

水飞蓟素肠溶聚乳酸-羟基乙酸共聚物纳米粒的制备及体外释药研究^Δ

何 静^{1*}, 邱妍川², 杨延音², 刘松青³, 林凤云², 江尚飞², 朱照静^{2#}(1.重庆医药高等专科学校继续教育学院, 重庆 401331; 2.重庆医药高等专科学校药学院, 重庆 401331; 3.第三军医大学第一附属医院药剂科, 重庆 400038)

中图分类号 R943;R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)34-4842-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.34.28

摘要 目的:制备水飞蓟素肠溶聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)纳米粒,并研究其体外释药行为。方法:以羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯(HPMCP)为肠溶材料,采用纳米沉淀法制备水飞蓟素肠溶PLGA纳米粒和水飞蓟素PLGA纳米粒,观察其形态,检测其粒径、Zeta电位、包封率、载药量、稳定性、体外释放度(Q)。以粒径、包封率、载药量为指标筛选水飞蓟素肠溶PLGA纳米粒中PLGA-HPMCP质量比。结果:PLGA-HPMCP的最佳质量比为1:0.25。所制水飞蓟素肠溶PLGA纳米粒和水飞蓟素PLGA纳米粒的粒径分别为224、193 nm, Zeta电位分别为-37.8、-40.7 mV;包封率分别为(74.7±2.2)%、(71.7±2.5)%,载药量分别为(5.39±0.24)%、(5.21±0.22)%;4℃下储存3个月后的渗漏率分别为0.2%、0.5%;人工胃液中 Q_{48h} 分别为38.6%、70.5%,人工肠液中 Q_{48h} 分别为80.2%、73.5%。结论:成功制得水飞蓟素肠溶PLGA纳米粒,其稳定性较好,能有效抑制水飞蓟素在人工胃液中的释放。

关键词 水飞蓟素;聚乳酸-羟基乙酸共聚物;羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯;纳米粒;体外释放度

Preparation and *in vitro* Drug Release of Enteric-coated Silymarin-PLGA Nanoparticles

HE Jing¹, QIU Yanchuan², YANG Yanyin², LIU Songqing³, LIN Fengyun², JIANG Shangfei², ZHU Zhaojing²(1.College of Extended Education, Chongqing Medical and Pharmaceutical College, Chongqing 401331, China; 2.College of Pharmacy, Chongqing Medical and Pharmaceutical College, Chongqing 401331, China; 3.Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital to Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To prepare enteric-coated silymarin-PLGA nanoparticles, and to study its *in vitro* release behavior. METHODS: Using HPMCP as enteric-coated material, nanoprecipitation method was used to prepare enteric-coated silymarin-PLGA nanoparticles and silymarin-PLGA nanoparticles. The morphology of nanoparticles were observed, and the particle size, Zeta-potential, encapsulation efficiency, drug-loading amount, stability and *in vitro* release rate (Q) were detected. The ratio of PLGA-HPMCP in enteric-coated silymarin-PLGA nanoparticles was screened by using particle size, encapsulation ratio and drug-loading capacity as indexes. RESULTS: The best PLGA-HPMCP ratio was 1:0.25. The particle size of enteric-coated silymarin-PLGA nanoparticles and silymarin-PLGA nanoparticles were 224 nm and 193 nm, Zeta potential were -37.8 mV and -40.7 mV; encapsulation ratio were (74.7±2.2)% and (71.7±2.5)%, and drug-loading amount were (5.39±0.24)% and (5.21±0.22)%; the percolation rates of them were 0.2% and 0.5% at 4℃ 3 months later; Q_{48h} of them in simulated gastric fluid were 38.6% and 70.5%, and Q_{48h} of them in simulated intestinal fluid were 80.2% and 73.5%, respectively. CONCLUSIONS: The enteric-coated silymarin-PLGA nanoparticles are prepared successfully with good stability, and can effectively inhibit the release of silymarin in simulated gastric fluid.

