

槲皮素-月桂酸共轭物的合成、磷脂/胆盐纳米胶束的制备及其药动学研究

高浩博, 姚玲玉, 柏应颖, 马玉花*

青海民族大学药学院, 青海省青藏高原植物化学重点实验室, 青海省现代藏药创制工程技术研究中心, 青海 西宁 810007

摘要: 目的 基于药物-脂质共轭技术 (lipid-drug conjugates, LDC) 与磷脂/胆盐纳米胶束 (phospholipid/bile salt mixed micelles, MMs) 递送系统, 采用月桂酸 (lauric acid, LA) 对槲皮素进行亲脂性结构修饰, 合成槲皮素-月桂酸共轭物 (quercetin-lauric acid conjugate, LA-Qu), 显著提升槲皮素在纳米胶束体系中的载药量与包封率, 口服生物利用度提高, 为槲皮素的高效口服制剂开发提供了新策略。方法 采用酰化法合成 LA-Qu, 柱色谱及制备液相色谱进一步分离纯化; 采用薄膜分散法制备 LA-Qu MMs, 并对其理化特征及稳定性进行评价; 通过检测槲皮素的含量, 对 LA-Qu MMs 进行了大鼠体内药物动力学和小鼠组织分布研究。结果 通过改变反应溶剂种类、催化剂种类及用量, 建立了 LA-Qu 的 4 种合成路线, 合成收率均在 77%~80%。采用 MS、¹H-NMR 鉴定结构, 成功合成 LA-Qu。在最佳处方条件下, LA-Qu MMs 平均粒径为 (53.57±1.02) nm, PDI 为 0.274±0.020, ζ 电位为 (-29.93±3.12) mV, 载药量为 (9.09±0.12)%, 包封率为 (100.00±0.00)%, 纳米胶束形态均呈类球形, 分散性好, 无聚集粘连, 粒径均一, 稳定性良好。LA-Qu MMs 的生物利用度分别是槲皮素混悬液的 19.04 倍, Qu MMs 的 1.42 倍, 明显促进槲皮素的口服吸收。槲皮素主要在肝脏、肾脏、肺中分布, 尤其肝脏的选择性强。结论 LA-Qu MMs 有效改善了槲皮素的渗透性, 明显提高槲皮素口服生物利用度。

关键词: 槲皮素; 槲皮素-月桂酸共轭物; 磷脂/胆盐纳米胶束; 药物动力学; 生物利用度

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)17-6184-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.17.009

Synthesis of quercetin-lauric acid conjugates, preparation of phospholipid/bile salt mixed micelles and its pharmacokinetic study

GAO Haobo, YAO Lingyu, BAI Yingying, MA Yuhua

School of Pharmacy, Qinghai Minzu University, Key Laboratory for Tibet Plateau Phytochemistry of Qinghai Province, Qinghai Engineering Research Center of Modern Tibetan Medicine Development, Xining 810007, China

Abstract: Objective The study is based on the technologies of lipid-drug conjugates and phospholipid/bile salt mixed micelles. The lipophilicity structure of quercetin was modified with lauric acid (LA) to synthesize the quercetin-lauric acid conjugate (LA-Qu), which significantly increased the drug loading and encapsulation efficiency of quercetin in the nanomicelle system, and improved the oral bioavailability, providing a new strategy for the development of efficient oral preparations of quercetin. **Methods** LA-Qu was synthesized by acylation method, and further separated and purified by column chromatography and preparative liquid chromatography. LA-Qu MMs was prepared by the thin-film dispersion method, and its physicochemical characteristics and stability were evaluated. By detecting the content of quercetin, the pharmacokinetics of LA-Qu MMs in rats and the tissue distribution in mice were studied. **Results** Four synthetic routes of LA-Qu were established by changing the type of reaction solvent, the type and dosage of catalyst, the synthesis yield was between 77% and 80%. The structure was identified by MS and ¹H-NMR, successfully synthesized LA-Qu. Under the optimal prescription conditions, the average particle size of LA-Qu MMs was (53.57 ± 1.02) nm, PDI was 0.274 ± 0.020, ζ potential was (-29.93 ± 3.12) mV, drug loading was (9.09 ± 0.12)%, encapsulation efficiency was (100.00 ± 0.00)%, and the morphology of micelles were spherical, with good dispersion, no aggregate adhesion, uniform particle size and good stability. The bioavailability of LA-Qu MMs was 19.04 times that of the quercetin suspension and 1.42 times that of Qu MMs, which significantly promoted the oral absorption of quercetin. Quercetin was mainly distributed in the liver, kidneys and lungs, especially in the liver.

收稿日期: 2025-04-23

基金项目: 青海省科技合作专项 (2017-HZ-814)

作者简介: 高浩博 (2001—), 硕士研究生, 研究方向为中藏药新型给药系统。E-mail: ggaobo0109@163.com

*通信作者: 马玉花 (1978—), 教授, 硕士生导师, 从事中藏药新型给药系统。E-mail: yuhuama612@163.com

Conclusion LA-Qu MMs effectively improved the permeability of quercetin, significantly enhanced the oral bioavailability of quercetin.

Key words: quercetin; quercetin-lauric acid conjugates; phospholipid/bile salt mixed micelles; pharmacokinetics; bioavailability

槲皮素是一种黄酮类成分,在中草药、水果和蔬菜中富含,具有抗氧化、抗肿瘤、抗炎、抗病毒、抗菌等多种活性^[1-3]。由于槲皮素化学结构中含有多个极性羟基,易形成分子间氢键,使晶格能增大,亲水性变差,口服生物利用度低,限制了其在临床上的应用^[4-6]。

为改善槲皮素的溶解性,促进其口服吸收,国内外学者采取了多种措施:通过化学修饰法在槲皮素的结构中引入亲水性基团^[7-8],增加其溶解性,如肌醇 2-磷酸-槲皮素偶联物^[9]、槲皮素 7-*O*-琥珀酰葡萄糖苷^[10]等;通过现代药剂学方法将槲皮素制成纳米乳^[11-12]、羧甲基化凝胶多糖/槲皮素纳米复合物^[13]等,以促进其溶出。但这些方法仅增加了槲皮素的溶解度,未能改善其渗透性,因此药物跨膜转运仍受限制,对生物利用度的改善十分有限,亟待应用新技术和新方法,解决槲皮素的吸收问题,提高其生物利用度。

药物-脂质共轭物(lipid-drug conjugates, LDC)是根据前药原理,将药物和脂质通过共价结合形成的新化合物,改变了药物本身的物理化学性质,显著提高药物的亲脂性,提高药物在脂质载体的包载效率及跨膜能力,从而改善药物药动学和药效学行为。以脂肪链做亲脂性修饰,有利于生物膜上的多种活性转运体识别并摄取药物,且 LDC 具有控释、增效和减毒等优点^[14]。

磷脂/胆盐纳米胶束(phospholipid/bile salt mixed micelles, MMs)是一种新型的纳米给药系统,由磷脂、胆盐及药物 3 部分组成,是改善药物溶解度和生物利用度的有效途径。一般来说胶束具有较小的粒径(10~100 nm)和较大的分散度,这不但可以大幅度增加难溶性药物的溶解能力,增强药物的临床疗效,而且其制备工艺简单,成本低廉,适合工业化生产^[15-16]。

基于 LDC 和 MMs 技术的优势,本实验采用药物-脂质共轭物技术对槲皮素进行亲脂性修饰,选择碳链长度适中的脂肪酸月桂酸(lauric acid, LA)与槲皮素共价结合,得到槲皮素-月桂酸共轭物(LA-quercetin conjugates, LA-Qu),随后通过薄膜分散法将其制成 LA-Qu MMs,并对其展开载药性能、稳定性、药动学及不同组织分布等方面的研究。

1 仪器与材料

1.1 仪器

LCMSD 型液质联用仪、Agilent 1220 Series 高效液相色谱仪,美国 Agilent 公司;Avance III 型核磁共振波谱仪,德国 Bruker 公司;ZS90 型激光散射粒度分析仪,英国 Malvern 公司;JEM-1230 型透射电子显微镜(TEM),日本 JEOL 公司;ZRS-8G 型溶出仪,天津大学无线电厂;IVIS Spectrum 型小动物活体成像仪,美国 PerkinElmer 公司。

