ± 18.4	-34.0 ± 6.4	1.6 ± 0
20	96.88 ± 0.85	0.168 ± 0.050	7.55 ± 0.22	178.9 ± 5.5	-25.0 ± 1.7	1.6 ± 0
30	96.63 ± 0.24	0.225 ± 0.018	9.51 ± 1.76	273.4 ± 64.2	-26.3 ± 1.3	2.4 ± 1.7
40	95.24 ± 0.36	0.467 ± 0.020	12.43 ± 1.36	387.0 ± 131.4	-18.7 ± 1.8	5.4 ± 3.9

2.3 优化的水飞蓟宾纳米粒的制备工艺:将 210 mg 硬脂酸和 20 mg 水飞蓟宾在磁力搅拌下加入 5 mL 丙酮,于(40 ± 2) 恒温水浴中使完全溶解,得到有机相,将 80 mg 芩泽溶于 30 mg 水中,得到水相,加热水相至(75 ± 2)。在高速磁力搅拌下,将有机相加入至水相中,得到脂质乳剂,保持恒温约 3.5 h,使有机溶剂挥发,乳剂浓缩至 7 mL,将此浓缩乳剂在中高速磁力搅拌下迅速加入至 7 mL 冰水中,固化的纳米粒再用冷水加至 15 mL,即得到水飞蓟宾纳米粒。

2.4 水飞蓟宾纳米粒的理化性质

2.4.1 水飞蓟宾纳米粒的形态学研究:取少量水飞蓟宾纳米粒,以 1 : 10 的比例稀释,固化和脱水,喷于金粒薄层上,用扫描电镜放大适宜倍数观察和拍照,结果见图 1。可见水飞蓟宾纳米粒比较圆整,粒度分布较窄,分散性较好。

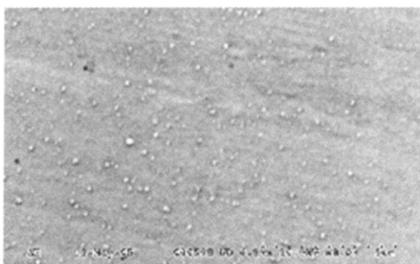


图 1 水飞蓟宾纳米粒的扫描电镜图

Fig 1 Scanning microphotograph of silibinin nanoparticles

2.4.2 水飞蓟宾纳米粒的粒径和粒度分布研究:取少量水飞蓟宾纳米粒,以 1 : 15 的比例稀释后,在 25 下用激光粒度电位仪测定平均粒径和 PI,见图 2。结果显示优化处方得到的水飞蓟宾纳米粒平均粒径为(178.9 ± 5.5) nm,PI 为 0.168 ± 0.05。电位为(-25.0 ± 1.7) mV,宽度为(1.6 ± 0) mV。

2.4.3 水飞蓟宾纳米粒的包封率和载药量的测定:精密量取水飞蓟宾纳米粒适量,加入 5% 乙醇适量,10 000 × g 超速离心 30 min 分离游离药物,转移上清液,挥干溶剂并用乙醇定量至 4 mL,在 289 nm 处用紫外分光光度法进行测定,计算包封率[包封率 = (投入药量 - 游离药量)/投入药量 × 100%]和载药量[载药量 = 测得的药量/固体脂质总量 × 100%]。

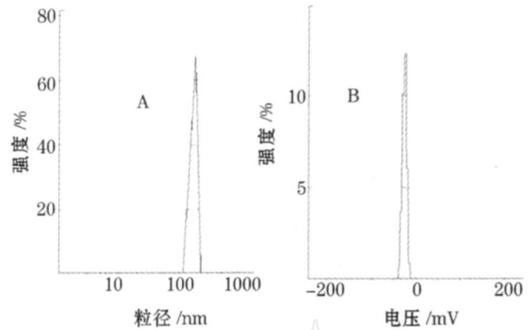
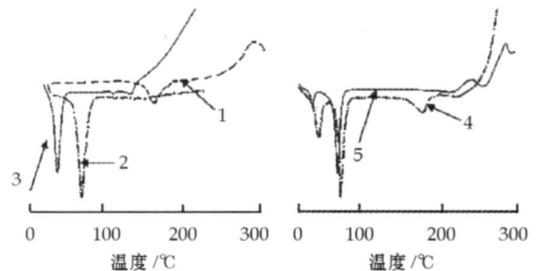


