

水飞蓟素固体脂质纳米粒的制备及体外释放研究

于 莲, 刘 思 佳, 杜 妍, 平 洋, 胡 艳 秋, 马 丽 娜

(佳木斯大学 药学院, 黑龙江省高校重点实验室, 黑龙江 佳木斯 154007)

摘 要:以单硬脂酸甘油酯为脂质材料, 豆磷脂与泊洛沙姆 188 为乳化剂, 水飞蓟素为试验药材, 采用乳化-超声分散法制备 SM-SLN 胶体溶液, 对其粒径、形态、包封率和载药量及体外释放进行研究, 并对其稳定性进行研究。结果表明: 所制得的纳米粒外观形态圆整, 平均粒径为 150.6 nm, 平均包封率为 85.3%。乳化-超声分散法适用于 SM-SLN 的制备, 其制剂包封率高, 粒度分布较均匀, 具有较好的稳定性。

关键词:水飞蓟素; 固体脂质纳米粒; 乳化-超声分散法

中图分类号:S 567.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)19-0175-04

水飞蓟素(Silymarin)是从菊科植物水飞蓟的种皮中提取出的黄酮类的有效部位, 发挥药理活性的为水飞蓟宾、异水飞蓟宾、水飞蓟宁、水飞蓟亭等主要成分^[1]。水飞蓟素被称为天然的保肝药, 临床上应用于治疗急慢性肝炎、中毒性肝损伤、肝纤维化和早期肝硬化。此外, 还扩展到抗衰老和防治动脉粥样硬化等方面^[2]。近年来, 采用固体脂质纳米粒(Solid lipid nanoparticles, SLN)提高难溶性药物的生物利用度, 增强药物在治疗部位的有效浓度是药剂学中研究的新方向之一。

SLN 作为新型的亚微粒胶体给药系统, 受到了人们广泛的关注, 其研究始于 20 世纪 90 年代^[3]。采用室温下固态的天然或合成的脂质或类脂(如卵磷脂、三酰甘

油等)为载体材料, 将药物包裹于类脂核中制成粒径约 50~1 000 nm 的固体脂质粒子给药体系。其具有提高药物的生物利用度, 缓控释作用及良好的靶向性, 同时避免了药物的降解或泄漏、无毒等优点^[4]。该研究以单硬脂酸甘油酯为载体材料, 采用乳化-超声分散法制备水飞蓟素固体脂质纳米粒并评价其质量。

1 材料与方法

1.1 试验材料

水飞蓟素原料药(佳木斯三江水飞蓟素有限公司); 水飞蓟宾对照品(天津一方科技有限公司, 批号: 10082633); 单硬脂酸甘油酯(天津市博迪化工有限公司); 注射用豆磷脂(上海太伟药业有限公司); 泊洛沙姆 188(珠海远城医药化工有限公司)。

DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器(河南省予华仪器有限公司); JY92-2D 型超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司); TGL-16M 台式高速冷冻离心机(长沙平凡仪器仪表有限公司); 1100 高效液相色谱

第一作者简介:于莲(1961-), 女, 本科, 教授, 研究方向为微生态及缓控释靶向制剂。E-mail: jdyulian@163.com.

基金项目:黑龙江省 2011 年研究生创新科研资助项目(YJSCX2011-391HLJ)。

收稿日期:2012-05-17

Cultivation Technology of Honeysuckle in Plateau Cold and Arid Conditions

XU Yong-zhong¹, LI Lian¹, SI Jian-hua², AN Huan-xia², YANG Hai-wen², DUAN Xiao-ming²

(1. Agricultural Technology Promotion Center of Tongren County in Qinghai Province, Tongren, Qinghai 811300; 2. Qinghai University, Xining, Qinghai 810016)

Abstract: Two varieties of honeysuckle were imported from Shandong and Henan, and the introduction experiments including the cultivation, field management, pest control technique, and planting demonstration had been conducted in Tongren county of Qinghai province. The results showed that the two varieties of honeysuckle could grow in the cold and drought environment of the plant area by taking over-mentoring protection measures, and it had expanded the two varieties growing region in China.

