

槲皮素前体脂质体的质量考察

任瑾¹, 方正杰², 印晓星^{1*}, 汤道权¹(1.徐州医学院药学院, 江苏 徐州 221004; 2.徐州市产品质量监督检验所食品及农产品检验中心, 江苏 徐州 221000)

摘要: 目的 制备液体型槲皮素前体脂质体, 并对制剂质量进行考察。方法 采用一种新型前体脂质体制备方法制备液体型槲皮素前体脂质体, 将脂质体膜材和药物等以一定比例溶于分散介质中, 形成一种无水的澄明溶液。考察其水合后粒子形态、粒径、电位、包封率及自组装速度等理化性质, 并评价其体外释药性质。结果 槲皮素前体脂质体遇水即可快速自组装成纳米级含药脂质体混悬液, 水合后形态多为类球形, 平均粒径为 228.7 nm, Zeta 电位为 -21.2 mV, 包封率可达 90%以上, 体外释药符合 Higuchi 方程。结论 槲皮素口服前体脂质体制备工艺简单可行, 包封率高, 具有一定的缓释效果。

关键词: 槲皮素; 前体脂质体; 体外释放

中图分类号: R943.41

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2013)01-0039-04

Quality Evaluation of Quercetin Proliposomes

REN Jin¹, FANG Zhengjie², YIN Xiaoxing^{1*}, TANG Daoquan¹(1.Department of Pharmacy, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221004, China; 2.Department of Food and Agriculture Products Inspection, Xuzhou Production Quality Supervision and Inspection Center, Xuzhou 221000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To prepare liquid quercetin proliposomes and investigate their pharmaceutical characteristics *in vitro*. **METHODS** A new kind of proliposome preparation method was used to prepare quercetin liquid proliposomes. The liposome membrane material and drug was dissolved in the dispersion medium according to a certain proportion, forming an anhydrous transparent solution and then the properties of the liposomes including the shape, the size, the zeta potential, the entrapment efficiency and the self-assemble rate *in vitro* were studied after the proliposomes were changed into the liposomes. Furthermore, the *in vitro* release of quercetin from proliposomes was investigated. **RESULTS** Quercetin oral proliposomes could self-assemble into nanoscale liposome suspension rapidly in water. Liposomes showed spherical morphology. The average size of particle was 228.7 nm and the Zeta potential was -21.2 mV. The entrapment efficiency was up to 90%. The *in vitro* release could be characterized by Higuchi equation. **CONCLUSION** The method for quercetin oral proliposomes preparation is simple and feasible. The entrapment efficiency of proliposome is high with good stability and the drug can be sustained released from the liposomes.

KEY WORDS: quercetin; proliposomes; *in vitro* release

槲皮素属黄酮类化合物, 广泛存在于许多植物的花、叶、果实中, 具有抗肿瘤、抗氧化、降血压、降血脂、抗炎等广泛的药理作用^[1]。但本品难溶于水亦难溶于油, 口服吸收困难, 生物利用度低, 限制了其在临床中的应用。脂质体是一种类似生物膜结构的双分子层微小囊泡, 作为一种新型药物载体, 脂质体可以促进药物吸收, 增加药物的稳定性, 延缓药物释放^[2]。本实验采用一种新型前体脂质体法^[3-5]制备了液体型槲皮素前体脂质体, 将脂质体膜材和药物等以一定比例溶于分散介质中, 形成一种无水的澄明溶液, 用前将该前体脂质体加水水合即可快速自组装成含药脂质体

混悬液。该液体型前体脂质体属于动力学稳定体系, 与用传统方法制备的脂质体溶液相比, 有效地改善了脂质体溶液存在的容易聚集, 易发生包封药物泄露^[6]等不稳定缺陷。同时, 本实验对槲皮素前体脂质体有关性质进行了考察, 为槲皮素新剂型的开发提供参考。

1 仪器与药品

Shimadzu LC-20AT 高效液相色谱仪(日本岛津公司); Malven Zetasizer 3000HS 粒径仪(英国马尔文公司); Veeco 原子力显微镜(美国 Veeco 公司); HITACHI H-7650 透射电子显微镜(日本日立公司); ZRS-8G 智能溶出试验仪(天津大学无线电厂)。

基金项目: 徐州医学院药学院院长人才专项科研启动项目(2010YKJ016)

