

槲皮素-PLGA 嵌段共聚物纳米粒冻干粉的制备及体外释放性能考察

闫鑫, 吕邵娃, 郭玉岩, 郭雪莹, 王瑛琦, 解鹏宇, 李永吉*, 孙爽*
(黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040)

[摘要] 目的:制备槲皮素-(聚乳酸-羟基乙酸共聚物)嵌段共聚物(QC-PLGA)纳米粒冻干粉并考察其体外释放规律。方法:采用乳化溶剂挥发法制备QC-PLGA纳米粒,通过正交试验确定最优处方工艺,通过单因素试验筛选冻干保护剂,通过动态透析技术考察QC-PLGA纳米粒冻干粉的体外释药规律。结果:最佳制备工艺为0.2%聚乙烯醇,PLGA质量浓度 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,油/水相体积比1:35,槲皮素用量5 mg,冻干保护剂为2%乳糖。QC-PLGA纳米粒冻干粉的外表光滑,形态无皱缩塌陷、结构致密且加入注射用水振摇后再分散性良好,体外释放规律基本符合Weibull方程的释药模型,释药动力学方程 $\ln[\ln(1/1-Q)] = 0.399\ln t - 1.503 (R^2 = 0.973)$ 。结论:QC-PLGA纳米粒冻干粉制备工艺简单可行、性质稳定、易储存,相比槲皮素原料药具有明显的缓释作用。

[关键词] 槲皮素; 纳米粒; 冷冻干燥法; 体外释放度; 聚乳酸-羟基乙酸共聚物

[中图分类号] R283.6;R945;R284.1;R944.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)14-0010-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016140010

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160523.1024.018.html>

[网络出版时间] 2016-05-23 10:24

Preparation of Quercetin-PLGA Nanoparticles Freeze-dried Powder and Investigation of Its *in Vitro* Release

YAN Xin, LYU Shao-wa, GUO Yu-yan, GUO Xue-ying,
WANG Ying-qi, XIE Peng-yu, LI Yong-ji*, SUN Shuang*

(Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare quercetin-poly (lactic-co-glycolic acid) block copolymer (QC-PLGA) nanoparticles freeze-dried powder and investigate its *in vitro* release rule. **Method:** QC-PLGA nanoparticles were prepared through emulsion solvent evaporation method, optimal formulation process was defined by means of orthogonal test. QC-PLGA nanoparticles mixed with the protective agent were freeze-dried, which was explored *in vitro* release rule through dynamic dialysis technology. **Result:** Optimum preparation parameters were as follows: polyvinyl alcohol (PVA) of 0.2%, PLGA of $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, proportion of oil and water phase of 1:35, QC amount of 5 mg, 2% lactose as freeze-drying protective agent. Surface of QC-PLGA freeze-dried powder was smooth without shrinking subsidence, which had dense structure. After the injection water was added to sway, redispersibility was good. The rule of *in vitro* release was in line with Weibull equation model, which was fitted the drug release kinetics equation of $\ln[\ln(1/1-Q)] = 0.399\ln t - 1.503 (R^2 = 0.973)$. **Conclusion:** The preparation technology of QC-PLGA nanoparticle freeze-dried powder is simple and feasible, which is easy to store

[收稿日期] 20150903(004)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82174091);黑龙江省自然科学基金面上项目(H2016060);黑龙江中医药大学科研基金项目(201102)

[第一作者] 闫鑫,硕士,从事中药新剂型的研究,Tel:13329410816,E-mail:849042780@qq.com

[通讯作者] *李永吉,博士,教授,从事中药新剂型的研究,E-mail:liyongji2009@163.com;

*孙爽,博士,讲师,从事中药新剂型研究,E-mail:309642421@qq.com

with stable properties. Compared with quercetin, QC-PLGA nanoparticle freeze-dried powder has an obvious sustained release effect.