Key words: *Lonicera japonica* Thunb; cold and arid plateau; Qinghai province; introduction; planting technology

仪(美国安捷伦公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 水飞蓟素固体脂质纳米粒的制备 精密称取处方量的单硬脂酸甘油酯,加热到 75℃使熔,将处方量的水飞蓟素(少量乙醇超声溶解)加入到搅拌的熔融的单硬脂酸甘油酯中,构成油相;另称取适量的豆磷脂和泊洛沙姆 188 溶于 20 mL 的注射用水中,将水相加热到与油相相同的温度,构成水相。在磁力搅拌下将水相滴加到油相中形成初乳。趁热将初乳进行超声再分散,迅速用冷水冷却,过 0.45 μm 微孔滤膜,即得 SM-SLN 的胶体溶液。

1.2.2 含量测定方法 色谱条件:色谱柱: C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇: 水: 冰醋酸=50: 50: 0.5; 流速: 1 mL/min; 柱温: 室温; 检测波长: 287 nm; 进样量: 5 μL。标准曲线的制备: 精密称取水飞蓟素对照品 10 mg 置 10 mL 容量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀得贮备液。分别取贮备液 0.05、0.2、0.35、0.5、1.0 mL 至 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 分别取 5 μL 进样, 以峰面积 A 对浓度 C 进行线性回归。精密度试验: 以浓贮备液分别精密配置成质量浓度为 5、50、100 μg/mL 的低、中、高 3 种浓度的水飞蓟素甲醇溶液, 分别于 1 d 内测定 5 次, 计算日内精密度; 每天测定 1 次, 连续测定 5 d, 计算日间精密度。回收率试验: 精密称取空白纳米粒 1.0 mL, 加入低、中、高质量浓度的水飞蓟素对照品, 用甲醇定容。过滤, 分别取续滤液 5 μL 进样, 根据测得的药物量和加入的药物量来计算回收率。

1.2.3 包封率和载药量的测定 采用离心超滤法。取 0.5 mL SM-SLN 胶体溶液置于离心超滤管上端, 5 000 r/min 离心 10 min, 滤液用甲醇溶解定容至 10 mL, 记 W_{free}; 另取 0.5 mL 分散液, 用甲醇溶解定容至 10 mL, 离心后取上清液进样测定 W_{total}。按“1.2.2”项下测定含量, 用下式计算包封率及载药量: 包封率 (EE) = (W_{total} - W_{free}) × 100% / W_i; 载药量 (DL) = (W_{total} - W_{free}) × 100% / W_{lipid}。

1.2.4 正交实验筛选 SM-SLN 的最优处方 在单因素考察的基础上, 选取对药物包封率影响较大的药物用量、单硬脂酸甘油酯用量、豆磷脂用量及泊洛沙姆用量 4 个因素, 以正交表 L₉ (3⁴) 进行实验, 各因素和水平见表 1。

表 1 正交实验的因素水平

水平	因素			
	药物用量 A	单硬脂酸甘油酯 用量 B/mg	豆磷脂用量 C /mg	泊洛沙姆用量 D /mg
1	8	350	50	450
2	10	400	100	500
3	12	450	150	550

1.2.5 形态及粒径的研究 按照优化后的处方制备样品, 样品用 2% 的磷钨酸负染, 滴加在覆盖碳膜的铜网上, 用透射电镜观察纳米粒的形态。用激光粒度分布仪

测定 SM-SLN 的粒径。

1.2.6 稳定性研究 将制得的 3 批样品放在 4℃ 冰箱内, 于 5、10、30 d 取出进行外观性状、粒径及包封率考察。

1.2.7 体外释放试验 量取 SM-SLN 胶体溶液 10 mL, 置于预处理的透析袋中, 透析袋两端扎紧, 放入装有释放介质 (pH 7.4 磷酸盐缓冲液) 的溶出杯中, 将溶出杯放入搅拌速度为 100 r/min, 温度为 37℃ 的溶出仪中。分别于 0.083、0.5、1、2、4、6、8、12、24 h 时取样 5 mL, 测定药物含量, 同时补加新鲜的释放介质 5 mL。在相同的条件下考察原料药的释放。以累计释药百分率对时间作图, 分别绘制曲线。

