

芒柄花素包合物脂质体的制备及质量评价[△]

廖灿城^{1*}, 郭波红^{1#}, 许丹翹¹, 吴秀君², 易军¹, 黄泽贤¹ (1. 广东药科大学药学院, 广州 510006; 2. 广东省妇幼保健院药学部, 广州 510010)

中图分类号 R943 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)03-0303-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.03.04

摘要 目的: 制备芒柄花素(FMN)包合物脂质体, 并评价其质量。方法: 以薄膜分散法制备FMN包合物脂质体, 考察所制脂质体的外观形态、粒径、Zeta电位、包封率以及体外释放行为。结果: 所制FMN包合物脂质体的粒径为(255.34 ± 12.87) nm, Zeta电位为(25.32 ± 3.51) mV、包封率为(81.63 ± 0.79)% (n=3)、24 h的累积释放度为56.12%。结论: 本方法成功制得具有良好缓释效果的FMN包合物脂质体, 且质量符合相关标准。

关键词 芒柄花素; 包合物; 脂质体; 质量评价

Preparation and Quality Evaluation of Formononetin Inclusion Compound Liposome

LIAO Cancheng¹, GUO Bohong¹, XU Danqiao¹, WU Xiujun², YI Jun¹, HUANG Zexian¹ (1. School of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 2. Dept. of Pharmacy, Guangdong Health Center for Women and Children, Guangzhou 510010, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To prepare Formononetin (FMN) inclusion compound liposome and evaluate its quality. METHODS: FMN inclusion compound liposome was prepared by film dispersion method. The morphology, particle size, Zeta potential, encapsulation efficiency and *in vitro* release properties were studied. RESULTS: The particle size, Zeta potential and encapsulation efficiency of prepared FMN inclusion compound liposome were (255.34 ± 12.87) nm, (25.32 ± 3.51) mV, (81.63 ± 0.79)%, respectively (n=3). The 24 h accumulative release rate of prepared FMN inclusion compound liposome was 56.12%. CONCLUSIONS: FMN inclusion compound liposome with good sustained-release effect is prepared successfully and in line with related quality standard.

KEYWORDS Formononetin; Inclusion compound; Liposome; Quality evaluation

1994年, McCormack B等^[1]首次提出环糊精可应用于脂质体中。近年来, 环糊精已广泛应用于脂质体、纳米粒等给药体系中, 上述给药体系均可提高难溶性药物的溶解度, 改善药物生物利用度, 同时增加药物的稳定性

以及减轻药物的刺激性^[2-3]。

芒柄花素(7-羟基-4'-甲氧基异黄酮, FMN)是一种异黄酮类化合物, 具有较好的抗肿瘤作用, 目前该药已被应用于乳腺癌、前列腺癌、结肠癌、肺癌等治疗, 还被

大鼠肾组织胰岛素样生长因子-1表达及肾小管上皮细胞转分化的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2015, 25(26): 22-26.

[13] LIU X, HUANG Z, ZOU X, et al. Possible mechanism of PNS protection against cisplatin-induced nephrotoxicity in rat models[J]. *Toxicol Mech Methods*, 2015, 25(5): 347-354.

[14] 周金玲, 杨玉芳, 黄振光, 等. 三七总皂苷通过HIF-1 α /BNIP3途径增强线粒体自噬保护大鼠顺铂肾损害[J]. 中国药学杂志, 2017, 52(3): 196-200.

[15] 孙辽, 余学清, 祝胜郎, 等. AGEs对肾小管上皮细胞转分化、I型胶原合成及smad信号通路的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2006, 22(12): 2429-2433.

[16] 陈涵枝, 刘殿阁, 丁弘, 等. Ets-1在大鼠顺铂相关性肾病基质重塑中的作用[J]. 现代医学, 2008, 36(5): 301-305.

