

栀子提取物类脂质体在大鼠体内的分布及靶向性研究^Δ

王吉平*, 王蔚, 张炜煜[#](长春中医药大学药学院, 长春 130117)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)04-0473-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.04.13

摘要 目的:研究栀子提取物类脂质体在大鼠体内的药物分布特点及靶向性。方法:采用改良薄膜分散法制备栀子提取物类脂质体。将30只大鼠按体重随机均分为空白组、栀子提取物(57 mg/kg)组和栀子提取物类脂质体(131 mg/kg)组,ig相应药物,空白组ig等体积蒸馏水,每天1次,连续7 d。末次给药1 h后,取大鼠心、肝、脾、肺、肾组织,采用高效液相色谱法检测其中栀子提取物有效成分栀子苷的含量,通过药物靶向指数(DTI)定量评价栀子提取物类脂质体的体内靶向性。结果:与栀子提取物组比较,栀子提取物类脂质体组大鼠心、脾、脑组织中栀子苷含量明显增加($P<0.01$),DTI分别为1.718、1.972、13.071;肝、肾组织中栀子苷含量明显降低($P<0.01$),DTI分别为0.431、0.467。结论:栀子提取物类脂质体改变了栀子苷在大鼠体内的组织分布,可靶向作用于脑组织,减少了肝的首关效应。

关键词 栀子提取物;类脂质体;药物靶向指数;靶向性;栀子苷;大鼠

Study on Distribution and Targeting of *Gardenia jasminoides* Extract Niosomes in Rats

WANG Jiping, WANG Wei, ZHANG Weiyu (School of Pharmacy, Changchun University of TCM, Changchun 130117, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study distribution and targeting of *Gardenia jasminoides* extract niosomes in rats. METHODS: *G. jasminoides* extract niosomes were prepared by modified thin film dispersion method. 30 rats were randomly divided into *G. jasminoides* extract group (57 mg/kg) and *G. jasminoides* extract liposome group (131 mg/kg) according to their weight. They were given relevant medicine intragastrically, once a day, for consecutive 7 days. 1 h after last administration, heart, liver, spleen, lung and kidney tissue were isolated, and HPLC method was adopted to the contents of active ingredients gardenoside in them. The targeting of *G. jasminoides* extract niosomes was evaluated by DTI quantitatively. RESULTS: Compared with *G. jasminoides* extract group, the contents of gardenoside in heart, spleen and brain tissue of rats increased significantly in *G. jasminoides* extract niosomes group ($P<0.01$), and DTI were 1.718, 1.972 and 13.071; the contents of gardenoside in liver and kidney decreased significantly ($P<0.01$), and DTI were 0.431 and 0.467, respectively. CONCLUSIONS: *G. jasminoides* extract niosomes change the distribution of gardenoside in rats, showing brain targeting effect and decreasing first pass effect for liver.

KEYWORDS *Gardenia jasminoides* extract; Niosome; Drug target index; Targeting; Gardenoside; Rat

栀子为茜草科植物栀子(*Gardenia jasminoides* Eills)的干燥成熟果实^[1],具有解热镇痛、镇静催眠、保肝利胆、抗抑郁、降压、抗血栓等作用^[2]。栀子提取物中的主要化学成分是环烯醚萜苷类化合物,以栀子苷计含量达到60%以上^[3]。研究表明,

栀子提取物中栀子苷对抑郁模型大鼠具有明显的改善作用^[4]。另有通过栀子粗提物对慢性应激导致抑郁模型小鼠行为学研究,结果也表明栀子提取物对抑郁模型小鼠行为有明显的改善作用^[5]。此外,还有报道显示,栀子苷具有抗病毒、抗抑郁、

- 519.
- [5] 杨娟,张元珍,刘文惠. 935 MHz微波电磁辐射对小鼠胚泡着床的影响[J]. 生殖与避孕, 2008, 28(2):80.
- [6] 邵帅,马增春,洪倩,等. 基于Nrf2-ARE通路的抗辐射有效活性成分筛选研究[J]. 中国药理学通报, 2012, 28(1):29.
- [7] 马惠荣,陈景伟,罗亚萍,等. 滋肾育胎丸对手机辐射大鼠卵巢功能和ATM蛋白表达的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2014, 31(2):252.
- [8] 何秋明,肖尚杰,夏慧敏. 大鼠阴道涂片的观察[J]. 广州医学院学报, 2007, 35(4):54.

