技术方法 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000924

吴茱萸碱水包油型纳米乳在大鼠体内的药代动力学及生物等效性研究

石明芯[1],胡江波[2],张 馨[1],王 薛[1],张景勋[1]
(1. 重庆医科大学药学院重庆药物高校工程研究中心,重庆 400016;
2. 重庆市南岸区妇幼保健计划生育服务中心药剂科,重庆 400060)

【摘 要】目的:研究吴茱萸碱的水包油型纳米乳(evodiamine nanoemulsion,EDN)在大鼠体内的药动学特征与生物等效性。**方法**:本试验将 12 只雄性大鼠随机分成 2 组,分别灌胃给予吴茱萸碱(evodiamine,ED)或 EDN,并于给药后 0、5、15、30、45 min、1、2、5、8、12、24、48、72 h 时对大鼠眼底取血,用 HPLC 法测定 ED 的血药浓度,用 DAS 软件分析药动学参数,并经方差分析和双单侧检验进行生物等效性评价。**结果**:EDN 的主要药动学参数:血药浓度-时间曲线下面积(area under concentration-time curve,$AUC_{(0\sim72\ h)}$)、药峰浓度(peak concentration,C_{max})和药峰时间(peak time,T_{max})分别为(3 636.79 ± 1 642.94) μg/L*h、(192.49 ± 37.68) μg/L 和(4.94 ± 1.67) h。EDN 的大鼠口服生物利用度约为 ED 的 4.66 倍。$AUC_{(0\sim72\ h)}$的 90%置信区间超出所规定的生物等效性标准区间。**结论**:EDN 明显提高了 ED 的口服生物利用度。ED 和 EDN 的生物不等效性。

【关键词】吴茱萸碱;纳米乳;高效液相色谱法;药动学;生物等效性
【中图分类号】R944.9 **【文献标志码】**A **【收稿日期】**2016-01-29

作者介绍:石明芯,Email:874992850@qq.com,
研究方向:药物新剂型与新技术研究。
通信作者:张景勋,Email:zjqrae01@163.com。
基金项目:重庆市科委资助项目(编号:cstc2015jcyjBX0027)。
优先出版:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160503.1058.002.html (2016-05-03)

[7] Huang MH,Yang RC,Lee CL,et al. Preliminary results of integrated therapy for patients with knee osteoarthritis[J]. Arthritis Rheum,2005,53(6):812-820.

[8] Moreland LW. Intra-articular hyaluronan (hyaluronic acid) and hylans for the treatment of osteoarthritis: mechanisms of action[J]. Arthritis Research & Therapy,2003,5(2):54-67.

[9] Asari A,Miyauchi S,Matsuzaka S,et al. Molecular weight-dependent effects of hyaluronate on the arthritic synovium[J]. Arch Histol Cytol,1998,61(2):125-135.

[10] Ghosh P. The role of hyaluronic acid(hyaluronan) in health and disease:interactions with cells,cartilage and components of synovial fluid[J]. Clinical Experiment Rheumatol,1994,12(1):75-82.

[11] Monfort J,Nacher M,Montell E,et al. Chondroitin sulfate and hyaluronic acid(500-730 kda) inhibit stromelysin-1 synthesis in human osteoarthritic chondrocytes[J]. Drugs Experiment Clinical Research,2005,31(2):71-76.

[12] 方奕巍,尹宗宁. 透明质酸修饰的白蛋白纳米粒的制备及抗肿瘤作用的初步评价[J]. 四川大学学报(医学版),2011,42(4):480-484.

[13] Peer D,Margalit R. Loading mitomycin C inside long circulating hyaluronan targeted nano-liposomes increases its antitumor activity in three mice tumor models[J]. International Journal of Cancer,2004,108(5):780-789.

[14] 邓 雪,何 丹,熊华蓉,等. 静脉注射尿酸酶多囊脂质体的药代动力学和药效学研究[J]. 四川大学学报(医学版),2015,46(5):688-691.

