

## 以甘草酸为稳定剂制备水飞蓟素纳米混悬剂及稳定机制研究

唐海龙, 李小芳\*, 龙家英, 邓茂, 谢龙, 廖艳梅

成都中医药大学药学院, 中药材标准化教育部重点实验室, 四川省中药资源系统研究与开发利用重点实验室——省部共建国家重点实验室培育基地, 四川 成都 611137

**摘要:** **目的** 制备以甘草酸为稳定剂的水飞蓟素纳米混悬剂 (silymarin nanosuspension, SM-NS), 并考察体外释放特性和电荷稳定机制。**方法** 用高速剪切-高压均质法制得 SM-NS, 用冷冻干燥法制成 SM-NS 冻干粉并进行理化特性表征和体外释放特性评价。从离子强度, pH 值的角度对 SM-NS 进行了稳定机制研究。**结果** 稳定剂甘草酸 (GA) 用量为 0.15%, 制备工艺为剪切速率 19 000 r/min、剪切时间 4 min、均质压力 100 MPa、均质次数 12 次, 冻干保护剂为甘露醇, 其用量 3%, 制得的 SM-NS 冻干粉平均粒径为  $(516.4 \pm 10.4)$  nm, 多分散指数 (PDI) 为  $0.260 \pm 0.046$ ; 体外释放结果表明 SM-NS 冻干粉的溶出速率和溶解度显著提高; 电荷稳定机制研究表明甘草酸能提供良好的电荷稳定作用, 抗环境冲击能力较强。**结论** SM-NS 是一种潜在的安全性高的新型纳米药物, 其通过甘草酸的电荷稳定作用显著提高水飞蓟素的溶解度及稳定性。

**关键词:** 纳米混悬剂; 水飞蓟素; 甘草酸; 制备工艺; 稳定机制; 高速剪切-高压均质技术; 释放特性; 冷冻干燥法; 溶解度; 稳定性

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)04-0971-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.04.022

## Preparation of silymarin nanosuspension with glycyrrhizic acid as stabilizer and study of its stabilization mechanism

TANG Hai-long, LI Xiao-fang, LONG Jia-ying, DENG Mao, XIE Long, LIAO Yan-mei

Key Laboratory of Research and Utilization of Chinese Medicinal Resources in Sichuan Province, Key Laboratory Breeding Base of Co-founded by Sichuan Province and Ministry of Science and Technology, Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicine of Ministry of Education, College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

**Abstract: Objective** To prepare silymarin nanosuspension (SM-NS) with glycyrrhizic acid as stabilizer, and investigate the *in vitro* release characteristics and charge stabilization mechanism. **Methods** SM-NS was prepared by high-speed shear-high pressure homogenization method. SM-NS lyophilized powder were prepared by freeze-drying method and characterized by physical and chemical characterization and *in vitro* release. The stability mechanism of SM-NS was studied from the ionic strength and pH value. **Results** The dosage of glycyrrhizic acid (GA) was 0.15%. The preparation process was shear rate of 19 000 r/min, shear time of 4 min, homogenization pressure of 100 MPa, homogenization times of 12 times, and lyoprotectant was mannitol 3%, the average particle size of SM-NS lyophilized powder was  $(516.4 \pm 10.4)$  nm, PDI was  $(0.260 \pm 0.046)$ ; The *in vitro* release results showed that the dissolution rate and solubility of SM-NS lyophilized powder were significantly higher than the physical mixture; The study of charge stability mechanism showed that licorice acid can provide good charge stabilization and strong resistance to environmental impact. **Conclusion** SM-NS is a potential and new nano-drug with high safety, which is formed by the charge stability of GA to significantly improve the solubility and stability of silymarin.

**Key words:** nanosuspension; silymarin; glycyrrhizic acid; preparation process; stabilization mechanism; high-speed shear-high pressure homogenization; release characteristics; freeze-drying method; solubility; stability

收稿日期: 2019-09-29

基金项目: 四川省科技厅项目 (2019YFS0113); 国家中医药管理局项目 (2018ZY03002)

作者简介: 唐海龙, 男, 硕士研究生, 研究方向为中药新制剂、新剂型、新技术。Tel: 18883893801 E-mail: 1106407573@qq.com

\*通信作者 李小芳, 女, 博士生导师, 研究方向为中药新制剂、新剂型、新技术。Tel: 13808195110 E-mail: lixiaofang918@163.com

水飞蓟素 (silymarin) 为菊科水飞蓟属植物水飞蓟 *Silybum marianum* (L.) Gaertn. 的种子提取物, 其由水飞蓟宾、异水飞蓟宾、水飞蓟宁、水飞蓟亭等黄酮类成分组成, 其中水飞蓟宾含量最高<sup>[1-2]</sup>, 水飞蓟素具有治疗非酒精性脂肪性肝病、治疗药物性肝损伤、改善学习记忆作用、抗肿瘤、抗肝纤维化、抗肾小管间质纤维化、抗肿瘤、抗炎及治疗糖尿病等药理作用<sup>[3-10]</sup>。然而, 水飞蓟素溶解度低、溶出慢, 口服生物利用度低<sup>[11-12]</sup>, 使其疗效的发挥及临床应用均受限。

