

白藜芦醇固体脂质纳米粒在小鼠体内的分布研究

梁健钦, 刘华钢^{2*}

(1. 广西中医学院, 南宁 530001; 2. 广西医科大学, 南宁 530021)

[摘要] 目的: 考查白藜芦醇固体脂质纳米粒(Res-SLN)在小鼠体内的分布。方法: 采用热高压均质法制备 Res-SLN。以 Res 混悬剂(Res-Sus)为参照制剂, 经小鼠尾 iv 给药, Res-SLN 组剂量为 $115.50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, Res-Sus 组剂量为 $119.25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 在一定时间处死动物(每个时间点 5 个动物), 摘取器官, 洗涤后进行分析。结果: 给与 Res-SLN 后, Res 主要分布在小鼠肝、肾, Res-SLN 靶向肾的增强倍数为 1.82 倍。结论: Res 制成 SLN 后, 改变了 Res 在小鼠体内的分布, 具有显著肾靶向作用。

[关键词] 白藜芦醇; 固体脂质纳米粒; 体内分布

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)13-0183-03

Distribution of Administrated Resveratrol-loaded Solid Lipid Nanoparticles in Mice

LIANG Jian-qin¹, LIU Hua-gang^{2*}

(1. Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530001, China;

2. Guangxi Medical University Nanning 530021, China)

[Abstract] Objective: To investigate the distribution of resveratrol-loaded solid lipid nanoparticles (Res-SLN) in mice. **Method:** Res-SLN was prepared by heat-high pressure homogenization method. Distribution studies were accomplished in mice. At different time after tail iv administration at $115.50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ for Res-SLN group and at $119.25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ for Res-Sus group, the animals were sacrificed ($n=5$ animals for each time). Tissues were collected, washed, weighted and analyzed. **Result:** Distribution study in mice demonstrated that Res after administrated Res-SLN was mainly distributed in liver and kidney. Compared to the control group, the target efficiency of Res-SLN was 1.82 folds in kidney. On the other hands, the Res retention time after administrated Res-SLN was prolonged. **Conclusion:** Res-SLN is an effective preparation that can target Res to kidney in mice.

[Key words] Resveratrol; solid lipid nanoparticles; distribution

白藜芦醇(resveratrol, Res)具有广泛的生物学活性,如抗癌、抗动脉粥样硬化、抗凝血、抗氧化、抗菌、免疫调节及神经保护等^[1]。固体脂质纳米粒(Solid lipid nanoparticles, SLN)是一种新型的纳米粒载药系统。常温下呈固态的天然或合成的类脂如卵

磷脂、三酰甘油酯等为基质,将药物包裹于类脂核中制成粒径约为 50~1 000 nm 纳米粒给药体系。SLN 在室温下通常呈现固态,具有聚合物纳米粒物理稳定性高、药物泄漏少的优势,又兼有脂质体、乳剂毒性低、能大规模生产的优点,且具有靶向性^[2]。本文采用热高压均质法制备白藜芦醇固体脂质纳米粒(Res-SLN),并研究 Res-SLN 在小鼠体内分布情况,评价 Res-SLN 是否具有靶向作用。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国); Sartorius BP211D 电子天平(德国); CG-16W 高速微量离心机(北京医用离心机厂); Niro-Soavi 高压均质

[收稿日期] 2010-03-10

[基金项目] 桂科攻 0630002 - 2E

[第一作者] 梁健钦,在读博士研究生,讲师,研究方向:新药开发。Tel: 0771-2059527, E-mail: liangjianqin@139.com

[通讯作者] * 刘华钢, Tel: 13907862166, E-mail: hgliu@263.net

机(意大利);XH-C 漩涡混合器(江苏金坛医疗仪器厂);JY92- 超声波粉碎机(宁波新芝科器研究所);Gilson 移液器(法国)。

1.2 药物与试剂 泊洛沙姆 188(注射用,南京威尔);单硬脂酸甘油酯(CP,广东汕头西陇化工厂);白藜芦醇对照品(批号 111535-200502,含量测定用,中国药品生物制品检定所);白藜芦醇(纯度 97.1%,桂林莱茵);乙腈(Fisher,色谱纯);甲醇(天津四友,色谱纯);山梨醇(上海国药集团, BR);甘露醇、海藻糖、乙醚(均为上海国药集团, AR)。

