DOI:10.16016/j.1000-5404.201603014

水飞蓟素肠溶纳米粒在大鼠体内分布及肝靶向性研究

何 静[1],邱妍川[1],杨延音[1],林凤云[1],刘松青[2],江尚飞[1],朱照静[1] (401331 重庆,重庆医药高等专科学校继续教育学院[1];400038 重庆,第三军医大学西南医院药剂科[2])

[摘要] **目的** 评价水飞蓟素肠溶 PLGA 纳米粒口服给药后在大鼠体内的分布及肝靶向效率。**方法** 以水飞蓟素分散片为对照,大鼠灌胃给药给予水飞蓟素肠溶 PLGA 纳米粒和水飞蓟素 PLGA 纳米粒后,采用高效液相色谱法测定血浆及各组织匀浆液中的药物浓度,采用 DAS 3.0 计算 AUC 值,以相对靶向效率(RTE)和肝靶向效率(TE)评价各制剂对肝脏的靶向性。**结果** 以水飞蓟素分散片为对照,水飞蓟素肠溶 PLGA 纳米粒和水飞蓟素 PLGA 纳米粒给药后,血浆及各组织的 RTE 值均大于 1,肝脏 RTE 值均大于 10;两种纳米粒制剂给药后,肝脏相对于血浆及各组织 TE 值均大于 1.5。**结论** 水飞蓟素肠溶 PLGA 纳米粒大鼠给药后能有效提高其体内吸收和组织分布,具有良好的肝靶向作用。

[关键词] 水飞蓟素;肠溶 PLGA 纳米粒;组织分布;肝靶向作用
[中图法分类号] R282.71;R944.9;R969.1 [文献标志码] A

Body distribution and liver targeting of enteric coated silymarin-nanoparticles in rats

He Jing[1], Qiu Yanchuan[1], Yang Yanyin[1], Lin Fengyun[1], Liu Songqing[2], Jiang Shangfei[1], Zhu Zhaojing[1]([1]Department of Continuing Education, Chongqing Medical and Pharmaceutical College, Chongqing, 401331; [2]Department of Pharmacy, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] Objective To evaluate the body tissue distribution and liver targeting efficiency of silymarin carried by enteric coated poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles in rats. Methods High performance liquid chromatography (HPLC) was established and used to determinate silymarin concentration in plasma and tissue samples. The rats were randomized into 3 groups based on the treatment: enteric coated silymarin-PLGA nanoparticles, silymarin-PLGA nanoparticles and silymarin dispersible tablets (control). DAS 3.0 was used to calculate the area under the curve (AUC). Relative targeting efficiency (RTE) and liver targeting efficiency (TE) were used to evaluate liver targeting distribution of each agent. Results Comparing with silymarin dispersible tablets, the RTE value in the plasma and tissues was greater than 1 and the liver RTE value was greater than 10 after administrated with enteric coated and non-coated silymarin-PLGA nanoparticles. In both groups treated with silymarin-PLGA nanoparticles, the liver TE value was greater than 1.5 then compared with the TE values of plasma and other tissues. Conclusion Oral administration of enteric coated silymarin-PLGA nanoparticles improves the absorption and tissue distribution of silymarin in rats, exerting a better liver targeting efficiency.

[**Key words**] silymarin; enteric coated silymarin-PLGA nanoparticle; tissue distribution; liver targeting

Supported by the Tackling Project of Science and Technology Research of Chongqing (CSTC2012gg-yyjs10008). Corresponding author: Zhu Zhaojing, E-mail: zhaojing6271@126.com

[基金项目] 重庆市科技攻关计划项目(CSTC2012gg-yyjs10008)
[通信作者] 朱照静,E-mail: zhaojing6271@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160620.1016.002.html(2016-06-20)

