

含功能性油的水飞蓟宾超饱和自纳米乳的制备与体外评价

郭雨凡, 任淑珍, 李 敏, 谢 燕*

上海中医药大学公共健康学院, 上海 201203

摘要: **目的** 制备含功能性油的水飞蓟宾超饱和自纳米乳 (SLB-S-SNEDDS), 并对其进行表征及体外评价研究, 以提高难溶性药物水飞蓟宾的生物利用度。 **方法** 铁氢化钾还原力与 1,1-二苯基-2-苦肟基 (DPPH) 自由基清除实验筛选功能性油脂; 伪三元相图考察乳化剂乳化能力; 测定粒径、多分散指数 (PDI)、Zeta 电位等考察混合油相比比例与载药量; 相容性与溶出度实验筛选促饱和物质并考察其质量浓度; 从外观、粒径分布、自乳化效率、形态学等方面表征 SLB-S-SNEDDS, 并进行溶出度、抗氧化能力、细胞毒性等体外评价。 **结果** 所得 SLB-S-SNEDDS 处方为 (1) 小麦胚芽油/Capryol 90-Cremophor ELP-Transcutol HP 与 (2) 沙棘籽油/Capryol 90-Cremophor ELP-Transcutol HP, 1 g 基质 (包含 0.043 g 小麦胚芽油或沙棘籽油、0.387 g Capryol 90、0.380 g Cremophor ELP、0.190 g Transcutol HP), 水飞蓟宾的添加量为各组分平衡溶解度之和的 20%, Soluplus 的添加量为上述总质量的 0.1%。小麦胚芽油、沙棘籽油体系分别为淡黄色、亮黄色透明状均一液体, 2 种体系自乳化分散后均呈近球形白色扁平乳滴, 粒径约为 50 nm, 乳化时间均为 65 s。与药物原料及 SLB-SNEDDS 相比, SLB-S-SNEDDS 中水飞蓟宾的累积溶出率 8 h 内均维持在 85%~110%, 表明该体系能够显著提高药物的溶出度。SLB-S-SNEDDS 与铁氰化钾反应后的吸光度 (A 值 0.452~0.782, 0.488~0.765) 以及 DPPH 自由基清除率 (39.09%~96.02%, 30.54%~89.20%) 均高于相应质量浓度下水飞蓟宾原料的 A 值与清除率 (0.411~0.760, 22.89%~63.21%), 表明 2 种处方体系均能提高水飞蓟宾的抗氧化能力。细胞毒性实验结果显示, 在 5、10 $\mu\text{mol/L}$ 药物浓度下, 水飞蓟宾原料组、水飞蓟宾 S-SNEDDS 组及其相应的空白 S-SNEDDS 组细胞生存率均 >90%, 说明 SLB-S-SNEDDS 及其所用辅料对人克隆结肠腺癌细胞 (Caco-2) 毒性较小、安全性较好。 **结论** 制备的含功能性油 SLB-S-SNEDDS 在提高水飞蓟宾累积溶出率的同时, 增强了其抗氧化能力, 为将超饱和自纳米乳 (S-SNEDDS) 用于改善难溶性药物水溶性及其生物活性提供有益参考。

关键词: 水飞蓟宾; 超饱和自纳米乳; 功能性油; 体外评价; Soluplus; 累积溶出率; 抗氧化; 天然油脂; 生物利用度; 自由基; 伪三元相图; 细胞毒性; 小麦胚芽油; 沙棘籽油; Caco-2 细胞

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)20-5137-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.20.005

Preparation of silybin self-nanomicroemulsion containing functional oil and its *in vitro* evaluation

GUO Yu-fan, REN Shu-zhen, LI Min, XIE Yan

School of Public Health, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

Abstract: Objective In order to improve the bioavailability of the insoluble drug silybin, silybin supersaturated self-nanoemulsifying drug delivery systems (SLB-S-SNEDDS) containing functional oil were prepared, its characterization and *in vitro* evaluation were also performed. **Methods** Functional oils were screened by performing potassium ferrihydride reduction and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging experiments. The pseudo-ternary phase diagram was drawn to investigate the emulsifying ability of emulsifier. The proportion of mixed oil phase and drug loading capacity were explored by analyzing particle size, polydispersity index (PDI), zeta potential, etc. The type and concentration of supersaturated substance in SLB-S-SNEDDS were obtained by conducting the compatibility and dissolution experiments. SLB-S-SNEDDS was characterized with appearance, particle size distribution, self-emulsification efficiency, and morphology, and its *in vitro* dissolution, antioxidant

收稿日期: 2020-05-15

基金项目: 上海市科委优秀学术带头人资助项目 (19XD1423700)

作者简介: 郭雨凡 (1998—), 女, 在读研究生, 研究方向为中药制剂新技术的研究与应用。Tel: 18221752790 E-mail: guo_yufan@163.com

*通信作者 谢 燕 (1978—), 女, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向为中药制剂新技术的研究与应用。

Tel: (021)51322440 E-mail: rosexie_2004@163.com

capacity, and cytotoxicity were also evaluated. **Results** The prescriptions of SLB-S-SNEDDS were as follows: (1) wheatgerm oil/Capryol 90- Cremophor ELP-Transcutol HP; (2) seabuckthorn seed oil/Capryol 90-Cremophor ELP-Transcutol HP. One g S-SNEDDS matrix contained 0.043 g of wheatgerm oil or sea-buckthorn seed oil, 0.387 g of Capryol 90, 0.380 g of Cremophor ELP, and 0.190 g of Transcutol HP. The adding amount of silybin in S-SNEDDS prescription was 20% of the sum of the equilibrium solubility of silybin in each component, and the adding amount of Soluplus was 0.1% of the total mass described above. The two obtained SLB-S-SNEDDS were transparent homogeneous liquid with light yellow (wheat germ oil) and bright yellow (seabuckthorn seed oil) color, respectively. After being dispersed, SLB-S-SNEDDS turned into subspherical white flat emulsion droplets with the particle size of about 50 nm, and the emulsification time was 65 s. Compared with raw materials and SLB-SNEDDS, the cumulative dissolution of silybin in SLB-S-SNEDDS was maintained between 85% and 110% within 8 h, indicating that the two systems can significantly improve the dissolution of silybin. The absorbance of SLB-S-SNEDDS after reaction with potassium ferricyanide (0.452—0.782, 0.488—0.765) and the DPPH free radical clearance of SLB-S-SNEDDS (39.09%—96.02%, 30.54%—89.20%) were all higher than those of raw silybin (0.411—0.760, 22.89%—63.21%), which suggested that the two systems can enhance the antioxidant capacity of silybin. Cytotoxicity test results showed that the cell survival rate in silybin raw material group, combination of silybin and S-SNEDDS group, and blank S-SNEDDS group were greater than 90% at 5 $\mu\text{mol/L}$ and 10 $\mu\text{mol/L}$ drug concentration, indicating that SLB-S-SNEDDS and its auxiliary materials were safe and less toxic to human cloned colorectal adenocarcinoma cell line (Caco-2). **Conclusion** The SLB-S-SNEDDS containing functional oil prepared in this paper can not only increase the cumulative dissolution of silybin, but also enhance its antioxidant capacity, which provides a useful reference for supersaturated self-nanoemulsifying drug delivery systems (S-SNEDDS) to improve the water-solubility and bioactivity of insoluble drugs.

