

# 槲皮素液体型前体脂质体的处方筛选及质量评价

任瑾<sup>1</sup>, 方正杰<sup>2</sup>, 魏雅芹<sup>1</sup>, 杜倩<sup>1\*</sup>

(1. 徐州医学院, 江苏徐州 221004; 2. 徐州市产品质量监督检验中心, 江苏徐州 221000)

**[摘要]** **目的:**分析槲皮素液体型前体脂质体的处方影响因素并考察该制剂的质量。**方法:**采用液体型前体脂质体的制备方法制备槲皮素前体脂质体。以槲皮素脂质体的粒径和包封率为指标,通过单因素试验和正交试验筛选槲皮素脂质体的处方。利用 Zetasizer 3000HS 型粒径仪测定脂质体的粒径和 Zeta 电位。采用透析法分离槲皮素脂质体和游离槲皮素,通过 HPLC 测定槲皮素的含量,检测波长 360 nm,流动相甲醇-0.1% 甲酸水溶液(55:45),考察该制剂在人工胃液和人工肠液中的稳定性。**结果:**选择卵磷脂为脂质膜材,聚氧乙烯化蓖麻油(cremophor RH40)为表面活性剂,药脂比 1:20, cremophor RH40 按磷脂和主药总量的 20% 加入,制剂中槲皮素质量浓度 10.0 g·L<sup>-1</sup>。该处方下前体脂质体水合后的粒径(228.7 ± 2.61) nm, Zeta 电位(-21.2 ± 1.47) mV, 包封率(93.12 ± 1.18)%, 有较好的重复性,且水合后脂质体在 12 h 内具有良好的稳定性,适合口服给药。**结论:**制备的槲皮素液体型前体脂质体具有良好体外性质。该制剂在人工胃液和人工肠液中的粒径略大于在水中的粒径,但无论是在哪种水性介质中,12 h 内其粒径变化不显著。

**[关键词]** 槲皮素; 前体脂质体; 表面活性剂; 包封率; 质量评价

**[中图分类号]** R283.6; R945; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)23-0017-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfx.2015230017

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20151022.1421.048.html>

**[网络出版时间]** 2015-10-22 14:21

**Formulation Optimization and Quality Evaluation of Quercetin Liquid Proliposomes** REN Jin<sup>1</sup>, FANG Zheng-jie<sup>2</sup>, WEI Ya-qin<sup>1</sup>, DU Qian<sup>1\*</sup> (1. Xuzhou Medical College, Xuzhou 221004, China; 2. Xuzhou Supervision and Inspection Center for Product Quality, Xuzhou 221000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To analyze factors affecting formulation of quercetin liquid proliposomes and evaluate its quality. **Method:** Quercetin liquid proliposomes was prepared. Taking particle size and encapsulation efficiency as indexes, formulation of quercetin liquid proliposomes was optimized by single factor experiment and orthogonal test. Free quercetin and quercetin proliposomes was separated by dialysis method, the content of quercetin was determined by HPLC, stability of quercetin proliposomes in artificial gastric juice and artificial intestinal juice was investigated. **Result:** Optimum formulation of quercetin liquid proliposomes was as follows: lecithin as lipid membrane material, cremophor RH40 as surfactant, drug phospholipids ratio of 1:20, cremophor RH40 amount of 20% to total content of phospholipid and main drug, the concentration of quercetin of 10 g·L<sup>-1</sup>. The particle size, Zeta potential and encapsulation efficiency of the proliposomes after hydration were (228.7 ± 2.61) nm, (-21.2 ± 1.47) mV and (93.12 ± 1.18)% with good stability within 12 h and good repeatability. It was suitable for oral administration. **Conclusion:** Quercetin liquid proliposomes has good *in vitro* properties. Within 12 h, its particle size do not change significantly in each aqueous medium.

