姜黄素固体脂质纳米粒在大鼠体内的组织分布研究Δ

李　旭*，郝　迪，王　梓，李　楠#（天津市医药科学研究所，天津　300020）

中图分类号　R969.1　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2023）03-0294-04
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2023.03.08

摘　要　目的　研究姜黄素固体脂质纳米粒（Cur-SLN）在大鼠体内的组织分布特点。**方法**　采用微乳法制备Cur-SLN。将SD大鼠随机分为Cur原料药组和Cur-SLN组，每组45只。两组大鼠均单次静脉注射相应药物（以Cur计，注射剂量均为25 mg/kg），分别于给药0.25、0.5、1、2、4、6、8、12、24 h时，分离大鼠心、肺、肾和肝组织，采用高效液相色谱法测定Cur在不同组织中的含量，并分析其组织分布情况。**结果**　Cur在心、肺、肾和肝组织中检测质量浓度的线性范围分别为0.064 75～129.50、0.064 75～64.75、0.064 75～129.50、0.064 75～129.50 μg/mL（r均大于0.99），定量下限均为0.064 75 μg/mL，检测限均为0.012 95 μg/mL；日内、日间精密度以及准确度、提取回收率均符合生物样品定量分析的要求。与Cur原料药组比较，Cur-SLN组大鼠心、肾、肺（0.25～24 h各时间点）和肝（0.25～1 h、12～24 h各时间点）组织样品中Cur的含量均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$）；而肝（2～8 h各时间点）组织样品中Cur的含量均显著降低（$P<0.01$）。**结论**　将Cur制成固体脂质纳米粒后，增加了其在心、肾、肺组织的分布。

关键词　姜黄素；固体脂质纳米粒；组织分布；大鼠；高效液相色谱法

Study on tissue distribution of curcumin solid lipid nanoparticles in rats

LI Xu, HAO Di, WANG Zi, LI Nan (Tianjin Institute of Medical and Pharmaceutical Sciences, Tianjin 300020, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE To study the tissue distribution characteristics of curcumin solid lipid nanoparticles (Cur-SLN) in rats. **METHODS** Cur-SLN was prepared with microemulsion. SD rats were randomly divided into Cur raw material group and Cur-SLN group, with 45 rats in each group. The rats of two groups were injected with the corresponding drugs (by Cur, 25 mg/kg) by single intravenous injection. The heart, lung, kidney and liver tisse were separated at 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12 and 24 h after administration. The contents of Cur in different tissues were determined by high-performance liquid chromatography method. Their tissue distribution was analyzed. **RESULTS** The linear range of detected mass concentration of Cur in heart, lung, kidney and liver tissues were 0.064 75-129.50, 0.064 75-64.75, 0.064 75-129.50, 0.064 75-129.50 μg/mL, respectively (all $r>0.99$). The lower limits of quantitation were all 0.064 75 μg/mL, and the limit of detection were all 0.012 95 μg/mL. The intra-day and inter-day precision, accuracy and extraction recovery were in line with the requirements of quantitative analysis. Compared with Cur raw material group, the contents of Cur in heart, kidney, lung (at each time point of 0.25-24 h) and liver tissue (at each time point of 0.25-1 h, 12-24 h) of samples were significantly increased in the Cur-SLN group ($P<0.05$ or $P<0.01$), while the contents of Cur in liver tissue (at each time point of 2-8 h) were significantly decreased ($P<0.01$). **CONCLUSIONS** After Cur was prepared into solid lipid nanoparticles, its distribution in heart, kidney and lung tissues is increased.

