

齐墩果酸纳米粒在小鼠体内分布及靶向性研究

王 婴¹, 辛俊伟², 王 岩² (1. 广东药学院医药化工学院, 广东 中山 528458; 2. 广东药学院中药学院, 广东 广州 510006)

摘要: **目的** 研究齐墩果酸纳米粒(OA-NP)在小鼠体内的分布及靶向性。**方法** 采用纳米沉淀法制备 OA-NP, 经小鼠尾静脉给药, 采用 HPLC 内标法检测齐墩果酸(OA)在小鼠主要脏器(心、肝、脾、肺、肾)中的浓度随时间的变化, 并与 OA 溶液对照组进行比较, 以峰浓度比(C_e)和相对摄取率(R_e)评价其靶向性。**结果** OA-NP 组在各脏器中的浓度明显高于 OA 溶液对照组, 其靶向性顺序依次为: 肝 > 脾 > 肺 > 肾 > 心, 并且肝中的药物浓度显著高于其他脏器。**结论** OA-NP 能明显改变 OA 在小鼠体内的组织分布, 尤其具有理想的肝靶向性。

关键词: 齐墩果酸; 纳米粒; 体内分布; 靶向性

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)03-0311-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.03.018

Distribution and Targeting of Oleanolic Acid Nanoparticles in Rats

WANG Ying¹, XIN Junwei², WANG Yan² (1. School of Pharmaceutical and Chemical Engineering, Guangdong Pharmaceutical University, Zhongshan 528458 Guangdong, China; 2. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006 Guangdong, China)

Abstract: Objective To study the distribution and targeting of oleanolic acid nanoparticles (OA-NP) in rats.

Methods The nanoparticles were prepared by nanoprecipitation method. After caudal intravenous injection, the contents of oleanolic acid in rat heart, liver, spleen, lung and kidney were detected by internal standard HPLC. The indexes of peak concentration ratio (C_e) and relative uptake rate(R_e) were used to evaluate the targeting feature of OA-NP. **Results** The tissue concentration of OA in various organs of OA-NP group was significantly higher than that of OA solution. The targeting sequence was liver>spleen>lung>kidney>heart, and the concentration in the liver was significantly higher than that of other organs. **Conclusion** The tissue distribution of OA-NP differs from OA in mice, and OA-NP has ideal liver targeting in particular.

Keywords: Oleanolic acid; Nanoparticles; Tissue distribution; Targeting

齐墩果酸(oleanolic acid, OA)主要用于慢性迁延性肝炎、急性黄疸型肝炎、肝纤维化等肝病的治疗, 但其水溶性差, 口服生物利用度较低, 影响了临床疗效。纳米粒(nanoparticle, NP)也称为毫微粒, 可增加难溶性药物的溶解度, 而且经静脉注射后可被网状内皮系统所吞噬, 富集于肝、脾、肺等器官, 也可由细胞内或细胞间穿过内皮壁到达靶部位, 可实现靶向给药^[1]。OA 纳米粒(OA-NP)是以聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)为包封材料制成的纳米粒冻干

制剂, 本研究旨在比较 OA 和 OA-NP 在小鼠体内的分布及肝靶向性。

1 仪器与材料

LC-20A 型高效液相色谱仪(日本岛津公司); JB-2 型恒温磁力搅拌器(上海智光仪器仪表有限公司); BP211D 型电子天平(德国赛多利斯公司); 电动组织匀浆器(美国 Pro scientific 公司); TDL-60B 型台式离心机(上海安亭科学仪器厂); SK-1 型快速混

收稿日期: 2013-09-25

作者简介: 王婴, 女, 实验师, 研究方向: 药物新剂型与质量控制研究。Email: 1248322680@qq.com。通讯作者: 王岩, 博士, 教授, Email: gdpuwy@126.com。

基金项目: 广东省科技计划项目(20120318055); 广东省教育厅学科建设专项资金(2013KJ CX0110)。

匀器(江苏国华仪器厂)。

OA 对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 110709-200505); 丹参酮 IIA 对照品(中国药品生物制品检定所, 110766-200619); OA 原料(四川省什邡市华康药物原料厂); PLGA(Mr15000, 山东省医疗器械研究所); 聚乙二醇硬脂酸酯 15(HS15, 德国 BASF 公司); 乙腈为色谱纯, 其余试剂均为分析纯。