甘草酸 (glycyrrhizic acid, GA), 又名甘草甜素, 是一种含有葡萄糖醛酸的三萜皂苷, 具有抗炎、抗肿瘤和抑制肝细胞坏死等作用<sup>[13-17]</sup>。其作为一种高甜度、低热量、安全无毒的非热源性甜味剂 (甜度约为蔗糖的 200~250 倍) 广泛用于各种食品生产。现代研究表明 GA 具有表面活性剂的性质, 能够在水溶液中形成胶束而对难溶性成分起到增溶作用<sup>[18-19]</sup>。然而, 对于甘草酸作为水飞蓟素纳米混悬剂 (silymarin nanosuspension, SM-NS) 的稳定剂是否可行, 电荷稳定作用是否发挥了稳定能力, 鲜有文献报道。本实验通过制备出成型的 SM-NS, 并探究电荷稳定作用对 SM-NS 成型的影响, 以期水飞蓟素的新剂型开发提供基础。

## 1 仪器与试剂

Nicomp 380ZLS 型激光粒度分析仪, 美国 PSS 公司; AH-100D 型高压均质机, 加拿大 ATS 公司; ZRS-8G 型智能溶出试验仪, 天津市天大天发科技有限公司; SJIA-10N-50 型冷冻干燥机, 宁波市双嘉仪器有限公司; 高剪切分散乳化均质机 C25, 上海恒川机械设备有限公司; Agilent 1200 高效液相色谱仪, 美国 Agilent 公司。

水飞蓟素原料药 (批号 GL20190508, 质量分数 80%)、GA (批号 GB201905021, 质量分数 98%), 西安小草植物科技有限责任公司; 甘露醇、乳糖、山梨醇, 成都市科龙化工试剂厂; 水飞蓟宾对照品, 批号 MUST-18101702, 质量分数 98.89%, 成都曼思特生物科技有限公司; 甲醇, 赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; 超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 SM-NS 的制备

采用高速剪切-高压均质法进行制备。称取 0.15 g 稳定剂 GA 于 100 mL 纯水中超声使溶解, 再加入 1.0 g 水飞蓟素, 超声, 用高速剪切机将药物剪为粗

混悬液。将药物的粗混悬液转入高压均质机, 在一定压力下均质数次, 即得 SM-NS。

**2.1.1 平均粒径、多分散指数 (PDI) 的测定** 取制备好的 SM-NS 200  $\mu$ L, 用纯水稀释至 25 mL, 采用纳米激光粒度仪测定其粒径及 PDI, 平行测定 3 次, 取平均值。

**2.1.2 稳定剂用量** 选择的稳定剂为 GA, 药物水飞蓟素质量浓度为 10 g/L, 于 16 000 r/min 剪切转速下操作 2 min, 置于 30 MPa 压力下均质 6 次, 100 MPa 下均质 15 次, 对稳定剂用量进行考察, 结果见表 1。随着稳定剂用量的增加, 平均粒径先减小后增大再减小, PDI 先减小后增大再减小, 当稳定剂用量达 0.3% 时, 所制备的 SM-NS 存在轻微沉淀, 用量达 0.4% 时, 制备的 SM-NS 有沉淀且不稳定。因此选择稳定剂 GA 的用量为 0.15%。

表 1 稳定剂 (GA) 用量对 SM-NS 平均粒径及 PDI 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 1 Effect of stabilizer dosage (GA) on average particle size and PDI of SM-NS ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

GA 用量/%	平均粒径/nm	PDI
0.05	638.0 $\pm$ 19.4	0.493 $\pm$ 0.089
0.10	678.5 $\pm$ 1.7	0.411 $\pm$ 0.023
0.15	519.0 $\pm$ 11.0	0.261 $\pm$ 0.011
0.20	612.9 $\pm$ 26.9	0.476 $\pm$ 0.027
0.25	616.1 $\pm$ 7.7	0.439 $\pm$ 0.017
0.30	574.0 $\pm$ 23.4	0.477 $\pm$ 0.047
0.35	607.1 $\pm$ 5.2	0.500 $\pm$ 0.006
0.40	578.7 $\pm$ 6.2	0.323 $\pm$ 0.176

### 2.2 工艺因素的考察

以平均粒径和 PDI 为指标, 分别对剪切转速、剪切时间、高压均质压力、均质次数 4 个工艺因素进行考察。

**2.2.1 剪切转速** 已确定稳定剂 GA 用量为 0.15%, 高速剪切 2 min, 置于 30 MPa 压力下均质 6 次, 100 MPa 下均质 15 次, 对剪切转速进行考察, 结果见表 2。随着剪切转速的增加, SM-NS 的平均粒径减小, PDI 先减小后增大。根据表 2 结果及 SM-NS 稳定情况选取剪切转速为 19 000 r/min。

