

水飞蓟宾纳米乳的制备及家兔体内药动学

宋¹梅, 平其能^{*}, 吴正红

(中国药科大学药剂学教研室, 南京 210009)

【摘要】 目的: 研制具有一定缓释效果的水飞蓟宾纳米乳并考察其家兔体内药物动力学。方法: 通过制备水飞蓟宾磷脂复合物, 提高了水飞蓟宾在油中的溶解度, 利用均匀设计优化了乳剂的处方工艺, 采用乳化法研制了稳定的水飞蓟宾纳米乳, 考察了水飞蓟宾纳米乳在家兔体内的代谢过程。结果: 优化的处方工艺制备的水飞蓟宾纳米乳平均光强粒径为 21.2 nm, Zeta 电位-26.9 mV, 稳定性好; 家兔体内药动学经时过程表明本制剂具有一定的缓释效果。结论: 与溶液剂相比, 水飞蓟宾纳米乳肌肉注射液延长了药物在体内的驻留时间, 具有一定的缓释效果。

【关键词】 水飞蓟宾; 纳米乳; 处方优化; 均匀设计; 肌肉注射; 药动学

【中图分类号】 R944 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000—5048(2005)05—0427—05

水飞蓟宾是从植物药水飞蓟果实中提取的有效成分^[1], 是一种肝细胞膜稳定剂, 能有效保护及增强肝细胞黏膜。实验表明, 本药不仅使血中胆固醇浓度下降, 还能进一步清除肝、肾组织中脂质沉积, 临床可用于老年高脂血症、脂肪肝。由于药效高, 毒性低^[2], 水飞蓟宾从发现至今一直备受关注。但其水不溶, 脂不溶^[3], 口服吸收差, 有较大的首过效应, 且体内的半衰期短等性质严重削弱了水飞蓟口服制剂药效的发挥。早年也有科研工作者研制了水飞蓟宾葡甲氨盐注射剂, 但其水溶液不稳定, 极易发生降解。制备成冻干粉针虽然可以解决其放置稳定性问题, 但是水飞蓟宾葡甲氨盐水溶液的 pH 值在 11 左右, 注射时局部刺激性较大, 且水飞蓟宾葡甲氨盐体内半衰期较短, 难以有效发挥药理作用。水飞蓟宾纳米乳溶液的 pH 值大约在 7 左右, 注射时局部刺激性小, 且可解决水飞蓟宾难溶性的问题, 药物从乳剂的油相中缓慢释放, 可以适当延长药物在体内的驻留时间, 利于药效的发挥。

1 材 料

1.1 仪 器

XHF-1型高速分散器(上海金达生化仪器厂); JY92-II型超声波细胞粉碎机(宁波新芝科器研究所); TGL-16C 高速离心机(上海安亭科学仪器厂);

马尔文粒径测定仪(Zetasizer 3000HSA); 高压匀质仪(EmulsiFlex-05, Avestin)。

1.2 药品与试剂

水飞蓟宾(silybin, 盘锦格林恩生物资源开发有限公司); 大豆磷脂(纯度 80%, 上海太伟药业有限公司); 中链甘油三酯(MCT, 上海卡乐康包衣技术有限公司); Poloxamer 188、Cremophor RH(巴斯夫有限公司); 聚乙烯吡咯烷酮(PVP, 国际特品有限公司); PEG 400(广东汕头市西陇化工厂); 油酸(上海化学试剂采购供应站); Tween-80(中国医药上海化工试剂公司)。

2 方 法

2.1 体外分析方法的建立

2.1.1 色谱条件 色谱柱: 岛津 Shim-pack VP-ODS (150 L × 4.6); 检测波长: 288 nm; 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 30 °C。流动相为甲醇-水-0.1 mol/L KH₂PO₄(70:25:5), 磷酸调 pH 4.5; 进样量: 20 μL。

2.1.2 标准曲线的绘制 精密称取水飞蓟宾标准品适量, 用甲醇配成 100 μg/mL 标准溶液, 精密吸取 0.1, 0.5, 1, 1.5, 2 mL 于 10 mL 量瓶中, 定容, HPLC 检测。用峰面积 A 对浓度 c(μg/mL) 作线性回归, 标准曲线方程为: $A (\times 10^5) = 0.1349c +$