水飞蓟素(silymarin,SM)是从菊科植物水飞蓟中提取精制而成的一类具有抗肝炎病毒活性的黄酮类化合物的总称,临床上广泛用于急慢性病毒性肝炎、药源性肝损伤、肝硬化等多种肝脏疾病的治疗[1]。水飞蓟素主要由水飞蓟宾、异水飞蓟宾、水飞蓟宁和水飞蓟亭等组成,其中水飞蓟宾及其异构体异水飞蓟宾含量最高,占该化合物的60%~70%,且具有最强的药理活性[2]。但是,由于水飞蓟素难溶于水,口服生物利用度很低,严重影响临床疗效的发挥和在临床的应用。研究显示,其大鼠口服给药后的绝对生物利用度约为0.95%[3]。此外,由于水飞蓟素溶解度低,在小肠上皮细胞的渗透性较差,且在吸收入血之前受到胃肠道对药物的降解作用,其口服给药后只有20%~50%经肠道吸收进入体循环[4]。

近年来,有多项研究采用不同的方法制备水飞蓟素纳米给药系统,以提高其溶解度和体内生物利用度,包括制备纳米混悬剂、自乳化给药系统等,但仍旧存在着稳定性差、载药量低,以及制备过程复杂等问题[5]。本实验前期研制了水飞蓟素肠溶PLGA纳米粒和水飞蓟素PLGA纳米粒,体外实验显示肠溶PLGA纳米粒能有效降低药物在胃液中的突释,且与市售制剂相比能明显增加其在人工胃液和人工肠液中的溶出。本实验进一步通过体内研究,评价其口服给药后在大鼠体内的分布以及肝靶向效率。

1 材料与方法

1.1 仪器

日本Shimdazu LC-2010C HT高效液相色谱仪,Min1512台式高速离心机(珠海黑马医学仪器有限公司),CP225D电子天平(德国赛多利斯公司),涡漩混合仪(合肥艾本森科学仪器有限公司),高速组织匀浆机(无锡德谱仪器制造有限公司),Eppendorf移液器(德国Eppendorf公司)。

1.2 实验用药

水飞蓟素(>98%,西安瑞林生物科技有限公司),柚皮素(>98%,上海佳和生物科技有限公司),水飞蓟素肠溶PLGA纳米粒和水飞蓟素PLGA纳米粒[实验室自制,其平均粒径分别为224 nm和193 nm,Zeta电位分别为-37.8 mV和-40.7 mV,包封率分别为(74.7±2.2)%和(71.7±2.5)%,载药量分别为(5.39±0.24)%和(5.21±0.22)%,两种纳米粒均在4 ℃条件下保存,3个月内能保持稳定],水飞蓟素分散片(商品名:分散片,规格:38.5 mg,江苏鹏鹞药业有限公司),β-葡萄糖醛酸酶(美国Sigma公司),乙醚(天津市科密欧化学试剂有限公司),甲醇(色谱纯,美国Fisher公司),去离子水由实验室自制。

1.3 实验动物

SD大鼠,雄性,8周龄,体质量220~250 g,由重庆大学实验动物中心提供。

1.4 实验方案与组织样品采集

将180只SD大鼠采用随机数字表法分为3组,每组60只,按水飞蓟素32 mg/kg灌胃自制水飞蓟素PLGA肠溶纳米粒或水飞蓟素PLGA纳米粒或水飞蓟素分散片,于灌胃后0.15、0.35、0.5、1、2、4、6、8、12h和24 h眼眶取血0.5 mL,立即处死,血样置肝素化的离心管中,8 000 r/min离心5 min分离血浆。迅速分离出心、肝、脾、肺、肾、脑各器官,滤纸吸干,放入冰生理盐水中冲洗3次,加入组织质量3倍体积的生理盐水,充分匀浆得组织匀浆液。

1.5 血样及各组织样品药物浓度测定方法

1.5.1 色谱条件 色谱柱为Dikma-C18色谱分析柱(4.6 mm×150 mm,5 μm),流动相为甲醇-0.05 mol/L磷酸盐缓冲液(pH值2.77,48∶52,体积比),经0.2 μm微孔滤膜滤过后使用,检测波长为288 nm,柱温为30 ℃,流速为1 mL/min,进样量:20 μL。

1.5.2 血浆和组织样品处理 精密吸取血浆或各组织匀浆液200 μL于带塞离心管中,加入磷酸盐缓冲液(pH=5)400 μL,用50 μL β-葡萄糖醛酸酶溶液混匀,于37 ℃水浴中培育16 h。加入内标(柚皮素)溶液50 μL,硼酸盐缓冲液(pH=8.5)1.0 mL,加入无水乙醚萃取2次,离心,分离醚层,合并乙醚层,空气吹干,残留用流动相100 μL复溶,离心,取上清液进样20 μL测定。

