

究结果。

本研究为温敏型眼用原位凝胶的体外释放考察方法提供了参考，但还需进一步的体内试验，将该制剂与市售滴眼液进行比较，以体现该制剂的优势所在。

REFERENCES

- [1] SHEN H, GOU S, SHEN J, et al. Synthesis and biological evaluations of novel bendazac lysine analogues as potent anticataract agents [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2010, 20(7): 2115-2118.
- [2] SUN X, SHI Y F. Determination of L-lysine in Bendazac Lysine eye drops by HPLC [J]. Chin J Pharm(中国医药工业杂志), 2014, 45(11): 1061-1062.
- [3] AMMAR H O, SALAMA H A, GHORAB M, et al. Development of dorzolamide hydrochloride in situ gel nanoemulsion for ocular delivery [J]. Drug Dev Ind Pharm, 2010, 36(11): 1330-1339.
- [4] ASASUTJARIT R, THANASANCHOKPIBULL S, FUONGFUCHAT A, et al. Optimization and evaluation of thermoresponsive diclofenac sodium ophthalmic in situ gels [J]. Int J Pharm, 2011, 411(1/2): 128-135.
- [5] WANG Z G, WANG Y J, LI H, et al. Study on preparation of Dange Mingmu in-situ forming eye gel [J]. Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2012, 37(1): 46-57.
- [6] GEETHALAKSHMI A, KARKI R, JHA S K, et al. Sustained ocular delivery of brimonidine tartrate using ion activated in situ gelling system [J]. Curr Drug Deliv, 2012, 9(2): 197-204.
- [7] LI X R, LEI Y L, SHEN C Y, et al. Preparation and evaluation of ophthalmic pH sensitive in-situ gel of acyclovir [J]. Chin New Drug J(中国新药杂志), 2009, 18(24): 2360-2364.
- [8] MONTI D, SACCOMANI L, CHETONI P, et al. Effect of iontophoresis on transcorneal permeation 'in vitro' of two beta-blocking agents, and on corneal hydration [J]. Int J Pharm, 2003, 250(2): 423-429.
- [9] QIAN Y, WANG F, LI R, et al. Preparation and evaluation of in situ gelling ophthalmic drug delivery system for methazolamide [J]. Drug Dev Ind Pharm, 2010, 36(11): 1340-1347.
- [10] GRATIERI T, GELFUSO G M, ROCHA E M, et al. A poloxamer/chitosan in situ forming gel with prolonged retention time for ocular delivery [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2010, 75(2): 186-193.
- [11] DEWAN M, BHOWMICK B, SARKAR G, et al. Effect of methyl cellulose on gelation behavior and drug release from poloxamer based ophthalmic formulations [J]. Int J Biol Macromol, 2015(72): 706-710.
- [12] XIAO Y Y, BAO X, SHEN J, et al. Preparation and *in vitro* characterizations of cyclosporine a ocular nanostructured lipid carriers [J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2012, 47(5): 362-366.
- [13] QIAN S, WONG Y C, ZUO Z. Development, characterization and application of in situ gel systems for intranasal delivery of tacrine [J]. Int J Pharm, 2014, 468(1/2): 272-282.
- [14] LU B. New Techniques and New Dosage Forms of Drug [M]. 2nd Ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2005: 386-387.
- [15] YUAN Y, CUI Y, ZHANG L, et al. Thermosensitive and mucoadhesive in situ gel based on poloxamer as new carrier for rectal administration of nimesulide [J]. Int J Pharm, 2012, 430(1/2): 114-119.
- [16] BHOWMIK M, KUMARI P, SARKAR G, et al. Effect of xanthan gum and guar gum on in situ gelling ophthalmic drug delivery system based on poloxamer-407 [J]. Int J Biol Macromol, 2013(62): 117-123.
- [17] TIAN F, WANG Y Z, YANG K, et al. Rheological characteristics of nifeviroc vaginal thermosensitive in situ gels [J]. Chin New Drug J(中国新药杂志), 2013, 22(3): 345-350.

收稿日期：2015-09-23

口服聚乙二醇修饰固体脂质纳米粒的组织分布及抗肿瘤药效学研究

陈春燕¹, 徐萍¹, 袁弘²(1.宁波市第一医院, 浙江 宁波 315010; 2.浙江大学, 杭州 310012)

摘要: 目的 研究口服固体脂质纳米粒(solid lipid nanoparticle, SLN)和经聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)修饰后的SLN(pSLN)在小鼠体内的组织分布及药效。方法 采用水性溶剂扩散法制备SLN, 用聚乙二醇单硬脂酸酯(PEG₂₀₀₀-SA)修饰以提供亲水基团; 测定其粒径、Zeta电位、表面元素、接触角和稳定性; 以DiR为荧光标记物, 测定SLN及pSLN制剂经口服给药后的体内组织分布; 以阿霉素为模型药物, 考察口服脂质纳米给药系统的体内抗肿瘤活性及安全性。结果 SLN经PEG修饰后, 得到的pSLN制剂粒径降低, Zeta电位约为-20 mV, 表面亲水性及体内稳定性增加; 经口服给药后, pSLN在肿瘤组织有聚集, 且经PEG修饰后的纳米粒在组织中的滞留时间可显著延长; 在荷瘤裸鼠模型动物上的药效学结果显示, PEG修饰口服脂质纳米给药系统在改善药效的同时, 降低药物的不良反应, 提高给药系统的安全性。结论 PEG修饰改善了口服纳米给药系统的生物分布及药效, 提高了给药系统的安全性。

