

苦参素肝靶向缓释纳米球的制备及大鼠体内分布研究

陈 纭 金 涌* 胡志伟

(安徽医科大学药学院,安徽合肥 230032)

摘要:目的 制备苦参素(KU)纳米球,研究其在大鼠体内的分布。方法 采用乳化溶剂挥发法制备苦参素-PLGA-纳米球(KU-PLGA-NS),建立高效液相色谱分析法,流动相选择 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钾溶液-甲醇-三乙胺(20:80:0.009),将36只大鼠随机分为两大组,每组再分3小组,每小组6只,两大组分别经腹腔给药苦参素原料药和制备得到的苦参素纳米球。通过检测大鼠心、肝、脾等组织中的药物浓度,评价其肝主动靶向作用。结果 制得苦参素-PLGA-NS平均粒径 190.5 nm ,平均包封率为 79.7% ,平均载药量为 20.5% 。与苦参素原料药对照,苦参素纳米球在肝组织中的药物峰浓度明显增加,20 min 后达 $9.65 \mu\text{g/ml}$ 。结论 KU-PLGA-NS 具有缓释和肝主动靶向作用。

关键词:苦参素; 乳酸-羟基乙酸共聚物; 纳米球

DOI 标识: doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2010.10.021

中图分类号: R284.2 文献标识码: B 文章编号: 1008-0805(2010)10-2467-02

苦参素(kurarinone, KU)又名氧化苦参碱,是从豆科植物苦豆草的种子苦豆子或豆科植物苦参的根中提取的一种生物碱,具有抗炎、抗病毒、免疫机制和抗肿瘤等作用,近年来发现它对病毒性肝炎亦有明显治疗作用^[1,2]。纳米给药系统在实现靶向和缓释给药,以及提高难溶性药物的生物利用度,降低药物毒副作用等方面具有良好的应用前景^[3,4]。高分子材料乳酸-羟基乙酸共聚物[poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA],因其优良的生物相容性和生物降解性,被广泛用作纳米球(nanosphere, NS)的载体材料,以其为载体的NS克服了纳米乳剂、纳米脂质体药物易泄露等缺点,成为国内外的研究热点之一,为一类新型的靶向给药载体^[5,6]。

本实验以PLGA为载体,Pluronic F68为乳化剂,采用乳化溶剂挥发法^[7]成功地制备了粒径大小适中的KU-PLGA-NS,通过其在大鼠体内的分布研究,探索其用于治疗肝炎的可行性。

1 材料与仪器

1.1 仪器 79-1型磁力搅拌器(金坛市杰瑞尔电器有限公司), AG285型电子天平(瑞典METTLER TOLEDO公司),岛津高效液相色谱仪(包括LC-20AB泵,SPD-M20A紫外检测器及岛津Resolution色谱工作站), C_{18} 色谱柱(依利特),超速冷冻离心机,纳米粒径分析仪(英国Malvern仪器公司),JEOL型高分辨透射电镜(日本电子株式会社)。

1.2 药品与试剂 苦参素(陕西龙孚生物化工有限责任公司), PLGA(LA/GA=75/25, MW=8 600, 济南岱罡生物科技有限公司), Pluronic F-68(西安罗森伯科技有限公司), 甲醇(色谱纯), 丙酮, 磷酸二氢钾等其他试剂均为分析纯。

标准溶液的配制:

水相: 0.5% pluronic F-68 称取 Pluronic F-68 0.5 g 溶于 100 ml 的纯化水中。

油相: 精密称取苦参素 19.7 mg; PLGA(75/25) 83.5 mg 溶于

5 ml 丙酮中, 备用。

2 方法

2.1 KU-PLGA-NS 胶体溶液的制备 取 3 ml 已配好的油相, 将其用注射器针头缓慢注入到以一定速度(以不起泡为宜)搅拌的 100 ml Pluronic F-68 水相中, 常温下磁力搅拌除尽丙酮, 搅拌时间以 3 h 为宜。经 $0.25 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤即得苦参素-PLGA-NS 胶体溶液。低温避光保存。

2.2 形态及粒径观察 取 KU-PLGA-NS 胶体溶液适量, 少量纯化水稀释后用 1.5% (W/V) 磷钨酸负染色, 滴于镀膜的电镜铜网上, 晾干后, 置于透射电镜下观察纳米球的外观形态并拍摄照片。