1.2 试剂

月桂酰氯、牛黄胆酸钠,梯希爱(上海)化工工业发展有限公司;槲皮素原料药,质量分数>98.0%,西安天一生物技术股份有限公司;槲皮素对照品,批号 JZ17092605, HPLC 测定质量分数≥98.0%,南京景竹生物科技有限公司;卵磷脂,德国 Lipoid GmbH 公司;胃蛋白酶(批号 C15174825)、胰酶(批号 C14838833),北京索莱宝科技有限公司;β-葡萄糖醛酸酶(批号 slbb6139v)、硫酸酯酶(批号 slbb1752v),美国 Sigma-Aldrich 公司;其余试剂均为分析纯。

1.3 动物

雌性 SD 大鼠,体质量(250±10)g,动物许可证号:SCXK(宁)2015-0002;雌性、雄性 ICR 小鼠,体质量(25±2)g,动物许可证号:SCXK(宁)2015-0001;雄性 BALB/c 小鼠,体质量(20±2)g,购于上海西普尔-必凯实验动物有限公司。实验动物在相对湿度 50%、温度 21℃条件下,适应性饲养 1 周,期间小鼠自由进食饮水,实验前小鼠禁食 12 h,自由饮水。动物实验经青海民族大学科技伦理审查批准,批准号 2017-019。

2 方法与结果

2.1 LA-Qu 的合成及表征

2.1.1 LA-Qu 的合成路线 通过改变反应溶剂种类、催化剂种类及用量,建立了 LA-Qu 的 4 种合成路线,各路线所有试剂及用量如表 1 所示,反应合成路线如图 1 所示。

操作方法:以合成路线 1 为代表,在 50 mL 干燥三口烧瓶中加入 10 mL 无水二甲基亚砜,然后加入槲皮素 151 mg(0.500 mmol),加入 477 mg(1.125 mmol)碳酸钠和 124.5 mg(0.750 mmol)碘化钾,

表 1 LA-Qu 合成所需试剂及用量

Table 1 Reagent and dosage required for LA-Qu synthesis

合成路线	槲皮素用量/ mg (mmol)	月桂酰氯用量/ mg (mmol)	反应溶剂及用量/mL	催化剂及用量/mg (mmol)
1	151 (0.50)	136.25 (0.62)	二甲基亚砜 (DMSO) 10	碳酸钠 477.00 (1.125)、碘化钾 124.50 (0.750)
2	151 (0.50)	272.50 (1.24)	无水 <i>N,N</i> -二甲基甲酰胺 (DMF) 10	碳酸钾 25.00 (0.181)、三乙胺 15.18 (0.150)
3	151 (0.50)	136.25 (0.62)	无水四氢呋喃 (THF) 10	碳酸钠 25.00 (0.236)、三乙胺 15.18 (0.150)
4	453 (1.50)	319.00 (1.45)	甲苯 (TL) 20	碳酸钠 25.00 (0.236)、4-二甲氨基吡啶 183.20 (1.690)

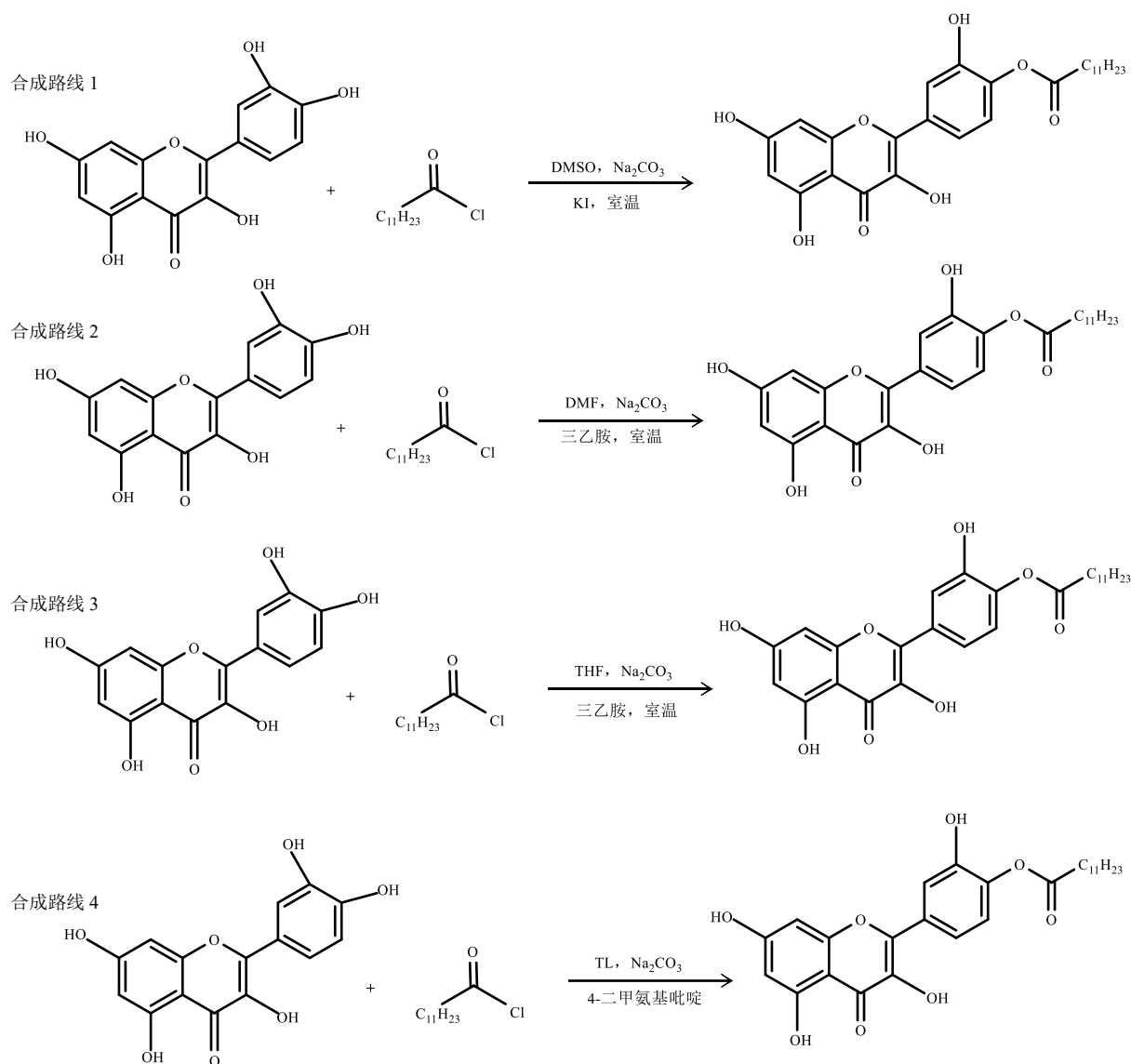


图 1 LA-Qu 合成路线

Fig. 1 Synthetic route of LA-Qu

用隔膜真空泵抽真空，氮气保护，冰浴，置于磁力搅拌器上 650 r/min 搅拌，将 136.25 mg (0.620 mmol) 月桂酰氯溶于 10 mL 无水二甲基亚砜，缓慢滴入反应液中，反应 1 h，撤掉冰水浴至室温反应 10 h，反应结束加 0.1 mol/L HCl，调 pH 值为 6~7，终止反应。加入 30 mL 醋酸乙酯和 10 mL 纯净水，萃取，

分液，水层继续用 30 mL 醋酸乙酯萃取 2 次；合并每次所得的有机层后向其中加入 10 g 无水硫酸镁，除水过夜，抽滤，旋干。

合成路线 2~4 的操作方法同路线 1，但在投药量、反应溶剂、催化剂的种类和用量上有差别，具体数据见表 1。结果发现，合成路线 1~4 的收率分

别为 79%、77%、80%、79%。

2.1.2 LA-Qu 的分离纯化 采用硅胶柱色谱分离目标产物。石油醚/醋酸乙酯 (2:1) 为洗脱剂, 薄层板点样检测目标产物, 石油醚/醋酸乙酯 (1:1) 为展开剂, 获得单一纯点, 得到 LA-Qu 的粗分物。

将 LA-Qu 的粗分物用乙腈溶解, 采用制备液相色谱纯化目标产物。色谱条件: 检测波长 255 nm, 体积流量 3 mL/s, 进样量 1 mL, 柱温为室温, 流动相为乙腈-水 (90:10)。分别收集目标产物色谱峰时间段内的流动相, 旋转蒸发除去溶剂, 真空干燥, 得到高纯度的 LA-Qu。