关键词: 固体脂质纳米粒; 聚乙二醇; 口服给药; 组织分布; 药效学

中图分类号: R969.1; R965.2 **文献标志码:** B

文章编号: 1007-7693(2016)05-0586-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.05.015

基金项目: 宁波市自然基金项目(2014A610216)

作者简介: 陈春燕, 女, 硕士, 药师 Tel: (0574)87085157

E-mail: chunyanchen@zju.edu.cn

Tissue-distribution and Anti-tumor Pharmacodynamics of PEGylated Solid Lipid Nanoparticles after Oral Administration

CHEN Chunyan¹, XU Ping¹, YUAN Hong²(¹Ningbo First Hospital, Ningbo 315010, China; ²Zhejiang University, Hangzhou 310012, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the tissues distribution and anti-tumor pharmacodynamics of monostearin solid lipid nanoparticles (SLN) and SLN modified by PEG₂₀₀₀-SA (pSLN) *in vivo* of mice. **METHODS** The SLN was prepared by aqueous solvent diffusion method, subsequently modified with PEG₂₀₀₀-SA as hydrophilic groups. The particle diameters, Zeta potentials, surface element, contact angle and stability of SLN and pSLN were determined. Tissues distributions of SLN and pSLN preparations *in vivo* of rats after oral administration were determined and the determining results were calculated with DiR as fluorescent marker. The *in vivo* antitumor efficacy and safety of the DOX-loaded nanoparticles was evaluated using BEL-7402 bearing mice model after oral administration. **RESULTS** The size of pSLN was smaller than that of SLN after modified by PEG. The Zeta potential of pSLN was about -20 mV and the surface hydrophilicity was improved after PEGylation of SLN. The pSLN accumulated in the tumor tissues and liver after oral administration, and the residence time in the tissue of nanoparticles was significantly prolonged after modified by PEG-SA. Furthermore, *in vivo* studies indicated that pSLN as a nanocarrier for the oral drug delivery system conducted well in maintaining therapeutic effects and inhibiting the growth of the solid tumor while reducing the toxicity against animal body. **CONCLUSION** Oral delivery of SLN can improve bio-distribution *in vivo* after modification with PEG-SA while reducing toxicity to normal tissue.

KEY WORDS: solid lipid nanoparticles; polyethylene glycol; oral administration; tissue-distribution; efficacy

固体脂质纳米粒(solid lipid nanoparticle, SLN)是继传统的乳剂、脂质体、聚合物微粒后，近年来研究较活跃的一种缓控释靶向微粒给药统^[1-2]。SLN 的口服给药方式因方便、快捷、患者适应性强，已成为研究热点^[3]。但 SLN 比表面积大，进入血液循环系统后，易受网状内皮系统吞噬作用的影响，无法达到增强渗透及滞留效应(enhanced permeability and retention effect, EPR)^[4]。这种吞噬作用与粒子的理化性质有关^[5]，减少脂质纳米载体体内吞噬的主要方法是通过物理或化学修饰，增加粒子的表面亲水性，减少表面蛋白吸附^[6]。因此，通过对纳米粒进行表面修饰，延长其体循环时间，具有非常重要的意义^[7-8]。

在纳米粒给药系统的探索中，笔者考察了聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)修饰对脂质纳米载体体内组织分布的影响。PEG 是一种常用的粒子表面修饰剂，它具有无毒、无免疫原性、无抗原性、高度水溶、对药物释放无影响等特性^[9]。脂质纳米载体通过低分子量的 PEG 修饰后可增加粒子空间稳定性、延长体循环时间、降低免疫原型、增强渗透性及体内滞留性^[10-12]。

本实验采用水性溶剂扩散法制备单硬脂酸甘油酯 SLN^[13]，用 PEG 修饰以提供亲水性基团，考察 PEG 修饰对 SLN 生物分布、药效及安全性的影晌，探讨 PEG 修饰后的 SLN(PEGylated solid lipid nanoparticles, pSLN)作为口服纳米给药系统的潜

在应用价值。

1 材料

1.1 动物

ICR 小鼠，30 只，♂，体质量 18~22 g；BALB/C+nu/F1 裸鼠，24 只，♂，体质量 16~20 g，均购自上海斯莱克实验动物责任有限公司，合格证号：SCXK(沪)2012-0002。

1.2 细胞株

人肝癌细胞 BEL-7402 细胞株由中国科学院上海生命科学研究院提供。

1.3 仪器与试剂

3000HS 微粒粒度与表面电位测定仪(德国 Malvern Instruments Ltd.); Milli-Q 超纯水仪(美国 Millipore Co.); Maestro EX 小动物活体成像仪(美国 CRI Inc.); 透析袋(MWCO 7 kDa, 美国 Spectrum Laboratories); GENESIS4000 X 射线能量色散谱仪(美国 EDAX); OCA20 视频接触角测定仪(德国 DATAPHYSI)。