KEYWORDS　curcumin; solid lipid nanoparticles; tissue distribution; rat; high-performance liquid chromatography

心肾综合征（cardiorenal syndrome，CRS）指心脏和肾脏中一个器官对另一个器官的功能损害不能进行代偿时，形成恶性循环，最终导致心脏和肾脏功能的共同损害；其发病机制复杂，心肾纤维化是其终末期的主要病理改变，目前尚无特效药物进行治疗[1－3]。姜黄素（curcumin，Cur）可减轻血管紧张素Ⅱ诱导的心肌纤维化和肾间质纤维化[4－5]。本课题组前期研究发现，Cur还可改善CRS模型大鼠的心肌肥大、肾功能以及肺组织损伤[6]。Cur的生物利用度极低（＜1%）且难溶于水（溶解度为0.6 μg/mL），在生理pH下的吸收和稳定性较差，且代谢快、易消除[7－8]，从而限制了其体内研究和临床应用。

固体脂质纳米粒（solid lipid nanoparticles，SLN）以脂质作为载体材料将药物包裹在其中，可避免药物与外界环境接触，增加药物的稳定性，延长药物的半衰期，从而提高药物的生物利用度[9－11]。本课题组前期采用微乳法制备了Cur-SLN[12]，现采用尾静脉注射Cur-SLN的方法，观察Cur在大鼠心、肾、肺和肝组织的分布情况，以期为Cur-SLN治疗CRS的临床应用提供参考。

Δ**基金项目**　国家自然科学基金资助项目（No.81903565）；天津市科技计划项目（No.21JCYBJC01630）；天津市卫生健康科技项目（No.TJWJ2021MS046，No.TJWJ2021QN078）

＊**第一作者**　助理研究员。研究方向：基础药理学。电话：022-27236137。E-mail：187391856@qq.com

＃**通信作者**　助理研究员。研究方向：纳米给药系统。电话：022-27236137。E-mail：llittlsnows@126.com

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有LC-2010型高效液相色谱（HPLC）仪（日本Shimadzu公司），XW-80A型涡旋混合仪（上海医科大学仪器厂），HWS-24型电热恒温水浴锅（上海一恒科学仪器有限公司），XW-80A型定时恒温磁力搅拌器（上海泸西分析仪器厂），PHS-3C型精密pH计（上海精密科学仪器有限公司），SZ-100型纳米粒度仪（日本Horiba公司），AB135型十万分之一电子天平、AL204型万分之一电子分析天平、PL203型精密电子天平[梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司]等。

1.2 主要药品与试剂

Cur对照品、大黄素对照品（内标）均购自中国食品药品检定研究院（批号分别为110823-201004、110756-200110，纯度均大于98%）；Cur原料药（批号TZSW200317-1，纯度99.0%）购自西安通泽生物科技有限公司；其余试剂均为实验室常用规格，水为娃哈哈纯净水。

1.3 动物

本研究所用实验动物为SPF级SD大鼠，共90只，雄性，体质量220～240 g，由北京维通利华实验动物技术有限公司提供，动物生产许可证号为SCXK（京）2019-0006。所用动物均活动正常且毛发柔顺，摄食、饮水均正常。本研究获得天津市医药科学研究所伦理委员会批准，伦理审批号为IMPS-EAEP-Z-18JCQNJC13500-01。

2 方法与结果

2.1 Cur-SLN混悬液的制备

参考本课题组前期方法制备Cur-SLN混悬液[12]：称取处方量的Cur和硬脂酸，于65 ℃熔化，加入2 mL相同温度的聚山梨酯80-乙醇溶液（质量比1∶4）和8 mL水，涡旋1 min，即得水包油型微乳。在电磁搅拌（1 020 r/min）下，将上述热微乳以每5 s 1滴的速度滴入2 ℃的分散介质水中，当微乳全部加入后继续以2 ℃保温搅拌15 min，即得Cur-SLN混悬液（每毫升Cur-SLN中含Cur原料药约0.77 mg，载药量为7.72%，包封率为87.73%）。本研究所制Cur-SLN的理化性质良好，平均粒径为（168.9±1.0）nm，Zeta电位为－（19.60±0.35）mV，多分散系数为0.212±0.020。