2 结果与分析

2.1 含量测定结果

在上述色谱条件下, 分别对空白 SLN、水飞蓟素对照品、载药 SLN 进行色谱扫描, 结果见图 1。

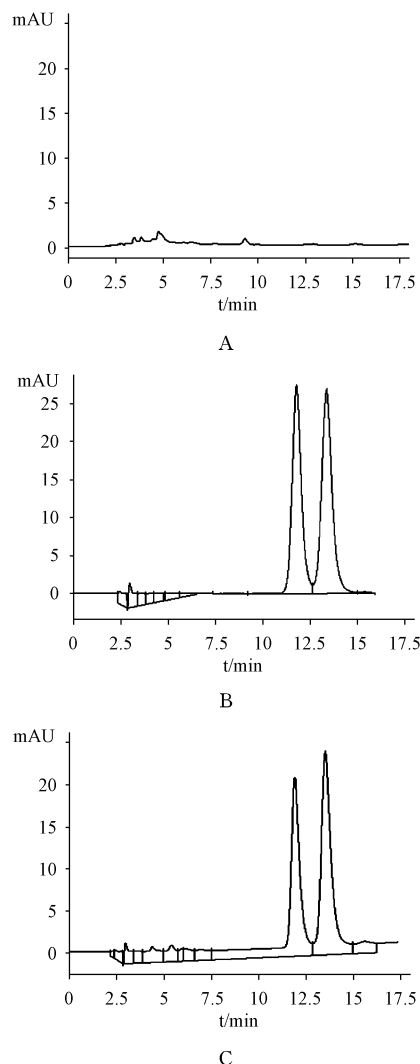


图 1 高效液相色谱图

注: A. 空白固体脂质纳米粒; B. 水飞蓟素对照品; C. 水飞蓟素固体脂质纳米粒样品。

标准曲线为: $A = 12.991C - 1.2983$, $r = 0.9999$ 。结果表明,水飞蓟素在 $5 \sim 100 \mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好。精密性及回收率符合方法学要求,日内精密性 RSD 为 0.82%,日间精密性 RSD 为 1.08%;平均回收率为 99.3%,RSD 为 0.63%。

2.2 正交实验

正交实验设计及结果见表 2,方差分析见表 3。由表 2 可知,该试验影响包封率的 4 个因素 R 值大小为 $A > B > C > D$,以因素 D 作为误差项进行方差分析,方差分析结果表明,A、B 因素有显著影响($P < 0.05$),C、D 因素无显著影响($P > 0.05$)。选取显著因素的最高水平,并综合直观分析的结果,确定最优处方组合为 $A_2B_2C_3D_1$ 。选取最优处方制备 3 批样品,按“1.2.3”项下方法测定包封率,结果表明,包封率的测定结果为 85.3%($n=3$),RSD 为 0.93%。

表 2 正交实验结果

试验号	A	B	C	D	包封率/%
1	1	1	1	1	85.0
2	1	2	2	2	84.9
3	1	3	3	3	84.0
4	2	1	2	3	84.8
5	2	2	3	1	85.3
6	2	3	1	2	84.2
7	3	1	3	2	83.7
8	3	2	1	3	83.5
9	3	3	2	1	82.6
K1	283.9	283.5	282.7	282.9	
K2	284.3	283.7	282.3	282.8	
K3	279.8	280.8	283.0	282.3	
R	1.50	0.97	0.23	0.20	

表 3 方差分析结果

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
A	4.14	2	2.07	60.03	< 0.05
B	1.75	2	0.87	25.39	< 0.05
C	0.08	2	0.04	1.19	> 0.05
D	0.07	2	0.03	1.00	> 0.05

