

叶酸修饰的水飞蓟宾固体脂质纳米粒体内药动学及靶向性研究

于 莲, 杜 妍, 平 洋, 郭 宇

佳木斯大学药学院 黑龙江省高校生物药制剂重点实验室, 黑龙江 佳木斯 154007

摘 要: 目的 对连接叶酸主动靶向头的水飞蓟宾固体脂质纳米粒 (FA-SIL-SLN) 进行大鼠体内药动学和小鼠体内靶向性研究。方法 大鼠或小鼠尾 iv 给予水飞蓟宾 (silybin, SIL) 水溶液、水飞蓟宾固体脂质纳米粒 (SIL-SLN) 溶液和 FA-SIL-SLN 溶液, HPLC 法检测不同时间血浆和各组织中 SIL 浓度, 利用 3P97 软件统计学方法分析 SIL 在大鼠体内的药动学特征及小鼠体内靶向性。结果 FA-SIL-SLN 与 SIL 水溶液组和 SIL-SLN 组相比具有良好的缓释能力和长循环特性, 肺部相对摄取率 (r_e) 为 SIL 水溶液的 3.98 倍; 相对靶向系数 (t_e) 为 SIL 水溶液的 2.85 倍, 同时, 能减少药物在心脏和肾脏中的分布。结论 SIL-SLN、FA-SIL-SLN 具有明显的缓释作用及肺部靶向性, 可降低药物对心脏、肾脏的毒副作用。

关键词: 水飞蓟宾; 叶酸; 药动学; 靶向性; 固体脂质纳米粒; 缓释; 组织分布

中图分类号: R285.61 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)08-1110-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.08.013

In vivo pharmacokinetic and targeting study on silybin solid lipid nanoparticles modified by folic acid

YU Lian, DU Yan, PING Yang, GUO Yu

Key Laboratory of Biopharmaceutics in Heilongjiang, College of Pharmacy, Jiamusi University, Jiamusi 154007, China

Abstract: Objective The silybin solid lipid nanoparticles (SIL-SLN), which is connected folic acid (FA) active targeting head, were studied on the *in vivo* pharmacokinetics of rats and *in vivo* targeting of mice. **Methods** SIL solution, SIL-SLN, and FA-SIL-SLN were iv injected by tail of rats or mice, respectively. The SIL concentration in the plasma and tissues was detected by HPLC method at different time points. The *in vivo* pharmacokinetic characteristics in rats and *in vivo* targeting data in mice were analyzed by statistical methods with 3P97 software. **Results** Compared with solution group and SIL-SLN group, FA-SIL-SLN has good sustained-release ability and long-cycle characteristics, r_e value of the lung in FA-SIL-SLN is 3.98 times higher than that in the control group, and t_e value is 2.85 times higher than that in the SIL solution group; Meanwhile, it can reduce the drug distribution in heart and kidney. **Conclusion** The *in vivo* tests show that SIL-SLN and FA-SIL-SLN have the obvious sustained-release effect and lung targeting, and also can reduce the toxicity of drugs in heart and kidney.

Key words: silybin; folic acid; pharmacokinetics; targeting; solid lipid nanoparticles; sustained-release; tissue distribution

肺癌已成为全世界死亡率最高的癌症, 据 WHO 的统计, 全世界每年新增约 104 万肺癌患者^[1], 非小细胞肺癌 (NSCLC) 的发生率占有所有肺癌患者的 75%~80%^[2]。近几年来, 虽然抗癌药物的研发有较大的进展, 但是对 NSCLC 患者而言, 药物的疗效、不良反应、生存年限及生活质量还存在很多问题。水飞蓟宾 (SIL) 是从菊科植物水飞蓟种子中提取的有效成分, 对多种化学致癌剂诱导肿瘤模型具有很强的治疗作用^[2]。

本研究在制备水飞蓟宾固体脂质纳米粒 (SIL-SLN) 的基础上, 以聚乙二醇 (PEG) 为桥梁, 连接叶酸与固体脂质纳米粒, 制备了叶酸修饰水飞蓟宾固体脂质纳米粒 (FA-SIL-SLN), 并对其进行大鼠体内药动学以及小鼠体内靶向性研究, 以期延长药物的半衰期, 从而提高对 NSCLC 的治疗效果。

1 材料

1.1 仪器

DF—101S 集热式恒温加热磁力搅拌器 (河南

收稿日期: 2013-12-31

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (41274101); 黑龙江省教育厅重点项目 (12511z027)