**[Key words]** quercetin; proliposomes; surfactant; encapsulation efficiency; quality evaluation

槲皮素在植物界分布广泛,是一种天然的具有多种生物活性的黄酮类物质,具有抗肿瘤、抗氧化、抗炎、免疫调节和心血管保护等药理作用<sup>[1-4]</sup>。但动物实验表明槲皮素口服后小肠吸收率比较低<sup>[5]</sup>,

**[收稿日期]** 20150424(007)

**[基金项目]** 徐州市科学技术局项目(XZZD1327);徐州市科学技术局项目(KC14SH077);徐州医学院院课题(2012KJ20)

**[第一作者]** 任瑾, 硕士, 实验师, 从事药物新剂型与新技术研究, Tel:0516-83262141, E-mail:0341227@163.com

**[通讯作者]** \* 杜倩, 硕士, 副教授, 从事药物新剂型与新技术研究, Tel:0516-83262139, E-mail:duqian81@163.com

在血浆中的血药浓度也偏低<sup>[6]</sup>,提示槲皮素口服吸收差、生物利用度低,使其临床应用受到影响。

脂质体可增加药物溶解度,促进细胞对药物的吸收<sup>[7]</sup>。文献报道脂质体在一定程度上对黄酮类药物可起到稳定和保护的作用<sup>[8]</sup>,是黄酮类药理想的制剂形式。目前,已有关于槲皮素脂质体的报道,如丁燕飞等<sup>[9]</sup>采用薄膜蒸发-高压均质法制备槲皮素纳米脂质体,陈浩等<sup>[10]</sup>采用薄膜超声法制备槲皮素脂质体,于莲等<sup>[11]</sup>采用乳化-超声分散法制备槲皮素脂质体,但这些脂质体均以液态形式贮存,在贮存时可能会发生粒子聚集、磷脂氧化、药物泄露等问题<sup>[12-14]</sup>。上述问题可通过制备前体脂质体的方式来避免。前体脂质体有固体型和液体型 2 种,王刚等<sup>[15]</sup>采用冷冻干燥法制备固体型槲皮素前体脂质体,即脂质体冻干粉针,用前加适量水可将冻干粉水合分散成脂质体混悬液,稳定性试验表明脂质体冻干粉针有较好的稳定性,但固体型前体脂质体的制备工艺复杂且需要相应的机械设备,成本较高。

本实验采用液体型前体脂质体法制备槲皮素前体脂质体<sup>[16-18]</sup>。将磷脂、表面活性剂和槲皮素按一定比例溶于乙醇中,形成一种无水透明的溶液,用前将该前体脂质体溶液加水水合轻摇即可快速分散成槲皮素脂质体混悬液。该液体型前体脂质体制作工艺简单,以无水溶液状态存储属于动力学稳定体系。选择包封率为评价指标,通过正交试验筛选槲皮素前体脂质体的处方,考察最优处方下前体脂质体的外观及其水合后脂质体的粒径、电位、包封率等,为该制剂的制备和应用提供参考。

## 1 材料

Zetasizer 3000HS 型粒径仪(英国马尔文公司), LC-20AT 型高效液相色谱仪(日本岛津公司), 85-2A 型数显磁力搅拌器(金坛市荣华仪器制造有限公司)。槲皮素对照品(成都曼思特生物科技有限公司,批号 100081-200406),槲皮素(自制,质量分数 > 95%),蛋黄卵磷脂(上海艾韦特公司),聚氧乙烯氢化蓖麻油 40(cremorphor RH40,德国巴斯夫公司),泊洛沙姆 188(德国巴斯夫公司),聚山梨酯-80(tween-80,国药集团试剂有限公司),聚氧乙烯蓖麻油 35(cremorphor EL35,德国巴斯夫公司),试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 槲皮素液体型前体脂质体的制备** 以蛋黄卵磷脂为脂质膜材,称取槲皮素 0.05 g,将槲皮素、蛋黄卵磷脂、表面活性剂按一定比例溶解在适量乙醇