1.3 动物 昆明种小鼠,雌雄各半,(22 ±2) g,广西医科大学实验动物中心提供,许可证号 SYKG(桂)2003-0005。

2 方法

2.1 Res-SLN 的制备 采用热高压均质法制备:精密称取 6 g 泊洛沙姆 188(F68)、3.5 g 单硬脂酸甘油酯(GMS)及 0.45 g Res。GMS 置烧杯中,水浴加热熔融。Res 置烧杯中,加无水乙醇适量,使溶解。将 GMS 加入到 Res 中,搅拌,水浴保温,制得油相。F68 置烧杯中,加约 80 mL 水,水浴加热,搅拌使溶解,制得水相。将油相缓慢加入到水相中,超声分散形成乳浊液,加水至 100 mL,过高压均质机,140 MPa 压力下循环至透明,冷却至室温,0.45 μm 滤膜过滤,即得。经测定,Res-SLN 的表面积平均粒径为 125 nm,平均包封率为 91%,平均载药量为 10%。

2.2 参比制剂中稳定剂的选择 精密称取 0.50 g Res,加无水乙醇适量使溶解,分别加入 5% 山梨醇、5% 甘露醇、5% 海藻糖至 100 mL,超声处理(42 kHz, 400 W) 30 min,即得。参考沉降体积比测定法(《中国药典》2005 年版二部,附录 O)测定,用具塞量筒量取供试品 50 mL,密塞,用力振摇 1 min,记下混悬物的开始高度 H₀,静置 3 h,记下混悬物的最终高度 H,按 $F = H/H_0$ 计算沉降体积比(F)。

2.3 生物样品中 Res 的测定^[3-4]

2.3.1 色谱条件 色谱柱为 Lichrospher C₁₈ 柱(4.6 mm ×250 mm, 5 μm);流动相为乙腈-水(30/70);流速 1 mL·min⁻¹;检测波长为 306 nm;柱温为 30 °C;进样量 20 μL。

2.3.2 生物样品处理 取血清或组织匀浆 0.1 mL,加入 1.0 mL 乙醚,漩涡混合 2 min,分取乙醚层,同法再萃取 1 次,合并乙醚层于尖底试管中,室温下挥干乙醚层,残渣用 200 μL 甲醇溶解,离心

(12 000 r·min⁻¹) 10 min,取上清液 20 μL,注入色谱仪,测定。

2.4 给药方案^[5-6] 小鼠 70 只,雌雄各半,随机分为 14 组,每组 5 只,其中 7 组为 Res-SLN 组,另 7 组为 Res 混悬剂 Res-Sus 组。给药前禁食 12 h,全程不禁饮水。Res-SLN 组按 115.50 mg·kg⁻¹、Res-Sus 组按 119.25 mg·kg⁻¹ 经尾 iv,分别于药后 5, 10, 30 min 和 1, 2, 4, 8 h 采样。小鼠拔眼球取血 0.5 mL,处死,取出心、肝(约 0.2 g)、脾、肺、肾(取左侧),用生理盐水清洗残留血液,称重,置离心管中,加 5 倍量生理盐水,匀浆。血液静置凝聚后离心,取血清。样品置 -20 °C 冰箱保存。