图 2 水飞蓟宾纳米粒的粒度分布(A)和 电位图(B)
Fig 2 Particle size (A) and zeta potential (B) of silibinin nanoparticles

结果优化配方所得的水飞蓟宾纳米粒的包封率和载药量分别为 96.88% ± 0.85%、7.55% ± 0.22%。

2.4.4 水飞蓟宾纳米粒的热分析:将水飞蓟宾、硬脂酸、芩泽、水飞蓟宾与各辅料的混合物、水飞蓟宾纳米粒用 DSC 分析仪进行差示扫描热(differential scanning calorimetry, DSC)分析。测定条件为升温速率 10 / min,测定气氛为 N₂,扫描范围 25 ~ 300。测定结果见图 3。水飞蓟宾在 164 有熔点峰,而药物与辅料的机械混合物保留了药物和各辅料的特征峰,基本上是水飞蓟宾和各辅料的叠加,而在纳米粒的图谱上,在 164 (水飞蓟宾的熔点峰值)处无峰,说明药物以无定形态包封于纳米粒中。



1-水飞蓟宾 2-硬脂酸 3-芩泽
4-水飞蓟宾与各辅料的混合物 5-水飞蓟宾纳米粒
1-silibinin 2-stearic acid 3-Brij 78 4-physical mixture
5-silibinin nanoparticles

图 3 水飞蓟宾及其制剂的差示扫描热图谱

Fig 3 DSC Curves of silibinin and its preparations

2.4.5 水飞蓟宾纳米粒的体外释放:取含有 20 mg 水飞蓟宾的纳米粒置于透析袋中,置于释放介质乙

醇-水(10:90)200 mL 中, (37 ± 0.5) °C 水浴振荡 (50 r/min)。不同时间点取样 5 mL (同时补加 5 mL 释放介质), 采用紫外分光光度法测定释放介质中的药物质量浓度, 计算累积释放率。同法测定水飞蓟宾原药的体外释放。结果见图 4, 水飞蓟宾为水不溶性药物, 在体外环境中可缓慢释放, 约 1 d 后基本释放完全。制成纳米粒后, 释放时间可长达 5 d, 且释放较平缓。体外释药时, 自由度为 $n - 2$, 当 $\alpha = 0.01$ 时, 相关系数临界值 $r = 0.917$, Higuchi 方程拟合释药情况时 $r = 0.9893 > r(4, 0.01)$, 相关性非常显著, 说明体外释药规律可以用 Higuchi 方程 $Q = 0.3323 t^{1/2} - 0.2834$ 拟合。

2.5 水飞蓟宾纳米粒的稳定性考察: 将水飞蓟宾纳米粒密封, 分别置冰箱内 3~5 °C、室温(15~25 °C)

表 4 水飞蓟宾纳米粒的 3 个月稳定性考察结果 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 4 Parameter changes of silibinin nanoparticles stored under different conditions for three months ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

考察条件	包封率/ %	PI	载药量/ %	粒径/ nm	电位/ mV	电位宽度/ mV
考察前	96.88 ± 0.85	0.168 ± 0.050	7.55 ± 0.22	178.9 ± 5.5	-25.0 ± 1.7	1.6 ± 0.0
3~5 °C	96.03 ± 0.77	0.172 ± 0.039	7.36 ± 0.41	176.2 ± 7.3	-29.6 ± 2.0	1.5 ± 1.2
15~25 °C	95.43 ± 0.34	0.169 ± 0.072	7.50 ± 0.19	181.3 ± 4.6	-27.2 ± 3.8	1.6 ± 0.4
37 °C	95.37 ± 0.96	0.178 ± 0.091	7.49 ± 0.32	185.6 ± 3.2	-24.8 ± 4.5	1.6 ± 0.9