[15] Zhong M,Feng Y,Liao H,et al. Azithromycin cationic non-lecithoid nano/microparticles improve bioavailability and targeting efficiency[J]. Pharmaceutical Research,2014,31(10):2857-2867.

[16] Tan Q,Zhang J,Wang N,et al. Uricase from Bacillus fastidious loaded in alkaline enzymosomes:enhanced biochemical and pharmacological characteristics in hypouricemic rats[J]. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,2012,82(1):43-48.

[17] 王 娜,赵春景,黄开顺,等. 产朊假丝酵母尿酸酶脂质纳米粒的制备及其药效学特性分析[J]. 中国生物制品学杂志,2013,26(8):1147-1150.

(责任编辑:张辉洁)

Pharmacokinetics and bio-equivalence of evodiamine nanoemulsion oil-in-water in rats

Shi Mingxin[1], *Hu Jiangbo*[2], *Zhang Xin*[1], *Wang Xue*[1], *Zhang Jingqing*[1]

(*1. Chongqing Research Center for Pharmaceutical Engineering in University, College of Pharmacy, Chongqing Medical University; 2. Department of Pharmacy, Chongqing Nanan Maternal and Child Health Care and Family Planning Service Center*)

【Abstract】***Objective***: To study the pharmacokinetic characteristics and bio-equivalence of evodiamine nanoemulsion (EDN) prepared by the experiment in rats. ***Methods***: Twelve male SD rats were randomly divided into 2 groups, and single dose of evodiamine (ED) or EDN was administrated respectively in the experiment. The blood was took from eye socket at 0,5,15,30,45 min and at 1,2,5,8,12,24,48,72 h after administration. The plasma concentration of ED was determined by HPLC; pharmacokinetic parameters was analyzed by DAS software; the bio-equivalence between ED and EDN was evaluated by analysis of variance and two one-sided test. ***Results***: The main pharmacokinetic parameters of EDN: area under concentration-time curve ($AUC_{(0\sim72\ h)}$), peak concentration (C_{max}) and peak time (T_{max}) were (3 636.79 ± 1 642.94) μg/L·h, (192.49 ± 37.68) μg/L, (4.94 ± 1.67) h, respectively. The oral bio-availability of EDN in rats was about 4.66 times higher than that of ED. The 90% confidence interval of $AUC_{(0\sim72\ h)}$ exceeded the bio-equivalence criteria interval. ***Conclusion***: EDN oil-in-water is successfully prepared. The bio-availability of ED in rats increases remarkably after oral administration of EDN.

【Key words】evodiamine; nanoemulsion; high pressure liquid chromatography; pharmacokinetics; bio-equivalence

吴茱萸碱(evodiamine, ED)作为一种重要的吲哚喹唑啉类生物碱，提取自芸香科植物吴茱萸、石虎或疏毛吴茱萸的干燥近成熟果实中[1]。ED 能作用于多个系统，具有保护心脏、降血压、减肥、镇痛、抗炎等多种药理作用，还能通过诱导肿瘤细胞凋亡和抑制癌细胞转移等实现抗肿瘤作用，已报道其对人胃癌、肝癌、肺癌以及黑色素瘤等有抑制作用[2-5]，但其口服吸收差，生物利用度低，至今未得到良好改善，故抗肿瘤作用也未能实现临床应用。纳米乳有很多如提高难溶性药物的溶解度、提高药物的稳定性、延长药物的半衰期以及实现药物的缓释等优点[6-7]，有宽广的应用前景。