单硬脂酸甘油酯和聚维酮 K30(上海化学试剂有限公司)；聚乙二醇(PEG2000-SA, Mw: 2 000, 美国 Sigma)；波洛沙姆 188(F-68, 德国 BASF)；无水乙醇(国药集团化学试剂有限公司)；DMSO(无锡海硕生物有限公司)；盐酸阿霉素(doxorubicin hydrochloride, DOX·HCl, 浙江海正药业有限公司)；脂质荧光染料 DiR(美国 Invitrogen)；其余溶剂和试剂为色谱纯或分析纯。

2 方法

2.1 SLN 的制备

用水性溶剂扩散法制备 SLN 和 pSLN。将 60 mg 单甘脂与 PEG₂₀₀₀-SA 的混合物(PEG 质量比分别为 0%, 10%)溶于 6 mL 乙醇, 70 ℃水浴预热。分别将 120 μL DiR(5 mg·mL⁻¹, 用于制备 DiR 标记 SLN 和 pSLN)或 3 mL DOX(1 mg·mL⁻¹, 用于制备载 DOX 的 SLN 和 pSLN)的 DMSO 溶液加入到上述脂质溶液中, 在水浴 70 ℃、400 r·min⁻¹的搅拌速度下将混合有机相快速注入 60 mL F-68 溶液(0.1%, w/v)中, 持续搅拌 5 min, 得到 DiR 标记(或载 DOX)固体脂质纳米粒。冷却至室温后, 将其倒入透析袋中, 以 10%聚维酮 K30 作为透析介质透析 48 h, 使固体脂质纳米粒溶液浓缩, 浓缩液用 F-68 溶液重新分散并定容至 10 mg·mL⁻¹(脂质浓度)。最终得到 DiR 标记的脂质纳米粒(SLN/DiR 和 pSLN/DiR)及载 DOX 脂质纳米粒(SLN/DOX 和 pSLN/DOX), 所有操作都在避光下进行。

2.2 纳米粒理化性质评价

2.2.1 粒径和表面电位 取 SLN 和 pSLN 分散液适量, 用 F-68 溶液稀释至 1 mg·mL⁻¹, 用 3 000 HS 粒度及表面电位分析仪测定其粒径和表面电位。

2.2.2 载药量和包封率测定 采用有机溶剂破坏法, 测定 SLN/DOX 及 pSLN/DOX 的载药量和包封率。取 SLN/DOX 及 pSLN/DOX 10 μL, 加 100 倍的 DMSO, 80 ℃水浴 10 min 加热破坏, 冷却至室温, 20 000 r·min⁻¹高速离心 15 min。荧光分光光度计(Ex=505 nm, Em=565 nm, Slit=5 nm)检测上清液的荧光值, 根据标准曲线计算样品的药物浓度。包封率(entrapment efficiency, EE)和载药量(drug loading, DL)分别按公式(1)和(2)计算:

$$DL\% = M_e / (M_a + M_c) \times 100\% \quad (1)$$

$$EE\% = M_e / M_a \times 100\% \quad (2)$$

式中 M_e 为包封的药物含量; M_a 为总投药量; M_c 为载体含量。

2.2.3 表面元素分析 采用 X 射线光电子能谱分析(X-ray photoelectron spectroscopy, XPS)来表征 PEG 修饰前后固体脂质纳米粒的表面元素变化。将 SLN 及 pSLN 的冻干样品压实(厚度≥50 μm), 用双面胶固定于样品铜台, 采用 X 射线能量色散谱仪定量分析样品中各元素含量。

2.2.4 接触角测定 制备 SLN 及 pSLN 溶液(10 mg·mL⁻¹), 将其均匀涂布在载玻片上, 自然晾

干。采用视频接触角测定仪测定 PEG 修饰前后样品的接触角变化。

2.2.5 稳定性评价 按中国药典 2010 年版规定的方法配置模拟胃液(pH=2)、肠液(pH=6.8)及包含 20%胎牛血清的模拟血液(pH=7.4)^[14]。取 SLN 及 pSLN 浓缩溶液适量, 将其重新分散在 20 mL 的模拟胃液、肠液及血液中, 使纳米粒的终浓度为 1 mg·mL⁻¹。然后将上述溶液转移到释放管中, 37 ℃、65 r·min⁻¹恒温振荡, 在设定的时间点(0, 2, 4, 8, 12, 24, 48 h)取样 1 mL, 用 3 000 HS 粒度及表面电位分析仪测定粒径变化。

2.3 体内组织分布研究

2.3.1 小鼠体内组织分布 取健康小鼠 30 只, 随机分成 2 组, 实验前禁食 12 h, 分别口服相同荧光强度的 SLN/DiR 和 pSLN-10%/DiR 溶液, 于给药后 3, 6, 12, 24, 48 h 脱臼处死, 取小鼠心、肝、脾、肺、肾各组织样品, 用生理盐水洗净表面, 采用 1% 给药量的 SLN/DiR 作为标准参照, 置于活体荧光成像仪下拍照^[15](滤光片为 NIR, 波长为 580~700 nm, 每 10 nm 自动采集信息, 曝光时间为 0.5 s)。由组织的荧光强度与 1% 给药剂量荧光强度及组织质量的比值得到 DiR 标记脂质纳米载体在不同组织内的半定量分布结果。

