

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910017736.9

[51] Int. Cl.

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 9/19 (2006.01)

A61K 31/357 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

[43] 公开日 2010 年 1 月 27 日

[11] 公开号 CN 101632638A

[22] 申请日 2009.8.21

[21] 申请号 200910017736.9

[71] 申请人 山东大学

地址 250012 山东省济南市历下区文化西路
44 号

[72] 发明人 张典瑞 贾乐姣 程惠玲 段存贤
王言才 冯飞飞

[74] 专利代理机构 济南圣达专利商标事务所有限
公司
代理人 杨 琪

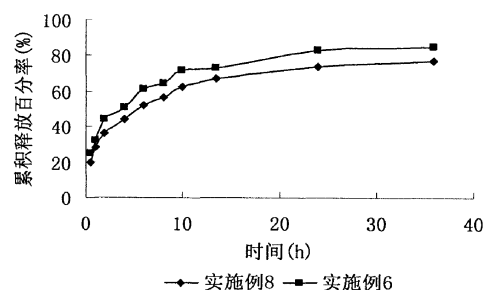
权利要求书 2 页 说明书 6 页 附图 1 页

[54] 发明名称

一种水飞蓟宾纳米脂质载体及其制备方法

[57] 摘要

本发明公开了一种水飞蓟宾纳米脂质载体，包括以下成分：水飞蓟宾 0.05 ~ 0.5wt%，固体脂质材料 0.1 ~ 5wt%，液态脂质 0.02 ~ 2wt%，脂溶性乳化剂，0.2 ~ 5wt%，水溶性乳化剂 0.2 ~ 5wt%，余量为水。制备方法为改造的微乳技术—乳化蒸发—低温固化法。本发明所制备的水飞蓟宾纳米脂质载体粒径在 200nm 左右，在体内具备缓释功能，可延长药物的循环时间，被动靶向于肝组织，提高水飞蓟宾的生物利用度，而且具有生物相容性好，易降解，包封率及载药量高等优点。



1. 一种水飞蓟宾纳米脂质载体, 其特征在于, 包括以下成分: 水飞蓟宾 0.05~0.5 wt%, 固体脂质材料 0.1~5 wt%, 液态脂质 0.02~2 wt%, 脂溶性乳化剂, 0.2~5 wt%, 水溶性乳化剂 0.2~5 wt%, 余量为水。
2. 根据权利要求 1 所述的一种水飞蓟宾纳米脂质载体, 其特征在于, 是由以下成分组成的: 水飞蓟宾 0.05~0.2 wt%, 固体脂质材料 1~2.5 wt%, 液态脂质 0.2~1.25 wt%, 脂溶性乳化剂, 0.6~2.0 wt%, 水溶性乳化剂 0.6~2.0 wt%, 余量为水。
3. 根据权利要求 1 所述的一种水飞蓟宾纳米脂质载体, 其特征在于: 所述固态脂质材料选自下列之一或它们的组合: 单硬脂酸甘油酯、双硬脂酸甘油酯、三硬脂酸甘油酯、硬脂酸、棕榈酸、石蜡、胆固醇。
4. 根据权利要求 1 所述的一种水飞蓟宾纳米脂质载体, 其特征在于: 所述液态脂质选自下列之一或它们的组合: 大豆油、橄榄油、中链脂肪酸甘油酯、油酸、亚油酸。
5. 根据权利要求 1 所述的一种水飞蓟宾纳米脂质载体, 其特征在于: 所述脂溶性乳化剂为磷脂或脂肪酸山梨坦。
6. 根据权利要求 5 所述的一种水飞蓟宾纳米脂质载体, 其特征在于: 所述磷脂包括大豆磷脂、蛋黄磷脂、卵磷脂; 所述脂肪酸山梨坦包括 Span60、Span80。
7. 根据权利要求 1 所述的一种水飞蓟宾纳米脂质载体, 其特征在于: 所述水溶性乳化剂选自下列之一或它们的组合: 聚乙二醇、泊洛沙姆 188、泊洛沙姆 182、胆酸钠、十二烷基硫酸钠。
8. 一种制备权利 1~7 中任一项所述的水飞蓟宾纳米脂质载体的方法, 其特征在于, 包括以下步骤:
 - (1) 将水飞蓟宾、载体材料和脂溶性乳化剂溶解于有机溶剂, 构成有机相; 取水溶性乳化剂溶于水中, 构成水相;
 - (2) 将上述有机相和水相水浴加热至 70~80℃, 在有机相完全溶解为澄明液体后, 搅拌下将有机相倾入水相中, 继续搅拌 4h~6h, 搅拌速度为 600~1200r/min, 使有机溶剂完全挥发, 得淡黄色乳剂;
 - (3) 将上述得到的淡黄色乳剂混于 0~2℃的水中, 搅拌 2h~4h, 搅拌速度为 600~1200r/min, 即得到水飞蓟宾纳米脂质载体。
9. 根据权利要求 8 所述的方法, 其特征在于, 还包括以下步骤:
 - (4) 向所述制得的水飞蓟宾纳米脂质载体中加入冻干保护剂, 制成冻干制剂; 所述冻