Key words: silybin; supersaturated self-nanoemulsifying drug delivery systems; functional oil; *in vitro* evaluation; Soluplus; cumulative dissolution; antioxidant; natural oil; bioavailability; DPPH; pseudo-ternary phase diagram; cytotoxicity; wheatgerm oil; seabuckthorn seed oil; Caco-2cell

水飞蓟宾 (silybin, SLB) 是从菊科植物水飞蓟 *Silybum marianum* (L.) Gaertn. 的果实中提取分离得到的黄酮木质素类化合物^[1], 具有清除体内过量自由基、抗脂质过氧化^[2-3]等药理活性, 对于因人体代谢紊乱或紫外线、酒精等外界因素导致的氧化应激型肝脏疾病^[4-5]具有较好疗效。然而, 水飞蓟宾属于生物药剂学分类中的 II 类药物 (溶解度低、渗透性高)^[6], 较差的水溶性 (430 mg/L) 限制了其药效作用的充分发挥。

超饱和自纳米乳释药系统 (supersaturated self-nanoemulsifying drug delivery systems, S-SNEDDS) 是由药物、油相、乳化剂、助乳化剂和促过饱和物质组成的混合体系, 在适宜温度下 (通常为 37 $^{\circ}\text{C}$) 经温和搅拌^[7]即可自发形成纳米级别的水包油 (O/W) 型乳剂。药物与表面活性剂之间的相互作用使药物能够位于增溶能力较大的界面层中^[8], 提高其溶解度; 除此之外, 处方中添加的促过饱和物质能够明显抑制药物的结晶, 使自纳米乳中析出的药物过饱和溶解^[9], 保证体系中同时存在大量微乳和增溶的药物分子, 提高难溶性药物的生物利用率。S-SNEDDS 处方组成中的油相是决定该制剂载药量、乳化效果和稳定性的重要因素^[8], 目前常用的油相有芳香烃、石蜡、脂肪酸酯类等^[10], 研究发现

一些存在于动植物及其代谢产物中的天然油脂具有抗氧化、清除自由基的功能^[11]。因此, 设想将天然油脂和药剂学辅料共同作为 S-SNEDDS 的油相, 制备水飞蓟宾 S-SNEDDS, 在提高水飞蓟宾水溶性的基础上, 联合天然油脂的抗氧化作用, 有效提升水飞蓟宾应对氧化应激型肝脏疾病的生物利用率。

因此, 本实验先进行抗氧化活性实验筛选出最适宜的天然油脂作为油相的一部分, 然后通过考察混合油的比例、乳化剂的乳化能力、载药能力来确定 SNEDDS 的处方组成, 再通过相容性和溶出度实验考察促过饱和物质种类及其用量, 从而确定水飞蓟宾 S-SNEDDS 的处方组成; 并对该载药体系进行溶出度、抗氧化能力和细胞毒性等评价, 为将 S-SNEDDS 用于改善难溶性药物水溶性及其生物活性提供有益参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

PHS-25 型 pH 计, 上海精密科学仪器有限公司; CP225D 型电子天平, 德国赛多利斯集团; HT7700 型透射电子显微镜 (TEM), 日本株式会社日立高新技术公司; Heraeus Multifuge 1S-R 型离心机, 赛默飞世尔科技公司; ZEN3600 Nano ZS 马尔文粒径仪, 英国马尔文公司; XW-80A 型涡旋混合器, 上

海医大仪器厂; UV-2800 紫外分光光度计, 尤尼柯有限公司; IKA RT10 型磁力搅拌器, 德国 IKA 仪器设备有限公司; RC8MD 型溶出试验仪, 天津市天大天发科技有限公司; 安捷伦 1260 高效液相色谱仪, 美国安捷伦公司。

1.2 材料与试剂

水飞蓟宾对照品, 批号 22888-70-6, 阿拉丁试剂有限公司, 质量分数 >98%; 水飞蓟宾原料, 批号 20160528, 上海笃玛生物科技有限公司, 质量分数 98%; 丙二醇辛酸酯 (Capryol 90, C90)、二乙二醇单乙基醚 (Transcutol HP, THP), 法国嘉法狮公司; 聚氧乙烯 35 蓖麻油 (Cremophor ELP, CELP)、PEG-40 氢化蓖麻油 (Cremophor RH40, CRH40), 北京凤礼精求医药股份有限公司; 丙二醇、聚乙二醇 400 (PEG 400), 国药集团化学试剂有限公司; 聚乙烯己内酰胺-聚乙酸乙烯酯-聚乙二醇接枝共聚物 (Soluplus), 巴斯夫公司; 水飞蓟籽油, 辽宁盘锦锦华成制药有限公司; 沙棘籽油, 内蒙古宇航人高技术产业有限公司; 小麦胚芽油、红花籽油、葡萄籽油, 菏泽中禾健元生物科技有限公司; 聚乙烯吡咯烷酮 K12 (PVP K12)、聚乙烯吡咯烷酮 K17 (PVP K17), 亚什兰集团公司; 聚乙二醇 4000 (PEG 4000), 广州市天润药业有限公司。

2 方法与结果

2.1 功能性油筛选

2.1.1 铁氰化钾还原力实验 用普鲁士蓝法^[12]测定水飞蓟宾与各功能性油联用后的铁氰化钾还原力。具体方法为取不同浓度的水飞蓟宾对照品溶液、水飞蓟宾 5% 功能性油乙醇样品溶液各 1 mL, 加入 2.5 mL 磷酸盐缓冲溶液与 2.5 mL 1% 铁氰化钾溶液, 涡旋混匀, 置于 50 °C 水浴反应 20 min, 冷却后再加入 2.5 mL 10% 三氯乙酸溶液终止反应, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 2.5 mL, 加入 2.5 mL 纯水、0.5 mL 0.1% 三氯化铁溶液, 涡旋混匀, 室温放置 10 min, 用紫外分光光度计测定波长为 700 nm 处的吸光度 (A) 值并作图, A 值越大代表样品的还原能力越强, 结果见图 1。结果显示, 水飞蓟宾质量浓度为 130~280 μg/mL 时, 在 700 nm 处的 A 值 (A₇₀₀) 随着水飞蓟宾质量浓度的增加而增加, 表明水飞蓟宾对铁氰化钾具有还原能力并呈质量浓度相关性; 功能性油与水飞蓟宾联用后, 小麦胚芽油与沙棘籽油的 A 值最大, 说明这 2 种油能够显著增强水飞蓟宾对铁氰化钾的还原能力。

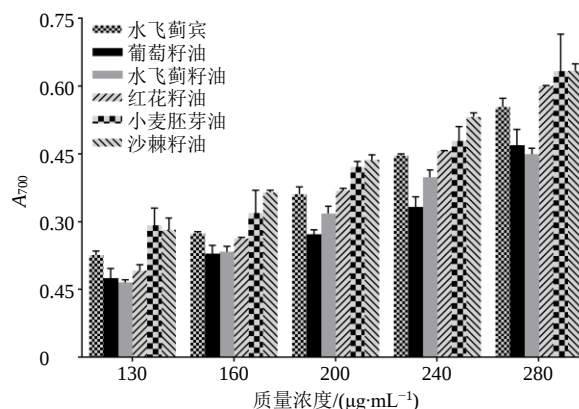


图 1 铁氰化钾还原力测定 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Determination of potassium ferricyanide reducing power ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.1.2 DPPH 自由基清除实验 分别取 1 mL 水飞蓟宾对照品溶液和水飞蓟宾 5% 功能性油乙醇样品溶液, 加 2 mL DPPH 反应试剂混合均匀作为实验组, 室温避光静置 30 min 使反应完全, 以无水乙醇调零, 用紫外分光光度计测定 517 nm 波长处的 A 值; 再分别以 1 mL 水飞蓟宾对照品溶液与 2 mL 乙醇混匀、1 mL 含油乙醇溶液与 2 mL 乙醇混合均匀后作为空白组, 以 1 mL 乙醇与 2 mL DPPH 溶液混合均匀作为对照组, 与实验组相同方法操作后测定 A 值, 每个样品平行 3 份。计算 DPPH 自由基清除率 [清除率 = $1 - (A_i - A_j) / A_0$, A_0 为对照组的 A 度, A_i 为实验组的 A 值, A_j 为空白组的 A 值] 并作图, 结果见图 2。结果显示, 质量浓度在 0.2~1.4 mg/mL 时, 水飞蓟宾对 DPPH 自由基的清除率随质量浓度升高而依次增强; 与功能性油联用后, 水飞蓟宾对 DPPH 自由基的清除率均不同程度增强, 说明红花籽油、水飞蓟籽油、小麦胚芽油、葡萄籽油、沙棘