**2.2.2 剪切时间** 已确定甘草酸用量为 0.15%, 药物质量浓度为 10 g/L, 剪切转速为 19 000 r/min, 置于 30 MPa 压力下均质 6 次, 100 MPa 下均质 15 次, 对剪切时间进行考察, 结果见表 3。当剪切时间达 4 min 后, 延长剪切时间对粒径和 PDI 影响不大, 并

表 2 剪切转速对 SM-NS 平均粒径及 PDI 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Effect of shearing speed on average particle size and PDI of SM-NS ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

剪切转速/(r·min <sup>-1</sup> )	平均粒径/nm	PDI
13 000	563.6±17.4	0.329±0.053
16 000	532.6±22.0	0.051±0.016
19 000	535.0± 8.5	0.180±0.022
22 000	607.6±36.7	0.273±0.007

表 3 剪切时间对 SM-NS 平均粒径及 PDI 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 3 Effect of shearing time on average particle size and PDI of SM-NS ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

剪切时间/min	平均粒径/nm	PDI
1	540.9±39.9	0.299±0.080
2	565.5± 3.2	0.210±0.014
3	543.2±13.0	0.228±0.031
4	465.6±55.2	0.261±0.122
5	545.1±47.1	0.168±0.149

且剪切时间过长会产生大量气泡不利于下一步高压均质操作, 故最终选择剪切时间为 4 min。

**2.2.3 均质压力** 按“2.1”项下的制备方法制备水飞蓟素粗混悬液, 置于 30 MPa 压力下均质 6 次, 于 60、80、100、120、150 MPa 压力下均质 15 次, 测定平均粒径及 PDI, 结果见表 4。随着均质压力升高, SM-NS 粒径及 PDI 先减小后增大。分析其原因可能是均质压力过大会破坏稳定剂的保护层, 使粒子发生聚集, 从而使得粒径增大。由于低压有利于破坏大颗粒, 而高压在加速稳定剂扩散同时又能使粒径减小<sup>[20]</sup>。所以本实验采用高、低压力联合, 即先在 30 MPa 下均质 6 次, 再在 100 MPa 下均质 12 次。

表 4 均质压力对 SM-NS 平均粒径及 PDI 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 4 Effect of homogenization pressure on average particle size and PDI of SM-NS ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

均质压力/MPa	平均粒径/nm	PDI
60	573.1± 0.5	0.175±0.052
80	568.3± 4.9	0.234±0.020
100	500.5± 5.2	0.189±0.071
120	558.2±13.4	0.268±0.122
150	609.1± 2.3	0.710±0.051

**2.2.4 均质次数** 按“2.1”项下的制备方法制备水飞蓟素粗混悬液, 置于 30 MPa 压力下均质 6 次, 再于 100 MPa 压力下均质 6、8、10、12、14、16 次, 然后测定平均粒径及 PDI, 结果见表 5。随着均质次数增加, 纳米混悬剂粒径先减小后增大, PDI 先减小且在均质次数大于 12 次后变化小。根据表 5 中结果分析, 原因可能为当均质次数超过 12 次, 导致 SM-NS 温度过高易引起不稳定现象, 从而导致粒径略有增大, 因此从节约能源和工作效率角度考虑, 选择均质次数为 12 次。

表 5 均质次数对 SM-NS 平均粒径及 PDI 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 5 Effect of homogeneous times on average particle size and PDI of SM-NS ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

均质次数	平均粒径/nm	PDI
6	645.1±10.6	0.208±0.057
8	609.7± 7.6	0.188±0.061
10	589.0±13.3	0.172±0.012
12	466.3±12.9	0.143±0.021
14	559.8±24.3	0.026±0.026
16	569.7±24.7	0.104±0.017

**2.2.5 验证实验** 基于工艺因素考察得出的 SM-NS 最优处方、工艺条件, 称取 0.15 g GA 于 100 mL 纯水中超声使溶解, 再加入 1.0 g 水飞蓟素, 超声, 以 19 000 r/min 的速度剪切 4 min, 然后在 30 MPa 下均质 6 次, 再在 100 MPa 下均质 12 次。重复制备 3 批样品, 测定其粒径及 PDI。结果显示 SM-NS 平均粒径为 (489.6±9.6) nm, PDI 为 0.222±0.049, 可知该制备方法具有良好的重现性。

### 2.3 冻干工艺考察

以再分散系数 (redispersibility index, RDI) 作为冻干后的 SM-NS 冻干粉再分散性的评价指标之一, 计算公式为  $RDI = \text{冻干再分散后测得的粒径} / \text{初始粒径}$ 。RDI 越接近 1, 表明冻干后“固化损伤”越小。