采用 HPLC 法对纯化后的 LA-Qu 共轭物进行纯度检测, 流动相为乙腈-水 (90:10), 柱温为 30 °C, 体积流量为 1 mL/min, 检测波长为 255 nm。原料药槲皮素的保留时间为 5.73 min, LA-Qu 的保留时间为 22.69 min, 色谱图见图 2。

合成路线 1~4 所得 LA-Qu 经纯化、检测, 质量分数分别为 98%、97%、96%、98%。

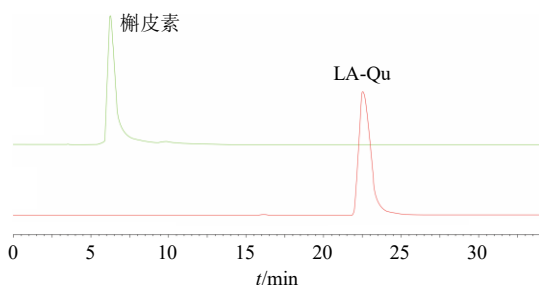


图 2 槲皮素和 LA-Qu 的 HPLC 图

Fig. 2 HPLC plot of quercetin and LA-Qu

2.1.3 LA-Qu 的结构鉴定 在 LA-Qu 的合成及分离过程中随时用薄层板点样跟踪目标产物, 粗分物溶于乙腈进行质谱 (MS) 检测, 纯化后的产物溶于氘代二甲基亚砷中, 采用核磁共振氢谱 ($^1\text{H-NMR}$) 进行结构分析和鉴定。

槲皮素的相对分子质量为 302, 与月桂酰氯化合后, 目标产物的相对分子质量为 484, 在 MS 中有高强度的相应分子离子峰出现, ESI-MS 的质谱图见图 3。其中, 离子峰 483 为 $[\text{M}-1]$ 产生的峰, 离子峰 546 为 $[\text{M}-1+\text{Na}-\text{H}+\text{CH}_3\text{CN}]$ 产生的峰, 质谱结果验证了目标合成物为 LA-Qu。

槲皮素与 LA-Qu 的 $^1\text{H-NMR}$ 图谱 (图 4、5), 各个氢原子的归属见相应的核磁共振数据。由此可知, 溶剂 DMSO、水的化学位移分别在 δ 2.50、3.33, 在槲皮素的氢谱中没有出现脂肪链的信号峰, 而在 LA-Qu 中, 脂肪链- CH_3 和- CH_2 的质子特征峰的化

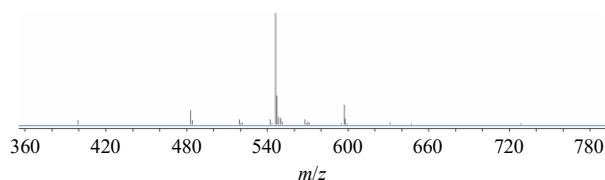


图 3 LA-Qu 的 ESI-MS 图谱

Fig. 3 ESI-MS spectrum of LA-Qu

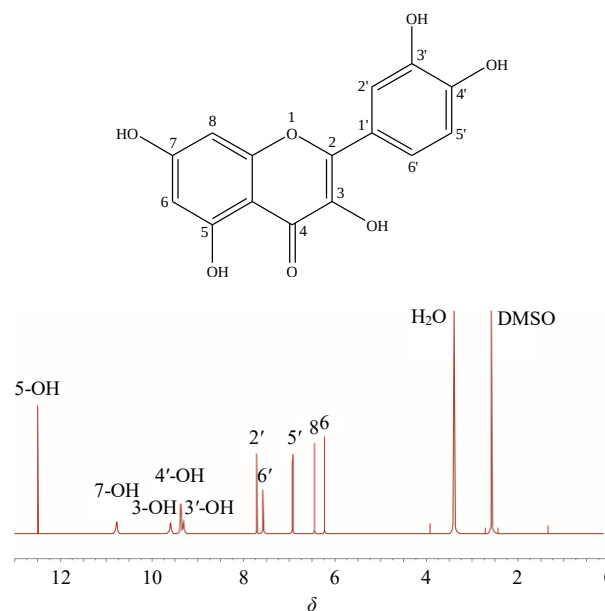


图 4 槲皮素的化学结构及 $^1\text{H-NMR}$

Fig. 4 Chemical structure and $^1\text{H-NMR}$ of quercetin

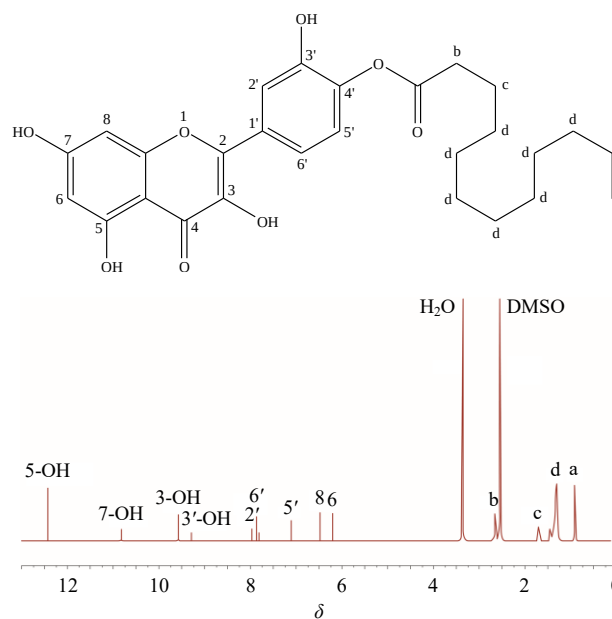


图 5 LA-Qu 的化学结构及 $^1\text{H-NMR}$

Fig. 5 Chemical structure and $^1\text{H-NMR}$ of LA-Qu

学位移分别为 δ 0.8、1.40、1.68、2.64。另外, 槲皮素中 4-OH 的信号峰 (δ 9.33) 在共轭物中消失, 而其他羟基上氢原子的信号峰依然存在, 并且使邻位

5'-H 和 6'-H 质子的化学位移向低场移动,说明月桂酸成功地合成到槲皮素的 4'位羟基上。

2.2 LA-Qu MMs 的制备与表征

2.2.1 LA-Qu MMs 的制备 采用薄膜分散法制备 MMs。称取 120 mg 卵磷脂与 20 mg LA-Qu 溶于 2 mL 四氢呋喃, 80 mg 牛黄胆酸钠溶于 1 mL 甲醇, 超声溶解后将两者置于 100 mL 圆底烧瓶混合均匀, 40 °C 旋转蒸发缓慢除去有机溶剂在瓶壁形成薄膜, 真空干燥箱中放置, 备用。随后加入 pH 7.4 PBS 4 mL, 37 °C 水化 5 min, 涡旋 10 min, 制得 LA-Qu MMs。

2.2.2 影响 LA-Qu MMs 形成的主要因素 课题组前期已完成载水飞蓟宾等磷脂/胆盐混合纳米胶束的制备工艺及处方筛选^[17-18], 所建方法简单可靠、重复性高, 因此本研究的主要工艺参数均采取以上 2 篇文献。在此基础上, 根据槲皮素和 LA-Qu 的理化性质进一步筛选了溶剂和投药量。

(1) 磷脂/胆盐比: 磷脂/胆盐比是决定能否成功制备胶束的最关键因素。当磷脂/牛黄胆酸钠比为 3:2 时, 制得胶束溶液澄清近透明, 胶束粒子的粒径和 PDI 都较好, 其余磷脂/胆盐比在制备过程中不是牛奶状的乳液, 就是含有泡沫或沉淀物, 制得的胶束粒子大小不一, 粒径分布较宽, 难以形成胶束。

(2) 溶剂的选择: 分别考察了不同有机溶剂同时对槲皮素、LA-Qu、卵磷脂及牛磺胆酸钠的溶解性, 选择溶解能力最好的溶剂, 尽量减少有机溶剂的用量及溶剂在胶束中的残留。所选溶剂的种类有三氯甲烷、乙腈、石油醚、醋酸乙酯、二氯甲烷、丙酮、四氢呋喃、甲醇、乙醇、水。经考察确定采用混合溶剂四氢呋喃-甲醇 (2:1)。

