

技术方法

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.001092

吴茱萸碱水包油型复合纳米乳的体外释放和在体吸收研究

晏声蕾¹, 胡江波², 王 薛¹, 赵德璋¹, 张景勃¹

(1. 重庆医科大学药学院重庆高校药物工程研究中心, 重庆 400016; 2. 重庆市南岸区妇幼保健院药剂科, 重庆 400060)

【摘要】目的:研究吴茱萸碱磷脂复合物水包油型纳米乳(evodiamine nanocomplex oil-in-water nanoemulsion, OECNE)体外释放特性和在胃肠吸收情况。**方法:**采用透析法建立 OECNE 体外模型,用模型拟合法和相似因子法(f_2)考察其体外释放行为;应用大鼠单向肠灌注模型研究其吸收情况。**结果:**在 pH 1.2 盐酸溶液和 pH 6.8 磷酸缓冲溶液中,OECNE 的累积释放率均为 EDA 的 3 倍,释放曲线均符合 Weibull 方程, f_2 说明 OECNE 能促进 EDA 释放;其吸收速率常数在胃部、十二指肠、空肠、回肠和结肠分别为 EDA 的 2.32、2.74、3.36、4.13 和 2.74 倍,有效渗透系数在 4 个肠段中分别为 EDA 的 4.66、3.70、4.87 和 3.60 倍,OECNE 增加了在大鼠胃和不同肠段中药物的吸收。**结论:**OECNE 改善了 EDA 的释放行为;OECNE 提高了 EDA 的吸收。

【关键词】吴茱萸碱;磷脂纳米复合物;纳米乳;体外释放;透析法

【中图分类号】R943

【文献标志码】A

【收稿日期】2016-05-17

Release profile and intestinal absorption of evodiamine complex
oil-in-water nanoemulsionYan Shenglei¹, Hu Jiangbo², Wang Xue¹, Zhao Dezhang¹, Zhang Jingqing¹

(1.Chongqing Research Center for Pharmaceutical Engineering, College of Pharmacy,

Chongqing Medical University; 2.Chongqing Nan'an Maternal and Child Health Care Hospital)

【Abstract】Objective: To study its in vitro drug release of evodiamine nanocomplex oil-in-water nanoemulsion(OECNE)and to investigate its intestinal absorption. **Methods:** The dialysis was used to evaluate release profile, and the release behavior was studied by model and similarity factor f_2 . Single-pass intestinal perfusion was conducted to evaluate intestinal absorption. **Results:** The cumulative releases of OECNE were both about 3-fold that of EDA in 0.1 pH 1.2 hydrochloric acid solution and in pH 6.8 phosphate buffer solution, and OECNE was in accordance with Weibull model in two different solutions, and f_2 also revealed OECNE have benefit in drug release. The intestinal absorption rate constant of OECNE was 2.32-fold, 2.74-fold, 3.36-fold, 4.13-fold and 2.74-fold than that of free EDA in stomach, duodenum, jejunum, ileum and colon. The effective permeability of OECNE was 4.66-fold, 3.70-fold, 4.87-fold and 3.60-fold than that of EDA. **Conclusion:** OECNE was successfully used to enhance the absorption of EDA.

【Key words】evodiamine; drug-phospholipid nanocomplex; nanoemulsion; drug release in vitro; dialysis method

吴茱萸碱(evodiamine, EDA)是石虎、吴茱萸和疏毛吴茱萸的活性成分之一,为吡啶喹啉类生物碱。研究报道吴茱萸碱有抗肿瘤、镇痛、减肥、抗抑郁等多种药理活性^[1-2]。近年来,EDA 的抗癌活性受

到极大关注,对肺癌、结肠癌、胃癌和口腔癌等都有一定的药理活性,其抗癌机制多样,能阻止肿瘤细胞的增殖、转移和代谢,诱导肿瘤细胞改变细胞周期,促使其凋亡^[3-5]。但 EDA 分子中具有多个环状刚性结构,水溶性差,药物吸收程度低,口服后生物利用度低^[6],一部分药物分子还未达到靶点便已经被代谢消除,不利于在临床使用。

