

芹菜素纳米混悬剂在小鼠体内的组织分布研究[△]

徐世一^{1*}, 吕畅², 霍元子³, 郝若祎³, 阎雪莹^{3#}(1.黑龙江中医药大学实验实训中心, 哈尔滨 150040; 2.齐齐哈尔医学院附属第三医院药剂科, 黑龙江齐齐哈尔 161099; 3.黑龙江中医药大学药学院, 哈尔滨 150040)

中图分类号 R969.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)04-0457-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.04.13

摘要 目的: 研究芹菜素纳米混悬剂(AP-NPs)在小鼠体内的分布特点及靶向特性。方法: 采用超声微量沉淀法制备AP-NPs。将昆明种小鼠随机分为芹菜素(AP)溶液组和AP-NPs混悬液组, 各45只。各组小鼠单次灌胃相应药物溶液(80 mg/kg), 分别于给药前(0 h)以及给药后0.25、0.5、1、2、4、6、8、10 h摘取眼球取血500 μ L, 并于末次取血后处死, 取其心、肝、脾、肺、肾、脑组织。血浆和各组织样品分别经甲醇沉淀蛋白后, 采用高效液相色谱法测定。色谱柱为Shimadzu ODS-SP, 流动相为甲醇-水(70:30, V/V), 检测波长为340 nm, 柱温为35 $^{\circ}$ C, 流速为1.0 mL/min, 进样量为20 μ L。根据标准曲线法计算AP在不同样品中的质量浓度, 采用DAS 2.0软件和Excel 2010软件计算AP的主要药动学参数(AUC、 c_{max} 等)和峰浓度比值(c_e)、相对摄取率(RUE)、摄取占比及其改变值, 以分析其组织分布及靶向特性。结果: AP在血浆和各组织中检测质量浓度的线性范围均为0.1~25.0 μ g/mL(r 均大于0.99), 定量下限均为0.1 μ g/mL; 日内、日间RSD均小于15%, 准确度为94.37%~117.48%, 提取回收率均大于80%。与AP溶液组比较, AP-NPs混悬液组小鼠血浆(0.5~6 h各时间点)以及肝(0.25~8 h各时间点)、脾(0.25~8 h各时间点)、脑(0.25~4 h各时间点)组织样品中AP的质量浓度均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 且以肝中含量最高; 而心脏(6 h)、肝(10 h)、肺(0.5 h)、肾(0.25~10 h各时间点)组织样品中AP的质量浓度则显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。两组小鼠血浆/组织样品中AP的AUC、 c_{max} 比较, 差异均有统计学意义($P<0.05$), 且肝组织的 c_e 、RUE、摄取占比及其改变值均最大, 分别为 1.34 ± 0.40 、 1.99 ± 0.29 、48.49%、15.71%。结论: 将AP制成纳米混悬剂后, 药物的组织分布有所改变, 尤其对肝组织的靶向作用有所提高。

关键词 芹菜素; 纳米混悬剂; 组织分布; 靶向; 小鼠; 高效液相色谱法

Study on Tissue Distribution of Apigenin Nanosuspension in Mice

XU Shiyi¹, LYU Chang², HUO Yuanzi³, HAO Ruoyi³, YAN Xueying³(1. Laboratory Training Center, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China; 2. Dept. of Pharmacy, the Third Affiliated Hospital of Qiqihar Medical College, Heilongjiang Qiqihar 161099, China; 3. College of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the distribution and targeting characteristics of Apigenin nanosuspension (AP-NPs) in mice. METHODS: AP-NPs was prepared with ultrasound microprecipitation. Kunming mice were randomly divided into apigenin (AP) solution group and AP-NPs suspension group, with 45 mice in each group. The mice were given relevant medicine intragastrically (80 mg/kg); blood sample of eyeball 500 μ L were collected before medication (0 h) and 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 h after medication. After the last blood collection, the mice were sacrificed and their heart, liver, spleen, lung, kidney and brain tissues were taken. After protein precipitation with methanol, HPLC method was adopted for determining plasma and tissues. The determination was performed on Shimadzu ODS-SP column with mobile phase consisted of methanol-water (70:30, V/V) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 340 nm, and column temperature was 35 $^{\circ}$ C. The sample size was 20 μ L. The concentration of AP in different samples was calculated according to standard curve, main pharmacokinetic parameters (AUC, c_{max}) of AP and the ratio of peak concentration (c_e), relative uptake rate (RUE), uptake ratio and its change value were calculated with DAS 2.0 software and Excel 2010 software; the tissue distribution and targeting characteristics of AP were analyzed. RESULTS: The linear range of AP in plasma and tissues were 0.1-25.0 μ g/mL (all $r>0.99$); the lower limits of quantification were 0.1 μ g/mL. RSDs of intra-day and inter-day were all lower than 15%, and the accuracy were 94.37%-117.48%. The extraction recovery rates were all more than 80%. Compared with AP solution group, the concentrations of AP in plasma sample (during 0.5-6 h), liver tissue (during 0.25-8 h), spleen tissue (during 0.25-8 h) and cerebral tissue (during 0.25-4 h) were increased significantly in AP-NPs suspension group ($P<0.05$ or $P<0.01$), and the highest in liver tissue. The concentrations of AP in heart tissue (6 h), liver tissue (10 h), lung tissue (0.5 h), spleen tissue (during 0.25-10 h) were decreased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). There was statistical significance in AUC and c_{max} of AP in plasma and tissue samples between 2 groups ($P<0.05$). The c_e , RUE, uptake ratio and its change value of liver tissue were the highest, being 1.34 ± 0.40 , 1.99 ± 0.29 , 48.49% and

[△]基金项目: 黑龙江省自然科学基金(重点项目)(No.ZD2016019)

* 助理实验师。研究方向: 缓控释、靶向制剂及抗肿瘤制剂。电话: 0451-82196224。E-mail: 994010246@qq.com

通信作者: 教授, 博士。研究方向: 靶向、缓控释制剂的研究及药物的体内代谢。电话: 0451-82196181。E-mail: 15159267@qq.com

15.71%。CONCLUSIONS: After AP is made into nanosuspension, the distribution of drug tissue is changed, especially targeting effect on liver tissue is improved.

