

· 药物代谢 ·

棉酚纳米混悬剂在小鼠体内的药代动力学及组织分布

王建程, 唐辉*, 杨四涛, 应雪, 刘怡娟

(新疆特种植物药资源教育部重点实验室, 新疆 石河子 832002)

[摘要] 目的:考察棉酚纳米混悬剂在小鼠体内的药代动力学及组织分布特性。方法:采用 HPLC 测定生物样品中棉酚的含量,流动相甲醇-0.4% 磷酸水(85:15),检测波长 238 nm。比较棉酚纳米混悬剂和棉酚溶液经尾静脉给药后体内药代动力学参数与组织分布特点的差异。结果:棉酚纳米混悬剂的血药浓度时间曲线面积、药物体内滞留时间、表观分布容积、消除速率和最大血药浓度分别为 $(18\ 792.56 \pm 2\ 304.43) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, $(21.82 \pm 1.60) \text{h}$, $(0.75 \pm 0.16) \text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$, $(1.37 \pm 0.37) \text{L} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, $(17\ 589.81 \pm 3\ 034.14) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。棉酚纳米混悬剂在肝、心、脾、肺及肾中的相对摄取率分别为 1.44, 3.21, 12.19, 1.88, 6.54。结论:棉酚纳米混悬剂能显著提高药物在各组织中的浓度水平,且延长了药物在体内组织的滞留时间,提高药物生物利用度,并在一定程度上延长药物在动物体内的循环时间。纳米混悬剂很有可能成为棉酚的一种新型药物传递系统。

[关键词] 棉酚; 纳米混悬剂; 药代动力学; 组织分布

[中图分类号] R969.1; R283.6; R944.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)10-0083-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015100083

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150401.0934.015.html>

[网络出版时间] 2015-04-01 9:34

Pharmacokinetics and Tissue Distribution of Gossypol Nanosuspensions in Mice WANG Jian-cheng, TANG Hui*, YANG Si-tao, YING Xue, LIU Yi-juan (Key Laboratory of Phytomedicine Resources and Modernization of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Shihezi 832002, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate pharmacokinetics and tissue distribution of gossypol nanosuspensions (GP-NS) in mice. **Method:** HPLC was established to determine the concentration of gossypol in serum and different tissues of mice. After tail administration of GP-NS and gossypol solution, their pharmacokinetics and tissue distribution differences were compared. **Result:** After administration of GP-NS, area under plasma concentration time curve ($AUC_{0-\infty}$) was $(18\ 792.56 \pm 2\ 304.43) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, *in vivo* residence time ($MRT_{0-\infty}$) was $(21.82 \pm 1.60) \text{h}$, apparent volume of distribution (V) was $(0.75 \pm 0.16) \text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$, clearance (CL) was $(1.37 \pm 0.37) \text{L} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ and maximum plasma concentration (C_{max}) was $(17\ 589.81 \pm 3\ 034.14) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. Values of relative uptake rate (Re) in the liver, heart, spleen, lung and kidney were 1.44, 3.21, 12.19, 1.88 and 6.54, respectively. **Conclusion:** GP-NS can significantly increase the level of gossypol concentration in mice and improve its bioavailability. GP-NS is helpful for gossypol to reach a long circulation time and is hopeful to be its novel drug delivery system.

[Key words] gossypol; nanosuspensions; pharmacokinetics; tissue distribution

棉酚是一种存在于锦葵科棉属植物中的黄色多元酚类化合物^[1]。近年关于棉酚及其衍生物的抗病毒、抗肿瘤作用^[2-3]研究较多,但该成分不稳定且水溶性差,限制了其在临床上的广泛应用。为改善难溶性药物的稳定性和生物利用度,将棉酚制备成纳米混悬剂是很好的选择之一。棉酚纳米混悬

剂是纯棉酚的亚微米颗粒在液体中的胶体分散体系^[4],由药物纳米晶体、稳定剂、液体分散介质组成,药物颗粒部分或全部以无定形状态存在。实验组前期对棉酚纳米混悬剂的制备、表征和稳定性做了详细研究,从不同方面充分证明纳米混悬剂中棉酚的稳定性良好^[5]。本实验以小鼠为研究

[收稿日期] 20140729(008)

[基金项目] 国家教育部科学技术研究重点项目(205185);新疆建设兵团博士基金项目(2009JC14)