昆明种小鼠, SPF 级, 体质量 18~22 g, 由广州中医药大学实验动物中心提供, 许可证号: SCXK(粤)2008-0020。

2 方法与结果

2.1 OA-NP 的制备 称取 OA 0.3 g、PLGA 1.0 g 溶于 10 mL 丙酮中, 形成有机相, 另取 0.25 g 聚乙二醇硬脂酸酯 15 溶于 50 mL 水中, 形成水相。采用液下注入法, 将有机相用注射器针头以 30 mL·min⁻¹ 的速度注入到不断搅拌的水相中, 常温下继续搅拌 4 h 使丙酮挥尽, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 得带有蓝色乳光的纳米粒胶体溶液。加入 15% 蔗糖作为支架剂, 搅拌使溶解后分装于预先洗净的西林瓶中, 置 -45 ℃ 预冻 8 h, 然后维持一定真空度冷冻干燥 31 h^[2], 加塞压盖, 即得。

2.2 OA-NP 的质量评价 取制备的冻干粉 3 批, 肉眼观察可见均匀白色疏松状固体, 表面光洁, 无塌陷、皱缩、空洞, 加入注射用水 5 mL 分散后振摇 30 s 内完全溶解, 为均匀的白色乳状溶液, 表明其再分散性良好; 另取冻干粉针剂, 加注射用水分散后, 以透射电镜(TEM)观察其形态, 结果表明微粒形态完整, 呈球形或类球形; 以激光粒度分析仪测定粒径, 结果微粒在 50~300 nm 范围内呈正态分布, 平均粒径为 123.8 nm, 分别见图 1、图 2。

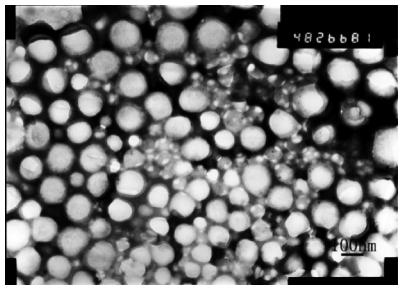


图 1 OA-NP 透射电镜照片(×52000)

Figure 1 TEM images of OA-NP(×52000)

2.3 生物样品中 OA 测定方法的建立

2.3.1 色谱条件 色谱柱: Phenomenex C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.1%磷酸溶

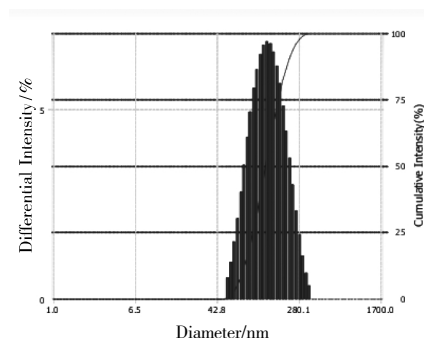
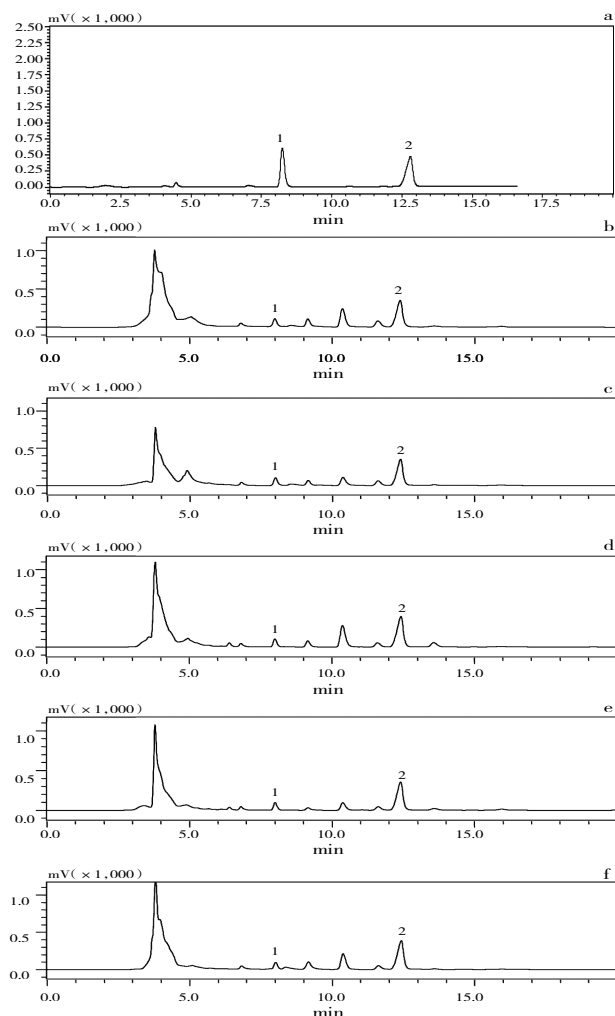