近年来对于 ED 的研究主要在于抗肿瘤活性上，对于制剂方面研究不多，且应用纳米乳技术更少见。故本试验将研究吴茱萸碱纳米乳(evodiamine nanoemulsion, EDN)在大鼠体内的药代动力学特征，并与 ED 作比较，对生物利用度以及生物等效性予以评价。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器 Agilent 1100 液相色谱仪(美国 Agilent 公司)；DF-101S 型集热式磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限责任公司)；HHS-4S 电子恒温不锈钢水浴锅(上海康路仪器设备有限公司)；Milli-Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司)；Nano-ZS90 型马尔文粒径测定仪(英国马尔文公司)；QL-901 型旋涡混合器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司)；THZ-82A 水浴恒温振荡器(江苏金坛荣华仪器制造有限公司)；TGL-16B 台式高速离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.1.2 试剂与试药 ED(纯度>99%，分子式为 $C_{19}H_{17}N_3O$，黄色片状结晶，武汉远城科技发展有限公司，批号：00930)；ED 制剂(实验室自制，混悬液，批号：20120301)；EDN(实验室自制，平均粒径为 26 nm，平均载药量为 99%，批号：20120301)；甲醇(色谱纯，美国新天地科技有限公司)；水为纯化水；其余试剂为分析纯。

1.1.3 实验动物 雄性 SD 大鼠，体质量 200~250 g，重庆医科大学动物实验中心所提供(许可证号：SYXK(渝)2012-0001)。

1.2 方法

1.2.1 给药方案与样品采集 将 12 只雄性大鼠随机分成 2 组，分别灌胃给予 ED 或 EDN，并于给药后 0、5、15、30、45 min、1、2、5、8、12、24、48、72 h 时对大鼠进行眼底取血，将所取血液离心后取上层血浆，-20 ℃保存即可。

1.2.2 血浆样品的处理 取“1.2.1”项下的血浆 150 μL，依次分别加入内标和厚朴酚[8]10 μL、氨水 75 μL 以及乙醚 750 μL 并分别涡旋一定时间，然后于 4 000 r/min 离心 5 min，取上清液挥干乙醚，再加入甲醇 100 μL 涡旋离心，即得血浆样品。

1.2.3 色谱条件 采用 Lichrospher C18 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)，流动相为甲醇:水=70:30，柱温取 35 ℃，流速为 1.0 mL/min，检测波长 225 nm，取 40 μL“2.2”项下血浆样品进样。

1.2.4 方法学试验 对 ED 分别做了精密度、重复性、回收率试验[8,15]，考察该方法是否合理。

1.3 数据处理

采用 DAS 软件(2.1.1 版)对药代动力学数据进行处理，比较 ED 和 EDN 的生物利用度，并用 SPSS 19.0 对 ED 和EDN

的各项药代动力学数据进行统计处理。

1.4 生物等效性评价

对 ED 和 EDN 的血药浓度-时间曲线下面积(area under concentration-time curve，$AUC_{(0\text{-}72\,h)}$)、药峰浓度(peak concentration，C_{max})2 个主要药代动力学参数作方差分析并考察 90%置信区间，对药峰时间(peak time，T_{max})采用非参数统计的 Wilcoxon 符号秩和检验，评价 ED 和 EDN 是否具有生物等效性。检验标准 α=0.05。

2 结 果

测定 ED 浓度的 HPLC 法的精密度、重复性、回收率等方法学结果均符合要求。ED 的日内精密度和日间精密度的相对标准偏差均小于 15%，ED 和厚朴酚的绝对回收率和方法回收率均在 85%~115%范围内，说明该方法处理血浆合理，该 HPLC 法可行。

2.1 体内药动学和生物利用度研究

实验数据经处理后得到 ED 和 EDN 的平均血药浓度-时间曲线图，见图 1。可看出 EDN 的整体血药浓度明显高于 ED，EDN 和 ED 分别约在 5 h 和 1 h 时达到最大血药浓度，说明达峰时间约延迟 4 h，且 EDN 的最大血药浓度约为 ED 的 2.39 倍。此外 EDN 的作用时间明显延长，在 24 h 时，ED 的血药浓度已为 0，而 EDN 仍有较高浓度，整体作用时间至少延长 1 倍。说明 EDN 能增加 ED 的血药浓度和持续作用时间。