**2.3.1 SM-NS 冻干粉的制备** 根据“2.2”项所得最优制备工艺, 制备 SM-NS, 各取 20 mL 分别加入 5% 的不同类别冻干保护剂(甘露醇、乳糖、山梨醇), 并设置空白对照组, 然后全部置于冻干容器中, 置 -55 °C 冷冻干燥机中预冻 12 h, 再减压冷冻干燥 48 h, 即得 SM-NS 冻干粉。

**2.3.2 再分散性评价** 取“2.3.1”项下所得冻干粉,

用 20 mL 纯水复溶,复溶过程中不得超声或剧烈振荡,测定复溶后的平均粒径、PDI 及 RDI。

**2.3.3 冻干保护剂种类的考察** 按照“2.3.1”项下方法分别加入常用冻干保护剂山梨醇、甘露醇、乳糖制备 SM-NS 冻干粉。将不添加任何冻干保护剂的样品作为空白对照组,以外观、再分散性为评价指标,考察不同冻干保护剂对 SM-NS 冻干粉的影响,结果见表 6。未加冻干保护剂的空白对照质地相对粗糙,再分散后粒径增大最为明显。以甘露醇为保护剂的冻干粉外观形状良好,复溶速率较快,复溶后溶液均一较稳定,测得其 RDI 最接近 1。因此考虑选择甘露醇作为冻干保护剂。

**2.3.4 冻干保护剂用量的考察** 以冻干粉外观和再

分散性为指标,考察甘露醇用量分别为 0、1%、3%、5%、10%对 SM-NS 冻干粉保护效果的影响,结果见表 7。随着保护剂甘露醇用量增加,冻干粉质地越发均匀,RDI 呈先降低后增大的趋势;当用量为 3%时,冻干粉表面平整、无塌陷现象,质地均一,冻干粉流动性好,复溶后平均粒径为  $(516.4 \pm 10.4)$  nm, PDI 为  $0.260 \pm 0.046$ ,复溶后仍能保持原有稳定的状态。

## 2.4 SM-NS 冻干粉的表征

**2.4.1 扫描电子显微镜 (SEM) 观察形态** 取适量水飞蓟素原料药和 SM-NS 冻干粉,黏附于样品池上,表层减压喷金处理以增加其电导率,于 SEM 下观察其形态,结果见图 1。可见水飞蓟素原料药为

表 6 冻干保护剂种类对 SM-NS 冻干粉外观及再分散性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 6 Effects of different lyoprotectants on appearance and redispersibility of SM-NS lyophilized powder ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

保护剂	外观	冻干前平均粒径/nm	再分散后平均粒径/nm	PDI	RDI
空白	疏松,质地较均匀,粗糙	$501.8 \pm 27.8$	$598.8 \pm 60.9$	$0.389 \pm 0.053$	$1.192 \pm 0.049$
甘露醇	疏松多孔,质地均匀,不塌陷,流动性好	$477.2 \pm 15.8$	$469.8 \pm 15.2$	$0.126 \pm 0.071$	$0.985 \pm 0.001$
乳糖	疏松多孔,孔较大,流动性好	$501.9 \pm 40.5$	$475.0 \pm 56.3$	$0.293 \pm 0.146$	$0.948 \pm 0.037$
山梨醇	疏松呈絮状,塌陷,流动性差,颜色不均一	$532.9 \pm 17.0$	$458.5 \pm 30.9$	$0.389 \pm 0.075$	$0.860 \pm 0.019$

表 7 冻干保护剂用量对冻干粉再分散性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 7 Effect of dosage of lyoprotectant on redispersibility of lyophilized powder ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

保护剂用量/%	外观	冻干前平均粒径/nm	再分散后平均粒径/nm	PDI	RDI
0	疏松,质地较均匀,粗糙	$501.8 \pm 27.8$	$598.8 \pm 60.9$	$0.389 \pm 0.053$	$1.192 \pm 0.049$
1	较疏松,质地均匀,流动性差	$552.7 \pm 48.4$	$497.7 \pm 67.0$	$0.689 \pm 0.032$	$0.900 \pm 0.071$
3	疏松多孔,质地均匀,不塌陷,流动性好	$535.7 \pm 9.0$	$516.4 \pm 10.4$	$0.260 \pm 0.046$	$0.964 \pm 0.008$
5	疏松多孔,质地均匀,不塌陷,流动性好	$581.2 \pm 19.3$	$480.7 \pm 74.7$	$0.257 \pm 0.012$	$0.827 \pm 0.088$
10	疏松,颜色偏淡,流动性好	$569.6 \pm 22.6$	$477.9 \pm 82.1$	$0.489 \pm 0.374$	$0.839 \pm 0.135$

