文章编号:1000-5404(2013)04-0325-03

论著

吴茱萸碱纳米复合物的药代动力学和生物利用度研究

柳 珊[1],杨 林[2],廖 红[1],赵德璋[1],张景勋[1] (400016 重庆,重庆医科大学药物高校工程研究中心[1];401121 重庆,重庆市食品药品检验所[2])

[摘要] **目的** 制备吴茱萸碱纳米复合物,并研究其在大鼠体内的药代动力学和生物利用度。**方法** 采用溶剂挥发法制备吴茱萸碱纳米复合物,考察其载药量、粒径和Zeta电位。大鼠单剂量灌胃给予吴茱萸碱纳米复合物和吴茱萸碱原料药,眼底采血,采用液液萃取法处理血浆样品,以和厚朴酚为内标物质,RP-HPLC测定血浆样品中吴茱萸碱的含量,用DAS软件分析药动学数据。**结果** 制备所得吴茱萸碱纳米复合物的载药量、粒径和Zeta电位分别为(24.26±0.97)%、248.8 nm、-28.61 mV。吴茱萸碱和吴茱萸碱纳米复合物在大鼠体内的药动学行为均符合一级消除动力学二室开放模型,吴茱萸碱与磷脂形成的纳米复合物的大鼠口服生物利用度是原料药的2.16倍。**结论** 成功制备了吴茱萸碱纳米复合物,建立了一种检测吴茱萸碱血药浓度的简单、可行的方法,吴茱萸碱纳米复合物明显提高了吴茱萸碱的口服生物利用度。

[关键词] 吴茱萸碱;纳米复合物;药代动力学;生物利用度
[中图法分类号] R282.71;R944.9;R969.1 [文献标志码] A

Pharmacokinetics and bioavailability of evodiamine nanocomplex

Liu Shan[1], Yang Lin[2], Liao Hong[1], Zhao Dezhang[1], Zhang Jingqing[1] ([1]Medicine Engineering Research Center, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Chongqing Institute for Food and Drug Control, Chongqing, 401121, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the pharmacokinetic behavior and bioavailability of evodiamine nanocomplex in rats. **Methods** Evodiamine nanocomplex was prepared by solvent evaporation method, and its loading efficiency, particle size and zeta potential were investigated by RP-HPLC and dynamic laser light scattering. Rats were administrated with (i. g.) evodiamine solution and evodiamine nanocomplex (500 mg/kg), respectively. Blood samples were collected from eye socket, and evodiamine in blood plasma was extracted by liquid-liquid extraction and determined by RP-HPLC using honokiol as the internal standard (IS). Compartmental pharmacokinetics was analyzed by DAS software. **Results** The loading efficiency, particle size and zeta potential of evodiamine nanocomplex were (24.26±0.97)%, 248.8 nm and -28.61 mV, respectively. Mean plasma concentration-time curve of evodiamine after oral administration of evodiamine nanocomplex and evodiamine solution in rats were both in accordance with open two-compartment mode. The bioavailability of evodiamine after oral administration of evodiamine nanocomplex was 2.16 times higher than that of evodiamine solution. **Conclusion** Evodiamine nanocomplex is successfully prepared by solvent evaporation method. The developed HPLC method is suitable for the determination of evodiamine in rat blood plasma. The bioavailability of evodiamine in rats increases remarkably after oral administration of evodiamine nanocomplex as compared with that of evodiamine solution.