中,过 0.22 μm 微孔滤膜除去杂质,即得。用前将该前体脂质体注入到适量水合介质中,轻摇,即可得到纳米级槲皮素脂质体混悬液。

**2.2 脂质体粒径的测定** 取适量槲皮素前体脂质体,注入水中水合并摇匀,采用动态光散射法测定槲皮素脂质体粒径大小。

**2.3 脂质体中槲皮素的含量测定** 色谱条件为 Zorbax SB-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),检测波长 360 nm,流动相甲醇-0.1% 甲酸水溶液(55:45),进样量 20 μL。在该色谱条件下,辅料对脂质体中槲皮素的测定无干扰。精密称取干燥至恒重的槲皮素对照品 2.5 mg,置 25 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释成 100 mg·L<sup>-1</sup> 的储备液,精密吸取该储备液 1.0, 0.8, 0.5, 0.3, 0.2, 0.1 mL,分别置于 100 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度并摇匀,按上述色谱条件测定,以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,得回归方程  $Y = 97\ 561X + 10\ 409$  ( $r = 0.999\ 8$ ),线性范围 0.1 ~ 1.0 mg·L<sup>-1</sup>。

**2.4 脂质体包封率的测定** 采用透析法<sup>[19]</sup>测定。取水合后的脂质体 1 mL,加至预先处理好的透析袋内,透析袋截留相对分子质量 14 000,将透析袋浸入 100 mL 的 10% 乙醇中,室温置于恒温磁力搅拌器上搅拌,每 4 h 更换 1 次透析液,透析 12 h,将透析袋内的液体取出并置于 25 mL 量瓶中,加适量水润洗透析袋 2 ~ 3 次,将全部润洗液转移至量瓶中,加甲醇稀释至刻度,按 2.3 项下方法测定槲皮素含量,记为  $W_{包}$ 。另取水合后的脂质体 1 mL,加甲醇稀释到 25 mL,测定槲皮素含量,作为总药量  $W_{总}$ ,按  $(W_{包}/W_{总}) \times 100\%$  计算包封率。

## 2.5 单因素试验考察

**2.5.1 表面活性剂** 分别选择泊洛沙姆 188, tween-80, cremorphor EL35, cremorphor RH40 作为前体脂质体处方中的表面活性剂,取槲皮素 0.05 g,保持药脂比 1:20,表面活性剂用量 18%,制剂中槲皮素质量浓度 8 g·L<sup>-1</sup>,参照 2.1 项下方法制备槲皮素前体脂质体,测定脂质体的粒径和包封率。结果显示只有选用 cremorphor RH40 作为表面活性剂时,脂质体包封率 > 90%,且粒径最小,约 220 nm。

**2.5.2 药脂比** 选择药脂比分别为 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30,以 cremorphor RH40 为表面活性剂,取槲皮素 0.05 g,其他条件同 2.5.1 项。结果表明随着磷脂用量的增加,脂质体的包封率逐渐提高。但当药脂比达 1:20 后,包封率提高的并不明显;同时,脂质体的粒径随着磷脂用量的增加逐渐增大,当

药脂比为 1:30 时,粒径已 >300 nm。粒径是影响脂质体体内行为的重要因素,一般粒径越小,脂质体越稳定,体内吸收越好,且从体内清除的越慢,越有利于提高药物的生物利用度<sup>[20]</sup>。因此,药脂比应选在 1:20 ~ 1:25,在该范围内,脂质体粒径均在 220 ~ 240 nm,且包封率 >90%。

