

甘草酸脂质体的制备及小鼠体内肝靶向效率的评价

扈本荃¹, 廉江平², 徐玥¹, 王燕¹, 张韞¹, 张博¹

(1. 西安医学院药学院, 西安 710021; 2. 陕西省人民医院药剂科, 西安 710068)

【摘要】 目的 制备甘草酸脂质体, 评价其在小鼠肝脏中的靶向性。方法 以薄膜分散-超声法制备甘草酸脂质体, 于小鼠尾静脉给药, RP-HPLC 法测定肝脏和血液中不同时间的药物浓度。以甘草酸注射剂为对照, 通过相对摄取率(r_e)、靶向效率(t_e)和峰浓度比(C_e)3个参数来评价脂质体的肝靶向效率。结果 甘草酸脂质体肝脏相对摄取率 $r_e = 1.4$; 甘草酸脂质体肝靶向效率 $t_e = 0.092$; 甘草酸注射液 $t_e = 0.059$, 肝脏中 $C_e = 1.59$, 血液中 $C_e = 0.99$ 。结论 与甘草酸注射剂相比, 甘草酸脂质体有明显的肝靶向性。

【关键词】 甘草酸; 脂质体; 肝靶向

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015)04-0401-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.04.013

Preparation of glycyrrhizic acid liposomes and evaluation its liver targeting property in mice

HU Ben-quan¹, LIAN Jiang-ping², XU Yue¹, WANG Yan¹, ZHANG Yun¹, ZHANG Bo¹

(1. Department of Pharmacy, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China,

2. Department of Pharmacy, People's Hospital of Shannxi Province, Xi'an 710068)

【Abstract】 Objective To prepare liposomes of glycyrrhizic acid, and evaluate its liver targeting property in mice.

Methods The liposomes were prepared with conventional rotary-evaporated film-ultrasonication method. The liposomes were injected into the mouse tail vein, and the concentration of glycyrrhizic acid was detected by RP-HPLC. The glycyrrhizic acid injection was taken as control. The targeted indicators, including the relative tissue exposure (r_e), targeting efficiency (t_e), and index of peak concentration ratio (C_e), were used to evaluate the liver targeting property. **Results** The r_e was 1.4, T_e of the liposomes was 0.092, and t_e of the injection was 0.059. The C_e of the liver was 1.59, and the C_e of the blood was 0.99. **Conclusion** Compared with glycyrrhizic acid injection, the glycyrrhizic acid liposomes show good liver-targeting property.

【Key words】 Glycyrrhizic acid; Liposome; Liver targeting property; Mice

肝炎是危害人类健康的严重疾病之一,尤其是慢性肝炎可诱发肝硬化、肝癌等继发疾病,目前仍缺乏治愈率高、疗效稳定的药物。已有循证医学证据表明,中草药治疗慢性乙型肝炎有潜在疗效和明显的经济优势^[1,2]。

近代研究发现^[2],甘草酸有直接的抗乙肝病毒HBV作用及对肝功能障碍的改善作用,从甘草根中

提取的甘草酸及其衍生物可明显减轻肝细胞脂肪坏死以及肝细胞间质炎症反应,抑制肝细胞纤维增生以及促进肝细胞再生等,是一种值得重视与推广的慢性肝炎治疗药物。但因甘草酸难溶于水、生物利用度低、肝靶向性差等原因限制了甘草酸在临床的实际应用。

脂质体是一种人工制备的携有双层包膜的磷脂

[基金项目] 陕西省教育厅科学研究计划项目(编号:2013JK0775)。

[作者简介] 扈本荃(1971-),女,副教授,主要从事药物分析研究。电话:029-86177548, E-mail: 873020493@qq.com

质微囊,是一种定向给药载体,经静脉注射后,自然靶器官主要为肝脏,由此可提高局部药物浓度并减少全身不良反应。本实验以脂质体为载体,制备了甘草酸的肝靶向制剂,增加甘草酸在肝脏中的浓度,提高药物的疗效,增强了药物的治疗效果,减少不良反应的发生。本文采用 RP-HPLC 法测定了不同时间甘草酸在小鼠肝脏和血浆中的含量,以甘草酸注射剂为对照,以相对摄取率(r_e)、靶向效率(t_e)和峰浓度比(C_e) 3 个参数来评价脂质体的肝靶向性评价。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 KM 小鼠 60 只,雌雄各半,6~8 周龄,体重在 18~22 g,购自第四军医大学实验动物中心【SCXK(陕)2014-002】,实验前禁食 24 h,但自由进水,实验于西安医学院药理实验室进行【SYXK(陕)2010-002】,并按实验动物使用 3R 原则给予人道关怀。