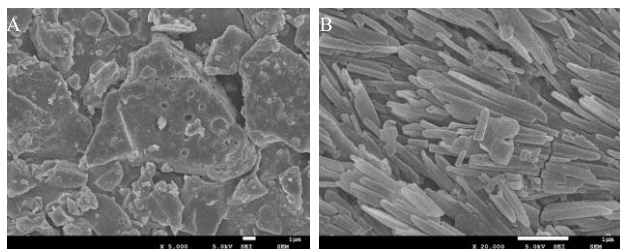


图 1 水飞蓟素原料药 (A) 和 SM-NS 冻干粉 (B) 的 SEM 图  
Fig. 1 SEM image of raw silymarin (A) and SM-NS (B)

大小不均匀的块状,表面粗糙;而 SM-NS 冻干粉呈大小较均匀的棒状,表面光滑,且粒径分布较原料药更加均匀。

**2.4.2 红外光谱 (FT-IR) 检测** 取水飞蓟素、甘草酸、SM-NS 冻干粉、水飞蓟素与 GA 物理混合物(取 0.15 g GA 和 1.0 g 水飞蓟素混合均匀,即得)作为

样品,与 KBr 混合压片,分别在  $400 \sim 4\ 000\text{ cm}^{-1}$  检测红外吸光谱,见图 2。水飞蓟素在  $3\ 440$ 、 $1\ 642\text{ cm}^{-1}$  具有明显的特征峰,物理混合物和 SM-NS 冻干粉均保留了 2 个特征峰,且没有新的吸收峰出现,表明水飞蓟素在纳米混悬剂中化学结构并未改变。

## 2.5 体外溶出评价

**2.5.1 色谱条件**<sup>[21]</sup> 色谱柱为 Agilent EP-C<sub>18</sub> 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇-0.1%冰醋酸水溶液 (48:52);检测波长 287 nm;柱温为 40 °C;体积流量 1.0 mL/min;进样量 10 μL。色谱图见图 3,其中图 3-A 所显示的 2 个峰均是对照品水飞蓟素的特征峰。

**2.5.2 对照品溶液的配制** 精密称取对照品水飞蓟素 10.06 mg,置于 50 mL 量瓶中,加入甲醇超声溶

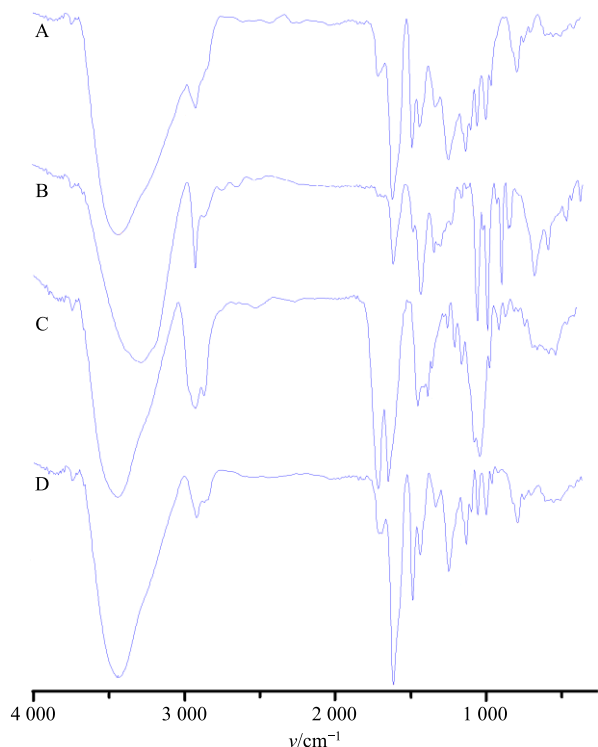


图 2 水飞蓟素 (A)、SM-NS 冻干粉 (B)、甘草酸 (C)、水飞蓟素-甘草酸物理混合物 (D) 的 FT-IR

Fig. 2 FT-IR of silymarin (A), SM-NS lyophilized powder (B), glycyrrhizic acid (C), silymarin-glycyrrhizic acid physical mixture (D)

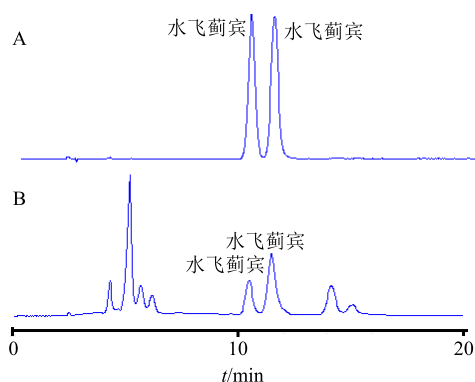


图 3 水飞蓟素对照品 (A) 和 SM-NS 冻干粉 (B) HPLC 图  
Fig. 3 HPLC of silymarin (A) and SM-NS lyophilized powder sample (B)

解并稀释至刻度线，配制成质量浓度为 0.20 mg/mL 的对照品溶液。

**2.5.3 供试品溶液的制备** 精密称取 SM-NS 冻干粉 200.20 mg，参照《中国药典》2015 年版第四部项下第二法（浆法），以 900 mL 蒸馏水为溶出介质，转速为 100 r/min，温度为 (37.0±0.2) °C，60 min 时取样 5 mL，经 0.45 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液即得。