[17] YUASA T, YANO R, IZAWA T, et al. Calponin expression in renal tubulointerstitial fibrosis induced in rats by cisplatin[J]. *J Toxicol Pathol*, 2014, 27(1): 97-103.

[18] ZHOU X, ZHANG J, XU C, et al. Curcumin ameliorates renal fibrosis by inhibiting local fibroblast proliferation and extracellular matrix deposition[J]. *J Pharmacol Sci*, 2014, 126(4): 344-350.

△ 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81403111)

* 硕士研究生。研究方向: 药物新型给药系统。电话: 020-39352117。E-mail: 347331778@qq.com

通信作者: 副教授, 博士。研究方向: 药物新剂型。电话: 020-39352117。E-mail: guobohong@gdpu.edu.cn

(收稿日期: 2017-09-08 修回日期: 2017-12-15)

(编辑: 邹丽娟)

用于治疗骨质疏松、改善妇女更年期症状等^[4-9]。但该化合物在水中几乎不溶,口服生物利用度低,极大限制了其临床应用。

包合物脂质体给药系统是结合了环糊精作为包合材料的优点和脂质体作为优良载体的缓释靶向优点的一种给药系统^[10],其中环糊精能将水不溶性分子作为客分子包入其疏水性空腔形成水溶性包合物,但是当药物包合物进入血液后迅速解离,所以包合物并不能控制药物的体内行为;而用脂质体包封药物包合物后可达到靶向和缓释的效果,可以用来控制药物在体内的清除速率及改变其组织分布等。本研究将环糊精包合物包封至脂质体载药系统中,旨在制备一种给药系统以提高脂质体包封率及其稳定性,以达到改善FMN药动学行为的目的。

1 材料

1.1 仪器

1200 高效液相色谱(HPLC)仪(美国 Agilent 科技有限公司);BS110S 电子天平(德国 Sartorius 有限公司);UV-1700 紫外-可见分光光度计(日本岛津公司);DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限责任公司);Delsa™ Nano C 粒径及 Zeta 电位分析仪(美国 Beckman Coulter 公司);Hitachi H-7650 透射电镜(日本 Hitachi 公司);透析袋(广州齐云生物技术有限公司,截留分子量:8 000~14 000 Da)。

1.2 药品与试剂

FMN 对照品(中国食品药品检定研究院,批号:111703-201504,纯度:99.50%);FMN 原料药(成都瑞芬思生物科技有限公司,批号:C-018-150728,纯度: $\geq 98\%$);FMN 包合物[广东药科大学药学院实验室自制,批号:160905,FMN 载药量:(9.42 ± 0.25)%^[11]];蛋黄卵磷脂、胆固醇(上海艾韦特医药科技有限公司);泊洛沙姆 188(P188,安徽山河药用辅料股份有限公司,批号:160310);葡聚糖凝胶(Sephadex G-50,瑞典 Pharmacia 公司);甲醇为色谱纯,其余试剂为市售分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 FMN 的含量测定方法

2.1.1 色谱条件 色谱柱:Dikma Diamonsil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-0.1%磷酸水溶液(70:30, V/V);流速:1 mL/min;检测波长:249 nm;柱温:30 ℃;进样量:20 μL。

2.1.2 溶液的制备 (1)对照品溶液。精密称取适量 FMN 对照品,加甲醇溶解,制成质量浓度为 30 μg/mL 的对照品贮备液。精密量取对照品贮备液 2.0 mL,置于 10 mL 棕色量瓶中,用流动相稀释定容制成质量浓度为 6 μg/mL 的溶液,作为对照品溶液。(2)供试品溶液。取“2.2.1”项下 FMN 包合物脂质体混悬液 0.5 mL,置于 10 mL 量瓶中,加入适量甲醇破乳后,加流动相定容至刻

度,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,得供试品溶液。(3)阴性对照溶液。取不含 FMA 的空白包合物脂质体混悬液 0.5 mL,按“(2)”项下方法制成阴性对照溶液。