2.3.2 荷瘤裸鼠体内分布 以荷 BEL-7402 肿瘤裸鼠为模型动物, 考察脂质纳米载体在肿瘤组织的分布情况。模型动物建立方法如下: 无菌条件下, 取对数生长期的 BEL-7402 细胞(融合度约 80%), 胰酶消化制备成单细胞悬液后 1 200 r·min⁻¹低温离心 5 min。将细胞团重新分散于不含血清的 DMEM 培养液, 洗涤并在同样条件下离心 5 min。将洗涤后的细胞团重新分散于不含血清的 DMEM 培养液, 计数并稀释至所需细胞浓度。每只裸鼠按每 100 μL 5×10⁶ 个细胞将细胞悬液皮下注射至 BALB/C+nu/F1 裸鼠左上肢腋下, 待肿瘤生长至适宜大小后灌胃给予 500 μL 载脂质染料 DiR 的 SLN 及 pSLN 溶液(SLN/DiR 和 pSLN/DiR)。分别于 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 h 用乙醚将裸鼠麻醉, 用小动物活体成像仪观察载 DiR 脂质纳米载体的体内分布情况, 并拍照。72 h 后使用颈椎脱臼法或过量乙醚处死裸鼠, 取其脏器用 PBS 清洗后置于活体成像仪下观察并拍照。

2.4 模型动物的药效学研究

按“2.1”项下方法, 采用溶剂扩散法制备

DOX，投入量为 5%的载 DOX 固体脂质纳米粒(SLN/DOX)及载 DOX 的 PEG 修饰固体脂质纳米粒(pSLN/DOX)。取荷 BEL-7402 裸鼠共 18 只，随机分成 6 组，每组 3 只。当裸鼠的实体瘤大小约为 100 mm³ 的时开始给药。第 1 组尾静脉注射 DOX·HCl，注射总剂量 7 mg(DOX)·kg⁻¹作为阳性对照；第 2 组尾静脉注射 5%葡萄糖溶液作为阴性对照；第 3 组口服 SLN/DOX 纳米粒溶液，口服总剂量为 7 mg(DOX)·kg⁻¹；第 4 组口服 pSLN/DOX 纳米粒溶液，口服总剂量为 7 mg(DOX)·kg⁻¹；第 5 组口服 pSLN/DOX 纳米粒溶液，口服剂量为 14 mg(DOX)·kg⁻¹；第 6 组口服 pSLN/DOX 纳米粒溶液，口服剂量为 21 mg(DOX)·kg⁻¹。仅第 1 天给药 1 次，然后每 3 d 用游标卡尺动态测量各肿瘤体积，并记录荷瘤鼠体质量。给药 27 d 后，处死裸鼠，剖取肿瘤称重。按式(3)和(4)计算各组的肿瘤体积(*V*)及抑瘤率(inhibitor rate of tumor volumn, IRT)。计算疗效评价标准：肿瘤抑制率>60%为有效。

$$V=a \times b^2 / 2 \quad (3)$$

$$\text{IRT}(\%)=(W_c-W_t)/W_c \times 100\% \quad (4)$$

式中 *a* 为肿瘤长径(mm)；*b* 为肿瘤短径(mm)；*W_t* 为治疗组的平均瘤重(g)；*W_c* 为阴性对照组的平均瘤重(g)。

3 结果与讨论

3.1 SLN 及 pSLN 的理化性质考察

3.1.1 SLN 及 pSLN 的粒径、多分散系数及表面电位 经 PEG 修饰后，纳米粒的粒径由 260 nm 降低到 210 nm 左右，这可能是由于 PEG 修饰改变了纳米粒的内部密度，使其空间结构更加复杂。Zeta 电位略有变化，但还在-20 mV 左右，体系相对稳定，结果见表 1。结果表明，PEG 修饰能在一定程度上改变粒子的表面性质，而这些性质的改变都有利于延长粒子的在体循环^[16]。

表 1 SLN 及 pSLN 的粒径、Zeta 电位和多分散系数(*n*=3)
Tab. 1 Diameters, Zeta potentials and polydispersion coefficients of SLN and pSLN(*n*=3)

载体	粒径/nm	电位/mV	多分散系数	包封率/载药量/%	%
SLN	264.43±1.86	-22.97±3.60	0.41±0.02		
pSLN	212.93±0.51	-21.63±0.80	0.29±0.02		
SLN/DOX	194.73±13.35	-17.80±3.10	0.58±0.08	76.83	3.66
pSLN/DOX	152.67±8.61	-14.90±0.40	0.26±0.02	74.17	3.53

3.1.2 SLN 及 pSLN 的表面元素分析 载体经过 PEG 修饰之后，氧元素的比例随之增加，结果见图 1。单纯 SLN 中，粒子表面氧元素的含量为 9.04%(*A_t*%)，PEG 修饰之后，氧元素的含量为 10.68%(*A_t*%)。这可能是由于 PEG 中，氧元素的比例要比单甘脂中氧元素的比例高。因此，经过 PEG 修饰之后，纳米粒表面的氧元素比例也有相应的提高。表面氧元素比例的变化说明了 PEG 链已分布到纳米粒的表面，达到了表面修饰的目的。