(3) 投药量考察: 分别考察投药量为 2%、4%、6%、8%、9%、10% 时, 对胶束粒径、PDI 的影响。对于 Qu MMs, 最大投药量为 4%, 超过该值时, 槲皮素析出, 无法成膜, 因此, 确定 Qu MMs 的投药量为 4%。对于 LA-Qu MMs, 当投药量为 6% 和 8% 时, 胶束粒子的平均粒径均约为 50 nm, PDI 小于 0.30, 当投药量增加到 10% 时, 胶束溶液变浑浊, 粒径和 PDI 均明显增加, 因此, 确定 LA-Qu MMs 的投药量约为 9%。

2.2.3 LA-Qu MMs 的含量测定

(1) LA-QU 色谱条件: 色谱柱为 Cosmosil C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水 (90:10); 检测波长 255 nm; 体积流量 1 mL/min;

进样量 10 μL。

槲皮素色谱条件: 色谱柱为 Cosmosil C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.2%磷酸水溶液 (70:30); 检测波长 370 nm, 体积流量 1 mL/min; 进样量 10 μL。

(2) 供试品溶液的制备: 取 LA-Qu MMs 溶液 200 μL 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇 5 mL, 超声破乳 10 min, 用甲醇稀释定容, 摇匀。随后, 以 10 000 r/min 离心 (离心半径 9.2 cm) 10 min, 取上清液 1 mL, 用流动相乙腈-水 (90:10) 稀释 1 倍, 涡旋混匀, 用 0.22 μm 滤膜滤过上清液, 取续滤液, 按照“(1)”项下色谱条件进行测定。取空白 MMs 200 μL, 同法制备空白 MMs 溶液。

(3) 线性关系考察: 精密称取槲皮素、LA-Qu 各 10.0 mg, 分别置于 50 mL 量瓶中, 用甲醇定容, 得 200 μg/mL 储备液, 用甲醇稀释得系列不同质量浓度 (160、80、50、20、10、4 μg/mL) 的对照品溶液, 在上述色谱条件下测定其峰面积, 以各槲皮素、LA-Qu 各质量浓度 (X) 的峰面积 (Y), 得标准曲线回归方程分别为槲皮素 $Y=36.575 X+1.079 9$, $r=0.999 6$; LA-Qu $Y=18.979 8 X-91.729 9$, $r=0.999 6$; 各样品在 4~200 μg/mL 呈现良好的线性关系。

(4) 专属性考察: 取 Qu MMs、LA-Qu MMs、空白 MMs 各 1 mL, 分别用甲醇超声破乳 10 min, 5 000 r/min 离心 (离心半径 9.2 cm) 5 min, 用 0.22 μm 滤膜滤过上清液, 取续滤液进行 HPLC 分析, 将空白 MMs 色谱图与 Qu MMs、LA-Qu MMs 色谱图比较, 考察载体对槲皮素、LA-Qu 的测定是否有干扰。结果见图 6、7, 槲皮素、LA-Qu 色谱峰不受其他杂质干扰, 专属性高。

(5) 精密度考察: 取 4、50、160 μg/mL 槲皮素、LA-Qu 对照品溶液, 按照“(1)”项下色谱条件连续测定 6 次, 记录槲皮素、LA-Qu 峰面积, 结果其 RSD 分别为 2.01%、2.33%, 均小于 3%, 表明该仪器精密度良好。

(6) 稳定性考察: 取 Qu MMs、LA-Qu MMs 供试品溶液, 分别于制备后 0、1、3、5、7、9、14、21 d, 按照“(1)”项下色谱条件进样检测, 记录槲皮素、LA-Qu 峰面积, 结果其 RSD 分别为 2.12%、1.56%, 结果表明, LA-Qu MMs 供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

(7) 重复性考察: 取 Qu MMs、LA-Qu MMs 样品, 按照“(2)”项下方法分别制备 6 份 Qu MMs、

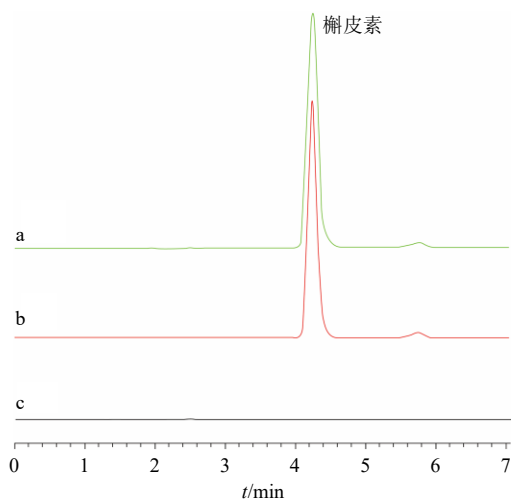


图 6 槲皮素对照品溶液 (a)、Qu MMIs (b) 和空白 MMIs (c) 的 HPLC 图

Fig. 6 HPLC spectrum of quercetin solution (a), Qu MMIs (b) and blank MMIs (c)

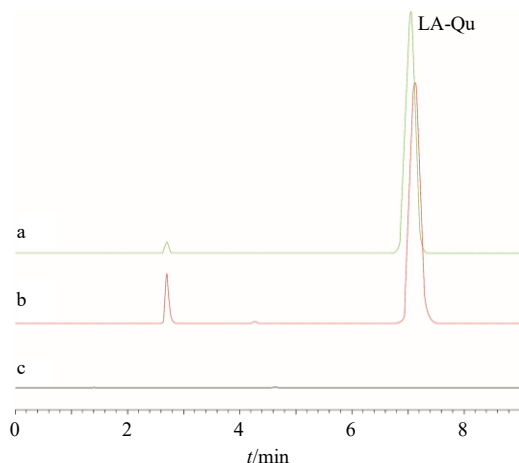


图 7 LA-Qu 溶液 (a)、LA-Qu MMIs (b) 和空白 MMIs (c) 的 HPLC 图

Fig. 7 HPLC spectrum of LA-Qu solution (a), LA-Qu MMIs (b) and blank MMIs (c)

LA-Qu MMIs 供试品溶液, 按照“(1)”项下色谱条件进样分析, 计算槲皮素、LA-Qu 质量分数的 RSD 分别为 1.01%、1.24%, 结果表明该方法重复性良好。

(8) 加样回收率考察: 分别精密吸取 0.5 mL Qu MMIs、LA-Qu MMIs 样品至 10 mL 量瓶中, 共 9 份, 分为高、中、低 3 组, 每组 3 份。分别精密加入槲皮素、LA-Qu 对照品储备液 (质量浓度 200 $\mu\text{g/mL}$) 0.3、0.7、1.0 mL, 按照“(2)”项下方法制备槲皮素、LA-Qu MMIs 供试品溶液, 按照“(1)”项下色谱条件测定槲皮素、LA-Qu 总量, 计算其加样回收率和 RSD 值。结果显示, 槲皮素、LA-Qu 的平均加样回收率分别为 101.28%、100.56%, RSD 分别为

2.05%、1.87%, 结果表明该方法准确度高。

2.2.4 LA-Qu MMIs 的表征

(1) 粒径、 ζ 电位及形态观察: 分别用纯化水将 Qu MMIs、LA-Qu MMIs 溶液稀释 5 倍, 采用激光粒度测定仪测定其粒径、PDI 和 ζ 电位。分别用纯化水将以上 2 溶液稀释至 0.5 mg/mL 左右, 滴在铜网上, 用磷钨酸染色, 自然晾干后置于 TEM 下观察其形态, 其外观见图 8。QU MMIs 和 LA-Qu MMIs 的平均粒径分别为 (11.63 ± 0.43) 、 (53.57 ± 1.02) nm, PDI 分别为 0.244 ± 0.040 、 0.274 ± 0.020 , ζ 电位分别为 (-30.60 ± 5.77) 、 (-29.93 ± 3.12) mV。其形态及粒径见图 9、10, 2 组 MMIs 形态均呈类球形, 分散性好, 无聚集粘连, 粒径均一。