2.1.3 专属性考察 取供试品溶液、对照品溶液、阴性对照溶液,按“2.1.1”项下色谱条件进样分析,记录色谱。结果,在该色谱条件下,芒柄花素的出峰时间约为 7.13 min,辅料和试剂对 FMN 的测定无干扰。色谱图见图 1。

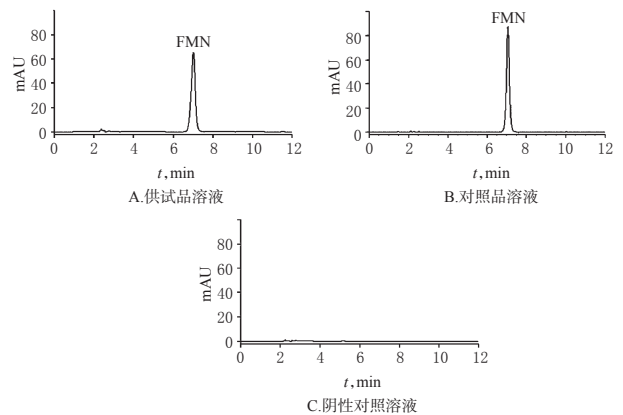


图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.1.4 线性关系考察 精密制备质量浓度分别为 0.75、1.5、3、6、12、24 μg/mL 的 FMN 对照品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以峰面积为纵坐标(y)、质量浓度为横坐标(x)进行线性回归。得回归方程为 $y=130.7x+16.272$ ($r=0.9999$),结果表明,FMN 在 0.75~24 μg/mL 质量浓度范围内与峰面积呈良好的线性关系。

2.1.5 精密度试验 取质量浓度为 6 μg/mL 的 FMN 对照品溶液,按照“2.1.1”项下色谱条件,连续进样测定 6 次考察日内精密度;每天进样测定 1 次,连续测定 4 d 考察日间精密度。结果显示,日内 RSD 为 0.28% ($n=6$),日间 RSD 为 0.12% ($n=4$)。

2.1.6 准确度试验 精密量取 FMN 脂质体供试品溶液 0.5 mL,分别按已知 0.5 mL 供试品中 FMN 含量的 0.8、1.0、1.2 倍加入适量的 FMN 对照品溶液,共 9 份,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,计算加样回收率。结果,平均加样回收率为 99.84% (RSD=0.36%, $n=9$)。

2.1.7 稳定性试验 取同一供试品溶液,在 0、4、8、12、24、36、48、72 h,分别按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果显示,峰面积的 RSD 为 0.87% ($n=8$),表明供试品溶液在 72 h 内稳定。

2.2 脂质体的制备

2.2.1 FMN 包合物脂质体 采用薄膜分散法^[12]制备 FMN 包合物脂质体。按质量比为 10:1 精密称取磷脂与胆固醇,溶于三氯甲烷,转移至 250 mL 茄形瓶中,45 ℃ 恒温水浴中减压旋转蒸发,形成均匀类脂薄膜,50 ℃ 真

空干燥过夜;另将0.025 4 g FMN包合物溶于10 mL pH 7.4磷酸盐缓冲液(PBS)中作为水化介质,加至茄形瓶中,再加入0.009 3 g P188,振摇,50 ℃恒温水浴中水化40 min,水浴超声(功率:200 W,超声时间:3 s,间歇时间:3 s,下同)将类脂膜完全洗脱,即得FMN脂质体混悬液;再探头超声4 min,依次过0.45、0.22 μm滤膜整粒,即得FMN包合物脂质体,4 ℃保存。

