

以茶皂素为天然乳化剂制备水飞蓟素纳米乳及其理化性质考察

邓 茂, 李小芳*, 陈慧娟, 谢 龙, 张旭敏, 刘 凯

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** 以茶皂素为天然乳化剂制备水飞蓟素纳米乳 (silymarin nanoemulsion, SM-NE)。 **方法** 使用高速剪切联合高压均质法制备 SM-NE, 以平均粒径、粒度多分散系数 (polydispersity index, PDI)、分层指数和外观为主要评价指标, 采用单因素试验对处方和制备工艺进行优化; 以摩尔增溶比 (molar solubilization ratio, MSR) 和胶束-水分配系数 (K_m) 作为评价指标探究了茶皂素对水飞蓟素的增溶能力; 对最佳处方和工艺制备的 SM-NE 进行了理化性质和稳定性考察。 **结果** SM-NE 的最佳处方为水飞蓟素用量 0.15%, 茶皂素用量为 0.3%, 油相用量为 5%, 最佳制备工艺为剪切速率 16 000 r/min, 剪切时间 3 min, 均质压力为 100 MPa, 均质次数为 8 次; 茶皂素对水飞蓟素增溶参数值 MSR 和 K_m 分别为 0.011 1 和 2.31; 制得的 SM-NE 的平均粒径为 (204.1 ± 2.8) nm, PDI 为 0.058 ± 0.007 , 电导率为 (117.8 ± 0.9) μ S/cm, pH 值为 7.31 ± 0.10 , 浊度为 (59.75 ± 1.10) cm^{-1} , 水飞蓟素溶解度为 (1.22 ± 0.05) mg/mL; 稳定性结果显示, SM-NE 具有良好的离心稳定性和储存稳定性。 **结论** 以茶皂素为天然乳化剂成功制备了稳定的 SM-NE, 茶皂素是一种潜在的用于水飞蓟素新型绿色纳米制剂生产的天然增溶剂。

关键词: 纳米乳; 茶皂素; 水飞蓟素; 理化性质; 增溶; 高速剪切联合高压均质法

中图分类号: R283.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2021)21-6528-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.21.010

Preparation of silymarin nanoemulsion with tea saponins as natural emulsifiers and investigation of its physicochemical property

DENG Mao, LI Xiao-fang, CHEN Hui-juan, XIE Long, ZHANG Xu-min, LIU Kai

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

Abstract: **Objective** The tea saponins (TS) were used as a natural emulsifier to prepare silymarin nanoemulsion (SM-NE). **Methods** The SM-NE was prepared by high-speed shear combined with high-pressure homogenization. The particle size, polydispersity index (PDI), delamination index and appearance were the main evaluation indicators. The optimal prescription and process parameters were screened out by single factor test; Molar solubilization ratio (MSR) and micelle-water partition coefficient (K_m) were used as evaluation indexes to explore the solubilization ability of TS to silymarin. The physicochemical property and stability of the SM-NE prepared by the optimal prescription and process parameters were studied. **Results** The best prescription of SM-NE was 0.15% of silymarin, 0.3% of TS, and 5% of oil phase. The shear rate and time were 16 000 r/min and 3 min, the homogenization pressure and times were 100 MPa and 8. The solubilization parameters MSR and K_m of TS to silymarin were 0.0111 and 2.31 respectively. The mean particle size of the prepared SM-NE was (204.1 ± 2.8) nm, PDI was 0.058 ± 0.007 , conductivity was (117.8 ± 0.9) μ S/cm, pH was 7.31 ± 0.10 , turbidity was (59.75 ± 1.10) cm^{-1} , and solubility of silymarin was (1.22 ± 0.05) mg/mL. The stability results showed SM-NE had good centrifugal stability and storage stability. **Conclusion** Using TS as the natural emulsifier, the stable SM-NE was successfully prepared. TS is a potential natural solubilizer for the production of a new green

收稿日期: 2021-05-26

基金项目: 四川省科技厅项目 (2019YFS0113); 四川省科技厅项目 (2020095)

作者简介: 邓 茂, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药新制剂、新剂型、新技术。Tel: 15723436257 E-mail: DengmaoL@stu.cdutcm.edu.cn

*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: lixiaofang@cdutcm.edu.cn

nano-pharmaceutics of silymarin.

Key words: nanoemulsion; tea saponins; silymarin; physicochemical property; solubilization; high-speed shear combined with high-pressure homogenization

水飞蓟素(silymarin, SM)是从水飞蓟 *Silybum marianum* (L.) Gaertn.的果实中提取的一种黄酮木脂素类混合物,其成分包括水飞蓟宾(silybin)、异水飞蓟宾(isosilybin)、水飞蓟宁(silydianin)和水飞蓟亭(silychristin)等,且其中水飞蓟宾含量最高^[1-2]。因水飞蓟素具有抗氧化、抗炎、神经保护、调血脂和降血糖等药理,被广泛用于各种疾病的治疗研究,如肝脏疾病、炎症性肠病、糖尿病、神经退行性疾病以及联用降低抗癌药物副作用等^[3-7]。然而,水飞蓟素不仅难溶,且口服后快速与肠道或肝脏细胞结合,由肝脏迅速排泄到胆汁中,导致其口服生物利用度很低,极大地限制了其临床应用^[8]。因此,提高水飞蓟素溶解度一直是研究者的关注点,目前用于水飞蓟素增溶的方法有纳米混悬剂、纳米胶束等^[9-10]。