1.5.3 专属性 分别制备空白大鼠血浆样品和各组织匀浆液样品,以及含药大鼠血浆样品和含药各组织匀浆液样品,按1.5.2进行样品处理后在1.5.1色谱条件下测定,考察检测方法的专属性。

1.5.4 标准曲线 精密吸取空白血浆或各组织匀浆液200 μL于带塞离心管中,加入水飞蓟素甲醇溶液配置成浓度分别为0.027、0.054、0.108、0.54、1.62、4.86、9.72 μg/mL的水飞蓟素血浆样品和各组织匀浆液样品,按1.5.2进行样品处理后在1.5.1色谱条件下测定,以水飞蓟宾和异水飞蓟宾峰面积之和进行水飞蓟素浓度的计算,内标法计算各样品标准曲线。

1.5.5 精密度与方法回收率 分别制备含水飞蓟素浓度分别为0.054、0.54、4.86 μg/mL的血浆样品和各组织匀浆液样品,按1.5.2进行样品处理后在1.5.1色谱条件下测定,进行精密度和方法回收率实验。

1.5.6 提取回收率 配制浓度分别为0.054、0.54、4.86 μg/mL的水飞蓟素甲醇溶液各5份,按1.5.1色谱条件下测定,记录水飞蓟素和内标的峰面积分别为A1、B1。制备含水飞蓟素浓度分别为0.054、0.54、4.86 μg/mL的血浆样品和各组织匀浆液样品各5份,按1.5.2进行样品处理后在1.5.1色谱条件下测定,记录水飞蓟素和内标的峰面积分别为A2、B2。分别以A2和A1的比值、B2和B1的比值计算水飞蓟素以及内标在各样品中的提取回收率。

1.6 水飞蓟素在大鼠体内的组织分布及肝靶向性评价

采用DAS 3.0软件按非房室模型计算血浆及各组织药时曲线下面积(AUC)。分别以水飞蓟素肠溶PLGA纳米粒和水飞蓟素PLGA纳米粒灌胃给药后血浆及各组织水飞蓟素AUC值,与以水飞蓟素分散片灌胃给药后血浆及各组织水飞蓟素AUC值之比计算相对靶向效率(relative targeting efficiency,RTE);分别以水飞蓟素PLGA肠溶纳米粒、水飞蓟素PLGA纳米粒和水飞蓟素分散片灌胃给药后,以肝脏水飞蓟素AUC值与其他组织AUC值之比计算药物在大鼠体内的肝靶向效率(targeting efficiency,TE)。

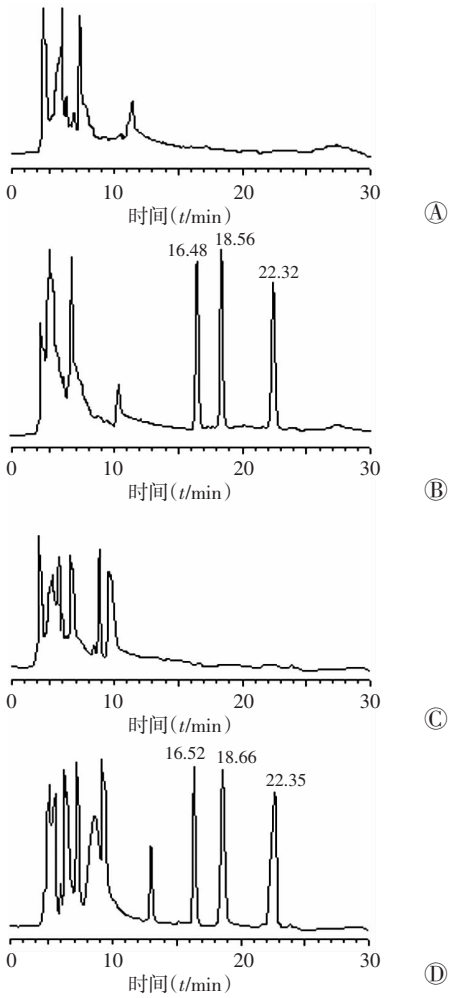
2 结果

2.1 血样及各组织样品药物浓度测定方法

2.1.1 专属性 血浆样品和肝脏匀浆液样品测定结果见图1,其他各组织匀浆液样品测定色谱图与肝脏匀浆液类似。由图1可见,水飞蓟宾和异水飞蓟宾的保留时间分别为16.5 min和18.6 min,内标保留时间为22.3 min,各样品中内源性物质不影响药物的分离测定。