- [9] 林晓萍,李雯,沈华浩. 抗氧化应激转录因子-Nrf2的研究进展[J]. 中国病理生理杂志, 2011, 27(6):1234.
- [10] Niture SK, Khatri R, Jaiswal AK. Regulation of Nrf2: an update[J]. *Free Radic Biol Med*, 2014, 66(8):36.
- [11] 马惠荣,陈景伟,栗晶晶,等. 900MHz拟手机电磁辐射对大鼠卵巢功能的影响[J]. 解放军医药杂志, 2013, 25(10):39.
- [12] 史云,杨胜华,陶莉莉,等. 滋肾育胎丸治疗脾肾虚弱型卵巢储备功能减退临床观察[J]. 山东中医药大学学报, 2013, 37(4):29.
- [13] 栾增强,曹文富,黄和贤,等. 延衰合剂对D-半乳糖衰老小鼠血清SOD、MDA、IL-2和睾酮的影响[J]. 中国药房, 2011, 22(7):589.

Δ 基金项目:吉林省中医药管理局科技项目(No.2012-075)
* 硕士研究生。研究方向:中药制剂。E-mail:379502816@qq.com

[#] 通信作者:教授,硕士。研究方向:药物新剂型与新型给药系统研究。电话:0431-86172198。E-mail:weiyuzhang2003@126.com

(收稿日期:2015-06-26 修回日期:2015-12-03)

(编辑:林静)

以及抗胃炎的作用。栀子提取物本身半衰期较短,且生物利用度低。而类脂质体是由非离子型表面活性剂与胆固醇组成,具有类似脂质体封闭的双层结构,可以用来进行细胞膜的生物模拟、药物的包裹及输送等。其具有缓释作用,从而延长药物的半衰期;具有良好的生物相容性,提高药物的生物利用度;同时,还具有被动靶向作用。因此,笔者将栀子提取物制备成类脂质体,进行大鼠体内分布实验,分析抗抑郁活性成分栀子苷的分布情况,并探讨其靶向作用。

1 材料

1.1 仪器

AR2140 电子天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司);JA5103N 电子天平(上海民桥精密科学仪器有限公司);TGL-18C 高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂);HH.SY21-Ni 电热恒温水浴锅(北京市长源实验设备厂);Agilent 1200 高效液相色谱(HPLC)仪(美国安捷伦公司)。

1.2 药品与试剂

栀子苷对照品、芍药苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110749-200714、110736-200934,纯度:99.7%、94.9%);栀子提取物(纯度:以栀子苷计为64.2%);栀子提取物类脂质体(长春中医药大学药学院药物制剂实验室自制);盐酸氟西汀胶囊(上海中西制药有限公司,批号:140302,规格:每粒20 mg);药用辅料硬脂山梨坦 60、聚山梨酯 80、胆固醇(湖南尔康制药股份有限公司);甲醇、乙腈为色谱纯(美国 Sigma 公司),其他试剂均为分析纯。

1.3 动物

SD 大鼠 30 只,♂,体质量 180~220 g,购自辽宁生物技术有限公司[合格证号:SCXK(辽)2014-0001]。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent Edipse SB-C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-水(12:88,V/V),流速:1.0 ml/min;柱温:25 ℃;进样量:10 μl;紫外检测波长:238 nm。

2.2 类脂质体的制备

根据前期优选的工艺条件进行试验:称取聚山梨酯 60 2.7 g、聚山梨酯 80 0.5 g、胆固醇 3.3 g,加入乙醇 250 ml 使溶解,60 ℃ 下旋转蒸发形成薄膜,将干燥的薄膜溶于 100 ml 乙醚制成溶液,备用。另取栀子提取物约 5.0 g,加入 pH 为 6.8 的磷酸盐缓冲液(PBS),将乙醚溶液加入 PBS 溶液中,超声 10 min,60 ℃ 水合 10 min,制成类脂质体混悬液,喷雾干燥后即得栀子提取物类脂质体。