[Key words] quercetin; nanoparticles; freeze-drying method; *in vitro* release; poly (lactic-co-glycolic acid)

槲皮素是一种天然黄酮素,存在于许多植物的花、叶、果实中,多以苷的形式广泛存在,经水解后得到槲皮素。槲皮素具有抗肿瘤、抗过敏、抗炎等药理作用,其作为能够逆转肿瘤细胞多药耐药性的药物,具有干扰肿瘤细胞信号转导通路、抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡等作用^[1]。于夏等^[2]通过动物实验发现小鼠按 15 g·kg⁻¹口服槲皮素 1 次,观察 7 d 无一死亡,表明其具有天然药物毒性小的特点。此外,陶晓薇等^[3]发现槲皮素具有潜在的抗脑肿瘤效应,为脑肿瘤的药物治疗提供了新的途径和理论依据。然而,由于槲皮素难溶于水、化学稳定性差等原因,限制了其在抗肿瘤研究领域的推广和应用。有研究证实槲皮素纳米脂质体延长了槲皮素在大鼠体内的循环时间,且具有一定的缓释特性^[4-5]。此外,王刚^[6]制备的槲皮素纳米脂质体能显著延长槲皮素在血浆中的循环时间,表明其具有长循环特征。因此寻找适合槲皮素的剂型对于其用于医疗事业具有重要意义。

采用嵌段共聚物纳米制剂技术制备的纳米粒具有难溶性抗肿瘤药物有效增溶、提高生物利用度、降低不良反应等优点^[7],其胶束具有高度的热力学及动力学稳定性,Barreiro-Iglesias 等^[8]研究了载喜树碱(CPT)的普流罗尼克-聚丙烯酸共聚物(pluronic-PAA)胶束的稳定性,结果载 CPT 的 pluronic-PAA 胶束在人血清中比未受保护的 CPT 要稳定 10 倍,使得其在血液中存在的时间显著延长。随着科学技术的进步,这项技术已被广泛应用于药物新剂型的研制中并取得良好的效果。本实验拟通过优化槲皮素-(聚乳酸-羟基乙酸共聚物)(QC-PLGA)嵌段共聚物纳米粒的工艺条件,制备成 QC-PLGA 纳米粒冻干粉,并探讨其体外释放规律,为槲皮素的临床推广提供参考。

1 材料

VCX750 型超声波细胞破碎仪(美国 Sonics 公司),Zetasizer Nano-ZS90 型激光粒度分析仪(英国马尔文仪器有限公司),2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),GLZY-0.5B 型冷冻干燥机(上海浦东冷冻干燥设备有限公司),DT-100 型电子天平(上海医用科学激光仪器厂),XL-90 型超速低温离心机

(美国 Beckman 公司)。

槲皮素对照品和原料药(中国食品药品检定研究院,批号分别为 120104-200701,XC110510,纯度分别为 ≥98%,98.07%),聚乳酸-羟基乙酸共聚物[PLGA,上海协泰化工有限公司,聚乳酸(PLA)-聚羟基乙酸(PGA)(75:25),相对分子质量 20 kDa];聚乙烯醇(PVA),乳糖和蔗糖(天津市星月化工有限公司);透析袋(美国 Sigma 公司,相对分子质量 8~14.4 kDa),甲醇、乙酸为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 槲皮素-PLGA 纳米粒处方工艺优选

2.1.1 正交试验设计 通过预试验和单因素试验筛选主要影响因素为聚乙烯醇质量分数,PLGA 质量浓度,油-水相体积比及槲皮素用量,每个因素选取 3 个水平,以包封率为评价指标,利用正交试验优化槲皮素-PLGA 纳米粒的处方工艺,试验安排及结果见表 1。由直观分析可知,各因素对处方工艺的影响顺序为 A > B > D > C,确定最佳处方组合为 A₂B₂C₃D₃。

表 1 槲皮素-PLGA 纳米粒处方工艺正交试验分析(n=3)

Table 1 Orthogonal test analysis of formulation process of quercetin-PLGA nanoparticles(n=3)