2.1.2 标准曲线 照1.5.4制备标准曲线,计算血浆及各组织匀浆液样品标准曲线方程见表1,各样品水飞蓟素浓度在0.027~9.72 μg/mL范围内均具有良好的线性关系。

2.1.3 精密度与方法回收率 照1.5.5制备水飞蓟素血浆样品及组织匀浆液样品,进行精密度和方法回收率实验,结果各样品批内和批间精密度RSD值均小于9.6%($n=5$),各样品方法回收率均在(100±15)%以内($n=5$)。



A:空白血浆;B:空白血浆+药物(0.54 μg/mL)+内标(2.46 μg/mL);C:空白肝组织匀浆液;D:空白肝组织匀浆液+药物(0.76 μg/mL)+内标(2.46 μg/mL)

图1 水飞蓟素色谱分析

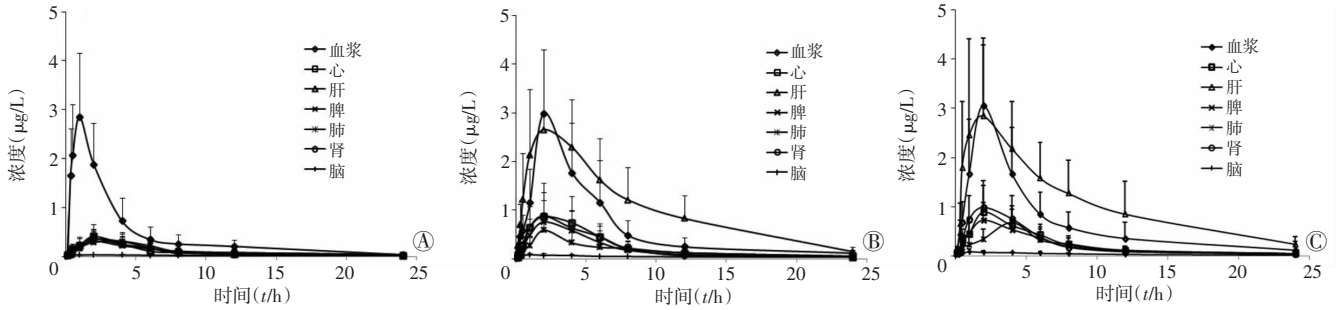
表1 血浆及各组织匀浆液中水飞蓟素标准曲线

组织匀浆液	标准曲线	R	权重
血浆	Y=1.119X+0.042	0.998 7	$1/C^2$
心	Y=1.432X+0.063	0.995 2	$1/C^2$
肝	Y=1.662X+0.068	0.994 6	$1/C^2$
脾	Y=1.544X+0.053	0.996 7	$1/C^2$
肺	Y=1.887X+0.044	0.997 9	$1/C^2$
肾	Y=1.525X+0.038	0.997 5	$1/C^2$
脑	Y=1.639X+0.052	0.998 6	$1/C^2$

2.1.4 提取回收率 照1.5.6制备水飞蓟素血浆样品及组织匀浆液样品进行提取回收率考察,结果各样品中水飞蓟素的提取回收率为72.3%~76.2%($n=15$),内标的提取回收率为65.9%~68.3%($n=15$)。

2.2 水飞蓟素在大鼠体内的组织分布

自制水飞蓟素PLGA肠溶纳米粒、水飞蓟素PLGA纳米粒或水飞蓟素分散片大鼠灌胃给药后,血浆及各组织药时曲线见图2。采用DAS 3.0软件按非房室模



A:水飞蓟素 PLGA 肠溶纳米粒;B:水飞蓟素 PLGA 纳米粒;C:水飞蓟素分散片

图 2 水飞蓟素在血浆及各组织中的平均药-时曲线($n=6$)