2.2 生物样品中Cur含量测定方法的建立

采用HPLC法检测大鼠各组织样品中Cur的含量。

2.2.1 色谱条件 以DIKMA Diamonsil C_{18}（250 mm×4.6 μm，5 mm）为色谱柱，以乙腈-0.50%磷酸溶液（58∶42，*V*/*V*）为流动相；检测器为紫外检测器，检测波长为426 nm，流速为1.0 mL/min，柱温为35 ℃，进样量为20 μL。

2.2.2 溶液的制备 （1）Cur对照品贮备液：精密称取Cur对照品13.21 mg于10 mL棕色容量瓶中，加甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀，即得质量浓度为1.321 mg/mL的Cur对照品贮备液，于4 ℃冰箱中保存。临用前用甲醇稀释制成相应质量浓度的标准溶液。（2）大黄素对照品溶液：精密称取内标大黄素对照品20 mg于100 mL棕色容量瓶中，加甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀，即得质量浓度为200 μg/mL的内标溶液，于4 ℃避光保存。

2.2.3 组织样品的处理 将大鼠的心、肺、肾和肝剪碎后，按照称定质量的2倍加入生理盐水匀浆，转移至离心管中，以4 000 r/min离心10 min，吸取上清液180 μL，精密加入大黄素对照品溶液20 μL、乙酸乙酯-甲醇混合溶剂（体积比为9∶1）1 mL，涡旋3 min后，以12 000 r/min离心10 min；小心吸取上层有机溶剂900 μL转移至另一离心管中，以氮气吹干，残渣加甲醇100 μL复溶，涡旋2 min，以12 000 r/min离心10 min，取上清液进样测定。

2.2.4 专属性考察 取空白心、肺、肾和肝组织样品，各空白组织+Cur（0.647 5 μg/mL）样品以及大鼠给药后0.5 h的组织样品各适量，按“2.2.3”项下方法处理（空白组织样品不需要添加内标）后，再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定，记录色谱图。结果显示，Cur和大黄素的保留时间分别约为10.1、15.0 min，2个色谱峰互不干扰且峰形良好，理论板数以Cur和大黄素计均不低于2 000，且各样品中的内源性物质不干扰Cur的测定，表明该色谱条件下专属性良好。结果见图1～图3。