图 2 OA-NP 粒径分布图

Figure 2 The particle size distribution of OA-NP

液(90:10); 检测波长: 215 nm; 柱温: 30 ℃; 流速: 0.7 mL·min⁻¹; 进样量: 20 μL。HPLC 色谱图见图 3。

2.3.2 标准曲线的制备 精密称取 OA 标准品 37.5 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇超声溶解并定容至刻度, 摇匀, 制得浓度为 750 μg·mL⁻¹ 的储备液; 分别



a. 对照品; b. 肝供试品; c. 心供试品; d. 脾供试品; e. 肺供试品; f. 肾供试品。1. 丹参酮 IIA; 2. OA

图 3 OA 的 HPLC 色谱图

Figure 3 HPLC results of OA

移取此溶液稀释，配成 OA 浓度分别为 1.875，3.75，7.5，37.5，75，375，750 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。另精密称取丹参酮 IIA 9.9 mg 置于 50 mL 量瓶中，用甲醇适量溶解并定容至刻度，得浓度为 198 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的内标溶液。

摘取小鼠心、肝、脾、肺、肾各器官，用滤纸吸去表面血渍，称定质量。加入 2 倍量水于匀浆器中匀浆^③。分别精密吸取 400 μL 空白组织匀浆液 6 份，精密加入上述不同浓度的 OA 对照品溶液 1200 μL 、丹参酮 IIA 内标溶液 50 μL ，再加入 3 倍量甲醇，涡漩振荡 1 min，以 15000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min，移取上清液，依次测定 OA 与内标物峰面积，并将两者的比值对进样浓度进行线性回归，得各脏器的线性回归方程，线性范围为 1.875 ~ 750 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，结果见表 1。

表 1 OA 在小鼠各脏器中的回归方程

Table 1 Regression equation of OA in mice organs

组织	回归方程	R^2
心	$Y=0.0775X-0.0033$	0.9941
肝	$Y=0.093X-0.0114$	0.9953
脾	$Y=0.1053X-0.011$	0.9913
肺	$Y=0.0802X-0.0059$	0.9933
肾	$Y=0.0539X-0.0024$	0.9917

2.3.3 精密度实验 精密吸取 400 μL 空白组织匀浆液 9 份，再分别加入浓度为 50，100，300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 OA 对照品溶液 1200 μL 、丹参酮 IIA 内标溶液 50 μL ，制成高、中、低 3 种浓度生物样品，混匀，然后按 2.3.2 项下方法处理和测定，依次测定 OA 及内标峰面积，将两者的比值代入各脏器回归方程，分别求出浓度，计算精密度，结果 RSD 均小于 3%，表明本法精密度良好。