干保护剂选自下列之一或它们的组合：乳糖、葡萄糖、甘露醇、蔗糖。

10. 根据权利要求 8 所述的方法，其特征在于：所述有机溶剂选自下列之一：氯仿、丙酮、乙醇、乙酸乙酯。

一种水飞蓟宾纳米脂质载体及其制备方法

技术领域

本发明涉及一种水飞蓟宾纳米脂质载体及其制备方法。

背景技术

水飞蓟素(silymarin)系从菊科植物水飞蓟(*Silybum marianum*(L.) Gaertn.)的种子中提取的一类黄酮木脂素类成分,主要由水飞蓟宾(silibinin,silibin)、异水飞蓟宾(isosilibinin,isosilibin)、水飞蓟宁(silidianin)和水飞蓟亭(silichristin)组成,其中水飞蓟宾含量最多,活性也最高。水飞蓟宾是由1分子紫杉叶素(taxifolin,类黄酮组分)和1分子松柏醇(coniferyl alcohol,木酚素组分)构成;该类化合物具有清除活性氧、对抗脂质过氧化、抑制一氧化氮(NO)的产生、抑制5'-脂氧合酶、保护肝细胞膜、促进肝细胞修复、再生、免疫调节、抗肝纤维化等,临床上主要用作急、慢性肝炎,酒精性及中毒性肝损害,脂肪肝及早期肝硬化等肝病的治疗。但是,由于水飞蓟宾难溶于水及一般有机溶剂,口服吸收差,生物利用度较低,影响了其临床疗效。促使人们进一步对水飞蓟宾结构进行修饰和药理筛选,或寻找新的水飞蓟宾给药剂型,以期增加水飞蓟宾溶解性、改善其生物利用度、提高疗效。

纳米粒(nanoparticles)是利用天然高分子或合成的化学物质为载体制成的载药微粒,直径10~1000 nm。依据结构的不同,可分为纳米球(nanospheres)和纳米囊(nanocapsules),药物可包埋或溶解在纳米粒的内部,也可吸附或耦合在其表面。纳米粒具有靶向性,能直接向靶器官、靶细胞或细胞内靶结构输送药物,同时具有缓释、保护药物、提高疗效、降低毒副作用等优点。血管内注射纳米粒后,纳米粒主要被网状内皮系统(RES)吞噬,RES为来自于骨髓吞噬功能很强的单核细胞的统称。肝中有数目众多的网状内皮细胞,且位置固定,被称作Kupffer细胞,因此药物能在肝脏内聚集,然后逐步释放入血液循环,使肝脏药物浓度增加,对其他脏器不良反应减少,对肝脏有被动靶向作用;当纳米粒足够小(100~150 nm)且表面覆以特殊包被后,便可逃过Kupffer细胞的吞噬,靠其连接的特异性抗体等物质定位于肝实质细胞发挥作用,从而具有主动靶向作用。因此,纳米粒对于治疗各种肝脏疾病具有特殊意义。

