

水飞蓟素纳米结晶微丸的表征及稳定性考察

罗开沛，李小芳*，罗佳，杨露，林浩，牟倩倩

(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，成都 611137)

[摘要] 目的:制备水飞蓟素纳米结晶微丸并表征其性质、考察其稳定性。方法:采用流化床喷雾干燥技术制备水飞蓟素纳米结晶微丸,通过激光粒度法,紫外光谱法(UV),差示扫描量热法(DSC),红外光谱法(FT-IR)及X-射线衍射法(XRD)对其进行表征,并考察水飞蓟素纳米结晶微丸的初步稳定性(高温、高湿、光照试验)。结果:水飞蓟素纳米结晶微丸再分散后平均粒径(251.6 ± 3.8) nm,多分散指数 0.184 ± 0.015 。通过UV和FT-IR分析显示药物的化学结构未发生改变,DSC和XRD分析显示药物以无定型或分子状态分散于载体中;分别在60℃,相对湿度75%和照度($4\,500 \pm 500$) Lux的条件下,水飞蓟素纳米结晶微丸外观性状、再分散性能、水飞蓟素含量及溶出度均未发生明显变化。结论:水飞蓟素纳米结晶微丸释药快速、稳定性良好,有望进一步制成口服固体制剂,为水飞蓟素的应用与推广提供参考。

[关键词] 水飞蓟素; 纳米混悬剂; 纳米结晶微丸; 多分散指数; 表征; 溶出度; 稳定性
[中图分类号] R283.6;R284.1;O434;V216.1+3 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2017)04-0007-05
[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017040007
[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161130.0902.002.html>
[网络出版时间] 2016-11-30 9:02

Characterization of Silymarin Nanocrystal Pellets and Investigation of Its Stability

LUO Kai-pei, LI Xiao-fang*, LUO Jia, YANG Lu, LIN Hao, MOU Qian-qian

(Pharmacy College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, 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, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare silymarin nanocrystal pellets and research for its characterization and stability test. **Method:** Silymarin nanocrystal pellets were prepared by fluid-bed spray drying technology and characterized by laser particle size analysis, ultraviolet spectroscopy (UV), infrared spectroscopy (FT-IR), differential thermal analysis (DSC) and X-ray diffraction (XRD). Preliminary stability were investigated (high temperature, high humidity and light test). **Result:** Average particle size of silymarin nanocrystal pellets was (251.6 ± 3.8) nm, and the polydispersity index (PDI) was 0.184 ± 0.015 . The chemical structure of silymarin did not change by the analysis of UV and FT-IR. Silymarin was dispersed in carrier with an amorphous or molecular state. Under the conditions of 60℃, relative humidity of 75% and light irradiation of ($4\,500 \pm 500$) Lux, the appearance, redispersion, content of silymarin and dissolution rate of nanocrystal pellets were not changed obviously. **Conclusion:** Silymarin nanocrystal pellets offers rapid drug release and good stability, which is expected to be further developed into oral solid preparations.

[收稿日期] 20160607(007)
[基金项目] 四川省科技厅“苗子工程”重点项目(2016RZ0037);四川省教育厅重点项目(15ZA0094)
[第一作者] 罗开沛,在读硕士,中药师,从事中药新制剂、新剂型、新技术研究,Tel:15351218131,E-mail:luokaipai@126.com
[通讯作者] *李小芳,教授,博士生导师,从事中药新制剂、新剂型、新技术研究,Tel:13808195110,E-mail:lixiaofang918@163.com

[**Key words**] silymarin; nanosuspensions; nanocrystal pellets; polydispersity index; characterization; dissolution; stability