1.1.2 仪器和试剂

岛津 LC-10A 高效液相色谱系统,SPD-10Avp 紫外检测器、Class-vp 6.0 工作站(日本岛津);真空干燥箱(SHZ 北京科伟永鑫试验仪器设备厂);150 型超声仪(浙江象山县石浦海天电子仪器厂),透射电子显微镜(JEM-2000EX,日本 Olympus 公司),GR-202 型分析天平(十万分之一,日本 A&D 公司);旋转蒸发器(R201C 上海申顺生物科技有限公司)。

甘草酸标准品(北京恒元启天化工技术研究院与北京世纪奥科生物技术有限公司联合研制,含量:≥98%,批号: MUST-12103101);甘草酸原料药(陕西惠科植物开发有限公司,含量 ≥98%,批号: 20131101);大豆卵磷脂(天津市津南区咸水沽工业园区,含量 ≥99%,批号: Q/12HB4742-2012);胆固醇(安徽天启化工科技有限公司)、甘露醇(广西南宁化学制药有限责任公司,产品批号: F691A)。甲醇(色谱纯,天津市科密欧化学试剂有限公司);纯水(双重蒸馏水)、其余试剂为分析纯;使用前所有液体试剂均经过 0.45 μm 微孔滤膜滤过。

1.2 甘草酸脂质体的制备

精密称取卵磷脂 100 mg,胆固醇 100 mg,置于 500 mL 茄形瓶中,再加入氯仿 15 mL,使其充分溶解后,加入甘草酸 10 mg,将烧瓶放在超声清洗器上超

声 3 次,每次 3 min,待甘草酸完全溶解后,加入直径为 1 mm 的玻璃珠 20 粒。37℃ 水浴下,以 70 r/min 旋转减压除去氯仿,可见在烧瓶内出现白色的半透膜,将烧瓶敞口放置,待氯仿完全挥发后置于真空干燥箱 6~7 h,取出,加入 6% 甘露醇 16 mL 进行水合,超声 3 次,每次 20 min,得乳白色半透明液体,依次经过 0.8 μm 和 0.45 μm 微孔滤膜过滤,分装于适合的安瓿中,4℃ 条件下密闭避光保存。

1.3 甘草酸脂质体小鼠体内肝靶向性实验

将小鼠随机分为 10 组(其中实验组 5 组,对照组 5 组),每组 6 只,实验组按 12 mg/kg 剂量小鼠尾静脉注射甘草酸脂质体,对照组鼠尾静脉注射同剂量的以生理盐水和二甲基亚砷混合液(v/v, 8:2)配制相同浓度甘草酸的注射剂。

给药后 5、30、60、120、240 min 眼眶取血 0.5 mL 置于肝素抗凝管中,3000 r/min,离心 10 min,分取血浆,于 -20℃ 保存,待检。

取血后,小鼠眼眶取血后,立即取出肝脏,挑去胆囊,用蒸馏水洗涤去血,并用滤纸吸干表面水份,精密称重后按 2 μL/mg 的比例加入磷酸盐缓冲液(pH 7.4)匀浆,15 000 r/min,离心 10 min,取肝浆(上清液),-20℃ 保存,待检。

1.4 RP-HPLC 检测小鼠肝脏和血中的甘草酸

1.4.1 生物样本前处理

(1) 血浆的前处理方法:取待测血浆 100 μL,加入甲醇 400 μL,用液体快速混合器涡旋 2 min,离心(15 000 r/min)10 min,取 20 μL 上清液进样分析。