[第一作者] 王建程,在读硕士,从事天然药物分析研究,Tel:13677541660,E-mail:740731797@qq.com

[通讯作者] *唐辉,教授,硕士生导师,从事药物分析及新药研究,Tel:0993-2055002,E-mail:th_pha@Shzu.edu.cn

对象,利用 HPLC 测定小鼠体内药物含量,研究棉酚纳米混悬剂和棉酚溶液尾静脉注射给药后在小鼠体内的药代动力学及组织分布,为棉酚的纳米给药系统研究与开发提供实验依据。

1 材料

1100 系列高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),BP211D 型电子分析天平(德国赛多利斯公司),GL-20G-II 型高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂)。棉酚对照品(纯度 99%)、棉酚纳米混悬剂(自制),肝素钠注射剂(湖北恒绿源科技有限公司),甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。健康昆明小鼠,无菌条件下饲养,雌雄各半,体重(20±2)g,购自新疆医科大学实验动物中心,合格证号新医动字第 2008-0003 号。

2 方法与结果

2.1 样品的处理

2.1.1 血浆样品 精密量取小鼠血浆样品 300 μL,加入 0.4% 磷酸溶液 100 μL,涡旋混合,加入乙醚-甲醇(9.5:0.5)混合液 1 mL 萃取 2 次,分别涡旋 30 s,于 4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,第 1 次定量转移乙醚层 750 μL,第 2 次定量转移 950 μL,将 2 次上清液移至同一离心管中,40 °C 水浴吹干,加甲醇 100 μL 复溶,于 10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液。

2.1.2 组织样品 精密称取组织器官 0.10 g(脾全取),加入 4 倍量生理盐水,制备匀浆,取适量匀浆液,加入 0.4% 磷酸溶液 100 μL,涡旋混合均匀,自“加入乙醚-甲醇(9.5:0.5)混合液 1 mL 萃取 2 次”至“取上清液”按 2.1.1 项下方法处理。

2.2 棉酚的含量测定

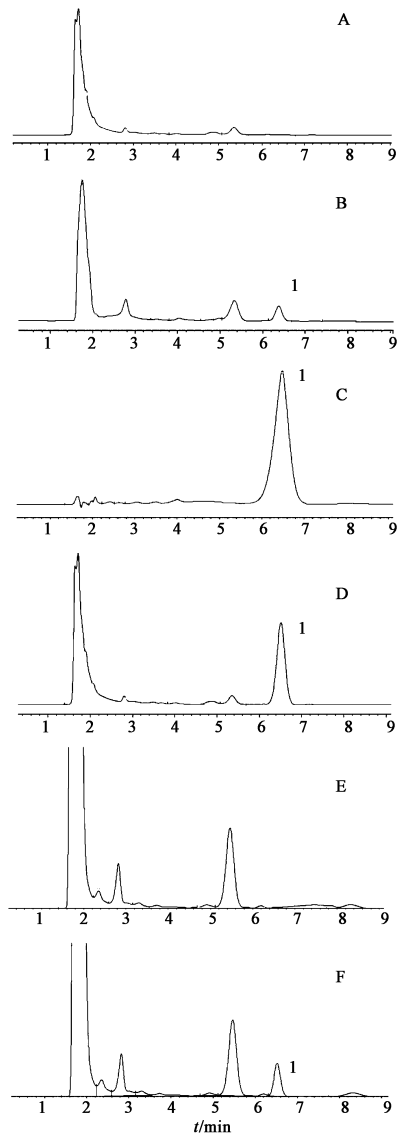
2.2.1 色谱条件 Bondapak C₁₈ 色谱柱(3.9 mm × 150 mm,4 μm),流动相甲醇-0.4% 磷酸水(85:15),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 25 °C,检测波长 238 nm。

2.2.2 标准曲线的绘制 精密称取一定量棉酚对照品,加甲醇配制 2 mg·L⁻¹ 储备液。精密量取小鼠空白血浆样品 300 μL,分别加入储备液 2.5,5,10,20,40 μL 配成相应质量浓度的血浆溶液 300 μL,按 2.1.1 项下方法处理,以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,得回归方程 $Y = 0.371X + 46.026$ ($R^2 = 0.9979$),线性范围 166.66 ~ 2 666.67 μg·L⁻¹。

以肝脏为例,其他器官与之相同。称取小鼠肝脏 0.1 g,共 6 份,分别加 4 倍量生理盐水制备组织匀浆液,分别加入棉酚对照品储备液 5,10,20,40,80,160 μL 配成相应质量浓度的组织样品,按 2.1.2 项下方法处理,取上清液 20 μL 进样,以峰面积为纵