(2) 载药量与包封率的测定: 分别精密吸取 Qu

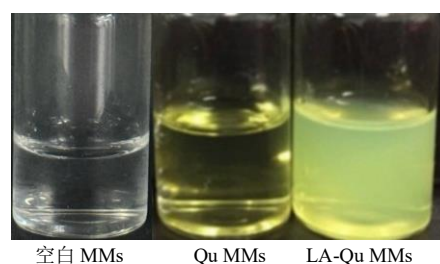


图 8 MMIs 外观

Fig. 8 Appearance of MMIs

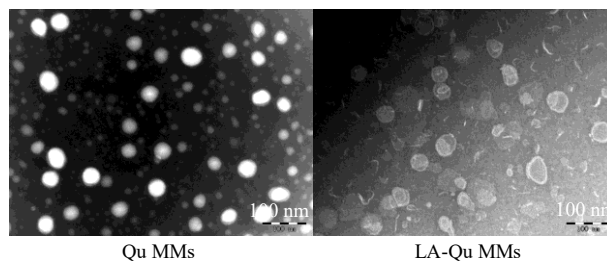


图 9 2 组 MMIs 的 TEM 图

Fig. 9 Two groups of MMIs TEM

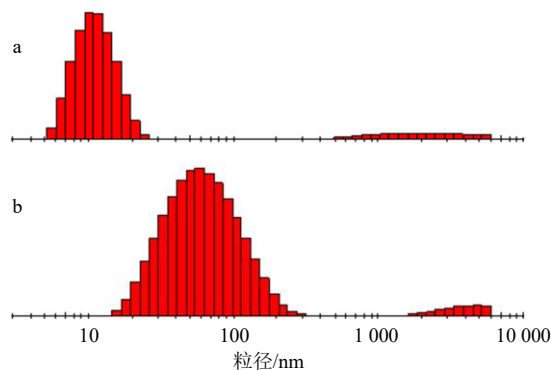


图 10 Qu MMIs (a) 和 LA-Qu MMIs (b) 2 组混合 MMIs 粒径分布图

Fig. 10 Particle size distribution of two groups of MMIs Qu MMIs (a) and LA-Qu MMIs (b)

MMs、LA-Qu MMs 溶液 1 mL, 用纯化水稀释 5 倍, 取稀释后的溶液 1 mL, 置于超滤内管(截留相对分子质量 30 000)中, 3 500 r/min 离心(离心半径 9.2 cm) 15 min, 取外管溶液进行 HPLC 分析, 分别计算游离槲皮素及 LA-Qu 的量, 记为 $W_{\text{游离}}$, 磷脂和胆盐载体材料的量记为 $W_{\text{载体}}$, 根据“(1)”项下含量测定结果计算得槲皮素及 LA-Qu 总含量, 记为 $W_{\text{总}}$, 按照以下公式计算 MMs 的包封率与载药量。

$$\text{包封率} = (W_{\text{总}} - W_{\text{游离}}) / W_{\text{总}}$$

$$\text{载药量} = (W_{\text{总}} - W_{\text{游离}}) / [W_{\text{载体}} + (W_{\text{总}} - W_{\text{游离}})]$$

经计算, 得 Qu MMs 的包封率和载药量分别为 $(47.75 \pm 1.57)\%$ 和 $(4.08 \pm 0.04)\%$; LA-Qu MMs 的包封率和载药量分别为 $(100.00 \pm 0.00)\%$ 和 $(9.09 \pm 0.12)\%$ 。对于 LA-Qu MMs 组, 外管液中未检测到游离的药物, 即 $W_{\text{游离}}$ 为 0, 因此, 包封率为 100.00%, 主要原因是 LA-Qu MMs 的脂溶性强, 与载体材料的相容性好, 更容易包载在胶束中, 载药量和包封率均有提高。

2.2.5 MMs 稳定性考察 以胶束的粒径与 PDI 值为考察指标, 将 Qu MMs、LA-Qu MMs 分别放置在 4 °C 与 25 °C 环境下, 分别于放置 0、1、3、5、7、9、14、21 d, 经激光粒度测定仪测定及 RSD 计算, 结果如表 2 所示, Qu MMS 的稳定性差, 低温情况下 LA-Qu MMs 的稳定性好。

2.3 口服药物动力学研究

SD 大鼠 ig LA-Qu MMs 后, 在血浆中均没有检测到 LA-Qu, 而在不同时间都检测到了槲皮素, 说

表 2 LA-Qu、Qu MMS 放置稳定性结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 2 Placement stability results of LA-Qu and Qu MMS ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	t/d	4 °C		25 °C	
		粒径	PDI	粒径	PDI
LA-Qu	1	54.2±0.5	0.188	52.2±1.4	0.107
	2	55.8±1.1	0.120	52.0±0.5	0.115
	3	58.2±0.4	0.146	53.1±0.1	0.085
	5	65.2±0.4	0.171	64.9±0.2	0.183
	7	69.3±0.9	0.209	66.7±0.8	0.181
	9	75.0±1.2	0.240	68.0±0.9	0.182
	14	76.5±0.2	0.291	71.2±0.5	0.196
	21	88.5±0.6	0.294	82.6±0.3	0.371
Qu MMS	1	12.8±0.2	0.196	12.8±0.2	0.196
	2	12.6±0.2	0.162	13.4±0.2	0.197
	3	12.2±0.2	0.212	13.6±0.2	0.215
	5	60.5±0.3	0.889	59.5±0.3	0.689

明 LA-Qu 在体内易被酯酶降解, 释放出原药。因此, 生物利用度的研究以槲皮素为评价指标, 建立槲皮素的体内 HPLC 分析方法。

2.3.1 色谱条件 色谱柱为 Cosmosil C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 检测波长 370 nm; 体积流量 1 mL/min; 进样量 20 μL; 流动相为 0.4%磷酸水溶液-乙腈, 梯度洗脱: 0~5 min, 40%~70%乙腈; 5~11 min, 70%~40%乙腈; 11~13 min, 40%乙腈。

2.3.2 槲皮素对照品溶液的配制 精密称取槲皮素对照品 10.0 mg 至 50 mL 量瓶中, 甲醇定容得 200 μg/mL 储备液, 用甲醇稀释得系列不同质量浓度 (200.0、100.0、50.0、10.0、2.0、0.4、0.1 μg/mL) 的对照品溶液。

2.3.3 姜黄素(内标)储备液的配制 精密称取姜黄素对照品 10.0 mg, 加入甲醇定容至 10 mL 得到 1 000 μg/mL 的母液, 用甲醇稀释得到 10 μg/mL 的姜黄素(内标)储备液。

2.3.4 酶工作液的配制 取醋酸铵 3.544 g, 加入纯化水 100 mL, 用醋酸调节 pH 值至 5.0。精密称取硫酸酯酶 0.065 g 于 5 mL 量瓶中, 用上述醋酸铵溶液定容; 吸取葡萄糖醛酸酶 (90 kU/mL) 100 μL, 加入至 1.7 mL 上述硫酸酯酶工作液, 分别得到 500 U/mL 硫酸酯酶工作液和 50 kU/mL 葡萄糖醛酸酶工作液。

2.3.5 血浆样品的处理 精密吸取血浆样品 100 μL, 加入 20 μL 含维生素 C 0.2 mg/mL 的醋酸溶液(含醋酸 0.5 mol/L), 调节血浆 pH 值约为 5.0, 加入 20 μL 酶工作液(硫酸酯酶 10 U, 葡萄糖醛酸酶 100 U), 涡旋 2 min, 37 °C 震荡孵育 30 min 后, 加入甲醇与内标各 20 μL, 醋酸乙酯 400 μL, 混合后振荡 5 min, 4 °C 下 12 000 r/min 离心(离心半径 9.2 cm) 10 min, 吸取上清液吹干, 加入 100 μL 甲醇复溶, 4 °C 下 12 000 r/min 离心(离心半径 9.2 cm) 10 min, 吸取上清液进行 HPLC 检测。

2.3.6 专属性考察 取空白 SD 大鼠血浆样品 100 μL, 除不加内标外, 操作同血浆样品的处理, 进样 20 μL, 得空白血浆色谱图。分别将一定质量浓度的槲皮素溶液和内标姜黄素溶液加入到空白血浆中, 同法操作得含有槲皮素和内标的对照色谱图。另取给药后的 SD 大鼠血浆, 同法处理得样品色谱图。比较对照各色谱图, 考察方法专属性。结果如图 11 所示, 槲皮素峰和内标峰基本对称, 峰形良好, 说明选定的色谱条件专属性良好。