水飞蓟素为菊科植物水飞蓟 *Silybum marianum* 种子的提取物,主要成分为水飞蓟宾、异水飞蓟宾、水飞蓟亭和水飞蓟宁等黄酮类物质^[1]。现代研究表明水飞蓟素具有抗纤维化、抗氧化、抗肿瘤、抗炎、调节免疫等药理活性^[2-3],但其水溶性差,属于生物药剂分类Ⅱ类药物,生物利用度低,影响了临床疗效^[4]。为提高药物的溶出度,本实验拟制备水飞蓟素纳米混悬剂,同时为改善液体制剂的稳定性,采用流化床喷雾干燥技术进一步将其制成纳米结晶微丸,前期体外释放试验研究表明药物释放快速,现对其理化性质进行表征,并考察其初步稳定性,为水飞蓟素后续制剂设计及药效学评价奠定基础。

1 材料

Nicomp 380ZLS 型激光粒度仪(美国 PSS 粒度仪公司),AH-100D 型高压均质机(加拿大 ATS 公司),Nicolet 6700 型傅里叶红外光谱仪(美国赛默飞世尔科技公司),HSC-1 型差示扫描量热仪(北京恒久科学仪器厂),MiniFiex 600 型 X 射线衍射仪(日本 Rigaku 公司),JHQ-100 型微型流化床(辽宁医联新药研究所),UV-6000 型紫外分光光度计(上海美谱达仪器有限公司),WHP250G 型综合药品稳定性试验箱(重庆英博实验仪器有限公司)。

水飞蓟素(西安小草植物有限公司,批号 LC20150203,质量分数 80%),水飞蓟宾对照品(成都曼思特生物科技有限公司,批号 MUST-15020104),聚维酮 K30(PVP-K30)和十二烷基硫酸钠(SDS)(成都市科龙化工试剂厂),空白丸芯(蔗糖型,杭州高成生物营养技术有限公司),羟丙甲基纤维素(HPMC,上海卡乐康包衣有限公司),水为蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 标准曲线的绘制 精密称取水飞蓟宾对照品适量,加无水乙醇超声使溶解,制得 0.1 g·L⁻¹ 储备液。精密吸取该储备液适量,加无水乙醇稀释,配制质量浓度分别为 0.004,0.006,0.008,0.010,0.012,0.014 g·L⁻¹ 的系列对照品溶液,于 286 nm 处测定吸光度 A,以 A 为纵坐标,质量浓度为横坐标,得标准曲线方程 $Y = 0.053\ 1X - 0.004\ 7$ ($r = 0.999\ 5$),线性范围 0.004 ~ 0.014 g·L⁻¹。

2.2 载药量的测定 称取水飞蓟素纳米结晶微丸适量,加入无水乙醇,适当振摇,经 0.45 μm 微孔滤

膜滤过,滤液稀释至一定倍数,测定 A,计算含药量。

2.3 水飞蓟素纳米混悬剂的制备 称取原料药 0.4 g 溶于 10 mL 无水乙醇中形成油相,缓慢注入含有 0.2 g 稳定剂(PVP-K30: SDS = 2: 1)的水相中,旋转蒸发以除尽乙醇,得粗混悬液,在压力为 100 MPa 条件下均质 12 次,得水飞蓟素纳米混悬剂。取水飞蓟素纳米混悬剂适量,加水稀释至一定倍数,测定平均粒径和多分散指数(PDI),见表 1。

表 1 水飞蓟素纳米混悬剂及纳米结晶微丸的分散性能考察
Table 1 Redispersion properties of silymarin nanosuspension and nanocrystal pellets

No.	固化前		固化后		粒径变化 差值/nm	PDI 变化 差值
	平均粒径 /nm	PDI	平均粒径 /nm	PDI		
1	189.9	0.132	247.3	0.172	57.4	0.040
2	192.5	0.136	254.5	0.185	62.0	0.049
3	191.8	0.138	252.9	0.194	61.1	0.056

2.4 水飞蓟素纳米结晶微丸的制备^[5] 在水飞蓟素纳米混悬剂中加入 0.16% HPMC 作黏合剂,混合均匀,以蔗糖丸芯为母核,采用流化床底喷方式上样,设定流化温度 38 ~ 42 ℃,鼓风频率 18 Hz,雾化压力 0.12 MPa,恒流泵转速 9.5 r·min⁻¹,载药完毕后,取出真空干燥 2 h,得水飞蓟素纳米结晶微丸,测得载药量约 35%。