KEYWORDS Silymarin; PLGA; HPMCP; Nanoparticle; Release rate *in vitro*

水飞蓟素(Silymarin)是从菊科植物水飞蓟中提取精制而成的一类黄酮类化合物的总称,主要包含水飞蓟宾、水飞蓟宁和水飞蓟亭等,其中水飞蓟宾及其异构体异水飞蓟宾含量最高,约占该化合物的60%~70%,且具有最强的药理活性^[1]。水飞蓟素在临床上是治疗肝脏疾病最为常用的一种植物药,体外研究证明其可通过抑制核因子κB(NF-κB)细胞发挥抗炎和免疫调节作用^[2];还可以通过影响丙型肝炎核心蛋白和NS5A病毒的表达,发挥治疗慢性丙型肝炎病毒感染的作用^[3]。此外,临床研究显示,水飞蓟素可有效用于非酒精性脂肪性肝

病的治疗^[4],并可减轻抗肺结核药物引起的肝损伤^[5],减少化疗过程中顺铂造成的肾毒性等^[6]。

尽管水飞蓟素在体外表现出了较好的药理活性,但由于其溶解度很低、体内吸收较差、生物利用度低,严重影响了其在临床的使用。目前临床上使用的水飞蓟素片剂或胶囊剂,患者需要每日给药3次,即每天需使用1.2~1.5 g才能维持有效的血药浓度。尽管水飞蓟素临床应用安全性较好,但高剂量长期使用仍会造成恶心、呕吐、腹泻等消化道不良反应。为提高水飞蓟素的生物利用度,国内外研究主要集中于制备其固体分散体、纳米脂质体、纳米混悬剂等^[7-8],能一定程度上改善其体内吸收和靶向特征,但目前均未应用于临床。近年来,肠溶纳米粒的研究逐渐成为热点,已有研究显示其与普通纳米粒相比,可使药物以分子形态分布于肠溶载体,进一步提高药物的物理化学稳定性,减少对胃肠道的刺激;此外,以小肠定位给药可有效减少或避免用药的个体差异^[9-10]。因此,本试

Δ 基金项目:重庆市科技攻关计划项目(No.cstc2012gg-yyjs10008);重庆市卫生局医学科研计划项目(No.2012-2-256)

* 副教授,硕士。研究方向:缓控释制剂。E-mail: hejingt@126.com

通信作者:教授,博士。研究方向:药剂学。E-mail: zhaojing6271@126.com

验通过制备水飞蓟素肠溶聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)纳米粒,以改善其溶解状况,降低其在人工胃液中的突释现象,进一步提高其口服给药的生物利用度和疗效,减少临床使用的不良反应。

1 材料

1.1 仪器

LC-2010C HT 高效液相色谱仪(日本岛津公司);Tecnia G2 20200kV 透射电子显微镜(厦门亿辰科技有限公司);纳米激光粒度仪(德国新柏泰克公司);超速离心机(美国贝克曼库尔特有限公司)。

1.2 药品与试剂

水飞蓟素对照品(西安瑞林生物科技有限公司,批号:130802,纯度:>98%);PLGA[中国科学院成都有机化学研究所,批号:141245-359,乙交酯(GA)-丙交酯(LA)(75:25)];羟丙甲基纤维素邻苯二甲酸酯(HPMCP,HP55,日本信越化学工业株式会社,批号:130906);聚乙烯醇(PVA,美国 Sigma-Aldrich 公司);甘露醇(重庆博方医药有限责任公司);丙酮(重庆川江化学试剂厂,化学纯);甲醇为色谱纯,水为去离子水。

2 方法与结果

2.1 水飞蓟素的含量测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Dikma-C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇-0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 2.77)(48:52, V/V,经 0.2 μm 微孔滤膜滤过后使用),流速为 1 ml/min;检测波长为 288 nm;柱温为 30 ℃;进样量为 10 μl。该色谱条件下,水飞蓟素和异水飞蓟素的出峰时间分别为 16.7、18.9 min,以两者峰面积之和计算水飞蓟素含量;其他辅料不影响水飞蓟素的含量测定。

2.1.2 方法学考察 按方法学考察相关方法进行试验。水飞蓟素峰面积(y)与质量浓度(x)的回归方程为 $y=16\ 548.6x+344.1$ ($r=0.999\ 8, n=6$),线性范围为 5.03~150.9 μg/ml;日内($n=5$)、日间($n=3$)精密密度试验的 RSD 均小于 4.29%;10.06、50.30、100.60 μg/ml 水飞蓟素溶液的方法回收率分别为 (97.68±3.22)%、(98.32±3.51)%、(99.65±1.24)% ($n=5$)。