研究报道^[7-8]将各种水溶性差、生物利用度低的药物和磷脂结合,形成纳米级的化合物或络合物后

作者介绍:晏声蕾, Email: 1347298118@qq.com,

研究方向:药物新型给药系统与新技术。

通信作者:张景勃, 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.20161215.1155.050.html>

(2016-12-15)

药物生物利用度提高、疗效增加。纳米乳为新型药物载体,常用来改善药物的吸收情况,常作为口服制剂的水包油型纳米乳被广泛研究^[9]。罗见春等^[10]发现,将不同的载体组合形成新载体,可以进一步提高药物的生物利用度和疗效。本实验首次将 EDA 的磷脂复合物装载于水包油型纳米乳载药系统中,制备为水包油型磷脂复合物纳米乳(evodiamine nanocomplex oil-in water nanoemulsion, OECNE),通过实验观察 OECNE 在不同模拟介质溶液中的体外释放行为和体肠吸收情况,判断药物的吸收情况是否得到有效改善,为 OECNE 的药动力学研究、临床应用提供一定的依据。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂和动物

Agilent 1100 液相色谱仪(美国 Agilent 公司);HL-1 恒流泵(上海青浦沪西仪器厂);TGL-16B 台式高速离心机(上海安亭科学仪器厂);THZ-82A 水浴恒温振荡器(江苏金坛荣华仪器制造有限公司)。

EDA(武汉远城科技发展有限公司,批号:00930,纯度>99%)。甲醇(美国新天地科技有限公司)为色谱纯,其余为分析纯;OECNE(批号 20150302、20150306、20150308)平均粒径 30.77 nm,多分散系数为 0.115,平均 zeta 电位-6.36 mV; pH 1.2 盐酸溶液、pH 6.8 磷酸缓冲溶液和 K-R 液,实验室自制。

雄性健康 SD 大鼠由重庆医科大学实验动物中心提供,体质量 210~250 g,许可证号:SCXK(渝)2011-000。

1.2 方法

1.2.1 OECNE 体外释放行为 分别吸取 1 mL EDA 和 OECNE(相当于含 1 mg 原料药 EDA)于预先处理过的透析袋中,将透析袋两端扎紧、密封。在锥形瓶中分别加入 pH1.2 盐酸溶液或 pH6.8 磷酸缓冲溶液,将含 EDA 或 OECNE 的透析袋浸入锥形瓶的释放介质中,在振动频率为 100 r/min、温度为 37 °C 条件下恒温振荡 168 h。在实验设定时间点(0.5、1、3、5、8、12、24、48、72、96、120、144、168 h)分别取释放介质 1.0 mL,并补加相应的新鲜释放介质 1.0 mL,维持锥形瓶中溶液体积不变。所取释放液于 12 000 r/min 条件下离心 10 min,精密吸取 20 μ L 上清液,用 HPLC 测定 EDA 的质量浓度,计算药物的含量^[11]。HPLC 色谱条件:色谱柱为大连伊利特 Lichrospher C18 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm,5 μ m);检测波长 225 nm;流动相为甲醇:水=75:25;流速为 1 mL/min;柱温为 35 °C,20 μ L 进样。将 OECNE 的累积释放率按照零级方程、一级方程、

Higuchi 方程和 Weibull 方程模型进行拟合,用拟合度(r)判断模型拟合的程度;用相似因子法(f_2)判断 OECNE 和 EDA 释放曲线的相似性,若 f_2 在 50~100 代表两曲线相似。