2.3 溶液的制备

2.3.1 栀子苷对照品贮备液的制备 取栀子苷对照品 25.0 mg,精密称定,置于 25 ml 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得质量浓度为 1.0 mg/ml 的栀子苷对照品贮备液。

2.3.2 混合对照品贮备液的制备 取空白组织样品,匀浆,按“2.3.5”项下方法处理并精密加入适量栀子苷对照品贮备液,制成栀子苷质量浓度为 0.2 mg/ml 的混合对照品贮备液,临用前稀释至所需质量浓度的混合对照品溶液。

2.3.3 内标溶液的制备 取芍药苷对照品约 3.6 mg,精密称定,置于 100 ml 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得芍药苷质量浓度为 0.036 mg/ml 的内标溶液。

2.3.4 样品贮备液的制备 取类脂质体 0.42 g,精密称定,置于 50 ml 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,制备成质量浓度为 8.4 mg/ml 的样品贮备液。

2.3.5 组织供试品溶液的制备^[6] 末次给药 1 h 后,取大鼠心、肝、脾、肺、肾、脑,用生理盐水冲洗,滤纸吸干,置尖底具塞试管中,于 -20 ℃ 冰箱中保存,备用。临用时将样品置匀浆器中,加入 5 ml 甲醇和 0.3 ml 内标溶液,匀浆,以离心半径为 5.9 cm、16 000 r/min 离心 15 min,收集上清液;沉淀加 5 ml 甲醇匀浆,离心,将上清液合并,挥干溶剂。残渣加甲醇适量溶解,置于 2 ml 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,过滤,即得各组织供试品溶液。阴性对照溶液为空白组大鼠组织供试品溶液,处理方法同上。

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性试验 制备混合对照品溶液、组织供试品溶液(肝脏组织)、阴性对照溶液(肝脏组织),按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱。结果显示,混合对照品溶液及组织供试品溶液色谱峰分离较好,栀子苷、芍药苷的保留时间分别为 10.99、19.48 min,阴性对照溶液无干扰。色谱图见图 1。

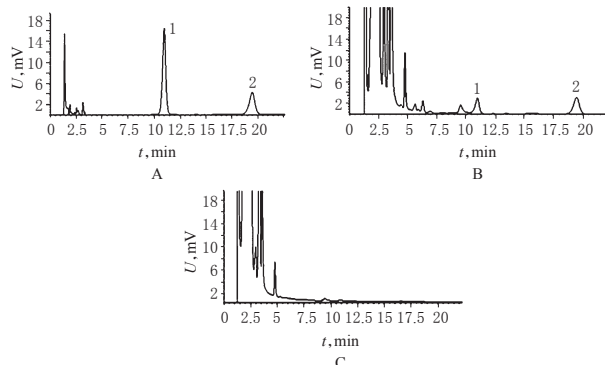


图 1 高效液相色谱图

A. 混合对照品溶液; B. 组织供试品溶液; C. 阴性对照溶液; 1. 栀子苷; 2. 芍药苷

Fig 1 HPLC chromatograms

A. mixed control solution; B. test sample solution; C. negative control solution; 1. gardenoside; 2. paeoniflorin

2.4.2 线性关系考察 取混合对照品贮备液 6 份,加甲醇稀释成含栀子苷质量浓度分别为 1.54、3.08、12.32、20.53、57.02、95.04 μg/ml 的混合对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件进行测定,记录色谱,以栀子苷与芍药苷峰面积比值(y)为纵坐标、混合对照品溶液中栀子苷质量浓度(x, mg/ml)为横坐标进行线性回归,得回归方程为 $y=26.211x+28.996$ ($r=0.9997$, $n=6$)。结果表明,栀子苷检测质量浓度的线性范围为 1.54~95.04 μg/ml。