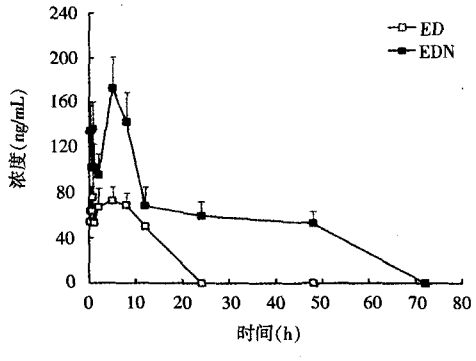


图 1 大鼠口服给药后血浆中 ED 和 EDN 的平均血药浓度－时间曲线（$\bar{x}\pm s$，n=6）

Fig.1 Mean plasma concentration-time profile of ED and EDN after single oral administration($\bar{x}\pm s$，n=6)

非房室模型分析，ED 和 EDN 在大鼠体内的主要药动学参数及统计分析结果见表 1。参数结果可看出：大鼠灌胃给予 EDN 的 $AUC_{(0\text{-}72\,h)}$、C_{max}、平均滞留时间(mean residence time，$MRT_{(0\text{-}72\,h)}$)均高于 ED，表观分布容积(apparent volume of distribution，V)和清除率(clearance，CL)均小于 ED，其中 $AUC_{(0\text{-}72\,h)}$ 为 ED 的 4.66 倍，C_{max} 为 ED 的 2.34 倍，说明 EDN 能提高 ED 的口服吸收。$MRT_{(0\text{-}72\,h)}$ 为 ED 的 3.18 倍，CL 减少了接近50%，说明 EDN 减少了 ED 的清除，延长了其在大鼠体内的作用时间。统计分析结果显示除 $AUC_{(0\text{-}72\,h)}$、V 和 CL 外，ED和 EDN 的各项药动学数据均有统计学差异。

表 1 大鼠单剂量灌胃 ED 和 EDN 非房室模型的主要药动学参数（$\bar{x}\pm s$，n=6）

Tab.1 Non-compartment pharmacokinetic parameters after administration of single dose of ED and EDN in rats($\bar{x}\pm s$，n=6)

参数	ED	EDN	P值
$AUC_{(0\text{-}72\,h)}$(μg/L*h)	781.25 ± 139.38	3 636.79 ± 1 642.94	0.10
C_{max}(μg/L)	82.22 ± 19.07	192.49 ± 37.68[a]	0.04
T_{max}(h)	1.17 ± 0.64	4.94 ± 1.67[a]	0.95
$MRT_{(0\text{-}72\,h)}$(h)	5.84 ± 0.31	18.60 ± 2.41[a]	0.01
V(L/kg)	1 102.68 ± 302.72	484.92 ± 121.25	0.09
CL(L/h/kg)	55.26 ± 9.18	30.33 ± 16.78	0.15

注：a，P < 0.05，表示两组数据间有统计学差异

房室模型分析的主要药动学参数及统计分析结果见表 2。表中，EDN 的 $AUC_{(0\text{-}72\,h)}$和 C_{max} 高于 ED，其中 $AUC_{(0\text{-}72\,h)}$为 ED 的 4.93 倍，C_{max} 为 ED 的 2.34 倍，说明吸收增加；吸收速率常数(absorption rate constant，Ka)减小了 17.57 h^{-1}，表明吸收速度变缓；CL 减少了接近 50%，说明清除率降低。统计分析结果显示 ED 和 EDN 的药动学数据中只有 C_{max} 和 T_{max} 有统计学差异。

表 2 大鼠单剂量灌胃 ED 和 EDN 房室模型的主要药动学参数（$\bar{x}\pm s$，n=6）

Tab.2 Compartment pharmacokinetic parameters after administration of single dose of ED and EDN in rats($\bar{x}\pm s$，n=6)