2.3 色谱分析条件 色谱柱为 hypersil ODS C_{18} 色谱柱(大连依利特公司 $150 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$); 流动相为 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钾溶液-甲醇-三乙胺(20:80:0.009); 流速为 $1.0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$; 检测波长为 229 nm; 柱温为 30°C ; 进样量为 $20 \mu\text{l}$ 。

2.4 包封率、载药量及利用率的测定 精密吸取 KU-PLGA-NS 胶体溶液 $500 \mu\text{l}$ 超速冷冻离心($45\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 2 h, 精密吸取上清液 $20 \mu\text{l}$, HPLC 法测定苦参素含量。计算未包封苦参素的量(M_1), 再精密吸取 KU-PLGA-NS 胶体溶液 $500 \mu\text{l}$, 用一定体积的混合有机溶剂溶解苦参素和 PLGA, 测得苦参素的总量, 计算胶体溶液中苦参素的含量(M_2), $M(\text{PLGA})$ 为 PLGA 的投药量, 按下式计算包封率、载药量和药物利用率。

$$\text{包封率}(\%) = (M_2 - M_1) / M_2 \times 100\%$$

$$\text{载药量}(\%) = (M_2 - M_1) / M(\text{PLGA}) \times 100\%$$

$$\text{药物利用率}(\%) = M_2 / \text{投药量} \times 100\%$$

2.5 组织内苦参素浓度的测定

2.5.1 样品处理 将 SD 大鼠心、肝、脾、肺、肾、胃、小肠、皮肤、肌肉、脂肪、胸腺、骨髓、睾丸/子宫和脑等组织脏器分别称取 0.2 g , 不足 0.2 g 的组织按实际重量称取, 吸干组织残留血液, 按 1:3 比例定量加入生理盐水研磨成匀浆, 吸取 $200 \mu\text{l}$, 置于玻璃离心管中。骨髓取之于大鼠的股骨, 剪刀剪断股骨, 用注射器吸 1 ml 盐水从股骨断处将骨髓冲出, 进行匀浆加入 $200 \mu\text{l}$ 的 1 mol/L NaOH 碱化, 涡旋混合 30 s, 加入乙酸乙酯 2 ml , 涡旋震荡约 45 s, $2\ 000 \text{ r/min}$ 离心 10 min, 取有机层, 重复 1 次, 合并有机相, 40°C 氮气吹干。流动相重溶, 转移至 EP 管中, $4\ 000 \text{ r/min}$ 离心 10 min , $20 \mu\text{l}$ 进样。考察方法的专属性、线性范围、精密度和回收率等。

2.5.2 KU-PLGA-NS 大鼠体内分布研究 根据新药指导原则

收稿日期: 2009-12-22; 修订日期: 2010-06-20

基金项目: 国家中医药管理局中医药科研三级实验室“中药药理实验室”(No. TCM-2009-197);

安徽省自然科学基金(No. 070413117);

安徽医科大学校级研究项目;

作者简介: 陈 纭(1981-) 男(汉族), 安徽合肥人, 现任安徽医科大学药学院讲师, 硕士学位, 主要从事药物分析研究工作。

* 通讯作者简介: 金 涌(1969-) 男(汉族), 安徽合肥人, 现任安徽医科大学药学院教授, 硕士研究生导师, 博士学位, 主要从事药剂学研究工作。

规定,将 36 只大鼠随机分为两大组,每大组再分 3 小组,每小组 6 只,两大组分别经腹腔给药苦参素原料药和苦参素靶向缓释纳米球,剂量均为 6 mg/kg。于 2、20 min 和 120 min 上述时间点股动脉放血处死大鼠,迅速取出心、肝、脾、肺、肾、胃、肠、肌肉、皮肤、胸腺、脑、子宫、睾丸、骨髓、脂肪,取样时要注意样本的一致性和代表性,用生理盐水冲去其表面污血,再用滤纸吸干表面的浮血,各组除骨髓外均称取实际重量,按 1:3 (W/V) 的比例加生理盐水适量,将组织匀浆,骨髓取之于小鼠的股骨,用注射器吸 1 ml 生理盐水从股骨处将骨髓冲出,进行匀浆。吸取匀浆液 200 μ l 置于玻璃离心管中,2 000 r/min 离心 10 min,取有机层,重复一次,合并有机相,40 $^{\circ}$ C 氮气吹干。流动相重溶,转移至 EP 管中,4 000 r/min 离心 10 min,就可取上清液进样了。