2.4.3 重复性试验 分别精密吸取组织供试品溶液及混合对照品贮备液(0.2 mg/ml)各 6 份,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱。结果 RSD 分别为 1.81%、0.93% ($n=6$),表明该方法重复性较好。

2.4.4 稳定性试验 取同一批组织供试品溶液及混合对照品贮备液(0.2 mg/ml),分别在室温下放置 0、2、4、6、12、24 h 后按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱。结果显示,栀子苷峰面积的 RSD 分别为 1.22%、0.88% ($n=6$),表明测试溶液在 24 h 内稳定性较好。

2.4.5 精密度与回收率试验 精密取混合对照品贮备液,加甲醇制成栀子苷质量浓度分别为 1.54、3.08、12.32 μg/ml 的混合对照品溶液。按“2.1”项下色谱条件测定,同日测定 6 次考察日内精密度,连续测定 6 d 考察日间精密度,计算方法回收率和提取回收率。结果日内、日间 RSD 均小于 13% ($n=6$),表明该方法精密度较好。各质量浓度混合对照品溶液的方法回收率分别为 98.31%、102.46%、105.38%, RSD 分别为

3.12%、2.07%、1.08% ($n=3$); 提取回收率分别为 86.27%、92.46%、96.06%, RSD 分别为 3.39%、3.57%、3.05% ($n=3$), 表明该方法准确度较好。

2.5 大鼠体内分布实验

取 SD 大鼠 30 只, 按体质量随机均分为空白组、栀子提取物 (57 mg/kg) 组和栀子提取物类脂质体 (131 mg/kg) 组, ig 给药, 空白组大鼠 ig 等体积蒸馏水, 每天 1 次, 连续 7 d。末次给药 1 h 后, 断头处死大鼠, 取大鼠心、肝、脾、肺、肾、脑, 按“2.3.5”项下方法处理后, 按“2.1”项下色谱条件进样, 记录色谱。采用内标法测定各组织中栀子苷含量。为了定量评价栀子提取物类脂质体的体内靶向性, 引入药物靶向指数 [DTI, $DTI = \frac{\text{给予栀子提取物类脂质体后 } t \text{ 时刻 } i \text{ 器官的药物量}}{\text{给予栀子提取物后 } t \text{ 时刻 } i \text{ 器官的药物量}}$]。采用 SPSS 19.0 统计分析软件处理, 组间比较采用配对 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, 结果详见表 1。

表 1 栀子苷在不同给药组大鼠体内各组织的含量及其靶向性测定结果 ($n=10$)

Tab 1 The content of gardenoside in each tissue of rats and its targeting in different groups ($n=10$)

组织	栀子苷含量 ($\bar{x} \pm s$), $\mu\text{g/g}$		DTI
	栀子提取物组	栀子提取物类脂质体组	
心	0.254 3 ± 0.049 25	0.436 9 ± 0.123 47*	1.718
肝	1.863 9 ± 0.244 79	0.803 9 ± 0.055 56*	0.431
脾	0.365 9 ± 0.081 23	0.721 6 ± 0.060 62*	1.972
肺	0.647 6 ± 0.189 09	0.552 3 ± 0.167 15	0.853
肾	1.084 7 ± 0.049 29	0.507 2 ± 0.122 15*	0.467
脑	0.060 6 ± 0.016 63	0.792 1 ± 0.204 88*	13.071

注: 与栀子提取物组比较, * $P < 0.01$

Note: vs. *Gardenia jasminoides* extract group, * $P < 0.01$

由表 1 可知, 与栀子提取物组比较, 栀子提取物类脂质体组大鼠心、脾、脑中栀子苷含量明显增加, 肝、肾中栀子苷含量明显降低 ($P < 0.01$)。结果表明, 栀子提取物类脂质体可增加脑部栀子苷的含量, 使其在神经中枢更好地发挥药效。靶向性试验结果表明, 栀子提取物类脂质体在大鼠心、脾、脑中 DTI 均大于 1, 表明栀子提取物类脂质体对靶器官比非靶器官有选择性; 而栀子提取物类脂质体减少了药物在肝脏、肾脏中的分布, 避免了药物在肝脏的首关效应。其中, 在脑中的 DTI 值最大, 说明将栀子提取物制备成类脂质体后, 可增加药物进入脑组织的含量, 靶向作用于脑部, 更好地发挥其抗抑郁作用。