3 结果

3.1 参比制剂中稳定剂的选择 结果见表 1。选择 5% 甘露醇作为 Res 参比制剂的稳定剂是合理的。

表 1 沉降体积比测定

稳定剂种类	F
5% 甘露醇	0.83
5% 山梨醇	0.62
5% 海藻糖	0.38

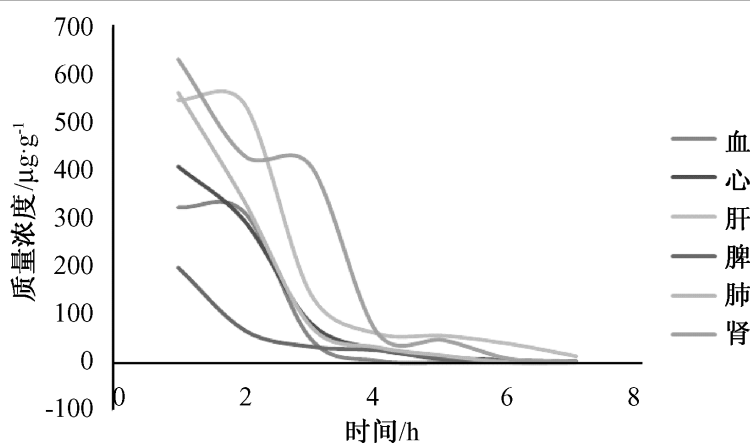


图 1 Res-SLN 在小鼠各脏器的经时曲线

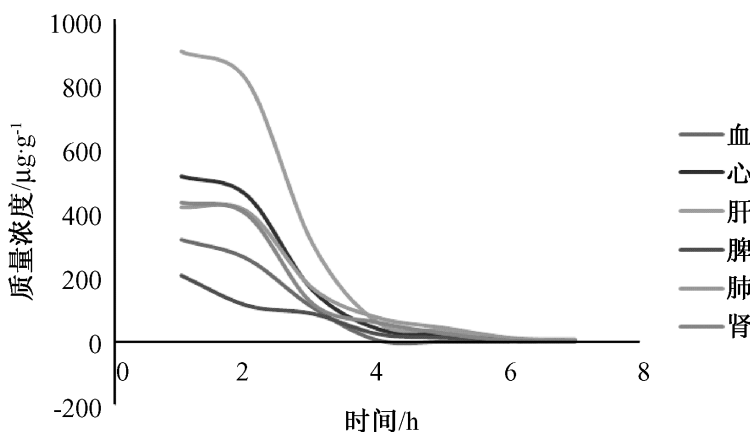


图 2 Res-Sus 在小鼠各脏器的经时曲线

3.2 Res-SLN 在小鼠体内的分布 从图 1 可知,给予 Res-SLN 后,Res 在肝、肾的浓度比其他器官高,其浓度按肝 > 肾 > 肺 > 心 > 血 > 脾的顺序依次减小,经过 4 h 后,小鼠体内 Res 浓度较低;从图 2 可知,给予 Res 混悬剂后,Res 在肝的浓度最高,其浓度按肝 > 心 > 肾 > 肺 > 血 > 脾的顺序依次减小,经

过 2 h 后, 体内 Res 浓度较低, 4 h 后很多器官已测不到 Res; 对比图 1、图 2 可知, 将 Res 制成 SLN 制剂后, 延长了药物在体内的滞留时间, 同时, Res-SLN 有明显的肾脏靶向作用。

3.3 靶向性评价 靶向性的评价可以采用器官相对摄取率 (r_e) 及靶向效率 (T_e) 作为指标。

$$r_e = \frac{AUC_{SLN}/X_{SLN}}{AUC_{Sus}/X_{Sus}}; T_e = \frac{AUC_{靶}}{AUC_{非靶}}$$

式中, AUC_{SLN} 为 Res-SLN 的曲线下面积 (0 ~ t), AUC_{Sus} 为 Res-Sus 曲线下面积 (0 ~ t), X_{SLN} 为 Res-SLN 的剂量, X_{Sus} 为 Res-Sus 的剂量。 r_e 大于 1 表示药物制剂在该器官或组织有靶向性, r_e 愈大靶向效果愈好, 等于或小于 1 表示无靶向性。 T_e 值表示药物制剂或药物溶液对靶器官的选择性, T_e 值大于 1 表示药物制剂对靶器官比某非靶器官有选择性; T_e 值愈大, 选择性愈强; 药物制剂 T_e 值与药物溶液的 T_e 值相比, 说明药物制剂靶向性增强的倍数 (表 2)。

表 2 Res-SLN 靶向性能评价 (柳士)

脏器	$AUC_{(0-t)}$		T_e^*		r_e
	Res-SLN	Res-Sus	Res-SLN	Res-Sus	
心	78.64	101.47	1.72	2.29	0.78
肝	201.87	194.52	4.42	4.40	1.04
脾	36.83	51.97	0.81	1.17	0.71
肺	73.50	134.36	1.61	3.04	0.55
肾	190.81	101.76	4.18	2.30	1.88
血	45.69	44.25	1.00	1.00	1.03

注: * 选择血液作为非靶器官

由表 2 可知, r_e 值提示 Res-Sus 组在心、脾、肺的靶向性比 Res-SLN 组好; Res-SLN 组肝脏靶向效果较 Res-Sus 组稍好; Res-SLN 组具有明显肾脏靶向效果。由 T_e 值可知, Res-Sus 组靶向肺的增强倍数为 1.89 倍, 提示 Res-Sus 容易被肺截留, 可能与药物粒径较大有关; Res-SLN 靶向肾的增强倍数为 1.82 倍, 有明显肾靶向。可见, 2 种制剂在鼠体内分布特征发生改变, 最为显著的是纳米制剂具有肾靶向。