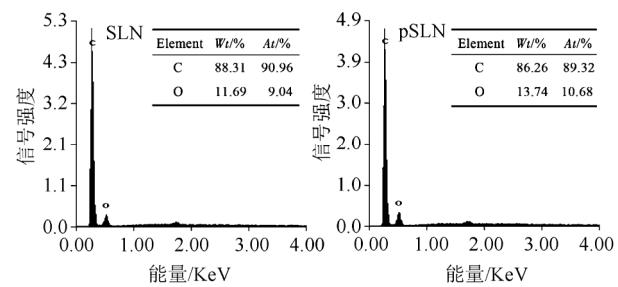


图 1 SLN 及 pSLN 纳米粒能量/KeV 色散谱

Fig. 1 Energy spectrum images of SLN and pSLN

3.1.3 SLN 及 pSLN 的接触角测定 经过 PEG 修饰后，粒子的接触角由 45.3° 降低到 38.7°，结果见图 2。接触角越小，说明液体对表面的润湿性越好，即 PEG 的修饰增加了粒子的亲水性。

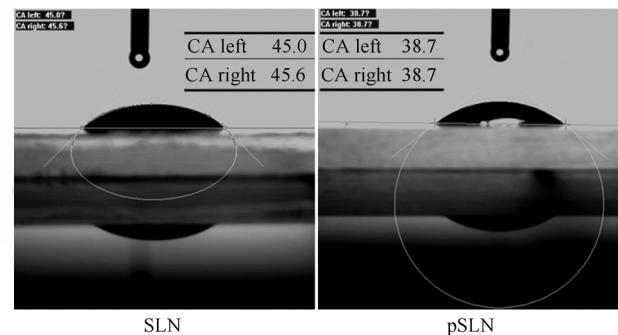


图 2 SLN 及 pSLN 的视频光学接触角测定

Fig. 2 Optical contact angle measuring of SLN and pSLN

3.1.4 SLN 及 pSLN 的稳定性 粒子与模拟液体孵育一定时间之后的粒径变化，未经过修饰的固体脂质纳米粒受模拟胃肠液及血液的影响，粒径发生了较大的变化。其中，受胃液的影响最大，在 48 h 时，粒径由原先的 200 nm 左右增加至 20 μm 左右，粒径增加了约 100 倍。然而，经过 PEG 修饰后的 SLN，在模拟胃液中粒径并未发生显著的变化，仅仅增加至 300 nm 左右。结果见图 3。这些都说明 PEG 能防止粒子的聚集，有效的增加纳米粒子在体内的稳定性。

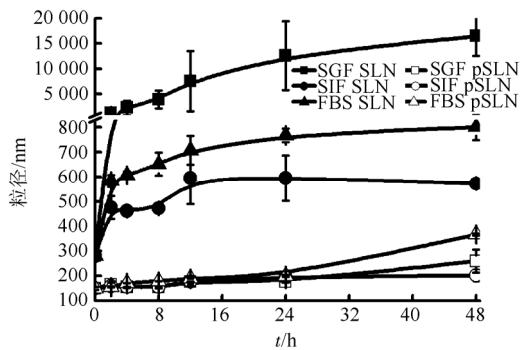


图 3 不同时间点 SLN 和 pSLN 与胃肠液及血液成分相互作用后的粒径变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

SGF—模拟胃液; SIF—模拟肠液; FBS—胎牛血清。

Fig. 3 Interaction of SLN and pSLN with gastrointestinal fluids and blood compounds after incubation for different time intervals ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

SGF—simulated gastric fluid; SIF—simulated intestinal fluid; FBS—fetal bovine serum.

3.2 体内组织分布

3.2.1 小鼠组织分布 由图 4 可见, 纳米粒在体内呈经-时分布, 相对于 SLN, pSLN 在组织中的滞留时间明显延长, 这可能是纳米粒表面覆盖有 PEG 链, 血液清除慢, 具有了明显的长循环和缓释作用,

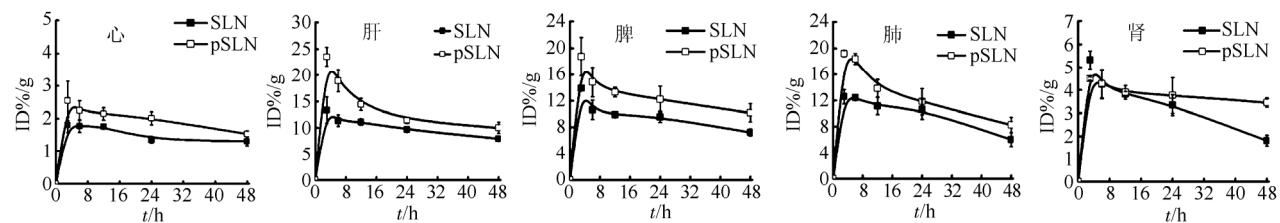


图 4 DiR 标记 SLN 和 pSLN 在不同组织内的半定量分布 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

ID% / g—组织荧光强度与 1% 给药剂量荧光强度及组织重量的比值。

Fig. 4 Semi-quantization of DiR labeled SLN and pSLN distribution in different tissues ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

ID% / g—the value of fluorescent intensity of tissues was divided by the value of the standard point and tissue weight.