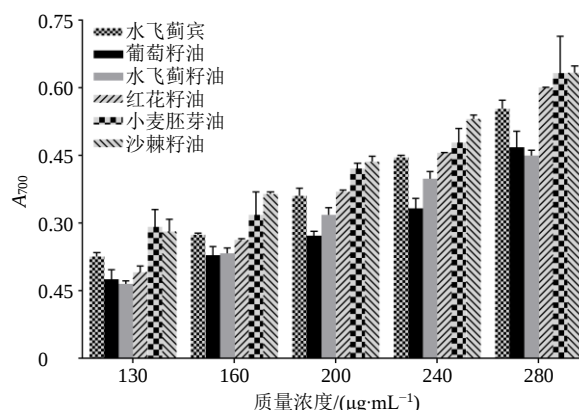


图 2 DPPH 自由基清除率测定 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Determination of DPPH free radical scavenging rate ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

籽油均能提高水飞蓟宾的抗氧化性能,其中,沙棘籽油和小麦胚芽油在较小质量浓度时也能保持较高的自由基清除率,抗氧化效果较好。

综上,本实验分别选择小麦胚芽油与沙棘籽油作为混合油相中的功能性油脂,展开后续研究。

2.2 含功能性油 SNEDDS 处方确定

2.2.1 乳化剂对混合油相乳化能力的考察 按乳化剂与助乳化剂的质量比 (K_m 值) 为 2:1 称取乳化剂、助乳化剂, 37 °C 水浴搅拌混匀后, 与混合油相按质量比为 1:9、2:8、3:7、4:6、5:5、6:4、

7:3、8:2、9:1 称定质量, 固定总质量为 1 g, 涡旋 2~3 min 至颜色、质地均一。向各体系中逐滴滴加 37 °C 纯水, 边加边涡旋混匀, 观察体系变化 (若体系呈乳白色, 平行光入射后有散射现象, 则为普通乳剂; 若体系澄明或有蓝色乳光, 平行光入射后有丁达尔现象, 则为微乳)。记录能够形成自微乳时临界点各组分的质量, 以乳化剂与助乳化剂的混合物、混合油相、水相分别作为 3 个顶点, 用 Origin 8 软件绘制伪三元相图, 黑色阴影区域即为乳化区域, 并计算阴影区域面积, 结果见图 3。

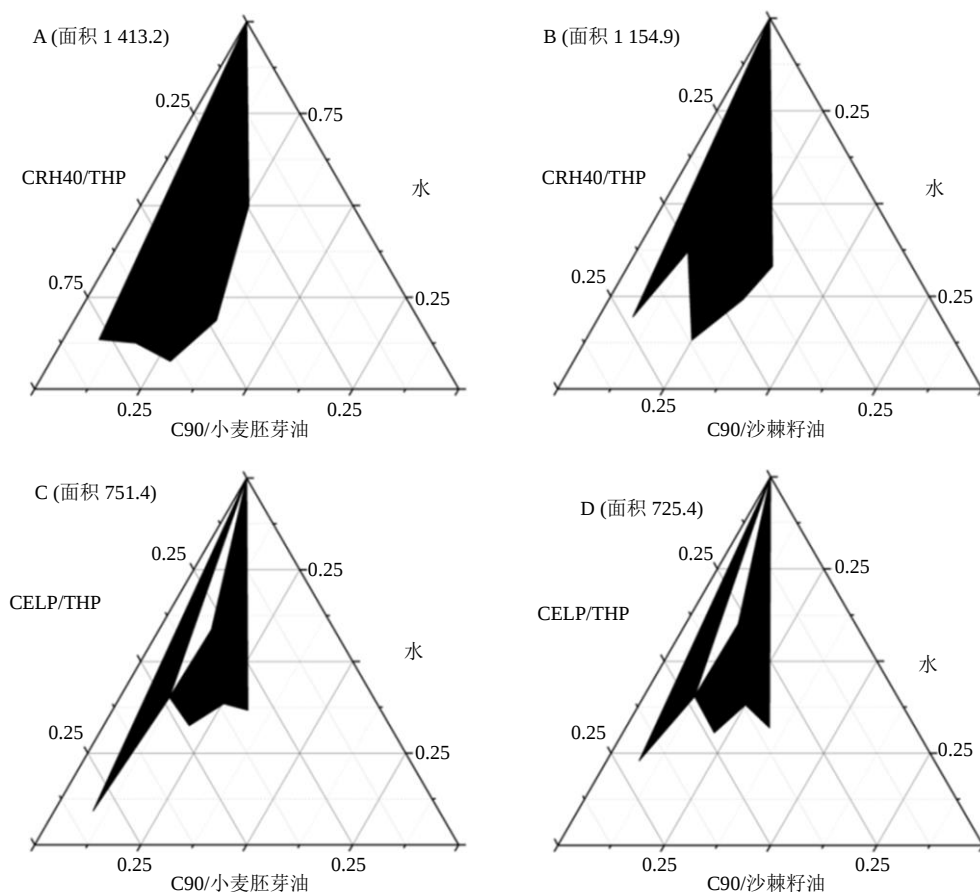


图 3 含小麦胚芽油或沙棘籽油 SNEDDS 的伪三元相图

Fig. 3 Pseudo-ternary phase diagrams of SNEDDS containing wheatgerm oil or seabuckthorn seed oil

结果显示, 以上 4 个体系均存在一定成乳区域, 且接近于左上方。据报道, 自纳米乳的乳化效果通常随着油相剂量的增加而降低, 伪三元相图中的乳化区域越接近左上方越好^[13], 因此认为 2 种乳化剂 CELP、CRH40 对含功能性油混合油相均具有较强的乳化能力。其面积大小顺序依次为 A>B>C>D, 说明与乳化剂 CELP 相比, CRH40 对混合油相的乳化能力更强; 在乳化剂种类相同的体系中, 乳化剂对含小麦胚芽油的混合油相成乳能力较强。

2.2.2 混合油相比比例考察 将预实验选定的油相 C90 与小麦胚芽油或沙棘籽油按照 1:9、2:8、3:7 的比例混合, 作为油相; 分别以 CELP、CRH40 为乳化剂, THP 为助乳化剂; 固定油相与混合乳化剂的比例分别为 4.3:5.7、2:8, K_m 均为 2:1。按上述比例依次称取辅料, 37 °C 恒温搅拌至混合均匀, 制备含功能性油空白 SNEDDS, 称取 1.25 g 滴加至 500 mL 纯水 (37 °C) 中, 100 r/min 恒速搅拌使自乳化。记录自乳化时间, 待分散均匀后取样,

测定分散乳液的粒径、电位、PDI 值,并以等温纯水为参比,测定分散乳液在 638.2 nm 处的透光率,结果见表 1。结果显示,C90-CELP-THP 体系在加入小麦胚芽油或沙棘籽油后,随着功能性油比例的增大,其粒径有减小的趋势,但 PDI、Zeta 电位值、透光率、乳化时间均无明显变化,说明随着混合油比例增大,体系的自乳化效率无明显变化,考虑到实验效率和经济效益,本实验选择小麦胚芽油或沙