3 结果

3.1 经透射电镜观察分析 纳米球呈类球形,分布较均匀,电镜下计数 500 个纳米球,得平均粒径为 190.5 nm, KU-PLGA-NS 的透射电镜照片如图 1。

3.2 包封率及载药量的测定结果 制得 KU-PLGA-NS 平均包封率平均包封率为 79.7% 平均载药量为 20.5%。

3.3 HPLC 检测苦参素的方法学考察

3.3.1 方法专属性 在以上的实验条件下,生物样品的内源性物质的色谱峰均对苦参素色谱峰无干扰,可以满足生物样品的快速准确分析。结果见图 2。

3.3.2 线性范围 在 0.025 ~ 1 μ g/ml 范围内,苦参素血浆浓度与色谱峰面积比线性关系良好,线性回归方程为: $\hat{Y} = 0.003\ 673X + 0.044\ 481$ ($r = 0.999\ 7, P < 0.05$) ($n = 7$),最低检测浓度 0.01 μ g/ml。

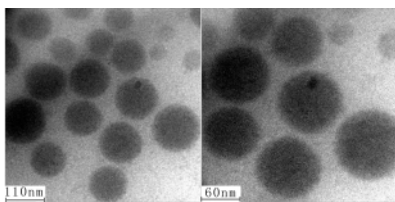


图 1 KU-PLGA-NS 的透射电镜照片

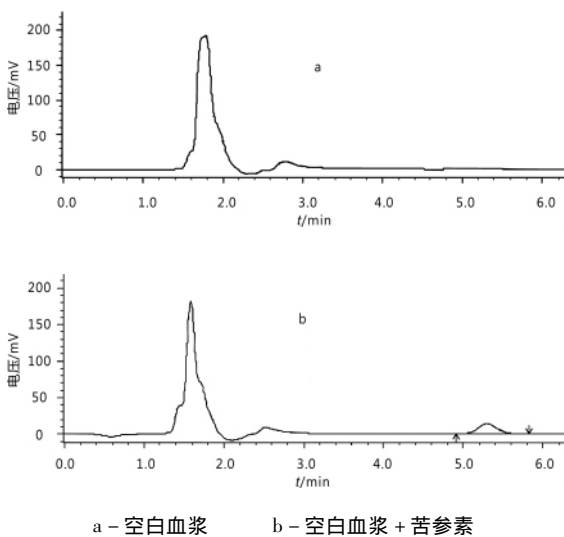
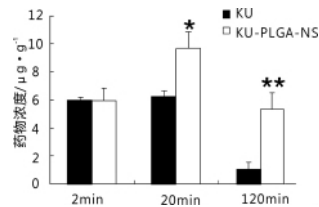


图 2 空白血浆和空白血浆加药色谱图

3.3.3 回收率和精密度 回收率为 92.1% ~ 102.1% ($n = 5$)。日内和日间精密度均 $< 6.5\%$ ($n = 5$)。

3.4 肝组织中 KU 浓度测定结果 图 3 显示两种制剂经腹腔注

射给药后 2 min 时在肝中浓度几乎没有差别。20 min 时 KU-PLGA-NS 制剂在肝中浓度明显高于 KU 原料药在肝中的浓度,是其 1.55 倍,说明 KU-PLGA-NS 制剂具有靶向性;120 min 时, KU 原料药在肝中的浓度显著下降,而 KU-PLGA-NS 制剂在肝中的浓度的下降幅度并不很大,说明 KU-PLGA-NS 制剂具有缓释性。



相同时间点 KU 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图 3 分别腹腔注射苦参素和苦参素纳米球后不同时间大鼠肝中药物浓度的比较

3.5 苦参素原料和纳米球在体内分布情况 如图 4 和图 5 所示,苦参素给药后主要分布在肝脏,与 KU 相比, KU-PLGA-NS 在体内的分布发生了很大的变化,苦参素纳米球在肝脏中浓度明显增高,20 min 后达 9.65 μ g/ml。