0.015 9 ($r=0.999$ 9), 線性範圍: 1~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.1.3 回收率試驗 精密移取空白乳劑 0.1 mL 于 10 mL 量瓶中, 分別加入標準品溶液 0.8, 1.0, 1.2 mL, 用甲醇定容至刻度。分別移取 0.5 mL 至 10 mL 量瓶中, 用流動相定容, HPLC 檢測。將峰面積代入標準曲線方程計算藥物濃度, 高、中、低 3 個濃度的平均回收率為 $(98.23 \pm 2)\%$, RSD 小於 1% ($n=3$)。

2.1.4 方法專屬性考察 分別取空白乳劑和含藥乳劑 0.1 mL 置 5 mL 量瓶中, 用甲醇溶解並定容。移取 0.2 mL, 用流動相定容至 10 mL, 摆勻, 進樣, 得色譜圖。由圖 1 可見, 藥物峰形好, 其他成分無干擾, 分離度較好。

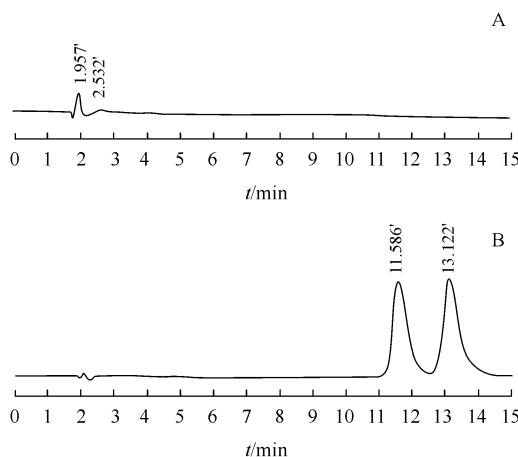


Fig. 1 HPLC of (A) blank emulsion; (B) silybin emulsion

2.2 水飛薊賓納米乳的處方工藝篩選

2.2.1 水飛薊賓磷脂複合物的制備 將水飛薊賓與磷脂按摩爾比 1:1 溶解於丙酮, 40 $^{\circ}\text{C}$ 磁力攪拌 4 h。所得溶液經噴霧干燥除去有機溶劑, 然後置 40 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥器中 12 h 除去殘留的有機溶劑, 得到淡黃色透明顆粒。

2.2.2 水飛薊賓、水飛薊賓磷脂複合物溶解性的考察 分別測定了水飛薊賓、水飛薊賓磷脂複合物、水飛薊賓和磷脂物理混合物(摩爾比 1:1)在水和不同油中的飽和溶解度及三者的油水分配系數 ($K_{\text{o/w}}$)。

2.2.3 均匀設計優化處方 乳劑的穩定性參數是評價乳劑穩定性的重要指標, 實驗採用離心加速實驗比較乳劑的分層速度, 以分光光度法測定乳劑離心前後的吸收度, 計算穩定性參數 K_e ^[4]。

在文獻調研, 單因素考察和預試的基礎上確定

主要考察因素, 各因素按 $U_7(7^6)$ 進行均勻設計^[5-8]實驗。

Tab. 1 Factors and levels of the uniform design

Level	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5
1	13	4	4	15	2
2	13	4.5	5	15	2
3	15	5	6	20	2.5
4	15	6	7	20	2.5
5	17	7	8	25	3
6	17	8	9	25	3

表中數據為各因素在體系中的質量比例 ($w/w, \%$)。其中, X_1 : 油相; X_2 : Poloxamer 188; X_3 : HP- β -環糊精; X_4 : PVP; X_5 : Cremophor RH。按表 1 中因素、水平制備乳劑, 以穩定性參數作為評價指標篩選最佳處方。

2.3 水飛薊賓納米乳家兔體內藥動學

2.3.1 給藥方法 健康家兔 6 只, 採用自身對照法, 分別給予水飛薊賓葡甲胺鹽水溶液及水飛薊賓納米乳, 兩制劑給藥間隔期 1 周, 給藥劑量均為 6 mg/kg , 實驗前禁食不禁水, 12 h 後後腿肌肉注射給藥。

2.3.2 血樣的采集 家兔給藥後耳緣靜脈取血 2 mL, 每個時間點取 6 個樣本。乳劑注射後 5, 10, 30, 45 min, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 8 h 取血; 葡甲胺鹽水溶液注射後 5, 10, 15, 20, 30, 45 min, 1, 1.5, 2, 3, 4 h 取血, 血樣置肝素化試管中靜置待處理。