2.2 PLGA 纳米粒的制备

采用纳米沉淀法制备 PLGA 纳米粒。称取水飞蓟素、PLGA 各约 0.7 g 与一定量的 HPMCP 溶于 10 ml 丙酮,在磁力搅拌条件下,缓慢滴加到 5% PVA 水溶液中,调节 pH 至 4~8,继续搅拌 2 h。12 000 r/min(离心半径 15 cm)离心 10 min 去除非目标粒径颗粒,加入甘露醇 6 g,冷冻干燥,得水飞蓟素肠溶 PLGA 纳米粒。另精密称取水飞蓟素和 PLGA 各约 0.7 g 溶于丙酮中,之后照上述方法制备得到水飞蓟素 PLGA 纳米粒。

2.3 包封率和载药量测定

称取葡聚糖凝胶,加纯化水溶胀、煮沸、放冷、装柱。取制备好的水飞蓟素肠溶 PLGA 纳米粒或水飞蓟素 PLGA 纳米粒,采用蒸馏水重新分散为纳米粒混悬液后,精密吸取 5.0 ml 上样。脱气后超纯水洗脱,流速 1.0 ml/min,收集洗脱液,弃去前 20 ml 洗脱液,取后 55 ml,旋转蒸发浓缩至干,甲醇清洗旋蒸瓶并定容。用高效液相色谱法测定水飞蓟素含量,计算包封率和载药量。包封率(%)= $W_s/W_t \times 100\%$,载药量= $W/W_m \times 100\%$,式中 W_t 为水飞蓟素投药量, W_s 为包裹在纳米粒中的药物量, W_m 为载药纳米粒的量。

2.4 肠溶材料对水飞蓟素肠溶 PLGA 纳米粒的影响

固定水飞蓟素和 PLGA 处方量,以粒径、包封率和载药量为指标,考察不同比例 PLGA-HPMCP(1:0、1:0.1、1:0.25、1:0.5、1:0.75、1:1)对水飞蓟素肠溶 PLGA 纳米粒的影响。结果显示,PLGA-HPMCP 比例在 1:0.25 之后,随 HPMCP 比例增大,纳米粒粒径增大,但包封率和载药量趋于稳定。因此,本试验选择 PLGA-HPMCP 比例为 1:0.25。不同比例 PLGA-HPMCP 对水飞蓟素肠溶 PLGA 纳米粒的影响见表 1。

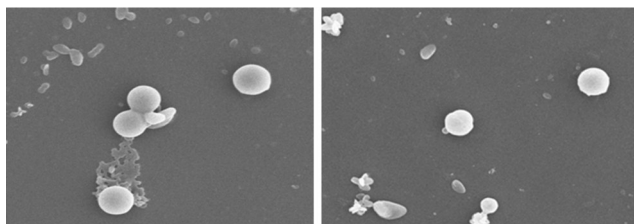
表 1 不同比例 PLGA-HPMCP 对水飞蓟素肠溶 PLGA 纳米粒的影响

Tab 1 Effects of different ratios of PLGA-HPMCP on enteric-coated silymarin-PLGA nanoparticles

PLGA-HPMCP	粒径, nm	包封率, %	载药量, %
1:0	193±34	71.7±2.5	5.21±0.22
1:0.1	212±37	70.7±2.8	5.09±0.28
1:0.25	224±29	74.7±2.2	5.39±0.24
1:0.5	235±22	74.9±3.1	5.41±0.25
1:0.75	249±36	74.2±3.1	5.43±0.28
1:1	258±41	74.5±3.6	5.44±0.26

2.5 PLGA 纳米粒质量评价

2.5.1 形态观察 按“2.3”项下方法制备水飞蓟素肠溶 PLGA 纳米粒和水飞蓟素 PLGA 纳米粒的混悬液,采用透射电子显微镜观察纳米粒的形态。结果显示,二者均呈圆形。透射电子显微镜图见图 1。