作者简介: 于 莲 Tel: 13845405552 E-mail: jdyulian@163.com

省予华仪器有限公司); 超声波细胞粉碎机 (宁波新芝生物科技股份有限公司); TGL—16M 台式高速冷冻离心机 (长沙平凡仪器仪表有限公司); Agilent1100 高效液相色谱仪 (美国安捷伦公司); XW—80A 旋涡混合器 (上海精科实业有限公司)。

1.2 药品与试剂

SIL (质量分数 90.6%, 批号 10031025, 佳木斯三江水飞蓟素制品有限公司), SIL 对照品 (质量分数 99.9%, 批号 10082633, 天津一方科技有限公司), SIL-SLN 及 FA-SIL-SLN 由黑龙江省高校生物药剂学重点实验室制备, 1-萘酚 (天津一方科技有限公司), 甲醇、无水乙醚 (色谱级, 天津市科密欧化学试剂有限公司), 冰醋酸 (天津市恒兴化学试剂制造有限公司), 其他试剂均为色谱纯。

1.3 动物

Wistar 大鼠, 雌雄各半, 体质量 (220±20) g, 由大连医科大学动物实验中心提供。昆明种小鼠, 雌雄各半, 体质量 (20±5) g, 由黑龙江中医药大学动物实验中心提供。

2 方法与结果

2.1 FA-SIL-SLN 制备

采用乳化超声分散法制备 FA-SIL-SLN。取适量单硬脂酸甘油酯加入少量无水乙醇助融, 加入 SIL, 水浴加热至熔融, 作为油相。称取泊洛沙姆

188 适量, 加入 20 mL 蒸馏水超声溶解, 称取适量脑磷脂, 加入少量无水乙醇超声溶解后加入泊洛沙姆 188 中, 作为水相。将水相加热至同温度后滴加至油相中, 乳化 10 min 后超声破碎 (600 W, 8 min, 3 s 间隔), 置于 4 ℃ 水浴中固化, 过 0.22 μm 滤膜滤过即得普通 SIL-SLN, 在普通 SIL-SLN 制备和处方的基础上, 油相中加入 3% 膜材 (溶于氯仿), 制备 FA-SIL-SLN^[3]。

2.2 体内药动学分析

2.2.1 色谱条件 色谱柱 C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水-冰醋酸 (50:50:0.5); 体积流量 1 mL/min; 柱温为室温; 检测波长为 287 nm; 进样量为 5 μL; 内标物为 1-萘酚。

2.2.2 专属性考察 分别取大鼠空白血浆和血浆样品, 加入 pH 值为 5 的磷酸盐缓冲液 200 μL、内标溶液 50 μL, 涡旋 5 min 混匀, 2.0 mL 乙醚萃取 2 次, 涡旋 5 min, 得提取液。将提取液置于 40 ℃ 水浴中挥干, 残渣用流动相 100 μL 溶解, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液 5 μL 进样, HPLC 测定, 记录峰面积。结果见图 1。该方法专属性良好, 在上述色谱条件下, 药物峰与内标峰峰形、分离度良好; 血浆中内源性杂质对 SIL 和内标的测定均无干扰, 其中保留时间 7.281、8.270 min 为 SIL 峰, 保留时间 11.655 min 为内标峰。