棘籽油-C90(1:9)进行后续研究;C90-CRH40-THP 体系在加入小麦胚芽油或沙棘籽油后,自乳化后乳滴粒径均<30 nm, PDI<0.3,透光率均在 90%以上,乳化时间基本无变化,说明该处方在混合油比例为 1:9、2:8、3:7 的条件下均能保持良好的自乳化效率,综合各因素,本实验选择功能性油比例较大的处方进行后续研究,即小麦胚芽油或沙棘籽油-C90(3:7)。

表 1 含功能性油 SNEDDS 空白处方比较结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Comparison results of blank SNEDDS prescription containing functional oil ($\bar{x} \pm s, n=3$)

处方	混合油比例	粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV	透光率/%	乳化时间/s
沙棘籽油/C90-CELP-THP	1:9	48.440±0.130	0.365±0.010	-14.333±0.115	96.0	99
	2:8	29.177±0.985	0.355±0.021	-21.500±0.608	97.4	100
小麦胚芽油/C90-CELP-THP	1:9	47.347±0.314	0.323±0.011	-10.900±0.300	95.6	96
	2:8	30.567±1.701	0.342±0.020	-9.693±0.055	97.5	92
沙棘籽油/C90-CRH40-THP	1:9	17.663±0.280	0.159±0.012	-1.773±1.056	98.0	39
	2:8	22.233±4.049	0.166±0.023	-0.946±0.832	95.3	44
	3:7	26.757±0.485	0.157±0.005	-2.060±0.675	98.1	45
小麦胚芽油/C90-CRH40-THP	1:9	21.427±1.214	0.237±0.010	-8.403±0.191	98.0	41
	2:8	18.280±0.384	0.204±0.007	-17.167±1.582	97.8	45
	3:7	22.173±0.445	0.223±0.011	-18.100±8.322	97.8	43

2.2.3 载药能力考察 将小麦胚芽油或沙棘籽油与 C90 按质量比 1:9、3:7 称取适量,搅拌使混合均匀,再分别与 2 种混合乳化剂 CELP-THP、CRH40-THP 混匀(固定混合油相与混合乳化剂的比例分别为 4.3:5.7、2:8, K_m 均为 2:1),按照“2.2.2”项下方法称取辅料,制备 4 种含功能性油的空白 SNEDDS。按水飞蓟宾在各组分中平衡溶解度之和的 15%、20%、25%、30%、35%计算药物用量,加入上述空白 SNEDDS 中,37℃恒温搅拌至澄清透明,得到载药 SNEDDS。取 1.25 g 滴加至 37℃ 500 mL 纯水中,100 r/min 恒速搅拌使自乳化,按照“2.2.2”项下方法记录自乳化时间,测定分散乳液的粒径、电位、PDI 值、透光率等,考察各自微乳体系的载药能力。结果显示,小麦胚芽油或沙棘籽油/C90-CELP-THP 体系,随水飞蓟宾加入量增加,其粒径、乳化时间均有所增大或延长,PDI 和电位变化不大,透光率均在 90%以上但有逐渐降低的趋势,综合考虑各指标,本实验选择加入自微乳体系各组分平衡溶解度之和的 20%的水飞蓟宾,制备载药 SNEDDS;同理,小麦胚芽油/C90-CRH40-THP 体系选择加入各组分平衡溶解度之和的 30%的水飞蓟

宾,沙棘籽油/C90-CRH40-THP 体系选择加入各组分平衡溶解度之和的 35%的水飞蓟宾。

2.3 水飞蓟宾 S-SNEDDS 制备

2.3.1 高分子材料种类筛选 按照“2.2”项下确定的处方及比例制备水飞蓟宾 SNEDDS,按处方总质量的 1%和 3%加入 TPGS、PVP K25、HPMC 2910 等高分子材料,37℃恒温搅拌均匀,即得。取水飞蓟宾 SNEDDS 1.25 g 滴加至 500 mL 纯水(37℃)中,100 r/min 恒速搅拌使自乳化,按照“2.2.2”项下方法记录自乳化时间,测定分散乳液的粒径、电位、PDI 值、透光率等,考察高分子材料与水飞蓟宾 SNEDDS 处方的相容性。结果显示,沙棘籽油/C90-CELP-THP 体系中加入高分子材料 PVP K17 后能形成透明均一的体系,且自乳化后粒径、PDI、电位均与原载药处方较接近,透光率在 95%以上,处方相容性较好,可作为 S-SNEDDS 处方进行后续研究;同理,小麦胚芽油/C90-CELP-THP-Soluplus、沙棘籽油/C90-CRH40-THP-PVP K12、小麦胚芽油/C90-CRH40-THP-PEG 4000 也可以作为水飞蓟宾 SNEDDS 的备选处方体系。

2.3.2 高分子材料促过饱和作用考察 比较水飞蓟

宾 SNEDDS 和 S-SNEDDS 的溶出度, 考察高分子材料对水飞蓟宾的促过饱和作用。

称取水飞蓟宾对照品适量, 加少量甲醇溶解, 用溶出介质稀释并定容至刻度, 得质量浓度为 0.1 mg/mL 的水飞蓟宾对照品浓配液; 吸取适量, 用溶出介质稀释成 5~30 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液, 于 287 nm 波长处测定 A 值, 以对照品质量浓度为横坐标 (X), 吸光度为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 得线性方程为 $Y=0.0379X+0.0092$, $R^2=0.9997$, 结果表明水飞蓟宾对照品溶液质量浓度在 5~30 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

取水飞蓟宾 SNEDDS, 按处方总质量的 0.5%~3.0% 加入 “2.3.1” 项下结果考察出的 4 种高分子材料, 制备水飞蓟宾 S-SNEDDS。分别称取水飞蓟宾 SNEDDS 及 S-SNEDDS 样品适量, 迅速滴入 60 mL 纯水中, 开始计时, 设置温度为 $(37.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 、转速为 100 r/min, 分别于 0.5、1、2、8、12 h 取样 5 mL, 并同时补加 5 mL 等温空白介质, 依法操作, 平行 3 份, 样液经 0.22 μm 滤膜滤过, 于 287 nm 波长处测定 A 值。将 A 值代入上述标准曲线方程, 计算水飞蓟宾的质量浓度与累积溶出率, 绘制溶出曲线, 结果见图 4。可见, 在小麦胚芽油/C90-CELP-THP 载药体系中, 1 h 内水飞蓟宾的累积溶出率达 95% 以上, 2 h 时明显下降, 8 h 后累积溶出率仅为 35% 左右, 随后基本维持不变; 但添加高分子材料 Soluplus 的载药体系, 水飞蓟宾累积溶出率 12 h 内均在 75% 以上, 长时间维持在较高水平, 说明 Soluplus 对水飞蓟宾具有促过饱和作用。相反, 水飞蓟宾 SNEDDS 载药体系中, 加入相应高分子材料后, 其溶出曲线与加入前相比变化不大, 表明 PVP K17、PEG 4000、PVP K12 对水飞蓟宾没有促过饱和作用。结合 “2.3.1” 项下高分子材料与 SNEDDS 处方相容性的实验结果, 本实验选择 Soluplus 作为促过饱和物质进一步考察其作为水飞蓟宾 S-SNEDDS 的可行性。

2.3.3 Soluplus 浓度考察 取水飞蓟宾 SNEDDS, 按照处方总质量的 0.1%~0.5% 加入 Soluplus, 制备水飞蓟宾 S-SNEDDS。按照 “2.3.2” 项下方法测定各个时间点水飞蓟宾的质量浓度与累积溶出率, 并绘制溶出曲线, 考察 Soluplus 在水飞蓟宾 SNEDDS 体系中发挥促过饱和作用的适宜质量浓度, 结果见图 5。可见, 在小麦胚芽油或沙棘籽油/C90-CELP-THP 载药体系中, 添加 0.1~0.5% Soluplus 均能够