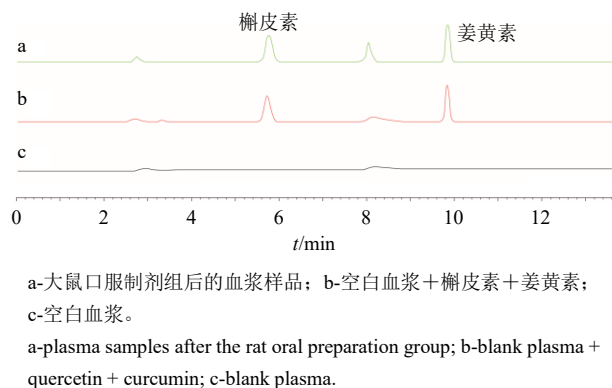


图 11 槲皮素专属性质色谱图
Fig. 11 Quercetin specific chromatogram

2.3.7 线性关系考察 精密吸取不同质量浓度槲皮素对照品溶液 (0.18、0.90、3.60、18.00、90.00、180.00、360.00 $\mu\text{g/mL}$) 各 20 μL , 加入 20 μL 姜黄素内标溶液, 20 μL 醋酸铵与 20 μL 维生素 C 溶液, 空白血浆 100 μL , 使槲皮素在血浆中的质量浓度分别为 0.02、0.10、0.40、2.00、10、20、40 $\mu\text{g/mL}$, 其余操作同血浆样品的处理。以槲皮素峰面积与内标物峰面积的比值 (A_1/A_2) 与槲皮素质量浓度 (C) 得标准曲线为 $A_1/A_2 = 0.599\ 019\ C + 0.256\ 395$, $r = 0.999\ 7$, 结果表明槲皮素在 0.02~40 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

2.3.8 精密度考察 精密吸取 20 μL 低、中、高 (0.15、20.00、175.00 $\mu\text{g/mL}$) 3 个不同质量浓度的槲皮素对照品溶液, 分别加入 100 μL 空白血浆, 按照“2.3.6”项下血浆样品的处理方法, 使其在血浆中的质量浓度分别为 0.03、4.00、35.00 $\mu\text{g/mL}$ 的样品, 在日内连续测定 3 次, 连续测定 3 d, 根据当日工作曲线, 测定槲皮素质量浓度, 计算其 RSD, 得精密度。经计算可知, 高、中、低 3 个质量浓度精密度的 RSD 分别为 9.94%、5.25%、2.88%, 均小于 10%, 符合生物样品分析的要求。

2.3.9 稳定性考察 精密吸取 20 μL 低、中、高 (0.15、20.00、175.00 $\mu\text{g/mL}$) 3 个不同质量浓度的槲皮素对照品溶液, 加入 100 μL 空白血浆, 同精密度方法处理, 使其在血浆中的质量浓度分别为 0.03、4.00、35.00 $\mu\text{g/mL}$ 的样品, 分别考察样品在不同条件下 (室温放置 4 h、室温放置 12 h、反复冻融 3 次) 的稳定性, 进行 HPLC 检测, 计算 RSD 值。在室温放置 4 h 后, 低、中、高 3 个质量浓度样品的 RSD 分别为 8.04%、7.00%、9.27%; 在室温放置 12 h 后, 低、中、高 3 个质量浓度样品的 RSD 分别为

6.76%、4.40%、8.84%; 反复冻融 3 次后, 低、中、高 (0.15、20.00、175.00 $\mu\text{g/mL}$) 3 个质量浓度样品的 RSD 分别为 5.73%、4.88%、7.49%; 结果表明, 稳定性结果符合生物样品分析的要求。

2.3.10 提取回收率 精密吸取 20 μL 低、中、高 (0.15、20.00、175.00 $\mu\text{g/mL}$) 3 个不同质量浓度的槲皮素对照品溶液, 加入 100 μL 空白血浆, 按照“2.3.6”项下方法处理, 使其在血浆中的质量浓度分别为 0.03、4.00、35.00 $\mu\text{g/mL}$ 的样品, 进行 HPLC 分析, 得相应的峰面积 A ; 另取空白血浆, 按照“2.3.6”项下方法处理, 再加入低、中、高 3 个质量浓度的标准溶液与内标, 进样分析得到峰面积 B , 以 A/B 计算槲皮素在血浆中的提取回收率。采用液-液萃取法提取血浆中的槲皮素。槲皮素在血浆中高、中、低 3 个质量浓度的回收率分别为 94.05%、90%和 91.13%, RSD 分别为 3.25%、3.71%、3.99%, 均小于 5%, 符合生物样品分析的要求。

2.3.11 检测限与定量限 取 50 ng/mL 槲皮素血浆对照品溶液, 逐步稀释, 以信噪比为 10:1 和 3:1 分别确定定量限和检测限。结果表明, 最低检测限为 7 ng/mL, 最低定量限为 19 ng/mL。

2.3.12 参比制剂-槲皮素混悬液 (Qu SUS) 将 20 mg 槲皮素原料药混悬于 10 mL 0.4% CMC-Na 溶液中, 制得 2 mg/mL Qu SUS。

2.3.13 给药及取血 雄性 SD 大鼠 18 只, 体质量约 (250 $\pm$ 10) g, 随机分为 3 组, 每组 6 只。分别是 LA-Qu MMs、Qu MMs 和参比制剂 (Qu SUS), 给药前禁食 12 h, 自由饮水。每只大鼠进行 ig, 给药量按槲皮素计算, 为 40 mg/kg。ig 结束后分别于 0.083、0.25、0.5、1、2、4、6、8、10、24 h 眼眶静脉丛取血 0.3 mL, 置于肝素钠离心管中轻微摇晃, 5 000 r/min 离心 (离心半径 9.2 cm) 5 min, 取上层血浆于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存, 待分析。采用 DAS 2.0 软件对血药浓度及各组织药物质量浓度进行参数计算, 利用 SPSS 21.0 软件对所得参数进行方差分析。SD 大鼠分别 ig Qu MMs、LA-Qu MMs 和参比制剂 Qu SUS 后, 不同时间的血药浓度测定结果见图 12, 药动学参数见表 3, 其中 Qu MMs 的相对生物利用度为 Qu SUS 的 133.85%、LA-Qu MMs 的相对生物利用度为 Qu SUS 的 190.44%。药动学结果显示, LA-Qu MMs 组在 72 h 仍可以检测到槲皮素 (药-时曲线图中未显示, 实验记录了相关数据), Qu MMs 在 24 h 检测到药物, 而 Qu SUS 24 h 时检测不到药

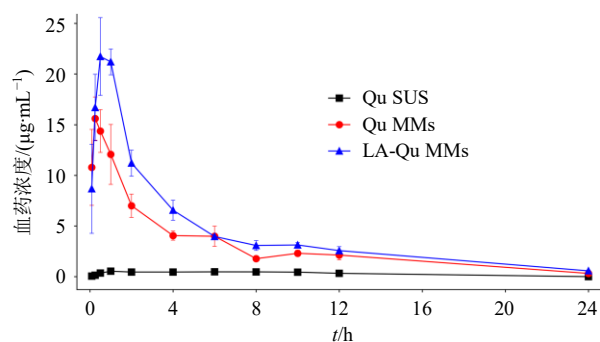


图 12 Qu MMs、LA-Qu MMs、Qu SUS 的药动学曲线
($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 12 Pharmacokinetic curves of Qu MMs, LA-Qu MMs, and Qu SUS ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

表 3 Qu MMs、LA-Qu MMs、Qu SUS 的主要药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Main pharmacokinetic parameters of Qu MMs, LA-Qu MMs, and Qu SUS ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

参数	单位	Qu SUS	Qu MMs	LA-Qu MMs
AUC _{0~24}	$\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$	5.257 ± 0.435	$70.363 \pm 5.170^{**}$	$100.115 \pm 4.287^{**\#}$
AUC _{0~\infty}	$\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$	8.306 ± 3.435	$72.790 \pm 6.583^{**}$	$114.384 \pm 25.821^{**\#}$
$T_{\max}$	h	6.000 ± 1.800	$0.333 \pm 0.129^{**}$	$0.750 \pm 0.274^{**\#}$
$C_{\max}$	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	0.734 ± 0.039	$15.568 \pm 1.570^{**}$	$23.125 \pm 2.273^{**\#}$
MRT _{0~24}	h	5.957 ± 0.646	5.851 ± 0.490	5.663 ± 0.197
CL	$\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$	2.680 ± 0.817	$0.277 \pm 0.023^{**}$	$0.181 \pm 0.030^{**}$

与 Qu SUS 比较: $^{**}P < 0.01$; 与 Qu MMs 比较: $^{\#}P < 0.01$ 。

$^{*}P < 0.01$ vs Qu SUS; $^{\#}P < 0.01$ vs Qu MMs.