**2.5.4 线性关系考察** 精密吸取质量浓度 0.20 mg/mL 的对照品溶液适量，用甲醇稀释得质量浓度为 10.06、20.12、30.18、40.24、50.30、100.60 mg/L 的对照品溶液，在“2.5.1”项色谱条件下进样分析，以质量浓度为横坐标 (X)，色谱峰面积为纵坐标 (Y)，绘制标准曲线，得到回归方程  $Y=31.732 X-32.87$ ， $r^2=0.9993$ ，表明水飞蓟素在 10.06~100.60 mg/L 呈良好线性关系。

**2.5.5 载药量的测定** 取适量 SM-NS 冻干粉，甲醇超声溶解，稀释后经 0.45 μm 微孔滤膜滤过，用 HPLC 测定，计算载药量为 (14.70±1.15)%。

**2.5.6 体外溶出度的测定** 按《中国药典》2015 年版四部项下第二法（浆法）进行溶出度测定，称取等量 SM-NS 冻干粉和水飞蓟素与 GA 物理混合物（取 0.15 g GA 和 1.0 g 水飞蓟素混合均匀，即得）投入 900 mL 蒸馏水中，控制温度为 (37.0±0.5) °C，转速为 100 r/min，分别于 5、10、20、30、40、50、60 min 取样 5 mL（立刻补足同温等量介质），经 0.45 μm 微孔滤膜滤过，按照 HPLC 法测定其峰面积，计算药物溶出度，并绘制溶出曲线，结果见图 4。可见 SM-NS 冻干粉在 120 min 时的溶出率达 88.2%，而物理混合物不超过 50%，表明将水飞蓟素制成 SM-NS 能提高其体外溶出度。根据 SPSS 25 软件 ANOVA 检验计算结果求得 2 组实验的 F 值为 13.126， $P=0.003<0.05$ ，表明 SM-NS 冻干粉与水飞蓟素物理混合物的溶出度差异具有显著性。综上所述，水飞蓟素制成 SM-NS 冻干粉能提高其体外溶出度。

**2.6 稳定机制的考察**

**2.6.1 pH 的影响** 称取 0.15 g 甘草酸稳定剂于 100

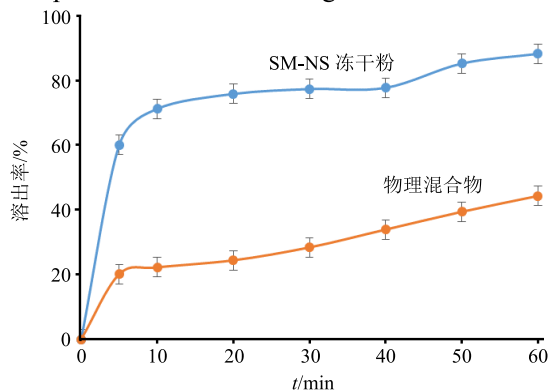


图 4 SM-NS 冻干粉和物理混合物的溶出曲线 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Fig. 4 Dissolution curves of SM-NS lyophilized powder and physical mixture ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

mL 纯水中超声使溶解, 用 0.1 mol/L 的氢氧化钠或 0.1 mol/L 的盐酸调整 pH 分别为 2、3、4、5、6、7, 然后加入 1.0 g 水飞蓟素, 超声, 用高速剪切机 D 档剪切 4 min, 再转入高压均质机, 在 30 MPa 压力下均质 6 次, 再于 100 MPa 压力下均质 12 次, 测定每一组的粒径及 PDI, 结果见表 8。当 pH $\geq$ 5 时 SM-NS 不稳定, 导致药物聚集沉淀, 且 SM-NS 表面浮着一层药物。

表 8 pH 对 SM-NS 平均粒径和 PDI 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Table 8 Effect of pH on particle size and PDI of SM-NS ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

pH 值	平均粒径/nm	PDI
2	481.2 $\pm$ 20.2	0.297 $\pm$ 0.020
3	474.2 $\pm$ 10.5	0.296 $\pm$ 0.010
4	526.4 $\pm$ 34.4	0.163 $\pm$ 0.050
5	724.4 $\pm$ 2.6	0.757 $\pm$ 0.020
6	636.9 $\pm$ 1.3	0.486 $\pm$ 0.050
7	547.2 $\pm$ 50.6	0.470 $\pm$ 0.060