坐标,质量浓度为横坐标,得肝、心、脾、肾、肺组织中棉酚的回归方程分别为 $Y = 0.114X + 20.813$ ($R^2 = 0.9955$), $Y = 0.101X + 16.419$ ($R^2 = 0.9969$), $Y = 0.109X + 18.086$ ($R^2 = 0.9929$), $Y = 0.092X + 22.794$ ($R^2 = 0.9972$), $Y = 0.095X + 21.127$ ($R^2 = 0.9971$),线性范围均为 0.1 ~ 3.2 μg·g⁻¹。

2.2.3 专属性考察^[6] 分别取小鼠空白血浆、空白血浆加棉酚对照品溶液、尾静脉给予后的小鼠血浆样品、空白组织匀浆、组织匀浆加棉酚对照品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件测定,见图 1。结果显示在选择的测定条件下,内源性物质均不干扰测定,表明该方法的专属性良好。



A. 空白血浆;B. 尾静脉给药血浆样品;C. 对照品;D. 空白血浆加对照品;E. 肝脏组织匀浆;F. 肝脏匀浆加对照品;1. 棉酚

图 1 棉酚纳米混悬剂 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of gossypol nanosuspensions

2.3 小鼠血药浓度动力学研究^[7-12] 取小鼠 60 只,随机分为 20 组(2 组预备用),每组 3 只。分别尾静脉给予棉酚溶液(对照组,乙酸棉酚溶解于 *N,N*-二甲基乙酰胺 1.5 mL 中,加入聚乙二醇 400 4 mL 和 5% 注射用葡萄糖溶液 4.5 mL,经 0.22 μm 滤膜过滤)和棉酚纳米混悬剂(试验组),给药剂量按棉酚计均为 20 mg·kg⁻¹,给药后分别于 5, 10, 30 min 及 1, 2, 4, 8, 12 h 小鼠眼眶取血,置于肝素抗凝的离心管中,3 000 r·min⁻¹离心 15 min,取上层血浆,按 2.1.1 项下方法处理,按 2.2.1 项下条件进样 20 μL,计算棉酚含量,绘制药-时曲线,见图 2。

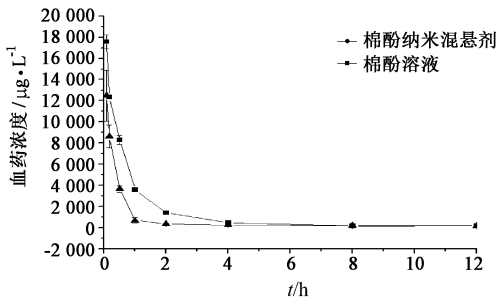


图 2 小鼠静脉注射棉酚溶液和棉酚纳米混悬剂药-时曲线 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 Plasma concentration-time curves of gossypol after administration of gossypol solution and gossypol nanosuspensions ($\bar{x} \pm s, n=3$)

静脉注射棉酚溶液和棉酚纳米混悬剂均符合三室模型。采用 DAS 2.0 药动学处理程序对单剂量静脉注射给药后的血药浓度数据进行处理,应用拟合度法及 AIC 判别法进行模型判断。计算药动学

参数,包括血药浓度时间曲线面积(AUC_{0-∞})、药物体内滞留时间(MRT_{0-∞})、表观分布容积(*V*)、消除速率(CL)和最大血药浓度(*C*_{max}),见表 1。结果显示小鼠静脉注射棉酚纳米混悬剂的 MRT_{0-∞}, *C*_{max}, AUC_{0-∞} 分别为棉酚溶液的 1.8, 1.4, 1.6 倍。

表 1 棉酚溶液和棉酚纳米混悬剂的药代动力学参数($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 1 Pharmacokinetic parameters of gossypol-solution and gossypol nanosuspensions($\bar{x} \pm s, n=3$)

参数	单位	棉酚纳米混悬剂	棉酚溶液
AUC _{0-∞}	μg·L ⁻¹ ·h ⁻¹	18 792.56 ± 2 304.43	11 912.56 ± 1 181.22
MRT _{0-∞}	h	21.82 ± 1.60	11.95 ± 3.12
<i>V</i>	L·kg ⁻¹	0.75 ± 0.16	1.172 ± 0.24
CL	L·h ⁻¹ ·kg ⁻¹	1.37 ± 0.37	2.33 ± 0.42
<i>C</i> _{max}	μg·L ⁻¹	17 589.81 ± 3 034.14	12 463.03 ± 2 599.73

2.4 小鼠体内组织分布动力学研究 将 2.3 项下各时间点快速取血后的小鼠,颈椎脱臼处死,取出小鼠的心、肝、脾、肺、肾。按 2.1.2 项下方法处理,按 2.2.1 项下色谱条件进样 20 μL,计算棉酚含量,绘制药-时曲线,见图 3。