4 讨论

4.1 生物样品中 Res 的富集 根据 Res 容易溶于甲醇的性质, 曾采用甲醇沉淀蛋白, 离心, 浓缩后, 加甲醇溶解, 离心后取上清液直接进样分析, 其结果与用乙醚萃取后分析结果差异不大。因此, 本试验采用乙醚萃取, 富集 Res^[3-4]。

4.2 参比制剂的制备 Res 在水中溶解度不好, 可溶在 70% 以上的乙醇溶液, 考虑到乙醇的药理作用, 未将 Res 制成乙醇溶液剂, 故参比制剂选择混悬

剂是合理的。试验以沉降体积比 (F) 作为指标, 考察了 5% 山梨醇、5% 甘露醇、5% 海藻糖对 Res 混悬剂稳定性的影响。

4.3 Res-SLN 肝靶向不明显, 但从经时曲线图可知, Res-SLN 可以延长 Res 在肝脏等器官中滞留时间。

4.4 生物样品中 Res 稳定性 文献报道^[7-8], Res 对光、热不稳定, 因此生物样品宜避光保存在 -20 条件下, 并应尽快分析测定。笔者对生物样品中 Res 的稳定性进行考察: 取空白血清及各空白组织匀浆, 加入一定量 Res 标准品溶液, 在 4 避光条件下保存, 24 h 后, 标准品色谱峰正常, 但是 72 h 后标准品峰后明显出现另一色谱峰, 推测 b 峰为顺式 Res。

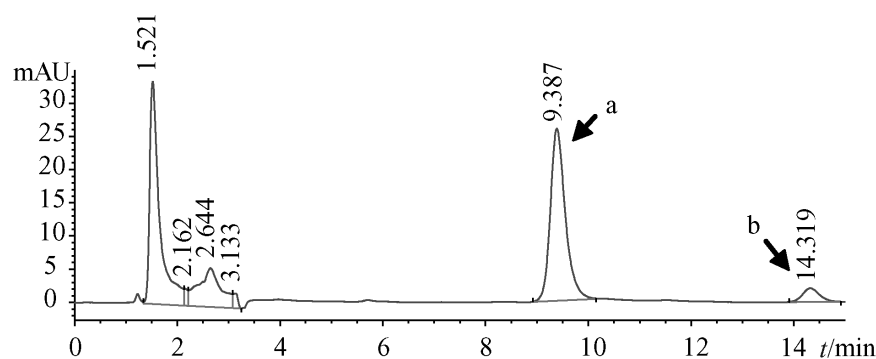


图 3 生物样品中 Res 液相色谱图
(a 为反式 Res 峰, b 为未知峰)

[参考文献]

- [1] 毕红彬, 阎晓卓, 邵攀科. 白藜芦醇的研究进展 [J]. 河北化工, 2006, 29(6): 22.
- [2] 龚明金, 黄桂华. 固体脂质纳米粒的研究进展 [J]. 中国药事, 2005, 19(10): 595.
- [3] 汪冬庚, 刘文英. 大鼠一次性灌服虎杖提取物后白藜芦醇血浓度测定方法的研究 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(6): 646.
- [4] 王莉, 周红, 张三奇, 等. RP-HPLC 法测定小鼠血清及脏器中白藜芦醇浓度 [J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(16): 1688.
- [5] 鄢长华, 赵慧, 盛惟. 醋柳黄酮口服固体脂质纳米粒在小鼠体内的分布及靶向性评价 [J]. 中成药, 2007, 29(3): 446.
- [6] 陈波, 俞惠新, 谭成, 等. 碘标白藜芦醇及其小鼠体内分布 [J]. 原子能科学技术, 2008, 42(6): 508.
- [7] 刘宇平, 文大为, 陈政, 等. 反式白藜芦醇热稳定性与光致异构化的高效液相色谱和液相色谱-电喷雾离子化质谱研究 [J]. 色谱, 2004, 22(6): 583.
- [8] 陈易彬, 孙宝祥, 陈佳希. 虎杖中白藜芦醇的稳定性研究 [J]. 中药材, 2007, 30(7): 805.

[责任编辑 何伟]