**2.5.3 表面活性剂用量** 分别按主药和磷脂总量的 10%, 12%, 15%, 18%, 20% 加入表面活性剂 cremophor RH40, 取槲皮素 0.05 g, 其他条件同

**2.5.1 项。**结果表明随着表面活性剂用量的增加,脂质体的粒径逐渐减小,包封率逐渐提高。当表面活性剂用量 ≥18% 时,脂质体粒径和包封率的变化趋于稳定,粒径约 220 nm,包封率 >90%。

**2.5.4 制剂中槲皮素质量浓度** 槲皮素前体脂质体以乙醇为溶剂,改变乙醇用量,使制剂中槲皮素质量浓度分别为 5, 7, 10, 12 g·L<sup>-1</sup>, 以 cremophor RH40 为表面活性剂,取槲皮素 0.05 g, 其他条件同 **2.5.1 项。**结果显示当槲皮素质量浓度为 12 g·L<sup>-1</sup> 时,脂质体的粒径较大,包封率较低。当药物质量浓度 ≤10 g·L<sup>-1</sup> 时,虽然随着药物浓度增高,脂质体的粒径逐渐增加,包封率有所下降,但包封率均 >90%, 粒径在 200 ~ 230 nm。

**2.6 正交试验** 在单因素试验基础上,选择药脂比、表面活性剂用量、制剂中槲皮素质量浓度为影响因素,以包封率为指标,按 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交表进行试验,确定槲皮素前体脂质体的最佳处方。每个处方取槲皮素 0.05 g, 共取 3 份, 试验安排及结果见表 1, 方差分析见表 2。

表 1 槲皮素前体脂质体处方正交试验分析

Table 1 Orthogonal test analysis for formulation of quercetin liquid proliposomes

No.	A 药脂比	B 表面活性剂 /%	C 槲皮素 /g·L <sup>-1</sup>	D 空白	包封率 /%
1	1:20	18	8	1	91.36
2	1:20	20	9	2	92.12
3	1:20	22	10	3	91.69
4	1:22	18	9	3	91.02
5	1:22	20	10	1	92.75
6	1:22	22	8	2	90.95
7	1:24	18	10	2	91.78
8	1:24	20	8	3	92.56
9	1:24	22	9	1	90.11

由直观分析可知,各因素对脂质体包封率的影响顺序为 B > C > A。方差分析表明因素 B 具有显著性影响,其他因素则无显著性影响,故选择最优处

表 2 包封率方差分析

Table 2 Variance analysis of encapsulation efficiency

方差来源	SS	F	P
A	0.088	0.473	>0.05
B	3.843	20.661	<0.05
C	1.474	7.925	>0.05
D(误差)	0.190		

注: F<sub>0.05</sub>(2, 2) = 19。

方 A<sub>1</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>, 即药脂比 1:20, 表面活性剂用量 20%, 制剂中槲皮素质量浓度 10 g·L<sup>-1</sup>。

**2.7 槲皮素前体脂质体的质量考察** 根据正交试验得到的最优处方,取槲皮素 0.05 g, 按 **2.1 项**下操作制备 5 批槲皮素前体脂质体进行质量考察。

**2.7.1 外观** 槲皮素前体脂质体溶液均为黄色澄清透明的乙醇溶液,遇水性介质后轻摇即可迅速分散成均一略带有蓝色乳光的脂质体混悬液。

**2.7.2 粒径、包封率及 Zeta 电位的测定** 按照 **2.2 和 2.4 项**下方法测定槲皮素前体脂质体水合后的粒径, Zeta 电位及包封率。结果显示脂质体的粒径分布窄且无杂质,表明前体脂质体在水合后粒径分布均匀。槲皮素前体脂质体水合后的粒径 (228.7 ± 2.61) nm, Zeta 电位 (-21.2 ± 1.47) mV, 包封率 (93.12 ± 1.18)%, 具有较好的重复性。

**2.8 槲皮素前体脂质体水合后稳定性考察** 取槲皮素前体脂质体 0.5 mL, 注入不同介质(水、人工胃液、人工肠液)中水合,混合均匀后置于 37 °C 水浴中,分别在 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 取出适量脂质体测定粒径,同时测定每个时间点下脂质体的包封率,通过粒径和包封率的变化来考察脂质体的稳定性,见表 3。结果表明脂质体在人工胃液和人工肠液中的粒径略大于在水中的粒径,但无论是在哪种水性介质中, 12