(2) 肝浆的前处理方法:取肝浆液 100 μL,加入甲醇 400 μL,其后处理步骤同上述“血浆处理方法”。

1.4.2 色谱条件

色谱柱:采用 Shim-pack VP-ODS 色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-pH2.6 磷酸盐缓冲液(69:31);流速:1.0 mL/min;检测波长:254 nm;柱温:室温;进样量 20 μL。在上述色谱条件下,样品的分离良好,无内源性物质干扰,见图 1。

1.4.3 标准曲线的建立

取小鼠空白血浆及空白肝浆加入不同浓度甘草酸系列标准溶液,分别制成 1.563~25 μg/mL 甘草酸的血浆样品和 5~200 μg/mL 甘草酸的肝浆样品。按“1.4.1”项和“1.4.2”项条件对样品处理并测定并按相关要求配制高、中、低三个浓度的模拟生物样本进行方法学验证^[3]。

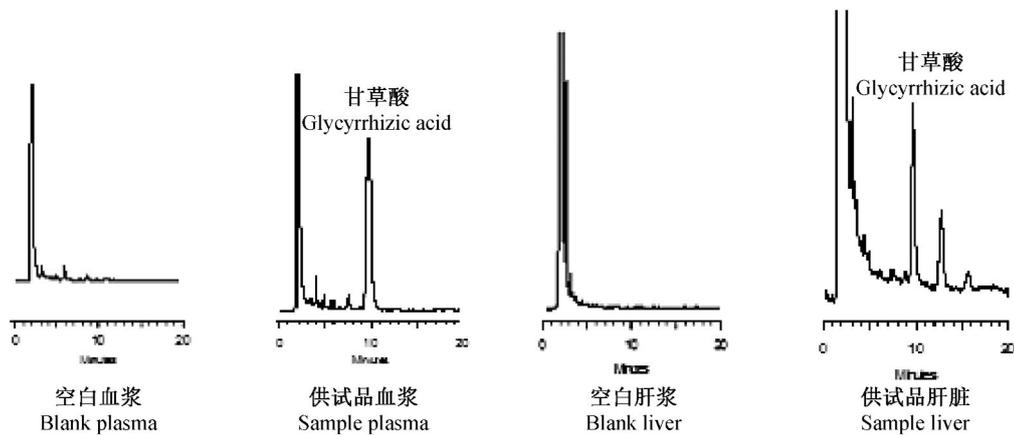


图 1 甘草酸测定的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of glycyrrhizic acid in the mouse plasma and liver

1.5 小鼠体内肝靶向性评价^[4-8]

以各时间点药物浓度均值绘制药时曲线,以药时曲线下面积(AUC)、血药浓度(C)为定量指标,通过相对摄取率(r_e)、靶向效率(t_e)和峰浓度比(C_e)3个参数来衡量脂质体的组织靶向性。

计算公式为: $r_e = AUC_{lip} / AUC_{inj}$

$t_e = AUC_{liver} / AUC_{plasma}$

$C_e = (C_{max})_{lip} / (C_{max})_{inj}$

式中 AUC_{lip} 表示脂质体组药时曲线下面积, AUC_{inj} 表示注射剂组药时曲线下面积; AUC_{liver} 表示肝组织药时曲线下面积, AUC_{plasma} 表示血浆药时曲线下面积; $(C_{max})_{lip}$ 表示脂质体组峰浓度, $(C_{max})_{inj}$ 表示注射剂组峰浓度。 r_e 、 C_e 和 (t_e)_{非靶向制剂} 大于 1 时, 药物具有靶向性。

2 结果

2.1 甘草酸脂质体形态学、包封率及载药量的检测^[9,10]

取适量脂质体采用磷钨酸负染法于透射电镜下检测其形态,见图 2,制备得到的脂质体球形圆整,大小均匀,粒径大小在 40~60 nm 之间;取适量甘草酸脂质体,通过透析技术分离未包封甘草酸,用 RP-HPLC 法测定脂质体包封率及载药量,甘草酸脂质体包封率为 84%,载药量为 0.60 mg/mL;脂质体 4℃ 放置 2 个月未发现任何沉淀,仍为乳白色混悬液,粒径未见明显变化,稳定性较好。