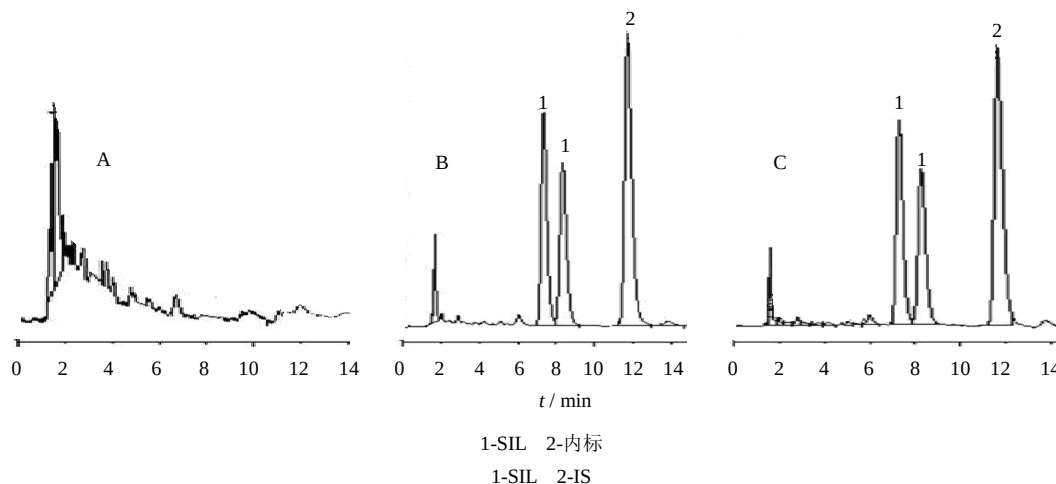


图1 空白血浆 (A)、空白血浆加入 SIL 对照品和内标 (B) 和血浆样品 (C) HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC of blank plasma (A), blank plasma spiked with SIL reference substance and internal standard (B), and plasma sample (C)

2.2.3 标准曲线的制备 取大鼠空白血浆, 加入 SIL 对照品及内标适量, 配制成 SIL 质量浓度分别为 0.05、0.10、0.50、1.00、2.00、5.00、10.00 μg/mL 的对照品溶液。按“2.2.2”项方法操作, 进样测定。以 SIL 与内标峰峰面积比值 (Y) 对血浆样品中 SIL 质

量浓度 (X) 进行回归, 得标准曲线方程: $Y=0.4055X-0.0427$ ($r=0.9987$), 在 0.05~10 μg/mL 内线性关系良好。

2.2.4 动物分组及给药 Wistar 大鼠 18 只, 随机分为 3 组。实验前禁食 10 h, 分别尾 iv SIL 水溶液、

SIL-SLN、FA-SIL-SLN (精密称取含 SIL 相同量的 SIL 原料药、SIL-SLN 和 FA-SIL-SLN 冻干粉末, 无菌注射用水溶解) 2 mg/kg, 于给药后 0.083、0.16、0.33、0.5、0.75、1、2、6、12 h 眼眶静脉丛取血约 0.5 mL, 置于涂有肝素的试管中, 10 000 r/min 离心 5 min, 分离出血浆, -20 °C 保存待测。

2.2.5 血浆样品的测定 取血浆适量, 按“2.2.2”项方法处理、测定, 根据标准曲线方程计算血药浓度, 绘制 SIL 水溶液组、SIL-SLN 组、FA-SIL-SLN 组 SIL 的血药浓度-时间曲线, 结果见图 2。尾 iv SIL-SLN 组和 SIL 水溶液组的 SIL 血药浓度均较 FA-SIL-SLN 组有所提高。将所得血药浓度-时间数据用 3P97 软件进行统计矩分析, 药动学参数结果见表 1。FA-SIL-SLN 组血浆 AUC 值小于其他 2 组, 说明 FA-SIL-SLN 在血液中释放药量较少, 能够保证药物在到达靶部位时的释放量, 在制备 FA-SIL-SLN 的膜材中还加入了 PEG, 进而增加了制剂在体内的循环时间, 达到长循环的效果。

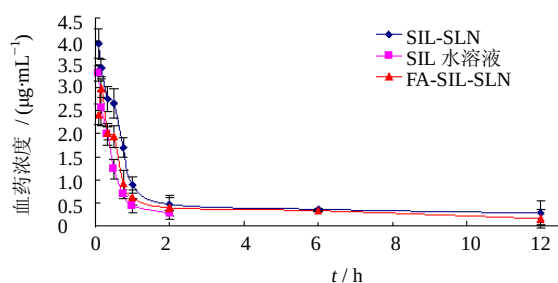


图 2 大鼠 iv 给予 SIL 不同制剂后 SIL 血药浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Concentration-time curve of SIL in rat plasma after iv administration of various SIL preparations ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

2.3 体内靶向性研究

2.3.1 色谱条件 按“2.2.1”项体内药动学色谱分析条件。

2.3.2 专属性考察 分别取小鼠各空白组织和组织样品, 制备组织匀浆液, 取各组织匀浆液 200 μ L 加入离心管中, 加入 pH 值为 5 的磷酸盐缓冲液 200 μ L、内标溶液 500 μ L, 涡旋 5 min 混匀, 2.0 mL 乙醚萃取 2 次, 涡旋 5 min, 得提取液。将提取液置于 40 °C 水浴中挥干, 残渣用流动相 100 μ L 溶解, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液 5 μ L 进样, HPLC 测定, 记录色谱图, 结果见图 3。

2.3.3 标准曲线的制备 吸取小鼠各空白组织匀浆

表 1 SIL 大鼠体内主要药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Major *in vivo* pharmacokinetic parameters of SIL in rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