[**Key words**] evodiamine; nanocomplex; pharmacokinetics; bioavailability

Supported by the Chongqing Natural Science Foundation (CSTC2012JJB10027). Corresponding author: Zhang Jingqing, E-mail: zjqrae01@163.com

吴茱萸碱(evodiamine, EDA)是从芸香科植物吴茱萸、石虎或疏毛吴茱萸的干燥近成熟果实中提取的一种生物碱[1]。国内外大量研究表明吴茱萸碱具有扩张血管、抗炎、镇痛、减肥、调节体温、抗肿瘤以及抑制癌细胞转移等药理活性,具有广阔的开发前景,但EDA的口服吸收不完全,生物利用度低[2],Shyr等[3]报道其大鼠口服生物利用度仅0.1%。国外研究报道中药活性成分与磷脂形成复合物后其口服生物利用度至少可以提高2倍[4]。本实验在制备EDA纳米复合物(evodiamine nanocomplex,ENC)的基础上,考察了其在大鼠体内的药代动力学,并与EDA原料药作比较。

[基金项目] 重庆市自然科学基金(CSTC2012JJB10027)
[通信作者] 张景勋, E-mail: zjqrae01@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20121128.0910.001.html(2012-11-28)

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器 UV-2501PC型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司),分析电子天秤(瑞士Mettler Toledo仪器公司,XP204,220 g/0.1 mg),Nano ZS马尔文粒径测定仪(英国马尔文公司),85-2型恒温磁力搅拌器(上海司乐仪器有限公司),RE-52AA型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂),DZF-1型真空干燥箱(上海跃进医疗器械厂),TGL-16B台式高速离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.1.2 试药 EDA(纯度>99%,武汉远城科技发展有限公司),和厚朴酚(纯度>99%,西安小草植物科技有限公司),蛋黄卵磷脂(BR,国药集团化学试剂有限公司,批号:20091110),羧甲基纤维素钠(上海新星化学试剂公司,批号:080410),甲醇(色谱纯,美国新天地科技有限公司),其余试剂为分析纯或色谱纯。

1.1.3 实验动物 清洁级SD大鼠[重庆医科大学实验动物中心提供,许可证号:SCXK-(渝)2009-0001],雄性,体质量(250±10)g,实验前未使用过其他药物。

1.2 方法

1.2.1 ENC的制备[5-8] 称取处方量的磷脂和EDA(分子比为2:1)于100 mL磨口圆底烧瓶中,加入四氢呋喃(使EDA终浓度为2.5 mg/mL),60 ℃水浴搅拌3 h后减压回收有机溶剂,残余物用氯仿溶解并过滤,沉淀用少量氯仿洗涤,洗涤液与上清液合并后减压回收有机溶剂,所得固体真空干燥后即得ENC。