纳米乳(nanoemulsion, NE)是在亚微米尺寸范围内的胶体微粒系统,可用作药物分子的载体,通常它们的大小在 10~200 nm。纳米乳作为药物输送系统可提高药物溶解度、生物利用度、降低不良反应和毒性反应,相比其他纳米制剂有着更好的物理稳定性^[11-13]。通常,纳米乳是由油相、水相、乳化剂和助乳化剂组成。乳化剂是保证纳米乳稳定性的决定性因素,而常用的乳化剂主要有合成表面活性剂和天然表面活性剂。研究表明,合成表面活性剂有着慢毒性和不可避免的一系列生物安全性隐患^[14-15]。因此,近年来天然表面活性剂受到广泛的关注,也成为了研究热点。

天然表面活性剂主要包括多糖、蛋白质、磷脂和皂苷等,它们具有生物降解性,低毒性环境友好等优点^[16]。茶皂素(tea saponins, TS)是一种从茶籽(茶树种子)中提取得到的五环三萜化合物,其结构中具有亲水性糖基和疏水性糖苷配基,因此其可作为天然表面活性剂,具有乳化、润湿和分散等作用^[17]。茶皂素作为一种天然表面活性剂已经在农业、石油、食品和化妆品方面有着广泛的研究^[18-21]。且已有研究证明其可作为稳定剂制备纳米混悬剂用于难溶性药物的增溶^[22]。因此,本实验以茶皂素为天然乳化剂制备水飞蓟素纳米乳(silymarin nanoemulsion, SM-NE),探究其作为天然表面活性剂制备 SM-NE 从而提高水飞蓟素溶解度的可行性,

为开发安全的水飞蓟素绿色新剂型奠定了基础,也为取代合成表面活性剂提供了新的方向。

1 仪器与材料

1.1 仪器

NICOMP 380ZLS 型激光粒度测定仪,美国 PSS 粒度仪公司; SJIA-10N-50 型冷冻干燥机,宁波市双嘉仪器有限公司; UV-6100 型紫外分光光度计,上海美谱达仪器有限公司; Agilent 1260 型高效液相色谱仪, DAD 检测器, 美国 Agilent 公司; C25 实验室分散乳化均质机,上海恒川机械设备有限公司; AH100D 高压均质机,加拿大 ATS 公司; DDS-11C 电导率仪, PHs-2F pH 计, 上海仪电科学仪器股份有限公司; KQ5200DE 型数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司; JEM 1200EX 透射电子显微镜,日本 JEOL 公司。

1.2 材料

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;水飞蓟素原料药(批号 GL20200508,质量分数 80%)、茶皂素(批号 GL20200429,质量分数 90%),西安小草植物科技有限责任公司;油酸、蓖麻油(分析纯),成都市科隆化学品有限公司;辛癸酸甘油酯(食品级)棕榈酸异丙酯(日化级),山东优素化工科技有限公司;中链三酰甘油(MCT,食品级),美国 Now Foods 公司;甘露醇、乳糖、山梨醇、葡萄糖、蔗糖,均为分析纯,成都市科龙化工试剂厂;甲醇(色谱级),赛默飞世尔科技(中国)有限公司;冰醋酸(色谱级),成都市科龙化工试剂厂;去离子水是由实验室超纯水机生产。

2 方法与结果

2.1 水飞蓟素含量测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Capcell Pak C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);检测波长 287 nm;流动相为甲醇-0.1%冰醋酸水溶液(48:52);柱温为 40 °C;体积流量 1.0 min/mL;进样量 10 μL^[9]。理论塔板数按水飞蓟宾色谱峰计算不低于 5000。

2.1.2 对照品溶液的配制 精密称取水飞蓟宾对照品 10.56 mg 于 50 mL 量瓶中,加入适量甲醇后超声使其溶解,再加甲醇定容至刻度线,摇匀,配制成质量浓度为 211.2 mg/L 的水飞蓟宾对照品溶液^[23]。

2.1.3 供试品溶液的配制 精密称取一定量的水飞蓟素原料药于 50 mL 量瓶中, 加入适量甲醇超声溶解, 加甲醇定容至刻度线, 摇匀, 即得供试品溶液 1。

精密吸取 1 mL SM-NE 于 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释后超声 15 min, 加甲醇至刻度线, 摇匀, 制成供试品溶液 2。

另取空白纳米乳, 按照供试品溶液 2 的配制方法制得阴性对照溶液。

2.1.4 专属性考察 分别取对照品溶液、供试品溶液 1、供试品溶液 2、阴性对照溶液, 用 0.22 μm 的微孔滤膜滤过后, 注入高效液相色谱仪, 按照“2.1.1”项下色谱条件进行分析。结果如图 1 所示, 水飞蓟宾双峰保留时间分别为 8.30、8.90 min, 阴性对照不产生干扰, 被测成分没有受到其他组分的影响, 且峰形良好。

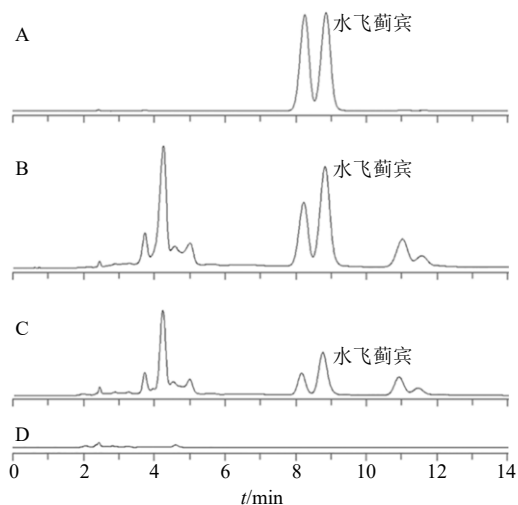


图 1 水飞蓟宾对照品 (A)、水飞蓟素原料药 (B)、SM-NE 样品 (C) 和空白纳米乳 (D) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC diagrams of silybin reference substance (A), SM coarse drug (B), SM-NE sample (C), and blank nanoemulsion (D)