No.	A PVA /%	B PLGA /g·L ⁻¹	C 油-水相 体积比	D 槲皮素用量 /mg	包封率 /%
1	0.1	5	1:15	1	31.05
2	0.1	10	1:25	3	72.49
3	0.1	20	1:35	5	68.33
4	0.2	5	1:25	5	58.84
5	0.2	10	1:35	1	75.47
6	0.2	20	1:15	3	40.96
7	0.3	5	1:35	3	11.39
8	0.3	10	1:15	5	40.26
9	0.3	20	1:25	1	15.23

2.1.2 制备工艺^[9] 称取槲皮素 5.05 mg 和 PLGA 20.04 mg 共同溶于 2.0 mL 丙酮中作为有机相,于 4℃避光处放置;精密称取 PVA 0.14 g 溶于 70.0 mL 水中,于 85℃,500 r·min⁻¹磁力搅拌 1 h,待 PVA 完

全溶解后,冷却至室温,作为水相。使用 5 mL 注射器将有机相吸取完全,缓慢滴入在磁力搅拌下的水相中,待完全滴入后,超声混合 1 min,重复 3 次,将超声好的混合液于 45 °C 旋转蒸发 15 min,除去丙酮,得槲皮素-PLGA 纳米粒溶液。

2.1.3 验证试验 按最佳处方工艺制备 3 批槲皮素-PLGA 纳米粒溶液,结果粒径分别为 141.7, 152.2, 137.6 nm,包封率分别为 77.49%, 74.36%, 81.22%。说明制备的槲皮素-PLGA 纳米粒具有包封率高、粒径较小、重复性良好等特点。

2.2 槲皮素-PLGA 纳米粒冻干粉的制备

2.2.1 冷冻干燥工艺 将槲皮素-PLGA 纳米粒溶液置于西林瓶中,于 -70 °C 冷冻干燥箱内预冻 12 h。开启真空泵,待冷冻干燥箱内的真空度降低而转入加热升华干燥后,缓慢升温,保持。持续 1 h 后,完成解析干燥。

2.2.2 冷冻干燥保护剂的筛选^[10] 冻干保护剂选择乳糖和蔗糖,取不同质量分数的冻干保护剂进行冷冻干燥。将冻干品添加水复溶,以纳米粒的粒径和包封率变化率为评价指标,筛选冻干保护剂,见表 2。以各组 6 个平行样本的粒径平均值为该冻干保护剂条件下的标准粒径,各样本实际粒径和标准粒径的差值与标准粒径作比后所取的平均值即为粒径变化率;包封率变化率与粒径变化率计算方法相同。结果表明当冻干保护剂的质量分数增大时,粒径逐渐增大,可能与冻干保护剂在干燥过程中发生了变化有关,最终选用 2% 乳糖为冻干保护剂。

表 2 不同冻干保护剂对槲皮素-PLGA 纳米粒冻干粉粒径和包封率变化率的影响 (n=6)

Table 2 Effect of different freeze-drying protective agent on particle size and encapsulation efficiency of quercetin-PLGA nanoparticles freeze-dried powder (n=6)

冻干保护剂	质量分数 /%	粒径 /nm	粒径变化率 /%	包封率 /%	包封率变化率 /%
乳糖	2	157.7	0.25	78.23	3.68
	3	175.6	11.07	65.24	19.67
	5	200.8	88.67	57.82	23.28
	7	398.9	182.68	32.75	29.44
蔗糖	2	207.5	31.25	67.75	16.58
	3	203.6	28.78	54.63	23.89
	5	425.5	208.4	22.48	31.21
	7	析出	-	-	-

2.2.3 稳定性考察 将以 2% 乳糖为冻干保护剂制得的冻干粉置于 4 °C 保存,分别于 1,3,6 个月取

样,外观观察仍均匀白色、外表光滑、体积等无明显变化。加入注射用水振摇后,可分散为乳白色溶液,再分散性良好。样品在 4 °C 保存 6 个月后,其包封率和粒径均无明显变化,表明该冻干粉稳定性良好。