2.2 HPLC 测定甘草酸的方法学验证结果

以甘草酸峰面积 (Y) 对模拟样品浓度 C ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 作线性回归, 血药浓度组和肝药浓度组回归方程 ($n = 5$) 分别为: $Y = 0.000808C + 0.934432$

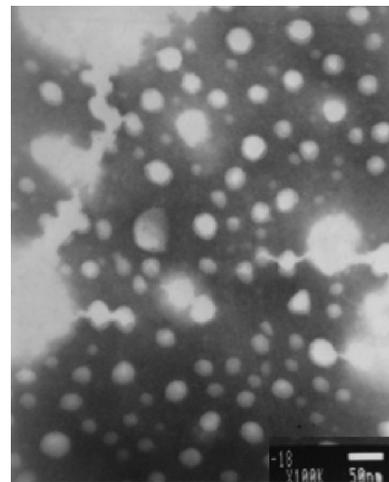


图 2 甘草酸脂质体透射电镜照片 ($\times 100$)

Fig. 2 Photograph of glycyrrhizic acid liposomes under transmission electron microscope

$r = 0.9999$; $Y = 0.000825C + 0.25003$ $r = 0.9996$ 。

二者 r 值表明在 5~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 1.5625~25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的范围内线性关系良好。

2.2.1 精密度、回收率和稳定性结果

按 1.4 制备好的样品在 1 d 内反复进样测定 5 次,测得日内精密度;每天进样一次,连续测定 5d,测得日间精密度,结果见表 1、2,结果表明,精密度和回收率满足要求。

2.2.2 稳定性结果

本试验考察了高中低浓度的甘草酸经过血浆样品和肝浆样品处理后 8 h 内的稳定性,结果平均 RSD 为 5.4% 和 3.6%,表明甘草酸过血浆样品和肝浆样品处理后在室温条件下至少能稳定 8 h。

表 1 血液中甘草酸的方法回收率和精密度($n=5$)

Tab. 1 Results of method recovery rate and precision of glycyrrhizic acid in plasma

浓度/ $\mu\text{g}/\text{mL}$ Concentration	回收率 Method recovery/% ($\bar{x} \pm s$)	RSD/%	日内精密度/% Intra-day accuracy RSD	日间精密度/% Inter-day accuracy RSD
100	99.60 \pm 2.35	2.3	3.9	4.7
25	100.83 \pm 9.31	9.3	5.1	8.9
5	109.47 \pm 5.66	5.7	1.7	1.3

表 2 肝脏中甘草酸的方法回收率和精密度($n=3$)

Tab. 2 Results of method recovery rate and precision of glycyrrhizic acid in the mouse liver

浓度/ $\mu\text{g}/\text{mL}$ Concentration	回收率/% Method recovery rate ($\bar{x} \pm s$)	RSD/%	日内精密度/% Intra-day accuracy RSD	日间精密度/% Inter-day accuracy RSD
12.5	98.05 \pm 3.46	3.5	4.0	4.4
6.25	98.16 \pm 4.17	4.2	3.2	2.4
1.56	106.40 \pm 5.69	5.7	2.5	5.1

2.3 小鼠体内肝靶向性评价

静注后小鼠肝脏内与小鼠血中药物浓度进行 t -检验分析, 实验组肝脏中的浓度明显高于对照组 ($P < 0.05$), 实验组与对照组中血浆浓度无明显差异 ($P > 0.05$), 药时-曲线见图 3、4。根据梯形法计算实验组与对照组血浆和肝脏中的 AUC。240 min 内甘草酸脂质体在小鼠肝脏内的 AUC 为 16.42 min/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL})$, 在血液中的 AUC 为 177.75 min/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL})$, 甘草酸注射剂在小鼠肝脏内的 AUC 为 11.75 min/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL})$, 在血液中的 AUC 为 200.81 min/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL})$ 。

