

β -榄香烯脂质体在大鼠体内的组织分布

宋笑丹,刘红梅,魏华,董迪,吴琳华* (哈尔滨医科大学附属第二医院药学部,黑龙江省高校重点实验室,哈尔滨 150086)

摘要:目的 考察 β -榄香烯脂质体在大鼠体内的组织分布。方法 建立了大鼠体内 β -榄香烯测定的HPLC。色谱条件为:Diamonsil C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μ m);流动相为甲醇-乙腈-水(40:57:3);检测波长:210 nm;柱温:30 $^{\circ}$ C。并测定大鼠尾静脉注射 β -榄香烯脂质体和榄香烯注射液后血浆及组织中的药物浓度。结果 此色谱条件下血浆与组织的标准曲线、精密度等实验结果表明,该方法适于分析生物样品中 β -榄香烯含量。与榄香烯注射液相比, β -榄香烯脂质体在大鼠体内的分布特性有不同程度的改变,其中 β -榄香烯脂质体在肝、脾、肾组织中分布相对较多。结论 β -榄香烯脂质体及榄香烯注射液在大鼠的心、脾、肾组织中分布具有显著性差异。

关键词: β -榄香烯;脂质体;组织分布

中图分类号:R979.1;R944.9

文献标识码:A

文章编号:1001-2494(2007)19-1480-03

Tissue Distribution of β -elemene Liposomes in Rats

SONG Xiao-dan, LIU Hong-mei, WEI Hua, DONG Di, WU Lin-hua* (Department of Pharmacy, Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Key Laboratory of College in Heilongjiang Province, Harbin 150086, China)

ABSTRACT:OBJECTIVE To investigate the tissue distribution of β -elemene liposomes in rats. **METHODS** The HPLC method was established to determine the drug concentration in plasma and tissues. HPLC analysis was performed on a Diamonsil C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μ m) with the mobile phase of methanol-acetonitrile-water (40:57:3). The UV detector wavelength was set at 210 nm. The column temperature was set at 30 $^{\circ}$ C. β -Elemene concentration in blood and tissue was determined after an intravenous administration of β -elemene liposomes and elemene injection in rats. **RESULTS** The HPLC method was fit for determining the tissue distribution of β -elemene. β -elemene liposomes were distributed mainly in liver, spleen and kidney in rats after an intravenous administration compared with control group treated with elemene injection. **CONCLUSION** There is significant difference in heart, spleen and kidney tissue distribution of rats between β -elemene liposomes and elemene injection.

KEY WORDS: β -elemene; liposome; tissue distribution

β -榄香烯(β -elemene)是从中药温莪术(*Curcuma wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling)中提取分离得到的单体,是我国自主开发研制的广谱抗癌二类新药。其抗癌谱广,高效、安全,对肝肾无损害,无骨髓抑制,应用前景广泛。目前已开发出口服乳剂与注射用乳剂,用于临床治疗恶性肿瘤^[1]。但 β -榄香烯乳注射液静脉炎发生率约为100%^[2],用药时出现疼痛、发热等症状,并且其心脏中分布较多,毒性较大,肝脾中分布较少^[3],影响在临床上的推广应用。将 β -榄香烯制成脂质体后,脂质体作为载体将药物包裹,可减少刺激性,降低毒性,提高疗效。本实验采用薄膜分散法制备了 β -榄香烯脂质体,同时比较了与普通注射液在大鼠体内的分布情况。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters 高效液相色谱仪(Millennium³² 色谱管理系统,510 泵,486 紫外检测器);HH-1 型旋涡混合器(天津市富兰斯电子科贸有限公司);LD4-2 型低速离心机(北京医用离心机厂);DY89-1 型电动玻璃匀浆机(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

1.2 试剂

β -榄香烯对照品(大连远大制药有限公司,纯度99.2%,批号:040308); β -榄香烯脂质体溶液(本室自制);榄香烯注射液(大连金港制药有限公司,批号:0507211);甲醇、乙腈(色谱纯);其他试剂均为分析纯。

1.3 动物

Wistar 大鼠,♂,体重(200±20)g(哈尔滨医科大学实验动物中心)。

2 方法与结果

作者简介:宋笑丹,女,硕士 *通讯作者:吴琳华,女,博士,教授,硕士生导师
mail:xiaoxiao0057004@163.com

Tel: (0451) 86605581 Fax: (0451) 86665559 E-

2.1 β -榄香烯脂质体的制备

采用薄膜-超声分散法制备 β -榄香烯脂质体。精密称取磷脂400 mg和胆固醇100 mg,溶解于20 mL氯仿,45℃减压蒸发成薄膜,加入15 mL的pH 7.0的磷酸盐缓冲液水合,再加入 β -榄香烯,超声50 min,即得 β -榄香烯脂质体溶液。