纳米脂质载体(nanostructured lipid carriers,NLC)是在固体脂质纳米粒(solid lipid nanoparticles,SLN)基础上发展而来的一种新型胶体载体系统,其与SLN的不同之处在于:SLN主要是由单一的固态脂质或不同种类的固态脂质混合组成,而NLC是将常温下的液态脂质加入到固态脂质中,从而造成晶体的混乱度增加,使载体具有较高的晶体缺陷,因而可以

容纳更多的药物分子。因此 NLC 不仅具有 SLN 的优点如物理稳定性高、保护敏感药物不被降解、控制释放和良好的生物相容性等,还克服了 SLN 的某些不足:载药能力有限、再贮存过程中包封的药物容易泄露等;NLC 可通过控制加入液态脂质的量并且仍然保持固体状态来控制药物的释药特性。

综上所述,将水飞蓟宾制成纳米脂质载体,预期可以达到改变药物体内分布、延长药物作用时间、提高生物利用度等目的。虽然将药物制成纳米脂质载体是常规的技术手段,但要研制出一种具有效果好、生物相容性好、稳定、释药可控等优点的配方及制备方法并不是很容易的,需要付出创造性劳动。

发明内容

针对上述现有技术,本发明提供了一种生物相容性好、稳定、释药可控生物水飞蓟宾纳米脂质载体,其可通过控制纳米粒的粒径达到肝组织被动靶向、提高生物利用度、改善患者顺应性的目的。本发明还提供了其制备方法。

本发明是通过以下技术方案实现的:

一种水飞蓟宾纳米脂质载体,包括以下成分:水飞蓟宾 0.05~0.5 wt%, 固体脂质材料 0.1~5 wt%, 液态脂质 0.02~2 wt%, 脂溶性乳化剂, 0.2~5 wt%, 水溶性乳化剂 0.2~5 wt%, 余量为水。

优选的,是由以下成分组成的:水飞蓟宾 0.05~0.2 wt%, 固体脂质材料 1~2.5 wt%, 液态脂质 0.2~1.25 wt%, 脂溶性乳化剂, 0.6~2.0 wt%, 水溶性乳化剂 0.6~2.0 wt%, 余量为水。

所述固态脂质材料选自下列之一或它们的组合:单硬脂酸甘油酯、双硬脂酸甘油酯、三硬脂酸甘油酯、硬脂酸、棕榈酸、石蜡、胆固醇等。优选单硬脂酸甘油酯。

所述液态脂质选自下列之一或它们的组合:大豆油、橄榄油、中链脂肪酸甘油酯、油酸、亚油酸。优选中链脂肪酸甘油酯。

所述脂溶性乳化剂选自下列之一或它们的组合:磷脂类,如大豆磷脂、蛋黄磷脂、卵磷脂;脂肪酸山梨坦类,如 Span60、Span80。

所述水溶性乳化剂选自下列之一或它们的组合:聚乙二醇、泊洛沙姆 188、泊洛沙姆 182、胆酸钠、十二烷基硫酸钠。

为更好地适于静脉用药,乳化剂优选大豆磷脂和泊洛沙姆 188 的组合。

一种制备水飞蓟宾纳米脂质载体的方法包括以下步骤:

(1) 将水飞蓟宾、载体材料和脂溶性乳化剂溶解于有机溶剂,构成有机相;取水溶性乳

化剂溶于水中，构成水相；

(2) 将上述有机相和水相水浴加热至 70~80℃，在有机相完全溶解为澄明液体后，搅拌下将有机相倾入水相中，继续搅拌 4h~6h，搅拌速度为 600~1200r/min，使有机溶剂完全挥发，得淡黄色乳剂；

(3) 将上述得到的淡黄色乳剂混于 0~2℃的水中，搅拌 2h~4h，搅拌速度为 600~1200r/min，即得到水飞蓟宾纳米脂质载体。

本发明所制备的水飞蓟宾纳米脂质载体粒径在 200nm 左右，在体内具备缓释功能，可延长药物的循环时间，被动靶向于肝组织，提高水飞蓟宾的生物利用度。

还可包括以下步骤：(4) 向所述制得的水飞蓟宾纳米脂质载体中加入冻干保护剂，制成冻干制剂。

具体操作时，可以将 4~8wt%的冻干保护剂溶于本发明的水飞蓟宾纳米脂质载体水分散体中，然后分装于西林瓶中，置-80℃的超低温冰箱中预冻 24h，取出，迅速移入冷冻干燥机中，冻干 48h,加塞密封即可。