表 3 槲皮素前体脂质体水合后在水、人工胃液和人工肠液中 12 h 的粒径、包封率变化

Table 3 Encapsulation efficiency and particle size of quercetin liquid proliposomes in water, artificial gastric juice and artificial intestinal juice after 12 h

t/h	粒径/nm			包封率变化/%		
	水	人工胃液	人工肠液	水	人工胃液	人工肠液
0	226.5	229.4	232.1	100.00	100.00	100.00
2	227.1	229.9	231.9	99.14	99.02	99.28
4	227.9	230.6	232.5	98.76	98.53	98.47
6	228.5	231.1	232.9	98.14	98.09	97.99
8	229.2	231.8	233.2	97.88	97.73	97.62
12	230.1	232.6	234.3	96.75	96.52	96.41

注:包封率变化 = EE<sub>t</sub>/EE<sub>0</sub> × 100%, EE<sub>t</sub> 为 t 时刻的包封率, EE<sub>0</sub> 为 0 时刻的包封率。

h 内脂质体的粒径变化并不显著。在所有介质中, 12 h 内包封率变化均 < 4%。表明槲皮素前体脂质体在 12 h 内具有良好的稳定性, 适合口服给药。

### 3 讨论

采用透析法测定脂质体的包封率, 关键在于选择合适的透析介质。本文选用 10% 乙醇作为透析介质, 可以增加难溶性药物槲皮素的溶解度, 有利于游离药物的溶出, 加快脂质体与游离药物的分离。对包封在脂质体中药物的测定, 一般需要加入适量的破乳剂破坏脂质体结构。经考察, 本文选用甲醇作为破乳剂, 甲醇能将脂质体溶解为澄清透明溶液, 并且甲醇的加入不会影响槲皮素的紫外吸收。

一般而言, 脂质体主要由磷脂和胆固醇组成, 但在前期实验中发现, 在液体型前体脂质体处方中加入胆固醇, 水合后脂质体稳定性差且粒径较大。因此, 在槲皮素液体型前体脂质体中添加适量表面活性剂作为修饰剂。表面活性剂具有增溶、乳化和消泡等作用, 亲水亲油平衡值 (HLB) 在 12 ~ 18 的表面活性剂增溶能力最强<sup>[21]</sup>。Cremophor RH40 的 HLB 在 14 ~ 16, 在槲皮素前体脂质体转化成脂质体时有利于增加磷脂和药物在水中的溶解度, 提高脂质体的包封率。另外, 脂质体的形成过程实际是具有两性性质的磷脂在水中自发聚集成具有封闭双层结构囊泡的过程, 也是一个降低界面自由能形成热力学稳定体系的过程。cremophor RH40 临界胶束浓度较低为  $0.039 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 故具有更强的表面活性, 也更有利于热力学稳定体系的形成。表面活性剂与磷脂混合后, 亲水基溶解在水中, 疏水基嵌合在磷脂分子之间, 诱导磷脂自发进行有序排列形成脂质囊泡, 并使脂质体形态稳定。虽然磷脂为脂质体膜材的主要组成成分, 但实验中发现磷脂用量过多会使脂质体粒径增加, 影响脂质体的稳定性和体内吸收。这可能是因为增加磷脂用量会使前体脂质体溶液的黏度增加, 从而使前体脂质体水合时不易水合分散。槲皮素前体脂质体水合后 12 h 内有较好的稳定性, 可能是因为水合后脂质体粒子的 Zeta 电位在 -21 mV 左右, 粒子间存在较大的静电排斥力, 不易聚集有利于维持脂质体的稳定<sup>[22]</sup>。

#### 【参考文献】

[1] 骆明旭, 罗丹, 赵万红. 槲皮素药理作用研究进展 [J]. 中国民族民间医药, 2014(17): 12-14.  
[2] 王艳芳, 王新华, 朱宇同. 槲皮素药理作用研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2003, 15(2): 171-173.  
[3] 宋玉乔, 姚凌云, 曹蔚, 等. 槲皮素的药理作用研究近况 [J]. 西北药学杂志, 2002, 17(1): 40-42.