KEYWORDS Apigenin; Nanosuspension; Tissue distribution; Targeting; Mice; HPLC

纳米混悬剂(Nanosuspensions, NPs)作为一种可提高难溶性药物溶解度的制剂形式,其优势不仅在于可提高口服药物的生物利用度,同时还可提高眼部、鼻部、皮肤给药等制剂的生物利用度并降低用药风险,近几年来已成为制剂学研究的热点之一^[1-4]。有研究指出,将难溶性抗肿瘤中药单体制成NPs可显著提高药物的抗肿瘤效果^[5]。较其他类型纳米制剂而言,NPs具有制备方法简单、辅料用量极少的优点,可降低辅料所致毒副作用发生的风险,并适用于大工业生产^[6]。目前,NPs常用的制备方法包括一步熔融乳化法^[7]、溶剂蒸发超声法^[8]和介质研磨法^[9]等,根据药物理化性质的不同,选择适宜的制备方法并深入研究相应NPs的药动学、药效学特征可为新型制剂的研发提供理论基础。

近年研究发现,芹菜素(Apigenin, AP)具有较强的抗肿瘤活性,其主要机制包括抑制肿瘤细胞增殖并促进其凋亡^[10]、抑制细胞迁移和侵袭^[11]、抑制细胞信号传导^[12-13]以及逆转细胞耐药性^[14]等;同时经研究证实,AP还具有较强的抗氧化性和降尿酸活性^[15]。但是该化合物在水和大多数有机溶剂中的溶解度都极差,导致其生物利用度较低、作用强度较弱^[16]。因此,为解决其溶解度低的问题,本研究制备了芹菜素纳米混悬剂(AP-NPs),并初步探讨了该制剂在小鼠体内的分布情况和靶向特性,旨在为AP-NPs的临床应用提供参考。

1 材料

1.1 仪器

2695型高效液相色谱(HPLC)仪(美国Waters公司);64R型低温高速离心机(德国Beckman公司);BT25S型电子天平(德国Sartorius公司);HSC-12B型水浴氮吹仪(上海旦鼎国际贸易有限公司);QL-901 Vortex型涡旋混合器(江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司);T18型高速分散机(德国IKA公司);Scientz-II D型超声波细胞破碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

1.2 药品与试剂

AP对照品(批号:2015109,纯度:≥99%)、AP原料药(批号:XC2014122,纯度:≥98%)均购自西安小草植物科技有限公司;聚乙烯吡咯烷酮(PVP,天津博迪化工有限公司);水溶性维生素E(TPGS,美国Sigma公司);甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

1.3 动物

清洁级昆明种小鼠,雌雄各半,2月龄,体质量(20±2)g,由黑龙江中医药大学实验动物中心提供,动物使用许可证号:SYXK(黑)2018-007。

2 方法与结果

2.1 生物样品中AP含量测定方法的建立

采用HPLC法检测小鼠血浆及组织样品中AP的含量。

2.1.1 色谱条件 色谱柱:Shimadzu ODS-SP(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-水(70:30, V/V);检测器:

紫外检测器;检测波长:340 nm;柱温:35 ℃;流速:1.0 mL/min;进样量:20 μL。

2.1.2 AP标准溶液的配制 精密称取AP对照品4.89 mg,溶于适量甲醇中,制成质量浓度为1 mg/mL的标准溶液。用甲醇将上述标准溶液逐级稀释成不同质量浓度的系列标准溶液,于4 ℃冰箱中保存,备用。

2.1.3 血浆样品的处理 取小鼠空白血浆100 μL至离心管中,加入甲醇500 μL,涡旋振荡,混匀,以8 000 r/min离心5 min,吸取上清液,以氮气流吹干,残渣用甲醇100 μL复溶,以10 000 r/min离心5 min,吸取上清液适量,进行HPLC定量分析。

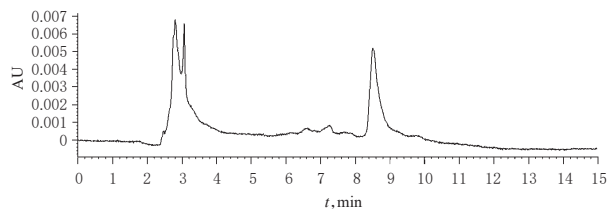
2.1.4 组织样品的处理 将小鼠完整的心、肝、脾、肺、肾、脑取出后,以生理盐水洗净,用滤纸吸干组织表面残留液体,精密称定质量后,置于离心管中,按质量比加入3倍量的生理盐水,用高速分散机将其分散均匀,即得组织匀浆液。精密吸取上述组织匀浆液200 μL至1.5 mL离心管中,加入甲醇1 000 μL,涡旋振荡沉淀蛋白,以8 000 r/min离心5 min,吸取上清液,以氮气流吹干,残渣用甲醇200 μL复溶,以10 000 r/min离心5 min,吸取上清液适量,进行HPLC定量分析。

2.1.5 专属性考察 取空白血浆以及空白心、肝、脾、肺、肾、脑组织样品,空白血浆/组织+AP标准溶液(10.0 μg/mL)以及小鼠灌胃给药后0.25 h的血浆/组织样品各适量,分别按“2.1.3”或“2.1.4”项下方法处理后,再按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,血浆及各组织中的其他成分均不干扰AP的测定,色谱峰分离较好,AP的保留时间约为6 min,详见图1~图3。

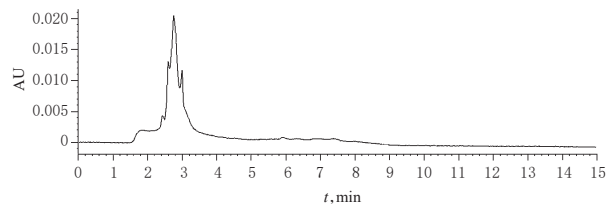
2.1.6 标准曲线和定量下限考察 精密吸取小鼠空白血浆100 μL和空白组织样品200 μL,分别加入相应质量浓度的AP系列标准溶液各100 μL,配制成AP质量浓度分别为0.1、0.5、2.5、5.0、10.0、25.0 μg/mL的血浆标准样品和组织匀浆标准样品,分别按“2.1.3”或“2.1.4”项下方法处理后,再按“2.1.1”项下色谱条件进样分析,记录色谱图。以待测物质量浓度(c , μg/mL)为横坐标、峰面积(A)为纵坐标进行线性回归,结果见表1。