4 讨论

纳米粒的制备方法有乳化溶剂挥发法、液中干燥法、天然高分子凝聚法、自动乳化法、盐析法等。本实验采用乳化溶剂挥发法制备 KU-PLGA-NS,此法主要利用机械搅拌法制备载药纳米粒,工艺简便且避免了一些如含氯等有机溶剂的使用,同时制得的 KU-PLGA-NS 的外观圆整,粒径可控制在 50 ~ 200 nm 范围内,且分散均匀,其包封率和载药量也较高。

本实验所采用的高分子材料乳酸-羟基乙酸共聚物 [poly (lactic-co-glycolic acid), PLGA] 是由乳酸和乙醇酸以不同比例镶嵌共聚而成的高分子纳米材料,其兼有两种聚酯材料的优势,如质量稳定、生物惰性、生物可降解性且降解速度可调节等优点,由于其优良的生物相容性和生物降解性,被广泛用作纳米球 (nanosphere, NS) 的载体材料,可延长药物作用时间,从而达到靶向目的,提高药物疗效。

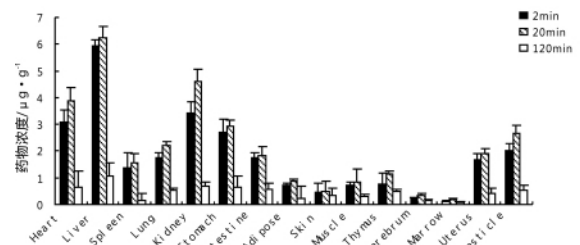


图 4 经腹腔给药苦参素原料药 (6 mg/kg) 后药物在各组织中分布

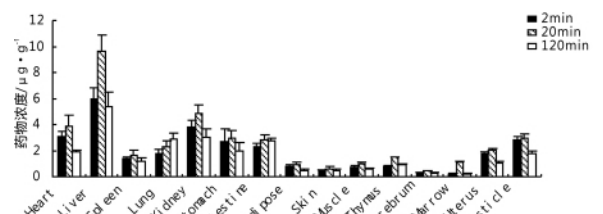


图 5 大鼠经腹腔给药苦参素纳米球 (6 mg/kg) 后药物在各组织中分布

将制成的 KU-PLGA-NS 制剂通过腹腔注射给药后,测得大鼠各组织药物浓度,发现药物在肝中的浓度明显高于以苦参素

原料给药后在肝中的浓度,同时在其它组织中的浓度相对较低,使苦参素在肝位的浓度大大提高,提高肝位病灶的治疗效果以及降低对于肝外组织与器官的毒副作用有着重要意义。

此外 KU-PLGA-NS 还显示出一定的体内缓释作用。这种体内缓释作用更有利于药物持续发挥作用,对药物入肝、减轻毒副作用具有重要意义。

参考文献:

- [1] 叶明. 苦参碱注射液的药理研究[J]. 广东医药, 1997, 18(11): 793.
- [2] 徐彬, 杨惠娣, 侯爱君. 苦参碱治疗慢性病毒性肝炎的作用[J]. 国外医药·合成药·生化药·制剂分册, 2002, 23(6): 356.
- [3] LiCY. The research of liver targeted dosage system [J]. Emerg Tradchin Med(Chinese), 2001, 10(6): 354.
- [4] 张耕, 易以木. 苦参素磷脂纳米粒的研制[J]. 中国医院药学杂志, 2004, 24(9): 573.
- [5] 康康, 胡容峰, 马凤余, 等. 水飞蓟宾可注射用肝靶向缓释纳米球的制备及影响因素考察[D]. 2007 安徽药理学学术年会论文集, 2007: 48.
- [6] Zur Muhlen A, Schwarz C, Mehnert W. Solid lipid nanoparticlar(SLN) for controlled drug delivery - drug release and release mechanism [J]. Eur J pharm Biopharm, 2006, 47(3): 147.
- [7] 陈纭, 金涌, 李俊. 苦参碱靶向缓释纳米球的制备及影响因素考察[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(5): 1203.