2.3.3 血液樣品的提取與分離 血樣靜置 30 min 後, 3 000 r/min 离心 20 min。吸取上層血漿 0.5 mL 至 10 mL 离心管中, 加入 1% 盐酸溶液 100 μL 及磷酸鹽緩衝液 (pH 5.0) 0.5 mL, 涡旋混勻, 再加入乙酸乙酯 4 mL 涡旋混勻, 3 000 r/min 离心 5 min。將乙酸乙酯移至 10 mL 离心管中, 重複提取兩次, 合併提取液, 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴下空氣揮干。用乙酸乙酯 1 mL 淋洗管壁再揮干, 加入流動相 100 μL , 涡旋混勻, 4 000 r/min 离心 10 min, 上清液進行 HPLC 測定。

2.3.4 体内分析方法的建立

色譜條件 島津 Shim-pack VP-ODS 色譜柱; HW-2000 型色譜工作站; 流動相為甲醇-水-0.05 mol/L KH₂PO₄ (45:50:5), 0.2 mol/L 磷酸調節 pH 至 3.8; 檢測波長 288 nm; 流速 1.0 mL/min; 柱溫 40 $^{\circ}\text{C}$; 進樣量 20 μL 。

標準曲線的繪制 取空白血漿 0.1 mL, 加入水飛薊賓標準品溶液, 使水飛薊賓的濃度分別為

0.08, 0.134, 0.256, 0.465, 0.640, 0.876, 1.024, 2.56 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。按“2.3.3”项下操作, 以峰面积为横坐标, 浓度为纵坐标进行线性回归。结果表明: 在 0.08 ~ 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内线性良好, 回归方程为: $c = 304.820A + 50.784 (r = 0.9990)$ 。

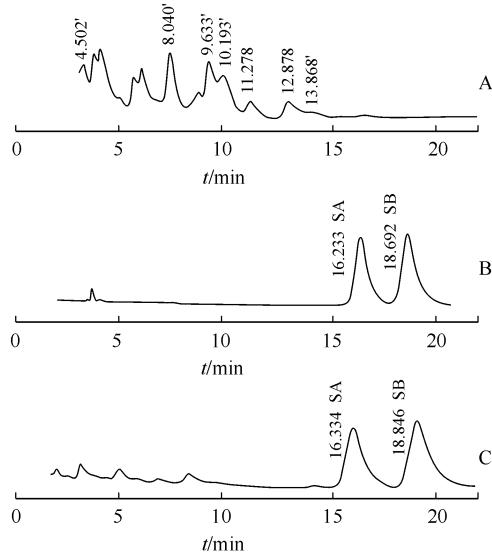


Fig. 2 HPLC of (A) blank plasma; (B) silybin; (C) plasma sample

方法专属性 分别取空白家兔血浆、水飞蓟宾家兔血浆样品、水飞蓟宾标准品均按“2.3.3”项下操作。由图2可见水飞蓟宾与其他杂质分离度良好, 最低检测限为 40 ng/mL 。

回收率和精密度试验 精密移取空白血浆 0.5 mL, 分别加入不同浓度的水飞蓟宾标准品溶液, 配制成高、中、低3种浓度水飞蓟宾的生物样品。按“2.3.3”项下操作, 记录谱图峰面积, 标准曲线计算测得量。本方法的平均回收率不低于 85%, RSD 为 3.49% ($n = 6$)。日内精密度为 3.18%, 日间精密度为 4.23% ($n = 6$)。

数据处理及统计分析 药物代谢动力学智能分析软件 (DAS Ver1.0) 处理分析血药浓度经时变化过程以及相关药动学参数。

3 结果与讨论

3.1 溶解度考察

水飞蓟宾、水飞蓟宾与磷脂的物理混合物、水飞蓟宾磷脂复合物在水、不同油中的饱和溶解度及油水分配系数见表2。

Tab. 2 Solubilities of silybin (SB), SB-phospholipid blend and SB-phospholipid complex in different medium (mg/mL)

Group	Water (pH 6.4)	Soybean oil	Cottonseed oil	Medium-chain triglycerides (MCT)	Castor oil	$K_{0/W}$
SB	0.018	0.188	0.121	0.256	0.169	22.6
SB-phospholipid blend	0.022	0.240	0.198	0.449	0.297	33.1
SB-phospholipid complex	0.056	9.12	4.39	16.35	6.69	332.8