2.1.5 线性关系考察 精密吸取配制好的水飞蓟宾对照品溶液 0.1、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 于 10 mL 量瓶中, 用甲醇定容至刻度线, 充分摇匀, 用 0.22 μm 的微孔滤膜滤过后按照“2.1.1”项下色谱条件进行 HPLC 分析。以水飞蓟宾对照品的质量浓度 (C) 为横坐标, 对应峰面积 (A) 为纵坐标, 绘制标准曲线, 进行线性回归, 得线性回归方程为 $A=21.328 C-5.733 6$, $R^2=0.999 9$, 结果表明水飞蓟宾在 2.112~211.200 mg/L 具有良好的线性关系。

2.1.6 水飞蓟素原料药中水飞蓟宾的测定 精密称取一定量的水飞蓟素原料药于 50 mL 量瓶中, 加

入甲醇超声溶解后, 加甲醇定容到刻度线, 用 0.22 μm 的微孔滤膜滤过至液相样品瓶中, 制备成供试品溶液 1, 平行制备 3 份, 按照“2.1.1”项下的 HPLC 条件进样分析。结果表明 3 份水飞蓟素原料药样品中水飞蓟宾的质量分数分别为 17.84%、17.40%、18.25%, 平均值为 17.83%。因此, 拟定水飞蓟素原料药中水飞蓟宾的质量分数是 17.83%。

2.2 SM-NE 的制备

SM-NE 的制备方法为高速剪切-高压均质法^[24]。将处方量的油相置于烧杯中, 加入精密称取的处方量的水飞蓟素原料药, 超声使其混匀于油相; 将处方量的去离子水置于另一烧杯中, 并加入精密称取处方量的茶皂素, 超声使茶皂素充分溶解, 作为水相。将水相倒入油相, 边倒边搅拌, 随后进行高速剪切, 制得粗乳液, 将粗乳液转入高压均质机在一定压力下进行高压均质数次, 即得 SM-NE。

2.3 粒径和粒度多分散系数 (PDI) 的测定

在室温下, 用去离子水将 0.12 mL 的纳米乳稀释至 25 mL, 并通过粒度分析仪、测定粒径和 PDI。测定结果均为平行测定 3 次的平均值。

2.4 SM-NE 的处方筛选

2.4.1 分层指数的计算 将制备的 SM-NE 置于相同规格的密封玻璃瓶中, 且在室温下静置。定期观察样品的分层, 絮凝和沉淀现象, 并记录乳液层的高度, 从而计算 SM-NE 的分层指数。

$$\text{分层指数} = (H_0 - H_t) / H_0$$

H_0 、 H_t 分别为 0、 t 时刻乳液层的高度

2.4.2 油相种类的筛选 精密称取处方量的水飞蓟素原料药, 分别加入 5% 油相 (蓖麻油、油酸、棕榈酸异丙酯、MCT、辛癸酸甘油酯), 依照前述“2.2”项下方法制备 SM-NE, 室温下静置 30 min 后, 观察其外观, 测定其平均粒径和 PDI; 并且以离心 2 h 后的乳液分层指数为稳定性指标, 考察了不同种类油相对乳液平均粒径、PDI 和稳定性的影响。结果如表 1 所示, 不同油相制备的乳液外观不一, 并且平均粒径、PDI、分层指数也不同。蓖麻油和油酸为油相制备所得乳液, 粒径较大且离心分层指数较大。棕榈酸异丙酯和辛癸酸甘油酯为油相制备的乳液虽然粒径比较小, 但 PDI 偏大, 且分层指数相比 MCT 较大。MCT 为油相制备的乳液粒径和 PDI 都较小, 且离心稳定性最佳, 因此最终选择 MCT 作为 SM-NE 的油相。

2.4.3 油相用量对 SM-NE 的影响 MCT 作为油相

表 1 油相种类对 SM-NE 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of oil phase types on SM-NE ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

油相种类	平均粒径/nm	PDI	外观	离心分层指数/%
蓖麻油	295.2±2.0	0.141±0.039	乳液不均匀, 烧杯壁上有大量油珠附挂	6.56
油酸	257.7±2.0	0.098±0.041	乳液较均匀, 表面一层药物漂浮	3.33
棕榈酸异丙酯	182.1±3.5	0.237±0.096	乳液均匀, 表面有少许油珠漂浮	0.83
MCT	221.5±3.0	0.070±0.012	乳液均匀, 表面有少许药物漂浮	0.66
辛酸酸甘油酯	222.5±2.7	0.231±0.010	乳液均匀, 表面少许药物漂浮	0.83

制备 SM-NE, 以外观、平均粒径和 PDI 为指标, 考察 MCT 不同用量 (体积分数, 1%、3%、5%、7%、9%) 对乳液的影响, 制备方法同“2.2”项。结果如表 2 所示, 随着油相用量的增加, 乳液粒径呈逐渐增加的趋势, 而 PDI 为先减小后增大。从外观上来看, 当油相用量达 7%及以上时, 乳液表面有油珠漂浮, 明显油相乳化不完全, 对乳液稳定性将会造成不好的影响。因此, 综合对平均粒径、PDI 和外观等的考虑, 最终选择油相 MCT 用量为 5%。

表 2 油相用量对 SM-NE 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effects of oil dosage on SM-NE ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

油相用量/%	平均粒径/nm	PDI	外观
1	198.1±4.9	0.106±0.029	乳液均匀
3	199.6±2.1	0.062±0.022	乳液均匀
5	227.0±2.6	0.037±0.005	乳液均匀
7	256.4±5.5	0.067±0.004	乳液均匀, 表面少量小油珠漂浮
9	278.2±2.5	0.101±0.010	乳液均匀, 表面油珠漂浮