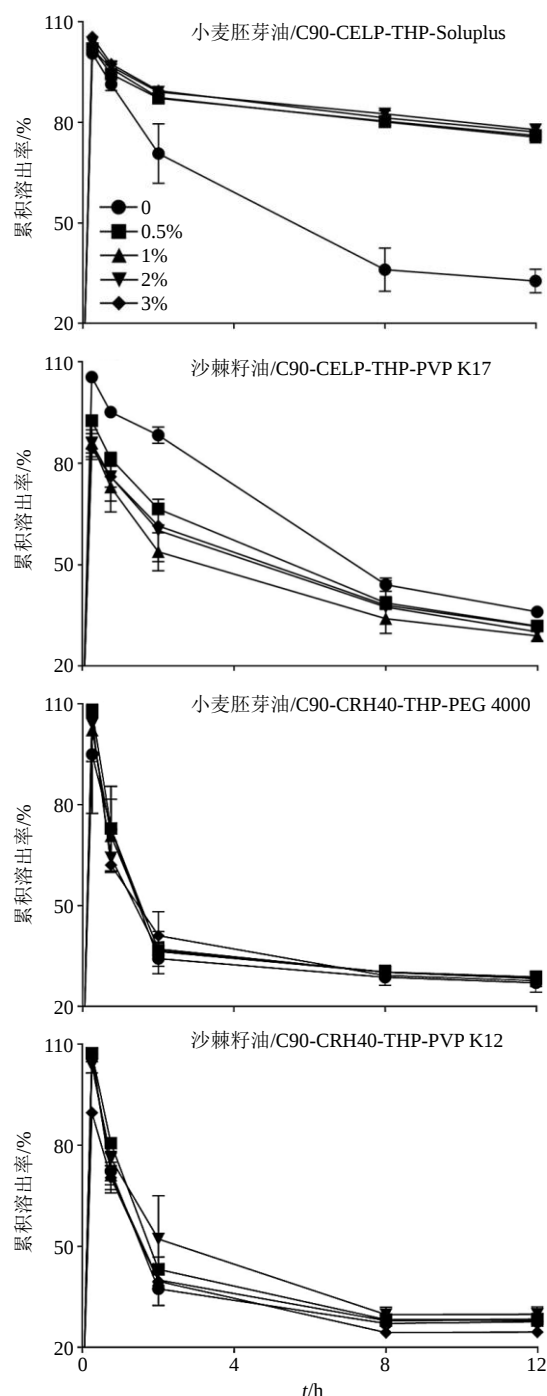
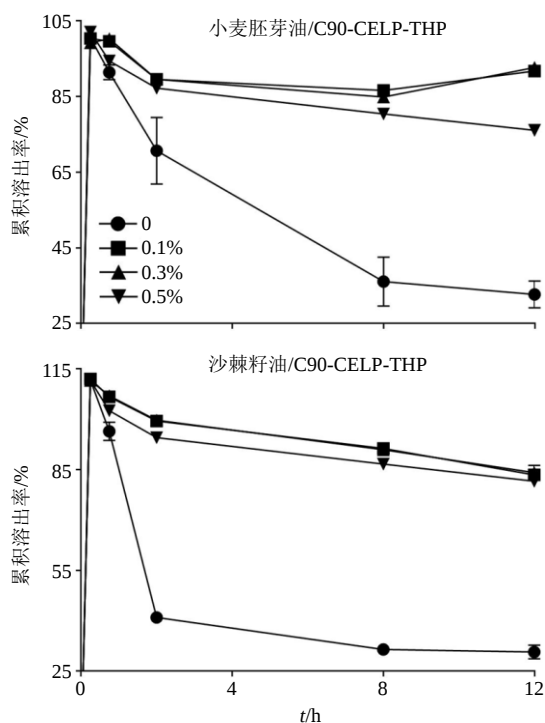


图 4 水飞蓟宾 SNEDDS 与 S-SNEDDS 的溶出曲线比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 Comparison of cumulative dissolution curves of SLB-SNEDDS and SLB-S-SNEDDS ($\bar{x} \pm s, n=3$)

长时间维持较高累积溶出率, 表明当 Soluplus 用量大于 0.1% 时, 对水飞蓟宾具有促过饱和作用。综合考虑处方载药量等因素, 本实验选择在以上 2 个体系中添加 0.1% Soluplus 制备水飞蓟宾 S-SNEDDS。

综上, 确定水飞蓟宾 S-SNEDDS 载药处方为 (1) 小麦胚芽油/C90-CELP-THP 体系和 (2) 沙棘

图 5 Soluplus 质量浓度考察结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 5 Results of concentration of Soluplus ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

籽油/C90-CELP-THP 体系, 1 g 基质 (包含 0.043 g 小麦胚芽油或沙棘籽油、0.387 g C90、0.380 g CELP、0.190 g THP), 水飞蓟宾的添加量为各组分平衡溶解度之和的 20%, Soluplus 的添加量为上述总质量的 0.1%。

2.4 水飞蓟宾 S-SNEDDS 表征

2.4.1 外观性状 按照“2.3”项下处方制备水飞蓟

宾 S-SNEDDS, 观察外观性状, 并称取 1.25 g 滴加至 500 mL 纯水 (37 °C) 中, 100 r/min 恒速搅拌使其自乳化, 待分散均匀后, 观察乳光现象, 结果见图 6。结果显示, 小麦胚芽油/C90-CELP-THP-Soluplus 体系、沙棘籽油/C90-CELP-THP-Soluplus 体系分别呈现为淡黄色、亮黄色透明状均一液体, 2 种体系自乳化分散后均带有淡蓝色乳光且澄清透明, 静置 2 h 后无分层现象或颗粒析出。

2.4.2 粒径分布及自乳化效率 取水飞蓟宾 S-SNEDDS 1.25 g, 滴加至 500 mL 纯水 (37 °C) 中, 100 r/min 恒速搅拌使其自乳化, 按照“2.2.2”项下方法测定分散乳液的粒径、Zeta 电位、PDI 值、自乳化时间、透光率等, 评价体系的粒径分布与自乳化效率, 结果见表 2 和图 7。

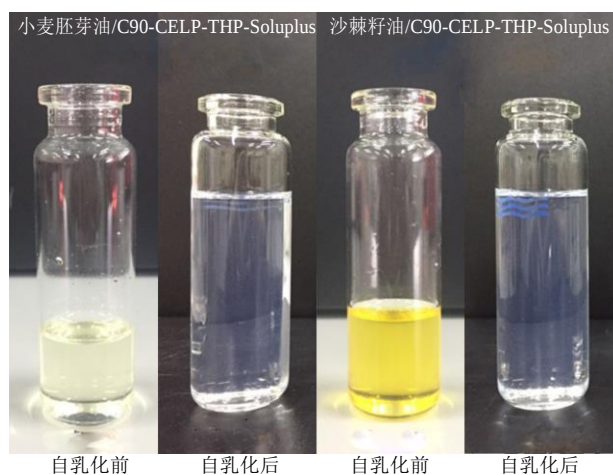


图 6 水飞蓟宾 S-SNEDDS 的外观性状

Fig. 6 Appearance and characters of SLB-S-SNEDDS

表 2 水飞蓟宾 S-SNEDDS 粒径、分布与自乳化效率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 2 Particle size and distribution of SLB-S-SNEDDS and its self-emulsifying efficiency ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