1.2.2 OECNE 在体胃肠吸收实验 给药前 6 只 SD 大鼠随机均分为 2 组,每组 3 只,将大鼠禁食 18 h(提供饮用水),腹腔注射 3.5%的水合氯醛将大鼠麻醉固定。在胃内吸收实验,沿大鼠的腹中线将腹腔打开 1 个 3 cm 左右小口,将幽门、贲门两侧各剪开 1 个适宜小口,插管、结扎。用预先恒温至 37 °C 的 pH1.2 盐酸溶液将胃残留内容物冲洗干净。随后分别注入 4 mL OECNE 和 EDA(相当于含 EDA 100 μ g/mL),2 h 后将胃中药液取出,冲洗胃内剩余药液,25 mL 容量瓶定容。在体肠吸收实验,依次找到实验所需的肠段(十二指肠、空肠、回肠和结肠),在待测各个肠段的上、下端分别剪开一个小口,插管并结扎。十二指肠段距幽门约 1 cm,空肠段位于幽门向下约 15 cm 处,回肠段距离盲肠上段约 20 cm,结肠段位于盲肠后段。用预先恒温到 37 °C 生理盐水和循环液将肠内容物冲洗干净,随后将生理盐水排出,用空白循环液在流速为 0.5 mL/min 条件下循环 10 min,取样作为空白。将空白循环液排出,换用含药(EDA 或 OECNE)的循环液(各个肠段均为 15 mL),灌流液进入肠段则立即开始计时,调节恒流泵流速为 0.2 mL/min,计时 1 h 后收集灌流液。用空白循环液将肠段残留药物冲洗干净,将冲洗液和灌流液合并,定容至 25 mL。用 HPLC 测定 EDA 的质量浓度^[11],实验结束后依次剪下各个实验肠段,测定其长度和内径,计算各个肠段的吸收速率常数(K_a)和有效渗透率(P_{eff})^[12]。

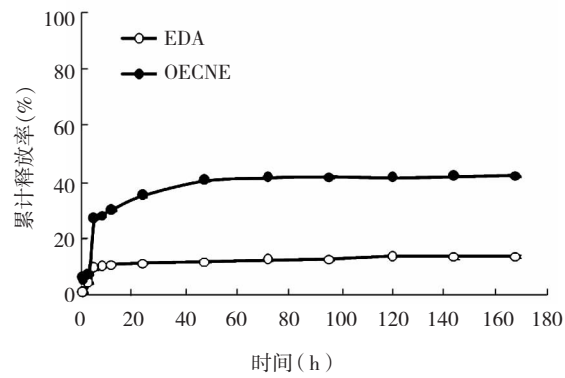
2 结果

2.1 OECNE 体外释放行为研究

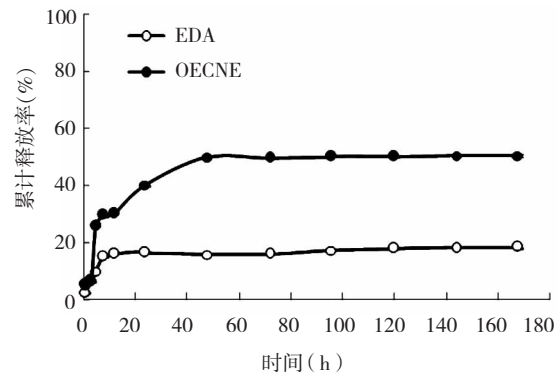
以 OECNE 和 EDA 的累积释放率和取样时间点作图,得图 1、表 1。恒温透析 168 h 后,OECNE 的累积释放率在 pH1.2 盐酸溶液中约为 40%,在 pH6.8 磷酸缓冲溶液中约为 50%,两者比值约为 0.8;EDA 分别在 2 种介质中累积释放率依次约 14%和 18%为,比值约为 0.8。即在 pH1.2 盐酸溶液中,OECNE 和 EDA 累积释放率比值为 3.04,在 pH6.8 磷酸缓冲溶液中,OECNE 和 EDA 累积释放率比值为 2.97。所以,在模拟介质中,OECNE 都提高了 EDA 的累积释放量,且 pH6.8 磷酸缓冲液更有利于 EDA 从 OECNE 释放,可以推测较高的 pH 有利于 EDA 的溶解、释放。另一方面,OECNE 具有明显的缓释性,药物释放时间能持续 48 h,明显高于 EDA 的释放时间。

将释放曲线进行模型拟合,结果见表 2。OECNE 在 2 种释放介质中均符合 Weibull 方程, r 分别为 0.914 3 和 0.936 0。在 pH1.2 盐酸溶液中,OECNE 和 EDA 释放曲线的 f_2 为