大 $15.568 \mu\text{g}/\text{mL}$, 吸收速度最快; LA-Qu MMs 在体内 5 min 时, 槲皮素的质量浓度达到 $8.13 \mu\text{g}/\text{mL}$, 45 min 时血药浓度最大 $23.125 \mu\text{g}/\text{mL}$, 吸收和消除速度慢于 Qu MMs。

Qu MMs、LA-Qu MMs 进入体内后, 槲皮素的平均 $C_{\max}$ 显著高于参比制剂 Qu SUS。以 AUC_{0~24} 计算, Qu MMs、LA-Qu MMs 的生物利用度分别是 Qu SUS 的 13.38、19.04 倍, 表明将槲皮素包裹在 MMs 中, 能够显著促进槲皮素的吸收。另外 LA-Qu MMs 的生物利用度是 Qu MMs 的 1.42 倍, 说明增加槲皮素的脂溶性, 能明显促进其口服吸收。

2.4 组织分布研究

ICR 小鼠 18 只, 雌雄各半, 体质量约 (25 ± 2) g, 随机分 3 组, 每组 6 只。分别是 LA-Qu MMs、Qu MMs 和 Qu SUS, 给药前禁食 12 h, 自由饮水。每只小鼠进行灌胃, 按槲皮素的 $40 \text{ mg}/\text{kg}$ 给药。ig 结束后分别于 0.083、0.25、0.5、1、3、7 h 从小鼠眼静脉丛取血约 0.5 mL 于 1.5 mL 肝素化离心管中, $5000 \text{ r}/\text{min}$ 离心 (离心半径 9.2 cm) 10 min, 取血浆待测。之后颈椎脱臼处死小鼠, 分别剖取小鼠心、

物质质量浓度, 表明 Qu SUS 体内的消除速度快于 MMs, 消除速度: Qu SUS > Qu MMs > LA-Qu MMs, LA-Qu MMs 在体内保留时间较长, 且缓慢持续释放槲皮素, 主要是由于药物脂溶性增加, 代谢速率减慢。Qu SUS、Qu MMs、LA-Qu MMs 中槲皮素的平均达峰浓度 (peak concentration, $C_{\max}$) 分别为 6.000、0.333、0.750 h, 表明将槲皮素包载在 MMs 中, 能促进其快速吸收, 主要是由于磷脂/胆盐载体材料的增溶作用及纳米粒子以较小的粒径, 较大的分散度, 增加了表面积, 促进了药物在体内快速溶出。Qu MMs 进入体内 5 min 时, 槲皮素的质量浓度就已接近 $C_{\max}$ 的 2/3, 20 min 时血药浓度达到最

肝、脾、肺、肾、脑, 置于生理盐水中洗净, 滤纸吸干, 将心脏中多余血液挤出后再进行清洗。分别精密称取各组织重量, 每克组织中加入 2.0 mL 生理盐水, 利用玻璃匀浆器制备成组织匀浆, -20°C 保存待测。组织样品的检测条件同血浆样品。

分别精密称取各组织质量, 按 $2.0 \text{ mL}/\text{g}$ 加入生理盐水, 利用玻璃匀浆器制备成组织匀浆, -20°C 保存。组织样品处理方法同药动学血浆处理方法。

采用 DAS 2.0 软件, 对血药浓度及各组织药物质量浓度进行参数计算, 利用以下指标进行靶向评价。靶向系数 (T_e) 计算公式为 $T_e = \text{AUC}_{\text{靶器官}} / \sum (\text{AUC}_{\text{靶器官}} + \text{AUC}_{\text{非靶器官}})$, T_e 值表示药物制剂对靶器官的选择性。 T_e 值大于 1 时, 表示药物制剂对靶器官比某非靶器官有选择性; T_e 值越大, 选择性越强。相对摄取率 (R_e) 计算公式为 $R_e = \text{AUC}_{pi} / \text{AUC}_{si}$, 公式中 i 指具体的组织, p 代表制剂组 (Qu MMs、LA-Qu MMs), s 代表混悬液组 (Qu SUS)。相对靶向系数 (RT_e), 计算公式为 $RT_e = T_{ep} / T_{es}$, 峰浓度比 (C_e) 计算公式为 $C_e = C_{\max p} / C_{\max s}$ 。

组织分布结果如表 4.5 所示, 对于 LA-Qu MMs

表 4 小鼠口服不同制剂组后各组织药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Pharmacokinetic parameters of different tissues of mice after oral administration of different preparations ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组织	AUC _{0~7} /($\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{g}^{-1}$)			C _{max} /($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)		
	Qu SUS	Qu MMs	LA-Qu MMs	槲皮素	Qu MMs	LA-Qu MMs
心脏	2.889±0.669	2.415±1.076	3.200±0.764	0.757±0.229	0.534±0.058	1.204±0.395
肝脏	1.430±0.230	9.169±1.076	14.567±2.424	0.848±0.315	9.174±1.983	10.638±0.955
脾脏	1.852±0.408	0.722±0.211	1.844±0.352	0.445±0.108	1.170±0.314	1.034±0.296
肺	3.816±0.527	4.338±0.605	6.677±1.808	1.210±0.379	6.202±1.133	7.013±1.625
肾脏	3.841±0.799	6.936±0.692	11.509±1.238	0.935±0.662	7.822±1.120	7.068±1.320
脑	0.928±0.380	1.622±0.655	1.760±0.298	0.457±0.161	0.489±0.230	0.353±0.149

表 5 小鼠口服不同制剂组后各组织中槲皮素的浓度 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 5 Concentrations of quercetin in tissues of mice after oral administration of different preparations ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

样品	组织	槲皮素/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)					
		5 min	15 min	30 min	60 min	180 min	480 min
Qu SUS	血浆	0.199±0.068	0.314±0.076	0.578±0.121	0.323±0.087	0.240±0.084	0.081±0.021
	肝脏	0.113±0.035	0.804±0.355	0.410±0.198	0.382±0.086	0.144±0.036	0.091±0.057
	肺	0.335±0.186	1.210±0.379	0.444±0.228	0.269±0.133	0.690±0.145	0.475±0.151
	肾脏	0.506±0.111	0.872±0.091	0.831±0.117	0.726±0.226	0.429±0.125	0.545±0.166
	脑	0.072±0.040	0.265±0.102	0.099±0.054	0.473±0.242	0.235±0.117	0.001±0.171
	心脏	0.685±0.309	0.315±0.129	0.274±0.089	0.598±0.174	0.406±0.142	0.334±0.084
Qu MMs	脾脏	0.152±0.093	0.256±0.079	0.216±0.077	0.323±0.148	0.364±0.134	0.101±0.055
	血浆	3.814±0.562	6.975±1.509	5.500±0.803	1.908±0.696	2.045±0.601	0.363±0.080
	肝脏	9.174±1.982	6.115±1.465	6.421±1.709	2.361±0.585	0.412±0.167	0.076±0.042
	肺	6.202±1.133	3.569±1.025	0.687±0.195	0.403±0.134	0.520±0.173	0.249±0.092
	肾脏	7.822±1.120	4.099±0.663	2.657±0.350	1.097±0.298	0.631±0.129	0.421±0.068
	脑	0.165±0.032	0.334±0.154	0.178±0.092	0.088±0.039	0.268±0.207	0.276±0.158
LA-Qu MMs	心脏	0.373±0.135	0.230±0.113	0.294±0.139	0.194±0.058	0.438±0.096	0.395±0.188
	脾脏	1.170±0.314	0.355±0.174	0.103±0.050	0.116±0.053	0.072±0.025	0.051±0.036
	血浆	16.101±3.533	24.499±2.700	12.578±1.858	7.371±1.272	4.354±1.007	0.749±0.078
	肝脏	3.891±1.379	10.638±0.955	5.612±1.568	2.688±0.296	2.045±0.857	0.131±0.045
	肺	7.013±1.625	2.933±0.586	1.886±0.680	1.085±0.441	0.934±0.713	0.161±0.073
	肾脏	6.768±1.076	6.832±1.400	4.877±0.762	2.268±0.281	1.345±0.419	0.559±0.096
	脑	0.072±0.046	0.217±0.100	0.093±0.027	0.285±0.048	0.290±0.085	0.224±0.108
	心脏	0.164±0.069	1.011±0.290	0.896±0.496	0.308±0.161	0.355±0.162	0.591±0.154
	脾脏	0.937±0.322	0.730±0.301	0.396±0.140	0.538±0.186	0.122±0.056	0.194±0.080