2.3 槲皮素-PLGA 纳米粒冻干粉的体外释放性能研究 将透析袋预处理后,于 4 °C 保存备用。取槲皮素-PLGA 纳米粒冻干粉样品适量(含主药 2.05 mg),精密加入注射用水 4.0 mL,分散后加入透析袋中,透析袋两端扎紧,混悬在盛有释放介质 86.0 mL (pH 7.4 磷酸盐缓冲液)的棕色瓶中,置恒温水浴振荡器 37 °C 水浴中恒速(100 r·min⁻¹)振摇。释放开始后,分别于 0.25,0.50,1,2,4,6,8,12,24,36,48 h 吸取释放外液 1.0 mL(及时补充等温等量释放介质),取续滤液进样测定,计算药物的累积释放率(Q)。精密吸取一定量槲皮素溶液,置透析袋内,同法进行试验,取样时间依次为 5,10,20,30,45,60,90,120 min。以 Q 对时间 t 作图,绘制释放曲线,见图 1。

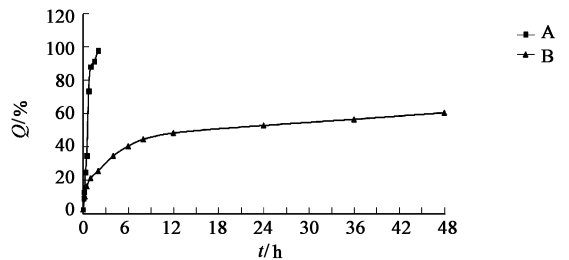


图 1 槲皮素(A)与槲皮素-PLGA 纳米粒冻干粉(B)的体外释放曲线

Fig.1 In vitro release curves of quercetin (A) and quercetin-PLGA nanoparticles freeze-dried powder (B)

结果表明槲皮素原料药在 2 h 时基本释放完全,而槲皮素-PLGA 纳米粒冻干粉在释放前期速度较快,后期变慢,与槲皮素原料药相比具有明显的缓释作用。采用一级动力学方程, Higuchi 方程, Niebergull 平方根定律, Hixcon-crowell 立方根定律, Ritger-peppas 方程和 Weibull 方程对槲皮素-PLGA 纳米粒冻干粉和槲皮素原料药各时间点的 Q 进行拟合,得回归方程^[11]。拟优合度以 R² 和最小信息准则(Akaike information criterion, AIC)进行综合判断,见表 3。结果显示除 Niebergull 方程外,其他各拟合方程的 R² 均大于自由度 9, α = 0.01 时的相关系数临界值 0.735,表明这些方程均显著相关(P < 0.01),均可用来描述槲皮素-PLGA 纳米粒冻干粉的体外释药规律,其中 Weibull 模型的拟合效果最好。

表 3 槲皮素-PLGA 纳米粒冻干粉的体外释药拟合方程

Table 3 *In vitro* drug release fitting equation of quercetin-PLGA nanoparticles freeze-dried powder

模型	回归方程	R ²	AIC
一级动力学方程	$\ln(1 - Q) = -0.015t - 0.302$	0.768	-42.67
Higuchi 方程	$Q = 0.074t^{1/2} + 0.154$	0.872	-59.57
Niebergull 平方根定律	$(1 - Q)^{1/2} = -0.006t + 0.862$	0.719	-31.32
Hixcon-crowell 立方根定律	$(1 - Q)^{1/3} = -0.004t + 0.903$	0.736	-69.33
Ritger-peppas 方程	$\ln Q = 0.327 \ln t - 1.626$	0.953	-43.85
Weibull 方程	$\ln[\ln(1/(1 - Q))] = 0.399 \ln t - 1.503$	0.973	-45.70