由图 3 可知,棉酚纳米混悬剂显示出与棉酚溶液不同的特性,能显著提高棉酚在各组织中的浓度水平,而且延长了药物在体内组织的滞留时间。纳米混悬剂的体内靶向性可采用靶向性参数[相对摄取率(*Re*)、峰浓度比(*C_e*)、靶向效率(*Te*)]进行评价。 $Re = (AUC_i)_p / (AUC_i)_s$, $C_e = (C_{max})_p / (C_{max})_s$, AUC_{*i*} 为药-时曲线求得的第 *i* 个器官或组织的药时曲线下的面积, *p* 为所选靶向给药系统, *s* 为非靶向给药系统。 $Te = AUC_i / \sum AUC_i$, AUC_{*i*} 为同一制剂在

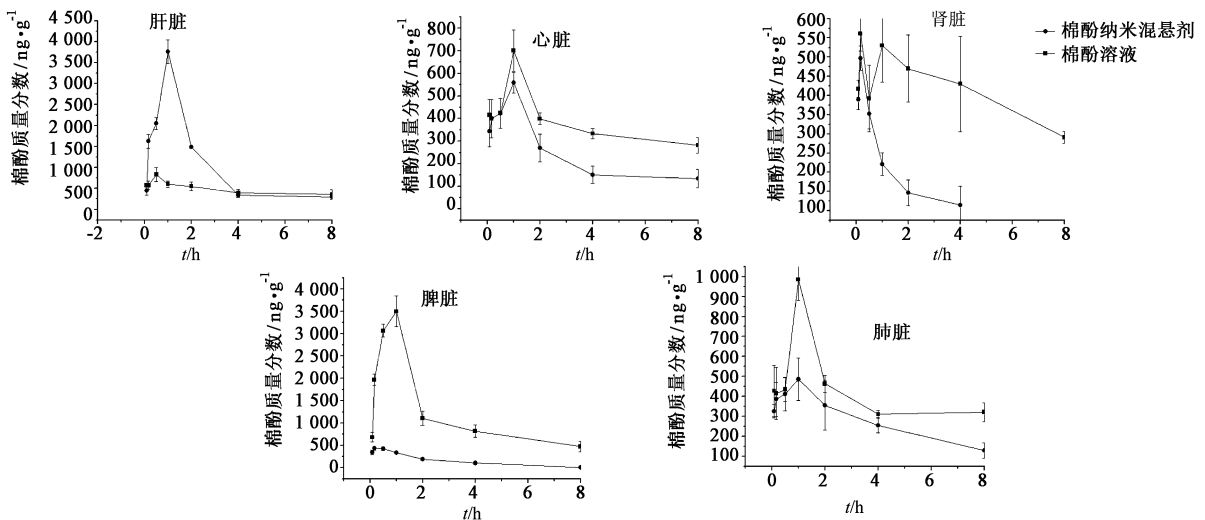


图 3 小鼠静脉注射棉酚溶液和棉酚纳米混悬剂后各组织药-时曲线 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 3 Concentration-time curves of gossypol in tissues of mice after administration of gossypol-solution and gossypol nanosuspensions ($\bar{x} \pm s, n=3$)

靶器官中药-时曲线下面积, ΣAUC_i 表示同一制剂所有组织中药-时曲线下面积之和。采用梯形法计算各组织的 AUC, 计算各靶向性参数, 见表 2, 3。结果棉酚纳米混悬剂注射后, 比棉酚溶液在脾、肾、心、

肺、肝组织中的 Re 有所提高, 与由 AUC 计算的 Te 结果一致。与棉酚溶液相比, 棉酚纳米混悬剂给药后组织中的药物浓度和 AUC 均明显提高, MRT 也显著延长, 更有利于药物在组织中发挥作用。

表 2 小鼠静脉注射棉酚溶液和棉酚纳米混悬剂在各组织的 AUC 和 C_{max}

Table 2 AUC and C_{max} in different tissues of mice after administration of gossypol-solution and gossypol nanosuspensions

样品	参数	单位	肝	心	肾	脾	肺
棉酚溶液	AUC_{0-24}	$h \cdot ng \cdot g^{-1}$	8 411.044	2 103.781	995.391 4	1 113.462	3 695.013
	C_{max}	$ng \cdot g^{-1}$	831.33	558.37	497.33	430.00	485.65
棉酚纳米混悬剂	AUC_{0-24}	$h \cdot ng \cdot g^{-1}$	12 143.56	6 753.75	6 510.39	13 574.34	6 963.57
	C_{max}	$ng \cdot g^{-1}$	3 763.2	700.67	530.33	3 065.67	685.67