2.3.4 方法回收率 按 2.3.3 项下的方法制成高、中、低 3 种浓度的生物样品，按 2.3.2 项下方法处理和测定，计算方法回收率，结果见表 2。

2.4 OA-NP 小鼠体内分布 将 OA-NP 加注射用水分散制成浓度为 2.4 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混悬液，作为试验组；另将 OA 用 5% 二甲基亚砜(DMSO)溶液溶解，制得浓度为 4.8 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 OA 溶液，作为对照组。取小鼠 90 只，随机分为 18 组，每组 5 只。其中 9 组按 10.5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ OA 的剂量尾静脉注射 OA-NP 混悬液，另 9 组给予同剂量的 OA 溶液。给药后，各组分别在 5 min、15 min、30 min、60 min、2 h、4 h、8 h、12 h、24 h 处死小鼠。同时迅速摘取小鼠心、肝、

表 2 回收率试验结果($n=3$)

Table 2 Results of recovery test

组织	加入量/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	测得量/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	回收率/%
心	50	49.8	99.60
	100	99.8	99.80
	300	298.7	99.57
肝	50	50.1	100.20
	100	100.0	100.00
	300	296.5	98.53
脾	50	49.6	99.20
	100	100.4	100.40
	300	305.7	101.90
肺	50	49.6	99.20
	100	98.5	98.50
	300	296.5	98.83
肾	50	49.2	98.40
	100	99.2	99.20
	300	292.0	97.33

脾、肺、肾各器官。按 2.3.2 项下方法处理，求得各时间点各组织中的 OA 浓度，结果见表 3 和表 4。

表 3 OA-NP 给药后小鼠各脏器中的 OA 浓度($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $n=5$)

Table 3 OA concentrations in mice organs after medication of OA-NP

时间/min	心	肝	脾	肺	肾
5	80.539	437.707	298.777	42.938	120.900
15	105.038	582.021	430.074	64.354	213.026
30	133.950	604.681	460.450	48.060	84.136
60	118.293	477.055	157.624	44.010	80.263
120	108.913	436.188	146.866	38.062	77.511
240	104.794	420.411	109.490	34.397	69.050
480	103.965	413.907	65.607	33.970	56.774
720	101.747	408.753	64.991	32.175	51.361
1440	80.269	394.240	61.771	29.851	42.506

表 4 OA 给药后小鼠各脏器中的 OA 浓度($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $n=5$)

Table 4 OA concentrations in mice organs after medication of OA-NP

时间/min	心	肝	脾	肺	肾
5	89.791	10.923	16.030	4.056	18.486
15	84.846	9.127	8.582	3.119	17.685
30	78.007	7.725	8.578	3.064	17.612
60	51.72	5.248	7.135	2.600	16.793
120	48.048	5.237	6.748	2.546	14.009
240	45.563	5.160	5.006	1.916	12.127
480	33.27	5.049	2.732	—	11.807
720	31.955	3.528	1.990	—	9.428
1440	30.824	2.140	—	—	3.295

注：“—”表示未检测到。

2.5 靶向性评价 将 OA-NP 试验组和 OA 溶液对照组所测药物浓度数据分别绘制药-时曲线, 用 3P97 药动学程序进行处理, 计算峰浓度($C_{\max}$)和药时曲线下面积(AUC), 以峰浓度比(C_e)、相对摄取率(R_e)评价药物的靶向性^[4-5]。计算公式为: $C_e = (C_{\max})_{\text{NP}} / (C_{\max})_{\text{OA}}$, $R_e = \text{AUC}_{\text{NP}} / \text{AUC}_{\text{OA}}$, 结果见表 5。

表 5 OA-NP 的体内靶向性评价结果

Table 5 Results of targeting evaluation of OA-NP in vivo

组织	OA-NP		OA		C_e	R_e
	$C_{\max}$	AUC	$C_{\max}$	AUC		
	$/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	$/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}$	$/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	$/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}$		
心	133.950	139979.48	89.791	53312.79	1.49	2.63
肝	604.681	597108.30	10.923	5680.06	55.36	105.12
脾	460.450	124912.80	16.030	3221.29	28.72	38.78
肺	64.354	48097.10	4.056	608.15	15.87	79.09
肾	213.026	82201.87	18.486	13291.12	11.52	6.18