水飞蓟宾在水和油中溶解度均较低, 其 $K_{0/W}$ 值为 22.6。直接制备乳剂, 药液体积大, 不利于临床使用; 水飞蓟宾与磷脂的物理混合物对药物的增溶作用也不显著, 其 $K_{0/W}$ 值为 33.1; 与磷脂复合后, 水飞蓟宾脂溶性显著提高, 复合物的 $K_{0/W}$ 值为 332.8, 是水飞蓟宾 $K_{0/W}$ 值的 14.7 倍。这可能是由于药物可以与磷脂的极性基团发生较强的相互作用, 抑制分子中单键的自由转动, 而磷脂的两个长脂肪链不参与复合反应, 可自由移动, 包裹了磷脂的极性部分, 形成了一个亲脂性的表面, 使复合物表现出较强的脂溶性^[10-11]。实验中水飞蓟宾磷脂复合物在 MCT 中溶解度最大, 选择水飞蓟宾磷脂复合物为原料, MCT 作为乳剂的油相。

3.2 水飞蓟宾纳米乳的处方工艺筛选结果

3.2.1 水飞蓟宾纳米乳的处方优化

Tab. 3 Result of the uniform design

Group	K_e (%)	Zeta potential (mV)	Size (nm)	Centrifugal (4 000 $\text{r}^{\prime}/\text{min}$, 15 min)	
				Precipitation	Oil and water separate
R1	20.3	22.4	20.4	Yes	Yes
R2	22.1	-24.3	24.7	Yes	No
R3	17.7	-23.1	12.9	No	Yes
R4	25.4	-23.5	24.6	Yes	No
R5	21.9	-26.6	73.3	Yes	No
R6	10.4	-26.9	21.2	No	No

经逐步回归程序将结果进行回归分析, 得如下方程:

$$K_e = 5.38X_1 + 0.8X_2 - 8.6X_3 - 3.83X_4 + 26.92X_5 (R^2 = 0.9906)$$

处方中油相及 Cremophor RH 的用量对纳米乳的稳定以及药物的增溶影响较大; 油相及 PVP 的用量影响乳剂黏度, 由于注射用乳剂要求较低的黏度和极佳的流动性, 故综合分析得优化处方为:

MCT 13 g, Poloxamer 188 9.5 g, 磷脂 8 g, PVP 10 g, Cremophor RH 1.5 g, 加蒸馏水至 100 g。

制备所得水飞蓟宾乳剂经透射电镜观察(图3), 乳滴外观圆整, 大小较为均匀。

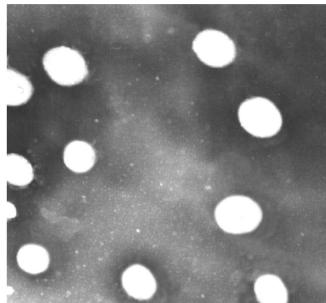


Fig. 3 Transmission electron micrograph of silybin emulsion($\times 15000$)

3.3 水飞蓟宾纳米乳的稳定性研究

3.3.1 粒径及 Zeta 电位的测定 按优化后的处方工艺制备的水飞蓟宾乳剂的平均光强粒径为 21.2 nm, Zeta 电位为 -26.9 mV。

多分散体系中分散粒子的带电与其聚结稳定性有关, 粒子的荷电直接影响粒子间斥力势能的大小和溶剂化作用。Zeta 电位是乳剂带电情况的表征, Zeta 电位与微粒的平均粒径之间存在指数关系, 当 Zeta 电位绝对值大于 25 mV 时, 多分散体系具有一定的稳定性^[12-14]。

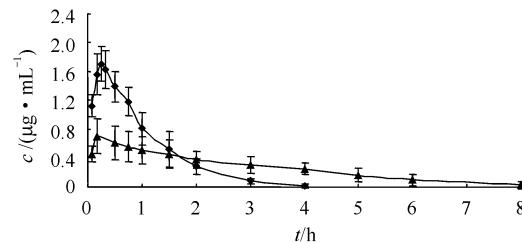
3.3.2 离心加速实验、冷冻-加热循环实验与热压灭菌实验、影响因素与留样观察实验 水飞蓟宾纳米乳离心后未见分层, 同时可以耐受冷冻-加热循环及热压灭菌而保持稳定; 影响因素试验结果表明, 对乳剂的稳定性影响最大的因素为高温, 其次为光照。封装于棕色安瓿中的水飞蓟宾纳米乳注射液在室温下贮存 6 个月, 各项质量指标无显著性变化。