参数	单位	SIL 水溶液	SIL-SLN	FA-SIL-SLN
AUC _{0-t}	mg·L ⁻¹ ·h	10.933	35.095	6.586
AUC _{0-∞}	mg·L ⁻¹ ·h	11.479	36.474	6.633
AUMC _{0-t}		28.235	301.229	10.276
AUMC _{0-∞}		37.225	366.598	12.666
MRT _{0-t}	h	2.582	8.583	1.560
MRT _{0-∞}	h	3.243	10.051	1.910
t _{1/2}	h	3.080	7.795	1.570
C _{max}	mg·L ⁻¹	6.812	7.226	6.420

液, 加入 SIL 对照品溶液及内标溶液, 配制 SIL 质量浓度为 0.05、0.5、1.0、5.0、10、30 μ g/mL 小鼠组织样品液。按“2.3.2”项组织样品的处理方法操作。以 SIL 与内标色谱峰峰面积比值对组织样品中 SIL 质量浓度进行回归运算, 绘制标准曲线方程, 结果见表 2。由结果可知 SIL 在小鼠心脏、肝脏、脾、肺、肾脏组织中在 0.1~20 μ g/mL 内线性关系良好。

2.3.4 动物分组及给药 60 只小鼠, 随机分为 3 组。分别尾 iv SIL 水溶液、SIL-SLN、FA-SIL-SLN 5 mg/kg, 分别于给药后 0.5、2、6、12 h 各组随机取 5 只小鼠处死, 取心脏、肝脏、脾、肺、肾脏组织, 精密称取各组织适量, 加入生理盐水匀浆, 制备得各组织匀浆液。

2.3.5 组织样品的测定 取各组织样品匀浆液, 按“2.3.2”项方法处理、测定, 记录峰面积。根据标准曲线方程计算各脏器中药物浓度。结果见图 4。

由图 4 可知, SIL 3 种制剂 iv 给药后 0.5 h 时 SIL 在肺中分布最多, SIL 组 > FA-SIL-SLN 组 > SIL-SLN 组, 从 2 h 开始 SIL 在肺中分布为 FA-SIL-SLN 组 > SIL-SLN 组 > SIL 组, 并持续至 12 h, FA-SIL-SLN 组与 SIL-SLN 组和 SIL 组比较具有显著性差异 ($P < 0.001$)。FA-SIL-SLN 组对肝脏、脾靶向性次之, 提示 FA-SIL-SLN 组有缓释作用并且对肺具有靶向性。

2.4 体内靶向性评价

靶向性评价采用 3 个指标, 分别为相对摄取率 (r_e)、相对靶向系数 (t_e) 和总靶向系数 (T_e^C), 计算公式如下:

$$r_e = \text{AUC}_{\text{靶向制剂}} / \text{AUC}_{\text{普通制剂}}$$

$$t_e = \text{AUC}_i \text{ 靶器官} / \text{AUC}_i \text{ 非靶器官}$$

$$T_e^C = \text{AUC}_i / \sum \text{AUC}_i$$

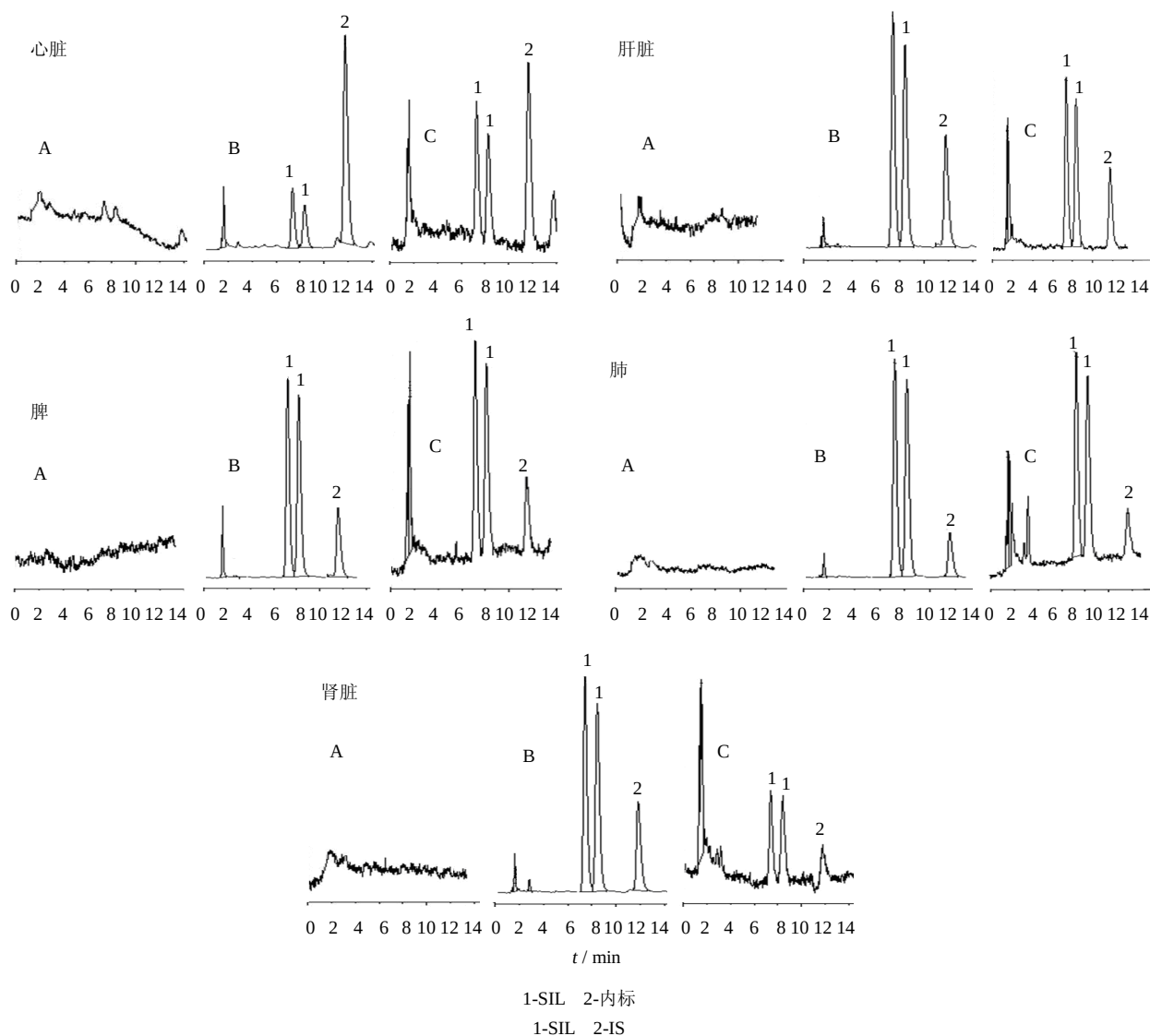


图 3 小鼠空白组织 (A)、空白组织加入 SIL 对照品和内标 (B) 及组织样品 (C) HPLC 色谱图
Fig. 3 HPLC of blank tissue (A), blank tissue spiked with SIL and internal standard (B), and tissue sample (C)

表 2 SIL 在小鼠不同组织中的标准曲线
Table 2 Standard curve of SIL in different tissues of mice

组织	标准曲线	r
心脏	$Y=5.772\ 3\ X+0.045\ 1$	0.999 2
肝脏	$Y=8.484\ 9\ X+0.157\ 3$	0.998 9
脾	$Y=2.477\ 3\ X+0.008\ 5$	0.998 1
肺	$Y=1.135\ 2\ X-0.121\ 8$	0.999 5
肾脏	$Y=3.755\ 0\ X+0.191\ 5$	0.999 2

计算得到 SIL-SLN 和 FA-SIL-SLN 的 r_e 、 t_e 、 T_e^C 值, 结果见表 3。由 r_e 值可知, FA-SIL-SLN 在各组织中分布顺序依次为肺>肝脏>脾>肾脏>心脏, SIL-SLN 和 FA-SIL-SLN 肺部的 r_e 值分别为

2.19 和 2.22, 表明对肺有一定靶向性, 且 FA-SIL-SLN 大于 SIL-SLN。FA-SIL-SLN 血浆的 r_e 值为 1.05, 显示有一定的靶向性, 间接反映出 FA-SIL-SLN 制剂有一定长循环作用; 除肝脏的 r_e 值为 1.04 和 1.14 外, 其他组织的 r_e 值均小于 1。

3 讨论

大鼠尾 iv FA-SIL-SLN 后, 0.083 h 取血样测得血中药物浓度为 2.417 $\mu\text{g/mL}$, 0.16 h 测得血样中药物浓度为 2.984 $\mu\text{g/mL}$, 第 1 个时间点的浓度比第 2 个时间点的浓度低, 可能与大鼠之间个体差异有关, 也可能是实验操作误差, 在今后的研究中应加以注意。