3 讨论

组织中内源性物质较为复杂, 样品处理步骤多, 待测组分损耗大。为了提高其分析的准确度, 本研究采用内标法进行测定。通过对人参皂苷 Rg_3 、丹酚酸 B、大黄酚、丹参酮 II A 等内标物质的比较, 以丹参酮 II A 色谱峰保留时间适中, 对 OA 色谱峰无干扰, 且能与杂质峰完全分离, 故以丹参酮 II A 作为内标物。

生物样品进行预实验时, 为减少干扰, 选择乙腈和甲醇对其进行了蛋白沉淀, 经 HPLC 测试, 用甲醇沉淀蛋白, OA 的损耗较乙腈低, 因此选择用甲醇作为蛋白沉淀试剂。

在色谱条件的摸索过程中, 曾以乙腈-水(90:10)作为流动相, 对处理后的生物样品进行分析, 但主峰拖尾较严重, 加入磷酸后峰形有较大改善; 生物样品虽经预处理但杂质仍然较多, 通过对分析条件的优选, 将流速调整为 $0.7 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 可将 OA、内标物及内源性杂质很好地分离。

小鼠体内分布试验结果显示, OA-NP 试验组在各脏器中的组织浓度明显高于 OA 溶液对照组, 其靶向性顺序依次为: 肝>脾>肺>肾>心, 并且肝中的药物浓度显著高于其他脏器, 表明 OA-NP 入血后很快被网状内皮系统丰富的脏器所摄取, 因而能明显改变 OA 在小鼠体内的组织分布, 尤其具有理想的肝靶向性。本研究有望为 OA 的临床应用提供一种疗效更佳、更安全的新制剂。

参考文献:

- [1] 王黎, 候新朴. 肝靶向给药系统的研究[J]. 国外医学(药学分册), 2001, 28(3): 106-164.
- [2] 何林, 李素华, 吴正中, 等. 肝靶向阿克拉霉素 A 固体脂质纳米粒质量考察及体内分布研究[J]. 中国药学杂志, 2008, 43(6): 431-435.
- [3] 陈纭, 金涌, 胡志伟. 苦参素肝靶向缓释纳米球的制备及大鼠体内分布研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(10): 2467-2469.
- [4] 陆彬, 奉建芳, 杨秀岑. 重组人干扰素 $\alpha-2a$ 聚氰基丙烯酸丁酯肝靶向缓释纳米球冻干剂的研究[J]. 四川大学学报(医学版), 2004, 35(1): 1-4.
- [5] 吴超, 郭伟英. 甘草次酸衍生物修饰去甲斑蝥素脂质体在小鼠体内肝靶向性研究[J]. 辽宁医学院学报, 2008, 29(6): 490-491.

(编辑: 梁进权)

国家食品药品监管总局发布 2013 年国家药品不良反应监测年度报告

来源: 国家食品药品监督管理总局 <http://www.sda.gov.cn/WS01/CL0051/99774.html>

日前, 国家食品药品监督管理总局发布《国家药品不良反应监测年度报告(2013年)》。2013年, 国家药品不良反应监测网络共收到药品不良反应/事件报告 131.7 万余份, 比 2012 年增长 9.0%。其中, 新的和严重的药品不良反应/事件报告 29.1 万份, 占同期报告总数的 22.1%。药品不良反应报告县级覆盖率达到 93.8%, 全国每百万人口平均报告数量达到 983 份。统计分析显示, 2013 年药品不良反应/事件报告仍以医疗机构为主, 药品生产企业报告较 2012 年有所增长。从涉及药品情况看, 国家基本药物安全状况平稳, 抗感染药报告数量报告比例已连续 4 年呈现下降趋势, 心血管系统用药报告比例较 2012 年上升 0.4 个百分点; 注射剂报告比例在连续几年下降后出现小幅增长, 增加 0.2 个百分点。从涉及患者情况看, 65 岁以上老年人报告占 17.8%, 较 2012 年明显增高。

国家食品药品监督管理总局提醒关注以下几方面问题: 一、老年患者不良反应报告比例上升明显, 提示应重视老年人用药安全性问题; 二、中药合并用药现象突出, 应警惕药物的相互作用; 三、不合理用药现象较为普遍, 增加药品安全风险, 建议医务工作者和患者加强安全用药意识, 防范用药风险。(编辑部辑录)