2.4.4 乳化剂 (茶皂素) 用量对 SM-NE 的影响 精密称取处方量的水飞蓟素原料药于烧杯中, 加入 5% 的油相 MCT, 再分别精密称取不同用量的茶皂素 (质量分数分别为 0、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%), 加入处方量去离子水中, 按“2.2”项方法制备 SM-NE, 测定平均粒径和 PDI, 结果如表 3 所示。随着茶皂素用量的增加, 粒径逐渐减小, 但可明显看出, 当其用量达到 0.4%时, 粒径减小趋势放缓。乳液 PDI 主要呈先减小后增大趋势。因此, 出于对粒径和 PDI 以及辅料用量的考虑, 选择茶皂素用量为 0.3%。

2.4.5 高速剪切速率的确定 精密称取质量分数为 0.15%的水飞蓟素原料药加入 5%油相 MCT, 称取 0.3%茶皂素于一定量去离子水中, 在不同的剪切速率 (10 000、13 000、16 000、19 000、22 000 r/min)

表 3 乳化剂用量对 SM-NE 平均粒径和 PDI 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of emulsifier dosage on SM-NE particle size and PDI ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

茶皂素 用量/%	平均粒径/ nm	PDI	外观
0.0	444.7±5.6	0.109±0.089	乳液不均匀, 药物和油珠漂浮
0.1	289.3±11.8	0.065±0.016	乳液均匀, 少量药物和油珠漂浮
0.2	233.5±3.5	0.046±0.035	乳液均匀, 少量油珠漂浮
0.3	209.0±1.5	0.043±0.016	乳液均匀
0.4	190.4±1.0	0.105±0.035	乳液均匀
0.5	186.2±0.9	0.085±0.031	乳液均匀
0.6	192.8±3.2	0.066±0.011	乳液均匀
0.7	189.6±1.2	0.094±0.006	乳液均匀

下剪切, 按“2.2”项下方法制备 SM-NE, 测定其平均粒径和 PDI。结果如表 4 所示, 当剪切速率为 16 000 r/min 时, 所制备的 SM-NE 的平均粒径和 PDI 都较小, 证明体系中的乳滴大小均匀, 粒径分布范围窄。当剪切速率大于 16 000 r/min 后, SM-NE 的平均粒径和 PDI 都有少量增加。可能是因为剪切速率过快造成泡沫太多, 影响下一步的均质操作。因此, 选择剪切速率为 16 000 r/min。

2.4.6 均质压力和均质次数的确定 精密称取质量分数为 0.15%的水飞蓟素原料药加入 5%油相, 称取

表 4 剪切速率对 SM-NE 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effects of shear rate on SM-NE ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

剪切速率/(r·min ⁻¹)	平均粒径/nm	PDI
10 000	207.5±6.1	0.048±0.028
13 000	210.2±2.3	0.073±0.005
16 000	205.6±1.0	0.042±0.027
19 000	205.4±1.9	0.043±0.023
22 000	213.6±0.7	0.046±0.014

0.3%茶皂素于一定量去离子水中,在不同压力(20、40、60、80、100、120 MPa)下,按“2.2”项下方法制备 SM-NE,测定其平均粒径和 PDI。结果如表 5 所示,随着均质压力的增加,SM-NE 的平均粒径和 PDI 呈减小的趋势,但当压力加到 100 MPa 时,SM-NE 的平均粒径和 PDI 呈平稳趋势,没有继续减小。因此,考虑到能耗和仪器损耗,以及均质压力过大乳液的温度升高,对乳液的稳定性可能产生不良影响,选择均质压力为 100 MPa。

表 5 均质压力对 SM-NE 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effects of homogenization pressure on SM-NE ($\bar{x} \pm s, n=3$)

均质压力/MPa	平均粒径/nm	PDI
20	373.2±5.7	0.053±0.031
40	251.5±5.3	0.041±0.005
60	227.9±4.8	0.078±0.058
80	218.6±4.9	0.066±0.001
100	206.6±1.5	0.079±0.021
120	206.2±1.3	0.102±0.011

随后考察了均值次数(4、6、8、10、12、14 次),结果 SM-NE 的粒径分别为(217.3±3.2)、(205.4±1.4)、(202.5±2.8)、(200.8±2.2)、(197.6±2.4)、(204.0±1.7) nm, PDI 分别为 0.065±0.023、0.074±0.028、0.051±0.023、0.067±0.008、0.079±0.021、0.046±0.004,随着均质次数的增加,SM-NE 的平均粒径和 PDI 逐渐减小,当均质次数到 8 次时,SM-NE 的平均粒径和 PDI 已经比较小,且继续增加均质次数,平均粒径和 PDI 没有明显的减小。因此,同样考虑到能耗和仪器损耗,以及均质压力过大乳液的温度升可能造成不良影响,选择均质次数为 8 次。

2.4.7 验证试验 根据以上实验得到的最佳处方和制备工艺条件制备了 3 批 SM-NE,分别测定其平均粒径和 PDI。结果见表 6,根据结果可知,在单因素考察得到的最优处方和制备工艺条件下,制备

表 6 验证试验结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 6 Results of verification test ($\bar{x} \pm s, n=3$)

批次	平均粒径/nm	PDI	水飞蓟素/(mg·mL ⁻¹)
1	206.9±3.1	0.051±0.014	1.19±0.03
2	202.9±1.2	0.063±0.026	1.24±0.04
3	202.5±2.0	0.061±0.006	1.23±0.01