2.1.7 精密性与准确度试验 按“2.1.6”项下方法配制定量下限质量浓度(0.1 μg/mL)的血浆/组织样品以及低、中、高质量浓度(0.2、5.0、20.0 μg/mL)的质控血浆/组织样品,分别按“2.1.3”或“2.1.4”项下方法处理后,再按“2.1.1”项下色谱条件进样分析。每质量浓度平行测定6次,考察日内精密性;连续测定3 d,考察日间精密性。以实测质量浓度与理论质量浓度进行比较,考察准确度。结果,精密性与准确度结果符合生物样品定量分析方法指导原则的相关要求^[17],结果见表2。

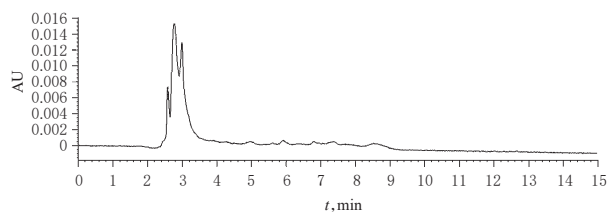
2.1.8 提取回收率试验 按“2.1.6”项下方法配制低、中、高质量浓度(0.2、5.0、20.0 μg/mL)的质控血浆/组织样品,各6份,分别按“2.1.3”或“2.1.4”项下方法处理后,再按“2.1.1”项下色谱条件进样分析,记录峰面积(A_1);取空白血浆100 μL和空白组织样品200 μL,分别按



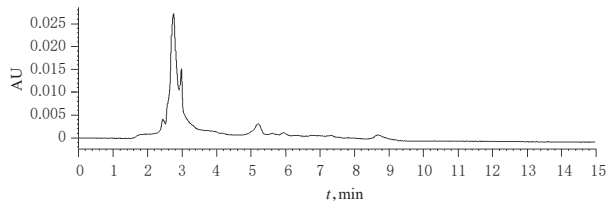
A.空白血浆样品



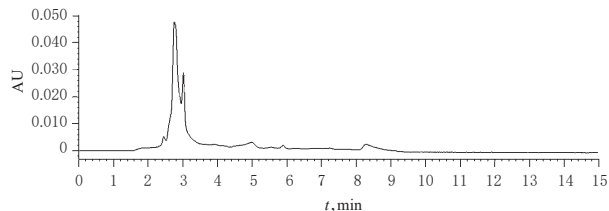
B.空白心脏组织样品



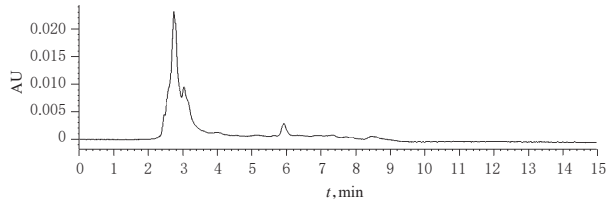
C.空白肝组织样品



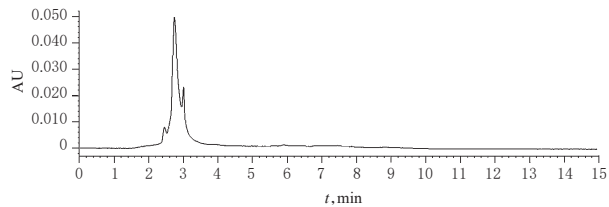
D.空白脾组织样品



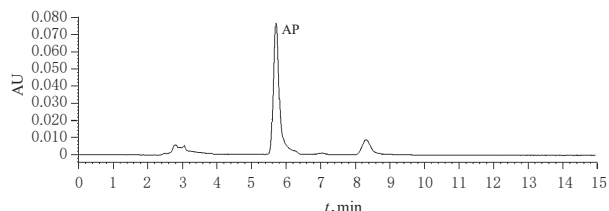
E.空白肺组织样品



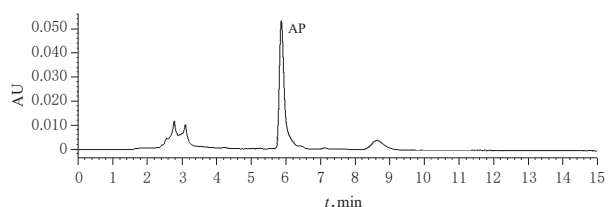
F.空白肾组织样品



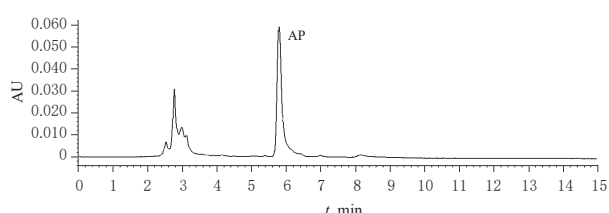
G.空白脑组织样品



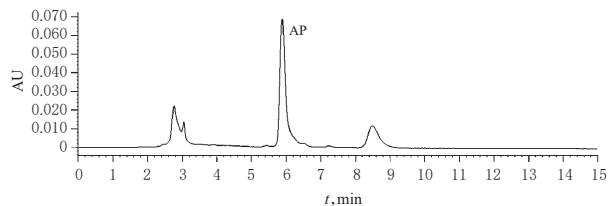
A.空白血浆+AP(10 μg/mL)



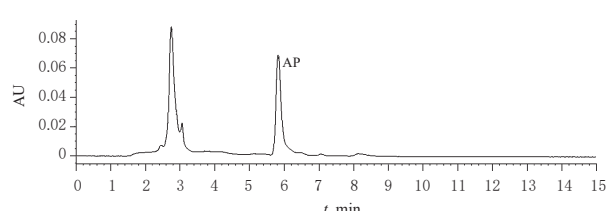
B.空白心脏组织+AP(10 μg/mL)



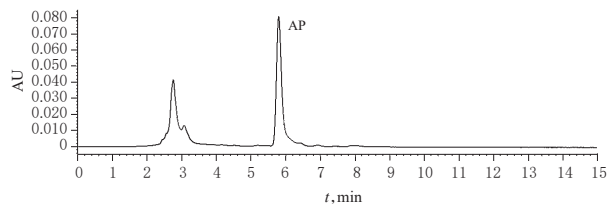
C.空白肝组织+AP(10 μg/mL)