通过大鼠和小鼠尾 iv SIL 水溶液、SIL-SLN 和

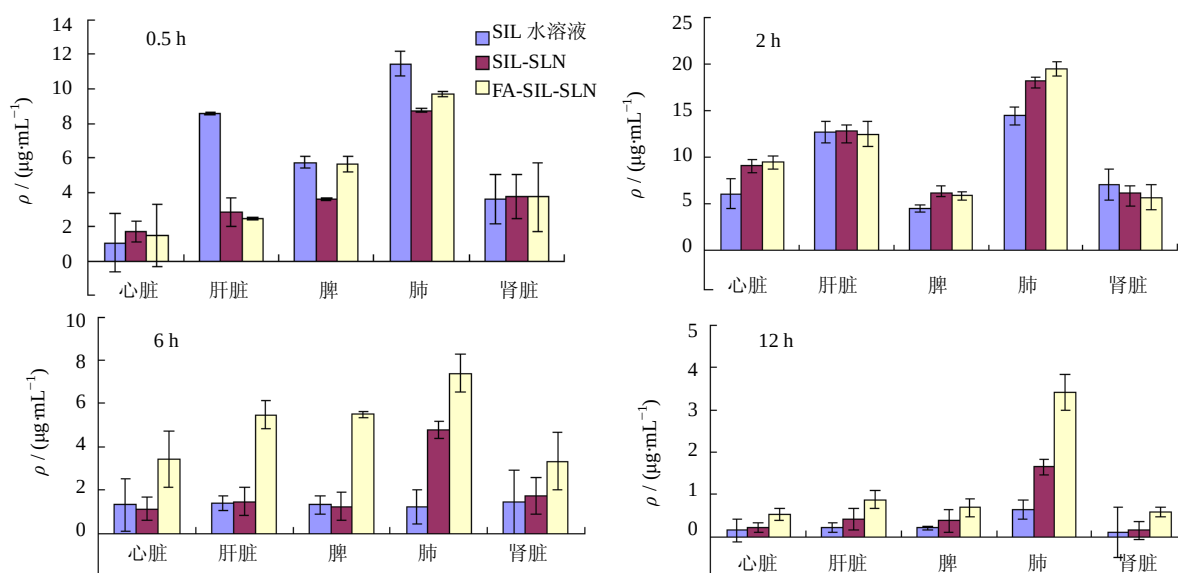
图4 小鼠 iv 给予 SIL 不同制剂后不同时间 SIL 的组织分布 ($\bar{x} \pm s, n=5$)Fig. 4 Tissue distribution of various SIL preparations after iv administration in different time ($\bar{x} \pm s, n=5$)

表3 体内靶向性评价指标

Table 3 Evaluation indexes of *in vivo* targeting

组织	r_e		t_e		T_e^C	
	SIL-SLN	FA-SIL-SLN	SIL-SLN	FA-SIL-SLN	SIL-SLN	FA-SIL-SLN
心脏	0.83	0.73	0.81	0.91	0.71	0.69
肝脏	1.04	1.14	1.30	1.02	1.13	1.03
脾	0.99	0.96	0.94	0.88	0.83	0.88
肺	2.19	2.22	1.67	1.72	1.44	1.57
肾脏	0.86	0.89	0.92	0.95	0.80	0.72

FA-SIL-SLN 研究了药物的体内药动学过程及体内组织分布。靶向性分析中 r_e 值说明 2 种制剂在同一器官或组织中的药物分布情况,不能反映制剂在不同器官的靶向效率,因此引入参数 t_e 。靶向性结果表明,FA-SIL-SLN 相比 SIL 水溶液和 SIL-SLN 有良好的缓释能力和长循环特性,FA-SIL-SLN 对肺有良好的靶向性,对肺以外组织无靶向性。

参考文献

- [1] 胡义德, 钱桂生. 肺癌生物及分子靶向治疗临床研究进展 [J]. 国外医学: 呼吸系统分册, 2005, 31(2): 25-28.
- [2] 徐文鸿. 非小细胞肺癌治疗新进展 [J]. 国外医学: 肿瘤学分册, 2002, 29(6): 433-436.
- [3] 于 莲, 杜 妍, 田丽华, 等. 叶酸修饰水飞蓟宾固体脂质纳米粒的制备及其对 A549 细胞抑制作用研究 [J]. 中草药, 2012, 43(2): 158-164.