**2.6.2 离子强度的影响** 称取 0.15 g 甘草酸稳定剂于 100 mL 纯水中超声使溶解, 用氯化钠调节离子强度, 离子强度分别为 0.01、0.05、0.10、0.25、0.50 mol/L, 然后加入 1.0 g 水飞蓟素, 超声, 用高速剪切机 D 档剪切 4 min, 再转入高压均质机, 在 300 MPa 压力下均质 6 次, 再于 1 000 MPa 压力下均质 12 次, 测定每一组的粒径及 PDI, 结果见表 9。随着离子强度的增大, SM-NS 的粒径和 PDI 均增大, 且当离子强度为 0.25 mol/L 时 SM-NS 出现了不稳定现象, 即主要为立即出现絮状沉淀, SM-NS 分层明显, 其本身不均匀。

根据表 8 结果显示, 当 pH 2~4 时, 随 pH 的增大, SM-NS 的粒径和 PDI 呈缓慢增大趋势; 但当

表 9 离子强度对 SM-NS 平均粒径及 PDI 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 9 Effect of ion strength on particle size and PDI of SM-NS ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

离子强度/(mol·L <sup>-1</sup> )	平均粒径/nm	PDI
0	511.6 $\pm$ 4.6	0.112 $\pm$ 0.040
0.01	542.7 $\pm$ 42.7	0.194 $\pm$ 0.070
0.05	584.9 $\pm$ 3.3	0.109 $\pm$ 0.090
0.10	608.6 $\pm$ 74.5	0.222 $\pm$ 0.040
0.25	831.6 $\pm$ 77.8	0.763 $\pm$ 0.320
0.50	831.9 $\pm$ 231.2	0.570 $\pm$ 0.070

pH 达到 5 后, 粒径和 PDI 都显著增加, 同时 SM-NS 有絮状沉淀产生, 表面已漂浮着一层药物, 证明其结构已被破坏。推测原因是甘草酸本身含有 3 个羧基 ( $pK_{a1}=3.98, pK_{a2}=4.59, pK_{a3}=5.15$ ), 呈现一定的酸性, 因此, 甘草酸作为 SM-NS 的潜在稳定剂, 其稳定机制与静电斥力有关。此外, 离子强度会影响粒子周围双电极层的形成和厚度。如果纳米粒子的粒径随离子强度的变化而变化, 则进一步证实了静电稳定发挥重要作用; 否则, 离子强度对粒径的变化不会产生影响。根据表 9 结果显示, 在纯水体系中 SM-NS 的粒径和 PDI 最小, 同时随离子强度 (0~0.5 mol/L) 增加纳米粒的粒径和 PDI 呈逐渐增大的趋势; 且当离子强度达到 0.25 mol/L 时, 其粒径和 PDI 相较于纯水体系显著增大, 纳米混悬液出现了不稳定现象, 纳米混悬液分层明显。这可能是由于溶液中离子的屏蔽作用, 离子进入双电极层作为反离子, 导致滑动层变薄, 因此静电斥力相对较弱, 导致粒子粒径显著增大<sup>[22]</sup>。同时, 测定的 SM-NS 的 Zeta 电位为 (-23.67 $\pm$ 1.40) mV, 表明电荷稳定作用较强, 能支撑体系稳定存在。因此, 本研究结果进一步表明静电斥力参与了甘草酸稳定 SM-NS。

### 3 讨论

本实验通过采用高速剪切-高压均质法, 成功制备出了稳定的 SM-NS, 该方法具有制备时间短, 避免了沉淀法有机溶剂残留的问题。本实验所采用的 GA 为天然皂苷类成分, 在较少的用量下即可对 SM-NS 达到较好的稳定效果。一般而言, 稳定剂浓度应当低于 CMC 才能较好的发挥增溶作用, 通过测定甘草酸的 CMC, 发现甘草酸在 CMC 以下的增溶效果更好, 这也与实验结果相一致。

体外溶出实验结果表明, SM-NS 冻干粉溶出率和溶解度显著提高, 纳米混悬技术可有效解决水飞蓟素难溶性问题。同时, SEM、FT-IR 结果综合表明成功制备出了棒状水飞蓟素纳米晶, 提示 GA 用于纳米混悬剂稳定剂的研究可适用于不同药物, 具有良好的发展前景。此外, 由于 GA 与水飞蓟素都具有保肝作用, 两者联用以后能否达到协同增效的作用也是课题组未来的重点研究方向。

研究表明, 甘草酸稳定 SM-NS 的稳定机理与静电斥力有关。但根据相关研究报道, 空间作用可能也参与了甘草酸的稳定作用。由于甘草酸具有两亲性, GA 对微粒具有较强的亲和力, 一部分

可与药物分子作用, 吸附于微粒表面, 另一部分通过分子间作用力相互缠绕, 在纳米粒子间形成三维网状结构, 这种网状结构可以阻止纳米粒子的聚集和生长<sup>[23]</sup>。一般认为, 在同时存在有静电稳定作用和空间稳定作用下的情况下, Zeta 电位绝对值大于 20 mV 就可以维持纳米混悬液的稳定<sup>[24]</sup>。因此, 课题组后续将对甘草酸的空间稳定作用进行进一步探究, 以期说明甘草酸如何通过两种稳定作用促使纳米混悬剂成型, 为进一步开发甘草酸作为稳定剂提供理论支撑。