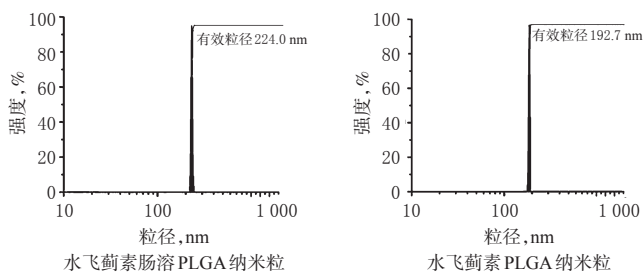


水飞蓟素肠溶 PLGA 纳米粒 水飞蓟素 PLGA 纳米粒

图 1 两种纳米粒的透射电子显微镜图(×2 300)

Fig 1 TEM of 2 kinds of nanoparticles(×2 300)

2.5.2 粒径和 Zeta 电位 按“2.3”项下方法制备水飞蓟素肠溶 PLGA 纳米粒和水飞蓟素 PLGA 纳米粒混悬液,加水稀释 10 倍,用纳米激光粒度仪测定其粒径和 Zeta 电位。结果显示,二者的平均粒径分别为 224、193 nm,粒径分布为正态分布;Zeta 电位分别为 -37.8、-40.7 mV,表明两种纳米粒均较为稳定。两种纳米粒的粒径分布见图 2。



水飞蓟素肠溶 PLGA 纳米粒 水飞蓟素 PLGA 纳米粒

图 2 两种纳米粒的粒径分布

Fig 2 Particle size distribution of 2 kinds of nanoparticles

2.5.3 含量测定 取水飞蓟素肠溶 PLGA 纳米粒和水飞蓟素 PLGA 纳米粒,加入甲醇溶解并稀释混匀,进样测定水飞蓟素含量。结果,二者水飞蓟素的含量分别为 (53.96±1.06)、(54.68±1.21) mg/g ($n=6$)。

2.5.4 稳定性考察 将水飞蓟素肠溶 PLGA 纳米粒和水飞蓟

素 PLGA 纳米粒分别置于 25 ml 的敞口试管中, 4 ℃ 下保存, 分别于 1、2、3 个月时取出样品测定平均粒径与渗漏率(LR), $LR(\%) = (1 - EE_t/EE_0) \times 100\%$, 式中, EE_t 和 EE_0 分别为在 t 时刻的包封率和初始包封率。结果显示, 二者在 4 ℃ 下储存 3 个月后期粒径基本无变化, LR 分别为 0.2%、0.5%, 具体结果见表 2。

表 2 两种纳米粒的稳定性试验结果

时间, 个月	水飞蓟素肠溶 PLGA 纳米粒		水飞蓟素 PLGA 纳米粒	
	平均粒径, nm	LR, %	平均粒径, nm	LR, %
1	226	0.1	191	0.2
2	225	0.1	197	0.3
3	228	0.2	199	0.5

2.6 体外释放度考察

分别取水飞蓟素肠溶 PLGA 纳米粒和水飞蓟素 PLGA 纳米粒 45 mg, 放入棕色瓶中, 分别加入 150 ml 人工胃液和人工肠液, 37 ℃ 气浴恒温振荡, 转速 100 r/min。分别于试验前和开始振荡后 0.5、1、2、4、8、12、24、48 h 取样 4 ml, 并补充等体积的释放介质。接收液用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤, 以甲醇稀释后于 288 nm 波长处测定吸光度, 计算累积释放度, 绘制体外释放曲线, 结果见图 3。

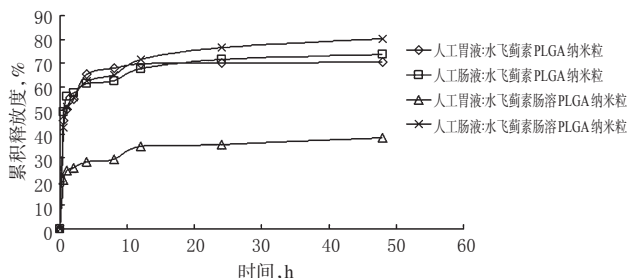


图 3 两种纳米粒的体外释放曲线

Fig 3 Release curves of 2 kinds of nanoparticles in vitro

由图 3 可见, 水飞蓟素肠溶 PLGA 纳米粒在人工胃液中的释放速度和累积释放度明显低于水飞蓟素 PLGA 纳米粒; 而在人工肠液中, 水飞蓟素肠溶 PLGA 纳米粒的释放速度和累积释放度略高于水飞蓟素 PLGA 纳米粒。这是因为水飞蓟素溶解度较差, 当人工肠液中肠溶材料溶解后, PLGA 骨架对药物的阻滞作用占优势; 而水飞蓟素肠溶 PLGA 纳米粒粒径较大, PLGA 骨架对药物溶出的阻滞作用也相对较差, 所以水飞蓟素溶出更快、溶出量更大。