得到的 SM-NE 平均粒径和 PDI 小,即 SM-NE 中的乳滴粒径小且分布范围窄。综上,单因素考察得到的最佳处方和制备工艺可行,具有良好的重现性。

2.5 茶皂素的增溶能力考察

2.5.1 增溶能力评价 通常,表示增溶剂增溶能力的参数主要有摩尔增溶比(molar solubilization ratio, MSR)和胶束-水分配系数(K_m)^[25]。因此,本实验选择这 2 个参数来探究茶皂素对水飞蓟素的增溶能力。

(1) MSR: MSR 是用来量化增溶剂对给定增溶物的增溶效果^[26]。它可以定义为每物质的量添加到溶液中的增溶剂中溶解的被增溶物的量。

$$MSR = (S_t - S_{CMC}) / (C_t - C_{CMC})$$

C_t 表示增溶剂溶液浓度(mol/L) ($C_t > C_{CMC}$), C_{CMC} 表示增溶剂溶液浓度达到临界胶束浓度(critical micelle concentration, CMC)时的浓度, S_t 、 S_{CMC} 分别代表增溶剂溶液浓度为 C_t 、 C_{CMC} 时溶质的表观溶解度(mol/L);以增溶剂溶液浓度(C_x)对溶质浓度(C)作图,线段斜率即为 MSR

(2) K_m : K_m 是指被增溶物在胶束与水相间有机物的分配量比值,可表示为 $K_m = X_m / X_a$,式中 X_m 为溶质在增溶剂胶束中的物质的量分数, X_a 为溶质在水相中的物质的量分数^[27]。 X_m 可以计算为 $X_m = MSR / (1 + MSR)$, X_a 可以计算为 $X_a = S_{CMC} \cdot V_w$, V_w 是水的摩尔体积($V_w = 0.018\ 05\ L/mol$),因此, K_m 的计算公式还可以表示为以下等式。

$$K_m = 55.4 MSR / S_{CMC} (1 + MSR)$$

2.5.2 增溶能力考察 分别精密称量不同量的茶皂素、十二烷基硫酸钠(SDS)或聚山梨酯-80(T80)分别置于 10 mL 的西林瓶中(SDS 和 T80 作为对照组),分别加入 5 mL 去离子水,使之配成一系列浓度高于 CMC 的增溶剂溶液,再分别向不同浓度的增溶剂溶液中加入过量的水飞蓟素原料药,超声溶解 2 h 后,置于(25±1)℃恒温水浴振荡 12 h,达到溶解平衡后,以 5000 r/min 的转速离心 30 min,分别精密量取 1 mL 上清液于 10 mL 量瓶中,加入甲醇稀释到刻度线,摇匀,过 0.22 μm 微孔滤膜,用 HPLC 法分析样品中水飞蓟素的含量。每个浓度平行 3 组。根据测定结果,得到不同浓度增溶剂溶液中水飞蓟素的最大溶解度,如表 7 所示。

根据表 7 结果,以平均药物浓度(C_{mean})为纵坐标,增溶剂溶液浓度(C_t)为横坐标作图,所得直线斜率即为增溶剂的 MSR。增溶剂的增溶趋势图

表 7 298 K 下水飞蓟素在不同浓度增溶剂溶液中的最大溶解量 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 7 Maximum dissolved concentration of SM in different concentrations surfactant solutions at 298 K ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

增溶剂	$C_i/$ (mmol·L ⁻¹)	水飞蓟素最大溶 解度/(mmol·L ⁻¹)	增溶剂	$C_i/$ (mmol·L ⁻¹)	水飞蓟素最大溶 解度/(mmol·L ⁻¹)	增溶剂	$C_i/$ (mmol·L ⁻¹)	水飞蓟素最大溶 解度/(mmol·L ⁻¹)
茶皂素	2.20	0.060±0.002	SDS	6.00	0.170±0.005	T80	12.50	0.260±0.003
	4.40	0.090±0.004		12.00	0.190±0.003		25.00	0.350±0.006
	8.80	0.130±0.004		24.00	0.380±0.015		50.00	0.440±0.007
	17.60	0.180±0.005		48.00	0.590±0.014		100.00	0.580±0.011
	35.20	0.440±0.018		96.00	0.790±0.016		200.00	0.660±0.009

如图 2 所示, 根据 MSR 计算得到 K_m , 各增溶剂的 MSR 和 K_m 值见表 8。根据结果可知, 对于水飞蓟素的增溶能力, 3 种增溶剂的 MSR: 茶皂素>SDS>T80, $\ln K_m$: 茶皂素>SDS>T80, 而 3 种增溶剂的 CMC 为 T80>SDS>茶皂素。可见各增溶剂 CMC 的大小规律与 $\ln K_m$ 的大小规律刚好相反。从图 2 可以看出, 不同增溶剂对水飞蓟素的增溶量随着其浓度变化呈不同斜率的线性增加, 可见增溶剂的种类对增溶效果有着显著的影响。Jyotsna 等^[25]提出增

溶剂之间的增溶能力差异可能归因于它们的结构, 且具有较低 CMC 值的增溶剂具有较高的增溶能力, 本实验的增溶结果刚好与这一规律相符。此外, 对于溶解在增溶剂胶束内核中心 (由疏水键端形成) 的被增溶物, 其增溶量会随着胶束直径或者聚集数的增加而增加, 所以增溶量会随着增溶剂溶液浓度的增加呈线性增加^[28]。总的来说, 天然增溶剂茶皂素对水飞蓟素的增溶效果比合成增溶剂 SDS 或 T80 对水飞蓟素的增溶效果好。

2.6 理化性质考察

2.6.1 SM-NE 的类型鉴别 选用染色法进行纳米乳的类型鉴别^[29]。分别取等量的 SM-NE 于 2 支相同规格的试管中, 分别取适量的亚甲基蓝 (水溶性染料) 和苏丹红 (油溶性染料) 加入试管中, 观察 2 种染料在纳米乳中的扩散速度。结果为亚甲基蓝在 SM-NE 中的扩散速度大于苏丹红在 SM-NE 的扩散速度, 可见 SM-NE 为 O/W 型纳米乳。