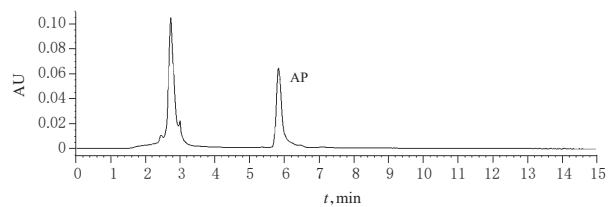
D.空白脾组织+AP(10 μg/mL)



E.空白肺组织+AP(10 μg/mL)



F.空白肾组织+AP(10 μg/mL)



G.空白脑组织+AP(10 μg/mL)

图1 空白血浆/组织样品的高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of blank plasma/tissue samples

图2 空白血浆/组织+AP标准溶液的高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms of blank plasma/tissue+AP standard solution

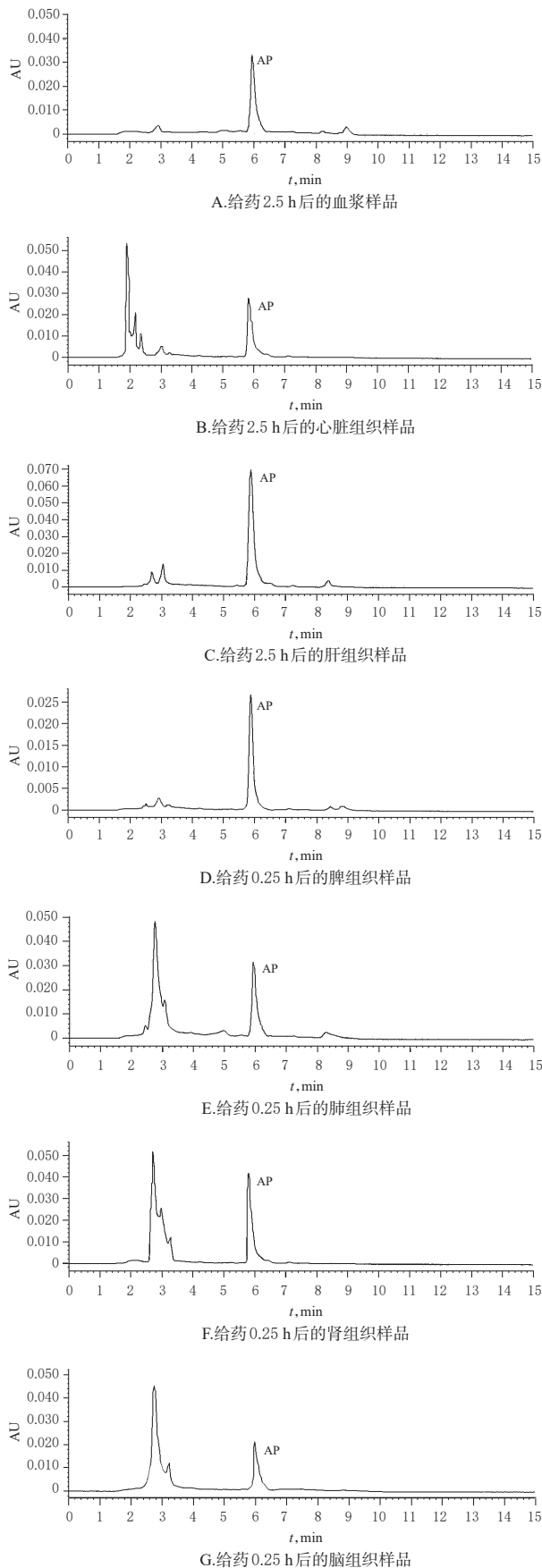


图3 给药0.25 h后血浆/组织样品的高效液相色谱图
Fig 3 HPLC chromatograms of plasma/tissue samples 0.25 h after administration

表1 血浆和不同组织样品中AP的回归方程、线性范围和定量下限

Tab 1 Regression equation, linear range and quantitation limit of AP in plasma and different tissues samples

样品	回归方程	线性范围, $\mu\text{g/mL}$	相关系数(r)	定量下限, $\mu\text{g/mL}$
血浆	$A=73\ 766c-12\ 868$	0.1~25.0	0.998 5	0.1
心	$A=85\ 171c-6\ 659.6$	0.1~25.0	0.999 4	0.1
肝	$A=75\ 296c+8\ 276.5$	0.1~25.0	0.998 9	0.1
脾	$A=113\ 863c-27\ 440$	0.1~25.0	0.997 5	0.1
肺	$A=117\ 643c-44\ 979$	0.1~25.0	0.998 2	0.1
肾	$A=100\ 348c-4\ 705.5$	0.1~25.0	0.999 4	0.1
脑	$A=101\ 820c-26\ 399$	0.1~25.0	0.996 9	0.1