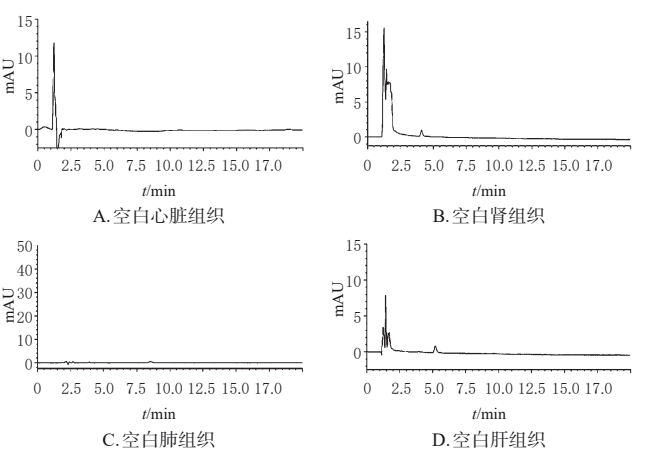


图1 空白组织样品的HPLC图

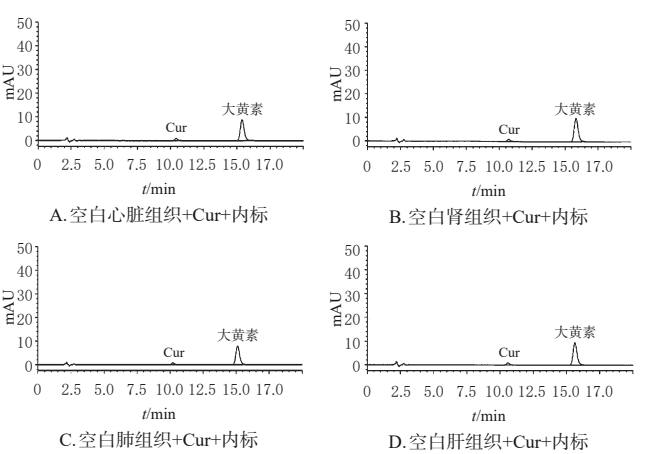
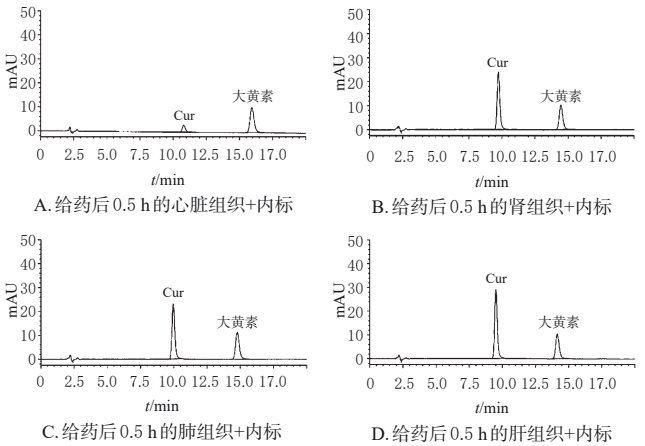


图2 空白组织+Cur+内标的HPLC图



A.给药后0.5 h的心脏组织+内标　B.给药后0.5 h的肾组织+内标
C.给药后0.5 h的肺组织+内标　D.给药后0.5 h的肝组织+内标

图3　给药后0.5 h各组织样品+内标的HPLC图

2.2.5　线性关系、定量下限、检测限的考察　取质量浓度为1.321 mg/mL的Cur对照品贮备液，用甲醇逐级稀释成质量浓度分别为1 295.00、647.50、323.75、129.50、64.75、12.95、6.475、1.295、0.647 5 μg/mL的系列标准溶液。分别精密吸取心、肾和肝组织的空白匀浆液180 μL，加入上述系列标准溶液20 μL，然后按“2.2.3”项下方法处理，即得Cur质量浓度分别为129.5、64.75、32.375、12.95、6.475、1.295、0.647 5、0.129 5、0.064 75 μg/mL的系列标准心、肾、肝组织样品溶液。同法精密吸取肺组织空白匀浆液，加入647.50、323.75、129.50、64.75、12.95、6.475、1.295、0.647 5 μg/mL的系列标准溶液，同前处理，得Cur质量浓度分别为64.75、32.375、12.95、6.475、1.295、0.647 5、0.129 5、0.064 75 μg/mL的系列标准肺组织样品溶液。将上述组织样品溶液按“2.2.1”项下色谱条件进样分析，记录色谱图。以组织样品中Cur的质量浓度（X）为横坐标、Cur与内标的峰面积比值（Y）为纵坐标进行线性回归，以线性范围最低值为定量下限，以信噪比3∶1计算检测限。结果见表1。

表1　不同组织中Cur的线性关系、定量下限、检测限的考察结果

组织	回归方程	线性范围/(μg/mL)	r	定量下限/(μg/mL)	检测限/(μg/mL)
心	Y=5.230 8X−2.992 3	0.064 75～129.50	0.999 6	0.064 75	0.012 95
肺	Y=5.125 3X−1.769 1	0.064 75～64.75	0.998 7	0.064 75	0.012 95
肾	Y=4.727 6X−5.201 1	0.064 75～129.50	0.999 1	0.064 75	0.012 95
肝	Y=4.702 8X−5.605 1	0.064 75～129.50	0.998 9	0.064 75	0.012 95

2.2.6　精密度与准确度试验　取Cur对照品适量，加入空白组织样品溶液，按“2.2.3”项下方法制备含Cur定量下限质量浓度的组织样品溶液以及含Cur低、中、高质量浓度（0.129 5、1.295、32.375 μg/mL）的组织样品溶液，每个质量浓度平行制备6份。按“2.2.1”项下色谱条件进样分析，以实测质量浓度与理论质量浓度进行比较，考察各样品中Cur质量浓度的日内精密度和准确度；连续3 d进样，考察批间精密度和准确度。结果显示，各样品日内、日间RSD均小于15%（n=6），准确度均值在标示值的±15%之内，符合生物样品定量分析的要求[13]。