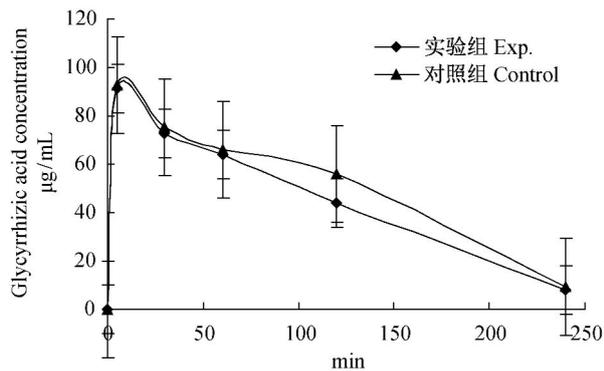


图 3 血浆中甘草酸药时曲线

Fig. 3 The plasma concentration-time curve of glycyrrhizic acid

240 min 内甘草酸脂质体肝脏相对摄取率 $r_e = 1.4 (> 1)$, 表明脂质体制剂可明显提高药物在肝组织中的分布; 甘草酸脂质体肝靶向效率 $t_e = 0.092$; 甘草酸注射液 $t_e = 0.059$, 脂质体组是注射剂组的 1.6 倍。肝脏中 $C_e = 1.59 (> 1)$, 血液中 $C_e = 0.99$ 。

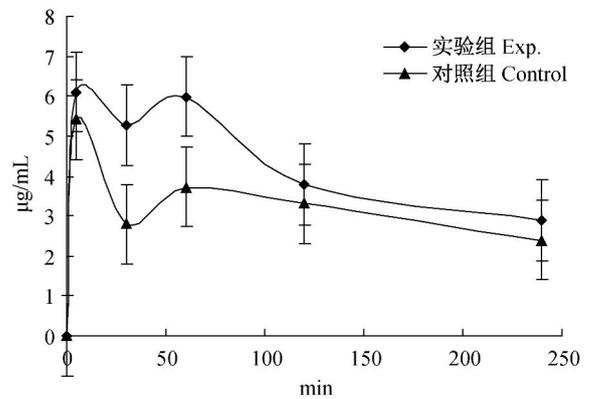


图 4 肝脏中甘草酸药时曲线

Fig. 4 The liver concentration-time curve of glycyrrhizic acid in the mice

以上结果表明, 与甘草酸注射剂相比, 甘草酸脂质体有明显的肝靶向性。

3 讨论

小鼠体内甘草酸脂质体肝靶向评价参数相对摄取率 r_e 是脂质体组和溶液组在器官的 AUC 的比值, $r_e > 1$ 表示脂质体组在肝脏有靶向性, r_e 值越大, 靶向性越强; 靶向效率 (t_e) 是指各器官的 AUC 与血浆 AUC 的比值, t_e 表示待测物对靶器官的选择性, t_e 越大, 选择性越强。峰浓度比是指脂质体组和注射剂组在各组织的浓度 C 的比值, C_e 表示脂质体改变药物在肝脏中分布的效果, C_e 大于 1 则具有靶向性, 越大则表明改变药物分布的效果越明显。

本实验测得甘草酸脂质体在小鼠内 r_e 为 1.4, 脂质体组 t_e 是注射剂组的 1.6 倍; 肝脏中 $C_e = 1.59 (> 1)$, 血液中 $C_e = 0.99$, 各结果均表明甘草酸脂质

体有明显的肝靶向性。

经小鼠静脉注射甘草酸脂质体,小鼠肝脏的药时曲线并非是一条缓慢降低的平滑曲线,而是在实验时间内有 2 个峰的曲线。形成这种现象的原因可能是甘草酸脂质体制备过程中,未将游离甘草酸分离,脂质体进入体内后游离甘草酸和脂质体包裹甘草酸共同发挥作用。游离甘草酸进入体内后随血液循环进入肝脏,迅速形成浓度曲线上的第一个峰值,随后肝脏中甘草酸浓度开始降低;随后肝脏的吞噬细胞摄取脂质体,甘草酸脂质体在肝脏中富集并释放药物,形成浓度曲线上的第二个峰。