1.2.2 ENC载药量的确定 平行称取3份干燥后的ENC 10.50 mg,无水乙醇溶解并定容于10 mL棕色容量瓶中,稀释20倍后进样10 μL测定其峰面积计算载药量。

1.2.3 ENC的粒径分布和Zeta电位的测定 取ENC 20 mg混悬于3 mL双蒸水中,过0.22 μm微孔滤膜后双蒸水稀释1倍,用马尔文粒径测定仪测定其粒径和电位。

1.2.4 样品中药物浓度的测定 色谱条件为:Lichrospher C18色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);柱温为35 ℃;流动相为甲醇:水=75:25(体积比),流速为1 mL/min;紫外检测波长为225 nm,以和厚朴酚为内标,进样量为40 μL。分别配制浓度为200 μg/mL的EDA工作液和100 μg/mL的和厚朴酚工作液(内标工作液)。血浆样品处理方法[9]为:精密量取血浆样品150 μL,加入内标工作液(20 μg/mL)10 μL,涡旋30 s,加入氨水75 μL,涡旋30 s,加入乙醚750 μL,涡旋3 min,取上清液600 μL至离心管中,40 ℃水浴挥干乙醚后,加入甲醇100 μL涡旋1 min,离心半径10 cm,12 000 r/min,离心10 min,取上清液40 μL进样检测。分别精密量取空白血浆150 μL,精密加入内标工作液(20 μg/mL)10 μL涡旋30 s后,再加入40 μL不同浓度的EDA工作液稀释液,得到EDA浓度分别为0.01、0.05、0.075、0.1、0.5、1.5、2.0 μg/mL的血浆溶液(各样品中内标的浓度为0.1 μg/mL),依照血浆样品处理方法处理后,进样测定各样品中EDA的峰面积Sd和内标的峰面积Sr,以Sd与Sr的比值对EDA的浓度进行线性回归,建立回归方程。取前述配制的EDA浓度分别为0.05、0.5、2.0 μg/mL的血浆溶液,考察1 d内连续进样检测5次的日内精密度(n=3),及连续5 d进样检测的日间精密度(n=3)。取前述配制的EDA浓度分别为0.05、0.5、2.0 μg/mL的血浆溶液(各样品中内标的浓度为0.1 μg/mL),按照前述血浆样品处理方法处理后,进样测定EDA和内标的峰面积Sd、Sr,采用流动相配制与血浆样品等浓度的EDA和内标溶液,进样检测EDA和内标的峰面积Sd1、Sr1,Sd/Sd1、Sr/Sr1即分别为EDA和内标的绝对回收率(n=3)。在空白血浆中加入不同浓度的EDA工作液,得到EDA浓度分别为0.05、0.5、2.0 μg/mL的血浆溶液,按照前述血浆样品处理方法处理后,进样测定EDA和内标的峰面积,将两者峰面积比代入回归方程中计算高、中、低3个浓度血浆样品溶液中EDA的浓度,以计算所得量和加入量之比计算方法回收率(n=3)。

1.2.5 ENC的体内药动学和生物利用度研究 采用简单随机化法将12只SD大鼠分为2组:1组给予EDA原料药(500 mg/kg,灌胃),另一组给予ENC(相当于EDA 500 mg/kg,灌胃)。给药前禁食12 h,不禁水,分别于给药后10、20、40 min,1、2、4、6、8、10、12、24 h乙醚麻醉大鼠后采用眼底取血的方法采集血样0.5 mL,至肝素浸润过的离心管中,离心半径10 cm,3 000 r/min离心10 min后分离上层血浆,按血浆样品处理后进样检测,代入回归方程,计算不同时间点的血药浓度,进行ENC大鼠体内药动学研究。

1.3 数据分析

采用DAS软件(2.1.1版)对药动学数据进行一级消除动力学一室模型、一级消除动力学二室模型拟合,以赤池信息恒准则(AIC)和权重残差平方和R_e为指标评价拟合效果,选取AIC和R_e较小的模型为最优拟合模型。

2 结果

2.1 ENC的制备和性质考察

测得ENC的粒径为248.8 nm,多分散指数(PDI)为0.260,Zeta电位为-28.61 mV。结果表明,使用该工艺制备的ENC粒径较小,粒度分布均匀。制备3个批次ENC的载药率分别为24.53%、23.19%、25.07%,载药率为(24.26±0.97)%,表明所制备的ENC可稳定包载EDA。

2.2 样品中药物浓度的测定

色谱条件下,EDA与和厚朴酚的保留时间分别为5.7、8.2 min,峰形良好且血浆内源性物质不干扰测定。以血浆中EDA和内标的峰面积比(Y)对EDA的浓度(X)进行线性回归,得回归方程如下:Y=1.130 6X+0.070 4(r=0.999 8),EDA在0.01~2.0 μg/mL浓度范围内与EDA和内标的峰面积比线性关系良好。高、中、低3个浓度的血浆样品的溶液的日内精密度RSD分别为3.26%、4.21%、1.89%,日间精密度RSD分别为3.80%、4.14%、2.70%,日内和日间精密度均良好,符合方法学要求。高、中、低3个浓度的溶液中EDA的绝对回收率分别为107.27%、115.17%、98.51%,内标的绝对回收率为104.03%、106.20%、103.30%。结果显示3个浓度中EDA和内标的绝对回收率比较接近,提示和厚朴酚对EDA的血样处理没有干扰,且两者在血浆和萃取剂乙醚中的分配行为相似,说明选用和厚朴酚作为内标检测EDA合适。高、中、低3个浓度的血浆样品的方法回收率分别为101.44%、99.82%、96.53%,回收率较高,说明采用该方法处理EDA血浆样品很合适。