2.2.7　提取回收率　按“2.2.3”项下方法配制含Cur低、中、高质量浓度（0.129 5、1.295、32.375 μg/mL）的组织样品溶液，各6份，按“2.2.1”项下色谱条件进样测定，记录Cur峰面积（A_s）和大黄素（内标）峰面积（A_i）。另取空白组织样品，同法预处理至氮气吹干，在残渣中加入低、中、高质量浓度（0.129 5、1.295、32.375 μg/mL）的Cur对照品贮备液20 μL，大黄素对照品溶液20 μL、甲醇60 μL，涡旋2 min；以12 000 r/min离心10 min，各质量浓度平行6份，按“2.2.1”项下色谱条件进样测定，记录未经提取的Cur峰面积（A_s’）和大黄素峰面积（A_i’）。分别计算Cur和大黄素的提取回收率：Cur提取回收率（%）=A_s/A_s’×100%；大黄素提取回收率（%）=A_i/A_i’×100%。结果显示，低、中、高质量浓度的Cur在心脏组织中的提取回收率分别为（89.72±2.13）%、（92.68±0.74）%、（97.31±1.45）%，在肺组织中分别为（91.77±1.86）%、（96.27±1.07）%、（98.11±0.37）%，在肾组织中分别为（90.56±2.64）%、（95.19±0.93）%、（97.81±0.11）%，在肝组织中分别为（93.80±3.62）%、（97.77±1.07）%、（95.46±3.47）%，RSD均小于5%（n=6）；大黄素在心、肺、肾、肝组织中的提取回收率分别为95.21%、94.38%、96.12%、95.72%，RSD均小于4%（n=6），符合生物样品定量分析的要求[13]。

2.2.8　稳定性试验　按“2.2.3”项下方法制备含Cur低、中、高质量浓度（0.129 5、1.295、32.375 μg/mL）的组织样品溶液，各3份，考察其于25 ℃放置24 h、−40 ℃放置24 h、反复冻融（−40 ℃～室温）3次的稳定性。结果显示，各样品测得质量浓度与理论质量浓度的相对误差（RE）均在±15%范围内，提示样品在上述条件下稳定性良好[13]。

2.3　Cur-SLN在大鼠心、肾、肺、肝组织的分布考察

2.3.1　分组、给药与样品采集　将大鼠随机分为Cur原料药组和Cur-SLN组，每组45只。于给药前12 h开始禁食不禁水，参考文献[14—15]给药方法，两组大鼠分别尾静脉注射Cur原料药混悬液（以含0.5%聚山梨酯80的生理盐水溶液溶解，临用现配）和Cur-SLN混悬液，以Cur计注射剂量为25 mg/kg。分别于给药后0.25、0.5、1、2、4、6、8、12、24 h时，各组分别取5只大鼠用乙醚麻醉，然后处死，解剖分离大鼠的心、肺、肾和肝组织，用生理盐水将组织表面的残血洗净，定性滤纸吸干后精确称质量，然后置于离心管内，保存备用。

2.3.2　Cur-SLN给药后的组织分布　取给药后不同时间点各组织样品适量，按“2.2.3”项下方法处理后，再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定，记录峰面积并代入标准曲线计算不同时间点各组织样品中Cur的含量。采用SPSS 17.0软件对数据进行统计分析，数据均以$\bar{x}\pm s$表示，组间比较采用t检验。检验水准α=0.05。结果显示，与Cur原料药相应组织样品组比较，Cur-SLN组大鼠心、肾、肺（0.25～24 h各时间点）和肝（0.25～1 h、12～24 h各时间点）组织样品中Cur的含量均显著升高（P<0.05或P<0.01）；而肝（2～8 h各时间点）组织样品中Cur的含量则显著降低（P<0.01）。结果见表2。

