Bào chế hệ thống phân phối thuốc Rutin-liposome và đánh giá hoạt tính chống oxy hóa *in vitro.*

Tóm lược:

Mục tiêu: Bào chế, mô tả đặc tính và đánh giá hoạt tính chống oxy hóa của rutin-liposome (RL). Phương pháp: Liposome của rutin được điều chế bằng phương pháp phân tán màng film, hiệu quả đóng gói (EE) được xác định bằng RP-HPLC. Nhân loại tế bào nội mô tĩnh mạch rốn (HUVECs) bị tổn thương bởi H2O2 và được điều trị bằng rutin tự do trong nước hoặc hệ thống phân phối RL. Khả năng tồn tại của HUVECs đã được xác định bởi MTT và ELISA. Kết quả: Hệ thống phân phối thuốc cho thấy lượng rutin được nạp đồng đều các hạt nano với kích thước hạt trung bình là (147,20 ± 1,42) nm, chỉ số phân tán của (0,191 ± 0,003) nm, thế Zeta là (-20,0 ± 1,0) mV và EE của thuốc được đóng thành 90,0%. Tác dụng chống oxy hóa của hệ thống phân phối thuốc đối với các HUVEC bị hư hỏng do H2O2 cho thấy RL có thể làm tăng khả năng tồn tại của các tế bào tổn thương so với rutin dạng nước tự do, đi kèm với sự giảm rõ rệt malondialdehyde (MDA), lactate dehydrogenase (LDH) trong khi tăng mức độ oxit nitơ (NOS). Kết luận: RL cấu trúc nano được cải thiện về tác dụng chống oxy hóa và có thể điều trị các bệnh khác nhau do các gốc tự do gây ra.

Từ khóa: hoạt tính chống oxy hóa, liposome, bào chế, rutin

1. Giới thiệu

Rutin (quercetin-3-O-rutinoside) là một flavonoid tự nhiên glycoside được tìm thấy trong nụ hoa của Scphora japonica L, và nó cũng có mặt trong nhiều loài thực vật khác như Fagopyrum esculentum Moench, Hypericum ascyron L., Ruta Tombolens L., vv. Nó thể hiện các đặc tính hấp thu đáng kể oxy gốc cả *in vitro* và *in vivo*. Nó cũng trưng bày một số các đặc tính dược lý quan trọng, bao gồm cả kháng vi-rút, tác dụng bảo vệ mạch và chống viêm (Li và cộng sự, 2014; Kandemir và cộng sự, 2015; Cheron và cộng sự, 2015; Mendes-Junior và cộng sự, 2013). Tuy nhiên, rutin thể hiện độ hòa tan thấp trong nước,

dẫn đến hiệu quả hấp thụ đường uống hoặc khả dụng sinh học kém (Almeida và cộng sự, 2010; Mauludin và cộng sự, 2009). Do đó, có một quan tâm đáng kể đến sự phát triển của phân phối rutin mới hệ thống để cải thiện hiệu quả điều trị rutin. Liposome là chất mang tiềm năng cho thuốc tiên tiến vì liposome có thành phần phospholipid tương tự như lớp kép lipid của màng tế bào trong cơ thể (Kozubek và cộng sự, 2000). Bên cạnh đó, cả hai loại kỵ nước và thuốc ưa nước có thể được tải trong không gian bên trong của

liposome. Các túi liposome có những ưu điểm của khả năng tương thích sinh học, khả năng phân hủy sinh học và độc tính thấp. Liposome là một chất mang đầy hứa hẹn cho các loại thuốc chống khối u và có được sử dụng để bao bọc một số loại thuốc kỵ nước để cải thiện tính khả dụng sinh học và giảm các tác dụng phụ (Ruttala và cộng sự, 2015).

Mục tiêu của cuộc điều tra này là chuẩn bị, mô tả đặc điểm và đánh giá hoạt động chống oxy hóa của rutinliposome (RL). Đặc điểm của liposome như chỉ số phân tán đa, thế Zeta, kích thước hạt, khả năng giải phóng và ổn định trong ống nghiệm đã được thực hiện. Các hoạt động chống oxy hóa của RL được đánh giá bởi chất bảo vệ ảnh hưởng của chấn thương đối với tế bào nội mô tĩnh mạch rốn của con người (HUVECs) do H2O2 gây ra.

2. Vật liệu và phương pháp

2.1 Hóa chất

Rutin được lấy từ Viện Quốc gia về Kiểm soát Dược phẩm và Sản phẩm Sinh học (Bắc Kinh, Trung Quốc). Phosphatidylcholine (PC), cholesterol (CH), và metyl thiazolyl tetrazolium (MTT) được cung cấp bởi Thuốc thử Aladdin (Thượng Hải, Trung Quốc). Polysorbate 80 (Tween 80) được mua từ Sino Regent (Thượng Hải, Trung Quốc).

HUVECs được cung cấp bởi Công nghệ sinh học BaiLi Thượng Hải Công ty TNHH (Trung Quốc). Hydrogen peroxide (H2O2) và đimetylsulfoxit (DMSO) được thu được từ

Công ty TNHH Sigma-Aldrich (Mỹ). Bộ thuốc thử cho đo lường MDA, NOS và LDH đã được mua từ Viện Kỹ thuật Sinh học Kiến Thành Nam Kinh (Trung Quốc). Tất cả các thuốc thử khác dùng phân tích hoặc sắc kí lỏng hiệu năng cao.