3.4 水飞蓟宾纳米乳家兔体内药动学

3.4.1 家兔体内血药浓度经时曲线 水飞蓟宾葡甲胺盐溶液剂及纳米乳分别给药后家兔体内血药浓度经时曲线(图4)可见, 溶液剂给药时曲线陡峭, 0.25 h 达峰, 但维持时间短, $MRT_{0-\infty}$ (0.864 \pm 0.066) h。纳米乳制剂则在 0.167 h 左右达峰, 曲线平缓持久, $MRT_{0-\infty}$ 为 (2.772 \pm 0.62) h, 表明水飞蓟宾纳米乳有一定的缓释效果。

水飞蓟宾纳米乳制剂给药后血浓达峰时间早

于水飞蓟宾葡甲胺盐溶液剂可能是由于部分药物是被体系中的表面活性剂(Cremophor RH、Poloxamer 等)增溶在水中, 从而促进了部分水飞蓟宾的快速吸收。但大部分的药物是存在于油相中, 所以乳剂药时曲线平缓持久, 表现出一定的缓释效果。同时乳剂经肌肉注射后, 药物吸收途径分为淋巴转运和血液循环, 经淋巴转运后再进入血液循环的过程也使乳剂表现出一定的缓释效应。



—▲—Silybin nanoemulsion; —◆—Silybin *N*-methylglucamine solution

Fig. 4 Mean serum concentration-time curves of silybin *N*-methylglucamine solution and silybin nanoemulsion after intramuscular administration in rabbits($n=6$)

Tab. 4 Pharmacokinetic parameters of silybin *N*-methylglucamine solution and silybin nanoemulsion after intramuscular administration in rabbits($n=6$)

Parameter	Silybin nanoemulsion	Silybin <i>N</i> -methylglucamine solution
$t_{1/2}(h)$	2.335 ± 0.25	0.467 ± 0.168
$t_{1/2}K_a$	0.007 ± 0.0005	0.153 ± 0.0877
$AUC_{0-\infty}(\text{mg} \cdot \text{L} \cdot \text{h})$	2.739 ± 0.96	1.571 ± 0.393
$AUMC_{0-\infty}$	8.121 ± 3.98	1.526 ± 0.362
$MRT_{0-\infty}(\text{h})$	2.772 ± 0.62	0.864 ± 0.066
$t_{\max}(\text{h})$	0.167	0.250
$c_{\max}(\text{mg/L})$	0.787 ± 0.21	1.534 ± 0.133
α, K_e	0.316 ± 0.054	1.667 ± 0.624
K_a	90.480 ± 7.12	6.110 ± 3.56

3.4.2 药物动力学分析及药动学参数的求算 分析结果表明: 水飞蓟宾葡甲胺盐溶液剂及乳液血药浓度经时变化过程为一室房室模型, 权重 $w=1$, 拟合值与实测值基本接近。

比较水飞蓟宾葡甲胺盐溶液剂及乳剂家兔体内药物动力学参数, 二者具有明显差异。以房室参数 AUC 计算水飞蓟宾纳米乳的相对生物利用度为 174.3%, 乳剂的平均驻留时间(MRT)及体内半衰期分别延长 3 倍和 5 倍, K_e 减小。由药动学参数可以判定水飞蓟宾纳米乳提高了药物疗效, 具有一定的缓释效果, 达到预期目的。

4 小 结

1) 水飞蓟宾纳米乳的制备过程中乳化剂及添加剂的种类及用量对体系的稳定性影响较大。

2) 本文制备的药物与磷脂的复合物极大地提高了该药的脂溶性, 从而使水飞蓟宾溶解于油溶液中并制备成稳定的纳米乳。其中水飞蓟宾磷脂复合物的性质对乳剂稳定性影响较大, 其复合率愈高, 性质愈稳定, 制得的纳米乳也就愈稳定。