2.2.2 FMN普通脂质体 取适量FMN原料药,按“2.2.1”项下“按质量比为10:1精密称取磷脂与胆固醇”起开始操作,水化介质为10 mL pH 7.4的PBS,制备FMN普通脂质体。

2.3 包封率的测定

精密量取0.5 mL脂质体置于Sephadex G-50凝胶柱顶端,用pH 7.4 PBS洗脱,收集游离包合物组分,水浴蒸干,再用适量甲醇溶解,测定FMN的浓度并计算游离部分的药量(m_{free});再取0.5 mL脂质体,加入适量甲醇充分振摇破乳,用流动相定容,测定FMN的浓度并计算总药量(m_{total}),根据下列公式计算包封率,包封率(%) = $(m_{\text{total}} - m_{\text{free}}) / m_{\text{total}} \times 100\%$ 。按上述方法分别测定FMN普通脂质体与FMN包合物脂质体的包封率,平行测定3次,结果显示,FMN普通脂质体的包封率为 $(5.38 \pm 1.46)\%$ ($n=3$),FMN包合物脂质体的包封率为 $(81.63 \pm 0.79)\%$ ($n=3$)。由此可见,FMN包合物脂质体可以显著提高难以包入脂质体的药物FMN的包封率。

2.4 脂质体形态观察

取适量FMN包合物脂质体用pH 7.4的PBS稀释后,点样于铜网上,负染后用透射电镜观察形态并拍照。结果显示,FMN包合物脂质体轮廓清晰,大体呈圆形或椭圆形,FMN包合物脂质体的透射电镜图见图2。

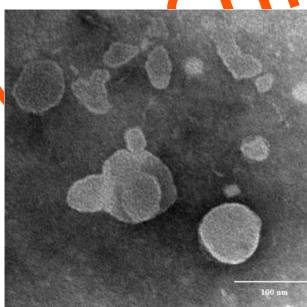


图2 FMN包合物脂质体的透射电镜图($\times 40\ 000$)

Fig 2 TEM of FMN inclusion compound liposome ($\times 40\ 000$)

2.5 粒径与Zeta电位的测定

取FMN包合物脂质体溶液适量,稀释若干倍后,用粒径及Zeta电位分析仪检测其粒径、多分散指数(PDI)和Zeta电位。结果显示,FMN包合物脂质体的粒径为 (255.34 ± 12.87) nm、PDI为 0.29 ± 0.03 、Zeta电位为 (25.32 ± 3.51) mV($n=3$),FMN包合物脂质体的粒径和Zeta电位分布图见图3。

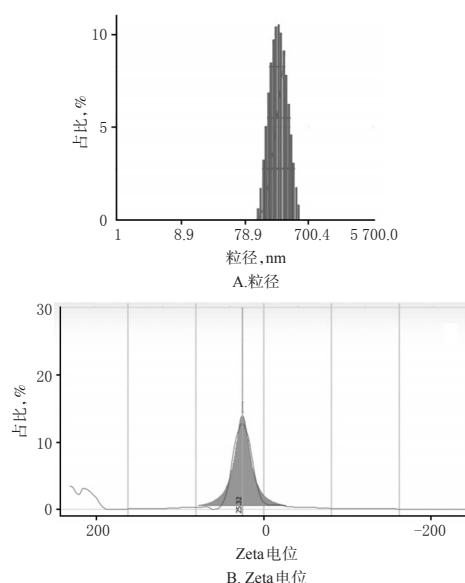


图3 FMN包合物脂质体的粒径和Zeta电位分布图

Fig 3 Particle size and Zeta potential distribution of FMN inclusion compound liposome

由图3可知,FMN包合物脂质体的粒径多在100 nm以下,而粒径及Zeta电位分析仪检查到的粒径却为 (255.34 ± 12.87) nm,这是由于电镜观察时,脂质体需在铜网上晾干,干燥过程中引起了脂质体收缩,因此电镜照片上的脂质体粒径小于粒径及Zeta电位分析仪测得的粒径。