#### 参考文献

- [1] 赵菲. 水飞蓟壳中水飞蓟素分离纯化及其功能性的研究 [D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2015.
- [2] Abenavoli L, Izzo A A, Milić N, *et al.* Milk thistle (*Silybum marianum*): A concise overview on its chemistry, pharmacological, and nutraceutical uses in liver diseases [J]. *Phytother Res*, 2018, 32(11): 2202-2213.
- [3] 谢思露, 赵茂吉, 杨朝国. 水飞蓟及其同分异构体的抑菌谱及其与抗生素联合抑菌效应探讨 [J]. 中草药, 2019, 50(7): 1641-1648.
- [4] 沈洁, 束艳, 童宁, 等. 2014—2018年南京市第二医院门诊药房水飞蓟类保肝药物的使用情况分析 [J]. 现代药物与临床, 2019, 34(11): 3433-3436.
- [5] 张丽娜, 蒋明光, 黄启功, 等. 水飞蓟素胶囊联合阿德福韦酯、拉米夫定治疗对失代偿期乙型肝炎肝硬化患者肝功能及血清病毒学指标的影响 [J]. 广西医科大学学报, 2019, 36(6): 952-956.
- [6] 朱钰叶, 李晓莉, 王伟, 等. 水飞蓟素长循环脂质体制备与抗肿瘤活性研究 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(7): 65-69.
- [7] 杨建邦, 王志. 水飞蓟素联合多烯磷脂酰胆碱对酒精性脂肪肝患者的临床疗效 [J]. 中成药, 2019, 41(6): 1469-1471.
- [8] 张晓东, 金戈. 水飞蓟素改善学习记忆作用研究进展 [J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(23): 6002-6004.
- [9] 刘志刚, 李雪玲, 翁立冬, 等. 水飞蓟素药理作用研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2012, 14(10): 91-93.
- [10] Karimi G, Vahabzadeh M, Lari P, *et al.* "Silymarin", a promising pharmacological agent for treatment of diseases [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2011, 14(4): 308-317.
- [11] 周桂芝, 吴珏, 杨雪晗, 等. 水飞蓟素-磺丁基-β-环糊精包合物的制备 [J]. 中草药, 2019, 50(17): 4100-4107.
- [12] 张自然, 陶建生, 邹凌燕, 等. 水飞蓟素原料药及其制剂体外溶出的研究 [J]. 中南药学, 2007, 5(6): 496-500.
- [13] 刘成林, 万远太. 异甘草酸镁治疗抗结核药致肝损害疗效和安全性的 Meta-分析 [J]. 药物评价研究, 2019, 42(3): 553-558.
- [14] 曹德龙, 曹海芳, 王晓霞, 等. 熊去氧胆酸胶囊联合甘草酸二铵治疗自身免疫性肝炎的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2018, 33(10): 2615-2619.
- [15] 王若宁, 柳雨影, 陈健, 等. 甘草酸、甘草次酸的抗肿瘤机制及其作为药物递送载体的研究进展 [J]. 中草药, 2019, 50(23): 5876-5886.
- [16] Li J Y, Cao H Y, Liu P, *et al.* Glycyrrhizic acid in the treatment of liver diseases: Literature review [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 1-15.
- [17] Rehan K, Quaiyoom K A, Abdul L, *et al.* Glycyrrhizic acid suppresses the development of precancerous lesions via regulating the hyperproliferation, inflammation, angiogenesis and apoptosis in the colon of wistar rats [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): 22-27.
- [18] Chen Y, Liu Y, Xu J, *et al.* A natural triterpenoid saponin as multifunctional stabilizer for drug nanosuspension powder [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2017, 18(7): 1-10.
- [19] Malamatarı M, Somavarapu S, Buckton G. Solidification of nanosuspensions for the production of solid oral dosage forms and inhalable dry powders [J]. *Expert Opin Drug Del*, 2016, 13(3): 435-450.
- [20] Xu Y, Liu X Y, Lian R Y, *et al.* Enhanced dissolution and oral bioavailability of aripiprazole nanosuspensions prepared by nanoprecipitation/homogenization based on acid-base neutralization [J]. *Int J Pharm*, 2012, 438(12): 287-295.
- [21] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [22] Guan J, Zhang Y, Liu Q, *et al.* Exploration of alginates as potential stabilizers of nanosuspension [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2017, 18(8): 1-10.
- [23] Ma Y, Gao X, Zhao X, *et al.* A natural triterpene saponin-based pickering emulsion [J]. *Chem-Eur J*, 2018, 24(45): 11703-11710.
- [24] 谢向阳, 陈晨, 廖祥茹, 等. 纳米混悬剂的物理稳定性研究进展 [J]. 国际药学研究杂志, 2011, 38(5): 369-374.