32.00, 在 pH6.8 磷酸缓冲溶液中 f_2 为 35.05, 2 种溶液中的 f_2 均小于 50。说明在 2 种不同的介质溶液中, OECNE 和 EDA 药物释放行为有明显的差异, OECNE 明显改善了 EDA 的体外释放情况。



A. 在 pH1.2 盐酸溶液中



B. 在 pH6.8 磷酸缓冲溶液中

图 1 OECNE 和 EDA 的体外释放行为($n=3$)
Fig.1 Release profiles of OECNE and EDA($n=3$)

2.2 OECNE 在体肠吸收行为特征研究

实验结果表明, OECNE 明显提高了 EDA 在胃肠中的吸收。由图 2、表 3 所示, OECNE 在大鼠胃部、十二指肠、空肠、回肠和结肠的 K_a 和 EDA 的比值依次为 2.32、2.74、3.36、4.13 和 2.74, 两者肠段 P_{eff} 比值依次为 4.66、3.70、4.87 和 3.60; 所以, 将 EDA 制备成 OECNE 后, 药物在胃和各个肠段的吸收均呈现不同程度的提高。

表 2 释放曲线拟合结果

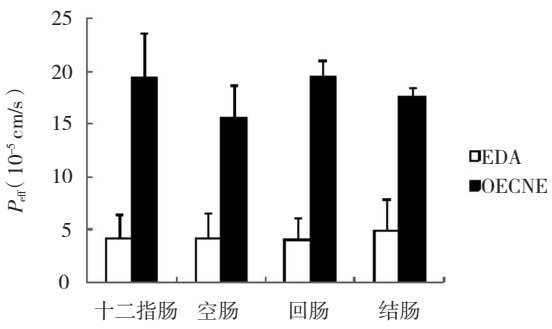
Tab.2 Mathematical models for mean cumulative release curve

拟合模型	pH1.2 盐酸溶液		pH6.8 磷酸缓冲溶液	
	方程	拟合度	方程	拟合度
零级方程	$Q=0.179t+20.46$	0.734 2	$Q=0.240t+21.19$	0.776 5
一级方程	$\ln(1-Q)=-0.002t-0.241$	0.766 2	$\ln(1-Q)=-0.003t-0.256$	0.809 3
Higuchi 方程	$Q=2.815t^{1/2}+13.25$	0.849 7	$Q=3.725t^{1/2}+11.81$	0.887 1
Weibull 方程	$\ln\ln[1/(1-Q)]=0.413\ln t-2.413$	0.914 3	$\ln\ln[1/(1-Q)]=0.492\ln t-2.540$	0.936 0

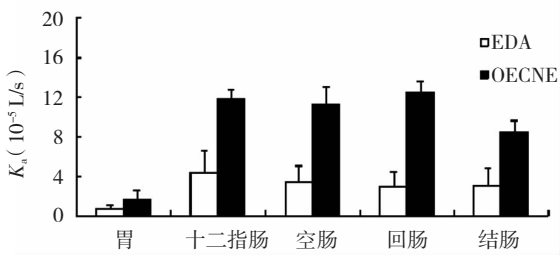
表 1 OECNE 和 EDA 的体外释放行为($n=3$)

Tab.1 Release profiles of OECNE and EDA($n=3$)