处方组成	粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV	透光率/%	乳化时间/s
小麦胚芽油/C90-CELP-THP-Soluplus	50.847 ± 0.483	0.243 ± 0.010	-9.547 ± 0.411	98.4	65
沙棘籽油/C90-CELP-THP HP-Soluplus	49.507 ± 0.292	0.311 ± 0.008	-13.800 ± 0.755	98.3	65

结果显示, 以上 2 个体系与水接触后, 温和搅拌便能自乳化形成均匀稳定的微乳。体系粒径约 50 nm, PDI 在 0.3 左右, 表明上述水飞蓟宾 S-SNEDDS 处方所形成的乳滴大小均匀、粒径分布较窄; 电位绝对值为 10 mV 左右, 表面呈负电性, 符合过饱和自纳米乳的要求, 稳定性较好; 透光率大于 90%, 且自乳化时间较短, 显示出较好的自乳化效率。

2.4.3 形态学考察 取水飞蓟宾 SNEDDS 和水飞蓟宾 S-SNEDDS 适量, 投至 200 倍量等温纯水中, 待自乳化分散完全后, 吸取乳液 20 μL 垂直滴加至

碳膜铜网正面, 室温下自然阴干, 滴加 2% 磷钨酸溶液使其悬挂在铜网上, 负染色 15~20 min, 从边缘吸去多余的磷钨酸溶液, 室温下阴干, 置于透射电镜下观察并拍照, 结果见图 8。由图 8 可以看出, 水飞蓟宾 SNEDDS 和 S-SNEDDS 分散乳液均呈现近球形白色扁平乳滴, 分散较为均匀, 视野中无水飞蓟宾沉淀或破裂的乳滴; 水飞蓟宾 SNEDDS 体系分散后所得粒径约为 50 nm, 加入高分子材料 Soluplus 后, 体系分散形成的乳滴粒径变化不大, 与动态光散射测得结果接近。

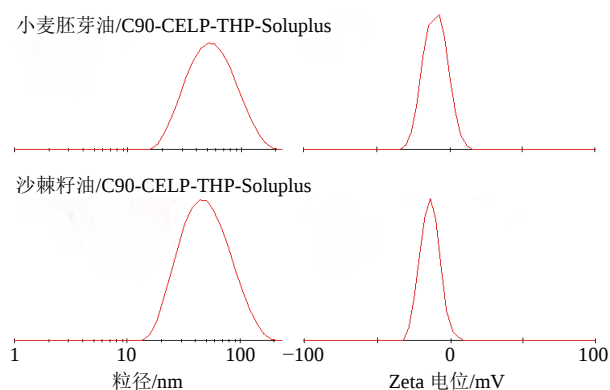


图 7 水飞蓟宾 S-SNEDDS 的粒径分布和 Zeta 电位图

Fig. 7 Particle size and Zeta potential diagram of SLB-S-SNEDDS

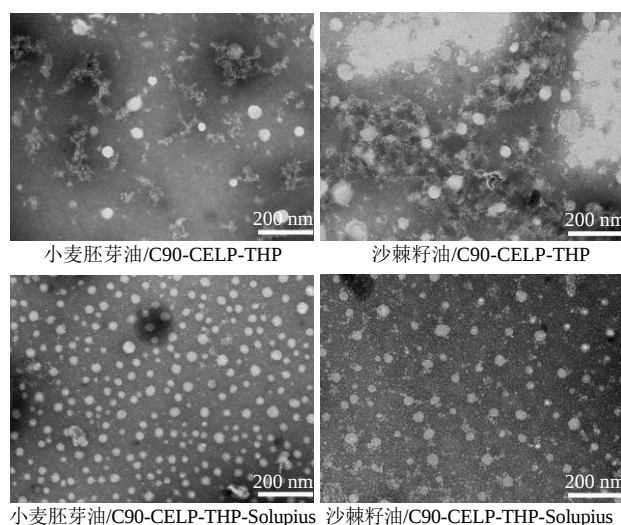
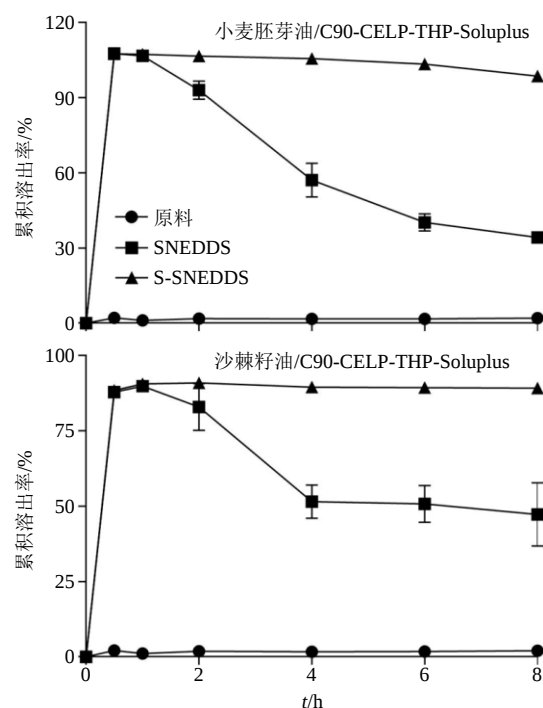


图 8 水飞蓟宾 SNEDDS 与 S-SNEDDS 的透射电镜图像

Fig. 8 TEM photographs of SLB-SNEDDS and SLB-S-SNEDDS

2.5 水飞蓟宾 S-SNEDDS 体外溶出度

分别称取水飞蓟宾原料、水飞蓟宾 SNEDDS 和水飞蓟宾 S-SNEDDS 适量，投入 150 mL 纯水中，开始计时，设定温度为 $(37.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 、转速为 250 r/min。分别于 0.5、1、2、4、6、8 h 取样 2 mL，并同时补加 2 mL 等温空白介质，依法操作，平行 3 份，用 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜滤过后，吸取 $20\ \mu\text{L}$ ，注入高效液相色谱仪，记录峰面积。色谱条件如下：色谱柱为 Waters Xbridge C_{18} 柱 ($250\ \text{mm} \times 4.6\ \text{mm}$, $5\ \mu\text{m}$)；流动相为甲醇-1%冰醋酸水溶液 (45:55)；检测波长 287 nm；柱温 30°C ；体积流量 1 mL/min。另取水飞蓟宾对照品溶液按相同操作注入高效液相色谱仪，记录峰面积，按外标一点法计算各样品中水飞蓟宾浓度，并计算其累积溶出率，绘制溶出曲线，结果见图 9。可见，8 h 时，水飞蓟宾原料的累

图 9 水飞蓟宾 SNEDDS 与 S-SNEDDS 的累积溶出曲线 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)Fig. 9 Cumulative dissolution curves of SLB-SNEDDS and SLB-S-SNEDDS ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

积溶出率仅为 5% 左右，溶出较少；在水飞蓟宾 SNEDDS 体系中，30 min 时，水飞蓟宾的累积溶出率可达 90% 以上，但 2 h 后开始下降，8 h 时降至 30% 左右；而在水飞蓟宾 S-SNEDDS 体系中，水飞蓟宾的累积溶出率在 8 h 内均维持在 100% 左右，无显著下降。另外，水飞蓟宾 SNEDDS 与水飞蓟宾 S-SNEDDS 在各个时间点的累积溶出率均明显高于水飞蓟宾原料，且水飞蓟宾 S-SNEDDS 体系能够长时间维持较高累积溶出率。以上结果表明，水飞蓟宾 SNEDDS 与水飞蓟宾 S-SNEDDS 均可改善水飞蓟宾的体外溶出，且水飞蓟宾 S-SNEDDS 体系能抑制药物释放后析出、聚集形成沉淀，从而提高递药系统对增加水飞蓟宾溶出度的稳定性，增加药物的生物利用率。