2.2 β -榄香烯在大鼠体内的含量测定方法

2.2.1 色谱条件 色谱柱: Diamonsil C₁₈柱(4.6 mm×250 mm,5 μ m);流动相: 甲醇-乙腈-水(40:

57:3);流速:1.0 mL·min⁻¹;柱温:30℃;检测波长:210 nm;进样量:20 μ L。按外标法以峰面积定量。

2.2.2 方法专属性考察 大鼠空白组织匀浆(血浆)及加入 β -榄香烯的样品经样品预处理后进行HPLC测定,内源性物质与 β -榄香烯在“2.2.1”色谱条件下分离良好,内源性杂质无干扰, β -榄香烯的保留时间为8.60 min,色谱图见图1。

2.2.3 样品的预处理方法 ①血浆:取大鼠血浆

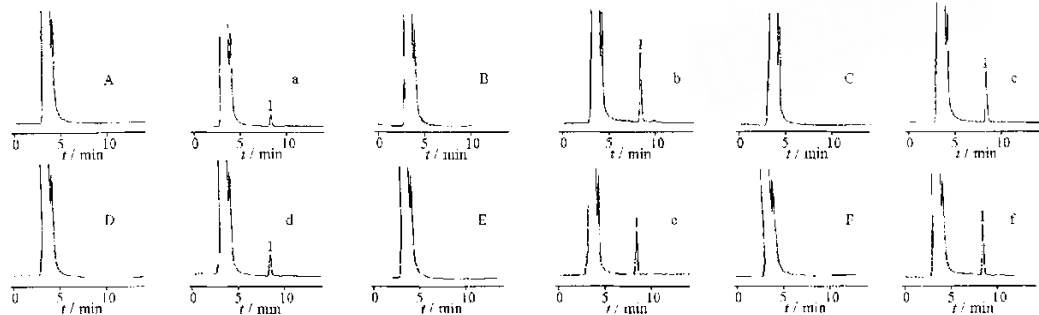


图1 β -榄香烯在血浆及组织中的HPLC色谱图

A-血浆(空白);a-血浆(样品);B-心(空白);b-心(样品);C-肝(空白);c-肝(样品);D-脾(空白);d-脾(样品);E-肺(空白);e-肺(样品);F-肾(空白);f-肾(样品);i- β -榄香烯

Fig 1 HPLC chromatograms of β -elemene in plasma and tissues

A-blank plasma;a-plasma sample;B-blank heart tissue;b-heart sample;C-blank liver tissue;c-liver sample;D-blank spleen tissue;d-spleen sample;E-blank lung tissue;e-lung sample;F-blank kidney tissue;f-kidney sample;i- β -elemene

1 mL,加饱和氯化钠溶液0.7 mL,0.1 mol·L⁻¹ NaOH 0.3 mL,混合振荡3 min 沉淀蛋白,静置15 min,0.5 mL 乙酸乙酯提取,旋涡混合5 min,3 000 r·min⁻¹离心10 min,分取上层有机相进样,测定 β -榄香烯浓度。②组织样品:脏器置匀浆器内,按0.3 mL·(100 mg)⁻¹加生理盐水匀浆,将匀浆液3 000 r·min⁻¹离心10 min,分取上层1 mL,其余处理步骤同血浆预处理方法。

2.2.4 标准曲线的绘制 分别取空白血浆及空白组织匀浆样品,精密加入不同质量浓度的 β -榄香烯溶液,配制系列质量浓度为0.1,0.5,2,5,10,25,50 mg·L⁻¹的含药匀浆液,按“2.2.3”项下方法进行处理,以 β -榄香烯的峰面积(Y)对 β -榄香烯的质量浓度(ρ)进行线性回归,得回归方程,见表1。

表1 生物样品标准曲线

Tab 1 Standard curve of β -elemene in biological samples

Sample	Regression equations	Linear range	r
Plasma	$Y = -8.1116 \times 10^3 + 1.3038 \times 10^4 \rho$	0.1~50 mg·L ⁻¹	0.999 6
Heart	$Y = -7.5263 \times 10^3 + 3.0067 \times 10^4 \rho$	0.1~25 mg·L ⁻¹	0.999 7
Liver	$Y = -5.5573 \times 10^3 + 3.1108 \times 10^4 \rho$	0.1~50 mg·L ⁻¹	0.999 8
Spleen	$Y = -9.6583 \times 10^3 + 2.2849 \times 10^4 \rho$	0.1~25 mg·L ⁻¹	0.999 5
Lung	$Y = 7.0211 \times 10^2 + 1.2382 \times 10^4 \rho$	0.1~25 mg·L ⁻¹	0.999 4
Kidney	$Y = -6.9623 \times 10^3 + 3.2993 \times 10^4 \rho$	0.1~25 mg·L ⁻¹	0.999 9