表2 精密性与准确度试验结果

Tab 2 Results of precision and accuracy tests

样品	理论质量浓度, $\mu\text{g/mL}$	日内($n=6$)			日间($n=18$)		
		实测质量浓度, $(\bar{x} \pm s), \mu\text{g/mL}$	日内RSD, %	准确度, %	实测质量浓度, $(\bar{x} \pm s), \mu\text{g/mL}$	日间RSD, %	准确度, %
血浆	0.1	0.11 ± 0.01	5.25	108.35	0.11 ± 0.01	9.54	111.88
	0.2	0.21 ± 0.01	4.76	105.00	0.23 ± 0.02	8.70	115.24
	5.0	4.79 ± 0.25	5.22	96.83	5.29 ± 0.74	13.99	116.75
	20.0	20.91 ± 1.76	8.42	104.56	21.23 ± 2.12	9.99	106.62
心	0.1	0.10 ± 0.01	11.37	98.64	0.11 ± 0.01	8.61	115.45
	0.2	0.21 ± 0.03	14.29	105.00	0.19 ± 0.02	10.53	95.62
	5.0	4.99 ± 0.69	13.83	99.80	5.02 ± 0.39	7.77	102.10
	20.0	20.45 ± 2.34	11.44	102.25	20.21 ± 2.35	11.63	101.05
肝	0.1	0.11 ± 0.01	10.85	109.24	0.11 ± 0.01	9.68	107.67
	0.2	0.18 ± 0.01	5.56	94.37	0.22 ± 0.02	8.70	113.63
	5.0	5.28 ± 0.44	8.33	105.60	4.91 ± 0.36	7.33	98.29
	20.0	20.77 ± 2.24	10.78	103.85	20.35 ± 1.06	5.21	101.45
脾	0.1	0.10 ± 0.01	5.69	100.88	0.11 ± 0.01	11.05	111.44
	0.2	0.21 ± 0.01	4.76	104.33	0.23 ± 0.02	8.70	115.20
	5.0	4.90 ± 0.56	11.43	102.05	4.82 ± 0.38	7.89	98.35
	20.0	19.51 ± 2.31	11.84	99.72	19.83 ± 1.04	5.24	95.95
肺	0.1	0.11 ± 0.01	9.53	109.34	0.10 ± 0.01	8.95	100.96
	0.2	0.22 ± 0.02	9.09	106.83	0.23 ± 0.02	8.69	108.50
	5.0	4.84 ± 0.48	9.92	98.50	4.78 ± 0.64	13.39	99.67
	20.0	19.84 ± 2.17	10.94	100.45	20.32 ± 1.32	6.50	108.27
肾	0.1	0.11 ± 0.01	5.23	109.74	0.11 ± 0.01	10.85	110.24
	0.2	0.18 ± 0.01	5.56	94.43	0.22 ± 0.01	4.55	110.00
	5.0	4.88 ± 0.36	7.38	100.52	4.79 ± 0.33	6.89	98.27
	20.0	20.23 ± 2.03	10.03	100.65	20.82 ± 1.63	7.83	111.50
脑	0.1	0.10 ± 0.01	5.25	102.83	0.10 ± 0.01	4.98	103.16
	0.2	0.21 ± 0.01	4.76	105.50	0.22 ± 0.02	9.09	117.48
	5.0	4.75 ± 0.26	5.47	96.18	5.30 ± 0.36	6.79	113.50
	20.0	20.94 ± 1.31	6.26	104.54	20.40 ± 2.32	11.37	111.43

“2.1.3”或“2.1.4”项下方法处理后,加入相应质量浓度的AP标准溶液,使最终质量浓度与前者对应,按“2.1.1”项下色谱条件进样分析,记录峰面积(A_2)。计算提取回收率:提取回收率= $(A_1/A_2) \times 100\%$,结果见表3。

2.1.9 稳定性试验 按“2.1.6”项下方法配制低、中、高质量浓度(0.2、5.0、20.0 $\mu\text{g/mL}$)的质控血浆/组织样品,各6份,分别按“2.1.3”或“2.1.4”项下方法处理后,考察其室温放置24 h、 $-40\text{ }^\circ\text{C}$ 放置24 h、反复冻融($-40\text{ }^\circ\text{C}$ ~室温)3次的稳定性。结果,各样品待测物峰面积RSD均小于10% ($n=6$),提示在上述条件下稳定性良好。

表3 提取回收率试验结果($n=6$)Tab 3 Results of extraction recovery tests ($n=6$)

样品	理论质量浓度, $\mu\text{g/mL}$	提取回收率($\bar{x} \pm s$), %	RSD, %
血浆	0.2	80.28 \pm 2.76	2.27
	5.0	95.26 \pm 1.55	1.33
	20.0	97.19 \pm 3.84	2.59
心	0.2	83.73 \pm 4.36	6.54
	5.0	91.33 \pm 2.35	3.86
	20.0	90.55 \pm 3.38	3.26
肝	0.2	80.36 \pm 2.52	1.49
	5.0	87.67 \pm 1.66	2.58
	20.0	98.98 \pm 0.89	1.53
脾	0.2	76.24 \pm 5.42	4.81
	5.0	90.62 \pm 1.37	1.95
	20.0	94.44 \pm 2.11	4.24
肺	0.2	76.32 \pm 5.94	3.77
	5.0	94.75 \pm 2.35	2.89
	20.0	98.20 \pm 0.56	2.85
肾	0.2	79.55 \pm 2.71	4.49
	5.0	95.81 \pm 1.25	1.39
	20.0	96.47 \pm 2.34	3.76
脑	0.2	82.73 \pm 1.44	4.42
	5.0	92.34 \pm 2.48	1.19
	20.0	97.37 \pm 1.86	3.12

2.2 AP-NPs在小鼠体内组织分布研究及靶向性评价

2.2.1 AP-NPs的制备 采用微量超声沉淀法^[18]制备AP-NPs。精密称取AP原料药100 mg,加二甲基亚砜(DMSO)适量使溶解;另称取PVP、TPGS各50 mg,溶解于水20 mL中,于超声(功率:750 W,频率:20 kHz,下

同)条件下将上述AP溶液加至其中,以15 000 r/min离心10 min,弃去上清液,再用水补至20 mL;重复操作2次以除去DMSO,随后将沉淀物摇匀,倒入西林瓶中,以超声2 s、间歇2 s处理10 min,即得AP-NPs(每毫升AP-NPs含AP原料药约4.35 mg,载药量为43.52%)。

2.2.2 体内分布实验 所有小鼠均禁食、不禁水12 h后,随机分为AP溶液组[将AP原料药溶于聚乙二醇-乙醇-生理盐水混合溶液(5:2:3, V/V/V)中,混悬液质量浓度为10.00 mg/mL]和AP-NPs混悬液组(将AP-NPs溶于生理盐水中,混悬液质量浓度为10.88 mg/mL),各45只。各组小鼠均单次灌胃相应药物80 mg/kg(剂量设置参考文献[19]及本课题组前期预实验结果)。分别于给药前(0 h)及给药后0.25、0.5、1、2、4、6、8、10 h摘取眼球取血500 μL ,置于含肝素钠的离心管中,以5 000 r/min离心10 min,分离血浆。末次取血后立即脱颈处死小鼠,取其心、肝、脾、肺、肾以及脑组织,用生理盐水将组织表面的残血洗净,用滤纸吸干后精确称定质量。将血浆及组织样品分别按“2.1.3”或“2.1.4”项下方法处理(其中肝组织样品经甲醇稀释1倍后进样)后,再按“2.1.1”项下色谱条件进样分析,记录峰面积,根据随行标准曲线计算各时间点各样品中AP的质量浓度,每个时间点各组取5只小鼠平行操作。采用Excel 2010软件绘制组织分布图;采用SPSS 17.0软件对数据进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。各样品中AP的质量浓度见表4,AP的组织分布见图4。