表 2 不同水飞蓟素制剂给药后大鼠血浆及各组织 AUC 值[mg(mL·min),$n=6$,$\bar{x}\pm s$]

制剂	血浆	心	肝	脾	肺	肾	脑
PLGA 肠溶纳米粒	32.79±5.33	11.18±4.92	53.45±7.30	9.53±3.57	9.99±2.97	11.83±4.02	1.98±0.78
PLGA 纳米粒	31.49±5.62	12.56±5.02	50.07±7.98	9.78±3.42	8.87±3.01	10.46±4.33	1.92±0.53
益肝灵分散片	21.57±6.21	4.72±1.23	4.99±1.54	5.16±2.04	4.48±1.94	5.76±2.23	0.88±0.33

型计算血浆及各组织 AUC 值见表 2。以水飞蓟素分散片为对照,以血浆药物 AUC 计算,水飞蓟素 PLGA 肠溶纳米粒和水飞蓟素 PLGA 纳米粒在大鼠体内的相对生物利用度分别为 152% 和 146%。

2.3 水飞蓟素大鼠体内肝靶向性评价

RTE 计算结果见表 3,可见将水飞蓟素制成肠溶 PLGA 纳米粒或 PLGA 纳米粒后,与水飞蓟素分散片比较,其在血浆及各组织中的 RTE 值均大于 1,且在肝脏中的 RTE 值大于 10。表明通过剂型改变以后,水飞蓟素在体内吸收和分布增多,且对肝脏有较好的选择性,水飞蓟素以 PLGA 纳米制剂给药后,其在肝脏的药物暴露为普通分散片给药后的 10 倍以上。

表 3 不同水飞蓟素制剂给药后水飞蓟素相对靶向效率

制剂	血浆	心	肝	脾	肺	肾	脑
PLGA 肠溶纳米粒	1.52	2.37	10.71	1.85	2.23	2.05	2.25
PLGA 纳米粒	1.46	2.66	10.03	1.90	1.98	1.82	2.18

TE 计算结果见表 4,可见将水飞蓟素制成肠溶 PLGA 纳米粒或 PLGA 纳米粒后,肝脏相对于血浆及各组织 TE 值均大于 1.5,表明水飞蓟素以 PLGA 纳米制剂给药后,其在肝脏的药物暴露为血浆及其他组织药物暴露量的 1.5 倍以上。而以水飞蓟素分散片给药后,肝脏相对于血浆及各组织 TE 值均小于 1.5(除脑以外,由于药物不易透过血脑屏障,在脑的分布极低,因此 TE 值较高,为 5.67)。由此可见,将水飞蓟素制成 PLGA 纳米粒后,具有更好的肝靶向作用。

表 4 不同水飞蓟素制剂给药后水飞蓟素肝靶向效率

制剂	血浆	心	脾	肺	肾	脑
PLGA 肠溶纳米粒	1.63	4.87	5.61	5.35	4.52	26.99
PLGA 纳米粒	1.59	3.99	5.12	5.64	4.79	26.08
益肝灵分散片	0.23	1.06	0.97	1.11	0.87	5.67

3 讨论

近年来,越来越多的研究表明,水飞蓟素除了具有抗炎、抗氧化、抗病毒等保护肝细胞,拮抗肝纤维化和抗丙型肝炎病毒的作用以外,还具有保护胰岛细胞、降低血糖、减轻胰岛素抵抗的作用,并且能抑制包括肝癌、肺癌、卵巢癌、乳腺癌等多种肿瘤细胞的增殖[6-7]。但是,由于其溶解度低,在小肠上皮细胞的渗透性较差,严重影响其体内吸收和药效的发挥。随着材料科学、纳米技术等的发展,各种新型药物载体材料不断涌现以改善药物的体内过程和药效的发挥[8-10]。PLGA 是目前开发最为成功的一种生物可降解聚合物,可在机体内分解为二氧化碳和水排出体外,具有较好的生物相容性,可有效用于延缓药物在体内的释放,降低药物在体内的代谢速度以及实现药物的靶向给药[11]。采用 PLGA 将难溶性药物制成纳米制剂,能有效提高药物的溶解速度和药物的稳定性,此外,还有利于提高药物使用的缓释性、靶向性和安全性。本实验前期制备水飞蓟素 PLGA 纳米粒的过程中,为降低其在胃液中的突释,在载体材料中加入肠溶材料羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯 HP55,取得了较好的效果。