2.3 ENC的体内药动学和生物利用度研究

EDA和ENC在大鼠体内的药动学行为均符合一级消除动

力学二室开放模型,拟合所得一级消除动力学参数见表 1,房室模型和非房室模型(统计矩)的主要药动学参数见表 2、3。采用房室模型和非房室模型分析药动学数据所得结果基本一致。药动学参数显示,大鼠单剂量灌胃给予 EDA 的达峰时间(t_{max})比 ENC 小,吸收快,分布和消除都较快,而 ENC 的达峰时间(t_{max})、峰浓度(C_{max})和消除半衰期均与原料药相比均有所增加,比较 ENC 和 EDA 的 $AUC_{(0\sim t)}$,发现 ENC 的生物利用度是原料药的 2.16 倍(非房室模型分析)或 2.44 倍(房室模型分析),结果说明通过制备 ENC,提高了 EDA 的大鼠口服生物利用度。

表 1 大鼠给予 EDA 和 ENC 后的一级消除动力学参数

制剂	A	α (h^{-1})	B	β (h^{-1})	K (h^{-1})	Ka (h^{-1})
EDA	9 300.259	0.458	9 033.988	0.407	0.084	31.411
ENC	6 562.131	0.416	3 304.224	0.223	3 293.716	0.625

3 讨论

本研究采用溶剂挥发法制备 ENC,为了提高 ENC 的复合率,我们将磷脂与 EDA 的投药分子比定为 2∶1,制备的 ENC 的载药量约为 25%。粒径测定结果显示 ENC 的粒径较小,有利于其在胃肠道的吸收转运,且绝对值较高的 Zeta 电位也提示其稳定性较高。

目前检测 EDA 体内药动学的方法有直接沉淀蛋白 HPLC 法[3]、液液萃取 LC-MS-MS 法[9]、固相萃取 LC-ESI-MS 法[10]等。直接沉淀蛋白法不适用于血浆中较低浓度药物的检测,且有时不能完全消除血浆内源性杂质;固相萃取法高效、可靠,适合低浓度样品的富集,但需要专门的仪器,成本较高;液液萃取法在消除血浆内源性杂质干扰的同时,能富集血样中的药物,适合血浆样品中低浓度药物的测定。LC-MS 或 LC-MS-MS 检测法成本高,本研究选择液液萃取结合 HPLC 法测定 EDA 的血浆浓度,方法简单、准确性高,灵敏度好,血浆内源性杂质无干扰。我们在实验中选用和厚朴酚作为内标检测 EDA 的血药浓度,回收率实验表明该内标的选择是合适的。

本研究结果表明,EDA 与磷脂复合后其大鼠口服生物利用度提高了 2.16 倍,原因可能是两亲性的磷脂分子改善了 EDA 在消化液中的分散度和溶解度,增强了 EDA 从消化液向肠上皮细胞的转运,并且肠上皮细胞的细胞膜中含有大量的磷脂双分子层,ENC 中的磷脂很可能与细胞膜中的磷脂双分子层嵌合,同时携带 EDA 穿过肠上皮细胞膜,从而提高 EDA 的胃肠道吸收,Kidd 等[11]对以上理论假设做了详细阐述,并且该假设也得到了试验证实[6,12]。另外,Peng 等[13]报道丹酚酸纳米复合物通过提高丹酚酸胃肠道的淋巴转运来增强丹酚酸的口服生物利用度,这可能也是 EDA 纳米复合物提高 EDA 口服生物利用度的一个原因。

参考文献:

[1] 高学敏. 中药学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2002: 278.

[2] Jiang J, Hu C. Evodiamine: a novel anti-cancer alkaloid from Evodia rutaecarpa[J]. Molecules, 2009, 14(5): 1852 – 1859.