表4 小鼠灌胃AP原料药和AP-NPs后各时间点血浆和组织样品中AP的质量浓度($\bar{x} \pm s, n=5, \mu\text{g/mL}$)Tab 4 The concentration of AP in plasma 1 tissue samples at different time points after intragastric administration of AP raw material and AP-NPs ($\bar{x} \pm s, n=5, \mu\text{g/mL}$)

组别	样品	时间点								
		0 h	0.25 h	0.5 h	1 h	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h
AP溶液组	血浆	-	5.30 \pm 1.10	7.79 \pm 1.01	4.82 \pm 0.35	3.95 \pm 0.68	3.03 \pm 0.46	2.26 \pm 0.31	1.16 \pm 0.27	-
	心	-	4.01 \pm 0.31	4.99 \pm 0.46	3.94 \pm 0.92	3.18 \pm 1.06	2.60 \pm 0.26	1.76 \pm 0.32	1.10 \pm 0.31	0.79 \pm 0.25
	肝	-	12.41 \pm 2.68	18.36 \pm 1.20	13.05 \pm 3.41	11.51 \pm 1.74	9.54 \pm 0.68	8.47 \pm 1.27	5.18 \pm 1.24	4.99 \pm 0.46
	脾	-	4.11 \pm 1.04	5.15 \pm 1.12	4.63 \pm 0.52	3.27 \pm 0.75	2.81 \pm 0.73	2.01 \pm 0.51	1.04 \pm 0.32	-
	肺	-	5.11 \pm 0.73	6.58 \pm 1.25	5.26 \pm 1.10	4.31 \pm 0.46	3.18 \pm 0.61	2.87 \pm 0.51	1.69 \pm 0.46	0.68 \pm 0.32
	肾	-	7.96 \pm 1.73	10.01 \pm 1.41	8.52 \pm 0.62	7.01 \pm 0.74	6.52 \pm 0.67	4.84 \pm 0.66	3.72 \pm 0.63	1.77 \pm 0.28
	脑	-	2.07 \pm 0.26	2.63 \pm 0.43	2.10 \pm 0.21	1.89 \pm 0.42	1.01 \pm 0.28	-	-	-
	AP-NPs混悬液组	血浆	-	5.48 \pm 1.23	9.34 \pm 1.04*	6.99 \pm 1.87*	4.93 \pm 1.11*	3.67 \pm 0.38*	2.85 \pm 0.81*	1.38 \pm 0.39
心		-	3.66 \pm 0.74	4.36 \pm 0.98	4.01 \pm 1.65	3.02 \pm 1.08	2.49 \pm 0.39	1.25 \pm 0.42*	0.81 \pm 0.22	-
肝		-	20.80 \pm 2.43**	24.68 \pm 2.82**	23.74 \pm 4.35**	21.81 \pm 2.33**	15.70 \pm 2.21*	12.27 \pm 2.21**	8.31 \pm 1.06**	3.39 \pm 0.48*
脾		-	5.55 \pm 1.11*	6.59 \pm 1.44*	5.78 \pm 1.65*	4.79 \pm 0.83*	3.89 \pm 0.92**	2.97 \pm 0.34*	1.68 \pm 0.46*	0.85 \pm 0.29
肺		-	4.98 \pm 0.89	5.54 \pm 2.23*	5.13 \pm 0.64	4.29 \pm 0.37	3.35 \pm 0.45	2.92 \pm 0.44	1.71 \pm 0.37	-
肾		-	6.28 \pm 0.66*	8.03 \pm 1.83*	7.11 \pm 1.77*	5.43 \pm 1.69**	3.99 \pm 1.01**	2.98 \pm 0.57**	1.77 \pm 0.54**	1.11 \pm 0.37*
脑		-	2.63 \pm 0.43*	3.43 \pm 0.47*	2.80 \pm 0.40*	2.39 \pm 0.39*	1.26 \pm 0.48*	0.98 \pm 0.21	-	-

注:“-”代表未检测到或低于定量下限;与AP溶液组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Note:“-” stands for undetected or below the lowest quantitation limit; vs. AP solution group, * $P < 0.05$,** $P < 0.01$

由表4、图4可见,与AP溶液组比较,AP-NPs混悬液组小鼠血浆样品(0.5~6 h各时间点)以及肝(0.25~8 h各时间点)、脾(0.25~8 h各时间点)、脑(0.25~4 h各时间点)组织样品中AP的质量浓度均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且以肝组织中AP含量最高;而心脏(6 h)肝(10 h)、肺(0.5 h)、肾(0.25~10 h各时间点)组织样

品中AP的质量浓度均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.2.3 体内靶向性评价 以AP原料药作为参比,采用DAS 2.0软件和Excel 2010软件计算药-时曲线下面积(AUC)、峰浓度(c_{max})、峰浓度比值(c_c)、相对摄取率(RUE),并以上述参数为主要指标评价AP在小鼠体内的靶向性。其中, c_c 越大,表示对应剂型对药物分布的改

变越明显;当RUE>1时,表示该组织对药物具有一定的摄取能力,提示药物具有一定的靶向性,而当RUE≤1则

表明该组织对药物无摄取能力^[20-21]。各指标计算公式如下(式中,NPs、原料分别表示AP-NPs和AP原料药,下同),结果见表5。

$$c_c = (c_{\max})_{\text{NPs}} / (c_{\max})_{\text{原料}} \dots\dots\dots ①$$

$$\text{RUE} = \text{AUC}_{\text{NPs}} / \text{AUC}_{\text{原料}} \dots\dots\dots ②$$