作者简介: 任瑾, 女, 硕士, 助理实验师 Tel: (0516)83262141 E-mail: 0341227@163.com 通信作者: 印晓星, 男, 博士, 教授 Tel: (0516)83262141 Email: yinxggood@126.com

槲皮素对照品(批号: 100081-200406, 纯度: 97.3%, 成都曼思特公司); 槲皮素(实验室自提, 含量>95%); 蛋黄卵磷脂(上海艾韦特公司); Cremophor RH40(BASF 公司); 其他辅料均为药用; 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 槲皮素前体脂质体的制备

以水合后槲皮素脂质体的包封率为指标, 通过单因素试验法, 确定最佳工艺如下: 以蛋黄卵磷脂为膜材, Cremophor RH40 为修饰剂, 药脂比为 1:20, CremophorRH40 按磷脂和主药总量的 18%~22%加入。称取槲皮素 0.04 g, 将槲皮素、蛋黄卵磷脂、CremophorRH40 按上述比例直接溶解在 5 mL 无水乙醇中, 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌, 灌封于充氮容器中, 即制成液体型含药前体脂质体。将该前体脂质体直接注入适宜的水合介质中, 即可快速自组装成纳米级槲皮素脂质体。

2.2 槲皮素前体脂质体的质量评价

2.2.1 粒径及 Zeta 电位测定 取槲皮素前体脂质体适量, 注入双蒸水中, 水合摇匀, 以动态光散射法测定槲皮素脂质体粒径大小、分散度及 Zeta 电位。粒径的分散度用多分散指数表示。结果粒径为 $(228.7 \pm 2.61)\text{nm}$, 多分散系数为 0.208 ± 0.04 , Zeta 电位为 $(-21.2 \pm 1.47)\text{mV}$ 。

2.2.2 形态观察 取适量槲皮素前体脂质体溶液, 注入双蒸水中, 水合摇匀, 取 1 滴滴于干净的玻璃片上, 放置过夜, 使其自然风干, 将风干后的玻璃片固定于原子力显微镜上, 选用 Tapping In Air 模式扫描槲皮素脂质体的形态。另取槲皮素前体脂质体溶液适量, 注入双蒸水中水合, 将所得脂质体混悬液滴至专用铜网上, 1.0%磷钨酸染色, 在透射电子显微镜下观察槲皮素脂质体的形态。槲皮素脂质体原子力显微镜图见图 1, 透射电镜图见图 2。原子力显微镜图及透射电子显微镜图均显示槲皮素脂质体形态为类球形, 且粒径分布均匀。并且从透射电镜图可以看出槲皮素脂质体轮廓清晰, 形成了脂质体特有的囊泡结构。

2.2.3 包封率的测定

2.2.3.1 色谱条件 色谱柱: ZORBAX SB-C₁₈ 柱 (4.6 mm \times 150 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.1%甲酸水溶液(55:45); 流速: 1.0 mL $\cdot\text{min}^{-1}$; 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 紫外检测波长: 360 nm; 进样量: 20 μL 。