2.6 体外释药考察

分别取FMN包合物溶液、FMN普通脂质体及FMN包合物脂质体各1 mL(均相当于FMN 0.55 mg),置于透析袋中,以pH 7.4 PBS 150 mL为释放介质,于 (37 ± 1) ℃、100 r/min下恒温搅拌。分别于0.5、1、2、3、5、7、10、12、24 h取样3 mL,并立即补充等温等量新鲜释放介质。收集样品按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,计算累积释放度,绘制释放曲线。3种样品的体外释药曲线见图4。

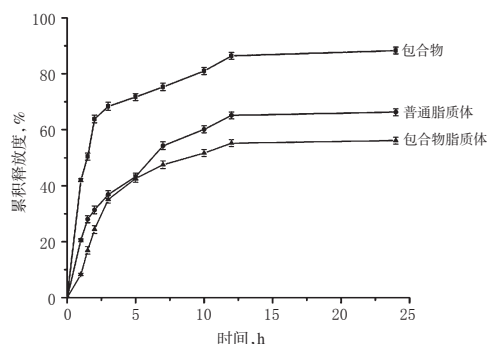


图4 3种样品的体外释药曲线

Fig 4 Curves of *in vitro* drug release for 3 kinds of samples

体外释放结果显示,FMN包合物溶液、FMN普通脂质体以及FMN包合物脂质体的释放速率依次减慢,1 h

累积释放度分别为42.00%、20.54%、8.31%，24 h累积释放度分别为88.30%、66.29%、56.12%。表明与FMN包合物溶液和FMN普通脂质体比较，FMN包合物脂质体具有明显的缓释作用。

2.7 稳定性考察

取FMN包合物脂质体混悬液，置于 (4 ± 2) °C留样观察，考察稳定性。结果显示，FMN包合物脂质体在 (4 ± 2) °C条件下放置3个月后，外观未发生变化，其包封率、粒径、Zeta电位分别为 $(80.16 \pm 0.39)\%$ 、 (260.21 ± 11.62) nm、 (25.47 ± 3.18) mV ($n=3$)，表明其并未发生明显改变，由此可以看出FMN包合物脂质体在低温下放置3个月具有较好的稳定性。

3 讨论

通常对于亲脂性特别强或亲水性特别强[油-水分配系数的对数($\lg P$) >4.5 或 $\lg P < -0.3$]的药物比较容易制备成脂质体，而其他药物难以包入脂质体，即使包封进脂质体后，将倾向于较迅速的渗漏^[13]。因FMN在水中的平衡溶解度为 (2.079 ± 0.036) $\mu\text{g/mL}$ ，在正辛醇-水体系中的表观油水分分配系数 $\lg P=2.79 \pm 0.03$ (37 °C下测得，相关数据另文发表)，对于这类药物可以尝试将其制成包合物后再制备脂质体。预试验中发现，FMN很难直接包入脂质体，其包封率仅为5.38%左右。制成包合物后再包入脂质体，其包封率可达80%以上。

预试验中，笔者以包封率为评价指标，比较了薄膜分散法、乙醇注入法、逆相蒸发法3种制备方法，结果用乙醇注入法、逆相蒸发法制备的FMN包合物脂质体的包封率仅达58.60%和50.35%，因此选择包封率高(81.63%)的薄膜分散法制备FMN包合物脂质体。

根据文献[14]，由于该制剂处方中加入环糊精，可能会破坏磷脂双层膜，并且胆固醇用量较小，对磷脂双层膜的稳定作用下降，故在处方中加入少量P188可能对脂质体混悬液有稳定作用，且一般不显著影响各项指标。预试验中考察了加P188的包合物脂质体和未加P188的包合物脂质体混悬液的稳定性，结果表明，未加P188的包合物脂质体混悬液在4 °C冰箱中保存2周后出现磷脂聚集现象，加P188的包合物脂质体在4 °C冰箱中可保存3个月。