2.3 形态及粒径

从透射电镜照片可以看出(图 2),所制得的纳米粒为类球形的实体粒子,外观形态较圆整。平均粒径为 150.6 nm。粒径分布见图 3。

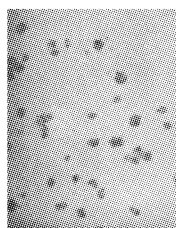


图 2 SM-SLN 的透射电镜照片

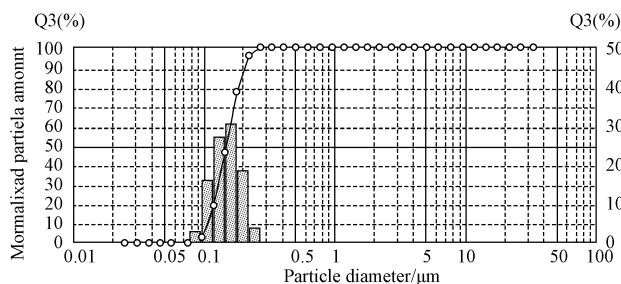


图 3 SM-SLN 的粒径分布图

2.4 稳定性研究结果

结果表明,SM-SLN 在 4°C 贮存条件下存放 30 d,外观保持澄清,粒径、包封率变化不大,稳定性良好。

2.5 体外释放试验

由图 4 可知,SM-SLN 在最初的 2 h 内累计释放药物的 35%左右,说明了释药初期具有一定的突释效应,12 h 释放了药物的 75%左右,说明载药的纳米粒具有明显的缓释作用。对 SM-SLN 累积释药曲线进行释药模型的拟合,见表 4,R 越接近 1,说明拟合效果越好。由表 4 可知,SM-SLN 的释放符合 Higuchi 模型的释放规律。

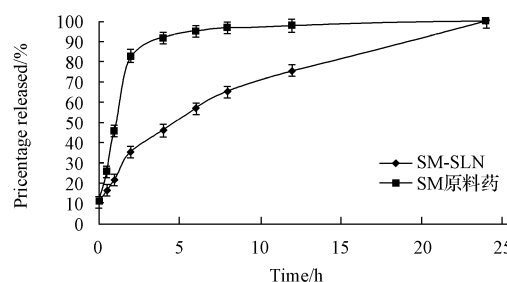


图 4 SM 与 SM-SLN 累积释药曲线

表 4 SM-SLN 累积释药曲线的拟合方程

Models	Equation	R
Zero order kinetics	$F(t) = 0.0388t + 0.2894$	0.8635
One order kinetics	$F(t) = -0.2115t - 0.1991$	0.9601
Higuchi equation	$F(t) = 0.2012t + 0.0448$	0.9965
Weibull equation	$F(t) = 0.6473t - 1.1434$	0.9498

3 结论与讨论

目前制备固体脂质纳米粒的方法有高压乳匀法、溶剂乳化法、薄膜超声分散法、微乳法、乳化-超声分散法等^[6]。该试验采用乳化-超声分散法制备水飞蓟素固体脂质纳米粒,避免了毒性大的有机溶剂的加入,操作简便,易于控制,所制得的纳米粒粒径分布均匀,包封率较高。

用于制备固体脂质纳米粒的脂质材料,一般包括甘油三酯(如三硬脂酸甘油酯),部分甘油酯(如单硬脂酸甘油酯),脂肪酸(如硬脂酸、棕榈酸、二十二碳烷酸等),类固醇(如胆固醇)等。该试验选择单硬脂酸甘油酯和硬脂酸 2 种载体材料制备 SM-SLN,并进行了比较和筛选,由于硬脂酸制备的纳米粒粒径大且不稳定,所以选

择单硬脂酸甘油酯作为脂质材料。

表面活性剂的种类和用量是影响固体脂质纳米粒性能的关键因素。当乳化剂混合使用时,可以形成良好的纳米粒形态^[6]。当卵磷脂和泊洛沙姆 188 合用时,非离子表面活性剂可插入磷脂单分子层形成紧密充填的混合层,从而减小粒径,提高稳定性^[7]。

建立了 SM-SLN 中药物含量和包封率的测定方法,水飞蓟宾是一对以非对映异构体的形式存在^[8]。在液相色谱分析中,水飞蓟宾出现双峰,即水飞蓟宾和异水飞蓟宾,以 2 个峰的面积之和定量,得到了较好的峰行和分离度。