表2　各组大鼠给药不同时间点后各组织样品中Cur含量的测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=5$，μg/mL）

样品	0.25 h	0.5 h	1 h	2 h	4 h	6 h	8 h	12 h	24 h
Cur原料药组心脏组织	2.67±1.25	6.46±1.87	13.24±2.51	16.34±4.11	12.72±1.44	7.31±1.23	3.92±1.31	1.09±0.12	0.41±0.21
Cur原料药组肺组织	0.95±1.34	2.98±1.78	4.35±1.01	8.21±0.92	4.86±1.02	3.77±0.56	2.18±1.59	0.59±1.20	0.23±0.12
Cur原料药组肾组织	7.21±2.99	13.32±1.62	18.09±7.27	21.75±1.24	13.35±0.46	10.13±0.31	6.46±1.25	5.42±1.98	1.63±0.35
Cur原料药组肝组织	1.82±0.35	8.77±0.40	42.17±1.17	75.40±2.21	120.43±1.92	63.73±1.40	28.87±1.25	3.48±0.30	0.62±0.10
Cur-SLN组心脏组织	7.19±1.18[a]	16.42±1.97[b]	36.79±0.41[b]	43.84±0.55[b]	50.12±3.99[b]	68.91±0.46[b]	21.32±0.68[b]	16.41±2.11[b]	12.57±0.43[b]
Cur-SLN组肺组织	13.35±1.13[b]	27.12±1.79[b]	31.63±0.33[b]	44.97±0.21[b]	49.21±0.27[b]	56.42±2.30[b]	22.62±0.39[b]	17.21±0.61[b]	11.24±0.81[b]
Cur-SLN组肾组织	18.95±0.31[b]	32.97±1.43[b]	42.51±2.12[b]	57.35±3.61[b]	63.38±1.41[b]	80.64±2.49[b]	25.31±2.23[b]	16.51±3.17[a]	10.92±1.01[b]
Cur-SLN组肝组织	25.07±1.17[b]	32.63±0.86[b]	47.17±1.35[b]	67.77±1.40[b]	75.43±0.76[b]	52.14±1.57[b]	23.47±0.93[b]	10.01±0.73[b]	7.82±0.59[b]

a：与Cur原料药组同时间点同组织样品比较，$P<0.05$；b：与Cur原料药组同时间点同组织样品比较，$P<0.01$

3　讨论

纳米技术的迅速发展为人类很多重大疾病的治疗提供了新机会。纳米药物能够提高难溶性药物的有效性和安全性，在药物递送系统中起着非常重要的作用[16]。Cur具有多种药理活性，且毒性低、药源充足，但其生物利用度低，限制了其在临床中的应用[17]。SLN是一种针对低生物利用度活性成分的理想递药系统[18]，能在一定程度上提高药物的生物利用度。

本课题组前期采用微乳法制备了Cur-SLN，并对其进行了质量评价和体外释药研究，其包封率为87.73%、载药量为7.72%、平均粒径为（168.9±1.0）nm、多分散系数为0.212±0.02[12]，表明本课题组所制的Cur-SLN粒度均匀，理化性质良好。本研究以Cur原料药为参照，采用大鼠尾静脉给药后，考察Cur-SLN在大鼠心、肾、肺和肝组织中的分布情况。结果发现，与Cur原料药组比较，Cur-SLN组大鼠心、肾、肺（0.25～24 h各时间点）和肝（0.25～1 h、12～24 h各时间点）组织样品中Cur的含量均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$）；而肝（2～8 h各时间点）组织样品中Cur的含量则显著降低（$P<0.01$）。由此可知，采用SLN负载Cur后，增加了Cur在心、肾、肺组织中的分布，延长了其在心、肾、肺组织中的相对滞留时间，有利于提高Cur在体内的生物利用度。静脉给药1 h后，Cur在肝组织中的分布先明显减少，12 h后又显著增加，这可能是由于各个组织中的药物浓度和药量分布是一个变化的过程，带负电荷的SLN易在肝组织中蓄积，从而出现肝组织药物分布的双峰现象。

综上所述，本研究将Cur制成SLN后，增加了其在心、肾、肺组织的分布。

参考文献

[1] 夏亚萍，雒云祥，路小燕. 心肾综合征中西医治疗研究进展[J]. 中西医结合研究，2021，13(2)：115-117，121.