2.6.2 SM-NE 的外观 通过透射电子显微镜 (TEM) 观察了 SM-NE 的外观形态。将适量的 SM-NE 稀释后滴在铜网上, 在 5~6 min 后吸去多余的乳液, 并加入 1% 磷酸钨溶液进行负染, 5 min 后吸去多余的染液, 将晾干的铜网置于 TEM 下观察并拍照。结果如图 3 所示, 可见 SM-NE 液滴呈圆球状, 大小均匀, 形态良好。

2.6.3 电导率的测定 按照最佳处方和制备工艺平行制备 3 批 SM-NE, 室温下静置 2 h 后测定其电导率。测得 SM-NE 的电导率平均值分别为 (117.4±1.2)、(118.4±0.9)、(118.7±1.3) $\mu\text{S}/\text{cm}$ ($n=3$)。

2.6.4 pH 值的测定 按照最佳处方和制备工艺平行制备 3 批 SM-NE, 室温下静置 2 h 后测定其 pH 值。测得 SM-NE 的 pH 平均值分别为 7.27±0.30、7.41±0.10、7.25±0.20 ($n=3$)。

2.6.5 浊度的测定 按最佳处方和制备工艺制备

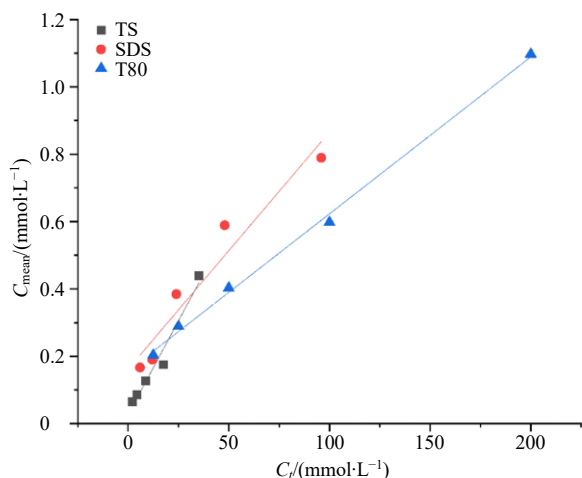


图 2 在 298 K 下水飞蓟素在不同浓度增溶剂溶液 (茶皂素、SDS、T80) 中的溶解趋势

Fig. 2 Solubilization trend of SM in different surfactants solutions (TS, SDS, T80) at 298 K

表 8 在 298 K 下水飞蓟素在不同增溶剂溶液中的 MSR 和 $\ln K_m$

Table 8 MSR and $\ln K_m$ of SM in different surfactant solutions at 298 K

增溶剂	MSR	$\ln K_m$
茶皂素	0.011 1	2.31
SDS	0.007 0	0.82
Tw80	0.004 7	0.26

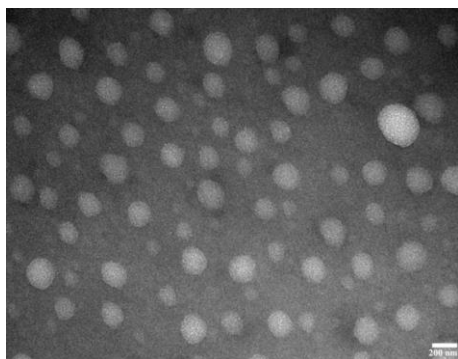


图 3 SM-NE 的 TEM 图

Fig. 3 TEM image of SM-NE

SM-NE, 用去离子水将 SM-NE 稀释 1000 倍, 室温下用紫外分光光度计测定其在 680 nm 处的透过率, 根据公式计算浊度^[30]。所有测量重复 3 次。

$$\tau = v/l \cdot \ln(I_0/I) = v/l \cdot \ln(1/T)$$

τ 表示浊度, l 表示光程长度, v 表示稀释倍数, I_0 表示光透过参比测试样后照射到光电转换器上的强度, I 表示光透过被测样品后照射到光电转换器上的强度, T 代表透光率

根据以上公式计算得到 SM-NE 的浊度平均值为 $(59.75 \pm 1.10) \text{ cm}^{-1}$ ($n=3$)。

2.6.6 SM-NE 中水飞蓟素溶解度测定 按最佳处方和制备工艺平行制备 3 份 SM-NE, 用 HPLC 法测定 SM-NE 中水飞蓟素的质量浓度, 样品溶液配制方法同“2.1.2”项供试品溶液 2。结果显示 SM-NE 中水飞蓟素的溶解度为 $(1.22 \pm 0.05) \text{ mg/mL}$, 水飞蓟素在水中的溶解度为 0.038 mg/mL 。可见水飞蓟素在 SM-NE 中的溶解度提高了约 30 倍, SM-NE 达到了良好的增溶作用。

2.7 离心稳定性考察

按照最佳处方和制备工艺平行制备 3 批 SM-NE, 分别取 6 mL 于离心管中, 在 4000 r/min 的转速下离心 30 min, 观察 SM-NE 的外观, 并测定离心前后 SM-NE 的吸光值 (A), 计算 SM-NE 的离心稳定常数 (K , K 值越大, 离心稳定性越好), 评价 SM-NE 的离心稳定性^[31]。

$$K = A_1/A_0$$

A_0 为纳米乳离心后的 A 值, A_1 为纳米乳离心前的 A 值

SM-NE 离心后呈乳白色, 没有分层、絮凝、破乳和凝结等不稳定现象。SM-NE 离心前的 $A_0 = 0.321 \pm 0.003$, 离心后的 $A_1 = 0.306 \pm 0.002$, $K = 95.3\%$ 。SM-NE 的外观和含量均未收到离心的影响, 可见以茶皂素为天然乳化剂制备的 SM-NE 有着良好的离心稳定性。