组, 槲皮素主要分布在心脏、肝脏、脾脏、肺、肾脏中, 且其浓度高于其他 2 组, 表明 LA-Qu MMs 释放的槲皮素在肝脏、肺、肾脏中分布最多。3 组制剂均在肝脏、肺、肾脏中的分布较高, 其分布浓度大小顺序为 LA-Qu MMs>Qu MMs>Qu SUS。

各组织中的 T_c 及 R_c 见表 6, RT_c 和 C_c 见表 7。结果显示, Qu MMs 和 LA-Qu MMs 的 T_c 最大的 3 个组织分别为肝脏、肾脏和肺, 相对提取率最大的组织为肝脏, 表明这 2 组 MMs 中药物对肝脏的选

择性强。Qu SUS 组的靶向系数最大的 3 个组织分别为肾脏、肺和心脏, 其中靶向系数最大的组织为肾脏, 表明该制剂药物对肾脏的选择性最强。

3 讨论

槲皮素的结构中含有 5 个羟基, 其中 7 位和 4' 位羟基与月桂酰氯反应的选择性高, 槲皮素与脂肪类反应生成 4'-槲皮素单取代物, 而与芳香类反应更倾向于生成 7-槲皮素单取代^[19]。合成过程中所用反应溶剂, 对原料药槲皮素和月桂酰氯都有很好的溶

表 6 小鼠口服不同制剂后各组织 T_e 及 R_e Table 6 T_e and R_e of each tissue after oral administration of different preparations in mice

组织	$T_e/\%$			R_e	
	Qu SUS	Qu MMs	LA-Qu MMs	Qu MMs	LA-Qu MMs
心脏	19.578	9.583	8.089	0.836	1.108
肝脏	9.691	36.385	36.825	6.412	10.187
脾脏	12.551	2.865	4.662	0.389	0.996
肺	25.861	17.214	16.879	1.137	1.749
肾脏	26.030	27.523	29.094	1.806	2.996
脑	6.288	6.437	4.449	1.748	1.896

表 7 小鼠口服 MMs 后各组织 RT_e 和 C_e Table 7 RT_e and C_e of each tissue after oral administration of nanomicelle group in mice

组织	RT_e		C_e	
	Qu MMs	LA-Qu MMs	Qu MMs	LA-Qu MMs
心脏	0.489	0.413	0.705	1.590
肝脏	3.754	3.800	10.818	12.545
脾脏	0.228	0.371	2.629	2.326
肺	0.666	0.653	5.126	5.796
肾脏	1.057	1.118	8.366	7.559
脑	1.023	0.707	0.934	0.722

解能力,对于反应溶剂的去除问题,用 0.1 mol/L HCl 多洗一两次,在醋酸乙酯的浓缩过程中,随着溶剂的减少逐渐提高水浴的温度至 70 °C,直至彻底去除溶剂。采用薄膜分散法制备了 MMs,决定胶束是否制备成功的最关键因素为磷脂/胆盐比,其次是投药量。LA-Qu MMs 相较于 Qu MMs,其载药量和包封率均有所增加,稳定性更佳,较高的稳定性和载药量,增强了药物递送效率。

药动学实验中,Qu SUS 体内的消除速度快于 MMs,LA-Qu MMs 在体内保留时间较长,且缓慢持续释放槲皮素。Qu SUS、Qu MMs、LA-Qu MMs 中槲皮素的平均 C_{max} 分别为 6.000、0.333、0.750 h,表明将槲皮素包载在纳米胶束中,能促进其快速吸收,主要是由于磷脂/胆盐载体材料的增溶作用及纳米粒子以较小的粒径,较大的分散度,增加了表面积,促进了药物在体内快速溶出。

在组织分布实验中,3 组制剂在所有组织中均能检测到原药槲皮素,而没有检测到 LA-Qu,这与血浆样品的结果一致,进一步说明 LA-Qu 在体内被酯酶降解,合成的酯键断裂,释放出原药。LA-Qu MMS 中的槲皮素主要在肝脏、肾脏、肺中分布蓄积,尤其对肝脏的选择性强,其在不同组织的分布

浓度均高于 Qu MMs 和 Qu SUS。

综上所述,本研究基于药物-脂质共轭物和磷脂/胆盐混合纳米胶束的技术,采用月桂酸对槲皮素进行亲脂性修饰,得到 LA-Qu,从而提高其在纳米胶束中的载药量与包封率,显著提高口服生物利用度。后续需对该纳米制剂继续更深入的如 Caco-2 细胞摄取、淋巴转运等吸收机制及药效学研究,为槲皮素制剂学研究提供借鉴。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 林春草, 陈大伟, 戴均贵. 黄酮类化合物合成生物学研究进展 [J]. 药学报, 2022, 57(5): 1322-1335.
- [2] Georgiou N, Kakava M G, Routsis E A, *et al.* Quercetin: A potential polydynamic drug [J]. *Molecules*, 2023, 28(24): 8141.
- [3] Mansour F R, Abdallah I A, Bedair A, *et al.* Analytical methods for the determination of quercetin and quercetin glycosides in pharmaceuticals and biological samples [J]. *Crit Rev Anal Chem*, 2025, 55(1): 187-212.
- [4] 邱振阳, 梁仲欢, 白思晓, 等. 槲皮素包合物工艺及果冻研究 [J]. 湖北农业科学, 2020, 59(7): 167-173.
- [5] 何朝星, 孙玉林, 贾佳, 等. 槲皮素三元自组装纳米胶束的制备及表征 [J]. 中国药理学杂志, 2022, 57(22): 1911-1916.
- [6] Frenț O D, Stefan L, Morgovan C M, *et al.* A systematic review: Quercetin-secondary metabolite of the flavonol class, with multiple health benefits and low bioavailability [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(22): 12091.
- [7] Alizadeh S R, Ebrahimzadeh M A. Quercetin derivatives: Drug design, development, and biological activities, a review [J]. *Eur J Med Chem*, 2022, 229: 114068.
- [8] Osonga F J, Onyango J O, Mwilu S K, *et al.* Synthesis and characterization of novel flavonoid derivatives via sequential phosphorylation of quercetin [J]. *Tetrahedron Lett*, 2017, 58(15): 1474-1479.
- [9] Calias P, Galanopoulos T, Maxwell M, *et al.* Synthesis of inositol 2-phosphate-quercetin conjugates [J]. *Carbohydr Res*, 1996, 292: 83-90.
- [10] Cao J N, Wang W H, Qu Y J, *et al.* Biosynthesis and evaluation of a novel highly water-soluble quercetin glycoside derivative [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2022, 24(8): 754-760.
- [11] Chen W Y, Ju X R, Aluko R E, *et al.* Rice bran protein-based nanoemulsion carrier for improving stability and bioavailability of quercetin [J]. *Food Hydrocolloid*, 2020, 108: 106042.

- [12] Kumar S M, Bibaran G, Prasad K P, *et al.* Quantification of the quercetin nanoemulsion technique using various parameters [J]. *Molecules*, 2023, 28(6): 2540.
- [13] Su Y T, Zhou Q, Xu H, *et al.* Enhancing the bioavailability of quercetin via the construction of carboxymethylated curdlan/quercetin nanocomplex [J]. *Food Hydrocolloid*, 2024, 149: 109502.
- [14] 马玉花, 方玉, 保怡, 等. 药物-脂质共轭物研究进展 [J]. *药学学报*, 2020, 55(10): 2281-2290.
- [15] Zhang S S, Zhao L D, Peng X, *et al.* Self-assembled phospholipid-based mixed micelles for improving the solubility, bioavailability and anticancer activity of lenvatinib [J]. *Colloid Surface B*, 2021, 201: 111644.
- [16] Vahid F M, Mattias O H, Katarina E, *et al.* Investigation of the enhanced ability of bile salt surfactants to solubilize phospholipid bilayers and form mixed micelles [J]. *Soft Matter*, 2021, 17(33): 7769-7780.
- [17] Ma Y H, He H S, Fan W F, *et al.* *In vivo* fate of biomimetic mixed micelles as nanocarriers for bioavailability enhancement of lipid-drug conjugates [J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2017, 3(10): 2399-2409.
- [18] Dong F X, Xie Y C, Qi J P, *et al.* Bile salt/phospholipid mixed micelle precursor pellets prepared by fluid-bed coating [J]. *Int J Nanomed*, 2013, 8: 1653-1663.
- [19] 毛雅君, 邵香敏, 李阳杰, 等. 槲皮素衍生物的合成研究进展 [J]. *有机化学*, 2022, 42(11): 3588-3605.

[责任编辑 郑礼胜]