制剂 时间 (h)	EDA		OECNE	
	pH1.2 盐酸 溶液	pH6.8 磷酸 缓冲溶液	pH1.2 盐酸 溶液	pH6.8 磷酸 缓冲溶液
0.5	0.98 ± 0.16	2.51 ± 0.16	5.51 ± 0.19	5.04 ± 0.12
1	1.05 ± 0.15	2.56 ± 0.12	6.29 ± 0.26	5.41 ± 0.16
3	4.48 ± 0.34	6.52 ± 0.10	7.29 ± 0.28	6.68 ± 0.24
5	9.69 ± 0.58	9.85 ± 0.15	27.36 ± 0.30	25.8 ± 0.17
8	10.41 ± 0.46	15.17 ± 0.25	28.50 ± 0.25	29.61 ± 0.35
12	11.03 ± 0.20	16.02 ± 0.16	30.26 ± 0.40	30.21 ± 0.37
24	11.47 ± 0.16	16.58 ± 0.20	35.42 ± 0.45	40.15 ± 0.26
48	11.98 ± 0.13	15.86 ± 0.21	40.73 ± 0.21	49.97 ± 0.17
72	12.62 ± 0.32	15.97 ± 0.18	41.87 ± 0.23	49.79 ± 0.23
96	12.91 ± 0.29	17.25 ± 0.16	42.05 ± 0.18	50.25 ± 0.12
120	13.79 ± 0.22	17.97 ± 0.25	41.74 ± 0.15	50.26 ± 0.24
144	13.84 ± 0.60	18.14 ± 0.22	42.25 ± 0.28	50.46 ± 0.22
168	13.98 ± 0.49	18.34 ± 0.20	42.56 ± 0.18	50.47 ± 0.43



A. OECNE 和 EDA 的有效渗透系数



B. OECNE 和 EDA 的吸收速率常数

图 2 OECNE 和 EDA 的吸收速率常数和有效渗透系数 ($n=3$)

Fig.2 Intestinal absorption rate constant and effective permeability of OECNE and EDA ($n=3$)

表 3 OECNE 和 EDA 的吸收速率常数和有效渗透率 ($n=3$)Tab.3 Intestinal absorption rate constant and effective permeability of OECNE and EDA ($n=3$)

肠段	EDA		OECNE	
	K_a (10^{-5} L/s)	P_{eff} (10^{-5} cm/s)	K_a (10^{-5} L/s)	P_{eff} (10^{-5} cm/s)
胃	0.69 ± 0.41	—	1.60 ± 1.02	—
十二指肠	4.27 ± 2.34	4.17 ± 2.31	11.71 ± 1.06	19.44 ± 4.16
空肠	3.34 ± 1.71	4.20 ± 2.37	11.23 ± 1.86	15.62 ± 3.13
回肠	2.99 ± 1.45	4.01 ± 2.14	12.41 ± 1.13	19.55 ± 1.53
结肠	3.10 ± 1.81	4.88 ± 3.12	8.49 ± 1.12	17.59 ± 0.93

3 讨 论

化疗药物目前的给药方式是以静脉注射为主,患者依从性差,生存质量受到影响。口服给药为最常见的给药方式之一,具有安全方便、患者依从性好、低制造成本等优点,因此,口服化疗药物得到越来越多的关注^[13]。EDA 的水溶性差,直接口服吸收程度低,寻找合适的药物载体来提高 EDA 的吸收是有必要的。分别称取磷脂、EDA 溶于乙醇中搅拌,挥干有机溶剂,得复合物。取油相、乳化剂和助乳化剂(油酸乙酯、聚氧乙烯蓖麻油和聚乙二醇)搅拌均匀,加入复合物,边搅拌边滴加纯化水,溶液澄清即得到 OECNE。磷脂为构成细胞膜的成分之一,安全、来源广泛,在实验中,将药物和磷脂通过电荷的迁移作用,形成纳米级磷脂复合物,可提高药物的吸收^[7]。进一步应用纳米乳化技术,将纳米复合物分散于水包油型纳米乳中,可改善药物的吸收情况。和 EDA 相比,在 2 种介质溶液中 OECNE 的累计释放程度均提高约 3 倍,不同肠段中 OECNE 的 K_a 和 P_{eff} 分别提高了 3~4 倍和 4~5 倍,药物吸收速度、程度均明显提高。

对于口服吸收的药物,其吸收和药物剂型以及所处的环境可能相关^[14],所以本研究在体外实验中用 2 种不同释放介质来分别模拟药物在胃部和肠道的生理情况,在体实验中用接近体内真实状态的单向肠灌注模型研究 OECNE 的吸收情况。体外释放实验显示 OECNE 较 EDA 在 2 种不同模拟介质溶液中的药物释放速度和程度明显增加,OECNE 与 EDA 的释放行为有明显差异的主要原因可能是剂型因素。EDA 为难溶性药物,OECNE 为水包油型乳剂,EDA 与两亲性的磷脂分子形成复合物后包封于外水相为水的纳米乳中,药物在乳剂中的分散度很大,有利于药物释放。在体实验结果表明,OECNE 使药物在体内的胃肠吸收提高明显,原因可能为:药物与磷脂复合后高度分散在 OECNE 纳米乳制剂