2.8 储存稳定性考察

根据最佳处方和制备工艺, 制备 6 份 SM-NE 并分别在室温和 4°C 各放置 3 份静置 90 d, 观察外观, 并于第 0、15、30、60、90 d 测定 SM-NE 的平均粒径和 PDI, 每份样品平行测定 3 次取平均值。储存稳定性的实验结果如表 9 所示。在长期储存过程中, 常温和 4°C 下储存的 SM-NE 均没有出现分层、聚结和破乳等不稳定现象。在常温和 4°C 下, SM-NE 的粒径有少量增长 ($\leq 20 \text{ nm}$)。SM-NE 的 PDI 在常温下有一定增大, 但在 4°C 下没有明显增大。可见, 以茶皂素为乳化剂制备的 SM-NE 在常温和 4°C 下稳定性良好, 证明茶皂素作为天然乳化剂可以用于制备储存稳定性良好的 SM-NE。

表 9 SM-NE 的储存稳定性 ($n=3$)Table 9 Storage stability of SM-NE ($n=3$)

t/d	平均粒径/nm		PDI	
	常温	4°C	常温	4°C
0	202.40 ± 1.14	204.56 ± 1.97	0.032 ± 0.027	0.026 ± 0.026
15	213.60 ± 4.20	212.17 ± 4.07	0.070 ± 0.047	0.042 ± 0.042
30	213.04 ± 2.18	215.87 ± 1.43	0.071 ± 0.049	0.039 ± 0.020
60	225.37 ± 1.07	216.17 ± 2.90	0.075 ± 0.041	0.019 ± 0.019
90	220.87 ± 4.23	224.27 ± 3.43	0.147 ± 0.154	0.062 ± 0.089

3 讨论

本实验使用高速剪切联合高压均质这一高能乳化法制备 SM-NE, 并且成功制备了粒径小、粒径分布均匀且质地均匀的 SM-NE, 同时也避免了低能乳化法存在的有机溶剂残留和辅料量大等问题。

本实验探究了茶皂素作为天然增溶剂制备 SM-NE 的可能性, 并对所制备的 SM-NE 进行了理化性质和稳定性考察。单因素实验结果显示, 以茶皂素为乳化剂成功制备了 SM-NE, 通过单因素考察得到了 SM-NE 的最佳处方 (水飞蓟素用量 0.15%, 茶皂素用量 0.3%, 油相用量 5%) 和最佳制备工艺 (剪切速率 16 000 r/min, 剪切时间 3 min, 均质压力为 100 MPa, 均质次数为 8 次), 这一结果为本课题组进一步使用效应面法优化处方和制备工艺奠定了基础。增溶能力考察结果显示, 茶皂素对水飞蓟素有着良好的增溶效果, 可以替代合成增溶剂用于 SM-NE 的制备, 而含量测定结果也证实了这一结论 (水飞蓟素在 SM-NE 中的溶解度约是其在水中溶解度的 30 倍)。稳定性结果显示茶皂素稳定的 SM-NE 有着良好的离心稳定性和储存稳定性, 可见茶皂素