所述冻干保护剂选自下列之一或它们的组合：乳糖、葡萄糖、甘露醇、蔗糖。

所述有机溶剂选自下列之一：氯仿、丙酮、乙醇、乙酸乙酯。

本发明的纳米脂质载体作为水飞蓟宾的载药体系，具有较好的稳定性，通过向固体脂质材料中加入一定比例的液态脂质，在一定程度上破坏了材料的晶型，提高了容纳药物的能力，避免了药物在存储过程中的泄露，药物释放可控，为水飞蓟宾提供了一种理想的载药方式。

本发明的工艺为改造的微乳技术—乳化蒸发—低温固化法，具有工艺简单，成本低，工艺参数易于控制等特点；而且具有生物相容性好，易降解，包封率及载药量高等优点。

附图说明

图 1 为水飞蓟宾纳米脂质载体透射电镜图；

图 2 为水飞蓟宾纳米脂质载体体外释放的释放百分率-时间曲线示意图；

图 3 为水飞蓟宾纳米脂质载体粒径分布图；(图中坐标为：横坐标：粒径 (Diameter)；纵坐标：百分率 (% in class))。

具体实施方式

下面结合实施例对本发明做进一步的说明：

实施例 1 制备水飞蓟宾纳米脂质载体：

取 15 mg 水飞蓟宾、200 mg 硬脂酸、100 mg 油酸、120 mg 卵磷脂和 5 ml 无水乙醇于 10 ml 试管中，于 70℃ 恒温水浴上加热使其充分溶解，构成有机相；另取 20 ml 蒸馏水，水浴加热至

和有机相相同的温度，构成水相。将有机相在800 r/min搅拌下用5号针头缓慢注入水相中， $(70 \pm 2)^\circ\text{C}$ 恒温搅拌，使有机溶剂挥发，6 h后将所得的半透明乳液快速分散于15 ml $0 \sim 2^\circ\text{C}$ 水相中，冰浴下搅拌2 h，即得水飞蓟宾纳米脂质载体。

实施例 2 制备水飞蓟宾纳米脂质载体：

取25 mg水飞蓟宾、400 mg单硬脂酸甘油酯、200 mg中链脂肪酸甘油酯、200 mg卵磷脂和5 ml丙酮于10 ml试管中，于 75°C 恒温水浴上加热使其充分溶解，构成有机相；另取20 ml蒸馏水，水浴加热至和有机相相同的温度，构成水相。将有机相在800 r/min搅拌下用5号针头缓慢注入水相中， $(75 \pm 2)^\circ\text{C}$ 恒温搅拌，使有机溶剂挥发，6 h后将所得的半透明乳液快速分散于15 ml $0 \sim 2^\circ\text{C}$ 水相中，冰浴下搅拌2 h，得水飞蓟宾纳米脂质载体。

实施例 3 制备水飞蓟宾纳米脂质载体：

取20 mg水飞蓟宾、250 mg硬脂酸、50 mg油酸、160 mg Span80和5 ml乙酸乙酯于10 ml试管中，于 75°C 恒温水浴上加热使其充分溶解，构成有机相；另取20 ml蒸馏水，水浴加热至和有机相相同的温度，构成水相。将有机相在900 r/min搅拌下用5号针头缓慢注入水相中， $(75 \pm 2)^\circ\text{C}$ 恒温搅拌，使有机溶剂挥发，4 h后将所得的半透明乳液快速分散于15 ml $0 \sim 2^\circ\text{C}$ 水相中，冰浴下搅拌2 h，得水飞蓟宾纳米脂质载体。