3 讨论

PLGA 是目前开发最为成功的一种生物可降解聚合物, 可在机体内降解为乳酸和乙醇酸, 进一步分解为二氧化碳和水排出体外, 具有较好的生物相容性。其也是目前美国 FDA 和欧盟药品监管局(EMA)均批准的一种血管外给药的药物传递系统, 可用于多种药物制剂的处方, 包括亲水性、疏水性药物, 也包括各种大分子或小分子药物, 可有效用于延缓药物在体内的释放, 降低药物在体内的代谢速度以及实现药物的靶向给药^[1]。

由于 PLGA 纳米粒在胃液中有较强的突释现象, 因此, 本试验在制备水飞蓟素 PLGA 纳米粒的基础上, 开发其肠溶剂型, 以降低其在胃液中的突释, 提高其在肠道的吸收, 从而提高其口服给药的生物利用度; 同时, 还能有效避免其对胃肠道的刺激, 减少不良反应的发生。从研究结果看, 水飞蓟素肠溶 PLGA 纳米粒能有效抑制水飞蓟素在人工胃液中的释放。此外, 笔者还需进一步试验评价其口服给药后体内的靶向作用, 为其制剂的开发和临床应用提供依据。

参考文献

- [1] Cacciapuoti F, Scognamiglio A, Palumbo R, et al. Silymarin in non alcoholic fatty liver disease[J]. *World J Hepatol*, 2013, 5(3): 109.
- [2] Morishima C, Shuhart MC, Wang CC, et al. Silymarin inhibits in vitro T-cell proliferation and cytokine production in hepatitis C virus infection[J]. *Gastroenterology*, 2010, 138(2): 671.
- [3] Bonifaz V, Shan Y, Lambrecht RW, et al. Effects of silymarin on hepatitis C virus and haem oxygenase-1 gene expression in human hepatoma cells[J]. *Liver Int*, 2009, 29(3): 366.
- [4] Aller R, Izaola O, Gómez S, et al. Effect of silymarin plus vitamin E in patients with non-alcoholic fatty liver disease. A randomized clinical pilot study[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2015, 19(16): 3 118.
- [5] Luangchosiri C, Thakkestian A, Chitphuk S, et al. A double-blinded randomized controlled trial of silymarin for the prevention of antituberculosis drug-induced liver injury[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2015, 15(1): 334.
- [6] Momeni A, Hajigholami A, Geshnizjani S, et al. Effect of silymarin in the prevention of cisplatin nephrotoxicity, a clinical trial study[J]. *JCDR*, 2015, 29(7): 1 046.
- [7] 陈晴宇, 周建平, 霍美蓉. 水飞蓟素新型纳米制剂的研究进展[J]. *中国药科大学学报*, 2015, 46(3): 376.
- [8] 李庆国, 关世侠, 郭慧珍. 水飞蓟素缓释片的制备及体外释药机制研究[J]. *中国药房*, 2013, 24(19): 1 770.
- [9] 王陆军, 邱瑞桂, 李建宇, 等. 葛根素肠溶纳米粒的制备及体外释放度研究[J]. *解放军药学报*, 2009, 25(6): 514.
- [10] 黄雅洁, 李雅彬, 袁海龙, 等. 南五味子总木脂素肠溶纳米粒的制备和药代动力学初步研究[J]. *药学报*, 2009, 44(9): 1 046.
- [11] Danhier F, Ansorena E, Silva JM, et al. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications[J]. *J Control Release*, 2012, 161(2): 505.

(收稿日期: 2016-02-05 修回日期: 2016-04-22)

(编辑: 邹丽娟)