2.5 水飞蓟素物理混合物的制备 称取处方量水飞蓟素,PVP-K30 及 SDS,加适量水直接搅拌混匀,加 0.16% HPMC 按 2.4 项下方法上样,即得。

2.6 表征粉末样品的制备 将 PVP-K30 和 SDS 以比例 2: 1 放入研钵研磨,混合均匀,制成空白辅料样品;分别取蔗糖丸芯、水飞蓟素物理混合物和水飞蓟素纳米结晶微丸适量,多次少量地放入研钵中充分研磨,制成蔗糖丸芯、物理混合物和纳米结晶微丸粉末样品。

2.7 体外释放度的测定 称取水飞蓟素纳米结晶微丸适量,按 2015 年版《中国药典》溶出度测定法项下第二法(桨法)操作,以脱气的 900 mL 水为释放介质,设定温度(37 ± 0.5) ℃,转速 100 r·min⁻¹,于第 30 min 取样 5 mL,同时补充等温等体积的新鲜介质,样品经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,在 286 nm 处测定 A,计算累积释放度。

2.8 水飞蓟素纳米结晶微丸的表征

2.8.1 再分散性能 取适量水飞蓟素纳米结晶微丸溶于水中,适当振摇,测定再分散平均粒径和 PDI,见表 1。结果发现纳米结晶微丸再分散后平均粒径和 PDI 有所增大,但粒径均维持在 < 300 nm, PDI 均 < 0. 2,表明纳米结晶微丸再分散性能良好。

2.8.2 紫外光谱分析^[6] 取水飞蓟素、蔗糖丸芯、空白辅料、物理混合物和水飞蓟素纳米结晶微丸分别用无水乙醇溶解,滤过,于 200 ~ 500 nm 扫描,见图 1。结果蔗糖丸芯和空白辅料在 200 ~ 500 nm 无明显吸收峰,水飞蓟素、物理混合物和纳米结晶微丸三者紫外光谱相似,均在 286 nm 处有最大吸收,提示纳米结晶微丸中水飞蓟素的发色团结构未发生改变。

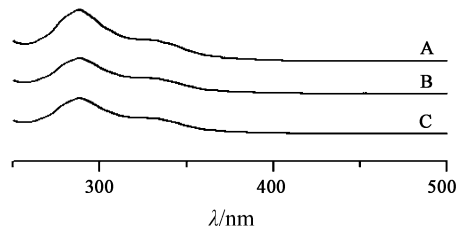


图 1 水飞蓟素(A),物理混合物(B)和纳米结晶微丸(C)的 UV
Fig.1 UV absorption spectra of silymarin (A) , physical mixture (B) and nanocrystal pellets(C)

2.8.3 差示扫描量热法(DSC)分析 取水飞蓟素、蔗糖丸芯、空白辅料、物理混合物和纳米结晶微丸作为样品,以空白坩埚为参比,以 10 ℃ · min⁻¹ 的扫描速率升温,在 25 ~ 300 ℃ 扫描,见图 2。结果显示水飞蓟素在 145. 2 ℃ 处有 1 个明显的特征峰,表明药物以结晶形式存在;蔗糖丸芯因自身的晶体性质同样具有较为明显的特征峰;物理混合物仅是原料药、蔗糖丸芯和空白辅料特征峰简单的叠加,水飞蓟素峰可能受辅料的影响有所下降,但仍以结晶形式存在;而纳米结晶微丸在 145. 2 ℃ 处的吸收峰消失,仅出现了和蔗糖丸芯相似的特征峰,提示药物以无定形状态分散于载体中,但与丸芯则以物理吸附方式结合。