2.6 水飞蓟宾 S-SNEDDS 抗氧化能力

取水飞蓟宾原料及水飞蓟宾 S-SNEDDS 样品，按照“2.1”项下方法进行铁氰化钾还原力测定实验和 DPPH 自由基清除实验，考察水飞蓟宾 S-SNEDDS 的抗氧化能力，结果见图 10、11。

由图 10 可知，在以小麦胚芽油/C90-CELP-THP-Soluplus 为组成的水飞蓟宾 S-SNEDDS 体系中，当水飞蓟宾质量浓度为 130、160、200、240、

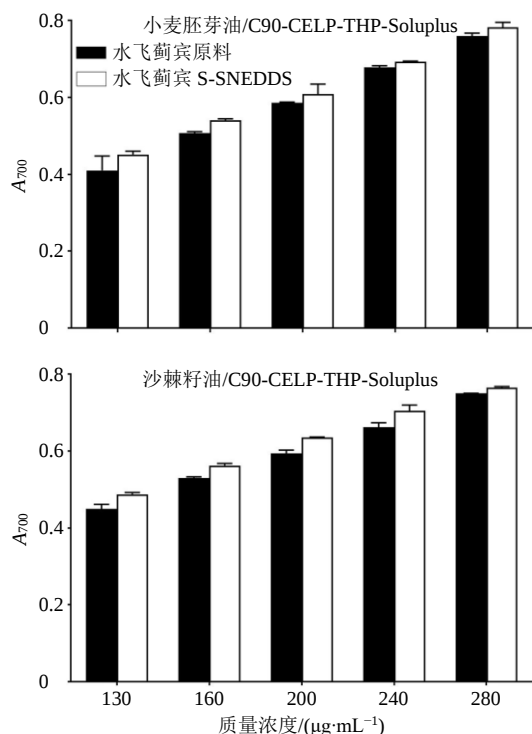


图 10 水飞蓟宾 S-SNEDDS 铁氰化钾还原力 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 10 Potassium ferricyanide reducing power of SLB-S-SNEDDS ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

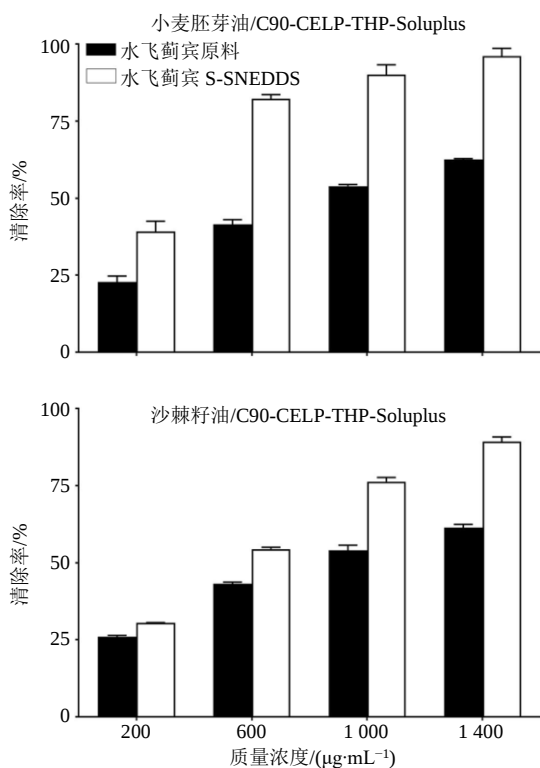


图 11 水飞蓟宾 S-SNEDDS 的 DPPH 自由基清除率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 11 DPPH free radical scavenging rate of SLB-S-SNEDDS ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

280 µg/mL 时, 与铁氰化钾反应后的 A 值分别为 0.452、0.540、0.609、0.693、0.782, 均略高于水飞蓟宾原料 (A 值分别为 0.411、0.507、0.586、0.678、0.760), 说明该体系能提高水飞蓟宾对铁氰化钾的还原能力。同理, 以沙棘籽油/C90-CELP-THP-Soluplus 为组成的水飞蓟宾 S-SNEDDS 体系也能够增强水飞蓟宾对铁氰化钾的还原能力。

由图 11 可知, 在以小麦胚芽油/C90-CELP-THP-Soluplus 为组成的水飞蓟宾 S-SNEDDS 体系中, 水飞蓟宾质量浓度分别为 200、600、1 000、1 400 µg/mL 时, 其自由基清除率分别为 39.09%、82.31%、90.10%、96.02%, 均明显高于水飞蓟宾原料 (自由基清除率分别为 22.89%、41.50%、53.95%、63.21%), 说明该体系能够提高水飞蓟宾对自由基的清除能力。同理, 以沙棘籽油/C90-CELP-THP-Soluplus 为组成的水飞蓟宾 S-SNEDDS 体系也能够增强水飞蓟宾的自由基清除能力。

鉴于以上结果, 即水飞蓟宾 S-SNEDDS 能提高水飞蓟宾对铁氰化钾的还原能力、对自由基的清除能力, 推断本实验所研制的水飞蓟宾 S-SNEDDS 能够提高水飞蓟宾的抗氧化能力。

2.7 水飞蓟宾 S-SNEDDS 细胞毒性

取对数生长期的 Caco-2 细胞, 调整细胞浓度为 8×10^4 个/mL, 取 100 µL 接种于 96 孔板, 置于培养箱中 (37 °C, 5% CO₂) 培养 24 h, 吸弃旧培养液, 分别加入 100 µL 含水飞蓟宾原料 (A 组)、水飞蓟宾 S-SNEDDS (B 组: 小麦胚芽油; C 组: 沙棘籽油) 及其对应的空白 S-SNEDDS (D: 小麦胚芽油; E 组: 沙棘籽油) 的培养基 (DMEM), 以含 0.5% 二甲亚砜 (DMSO) 或 0.5% 灭菌水的培养基为对照组, 以培养基为空白组, 每组复 3 孔。培养 24 h 后, 弃去旧培养液, 加入 120 µL 含四唑氮衍生物 (MTS) 的培养基 (MTS-DMEM 1:5), 置培养箱中孵育 1 h, 于振荡器上放置 10 min, 至晶体完全溶解。用酶标仪于 490 nm 处测定各孔的 A 值, 计算细胞生存率, 结果见图 12。结果显示, 水飞蓟宾 S-SNEDDS 及其相应的空白 S-SNEDDS 在水飞蓟宾质量浓度为 5、10 µmol/L 时, 其细胞生存率均 > 90%, 表明在此质量浓度下, 水飞蓟宾 S-SNEDDS 及其所用辅料对 Caco-2 细胞毒性较小、较安全。

$$\text{细胞生存率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

3 讨论

近年来, SNEDDS 被广泛用于提高难溶性药物

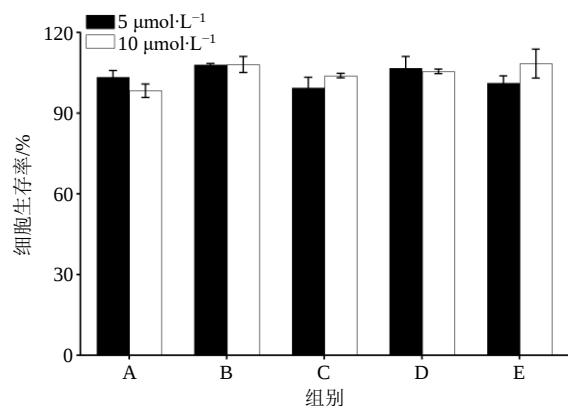


图12 水飞蓟宾 S-SNEDDS 的细胞毒性 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 12 Cytotoxicity of SLB-S-SNEDDS ($\bar{x} \pm s, n=3$)