[4] 刘芸, 赵鹏, 张丽华. 槲皮素亚微乳的制备及特性表征研究 [J]. 中成药, 2014, 36(5): 1077-1080.  
[5] 韩珂, 谢志红, 叶丽卡. 在体单向肠灌注模型研究槲皮素的大鼠肠吸收特性 [J]. 今日药学, 2014, 24(3): 149-177.  
[6] 朱红岗, 凌明. 大鼠体内槲皮素的血药浓度测定及其药代动力学研究 [J]. 中国药业, 2013, 22(2): 14-15.  
[7] 李发鹏, 王刚, 蒋芙蓉, 等. 槲皮素及其纳米脂质体在 Caco-2 细胞的吸收特性研究 [J]. 安徽医药, 2011, 15(10): 1206-1208.  
[8] 龚双梅, 赵良容, 张荣荣, 等. 磷脂脂质体对三种天然黄酮化合物稳定作用 [J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(12): 1791-1796.  
[9] 丁燕飞, 姚瑶, 陶昱斐, 等. 槲皮素纳米脂质体的处方工艺优化 [J]. 中草药, 2008, 39(4): 522-524.  
[10] 陈浩, 戴俊东, 王玉蓉, 等. 薄膜超声法制备槲皮素脂质体研究 [J]. 药学实践杂志, 2012, 30(1): 32-34.  
[11] 于莲, 杨金儒, 刘洋, 等. 槲皮素纳米结构脂质载体的制备及理化性质研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(8): 1151-1155.  
[12] 夏书芹, 范明辉, 许时婴, 等. 红景天前体脂质体的制备与性质研究 [J]. 食品科学, 2009, 30(16): 35-40.  
[13] 郑稳生, 王璐璐, 张宇佳, 等. 多柔比星前体脂质体制备工艺筛选及质量考察 [J]. 中国药师, 2012, 15(8): 1130-1134.  
[14] 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]. Inter J Pharm, 2006, 319(1/2): 162-168.  
[15] 王刚, 余学英, 常明泉, 等. 槲皮素纳米脂质体冻干粉针的制备及其质量评价 [J]. 中国药师, 2012, 15(8): 1079-1083.  
[16] Wang J P, Maitani Y, Takayama K, et al. Pharmacokinetics and antitumor effect of doxorubicin carried by stealth and remote loading proliposome [J]. Pharm Res, 2000, 17(7): 782-787.  
[17] 王梅, 高晓黎. 新型前体脂质体载药及影响因素考察 [J]. 药学报, 2006, 41(12): 1204-1207.  
[18] 王兴慧, 李俊生, 吕佳佳, 等. 盐酸小檗碱脂质体的制备工艺优选及体外释放性质考察 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(18): 39-42.  
[19] 杨世艳, 何兵, 冯文字. HPLC 测定复方维 A 酸脂质体中萹酮的含量和包封率 [J]. 重庆医科大学学报, 2011, 36(8): 956-958.  
[20] 孙维彤, 邹伟伟. 脂质体粒径对促进托氟啶口服吸收的影响 [J]. 山东大学学报: 医学版, 2007, 45(6): 639-642.  
[21] 周雅文, 刘静伟, 赵莉, 等. 表面活性剂的性能与应用 (IX) — 表面活性剂的增溶作用及其应用 [J]. 日用化学工业, 2014, 44(9): 486-489, 493.  
[22] 马涛. 全合一混合液 (All In One Admixture) 的稳定性 [J]. 中国药房, 2000, 11(2): 88-90.

[责任编辑 刘德文]