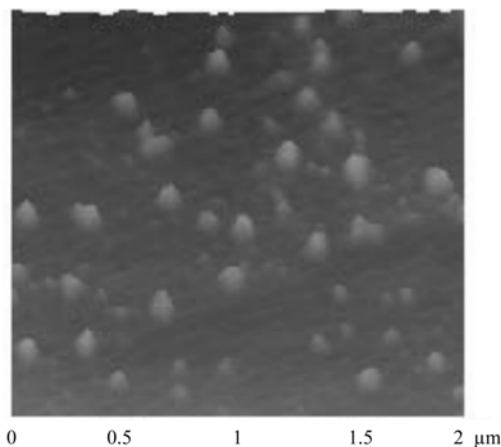


图 1 原子力显微镜图

Fig 1 Atomic force micrograph of quercetin liposomes

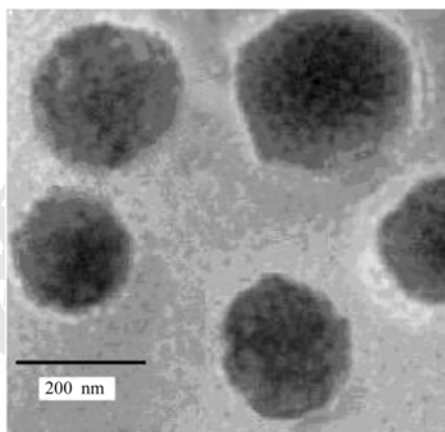


图 2 透射电子显微镜图

Fig 2 Transmission electron photomicrograms of quercetin liposomes

2.2.3.2 标准曲线 精密称取槲皮素对照品 2.5 mg, 置 25 mL 量瓶中, 甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀得 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 槲皮素储备液。然后用甲醇逐级稀释槲皮素储备液, 精密配制一系列浓度为 1, 0.8, 0.5, 0.3, 0.2, 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的槲皮素溶液, 各浓度溶液按“2.2.2.1”项下色谱条件进样 20 μL , 记录色谱峰面积。以峰面积积分值(Y)为纵坐标, 相应浓度(X)为横坐标进行线性回归, 得回归方程 $Y=97\ 561X+10\ 409(r=0.999\ 8)$ 。结果, 槲皮素检测浓度在 $0.1\sim 1.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内与峰面积积分值线性关系良好。

2.2.3.3 精密度实验 分别配制 1, 0.5, 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 高、中、低 3 种浓度的槲皮素甲醇溶液, 按“2.2.3.1”项下色谱条件, 分别于 1 d 内测 5 次, 连续测定 5 d, 计算日内日间精密度。日内和日间精密度(RSD)均 $<2.0\%$, 符合含量测定要求。

2.2.3.4 回收率实验 吸取水合后的空白脂质体

溶液 0.2 mL 于 10 mL 量瓶中, 共 3 份, 每份中各加入 $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 槲皮素标准液 1, 0.5, 0.1 mL, 用甲醇稀释至刻度, 制得高、中、低 3 种浓度的溶液, 每个浓度各做 3 份。按“2.2.3.1”项下色谱条件进样 $20 \mu\text{L}$, 记录色谱峰面积。以加入量与测得量之比值, 计算回收率。高、中、低浓度的回收率分别为 $(98.7 \pm 1.2)\%$ 、 $(99.9 \pm 0.05)\%$ 和 $(97.3 \pm 0.03)\%$ 。

2.2.3.5 包封率测定 将 0.5 mL 槲皮素前体脂质体注入 4.5 mL 双蒸水中水合, 精密移取水合后的脂质体用流动相稀释 50 倍定容, 取 $20 \mu\text{L}$ 进样, 所得峰面积代入标准曲线计算浓度(A), 同时另取重组后的脂质体过 $0.45 \mu\text{m}$ 的滤膜, 精密移取续滤液用流动相稀释 50 倍定容, 取 $20 \mu\text{L}$ 进样, 所得峰面积代入标准曲线计算浓度(B)。按 $EE/\% = B/A \times 100\%$ 计算包封率(EE), A 代表总的槲皮素含量, B 代表脂质体中槲皮素含量。结果见表 1。

表 1 槲皮素脂质体包封率测定结果

Tab 1 Results of quercetin liposome drug encapsulation efficiency

| 批号 | 包封率/% | 平均包封率/% |
|----------|-------|------------------|
| 20110621 | 90.36 | |
| 20110622 | 92.69 | 91.65 ± 1.18 |
| 20110623 | 91.90 | |

2.2.4 自组装速度测定 类脂在水性介质中所形成胶体溶液的分散程度可通过测定其浊度(τ)变化来评价, 当类脂在水性介质中分散形成均一体系时, 体系的浊度几乎达到坪值, 不再发生很大变化。由于胶体溶液的浊度(τ)与其吸收度(A)呈正相关($\tau=2.303A$), 因此, 本实验通过测定脂质体的吸收度来评价槲皮素前体脂质体自组装速度。使用双蒸水配对, 在样品池中加入 3 mL 双蒸水, 用微量进样针在液面下快速注入槲皮素前体脂质体, 封膜, 反复振摇 3 次, 于 600 nm 处快速反复测定吸光度, 以浊度(τ)对时间(t)作图。结果见图 3。由结果可知, 槲皮素前体脂质体在 120 s 时便在分散介质中分散达到平衡, 表明前体脂质体遇水即可快速自组装成含药脂质体混悬液。