表 3 小鼠尾静脉注射棉酚溶液和棉酚纳米混悬剂的靶向参数

Table 3 Targeting parameters of administration of gossypol-solution and gossypol nanosuspensions

参数	肝	心	肾	脾	肺
$Te_{棉酚溶液} / \%$	51.54	12.89	6.10	6.82	22.64
$Te_{棉酚纳米混悬剂} / \%$	26.43	14.70	14.17	29.54	15.16
Re	1.44	3.21	6.54	12.19	1.88
Ce	4.53	1.25	1.07	2.75	1.41

3 讨论

棉酚纳米混悬剂组织分布与血浆中药物浓度类似, 该制剂在小鼠体内的组织分布表现出了与棉酚溶液明显不同的特征。棉酚纳米混悬剂与棉酚溶液相比显著提高了药物在各组织中的浓度, 延长了药物在体内的滞留时间, 使药物在各组织中的 AUC 增大。此外, 棉酚纳米混悬剂是 1 种水相系统, 具有较低的黏度, 故扩散性较好, 是导致药物组织浓度较高的原因之一。与载体亚微粒^[13]给药系统不同, 纳米混悬剂是纯药物固体作核心, 少量稳定剂包覆在表面而形成的, 在体液中随着药物的溶解粒径会逐渐减小, 直至药物完全溶解则纳米粒消失成为分子溶液。纳米混悬剂静脉注射后在血液循环中开始会被网状内皮系统器官或血液中吞噬细胞识别吞噬, 富集于网状内皮系统丰富的肝、脾等器官, 对这些器官表现出良好的靶向性。棉酚纳米混悬剂能够被网状内皮系统运送至吞噬细胞丰富的肝、脾部, 所以棉酚在这些器官的浓度有较好的分布。

gossypol in the treatment of patient with refractory metastatic breast cancer: A phase I/II clinical trial [J]. Breast Cancer Res Tr, 2001, 66(3): 239-241.

[3] Baram I, Ismailov A I, Ziyaev K L, et al. Biological activity of gossypol and its derivatives [J]. Chem Nat Compd +, 2004, 40(3): 199-202.

[4] 朱建芬, 吴祥根. 纳米混悬剂的制备方法及其在药剂学中应用的研究进展 [J]. 中国医药工业杂志, 2006, 37(3): 196-198.

[5] 杨四涛, 唐辉, 应雪, 等. 棉酚纳米混悬剂的制备、表征和在体单向灌流肠吸收研究 [J]. 中国药学杂志, 2014, 49(10): 843-848.

[6] 王朝红, 文蛟, 何毅. 液相色谱-质谱联用测定乌头碱血药浓度及其药代动力学参数的方法学研究 [J]. 分析测试学报, 2004, 23(增刊): 51-53, 56.

[7] 李艳辉, 李媛, 刘卫平, 等. 苦参碱纳米粒在小鼠体内组织分布和药动学研究 [J]. 中南药学, 2010, 8(7): 487-490.

[8] 房志刚, 陈亚根, 张学农, 等. 环孢素 A 纳米粒在小鼠体内的药动学及组织分布 [J]. 中国药房, 2010, 21(9): 796-798.

[9] 熊迎新, 尹宗宁. 表面修饰对药物靶向性的影响 [J]. 中国新药杂志, 2004, 13(12): 1275-1278.

[10] 胡玥, 王金萍, 黄桂华, 等. 洛莫司汀热敏脂质体在动物体内的药代动力学及组织分布 [J]. 药物分析学杂志, 2010, 30(7): 1237-1241.

[11] 李学明, 程晓丹, 王永禄, 等. 紫杉醇纳米混悬剂的制备及其在动物体内药动学与组织分布研究 [J]. 中国药学杂志, 2009, 46(9): 680-685.

[12] 范景行. 药物代谢动力学软件设计 (三室模型) [J]. 卫生职业教育, 2012, 30(17): 42-44.

[13] 路一菱, 张霞, 尹宗宁. 蚓激酶壳聚糖亚微粒的制备工艺研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2009, 29(23): 1974-1977.

[参考文献]

[1] Kenar J A. Reaction chemistry of gossypol and its derivatives [J]. JAOCS, 2006, 83(4): 269-270.

[2] Catherine V P, Andrew D S, Marcus M R, et al. Oral

[责任编辑 刘德文]