[2] 李旭，王梓，郝迪，等. 参附强心丸对心肾综合征模型大鼠心肌细胞中LC3b、Bax表达的影响[J]. 中国药房，2016，27(19)：2602-2605.

[3] 李颖. 血管紧张素受体-脑啡肽酶双重抑制通过调控TGF-β/Smad信号通路对心肾综合征的作用及机制研究[D]. 天津：天津医科大学，2019.

[4] YAO Q，KE Z Q，GUO S，et al. Curcumin protects against diabetic cardiomyopathy by promoting autophagy and alleviating apoptosis[J]. J Mol Cell Cardiol，2018，124：26-34.

[5] 郜珊珊，霍建华，王晨，等. 姜黄素通过增强心肌自噬活性改善自身免疫性心肌炎大鼠的心功能[J]. 西安交通大学学报（医学版），2019，40(6)：1018-1022.

[6] 李旭，郝迪，刘伟伟，等. 姜黄素固体脂质纳米粒对心肾综合征模型大鼠心、肾、肺功能及细胞自噬相关因子表达的影响[J]. 中国药房，2021，32(19)：2347-2353.

[7] MEHTA P，BOTHIRAJA C，MAHADIK K，et al. Phytoconstituent based dry powder inhalers as biomedicine for the management of pulmonary diseases[J]. Biomed Pharmacother，2018，108：828-837.

[8] PRATHIPATI B，ROHINI D P，KOLA D P K，et al. Neuroprotective effects of curcumin loaded solid lipid nanoparticles on homocysteine induced oxidative stress in vascular dementia[J]. Curr Res Behav Sci，2021，2：100029.

[9] 王金悦，叶青卓，李婷，等. 应用Box-Behnken实验设计优化七叶皂苷钠固体脂质纳米粒的处方研究[J]. 中国药剂学杂志，2021，19(1)：1-11.

[10] 杨娟，钟莹，尚曙玉，等. 白藜芦醇磷脂复合物固体脂质纳米粒的制备及其体内药动学研究[J]. 中成药，2021，43(4)：841-846.

[11] MOHAMED J M，ALQAHTANI A，AHMAD F，et al. Pectin co-functionalized dual layered solid lipid nanoparticle made by soluble curcumin for the targeted potential treatment of colorectal cancer[J]. Carbohydr Polym，2021，252：117180.

[12] 李楠，李旭，刘伟伟，等. 姜黄素固体脂质纳米粒干粉吸入剂的体外释药、体内急性毒性及对哮喘模型小鼠炎症反应的影响[J]. 中国药房，2019，30(3)：332-338.

[13] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：四部[S]. 2020年版. 北京：中国医药科技出版社，2022：466.

[14] 张迪，许茜，刘珂，等. 2种姜黄素聚合物胶束在大鼠体内的药动学比较研究[J].中国中药杂志，2016，41(19)：3668-3673.

[15] 俞婷婷，郑英，丁志山，等. 新型姜黄素纳米粒在小鼠体内组织分布的研究[J]. 中国现代应用药学，2019，36(3)：261-268.

[16] 刘君，许银银，李萌，等. 纳米药物的研究进展[J]. 药学与临床研究，2020，28(1)：51-55.

[17] 张金兰，李朝霞，黄支隆，等. 姜黄素在肺部疾病中的研究进展[J]. 贵州医药，2019，43(1)：42-45.

[18] MU H，HOLM R. Solid lipid nanocarriers in drug delivery：characterization and design[J]. Expert Opin Drug Deliv，2018，15(8)：771-785.

（收稿日期：2022-05-05　修回日期：2022-12-04）

（编辑：唐晓莲）