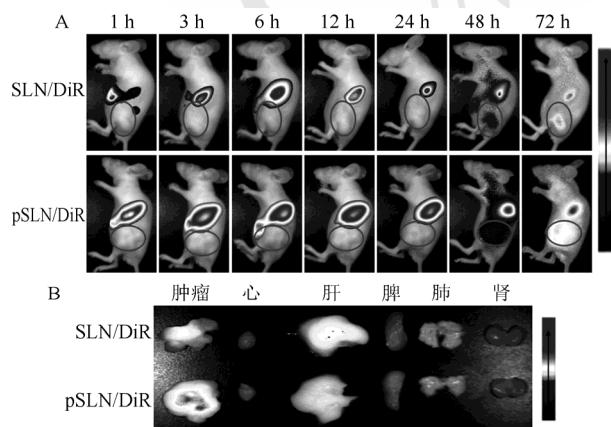


图 5 荷瘤裸鼠荧光成像

A—体内分布; B—离体组织。

Fig. 5 Fluorescence images of tumor bearing nude mice
A—in vivo bio-distribution; B—in vitro tissues.

此结果与笔者报道的大鼠体内药动学结果相似^[17]。给药 3 h 后在各组织分布总量逐渐下降, 可能是部分纳米粒在体内被酶、酸等降解, 纳米粒的粒径大小等性质发生变化, 有关体内降解的过程有待进一步研究。SLN 在肝、脾和肺分布较多, 这与网状内皮系统的吞噬或纳米粒对肝、脾器官具有趋向性有关。心和肾的分布较少, 从而推断纳米粒载体可以降低某些药物对心脏的不良反应。

3.2.2 荷瘤裸鼠体内分布 荷 BEL-7402 裸鼠口服给予 500 μ L 载 DiR 纳米粒(SLN/DiR 和 pSLN/DiR)后, 用小动物活体成像仪观察不同时间点的荧光照片(图片经过光谱分离处理, 红圈标示区域为肿瘤部位), 见图 5。从图中可以看到, 纳米粒能较快的分布到肝脏与脾脏, 肾与心的药物分布量很低, 此结果与正常小鼠的组织分布相似。值得注意的是, pSLN 与 SLN 相比, 在肿瘤部位的分布量得到提高, 且随着时间的延长, 在肿瘤部位的蓄积逐渐增多。表明 pSLN 具有较好的肿瘤靶向性, 提高抗肿瘤作用, 其原因与纳米粒在血浆中的长循环以及纳米粒在固体肿瘤中的 EPR 有关^[18]。

3.3 模型动物的药效学研究

本研究以荷 BEL-7402 肿瘤裸鼠为肿瘤模型动物, 将市售盐酸阿霉素注射制剂通过尾静脉注射入荷瘤裸鼠体内, 而载药脂质纳米粒溶液通过口服灌胃的方式进入荷瘤裸鼠体内, 考察 PEG 修饰对固体脂质纳米粒抗肿瘤疗效的影响。研究结果显示, 相对于 SLN/DOX, PEG 修饰提高了抗肿瘤药效; 而相对于市售盐酸阿霉素注射制剂, pSLN/DOX 以口服方式给药, 在抑瘤率有效的前提下, 提高了顺应性及模型动物对阿霉素的耐受性, 进一步降低了药物的不良反应。

肿瘤体积的经时变化见图 6A, 同样以 7 mg(DOX)·kg⁻¹ 给药后, 与市售多柔比星 89.80%

的抑瘤率相比, SLN/DOX 和 pSLN/DOX 的抑瘤率分别为 27.93% 和 77.80%。当以 $21 \text{ mg(DOX)·kg}^{-1}$ 给药后, pSLN/DOX 的抑瘤率为 83.74%。体内组织分布显示 PEG 修饰给药系统的体内滞留时间加长, EPR 作用增强可能带来更优的治疗效果^[19]。但是低浓度组 pSLN/DOX 在体内药效实验中的优势并未显现, 这可能是由于药物释放缓慢造成的, 而抗肿瘤药效的产生需要肿瘤部位有瞬时局部的药物脉冲浓度。

另一方面, 安全性也是肿瘤治疗评价的重要指标, 为此考察了裸鼠的体质量变化, 结果见图 6B。市售多柔比星以 $7 \text{ mg(DOX)·kg}^{-1}$ 给药时, 模型动物的前期体质量持续下降, 提示其具有较大毒性; 而 pSLN/DOX 即使以 $21 \text{ mg(DOX)·kg}^{-1}$ 给药, 动物体质量仍没有表现出明显下降, 与葡萄糖注射组相近, 差异无统计学意义。由于 pSLN 在心脏分布较少, 阿霉素经其包载后还可减轻心脏方面的不良反应。由此可见, pSLN/DOX 给药系统在提高肿瘤治疗的安全性方面具有优势。