本实验采用市售益肝灵分散片为对照,评价了前期制备的水飞蓟素肠溶 PLGA 纳米粒和 PLGA 纳米粒大鼠口服给药后的体内分布和肝脏靶向作用。从研究结果可以看出,将水飞蓟素制备为纳米粒后,能有效提高其体内的吸收,血浆及各组织药物暴露都有明显的增加,相对生物利用度均大于 100%。此外,以 PLGA 纳米粒给药后,药物在肝脏的暴露量为普通分散片给药后肝脏暴露量的 10 倍以上,且药物在肝脏的暴露量为血浆药物暴露量的 1.5 倍以上,而采用普通分散片给药后,药物在肝脏的暴露量仅为血浆药物暴露量的 1/5。由此可见,本实验室研制的水飞蓟素肠溶 PLGA 纳米粒和 PLGA 纳米粒均能明显提高水飞蓟素在大鼠体内的吸收,且明显改善其体内分布情况,具有良好的肝脏靶向性,值得进一步研究和开发。

参考文献:

[1] Vargas-Mendoza N, Madrigal-Santillan E, Morales-Gonzalez A, *et al*. Hepatoprotective effect of silymarin[J]. World J Hepatol, 2014, 6(3): 144 - 149. DOI: 10.4254/wjh.v6.i3.144

[2] Cacciapuoti F, Scognamiglio A, Palumbo R, *et al*. Silymarin in non alcoholic fatty liver disease[J]. World J Hepatol, 2013, 5(3): 109 - 113. DOI: 10.4254/wjh.v5.i3.109

[3] Cao X, Fu M, Wang L, *et al*. Oral bioavailability of silymarin formulated as a novel 3-day delivery system based on porous silica nanoparticles [J]. Acta Biomater, 2012, 8(6): 2104 - 2112. DOI: 10.1016/j.actbio.2012.02.011

[4] Wu J W, Lin L C, Hung S C, *et al*. Analysis of silibinin in rat plasma and bile for hepatobiliary excretion and oral bioavailability application [J]. J Pharm Biomed Anal, 2007, 45(4): 635 - 641. DOI: 10.1016/j.jpba.2007.06.026

[5] 陈晴宇, 周建平, 霍美蓉. 水飞蓟素新型纳米制剂的研究进展[J]. 中国药科大学学报, 2015, 46(3): 376 - 384. DOI: 10.11665/j.issn.1000-5048.20150320

[6] 李青权, 周强, 牛俊奇, 等. 水飞蓟素药理机制新进展及临床价值再探讨[J]. 临床肝胆病杂志, 2015, 31(2): 315 - 316. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2015.02.044

[7] Vaid M, Singh T, Prasad R, *et al*. Silymarin inhibits melanoma cell growth both *in vitro* and *in vivo* by targeting cell cycle regulators, angiogenic biomarkers and induction of apoptosis[J]. Mol Carcinog, 2015, 54(11): 1328 - 1339. DOI: 10.1002/mc.22208

[8] Khalkhali M, Sadighian S, Rostamizadeh K, *et al*. Simultaneous diagnosis and drug delivery by silymarin-loaded magnetic nanoparticles[J]. Nanomedicine Journal, 2015, 2(3): 223 - 230. DOI: 10.7508/nmj.2015.03.008

[9] Ahmad U, Faiyazuddin M, Hussain M T, *et al*. Silymarin: an insight to its formulation and analytical prospects [J]. Acta Physiol Plant, 2015, 37: 253. DOI: 10.1007/s11738-015-2008-3

[10] Chaudhary S, Garg T, Murthy R S, *et al*. Development, optimization and evaluation of long chain nanolipid carrier for hepatic delivery of silymarin through lymphatic transport pathway [J]. Int J Pharm, 2015, 485(1/2): 108 - 121. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2015.02.070

[11] Danhier F, Ansorena E, Silva J M, *et al*. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications[J]. J Control Release, 2012, 161(2): 505 - 522. DOI: 10.1016/j.jconrel.2012.01.043

(**收稿**:2016-03-02;**修回**:2016-04-08)

(编辑 张 维)