2.8.4 X-射线衍射法(XRD)分析 取水飞蓟素、蔗糖丸芯、空白辅料、物理混合物和纳米结晶微丸作为样品进行 XRD 分析,检测条件为 Cu 靶,K 线,管压 40 kV,扫描步长 0. 02 度,扫描范围 5 ~ 60 度,扫描速度 2 度/min,见图 3。水飞蓟素在 13. 73, 14. 61, 16. 13, 17. 29, 17. 52, 19. 70, 20. 71, 22. 38, 24. 49, 24. 60 度处呈现衍射峰,表明为晶体结构;蔗糖丸芯由于结晶性质同样存在数个较强衍射峰;物

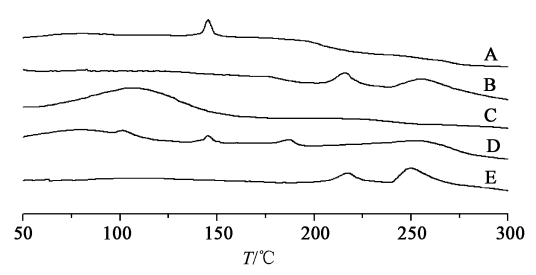


图 2 水飞蓟素(A),蔗糖丸芯(B),空白辅料(C),物理混合物(D)和纳米结晶微丸(E)的 DSC
Fig.2 DSC scanning of silymarin (A) , sucrose pellet core (B) , blank excipients(C) , physical mixture (D) and nanocrystal pellets (E)

理混合物中可清晰看到药物的衍射峰,表明药物与载体仅是简单的物理吸附,仍以结晶形式存在;而纳米结晶微丸只出现了蔗糖丸芯的衍射峰,药物结晶衍射峰几乎完全消失,提示药物以无定型或分子状态存在^[7-8],与 DSC 分析结果一致。

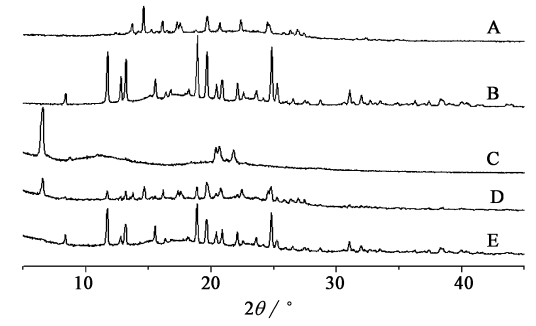


图 3 水飞蓟素(A),蔗糖丸芯(B),空白辅料(C),物理混合物(D)和纳米结晶微丸(E)的 XRD
Fig.3 XRD spectra of silymarin (A) , sucrose pellet core (B) , blank excipients(C) , physical mixture (D) and nanocrystalline pellets(E)

2.8.5 傅里叶红外变换光谱(FT-IR)分析 取水飞蓟素、蔗糖丸芯、空白辅料、物理混合物和纳米结晶微丸作为样品,与 KBr 混合压片,分别在 4 000 ~ 400 cm⁻¹ 检测红外吸收光谱,见图 4。水飞蓟素为黄酮类化合物,分子结构中含有 C = O 和 -OH 等结构,C = O 在 3 441 cm⁻¹ 处有一强吸收峰,-OH 在 1 642 cm⁻¹ 处有一尖锐吸收峰,另外 1 274 cm⁻¹ 处吸收峰为醚键;蔗糖丸芯中 C = O 和 -OH 分别在 3 385 cm⁻¹ 和 1 636 cm⁻¹ 处出现吸收峰;空白辅料中 C = O 和 -OH 分别在 3 395 cm⁻¹ 和 1 665 cm⁻¹ 处出现吸收峰;而 1 274 cm⁻¹ 处蔗糖丸芯和空白辅料并未出现明显吸收峰,对主药无干扰;物理混合物和纳米结晶微丸中并未出现新的吸收峰,且保留了药物 3 个明显的吸收峰,但峰强度可能受辅料影响而减弱,提示水飞蓟素在纳米结晶微丸中的化学结构并未发生改变^[9],与 UV 试验结果一致。