参数	ED	EDN	P值
$AUC_{(0\text{-}72\,h)}$(μg/L*h)	755.95 ± 146.75	3 726.98 ± 1 871.58	0.12
C_{max}(μg/L)	82.22 ± 19.07	192.49 ± 37.68[a]	0.04
T_{max}(h)	1.17 ± 0.64	4.94 ± 1.67[a]	0.95
K_a(1/h)	20.16 ± 34.68	1.40 ± 2.10	0.46
CL(L/h/kg)	55.05 ± 9.43	30.55 ± 22.17	0.20
$t_{1/2}$(h)	14.51 ± 6.60	12.33 ± 3.50	0.55

注：a，P<0.05，表示两组数据间有统计学差异

由主要药动学参数可得出非房室模型和房室模型分析结果几乎一致，EDN 的生物利用度约高出 ED 3.66 倍(非房室模型)或者 3.93 倍(房室模型)，相对生物利用度为 215.61%。

2.2 生物等效性评价

数据经 DAS 2.1.1 软件处理后，见表 3。ED 与 EDN 的C_{max} 的 90%置信区间在规定的生物等效性标准区间内，$AUC_{(0\text{-}72\,h)}$ 超出所规定的区间，因此 ED 与 EDN 生物不等效性。此外，对 T_{max} 进行非参数检验(配对样本的 Wilcoxon 符号秩和检验)，按 α=0.05 水准，得 P=0.064，认为 ED 与EDN 的 T_{max} 无统计学差异，即 ED 与 EDN 的达峰时间差异无统计学意义。

表 3 大鼠单剂量灌胃 ED 和 EDN 后，生物等效性的比较

Tab.3 Comparison of bio-equivalence after administrating single dose of ED and EDN in rats

参数	90%置信区间	生物等效性标准	生物等效性结果
$AUC_{(0\text{-}72h)}$	109.1%～128.1%	80%～125%	不等效
C_{max}	109.4%～128.6%	70%～143%	等效

3 讨 论

ED因具有抗肿瘤的作用而被广泛研究，发现其能有效抑制多种肿瘤[9-11]，但其口服吸收差而限制其临床应用。有学者改变其结构以提高其活性，但多数研究侧重于药理作用机制方面[12-14]。在制剂方面，Liu 等[15]通过加入磷脂，与 ED 以非共价结合形成磷脂复合物来提高 ED 的水溶性和膜通透性，最终提高其生物利用度，此外对于其他制剂类型的研究不多。纳米乳作为一种能提高药物的生物利用度的新兴载体技术，在中药上的研究颇多，但在 ED 上研究甚少。

本试验通过研究 EDN 在大鼠体内的药代动力学特征及生物等效性，对 ED 和 EDN 的主要药动学参数用非房室模型和室模型分析，得出二者的分析结果几乎一致，均表明 EDN 的生物利用度相比 ED 提高了 3 倍以上，相比文献报道[8]，ED 的纳米乳制剂比磷脂纳米复合物的生物利用度高出了 1 倍多。且最大血药浓度约为 ED 的 2.34 倍，清除率减小，整体作用时间延长，说明纳米乳能提高 ED 的有效血药浓度，实现缓慢释放和持续作用，其原因可能是纳米乳提高了 ED 的溶解度，提高了肠上皮细胞的通透性，促进了 ED 的吸收，提高了血药浓度，提高了 ED 的生物利用度；纳米乳表面活性剂等辅料延缓了 ED 的释放速度，延长了 ED 的作用时间，降低了 ED 的清除率，使 ED 能持续作用。根据生物等效性的判断标准，EDN 与 ED 生物不等效，即 EDN 和 ED 的药代动力学行为不一致，进一步说明 EDN 能改善 ED 的口服吸收情况。