脂质体作为一种有效的被动靶向给药系统,利用磷脂形成的脂质双分子层囊泡包裹药物分子,具有生物降解性和生物相容性,脂质体对肝脏有天然的靶向性。脂质体的被动靶向主要是网状内皮系统的吞噬作用,大量研究表明,脂质体进入体内主要被网状内皮系统吞噬而激活机体的自身免疫功能。并改变被包封药物的动力学性质和体内分布,使药物主要分布在网状内皮细胞富集的器官,达到减小给药剂量。降低毒性的效果^[11]。本实验结果表明,与甘草酸注射液相比,脂质体显著增加了甘草酸在肝的分布,甘草酸脂质体有明显的肝靶向性。

RP-HPLC 法测定血液及肝脏中甘草酸时,需要对血液和肝脏中的药物进行提取,提取溶剂的选择:笔者曾考察了三个提取方法:①先用氯仿提取挥干的残渣,再以甲醇复溶;②饱和硫酸锌甲醇溶液;③只用甲醇。但测定结果表明用①法甘草酸提取率太低,且引入内源性杂质太多;方法②和方法③提取效果相似,最终本实验选择了方法以甲醇为提取溶剂。血浆和甲醇(蛋白沉淀剂作用)的比例经多次实验,确定 1:4 为理想比例。

甘草酸为酸性三萜皂甙类化合物,考虑到生物体内的偏碱性环境可能使甘草酸成盐(而变为离子态),而影响到提取溶剂的效率。因此,曾拟用酸性

缓冲液来作为小鼠肝脏的匀浆液,但实验发现用酸性缓冲液作小鼠肝脏匀浆液,会引入过多的杂质,造成杂质峰过多而使主峰难以得到满意的分离。最后,采用 pH 为 7.4 磷酸盐缓冲液作为小鼠肝脏的匀浆液,引入的生物内源性杂质较少,甘草酸可以得到很好的分离。

参 考 文 献

- [1] Liu J, McIntush H, Lin H. Chinese medicinal herbs for chronic hepatitis B: a systematic review [J]. *Liver*, 2001, 21(4): 280 - 286.
- [2] Chen Y, Zhu J. Anti-HBV effect of individual traditional Chinese herbal medicine in vitro and in vivo: an analytic review [J]. *J Viral Hepat*. 2013, 20(7): 445 - 452.
- [3] 中国药典. 二部 [S]. 2010. 附录 195 - 196
- [4] 柳影, 李继昌, 孟倩, 等. 达氟沙星脂质体在蛋雏鸡体内的组织动力学及靶向性研究 [J]. *中国兽医学报*, 2010, 30(4): 480 - 484.
- [5] 王婴, 辛俊伟, 王岩. 齐墩果酸纳米粒在小鼠体内分布及靶向性研究 [J]. *中药新药与临床药理*, 2014, 25(3): 311 - 314.
- [6] 范燕妮, 马丽, 那莎, 等. 川芎嗪微乳的脑靶向性研究 [J]. *安徽中医学院学报*, 2012, 31(1): 61 - 64
- [7] 朱琪琦, 于芳, 冯晨, 等. 叶酸脂质体包裹的 MYCN siRNA 在裸鼠体内靶向治疗作用的初步研究 [J]. *中国医药导报*, 2012, 9(16): 22 - 24.
- [8] 迟庆, 朱蓝玉, 孟庆瑜, 等. 磁导靶向给药在荷瘤小鼠体内分布特性的实验研究 [J]. *中国医药导报*, 2013, 10(34): 7 - 9.
- [9] 程建峰, 扈本荃, 刘梅, 等. 甘草酸脂质体的处方及制备工艺 [J]. *第四军医大学学报*, 2006, 27(7): 656 - 657.
- [10] 扈本荃, 程建峰, 刘梅, 等. 反相高效液相色谱法测定甘草酸脂质体中甘草酸的含量 [J]. *中国药房*, 2006, 17(9): 692 - 693.
- [11] Ueng YF, Shyu CC, Lin YL, et al. Effects of baicalin and wogonin on drug-metabolizing enzymes in C57BL/6J mice [J]. *Life Sci*, 2000, 67(18): 2189 - 2200.

[收稿日期] 2015-01-21