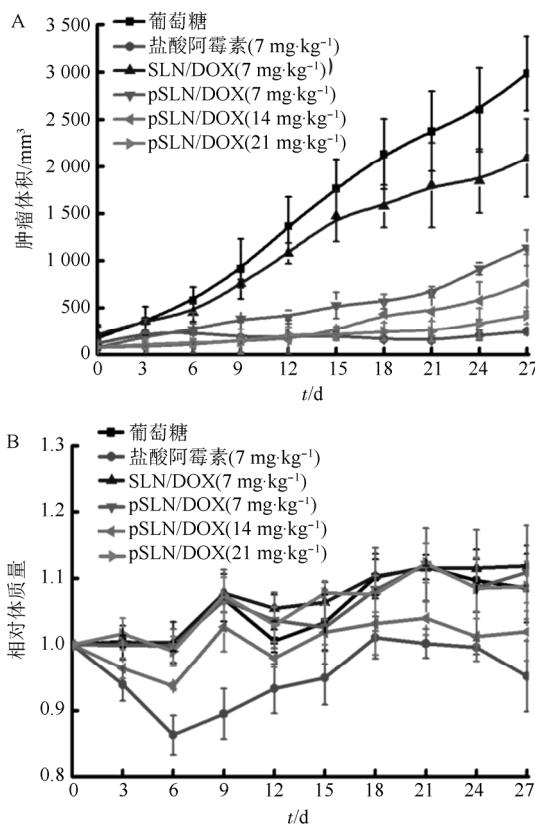


图 6 不同给药组的体内抗肿瘤疗效($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

A—肿瘤体积; B—相对体质量。

Fig. 6 *In vivo* anti-tumor activities of different groups ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

A—mice tumor volume; B—mice relative body weight.

4 结论

与未经修饰的纳米粒比较, 经 $\text{PEG}_{2000}\text{-SA}$ 修饰的脂质纳米载体, 由于 PEG 在纳米粒表面形成亲水链段, 降低了血液中调理素在纳米粒表面的吸附, 使单核吞噬系统对纳米粒的吞噬能力降低, 载体在血液中的消除减慢, 从而延长了药物在循环系统的滞留时间。此外, 对于某些需静脉给药但不良反应大的药物, 通过 pSLN 包载之后口服给药, 在维持药效的同时提高了患者的顺应性及药物的安全性。总体上说, 采用溶剂扩散法制备 SLN, 以 $\text{PEG}_{2000}\text{-SA}$ 修饰以提供亲水基团, 所得到的脂质纳米载体粒度分布均匀, 表面亲水性及体内稳定性增加。体内动物实验显示 pSLN 组织滞留时间可显著延长, 且在肿瘤组织有聚集; pSLN 给药系统可使所包载药物的不良反应降低, 给药系统的安全性得到提高。因此, pSLN 作为一种潜在的口服药物载体具有广阔的应用前景。

REFERENCES

- [1] CHALIKWAR S S, BELGAMWAR V S, TALELE V R, et al. Formulation and evaluation of Nimodipine-loaded solid lipid nanoparticles delivered via lymphatic transport system [J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2012, 97: 109-116.
- [2] MUCHOW M, MAINCENT P, MULLER R H. Lipid nanoparticles with a solid matrix (SLN®, NLC®, LDC®) for oral drug delivery [J]. Drug Dev Ind Pharm, 2008, 34(12): 1394-1405.
- [3] ZHENG Y, ZHENG S S, WANG Z S. Enhancement of oral bioavailability of curcumin loaded PLGA nanoparticles [J]. Chin J Mod Appl pharm(中国现代应用药学), 2014, 31(6): 717-721.
- [4] MATSUMURA Y, MAEDA H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs [J]. Cancer Res, 1986, 46(12 Pt 1): 6387-6392.
- [5] ZHANG Y, KOHLER N, ZHANG M. Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake [J]. Biomaterials, 2002, 23(7): 1553-1561.
- [6] GESSNER A, WAICZ R, LIESKE A, et al. Nanoparticles with decreasing surface hydrophobicities: influence on plasma protein adsorption [J]. Int J Pharm, 2000, 196(2): 245-249.
- [7] ALLEN T M, HANSEN C. Pharmacokinetics of stealth versus conventional liposomes: effect of dose [J]. Biochim Biophys Acta, 1991, 1068(2): 133-141.
- [8] GABIZON A H, SHMEED A, BARENHOLZ Y. Pharmacokinetics of pegylated liposomal doxorubicin [J]. Clin Pharmacokinet, 2003, 42(5): 419-436.
- [9] KOUCHEKZADEH H, SHOJAOSADATI S A, MAGHSOUDI A, et al. Optimization of PEGylation conditions for BSA nanoparticles using response surface methodology [J]. AAPS Pharm Sci Tech, 2010, 11(3): 1206-1211.
- [10] USKOKOVIĆ V, LEE P P, WALSH L A, et al. PEGylated silicon nanowire coated silica microparticles for drug delivery