由表5可见,AP-NPs在血浆/组织样品中的AUC、 c_{\max} 与AP原料药比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。其中,AP-NPs在血浆以及肝、脾、脑组织中的RUE均大于1;血浆以及脾、脑组织的 c_c 值也较高,但由于AP在上述组织中的AUC均低于肝脏(AP原料药和AP-NPs在肝脏中的AUC分别是血浆中的3.46、4.66倍,脾中的4.06、4.76倍,脑中的9.35、11.87倍),故提示AP在肝组织的积累量高于血浆以及脾、脑组织。

本研究就各组织对药物的摄取占比及其改变值进行了进一步分析,以考察药物在各个组织分布的比例以及不同制剂在同一组织中分布的差异,进而评价组织对不同制剂的摄取差异,相关计算公式如下,结果见表5。

$$\text{摄取占比} = \text{某组织 AUC} / \text{各组织 AUC 的总和} \times 100\% \dots\dots\dots ③$$

$$\text{摄取占比改变值} = \text{摄取占比}_{\text{NPs}} - \text{摄取占比}_{\text{原料}} \dots\dots ④$$

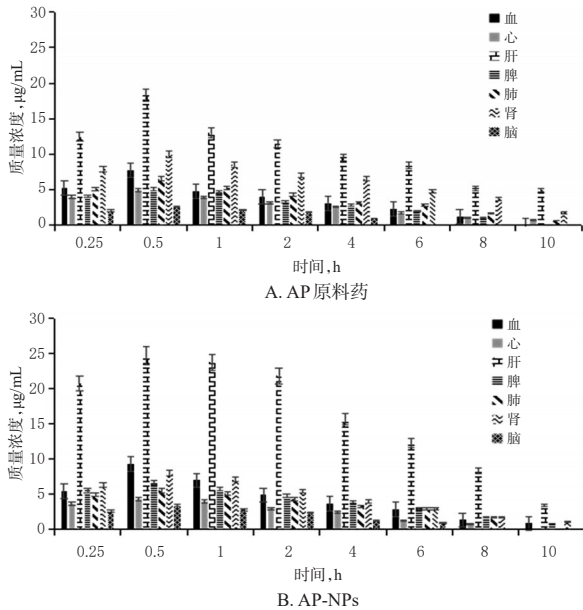


图4 AP原料药及AP-NPs在小鼠体内的组织分布图
Fig 4 Tissue distribution charts of AP raw material and AP-NPs in mice *in vivo*

表5 AP在小鼠体内分布的靶向性评价参数($n=5$)

Tab 5 Targeting evaluation parameters of AP in mice *in vivo* ($n=5$)

样品	AUC($\bar{x} \pm s$), mg·h/L		RUE($\bar{x} \pm s$)	c_{\max} ($\bar{x} \pm s$), mg/L		c_c ($\bar{x} \pm s$)	摄取占比, %		摄取占比改变, %
	AP溶液组	AP-NPs混悬液组		AP溶液组	AP-NPs混悬液组		AP溶液组	AP-NPs混悬液组	
血浆	25.16 ± 3.48	37.14 ± 5.93*	1.48 ± 0.31	7.79 ± 0.79	9.34 ± 1.32*	1.20 ± 0.39	9.46	10.40	0.94
心	22.94 ± 3.12	22.21 ± 3.96*	0.96 ± 0.27	4.99 ± 1.02	4.36 ± 1.13*	0.87 ± 0.18	8.63	6.22	-2.41
肝	87.17 ± 6.39	173.17 ± 8.38*	1.99 ± 0.29	18.36 ± 4.72	24.68 ± 5.32*	1.34 ± 0.40	32.78	48.49	15.71
脾	21.49 ± 3.25	36.39 ± 4.34*	1.69 ± 0.30	5.15 ± 0.98	6.59 ± 1.21*	1.27 ± 0.32	8.08	10.19	2.11
肺	37.09 ± 5.38	30.92 ± 4.58*	0.83 ± 0.27	6.58 ± 1.40	5.54 ± 1.17*	0.84 ± 0.21	13.95	8.66	-5.29
肾	62.76 ± 7.38	42.74 ± 4.57*	0.68 ± 0.19	10.01 ± 2.01	8.03 ± 1.97*	0.82 ± 0.24	23.60	11.97	-11.63
脑	9.32 ± 1.23	14.59 ± 2.42*	1.56 ± 0.34	2.63 ± 0.53	3.43 ± 0.96*	1.30 ± 0.36	3.50	4.09	0.59

注:与AP溶液组比较, * $P<0.05$

Note: vs. AP solution group, * $P<0.05$

由表5可见,AP-NPs明显提高了AP原料药在肝中的摄取量,其摄取占比由原料药的32.78%提高至48.49%,摄取占比改变值为15.71%,提示将AP制成NPs可大幅度提高肝脏对药物的摄取,使AP可累积在肝脏部位以发挥治疗作用。

3 讨论

3.1 生物样品处理方法的选择

本研究采用蛋白沉淀法对血浆/组织样品进行处理,并比较了乙腈和甲醇作为沉淀剂的蛋白沉淀效果。结果发现,以甲醇作为沉淀剂的效果更好,因此本研究选择甲醇作为蛋白沉淀剂。

3.2 参比制剂溶媒的选择

由于AP的溶解性极差,且目前并无市售的口服制剂,故本研究采用复合溶媒[聚乙二醇-乙醇-生理盐水(5:2:3, V/V/V)]对AP原料药进行溶解。与常用乳剂参比制剂相比,复合溶媒所含辅料少、制备方法简单且稳

定性好,故本研究以复合溶媒溶解的AP溶液作为参比制剂,进行体内组织分布研究及靶向性评价。

3.3 组织分布及靶向性评价结果分析

为解决难溶性抗肿瘤活性成分AP的生物利用度问题,本研究采用微量超声沉淀法制备AP-NPs;同时,以AP原料药为参照,考察了AP-NPs在小鼠体内的组织分布情况以及靶向特性。结果显示,与AP溶液组比较,AP-NPs混悬液组小鼠血浆(0.5~6 h各时间点)以及肝(0.25~8 h各时间点)、脾(0.25~8 h各时间点)、脑(0.25~4 h各时间点)组织中AP的质量浓度均显著提高,且以肝中含量最高;而心脏(6 h)、肝(10 h)、肺(0.5 h)、肾(0.25~10 h各时间点)组织样品中AP的质量浓度均显著降低。这提示AP-NPs在血、肝、脾、脑中的分布均有所增多,而在心、肾,尤其是肾中的分布则明显减少。同时,AP在血浆、肝、脾、脑组织中的RUE均超过1,提示AP-NPs对上述器官具有一定的靶向作用。进一步考察