[3] Shyr M H, Lin L C, Lin T Y, *et al*. Determination and pharmacokinetics of evodiamine in the plasma and feces of conscious rats[J]. Analytica Chimica Acta, 2006, 558(1/2): 16 – 21.

[4] Semalty A, Semalty M, Rawat M S, *et al*. Supramolecular phospholipids-polyphenolics interactions: the PHYTOSOME strategy to improve the bioavailability of phytochemicals[J]. Fitoterapia, 2010, 81(5): 306 – 314.

[5] 廉洁, 王伯初. 药物磷脂复合物工艺评价标准及应用研究进展[J]. 生物技术通讯, 2006, 17(5): 830 – 833.

[6] Yue P F, Yuan H L, Li X Y, *et al*. Process optimization, characterization and evaluation in vivo of oxymatrine-phospholipid complex[J]. Int J Pharm, 2010, 387(1/2): 139 – 146.

[7] Qin X, Yang Y, Fan T T, *et al*. Preparation, characterization and in vivo evaluation of bergenin-phospholipid complex[J]. Acta Pharmacol Sin, 2010, 31(1): 127 – 136.

[8] Ruan J, Liu J, Zhu D, *et al*. Preparation and evaluation of self-nanoemulsified drug delivery systems (SNEDDSs) of matrine based on drug-phospholipid complex technique[J]. Int J Pharm , 2010, 386(1/2): 282 – 290.

[9] Xu J H, Liu W Y, Zheng F, *et al*. Determination of EVO by high performance liquid chromatography-tandem mass pectrometry and pharmacokinetic studies in rats[J]. Chin J Clin Pharmacol Ther, 2007, 12: 427 – 433.

[10] Wen D, Li C, Liu Y, *et al*. Determination of evodiamine and rutecarpine in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Anal Bioanal Chem, 2006, 385(6): 1075 – 1081.

[11] Kidd P M. Bioavailability and activity of phytosome complexes from botanical polyphenols: the silymarin, curcumin, green tea, and grape seed extracts[J]. Altern Med Rev, 2009, 14(3): 226 – 246.

[12] Lu Y, Zhang Y, Yang Z, *et al*. Formulation of an intravenous emulsion loaded with a clarithromycin-phospholipid complex and its pharmacokinetics in rats[J]. Int J Pharm, 2009, 366(1/2): 160 – 169.

[13] Peng Q, Zhang Z R, Sun X, *et al*. Mechanisms of phospholipid complex loaded nanoparticles enhancing the oral bioavailability[J]. Mol Pharm, 2010, 7(2): 565 – 575.

表 2 大鼠给予 EDA 和 ENC 房室模型的主要药动学参数

制剂	$t_{1/2\alpha}$(h)	$t_{1/2\beta}$(h)	V_1/F(L/kg)	CL/F[L/(h·kg)]	$AUC_{(0\sim t)}$(μg·h/L)	$AUC_{(0\sim\infty)}$(μg·h/L)	t_{max}(h)	C_{max}(μg/L)
EDA	1.512	1.701	0.028	0.264	1 835.156	1 893.011	4	352.01
ENC	1.666	3.114	115.642	108.360	4 567.837	4 614.263	8	599.66

表 3 大鼠给予 EDA 和 ENC 非房室模型的主要药动学参数

制剂	$AUC_{(0\sim t)}$(μg·h/L)	$AUC_{(0\sim\infty)}$(μg·h/L)	$MRT_{(0\sim t)}$(h)	$MRT_{(0\sim\infty)}$(h)	$t_{1/2}$(h)	t_{max}(h)	Vz/F(L/kg)	CLz/F[L/(h·kg)]	C_{max}(μg/L)
EDA	1 762.05	1 772.35	4.26	4.32	1.33	4	0.54	0.28	352.01
ENC	3 874.88	3 878.24	7.6	7.62	2.07	8	385.37	128.93	599.66

(收稿:2012-09-12;修回:2012-11-06)

(编辑 张 维)