实施例 4 制备水飞蓟宾纳米脂质载体冻干制剂：

取10 mg水飞蓟宾、320 mg硬脂酸、80 mg中链脂肪酸甘油酯、200 mg卵磷脂和5 ml无水乙醇于10 ml试管中，于 80°C 恒温水浴上加热使其充分溶解，构成有机相；另取150 mg 泊洛沙姆188溶于20 ml蒸馏水，水浴加热至和有机相相同的温度，构成水相。将有机相在1000 r/min搅拌下用5号针头缓慢注入水相中， $(80 \pm 2)^\circ\text{C}$ 恒温搅拌，使有机溶剂挥发，4 h后将所得的半透明乳液快速分散于20 ml $0 \sim 2^\circ\text{C}$ 水相中，冰浴下搅拌2 h，得水飞蓟宾纳米脂质载体，冻干。取适量冻干粉用水稀释一定倍数后，以H-7000型透射电子显微镜观测其形态，如图1所示。由图1可知所得水飞蓟宾纳米脂质载体大小均一、形态圆整。

冻干工艺为：

取 7 wt%的甘露醇，溶于本发明的水飞蓟宾纳米脂质载体水分散体中，然后分装于西林瓶中，置 -80°C 的超低温冰箱中预冻 24h，取出，迅速移入冷冻干燥机中， -40°C 、0.10 mbar冻干 48h，加塞密封即可。

实施例 5 制备水飞蓟宾纳米脂质载体：

取40 mg水飞蓟宾、450 mg硬脂酸、150 mg油酸、200 mg卵磷脂和5 ml丙酮于10 ml试管

中，于70℃恒温水浴上加热使其充分溶解，构成有机相；另取100 mg 胆酸钠溶于20 ml蒸馏水，水浴加热至和有机相相同的温度，构成水相。将有机相在800 r/min搅拌下用5号针头缓慢注入水相中，(70±2)℃恒温搅拌，使有机溶剂挥发，4 h后将所得的半透明乳液快速分散于20 ml 0~2℃水相中，冰浴下搅拌23h，得水飞蓟宾纳米脂质载体。

实施例6 制备水飞蓟宾纳米脂质载体：

取10 mg水飞蓟宾、300 mg单硬脂酸甘油酯、150 mg油酸、150 mg Span80和5 ml无水乙醇于10 ml试管中，于80℃恒温水浴上加热使其充分溶解，构成有机相；另取150 mg 泊洛沙姆188溶于20 ml蒸馏水，水浴加热至和有机相相同的温度，构成水相。将有机相在1000 r/min搅拌下用5号针头缓慢注入水相中，(80±2)℃恒温搅拌，使有机溶剂挥发，4 h后将所得的半透明乳液快速分散于15 ml 0~2℃水相中，冰浴下搅拌2 h，得水飞蓟宾纳米脂质载体。

水飞蓟宾纳米脂质载体的药物释放，通过以下方式实现：精密吸取水飞蓟宾纳米脂质载体2 ml置于含200 mlPBS (pH 7.4) 的小溶出杯中，设定温度为37℃，搅拌浆转速为75 r/min。取样经超滤离心后，进样20 µl进行HPLC测定，计算累积释放百分率，如图2所示，由图可知水飞蓟宾纳米脂质载体体外释放呈双相动力学，即最初为突释后为缓释；液态脂质占总脂质比重越大，释药越快。

实施例7 制备水飞蓟宾纳米脂质载体：

取30 mg水飞蓟宾、500 mg硬脂酸、100 mg中链脂肪酸甘油酯、300 mg卵磷脂和5 ml无水乙醇于10 ml试管中，于80℃恒温水浴上加热使其充分溶解，构成有机相；另取300 mg 泊洛沙姆188溶于20 ml蒸馏水，水浴加热至和有机相相同的温度，构成水相。将有机相在1000 r/min搅拌下用5号针头缓慢注入水相中，(80±2)℃恒温搅拌，使有机溶剂挥发，4 h后将所得的半透明乳液快速分散于20 ml 0~2℃水相中，冰浴下搅拌2 h，得水飞蓟宾纳米脂质载体。用水稀释后，以Zetasizer 3000 HS型激光粒度分布仪测定粒径分布，测得平均粒径为205.8 nm，多分散性系数为0.103，如图3所示。