3 讨论

曾选用各种形状的搅拌子进行了水飞蓟宾纳米粒的制备, 最终选用了多边形搅拌子(直径为 4.8 mm, 长度为 22.2 mm)。制备 O/W 型乳剂时需高速搅拌, 而在冷却过程中需用中速搅拌。有机相加入至水相的速度对制备 O/W 型乳剂影响很大。开始的 5 mL 丙酮液需滴加至水相, 前一滴需完全混合均匀后才能滴加下一滴。另一方面, 乳剂固化时, 需将温热的水飞蓟宾纳米粒迅速倾倒入冷却的蒸馏水中。脂质、表面活性剂和稳定剂、药物用量都会影响水飞蓟宾纳米粒的包封率和多分散指数。苯泽的用量在一定范围内对药物的包封率产生负影响, 可能是因为苯泽的增加相应地减少了形成纳米粒的脂质用量。当水飞蓟宾用量为 20 mg 时, 包封率最高为 96.88%, 表明脂质的用量较大(20% 以上), 得到的是富含药纳米核模型的纳米粒, 纳米粒的载药空间有限, 实验结果同相关文献报道^[7]一致。通过改变处方和制备工艺条件, 可以使水飞蓟宾很好地包封于纳米粒中, 得到的水飞蓟宾纳米粒具有适宜的粒径、形状、包封率和稳定性。

曾采用磷酸缓冲液(pH 7.4)为释放介质, 紫外

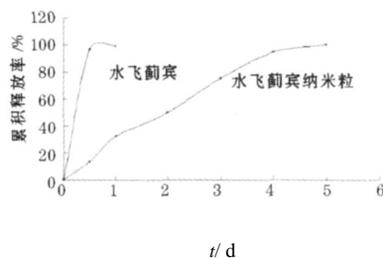


图 4 水飞蓟宾及其制剂的体外释放曲线

Fig 4 In vitro release curves of silibinin and its preparations

与 37 °C (相对湿度为 75%) 放置 3 个月, 定期进行各项指标的考察, 结果见表 4。水飞蓟宾纳米粒放置 3 个月, 外观、色泽、粒径及分布、电位及电位宽度、包封率、载药量、PI、体外释放情况基本没有改变, 初步稳定性试验说明水飞蓟宾纳米粒的稳定性较好。

分光光度法测定药物体外释放情况, 结果表明实验条件下所有样品的吸光度都在检测限下(数据未报道), 几乎无药物在 5 d 内释放出来。此结果证实了水飞蓟宾纳米粒的释放极慢, 在纳米粒度范围的水飞蓟宾纳米粒缓释效果明显。

参考文献:

- [1] Comelli M C, Mengs U, Schneider C, et al. Toward the definition of the mechanism of action of silymarin: activities related to cellular protection from toxic damage induced by chemotherapy [J]. *Integr Cancer Ther*, 2007, 6(2): 120-129.
- [2] An R B, Sohn D H, Jeong G S, et al. In vitro hepatoprotective compounds from *Suaeda glauca* [J]. *Arch Pharm Res*, 2008, 31(5): 594-597.
- [3] 刘红梅, 褚惠媛, 崔金霞, 等. 薄膜-超声分散法制备 - 榄香烯固体脂质纳米粒[J]. *中草药*, 2008, 39(2): 193-195.
- [4] Shidhaye S S, Vaidya R, Sutar S, et al. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers—innovative generations of solid lipid carriers [J]. *Curr Drug Deliv*, 2008, 5(4): 324-331.
- [5] Wu M, Dellacherie E, Durand A, et al. Poly(n-butyl cyanoacrylate) nanoparticles via miniemulsion polymerization. 2. PEG-based surfactants [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2009, 69(1): 147-151.
- [6] Song Y, Zhuang J, Guo J, et al. Preparation and properties of a silybin-phospholipid complex [J]. *Pharmazie*, 2008, 63(1): 35-342.
- [7] Souto E B, Müller R H. Cosmetic features and applications of lipid nanoparticles (SLN, NLC) [J]. *Int J Cosmet Sci*, 2008, 30(3): 157-165.