中,纳米乳表面积大,亲水性好,增加了药物在胃肠的吸收;药物从乳剂和磷脂复合物中缓慢释放出来,延长了药物的释放时间;磷脂为体内细胞生物膜结构中的成分,药物与磷脂结合后,不仅可使药物拥有良好的组织相容性、细胞亲和力,而且明显提高了 EDA 进入大鼠肠上皮细胞的量^[7-8]。目前 EDA 应用前景良好,虽还未直接应用于临床治疗,但含 EDA 的膳食补充剂已在美国有售^[15]。

参 考 文 献

- [1] 张志仙,蒋美玲,王欣慧,等. 吴茱萸碱的药理学研究进展[J]. 现代生物医学进展,2014,14(21):4189-4195.
- [2] Fang C,Zhang J,Qi D,et al. Evodiamine induces G2/M arrest and apoptosis via mitochondrial and endoplasmic reticulum pathways in H446 and H1688 human small-cell lung cancer cells[J]. PLoS One, 2014,9(12):e115204.
- [3] Huang RF,Wei YJ,Inbaraj BS,et al. Inhibition of colon cancer cell growth by nanoemulsion carrying gold nanoparticles and lycopene [J]. Int J Nanomedicine,2015,10:2823-2846.
- [4] Sachita K,Kim Y,Yu HJ,et al. In Vitro assessment of the anti-cancer potential of evodiamine in human oral cancer cell lines[J]. Phytother Res,2015,29(8):1145-1151.
- [5] Shen H,Zhao S,Xu Z,et al. Evodiamine inhibits proliferation and induces apoptosis in gastric cancer cells[J]. Oncol Lett,2015,10(1):367-371.
- [6] Tan Q,Liu S,Chen X,et al. Design and evaluation of a novel evodiamine-phospholipid complex for improved oral bioavailability[J]. AAPS PharmSciTech,2012,13(2):534-547.
- [7] 袁誉铭,孙 全,陈学梁,等. 溴吡斯的明磷脂复合物纳米乳体外溶出度与体内吸收的相关性[J]. 第二军医大学学报,2016,37(5):650-653.
- [8] 罗见春,何 丹,尹华峰,等. 姜黄素磷脂复合物的药代动力学评价[J]. 第二军医大学学报,2014,35(7):754-757.
- [9] Rachmawati H,Haryadi BM,Anggadiredja K,et al. Intraoral film containing insulin-phospholipid microemulsion:formulation and in vivo hypoglycemic activity study[J]. AAPS PharmSciTech,2015,16(3):692-707.
- [10] 罗见春,胡雪原,吴建勇,等. 姜黄素羟丙基- β -环糊精磷脂复合物在大鼠体内药代动力学研究[J]. 中药材,2015,38(3):572-575.
- [11] 张 雪,刘宏明,雷婷婷,等. 吴茱萸碱羟丙基- β -环糊精分子包合物的药代动力学[J]. 南方医科大学学报,2016,36(4):548-551.
- [12] 孙 全,杨 林,陈学梁,等. 溴吡斯的明纳米乳体外释放行为评价[J]. 中国医院药学杂志,2015,35(2):132-135.
- [13] Tariq M,Singh AT,Iqbal Z,et al. Investigative approaches for oral delivery of anticancer drugs:a patent review[J]. Recent Pat Drug Deliv Formul,2016,10(1):24-43.
- [14] 罗见春,何 丹,杨 梅,等. 去甲氧基姜黄素羟丙基- β -环糊精在体肠吸收特征[J]. 第二军医大学学报,2016,37(2):247-250.
- [15] Gavaraskar K,Dhulap S,Hirwani RR. Therapeutic and cosmetic applications of evodiamine and its derivatives—a patent review[J]. Fitoterapia,2015,106:22-35.

(责任编辑:冉明会)