的溶解度,但其尚有不足之处:自微乳在体内经胃肠液稀释后,部分药物无法始终溶解在油相里,从而外泄产生结晶沉淀,影响药物的利用率^[14]。为了防止药物包裹不完全,传统的 SNEDDS 处方中会添加大量的表面活性剂,但它们会对患者胃肠道产生刺激^[15],长期服用易导致蓄积中毒;而促过饱和物质可以通过自身的抑晶作用延迟药物析晶过程,延长药物作用时间^[16],一定程度上解决了传统 SNEDDS 的药物析晶问题。本实验通过添加促过饱和物质 Soluplus 制备水飞蓟宾 S-SNEDDS,与水飞蓟宾 SNEDDS 相比,既避免了使用过多的表面活性剂,又显著提高了药物的累积溶出率,有效保证了水飞蓟宾的生物利用率。

Soluplus 是一种两亲性的非离子型共聚物载体材料,具有增溶、空间稳定、热敏等作用^[17],不但能将难溶性药物溶于自身疏水内核中,自发形成稳定的聚合物胶束以提高药物的溶解度,还可作为药物纳米晶体的稳定剂以及热敏凝胶的载体。另外有研究显示, Soluplus 可作为自乳化给药系统的晶体抑制剂,能显著提高含羟基药物(如非诺贝特^[18]、他克莫司^[19])的累积溶出率,这与 Soluplus 分子式中含有较多游离羟基,可以与药物中的羟基形成分子间氢键,增加了药物结晶成核的活化能^[18],从而有效抑制药物晶体的生长过程有关。本研究中, Soluplus 可能与水飞蓟宾中的羟基形成氢键从而有效地抑制了其析晶过程,在水飞蓟宾 S-SNEDDS 中展现出良好的促过饱和性能。

油相是 S-SNEDDS 处方的重要组成部分,通常选择能够溶解疏水性药物的油作为油相:马祖兵^[20]等将肉桂油作为油相包裹难溶性药物大黄素,建立了大黄素-桂皮醛(肉桂油主要活性成分)自微乳体

系,两药配伍共同发挥解热镇痛作用;蒋欣欣等^[21]研制了槟榔油自乳化递药系统以探讨槟榔油的毒理安全性及微乳化特性,发现槟榔油安全范围较大,所制备的自微乳稳定性良好,其中槟榔油兼具药物与油相两种功能;以上均体现了中药制剂辅料选择中“药辅合一”的思想。也有研究显示^[22],绝大多数天然植物油脂中都含有一定量的内源性抗氧化物质,如维生素 E、植物多酚等,这些物质既可以通过键的断裂与结合直接清除自由基达到抗氧作用,也可以通过释放活泼氢,捕获自由基,从而阻止自由基链反应,终止脂质过氧化过程。受以上研究的启发,本实验尝试用天然油脂替代药剂学辅料而作为一部分油相,制备水飞蓟宾 S-SNEDDS,发现该处方在改善水飞蓟宾溶出度的同时,提高了其抗氧化能力。本研究是将天然油脂用于自微乳处方组成的有益尝试,并可利用其抗氧化作用,最大限度地发挥中药成分的生物活性,值得进一步深入研究。

参考文献

- [1] 刘敏,肖颖,左爱仁,等. 槲皮素、根皮素、水飞蓟宾清除自由基和抑制脂质过氧化活性研究 [J]. 中成药, 2012, 34(4): 753-756.
- [2] 邵爽,刘春燕,高沿航. 水飞蓟宾治疗药物性肝损伤的研究进展 [J]. 临床肝胆病杂志, 2017, 33(6): 1179-1182.
- [3] 武艳强,王慧娟,冯社军,等. 水飞蓟宾对 H_2O_2 诱导大鼠 H9C2 心肌细胞氧化应激损伤的保护作用 [J]. 现代药物与临床, 2015, 30(5): 503-508.
- [4] Polachi N, Bai G, Li T, et al. Modulatory effects of silibinin in various cell signaling pathways against liver disorders and cancer - A comprehensive review [J]. *Eur J Med Chem*, 2016, 123: 577-595.
- [5] 高华武,陈明,龙子江,等. 水飞蓟宾对高脂诱导非酒精性脂肪肝大鼠的调脂保肝作用 [J]. 药物评价研究, 2017, 40(6): 773-777.
- [6] 胡林,童焕,丁茹,等. Caco-2 细胞单层模型中水飞蓟宾吸收机制研究 [J]. 中国药科大学学报, 2018, 49(2): 202-208.
- [7] Michaelsen M, Siqueira J, Abdi I, et al. Fenofibrate oral absorption from SNEDDS and super-SNEDDS is not significantly affected by lipase inhibition in rats [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2019, 142: 258-264.
- [8] 张楠,周宏兵,全东琴. 自微乳释药系统提高药物生物利用度的机理与应用 [J]. 中国医药生物技术, 2009, 4(1): 47-50.
- [9] 赵丹丹,黄挺,黄绳武. 依托泊苷过饱和自微乳释药系统的制备工艺及质量评价研究 [J]. 中草药, 2015,

- 46(6): 822-831.
- [10] 吴旭锦. 纳米乳结构、类型与处方设计的研究进展 [J]. 养殖技术顾问, 2013(11): 182.
- [11] 曾英男, 顾宇航, 刘 佳, 等. 天然抗氧化剂在油脂中的研究进展 [J]. 安徽农学通报, 2019, 25(Z1): 21-23.
- [12] 王雯婷, 宿友志, 冯治平, 等. 食醋抗氧化性比较分析 [J]. 四川理工学院学报: 自然科学版, 2019, 32(2): 23-29.
- [13] 苏 瑾, 胡艳秋, 田 鸣. 满山红油自乳化释药微乳的制备研究 [J]. 黑龙江医药科学, 2016, 39(5): 10-12.
- [14] 王 娇, 李葆林, 何晓明, 等. 新型自乳化给药系统研究进展 [J]. 中国现代应用药学, 2016, 33(1): 119-121.
- [15] 乔 梁, 魏颖慧, 李范珠. 过饱和自微乳释药系统的研究进展 [J]. 国际药学研究杂志, 2008(4): 279-283.
- [16] Bannow J, Yorulmaz Y, Löbmann K, *et al.* Improving the drug load and in vitro performance of supersaturated self-nanoemulsifying drug delivery systems (super-SNEDDS) using polymeric precipitation inhibitors [J]. *Int J Pharm*, 2020, 575: 118960.
- [17] 吴慧敏, 陈雨琪, 陈 芳, 等. Soluplus 在药物制剂中的应用 [J]. 中国医药工业杂志, 2016, 47(4): 478-483.
- [18] Quan G, Niu B, Singh V, *et al.* Supersaturable solid self-microemulsifying drug delivery system: Precipitation inhibition and bioavailability enhancement [J]. *Int J Nanomed*, 2017, 12: 8801-8811.
- [19] Daero L, Myoungjin H, Hyuckjun J, *et al.* Enhanced dissolution and oral absorption of tacrolimus by supersaturable self-emulsifying drug delivery system [J]. *Int J Nanomed*, 2016, 11: 1109-1117.
- [20] 马祖兵, 李小芳, 谢 龙, 等. 大黄素-桂皮醛自微乳的制备及体外评价 [J]. 中成药, 2019, 41(1): 1-7.
- [21] 蒋欣欣, 张海德, 王伟涛, 等. 槟榔油急性毒理试验及其自微乳特性研究 [J]. 中国粮油学报, 2014, 29(6): 57-62.
- [22] 刘慧敏. 不同植物油微量成分与抗氧化能力的相关性研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2015.