体外释药试验结果表明，FMN包合物溶液体外释放速度最快、包合物脂质体的释放速度最慢，包合物脂质体释放速度慢的原因可能是：包合物脂质体中的药物经过环糊精包合后被包载在脂质体的内水相，药物释放有两个过程，第一个过程是以包合物的形式从脂质体中释放，第二个过程是药物从包合物中释放^[15]，所以释放速度比包合物溶液和普通脂质体慢。

本研究制备了性质稳定且有较高包封率的FMN包合物脂质体，且具有良好的缓释效果，质量也符合相关标准。

参考文献

- [1] MCCORMACK B, GREGORIADIS G. Entrapment of cyclodextrin-drug complexes into liposomes; potential advantages in drug delivery[J]. *J Drug Target*, 1994, 2(5): 449-454.
- [2] CHEN Y, CHEN C, XIAO YY, et al. Liposomes encapsulating 10-hydroxycamptothecin-cyclodextrin complexes and their in vitro anti-tumor activities[J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2015, 15(5): 3786-3795.
- [3] GIDWANI B, VYAS A. Formulation, characterization and evaluation of cyclodextrin-complexed bendamustine-encapsulated PLGA nanoparticles for sustained delivery in cancer treatment[J]. *Pharm Dev Technol*, 2016, 21(2): 161-171.
- [4] 盛佳钰, 陈红凤. 芒柄花素联合MK2206对不同亚型乳腺癌细胞增殖和凋亡的影响[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2015, 22(13): 998-1003.
- [5] 胡昆, 徐华金, 辛文群, 等. 刺芒柄花素氮芥衍生物的合成及抗肿瘤活性[J]. *中国药科大学学报*, 2012, 43(2): 113-119.
- [6] 赵培, 杨媛, 徐扬, 等. 刺芒柄花素调节血脂代谢及改善动脉粥样硬化病变的实验研究[J]. *中国新药杂志*, 2009, 18(10): 925-929.
- [7] LI TY, ZHAO XG, MO ZN, et al. Formononetin promotes cell cycle arrest via downregulation of Akt/Cyclin D1/CDK4 in human prostate cancer cells[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2014, 34(4): 1351-1358.
- [8] YANG Q, CHEN G, YANG Y, et al. Formononetin ameliorates DSS-induced ulcerative colitis in mice through induction of Nrf2 in colons[J]. *J Chin Pharm Sci*, 2016, 25(3): 178-188.
- [9] ZHOU R, XU L, YE M, et al. Formononetin inhibits migration and invasion of MDA-MB-231 and 4T1 breast cancer cells by suppressing MMP-2 and MMP-9 through PI3K/AKT signaling pathways[J]. *Horm Metab Res*, 2014, 46(11): 753-760.
- [10] 余艳红, 罗津. 包合物脂质体靶向系统在给药中的应用[J]. *中国当代医药*, 2014, 21(9): 195-197.
- [11] 郭波红, 廖灿城, 吴秀君, 等. 芒柄花素羟丙基- β -环糊精包合物的制备及其包合行为探讨[J]. *中草药*, 2017, 48(14): 2877-2882.
- [12] 黄青燕, 吕应年, 邓小云, 等. 五肽 YIGSR 修饰的半边旗提取物5F脂质体的制备及理化性质研究[J]. *中国药房*, 2016, 27(13): 1842-1844.
- [13] 王理想, 瞿鼎, 刘聪燕, 等. 制备工艺和包封材料对3种成分脂质体包封率的影响[J]. *中成药*, 2017, 39(1): 60-64.
- [14] 张鑫, 谭睿, 顾健, 等. 波棱素脂质体的制备工艺及处方优化研究[J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(6): 1007-1010.
- [15] ZHANG LN, ZHANG Q, WANG X, et al. Drug-in-cyclodextrin-in-liposomes: a novel drug delivery system for flurbiprofen[J]. *Int J Pharm*, 2015, 492(1/2): 40-45.

(收稿日期:2017-08-10 修回日期:2017-10-24)

(编辑:邹丽娟)