2.2.5 稳定性实验 取槲皮素前体脂质体, 过滤除菌, 分装于充氮容器中, 置于室温环境下, 于 0, 1, 2, 3 月取样, 观察其外观, 药物析出情况, 并测定药物含量, 初步考察槲皮素前体脂质体的稳定性。结果显示, 制剂放置 3 个月, 无药物晶体析出, 制剂一直为淡黄色澄清透明、均一的溶液。药物含量无明显变化。

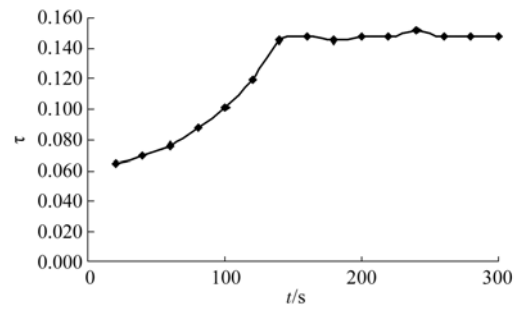


图 3 槲皮素前体脂质体自主装速度浊度试验

Fig 3 Profile of self-assembled rate for quercetin proliposomes by turbidity analysis

2.3 体外释放实验

2.3.1 胃液中稳定性考察 将槲皮素前体脂质体用人工胃液稀释, 取上述脂质体混悬液适量置于透析袋内, 将透析袋放入含有人工胃液的烧杯中, 保持漏槽条件, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴, 磁力搅拌器搅拌。分别于 0, 10, 20, 30, 60, 90, 120 min 从透析袋中取出槲皮素脂质体混悬液适量, 甲醇稀释后 HPLC 测定槲皮素含量, 计算脂质体中药物含量变化百分率。结果见图 4。

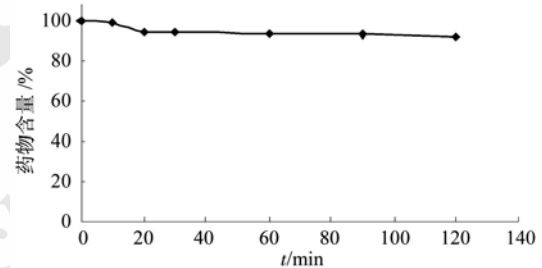


图 4 脂质体中药物含量变化百分率

Fig 4 The percentage change of drug content in liposomes

由结果可知, 槲皮素脂质体在人工胃液中药物含量基本保持不变, 表明脂质体在胃液中释放药量很少, 保持了完整的脂质体形态。

2.3.2 释放实验 称取适量槲皮素使其完全溶解于 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠中, 制得浓度为 $0.75 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的槲皮素的氢氧化钠溶液。将槲皮素前体脂质体用透析介质(人工肠液)稀释。分别取 2 mL 槲皮素氢氧化钠溶液和槲皮素脂质体混悬液(相当于 1.5 mg 槲皮素)置于透析袋内, 透析袋提前在释放介质中饱和 12 h。分别将装有槲皮素溶液剂和槲皮素脂质体混悬液的透析袋放入 200 mL 透析介质中, 并固定于搅拌桨上, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴、 $50 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 搅拌。在 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12 h 分别取透析外液 1 mL, 同时补充介质 1 mL。将取出的样品

溶液 10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 后取上清液进 HPLC 色谱测定释放介质中槲皮素的含量, 计算累积释放百分率, 绘制槲皮素前体脂质体的体外累积释药曲线, 并对释放曲线进行方程拟合。结果见图 5。

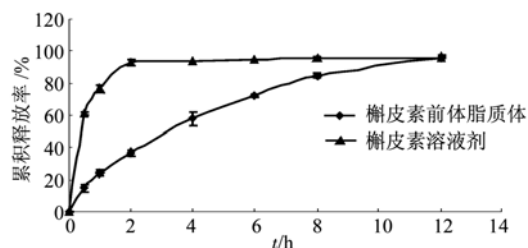


图 5 体外累积释放曲线

Fig 5 *In vitro* cumulative release curve

由结果可知, 槲皮素溶液剂释放很快, 2 h 内基本释放完全。而槲皮素脂质体的释放速率较为缓慢, 表明脂质体对包封在内部的药物起到了一定的缓释作用。将槲皮素体外释药曲线进行拟合, 结果表明槲皮素脂质体释药行为用 Higuchi 方程拟合最佳, $Y=29.779X-3.2704$, $r=0.9962$, 药物的释放主要以扩散的模式进行。