2.2 Chuẩn bị các hạt nano được nạp rutin

Các hạt nano liposome nạp Rutin được điều chế bởi

phương pháp phân tán màng. Hệ thống phân phối đã được chuẩn bị trước

trong môi trường etanol (10 mL) có chứa rutin-PC-CH 0,15: 5: 1

trong thiết bị bay hơi quay ở 40 oC và 60 vòng / phút trong 1 giờ. Mỏng

các sản phẩm màng lipid được hydrat hóa thấp bằng cách sử dụng phốt phát

đệm (15 mL, pH 6,8 và chứa Tween 80) dưới mức thấp

tốc độ trong thiết bị cô quay ở 40 oC trong 30 phút. Các hỗn hợp

được tạo âm trong 10 phút và sau đó được lọc qua

Màng lọc vi xốp 0,22 μm và trưởng thành qua đêm

ở 4 oC. Các hệ thống phân phối trống không có rutin cũng

chuẩn bị theo cách tương tự.

2.3 Đặc tính của các hạt nano được nạp rutin

2.3.1 Hiệu quả đóng gói

Sau khi sơ chế các hạt nano RL, dung dịch nước

pha được thu thập ở 10 000 vòng / phút trong 20 phút ở 4 o

C với một

máy ly tâm lạnh (5810R, Eppendorf), và rutin

Nội dung trong pha nước được xác định là thất thoát thuốc (Yu

và cộng sự, 2014; Ourique và cộng sự, 2008). Nồng độ rutin

được xác định bởi Shimadzu HPLC Instrument (LC-2010A,

C-18, 150 mm × 4,60 mm). Các mẫu đã được rửa giải bằng cách sử dụng

metanol-nước (50:50) với axit axetic (pH biểu kiến ​​4,0) ở

tốc độ dòng 1,0 mL / phút và được phát hiện ở bước sóng 352 nm.

Hiệu suất đóng gói (EE) được tính toán là EE = (tổng

thuốc - thuốc mất tác dụng) / tổng số thuốc

2.3.2 Kích thước hạt, chỉ số phân tán và thế Zeta

Kích thước và chỉ số phân tán của các hạt nano RL trong

đệm photphat với độ pha loãng thích hợp được đo bằng

phương pháp tán xạ ánh sáng laze. Các tiềm năng của Zeta là

được xác định bởi Zeta sizer (Kích thước hạt Laser Nano-ZS90

Máy phân tích, Malvan, Anh).

2.3.3 Tính ổn định và giải phóng rutin

Tính ổn định của các hạt nano liposome được nạp rutin là

được đánh giá sau khi bảo quản ở 4 o

C và nhiệt độ phòng trong sáu

tháng, tương ứng. Sự phân bố kích thước hạt và EE của

mẫu được xác định tại thời điểm lưu trữ.

Lượng hạt nano RL 2 mL được đưa vào thẩm tách

túi, sau đó ngâm trong 200 mL nước-etanol (70:30) và

lắc trong bể nước lắc ở 37 o

C (Ourique và cộng sự, 2008;

Stancel và cộng sự, 2016). Tại các khoảng thời gian định trước, 2 mL bên ngoài

phương tiện từ hệ thống đã được loại bỏ để đo HPLC

diện tích đỉnh và thể tích tương đương của môi trường tươi đã được thêm vào

hệ thống lọc máu.

2.4 Hoạt động chống oxy hóa

2.4.1 Thử nghiệm khả năng tồn tại của tế bào

HUVECs được nuôi cấy trong DMEM bổ sung với

10% huyết thanh bò thai (FBS) và 1 mg / mL ceftriaxone trong

tủ ấm ẩm ở 37 o

C và 5% CO2. Lôgarit

HUVECs đang phát triển được gieo vào các đĩa 96 giếng ở 5000

tế bào / giếng và được ủ để kết dính qua đêm. sau đó

tế bào bị bỏ đói với môi trường nuôi cấy chứa 0,1%

FBS trong 24 giờ. Sau đó, các tế bào được ủ trước với

nồng độ rutin và RL khác nhau trong 24 giờ, với sáu

nhân rộng các giếng cho mỗi nhóm và kích thích bằng H2O2

(1 mmol / L) tương ứng trong 4 giờ khác. Tế bào đã được xử lý

với vitamin C ở nồng độ 1 × 103 μg / mL là dương tính

mẫu thuốc. Sau khi ủ, 150 μL DMEM chứa

0,5 mg / mL MTT được thêm vào mỗi giếng và ủ cho

4 giờ nữa. Sau khi loại bỏ môi trường, các tế bào được đưa vào

150 μL DMSO và độ hấp thụ được ghi lại ở bước sóng 570 nm

của độc giả ELISA.

2.4.2 Đo các chất nổi trên bề mặt văn hóa LDH, MDA,

và cấp độ NOS

Các HUVEC được mạ ở 10 000 tế bào / giếng vào

24 đĩa giếng, với sáu giếng lặp lại cho mỗi nhóm. Các

tế bào được nuôi cấy và tiền xử lý như phương pháp trên. Sau

xử lý và ủ các tế bào, các chất nổi trên mặt của chúng là

được thu hoạch để xác định mức NOS, MDA và LDH

với các bộ dụng cụ có bán trên thị trường.

2.5 Phân tích thống kê

Các công thức đã được chuẩn bị và phân tích trong ba lần.

Guo Y và cộng sự. Thuốc thảo dược Trung Quốc, 2016, 8 (4): 371-375 373

Tất cả dữ liệu được phân tích bằng gói phần mềm SPSS18.0

(SPSS, Hoa Kỳ). Phân tích phương sai một chiều (ANOVA) là

được sử dụng để xác định sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa

các nhóm và phương tiện của mỗi hai nhóm khác nhau là

được phát hiện với thử nghiệm t. Tất cả các giá trị được biểu diễn dưới dạng ± sx

từ ít nhất ba thí nghiệm độc lập. Thống kê

mức ý nghĩa được xác định là P <0,05 hoặc 0,01.