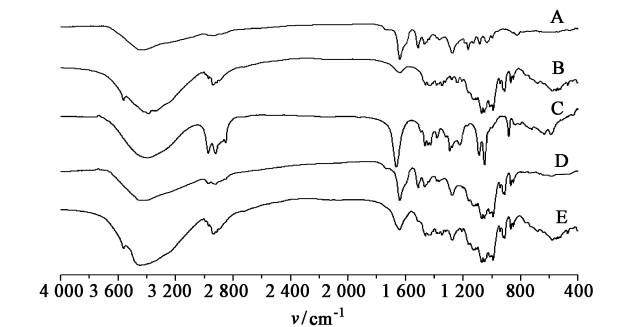


图 4 水飞蓟素 (A),蔗糖丸芯 (B),空白辅料 (C),物理混合物 (D) 和纳米结晶微丸 (E) 的 FT-IR

Fig. 4 FT-IR spectra of silymarin (A) , sucrose pellet core (B) , blank excipients (C) , physical mixture (D) and nanocrystalline pellets (E)

2.9 初步稳定性试验

2.9.1 高温试验 取水飞蓟素纳米结晶微丸开口置于称量瓶中,60 ℃ 恒温条件下放置 10 d,分别于第 0,5,10 天取样,观察外观性状,测定再分散性能、水飞蓟素含量及溶出度,见表 2。结果发现纳米结晶微丸均未发生明显变化,表明在此条件下该制剂较稳定。

表 2 水飞蓟素纳米结晶微丸的高温试验考察

t/d	再分散性能		水飞蓟素质量 分数/%	30 min 累积 溶出度 /%
	平均粒径 /nm	PDI		
0	252.8	0.182	35.03	90.73
5	261.1	0.204	35.07	90.26
10	262.4	0.197	34.84	90.01

注:外观均为黄色微丸(表 3,4 同)。

2.9.2 高湿试验 取纳米结晶微丸开口置于称量瓶中,相对湿度 92.5% 的条件下放置 10 d,在第 0,5,10 天取样,发现到第 5 天时,微丸吸湿明显,部分发生粘连,测得吸湿增重 >5%;到第 10 天时,吸湿增重 >10%。因此在相对湿度 75% 条件下重复此试验,观察外观性状,测定再分散性能、水飞蓟素含量、溶出度及吸湿增重,见表 3。结果发现纳米结晶微丸在第 5,10 天吸湿增重分别为 2.65%,3.78%,吸湿后对性状、再分散性能、水飞蓟素含量及溶出度均无显著影响,表明在高湿条件下有轻微吸湿现象,应于干燥环境储存。

2.9.3 强光照射试验 取纳米结晶微丸开口置于称量瓶中,照度(4 500 ± 500) Lux 的条件下放置 10 d,在第 0,5,10 天取样,观察外观性状,测定再分散性能、水飞蓟素含量及溶出度,见表 4。结果显示

表 3 水飞蓟素纳米结晶微丸的高湿试验考察

t/d	再分散性能		水飞蓟素 质量分数 /%	30 min 累积 溶出度 /%	吸湿增重 /%
	平均粒径 /nm	PDI			
0	250.5	0.172	35.16	89.93	—
5	259.4	0.181	35.04	90.12	2.65
10	253.8	0.195	34.89	91.41	3.78

纳米结晶微丸均未发生明显变化,表明在此条件下较稳定。

表 4 水飞蓟素纳米结晶微丸的强光照射试验考察

t/d	再分散性能		水飞蓟素质量 分数/%	30 min 累积 溶出度/%
	平均粒径 /nm	PDI		
0	252.9	0.180	35.18	90.33
5	254.3	0.193	34.87	91.28
10	260.7	0.187	35.02	90.65

3 讨论

纳米混悬剂的不稳定性是制约其发展的主要原因,解决该问题的理想选择为固体化,故本文采用流化床喷雾干燥技术固化制得水飞蓟素纳米结晶微丸,其再分散性能较好、释药快速、稳定性良好,该技术相较于纳米混悬剂常规的固化方式,如冷冻干燥、喷雾干燥等,其优点在于对仪器设备要求不高,在低温条件下即可实现喷雾干燥和一步制粒,利于工业化生产,具有一定的实用价值和推广价值。