通过对 SM-SLN 的各种理化性质的考察,结果表明,乳化-超声分散法适合纳米粒的制备,该制剂稳定性好,粒度分布较均匀,包封率及载药量较高,为固体脂质纳米粒的开发及应用提供了一定的参考。

参考文献

- [1] Bandopadhyay M. Components of silybum marianum[J]. Indian J Chem, 1992, 10(2): 808.
- [2] 孙铁民,李锐. 水飞蓟素药理研究进展[J]. 中草药, 2000, 31(3): 229.
- [3] Wissing S A, Kayser O, Muller R H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery[J]. Adv Drug Delivery Rev, 2004, 56(9): 1257-1272.
- [4] 王建新,张志荣. 固体脂质纳米粒的研究进展[J]. 中国药理学杂志, 2001, 36(2): 73.
- [5] Muller R H, Madwe K, Gohla S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery—a review of the state of the art[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2000, 50(1): 161-177.
- [6] Fei Han, Sanming Li, Ran Yin, et al. Effect of surfactants on the formation and characterization of a new type of colloidal drug delivery system: Nanostructured lipid carriers[J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2008, 31(5): 210-216.
- [7] Hou D Z, Xie C S, Ping Q N. Preparation of Stable Solid Lipid Nanoparticles (SLNs) Suspension with Combined Surfactants[J]. Journal of China Pharmaceutical University, 2005, 36(5): 417-422.
- [8] 徐为人,刘成卜,王建武,等. 水飞蓟宾构象理论[J]. 中草药, 2004, 35(4): 375-378.

Study on Preparation of Silymarin Solid Lipid Nanoparticles and *in vitro* Release

YU Lian, LIU Si-jia, DU Yan, PING Yang, HU Yan-qiu, MA Li-na

(Heilongjiang Key Lab of University, College of Pharmaceutical, Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang 154007)

Abstract: Taking monostearin lipid as material, soybean lecithin and poloxamer 188 as emulsifier, silymarin as a model drug, SM-SLN were prepared by the emulsification ultrasonic dispersion method. The particle size, morphology, encapsulation efficiency, drug loading, *in vitro* release and stability were studied. The results showed that morphology of SM-SLN was round and smooth, and the average particle size was 150.6 nm and encapsulation efficiency 85.3%. Emulsification ultrasonic dispersion method was suitable for SM-SLN preparation, with high encapsulation efficiency, uniform particle size distribution and better stability.

Key words: silymarin; solid lipid nanoparticles; emulsification ultrasonic dispersion method

《北方园艺》征稿说明

《北方园艺》是由黑龙江省农科院主管、黑龙江省园艺学会和黑龙江省农科院主办的以科学研究和技术普及相结合的园艺类综合性科技期刊。半月刊, 200 页, 每月 15 日、30 日出版。现辟有试验研究、研究简报、设施园艺、栽培技术、园林花卉、生物技术、植物保护、土壤与肥料、贮藏保鲜加工、食用菌、中草药、新品种选育、产业论坛、专题综述、经验交流、农业经纬等栏目。来稿要求文责自负、杜绝一稿多投; 严禁抄袭、剽窃他人作品; 稿件要求具有创新性、材料翔实、数据可靠、文字精炼, 篇幅最多不超过 9 000 字, 技术类文章在 5 000 字以内。凡是急需发表的论文, 请在文中说明最晚发表时间, 以免延误。

本刊共 3 个信箱: 新投稿件: bfybjb@163. com; 录用稿件: bfybjb@yahoo. com. cn; 问题查询: bfyycx@yahoo. com. cn。本刊审稿期限 20~25 个工作日。文章录用后, 请于规定日期及时缴付版费。

提请各位作者, 现发现一些网站、公司和个人声称代理本社征稿, 向作者收取版面费和中介费。在此, 本刊郑重声明: 《北方园艺》从未委托其他机构或个人征稿, 请作者投稿时务必认准本刊投稿邮箱地址、邮箱和电话, 不要上当受骗。如发现违法者请及时向编辑部举报, 本刊将追究其法律责任。

地 址: 150086 哈尔滨市南岗区学府路 368 号 黑龙江省农科院《北方园艺》编辑部

联系电话: 0451-86674276