2.2.5 回收率、精密度实验 用空白血浆及组织匀

浆,分别配制成低(0.5 mg·L⁻¹)、中(5 mg·L⁻¹)、高(25 mg·L⁻¹)3种质量浓度的含药匀浆液,按“2.2.3”项下方法操作,每种质量浓度做5份样品,HPLC测定药物浓度,将 β -榄香烯峰面积代入回归方程,得 β -榄香烯测定浓度,以测定浓度与配制浓度之比计算回收率,回收率及精密度测定结果见表2。

表2 回收率及精密度实验.n=5,x±s

Tab 2 Results of recovery and precision experiments. n=5, $\bar{x} \pm s$

Tissue	0.5/mg·L ⁻¹		5/mg·L ⁻¹		25/mg·L ⁻¹	
	Recovery	RSD	Recovery	RSD	Recovery	RSD
	/%	/%	/%	/%	/%	/%
Plasma	91.21±6.25	6.85	101.53±4.72	4.65	97.81±3.43	3.51
Heart	114.16±9.98	8.74	94.80±2.03	2.14	100.01±1.83	1.83
Liver	112.30±7.40	6.59	85.86±1.30	1.51	98.74±4.34	4.40
Spleen	88.53±7.40	8.36	87.94±6.73	7.65	100.66±5.85	5.81
Lung	85.09±5.05	5.94	100.67±1.39	1.38	98.94±2.35	2.38
Kidney	105.16±8.02	7.63	100.57±1.36	1.35	100.26±0.15	0.15

2.2.6 样品稳定性实验 用空白血浆及组织匀浆,分别配制成低(0.5 mg·L⁻¹)、中(5 mg·L⁻¹)、高(25 mg·L⁻¹)3种质量浓度的样品,按“2.2.3”项下方法操作,分别进行冻融实验、-20℃冻存条件下稳定性及样品室温稳定性试验,结果样品反复冻融3次、-20℃冻存条件下28 d、室温放置24 h均

稳定。

2.3 大鼠体内的组织分布

大鼠 36 只,随机分为 6 组,每组 6 只。设 5,15,30 min,1,2,4 h,6 个时间点,每个时间点含 β -榄香烯脂质体和注射液各 1 组,按 $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的剂量大鼠尾静脉注射给药,给药后于不同时间点摘眼球取血后处死大鼠,剖取心、肝、脾、肺、肾,全血置肝素化离心管中,3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min 得血浆,脏器用蒸馏水冲洗干净后滤纸吸干水分,精密称重, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温保存备用。按“2.2.3”项下方法操作,进行 HPLC 测定,记录色谱图。将测得的 β -榄香烯峰面积代入相应标准曲线,计算出大鼠血浆及组织中药物含量,若计算出的药物浓度超过标准曲线高点,则需要经过稀释处理,即根据浓度的大小,以 1 或 2 倍空白血浆稀释,将计算的结果乘以相应的稀释倍数,药物浓度的经时过程结果见图 2,并用 DAS2.0 统计软件计算出了药-时曲线下面积 (AUC_{0-4}) 及平均滞留时间 (MRT_{0-4}),见表 3。

3 讨论

3.1 β -榄香烯是一种脂溶性挥发油,在测定血浆及组织中药含量进行样品预处理时,作者曾参考了有关文献^[4],但提取后进行有机溶剂挥干时,药物损失量太大,提取回收率过低,仅达到 20% 多,因此作者建立了采用乙酸乙酯提取,不浓缩直接进样的方法,经方法学考察,该方法灵敏度高,重现性好,专表 3 大鼠尾静脉注射 β -榄香烯脂质体(L)和榄香烯注射液(I)后的药-时曲线下面积。 $n=3$

Tab 3 AUC of β -elemene after the administration of β -elemene liposomes and elemene injection in rats. $n=3$

Preparation	AUC/ $\text{mg}\cdot\text{min}\cdot\text{L}^{-1}$					
	Plasma	Heart	Liver	Spleen	Lung	Kidney
β -elemene liposomes	4 589.4	299.4	1 161.7	1 312.6	439.2	1 333.7
β -elemene injection	4 291.0	772.3	517.9	519.5	442.3	540.9

属性强,完全可以满足 β -榄香烯体内分析的要求。

3.2 大鼠 iv β -榄香烯脂质体和榄香烯注射液后,体内消除迅速,肝中 4 h 已测不出药物。组织分布研究结果表明,制成脂质体后, β -榄香烯在大鼠体内的分布发生了明显变化,脂质体组与注射液组在心 ($P<0.01$)、脾 ($P<0.05$)、肾 ($P<0.05$) 中分布均有显著性差异。其中, β -榄香烯脂质体在富有网状内皮系统的肝、脾、肾中分布较多,血中分布也较多,有利于维持较高的血药浓度,达到治疗目的,而在心脏中分布较少,有利于降低心毒性。由 AUC 数据也可以看出,脂质体被心的摄取量明显小于游离型药物(脂质体是游离型药物的 0.39 倍),而在肝、脾、肾中被大量摄取(脂质体分别为游离型药物的 2.2, 2.5, 2.5 倍),具有一定的靶向性。经计算各组织药