3 讨论

到目前为止, 已有关于槲皮素固体脂质纳米粒^[7]及槲皮素纳米脂质体^[8]的报道, 但所得到的制剂包封率较低, 制备工艺复杂。本研究所制备的液体型槲皮素前体脂质体, 包封率较高, 可达到 90% 以上, 并且制备工艺简单, 无需专门设备, 易于放大生产。与传统的脂质体溶液相比, 可有效提高脂质体的稳定性。制备的前体脂质体遇水即可快速自组装成为含药脂质体混悬液, 粒径分布均匀。

在液体型前体脂质体中, 表面活性剂 CremophorRH40 的加入对脂质体的形成及脂质体粒径的控制起到了非常重要的作用。在脂质体溶液中加入少量表面活性剂, 表面活性剂可嵌入磷脂膜内, 增加磷脂以及药物在水中的溶解度。同时嵌合的表面活性剂具有疏水尾基和亲水头基, 独特的两亲性使其在水溶液中可自发形成有序聚集体, 降低油水表面张力, 协助磷脂形成囊泡结构, 减小脂质体粒径并使粒径分布均匀, 同时增加磷脂膜的稳定性, 且不会破坏脂膜。前体脂质体的具体形成机理还有待进一步通过相关实验验证。

包封率常用的测定方法有透析法、冷冻超速

离心法、凝胶柱层析法、超滤法等^[9]。本实验采用过膜法^[10-11]测定脂质体包封率。槲皮素在水溶液中的溶解度非常低, 溶解度约为 12 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。因此在前体脂质体水化后, 没有被包封在脂质囊泡中的游离槲皮素绝大多数会以不溶沉淀的形式存在于水溶液中。通过过膜的方式, 药物沉淀被过滤除去, 而脂质体由于具有一定的流动性, 可以完整地通过滤膜的滤孔, 过滤后所得的滤液即为包含药物的脂质体溶液。该方法简单可靠, 操作方便。

体外释放结果表明, 槲皮素脂质体 0.5 h 时累积释放率 < 40%, 符合中国药典规定。与槲皮素溶液剂相比, 槲皮素脂质体具有一定的缓释效果, 本研究将对其相关体内性质做进一步的考察和评价。

REFERENCES

- [1] WANG Y F, WANG X H, ZHU Y T. Advancement of researches in quercetin [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2003, 15(2): 171-173.
- [2] SHI N Q, ZHANG D T, LI S Y, et al. Application of liposome and new liposome in drug delivery system [J]. J Shandong Institute of Light Industry(山东轻工业学院学报), 2008, 22(1): 77-80.
- [3] WANG M, GAO X L. Influence factor on the entrapment of drugs in a novel proliposomes [J]. Acta Pharm Sin(药理学学报), 2006, 41(12): 1204-1207.
- [4] WANG J P. *In vivo* evaluation of doxorubicin carried with longcirculating and remote loading proliposome [J]. Inter J Pharm, 2000, 20(3): 61-69.
- [5] RUZICA G R, KARMALE B, ZELJKA P, et al. High efficiency entrapment of superoxide dismutase into mucoadhesive chitosan-coated liposome [J]. Euro J Pharm, 2002, 15(5): 441-448.
- [6] WANG J, LI M X. Progresses of proliposome [J]. Chin J Pharm(中国医药工业杂志), 2005, 36(11): 707-711.
- [7] LI H L, ZHAI G X, ZHU W W, et al. Studies on preparation of quercetin solid lipid nanoparticles and oral absorption in mice [J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2008, 43(6): 435-438.
- [8] DING Y F, YAO Y, TAO Y F, et al. Optimization of formulation and process for quercetin-loaded nanoliposomes [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2008, 39(4): 522-524.
- [9] CHEN S H, LIU G Y, WEI Y C. Advancement of researches in methods for liposomes entrapment efficiency determination [J]. Pharm J Chin PLA(解放军药理学学报), 2011, 27(1): 79-82.
- [10] KE X, WANG C J, YAN F. Filtration by microspore film for determination of the entrapment efficiency of docetaxel liposomes [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2008, 25(4): 314-316.
- [11] XIAO Y Y, SONG Y M, CHEN Z P, et al. Preparation of silymarin proliposome: a new way to increase oral bioavailability of silymarin in beagle dogs [J]. Int J Pharm, 2006, 319(1/2): 162-168.

收稿日期: 2011-11-07