再分散性能试验结果显示,纳米结晶微丸再分散后较固化前粒径平均增加 60.2 nm, PDI 增加 0.048,其原因可能是在干燥过程中存在“固化损伤”,导致部分纳米粒子发生聚集、增长^[10]。据文献[11]报道,在纳米混悬剂中加入适量的保护剂或分散剂,同时控制合理的制备工艺,可有效防止药物粒子团聚。能否有效改善纳米结晶微丸的再分散性能,保证其固化前后不发生“质”的改变,本课题组将进行深入探索与验证。

有研究报道,UV 可对药物发色团进行鉴定,该方法操作简便、成本较低、适用性较强,已广泛应用于磷脂复合物、固体分散体和环糊精包合物等药物结构的表征^[12-14]。目前,对纳米混悬固体制剂的表征和鉴定主要采用 DSC, XRD 和 FT-IR 分析,而运用 UV 表征药物的结构还未见报道。通过 UV 和 FT-IR 分析,水飞蓟素纳米结晶微丸中的药物结构

未发生改变,有利于保持其生物活性;由 DSC 和 XRD 分析可知,水飞蓟素与载体发生了交互作用,药物结晶峰消失,以无定型或分子状态存在。一般而言,药物的粒径小且结晶度低有利于其溶出和吸收^[15]。体外溶出试验研究证实,纳米结晶微丸中药物的体外溶出度明显提高^[5],但是否和体内药代动力学结果呈现一致性,还需进一步实验研究证实。

[参考文献]

[1] 朱铉,崔京浩,全姬善,等. 水飞蓟素混悬剂的制备及稳定性和溶出度考察[J]. 中国新药杂志,2006,15(24):2136-2139.

[2] Milić N, Milosević N, Suvajdzić L, et al. New therapeutic potentials of milk thistle (*Silybum marianum*) [J]. Nat Prod Commun,2013,8(12):1801-1810.

[3] 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.

[4] Kawabata Y, Wada K, Nakatani M, et al. Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: basic approaches and practical applications [J]. Int J Pharm, 2011, 420(1):1-10.

[5] 罗开沛,李小芳,杨露,等. 流化床法制备水飞蓟素纳米结晶微丸[J]. 中成药,2016,38(5):1024-1029.

[6] 朱延焱,田伟强,黄绳武. 芍药苷磷脂复合物的制备及表征[J]. 中国药业,2013,22(1):24-26.

[7] 张彩云,袁慧玲,易加明,等. 姜黄素纳米混悬剂的制

备及体外释放研究[J]中国药学杂志,2014,49(21):1917-1922.

[8] 郭东杰,顾成波,祖元刚,等. 牡荆苷纳米混悬剂冻干粉的准备及表征[J]. 植物研究,2014,34(4):567-571.

[9] 郝吉福. 白藜芦醇纳米混悬剂改善口服生物利用度及经鼻脑靶向递药系统研究[D]. 济南:山东大学,2015.

[10] WANG B, ZHANG W, ZHANG W, et al. Progress in drying technology for nanomaterials [J]. Dry Technol, 2005,23(1/2):7-32.

[11] 罗开沛,李小芳,罗佳,等. 纳米混悬技术在中药制剂中的应用及发展趋势[J]. 中草药,2016,47(6):865-871.

[12] 韩雷,马诗经,江森,等. 根皮素固体分散体的制备和表征[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(24):10-13.

[13] 谈唯,丁冬梅,张振海,等. 黄芩苷固体分散体的制备及其体外溶出行为考察[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(9):12-15.

[14] 徐磊,蒋剑平,金铭,等. 温莪术油羟丙基-β-环糊精包合物的制备与表征[J]. 中华中医药杂志,2015,30(4):1043-1046.

[15] Kocbek P, Baumgartner S, Kristl J. Preparation and evaluation of nanosuspensions for enhancing the dissolution of poorly soluble drugs [J]. Int J Pharm, 2006,312(1):179-186.

[责任编辑 刘德文]