可用于稳定性要求高的载药纳米乳制备。

总的来说,本实验证实了茶皂素作为天然乳化剂制备水飞蓟素新型绿色纳米制剂的可行性,这为新型绿色纳米制剂的发展提供了新的选择和方向。研究表明虽然茶皂素对皮肤和眼部有轻微的刺激作用,但对肠胃有保护作用且无明显毒性作用^[32-33]。此外,茶皂素已被证明是安全、环保及来源广泛易得的^[34]。综上,茶皂素作为增溶剂替代合成增溶剂用于口服纳米乳制剂的生产是可行的,但对于茶皂素进一步的体内外生物相容性、体内安全性等的研究是必要的。本课题组将对茶皂素稳定的 SM-NE 的药理活性和安全性进行研究,以期以茶皂素为增溶剂的水飞蓟素新型绿色制剂开发奠定基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Kumar S, Pandey A K. Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview [J]. *Sci World J*, 2013, 2013: 162750.
- [2] Xie Y, Zhang D Q, Zhang J, *et al.* Metabolism, transport and drug-drug interactions of silymarin [J]. *Molecules*, 2019, 24(20): E3693.
- [3] Nguyen T T, Trinh N T, Tran H N, *et al.* Improving silymarin oral bioavailability using silica-installed redox nanoparticle to suppress inflammatory bowel disease [J]. *J Control Release*, 2021, 331: 515-524.
- [4] Wu W T, Chen Y R, Lu D H, *et al.* Silymarin modulates catabolic cytokine expression through Sirt1 and SOX9 in human articular chondrocytes [J]. *J Orthop Surg Res*, 2021, 16(1): 147.
- [5] Yardim A, Kucukler S, Özdemir S, *et al.* Silymarin alleviates docetaxel-induced central and peripheral neurotoxicity by reducing oxidative stress, inflammation and apoptosis in rats [J]. *Gene*, 2021, 769: 145239.
- [6] Ommati M M, Farshad O, Azarpira N, *et al.* Silymarin mitigates bile duct obstruction-induced cholemic nephropathy [J]. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 2021, 394(6): 1301-1314.
- [7] Haddadi R, Shahidi Z, Eyvari-Brooshghalan S. Silymarin and neurodegenerative diseases: Therapeutic potential and basic molecular mechanisms [J]. *Phytomedicine*, 2020, 79: 153320.
- [8] Tvrdý V, Pourová J, Jirkovský E, *et al.* Systematic review of pharmacokinetics and potential pharmacokinetic interactions of flavonolignans from silymarin [J]. *Med Res Rev*, 2021, 41(4): 2195-2246.
- [9] 唐海龙, 李小芳, 龙家英, 等. 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 [J]. *中草药*, 2020, 51(4): 971-977.
- [10] 贺少龙, 洪彤彤, 刘艳华, 等. 水飞蓟素载药纳米胶束的制备及初步评价 [J]. *宁夏医科大学学报*, 2016, 38(8): 868-871.
- [11] 陈雯烨, 王志高, 鞠兴荣, 等. 纳米乳的研究进展与潜在局限性 [J]. *粮食科技与经济*, 2020, 45(3): 79-83.
- [12] Jaiswal M, Dudhe R, Sharma P K. Nanoemulsion: An advanced mode of drug delivery system [J]. *3 Biotech*, 2015, 5(2): 123-127.
- [13] Mahour R, Sahni J K, Sharma S, *et al.* Nanoemulsion as a tool for improvement of Cilostazol oral bioavailability [J]. *J Mol Liq*, 2015, 212: 792-798.
- [14] Walia N, Chen L Y. Pea protein based vitamin D nanoemulsions: Fabrication, stability and *in vitro* study using Caco-2 cells [J]. *Food Chem*, 2020, 305: 125475.
- [15] Yang Y, Leser M E, Sher A A, *et al.* Formation and stability of emulsions using a natural small molecule surfactant: *Quillaja* saponin (*Q-Naturale*®) [J]. *Food Hydrocoll*, 2013, 30(2): 589-596.
- [16] De S, Malik S, Ghosh A, *et al.* A review on natural surfactants [J]. *RSC Adv*, 2015, 5: 65757-65767.
- [17] Yan J, Wu Z L, Zhao Y L, *et al.* Separation of tea saponin by two-stage foam fractionation [J]. *Sep Purif Technol*, 2011, 80(2): 300-305.
- [18] Ma Y, Gao Y X, Zhao X, *et al.* A natural triterpene saponin-based pickering emulsion [J]. *Chem-Eur J*, 2018, 24(45): 11703-11710.
- [19] Bezerra K G O, Rufino R D, Luna J M, *et al.* Saponins and microbial biosurfactants: Potential raw materials for the formulation of cosmetics [J]. *Biotechnol Prog*, 2018, 34(6): 1482-1493.
- [20] Nowrouzi I, Mohammadi A H, Manshad A K. Water-oil interfacial tension (IFT) reduction and wettability alteration in surfactant flooding process using extracted saponin from *Anabasis Setifera* plant [J]. *J Petrol Sci Eng*, 2020, 189: 106901.
- [21] Zhu Z, Wen Y, Yi J, *et al.* Comparison of natural and synthetic surfactants at forming and stabilizing nanoemulsions: Tea saponin, *Quillaja* saponin, and Tween 80 [J]. *J Colloid Interf Sci*, 2019, 536: 80-87.
- [22] Long J Y, Song J W, Zhang X M, *et al.* Tea saponins as natural stabilizers for the production of hesperidin nanosuspensions [J]. *Int J Pharm*, 2020, 583: 119406.
- [23] 梁文权, 赵航. 水飞蓟素胶丸的制备及其含量测定 [J]. *华西药理学杂志*, 2004, 19(4): 254-256.
- [24] 廖艳梅, 李小芳, 刘罗娜, 等. 橙皮苷纳米乳液的制备及其稳定性研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(10): 2312-2318.

- [25] Lakra J, Tikariha D, Yadav T, *et al.* Study of solubility efficiency of polycyclic aromatic hydrocarbons in single surfactant systems [J]. *J Surfactants Deterg*, 2013, 16(6): 957-966.
- [26] Srivastava A, Ismail K. Solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous sodium dioctylsulfosuccinate solutions [J]. *J Mol Liq*, 2014, 195: 105-109.
- [27] Lewandowski A, Szymczyk K. Partitioning of selected anisole and veratrole derivatives between water and anionic surfactant micelles [J]. *Molecules*, 2020, 25(24): E5818.
- [28] Mir M A, Chat O A, Najjar M H, *et al.* Solubilization of triphenylamine, triphenylphosphine, triphenylphosphineoxide and triphenylmethanol in single and binary surfactant systems [J]. *J Colloid Interf Sci*, 2011, 364(1): 163-169.
- [29] 何文, 吴文英. O/W 型硝苯地平透皮纳米乳的制备及质量评价 [J]. 中国药师, 2017, 20(4): 668-673.
- [30] Liao Y M, Zhong L, Liu L N, *et al.* Comparison of surfactants at solubilizing, forming and stabilizing nanoemulsion of hesperidin [J]. *J Food Eng*, 2020, 281: 110000.
- [31] 姚艳玉, 马培华, 曾庆晗, 等. 油相种类对姜黄素纳米乳液稳定性的影响 [J]. 食品科技, 2017, 42(9): 238-242.
- [32] 文莉, 芦苇, 蒋倩, 等. 茶皂素毒性刺激性试验及抑菌作用研究 [J]. 中国油脂, 2011, 36(6): 58-60.
- [33] 岳翠男, 江新风, 李延升, 等. 茶皂素提取技术及生物活性研究进展 [J]. 食品工业科技, 2019, 40(7): 326-331.
- [34] Cui C J, Zong J F, Sun Y, *et al.* Triterpenoid saponins from the genus *Camellia*: Structures, biological activities, and molecular simulation for structure-activity relationship [J]. *Food Funct*, 2018, 9(6): 3069-3091.

[责任编辑 郑礼胜]