枳实中多甲氧基黄酮类化合物的研究

韩金旦, 王奎武*, 沈莲清

(浙江工商大学食品与生物工程学院, 浙江 杭州 310035)

摘要: 目的 研究枳实中的多甲氧基黄酮类化合物。方法 对枳实 95% 乙醇提取物的醋酸乙酯部分和正丁醇部分进行色谱分离, 通过核磁共振和质谱分析鉴定其化合物的结构。结果 从枳实中分离鉴定出 4 个多甲氧基黄酮类化学成分, 分别为桔皮晶 (Tangeretin, I), 蜜桔黄素 (Nobiletin, II), 4', 5, 7, 8-四甲氧基黄酮 (4', 5, 7, 8-Tetramethoxyflavone, III), 5-降甲基蜜桔黄素 (5-Demethylnobiletin, IV)。结论 I, II, III, IV 化合物均为首次从枳实中分离得到。

关键词: 枳实; 多甲氧基黄酮; 化学成分

DOI 标识: doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2010.10.022

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1008-0805(2010)10-2469-02

Study on the Compounds of Polymethoxylated Flavonoids in Fructus Aurantii Immaturus

HAN Jin-dan, WANG Kui-wu*, SHEN Lian-qing

(College of Food Science and Biotechnological Engineering, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310035, China)

Abstract: **Objective** To investigate the chemical constituents of Fructus Aurantii Immaturus. **Methods** The constituents of the EtOAc-soluble portion and normal butanol soluble portion in the 95% ethanol extract were isolated and purified by means of chromatography. Compounds were identified by ¹H-NMR, ¹³C-NMR and MS. **Results** Four polymethoxylated flavonoids were isolated and identified as Tangeretin (I), Nobiletin (II), 4', 5, 7, 8-Tetramethoxyflavone (III) and 5-Demethylnobiletin (IV). **Conclusion** Compounds I-IV were isolated from Fructus Aurantii Immaturus for the first time.

Key words: Fructus Aurantii Immaturus; Polymethoxylated flavonoids; Chemical constituents

枳实 *Fructus Aurantii Immaturus* 是芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 及其栽培变种或甜橙 *Citrus sinensis* Osbeck 的干燥幼果, 具有破气消积、化痰散痞的作用, 用于治疗积滞内停、痞满胀痛、泻痢后重、大便不通、结胸、胃下垂、脱肛、子宫脱垂等症^[1], 主要含挥发油、生物碱(辛弗林、N-甲基酪胺)、黄酮类化合物、维生素 C 及维生素 D 等成分^[2]。

黄酮类化合物是枳实中的主要有效活性成分, 此前的研究多集中在枳实中含有的芸香柚皮苷与柚皮苷、橙皮苷与新橙皮苷等黄酮苷类化合物中^[3-7], 而对多甲氧基类黄酮化合物(PMFs)的

研究较少。近年来有关 PMFs 抗癌的研究取得了很大进展^[8-11], 由于 PMFs 对多种癌细胞有较强的抑制作用, 受到国内外的广泛关注。国内外对多甲氧基黄酮类成分的抗癌活性报道越来越多, 提示这类成分具有潜在的新药开发价值。为进一步开发利用枳实中的多甲氧基黄酮类成分, 作者利用现代色谱和波谱技术对其所含有的此类黄酮进行了分离纯化和结构鉴定, 从中得到了 4 个 PMFs 类活性成分, 分别鉴定为桔皮晶 (Tangeretin, I), 蜜桔黄素 (Nobiletin, II), 4', 5, 7, 8-四甲氧基黄酮 (4', 5, 7, 8-Tetramethoxyflavone, Tetramethyl-O-isoscutellarein, III), 5-降甲基蜜桔黄素 (5-Demethylnobiletin, IV)。

1 仪器与材料

1.1 仪器与试剂 X-4 数字显示显微熔点测定仪 (温度计未校正); Nicolet NEXUS-470 型红外光谱仪 (溴化钾压片); Bruker 500 AVANCE III 型核磁共振仪, 内标为 TMS (实验所测 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 分别为 500, 125 MHz); Thermo LCQ FLEET 型电喷雾质谱仪 (ESI-MS); 柱色谱用硅胶 (青岛海洋化工厂); Sephadex LH-20 (Pharmacia 公司); GF254 高效薄层板 (烟台汇

收稿日期: 2010-01-04; 修订日期: 2010-04-09

基金项目: 浙江省自然科学基金 (No. Y4090121)

作者简介: 韩金旦 (1985-), 女 (汉族), 浙江宁波人, 现为浙江工商大学食品与生物工程学院在读硕士研究生, 主要从事天然产物研究工作。

* 通讯作者简介: 王奎武 (1972-), 男 (汉族), 山东泰安人, 现任浙江工商大学食品与生物工程学院副教授, 博士学位, 主要从事天然产物研究工作。