3) 本文采用离心分光光度法评价水飞蓟宾纳米乳注射液的稳定性, 测定波长的选择是以 $(A_0 - A)$ 差值变化大小为依据, 选择吸收度差值大的波长^[13]。研制的水飞蓟宾纳米乳稳定, 因此选择较剧烈的条件(4 000 r/min 离心 15 min)考察其变化, 实验结果表明其稳定性良好。

【参考文献】

- [1] José F, Alvarez B. Extraction of nutraceuticals from milk thistle [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2003, **10**: 105—108.
- [2] 于乐成(Yu LC), 顾长海(Gu CH). 水飞蓟素药理学效应研究进展[J]. 中国医院药学杂志(*Chin J Hosp Pharm*), 2001, **21**(8): 493—494.
- [3] 王鸿辰(Wang HC). 水飞蓟素溶解性能的研究[J]. 药学通报(*Chin Pharm Bull*), 1983, **19**(12): 23—25.
- [4] 高晓黎(Gao XL). 去氢骆驼蓬碱静脉纳米乳注射液的研究. 沈阳药科大学博士论文, 1998.
- [5] 王鹏(Wang P), 王玉珠(Wang YZ), 沈建民(Shen JM). 均匀设计及其在药学中的应用[J]. 沈阳药科大学学报(*J Shenyang Pharm Univ*), 1989, **6**(4): 297—305.
- [6] 韩可勤(Han KQ), 杨静化(Yang JH), 刘晓东(Liu XD)编. 药学应用概率统计[M]. 南京: 东南大学出版社, 2000. 142—144.
- [7] Woo JS. Oral-emulsion composition of silybin [P]. US Patent 20010005726. 2001—06—28.
- [8] 林巧平(Ling QP), 周建平(Zhou JP). 药物载体脂肪乳的研究与应用[J]. 药学进展(*Prog Pharm Sci*), 2005, **8**: 359—363.
- [9] 龚明涛(Gong MT), 张均寿(Zhang JS), 戴晓鸣(Dai XM). 羟基喜树碱纳米乳在大鼠体内的药代动力学研究[J]. 中国药科大学学报(*J China Pharm Univ*), 2004, **35**(4): 324—327.
- [10] 吴建梅(Wu JM), 陈大为(Chen DW), 孙波(Sun B), 等. 天然活性成分磷脂复合物药学研究概述[J]. 中国药学杂志(*Chin Pharm J*), 1998, **33**(10): 9—11.
- [11] Venkataranam S, Roger JA. Characteristics of drug-phospholipid operecipitates I: physical properties and dissolution behavior of griseofulvin-dimyristoylphatidyl choline systems [J]. *J Am Pharm Assoc*, 1984, **73**(6): 757—761.
- [12] Labhasetwar V, Mohan MS, Dorle AK. A study on zeta potential and dielectric constant of liposomes [J]. *J Microencapsulation*, 1982, **11**(6): 663—668.
- [13] 韩继洪(Han JH). 抗癌药物FT-207脂肪乳物理性质的研究[J]. 沈阳药学院学报(*J Shenyang Pharm Univ*), 1991, **8**(1): 14—17.
- [14] Labhasetwar VD, Dorle AK. A study on the zeta potential of microcapsules during ageing [J]. *J Microencapsulation*, 1991, **8**(1): 83—85.

Preparation of Silybin Nanoemulsion and Its Pharmacokinetics in Rabbits

SONG Yun-Mei, PING Qi-Neng, WU Zheng-Hong

(Department of Pharmaceutics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

【ABSTRACT】 AIM: To prepare stable silybin nanoemulsion for intramuscular injection and to study the *in vivo* disposition behaviors. METHODS: Silybin-phospholipid complex was prepared to enhance silybin's solubility in the oil; The formulation of the silybin nanoemulsion was optimized by the uniform design; Following administration of the nanoemulsion to rabbits, the *in vivo* disposition of silybin was evaluated. RESULTS: The silybin nanoemulsion with optimized formulation was stable with the average particle size being 21.2 nm and Zeta potential being -26.9 mV. And the release profile in rabbits showed a sustained-release manner. CONCLUSION: Silybin nanoemulsion for intramuscular injection could increase silybin MRT *in vivo*. In comparison to silybin aqueous injection, the intramuscularly injected nanoemulsion could sustain the *in vivo* release of silybin with improved bioavailability.

【KEY WORDS】 Silybin nanoemulsion; Formula optimization; Uniform design; Intramuscular injection; Pharmacokinetics