文献[15]报道了吴茱萸碱磷脂复合物的制备和体外溶出，但没有生物利用度数据，故通过进一步查阅文献，文献[8]中考察了吴茱萸碱磷脂纳米复合物的生物利用度，吴茱萸碱磷脂纳米复合物可提高吴茱萸碱生物利用度 2.16 倍，吴茱萸碱水包油型纳米乳可提高吴茱萸碱生物利用度 4.66 倍。本研究得到的吴茱萸碱水包油型纳米乳对吴茱萸碱生物利用度提高效果更明显；吴茱萸碱水包油型纳米乳提供了较吴茱萸碱磷脂纳米复合物更优的、可提高吴茱萸碱生物利用度的新剂型。因此本试验能为提高 ED 口服生物利用度以及研究 ED 新剂型提供一定参考依据。

参 考 文 献

[1] 左信丽. 吴茱萸中生物碱类成分的研究进展[J]. 中国现代药物应用，2015，9(9)：265-267.

[2] Liu AJ，Wang SH，Chen KC，et al. Evodiamine，a plant alkaloid，induces calcium/JNK-mediated autophagy and calcium/mitochondria-mediated apoptosis in human glioblastoma cells[J]. Chemico-Biological Interactions，2013，205(1)：20-28.

[3] 刘利琼，任 伟，谢 丽，等. 吴茱萸碱诱导肿瘤细胞凋亡的分子机制研究进展[J]. 现代肿瘤医学，2015，23(10)：1471-1474.

[4] 侯化化，张婧怡，林淑娴，等. 吴茱萸碱抑制血管紧张素Ⅱ致大鼠血管平滑肌细胞增殖的研究[J]. 华西药学杂志，2014，29(6)：645-647.

[5] Zhang ZX，Jiang ML，Wang XH，et al. Progress on pharmacological effect of evodiamine[J]. Progress in Modern Biomedicine，2014，14(21)：4189-4191.

[6] 杨鹏飞，陈卫东. 纳米乳提高难溶性药物生物利用度的研究进展[J]. 中国药学杂志，2013，48(15)：1238-1244.

[7] 黄益明，伍 凯，唐文涛，等. 纳米技术在口服难溶性药物的研究进展[J]. 中南药学，2013，11(5)：362-365.

[8] 柳 珊，杨 林，廖 红，等. 吴茱萸碱纳米复合物的药代动力学和生物利用度研究[J]. 第三军医大学学报，2013，35(4)：325-327.

[9] 刘惠玉，李 方. 吴茱萸碱抑制人卵巢癌细胞 SKOV3 增殖的实验研究[J]. 现代妇产科进展，2015，24(6)：428-430.

[10] 孙建超，娄方方，史 云，等. 吴茱萸碱对人肝癌 HepG2 细胞增殖影响[J]. 中国公共卫生，2015，31(5)：587-590.

[11] Chang M，Wang ZL，Zhou LS. Research progress in evodiamine on pharmacological activity as multi-target drugs[J]. Medical Recapitulate，2015，21(4)：695-697.

[12] 赵绿翠，廖 科，李科琼，等. 吴茱萸碱调控人结肠癌 HCT-116 细胞中 JAK2/STAT3 信号通路的机制研究[J]. 中国药理学通报，2015，31(10)：1394-1398.

[13] 何佩仪，江燕妮，谭宇蕙，等. 吴茱萸碱诱导肾癌 786-0 细胞 G2/M 期阻滞及其分子机制[J]. 广州中医药大学学报，2015，32(5)：853-856.

[14] Liu LQ，Ren W，Xie L，et al. Molecular mechanism of tumor cell apoptosis induced by evodiamine[J]. Modern Oncology，2015，23(10)：1471-1474.

[15] Liu S，Tan QY，Yin HF，et al. Process optimization and dissolution kinetics of evodiamine supra-structure complex[J]. China Journal of Hospital Pharmacy，2012，32(14)：1088-1093.

（责任编辑：张辉洁）