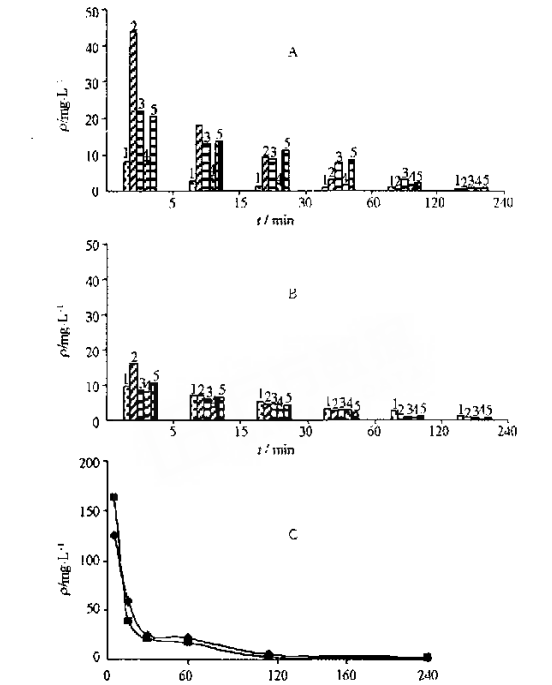


图 2 β -榄香烯脂质体(A)和榄香烯注射液(B)在大鼠组织及血浆(C)中的分布情况。 $n=3$

A, B - 1 - 心脏; 2 - 肝; 3 - 脾; 4 - 肺; 5 - 肾; C - $\blacklozenge$ - 脂质体; $\blacksquare$ - 注射液

Fig 2 Distribution of β -elemene in tissues and plasma (C) of rats after an iv administration of β -elemene liposome (A) and elemene injection (B). $n=3$

A, B - 1 - heart; 2 - liver; 3 - spleen; 4 - lung; 5 - kidney; C - $\blacklozenge$ - liposome; $\blacksquare$ - injection

物的峰浓度比也显示脂质体在肝、脾、肾(峰浓度比分别为 2.7, 2.6, 1.9)中改变药物分布的效果比较明显。

REFERENCES

[1] HUA W F, CAI S H. Basical and clinical study of anti-tumor effect of β -elemene[J]. J Chin Med Mater (中药材), 2006, 29 (1): 93-97.

[2] TAO X M, GAO W B. Adverse drug reaction and prevention and cure of elemene emulsion[J]. Adverse Drug React J (药物不良反应杂志), 2003, 6: 390-392.

[3] WANG K, SU C Y. Pharmacokinetics and disposition of β -elemene in rats[J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2000, 35 (10): 725-728.

[4] WANG K, SU C Y. Determination of β -elemene in biological sample by gas chromatography[J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 1998, 18 (6): 349-395.

(收稿日期: 2006-11-15)

β-榄香烯脂质体在大鼠体内的组织分布

作者: [宋笑丹](#), [刘红梅](#), [魏华](#), [董迪](#), [吴琳华](#), [SONG Xiao-dan](#), [LIU Hong-mei](#), [WEI Hua](#), [DONG Di](#), [WU Lin-hua](#)

作者单位: [哈尔滨医科大学附属第二医院药学部, 黑龙江省高校重点实验室, 哈尔滨, 150086](#)

刊名: [中国药学杂志](#) 

英文刊名: [CHINESE PHARMACEUTICAL JOURNAL](#)

年, 卷(期): 2007, 42 (19)

被引用次数: 1次

参考文献(4条)

1. [WANG K;SU C Y](#) [Determination of β-elemene in biological sample by gas chromatography](#) 1998 (06)

2. [WANG K;SU C Y](#) [Pharmacokinetics and disposition of β-elemene in rats](#)[期刊论文]-[药学报](#) 2000 (10)

3. [TAO X M;GAO W B](#) [Adverse drug reaction and prevention and cure of elemene emulsion](#)[期刊论文]-[药物不良反应杂志](#) 2003 (06)

4. [HUA W F;CAI S H](#) [Basical and clinical study of anti-tumor effect of β-elemene](#)[期刊论文]-[中药材](#) 2006 (01)

引证文献(1条)

1. [祁金文](#). [梁文权](#) [高效液相法测定空间稳定脂质体中β-榄香烯的含量](#)[期刊论文]-[海峡药学](#) 2008 (10)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zgyxzz200719012.aspx