实施例8 制备水飞蓟宾纳米脂质载体：

取30 mg水飞蓟宾、500 mg硬脂酸、200 mg中链脂肪酸甘油酯、350 mg卵磷脂和5 ml无水乙醇于10 ml试管中，于80℃恒温水浴上加热使其充分溶解，构成有机相；另取200 mg 泊洛沙姆188溶于20 ml蒸馏水，水浴加热至和有机相相同的温度，构成水相。将有机相在1000 r/min搅拌下用5号针头缓慢注入水相中，(80±2)℃恒温搅拌，使有机溶剂挥发，4 h后将所得的半透明乳液快速分散于20 ml 0~2℃水相中，冰浴下搅拌2 h，得水飞蓟宾纳米脂质载体。

水飞蓟宾纳米脂质载体的药物释放，通过以下方式实现：精密吸取水飞蓟宾纳米脂质载体2 ml置于含200mlPBS (pH 7.4) 的小溶出杯中，设定温度为37℃，搅拌浆转速为75 r/min。取样经超滤离心后，进样20 μ l进行HPLC测定，计算累积释放百分率，如图2所示。

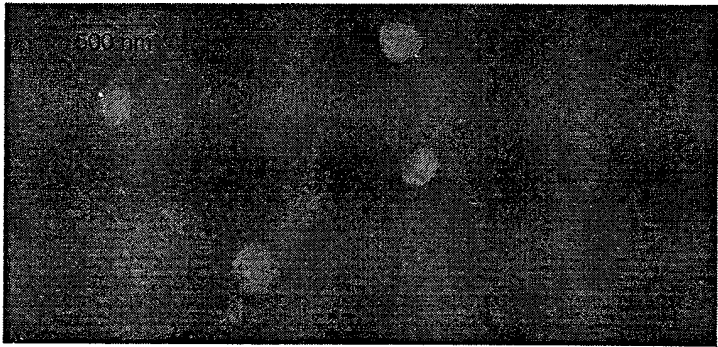


图 1

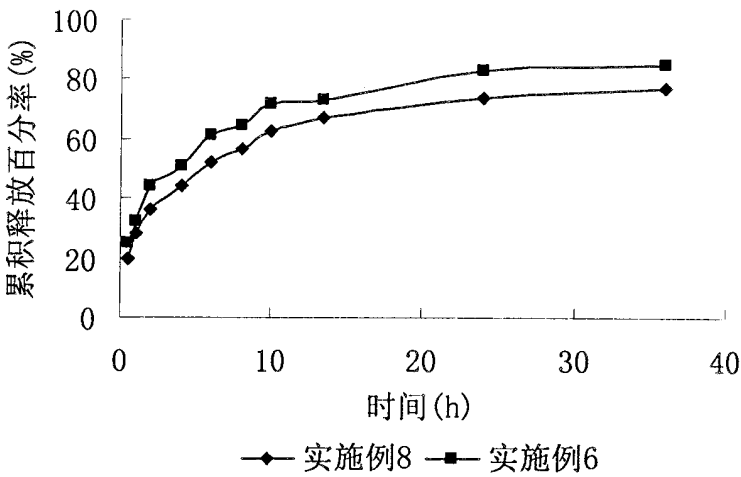


图 2

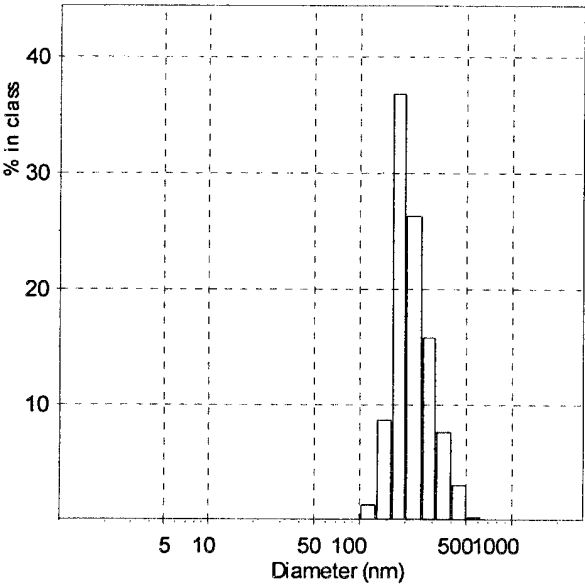


图 3