AP在各组织部位中的摄取占比发现,AP在肝脏中的摄取占比高达48.49%,而在血浆、脾、脑组织中分别仅为10.40%、10.19%、4.09%;且比较AP原料药与AP-NPs在各组织中的摄取占比改变值发现,其在肝脏中占比改变值最大,为15.71%,而血浆、脾、脑中分别仅为0.94%、2.11%、0.59%。这提示与AP原料药相比,AP-NPs增加了药物在肝脏部位的聚集。

综上所述,本研究建立的HPLC法操作简便,专属性强,灵敏度、精密度高,可用于小鼠血浆以及组织样品中AP质量浓度的检测及药动学的研究。将AP制成NPs后,药物的组织分布有所改变,尤其对肝的靶向作用有所提高。根据AP-NPs的组织分布特点,基于AP良好的抗肿瘤和逆转多药耐药的作用,本课题组将进一步探讨经口给予AP-NPs对肝癌的干预作用,同时也将进一步评价AP-NPs这类口服中药抗肿瘤制剂与化疗药物联合治疗的效果,并探讨其可能机制,为抗肿瘤治疗提供新的思路。

参考文献

- [1] SATTAR A, CHEN D, JIANG L, et al. Preparation, characterization and pharmacokinetics of cyadox nanosuspension[J]. *Sci Rep*, 2017. DOI:10.1038/s41598-017-02523-4.
- [2] ABDELGHANY S, TEKKO IA, VORA L, et al. Nanosuspension-based dissolving microneedle arrays for intradermal delivery of curcumin[J]. *Pharmaceutics*, 2019. DOI: 10.3390/pharmaceutics11070308.
- [3] SHI S, ZHANG Z, LUO Z, et al. Chitosan grafted methoxy poly(ethylene glycol)-poly(ϵ -caprolactone) nanosuspension for ocular delivery of hydrophobic diclofenac[J]. *Sci Rep*, 2015. DOI: 10.1038/srep11337.
- [4] PAILLA SR, TALLURI S, RANGARAJ N, et al. Intranasal zotepine nanosuspension: intended for improved brain distribution in rats[J]. *Daru*, 2019. DOI: 10.1007/s40199-019-00281-4.
- [5] RAJAMANI S, RADHAKRISHNAN A, SENGODAN T, et al. Augmented anticancer activity of naringenin-loaded TPGS polymeric nanosuspension for drug resistive MCF-7 human breast cancer cells[J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2018, 44(11):1752-1761.
- [6] CHIANG PC, GOULD S, NANNINI M, et al. Nanosuspension delivery of paclitaxel to xenograft mice can alter drug disposition and anti-tumor activity[J]. *Nanoscale Res Lett*, 2014. DOI:10.1186/1556-276X-9-156.
- [7] WANG C, CUI B, GUO L, et al. Fabrication and evaluation of lambda-cyhalothrin nanosuspension by one-step melt emulsification technique[J]. *Nanomaterials*, 2019. DOI:10.3390/nano9020145.
- [8] PHAECHAMUD T, TUNTARAWONGSA S. Transformation of eutectic emulsion to nanosuspension fabricating with solvent evaporation and ultrasonication technique[J]. *Int J Nanomedicine*, 2016. DOI:10.2147/IJN.S108355.
- [9] LESTARI M, MÜLLER RH, MÖSCHWITZER JP. The scalability of wet ball milling for the production of nanosuspensions[J]. *Pharm Nanotechnol*, 2019. DOI: 10.2174/2211738507666190401142530.
- [10] SHUKLA S, KANWAL R, SHANKAR E, et al. Apigenin blocks IKK α activation and suppresses prostate cancer progression[J]. *Oncotarget*, 2015. DOI: 10.18632/oncotarget.5157.
- [11] XU M, WANG S, SONG YU, et al. Apigenin suppresses colorectal cancer cell proliferation, migration and invasion via inhibition of the Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *Oncol Lett*, 2016, 11(5):3075-3080.
- [12] VILCHEZ V, TURCIOS L, MARTI F, et al. Targeting Wnt/ β -catenin pathway in hepatocellular carcinoma treatment[J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(2):823-832.
- [13] 陈亭亭, 杨培伟, 张树辉. 芹菜素抗肿瘤机制研究进展[J]. *中国现代应用药学*, 2019, 36(4):507-510.
- [14] SEO HS, KU JM, CHOI HS, et al. Apigenin overcomes drug resistance by blocking the signal transducer and activator of transcription 3 signaling in breast cancer cells[J]. *Oncol Rep*, 2017, 38(2):715-724.
- [15] 缪明星, 王星, 陆琰, 等. 芹菜素对氧嗪酸钾盐致高尿酸血症小鼠的降尿酸及肾保护作用机制研究[J]. *中国药房*, 2016, 27(34):4794-4797.
- [16] TANG D, CHEN K, HUANG L, et al. Pharmacokinetic properties and drug interactions of apigenin, a natural flavone[J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2017, 13(3):323-330.
- [17] 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, 2015:363-364.
- [18] 于世龙. 芹菜素纳米混悬剂的制备及药物动力学研究[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2015.
- [19] ZHAO F, DANG Y, ZHANG R, et al. Apigenin attenuates acrylonitrile-induced neuro-inflammation in rats: involved of inactivation of the TLR4/NF- κ B signaling pathway[J]. *Int Immunopharmacol*, 2019. DOI: 10.1016/j.intimp.2019.105697.
- [20] 扈本荃, 廉江平, 徐玥, 等. 甘草酸脂质体的制备及小鼠体内肝靶向效率的评价[J]. *中国实验动物学报*, 2015, 23(4):401-405.
- [21] 王吉平, 王蔚, 张炜煜. 栀子提取物类脂质体在大鼠体内的分布及靶向性研究[J]. *中国药房*, 2016, 27(4):473-475.

(收稿日期:2019-06-19 修回日期:2019-12-03)

(编辑:张元媛)