3 讨论

近年在肿瘤治疗方面,纳米粒递药系统已经表现出相对于传统化疗药物更大的优势。而 PLGA 是由 2 种单体——乳酸和羟基乙酸随机聚合而成,是一种可降解的功能高分子有机化合物,由于其自身具有的生物降解性及良好的生物相容性,成为众多材料中制备纳米粒的首选。在美国,PLGA 已通过 FDA 认证,被正式作为药用辅料收录进了《美国药典》。有学者研究表明 PLGA 在体内吸收过程中,具有的亲水性和纳米级粒径能够有效减少其与免疫球蛋白作用,加上其亲水性外壳的设计和优化使其在体内易形成长循环系统,可有效避免单核吞噬系统对纳米粒的吞噬,既解决了槲皮素不溶于水的难题,提高了溶解度,又增加了药物的作用时间,起到了缓释作用^[12-13]。

采用乳化溶剂挥发法制备槲皮素-PLGA 纳米粒时,由于槲皮素特殊的理化性质,油相和水相的比例对制备工艺影响较大。同时,考虑到槲皮素脂溶性较好,故采用水包油(O/W)型乳化制备方法,大大增加了槲皮素的包封率。冻干过程当中,为了保证纳米粒的粒径在冻干前后尽量保持一致,对不同种类和不同质量分数的冻干保护剂进行了筛选,最终确定了适宜的冻干工艺,为保障药物在运输、使用、储存过程中的稳定性提供了新思路。本研究对槲皮素这一临床上生物利用度较低的药物进行剂型开发,希望能够推动槲皮素在临床上的使用率,使其在抗肿瘤方面能够不因溶解度低等缺点而受到限制。为今后深入研究槲皮素的抗肿瘤机制提供理论依据。

[参考文献]

[1] 翟闪闪,杨成君,王芳,等. 槲皮素逆转肿瘤多药耐药作用研究进展[J]. 中国老年学杂志,2012,32(13): 2906-2908.

[2] 于夏,唐滋贵. 槲皮素的研究进展[J]. 河南职工医学院学报,2011,23(3):391-392.

[3] 陶晓薇,毛其芬. 槲皮素对人胶质母细胞瘤 T98G 凋亡及 HSP27 蛋白表达的干预作用[J]. 浙江中西医结合杂志,2015,25(5):436-438,442.

[4] 张洋. 纳米脂质体槲皮素对肝损伤大鼠保肝作用的研究[D]. 长沙:中南大学,2012.

[5] 阮婧华,杨付梅,张金洁,等. 槲皮素纳米结构脂质载体增加口服吸收机制研究[J]. 中国药学杂志,2013,48(5):368-373.

[6] 王刚. 槲皮素纳米脂质体的脑靶向性及其抗 C6 脑胶质瘤作用与机制研究[D]. 成都:成都中医药大学,2012.

[7] 林宏英,吴建梅,赵李宏,等. 难溶性抗肿瘤药物载体-嵌段共聚物胶束[J]. 中草药,2006,37(4):481-485.

[8] Barreiro-Iglesias R, Bromberg L, Temchenko M, et al. Solubilization and stabilization of camptothecin in micellar solutions of pluronic-g-poly (acrylic acid) copolymers [J]. J Control Release, 2004, 97 (3): 537-549.

[9] 解鹏宇,孙爽,吕邵娃,等. 槲皮素-PLGA 嵌段共聚物纳米粒的制备及释放机制研究[J]. 中医药信息, 2013,30(5):62-66.

[10] Chandrawati R, Städler B, Postma A, et al. Cholesterol-mediated anchoring of enzyme-loaded liposomes within disulfide-stabilized polymer carrier capsules [J]. Biomaterials, 2009,30(30):5988-5998.

[11] 黄义,李媛,李新中,等. 齐墩果酸纳米囊体外释放研究[J]. 中药材,2008,31(2):283-285.

[12] 孙爽,吕邵娃,李艳秋,等. 槲皮素 PLGA 嵌段共聚物纳米粒冻干粉针剂在大鼠体内的药动学分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(4):84-88.

[13] Li J, Wang B C, Wang Y Z, et al. Preparation and characterization of thermosensitive nanoparticles for targeted drug delivery [J]. J Macromol Sci, 2008, 10 (45):833-838.

[责任编辑 刘德文]