- across intestinal epithelium [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(5): 1663-1672.
- [11] ZHANG Z S, TAN, FENG S S. Vitamin E TPGS as a molecular biomaterial for drug delivery [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(19): 4889-4906.
- [12] FISHBURN C S. The pharmacology of PEGylation: Balancing PD with PK to generate novel therapeutics [J]. *J Pharm Sci*, 2008, 97(10): 4167-4183.
- [13] BOCCA C, CAPUTOB O, CAVALLI R, et al. Phagocytic uptake of fluorescent stealth and non-stealth solid lipid nanoparticles [J]. *Int J Pharm*, 1998, 175(2): 185-193.
- [14] TOBÍO M, SÁNCHEZ A, VILA A, et al. The role of PEG on the stability on digestive fluids and *in vivo* fate of PEG-PLA nanoparticals following oral administration [J]. *Colloid Surf B: Biointerfaces*, 2000, 18(3/4): 315-323.
- [15] TEXIER I, GOUTAYER M, DA SILVA A,, et al. Cyanine-loaded lipid nanoparticles for improved *in vivo* fluorescence imaging [J]. *J Biomed Opt*, 2009, 14(5): 054005.
- [16] ZHANG Z Q, QIN B, LI Z, et al. Preparation of paclitaxel liposomes modified with mPEG-DSPE and its pharmacokinetics in rats [J]. *Chin Pharm J(中国药学杂志)*, 2008, 43(3): 199-202.
- [17] YUAN H, CHEN C Y, CHAI G H, et al. Improved transport and absorption through gastrointestinal tract by PEGylated solid lipid nanoparticles [J]. *Mol Pharm*, 2013, 10(5): 1865-1873.
- [18] WANG H X, WANG H Y, ZHANG M, et al. Poloxamer188-PLGA nanodrug delivery system for overcoming drug resistant tumor [J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2014, 31(10): 1167-1170.
- [19] XIN H, CHEN L, GU J, et al. Enhanced anti-glioblastoma efficacy by PTX-loaded PEGylated poly (-caprolactone) nanoparticles: *In vitro* and *in vivo* evaluation [J]. *Int J pharm*, 2010, 402(1/2): 238-247.

收稿日期: 2015-11-08

HPLC 同时测定大血藤中绿原酸、咖啡酸和香草酸的含量

荆彦民¹, 马瑞丽^{1,2*}(¹定西市农业科学研究院, 甘肃 定西 743000; ²江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013)

摘要: 目的 建立同时测定大血藤各部位绿原酸、咖啡酸和香草酸含量的高效液相色谱方法。方法 色谱柱为 Kromasil C₁₈柱(4.6 mm×250 mm, 4.5 μm), 流动相: A 为 1%冰醋酸, B 为甲醇, 以 A : B=68 : 32 等度洗脱; 柱温: 30 ℃; 流速: 1 mL·min⁻¹; 检测波长: 327 nm; 进样量: 20 μL。结果 在测定样品中, 绿原酸和咖啡酸在乙酸乙酯部位含量最高, 分别为 4.52%, 0.11%, 香草酸在二氯甲烷部位含量最高, 为 5.8%。结论 该方法简便、准确、重复性高, 可用于大血藤中绿原酸、咖啡酸、香草酸含量的测定。

关键词: 高效液相色谱法; 大血藤; 绿原酸; 咖啡酸; 香草酸

中图分类号: R917.101 **文献标志码:** B **文章编号:** 1007-7693(2016)05-0592-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.05.016

Simultaneous Determination of Chlorogenic Acid, Caffeic Acid and Vanillic Acid in Sargentodoxae Caulis by HPLC

JING Yanmin¹, MA Ruili^{1,2*}(¹Dingxi Academy of Agricultural Sciences, Dingxi 743000, China; ²School of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop an HPLC method for simultaneous determination of chlorogenic acid, caffeic acid and vanillic acid in each fraction of Sargentodoxae Caulis. **METHODS** The analysis was carried on a column of Kromasil C₁₈(4.6 mm×250 mm, 4.5 μm). Isocratic elution, mobile phase consisted of solvent A (1%, solution of HAc in water) and solvent B (methanol) at the ratio of 68 : 32, the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, the injection volume was 20 μL, the detection wavelength was 327 nm, the column temperature was at 30 ℃. **RESULTS** Ethyl acetate fraction had the highest concentration of chlorogenic acid (4.52%) and caffeic acid (0.11%) and dichloromethane fraction possessed the highest concentration of vanillic acid of 5.8%. **CONCLUSION** This method is simple, accurate, rapid and suitable for the usual quality control of Sargentodoxae Caulis.

KEY WORDS: HPLC; Sargentodoxae Caulis; chlorogenic acid; caffeic acid; vanillic acid

大血藤为木通科植物大血藤 *Sargentodoxa cuneata* (Oliv.) Rehd. et Wils. 的藤茎, 别名血藤、红皮藤、大活血等, 主产于安徽、浙江、江西、湖北、

广西等地, 具有清热解毒、理气活血、祛风杀虫、消肿散结、止痛、通经、败毒等功效^[1]。孙惠芳等^[2]研究表明大血藤具有较强的抗氧化、抗菌活

基金项目: 甘肃省定西市道地中药材产业化推广及惠民示范工程(S2013GMG100004)

作者简介: 荆彦民, 男, 高级农艺师 Tel: 13993248301 E-mail: jym.86@163.com *通信作者: 马瑞丽, 女, 硕士 Tel: 18209326620 E-mail: maruili@live.cn