3 讨论

有研究表明, 栀子提取物主要成分栀子苷半衰期短、生物利用度低^[7-8]; 而类脂质体具有良好的生物相容性, 具有靶向作用, 并可提高生物利用度, 以及发挥缓释的作用^[9]。因此, 本试验将栀子提取物制备成类脂质体。实验中类脂质体的制备工艺为经过工艺优化后的最佳制备工艺, 并经过验证试验。在栀子苷含量测定的过程中, 由于动物组织的处理步骤相对烦琐, 难免会造成栀子苷含量的损失, 以致测定结果不准确。因

此, 在本实验中笔者选用芍药苷作为内标物质, 采用内标法进行栀子苷的含量测定, 对测定结果加以矫正, 以减小误差。同时, 阴性对照溶液色谱图显示, 各组织内源物质在栀子苷相应的保留时间处无干扰。在专属性试验中, 由于组织样品较多, HPLC 色谱图没有全部罗列出来, 仅给出了肝组织的色谱图加以表示, 其他各组织的色谱峰主峰的分离度均较好, 各组织的阴性对照无干扰。

本文着重探讨栀子提取物类脂质体的体内分布情况, 实验主要采用了栀子提取物组及栀子提取物类脂质体组进行对比分析。由实验结果可看出, 栀子提取物类脂质体组在心、脑组织的药物分布明显高于栀子提取物组, 因此, 将其制备成类脂质体对于栀子提取物在对脑神经元保护等^[10]方面发挥药效有更积极的意义。

在靶向性的研究中, 从结果可以看出, 将栀子提取物制备成类脂质体后, 若脑组织和心组织的 DTI 值明显高于 1, 则表明其靶向效果好。从本实验结果可以看出, 栀子提取物类脂质体在上述组织内的分布与该结论基本相符。

综上, 栀子提取物类脂质体改变了栀子苷在大鼠体内的组织分布, 可靶向作用于脑组织, 减少了肝的首关效应。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 四部[S]. 2015 年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 238.
- [2] 齐雅静, 顾军强, 王立, 等. 栀子果功能性成分研究进展[J]. 食品工业科技, 2013, 34(14): 363.
- [3] 杜守颖, 赵帅眉, 陆洋. 中药栀子提取物质量标准研究[J]. 北京中医药大学学报, 2009, 32(11): 768.
- [4] 沈小丽, 陈建丽, 田俊生, 等. 新型抗抑郁天然药物京尼平的药理学研究[C]//2014 年创新药物成药性评价高层学术论坛报告汇编. 眉山: 创新药物成药性评价高层学术论坛, 2014.
- [5] 郝文字. 栀子粗提物治疗慢性应激致抑郁模型小鼠的机制研究[D]. 北京: 中国协和医科大学, 2009.
- [6] 张笑恺. 欧前胡素在大鼠体内的药动学与组织分布研究[J]. 中国药房, 2013, 24(3): 216.
- [7] 江莉, 黄熙, 秦锋, 等. 栀子与柴苓承气汤中栀子苷在大鼠体内的药动学比较[J]. 中药药理与临床, 2007, 23(5): 13.
- [8] 田秀峰, 李鹏跃, 王宏洁, 等. 醒脑静口服给药栀子苷在 Beagle 犬体内的药代动力学研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(16): 2461.
- [9] 杨瑞, 王淑君. 非离子表面活性剂囊泡的研究进展[J]. 中国药理学杂志, 2008, 6(3): 124.
- [10] 朱晓磊, 张娜, 李澎涛, 等. 胆酸、栀子苷配伍对脑缺血时脑组织 TNF- α 、IL-1 β 和 ICAM-1 含量的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2004, 11(27): 26.

(收稿日期: 2015-06-11 修回日期: 2015-09-07)

(编辑: 林 静)

《中国药房》杂志——中国科技核心期刊, 欢迎投稿、订阅