

吴茱萸碱衍生物纳米粒体内药动学和生物等效性研究

杨 兰¹, 万 坤², 杨建波¹, 晏声蕾¹, 张奇娆¹, 张景勍¹, 胡雪原^{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. 四川省眉山市心脑血管病医院, 四川 眉山 620020

摘要: 目的 研究吴茱萸碱丁酰基衍生物 (evodiamine butyryl derivative, EAB) 及其固体脂质纳米粒 (evodiamine butyryl derivative-loaded lipid nanoparticles, EABLN) 在大鼠体内的药动学行为并比较其生物等效性。方法 采用薄膜超声法制备 EABLN, 将 16 只 SD 雄性大鼠随机分为 2 组, 分别 ig EAB 或 EABLN (100 mg/kg), 并在给药后的各个时间点对大鼠进行眼眶后静脉丛取血, 建立高效液相色谱方法测定 EAB 的血药浓度; 用 DAS 软件分析各药动学数据并比较生物等效性。结果 EABLN 的主要药动学参数 $AUC_{0-72\text{ h}}$ 、 C_{max} 和 t_{max} 分别为 $(11\,535.39 \pm 261.08) \mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ 、 $(886.73 \pm 15.40) \mu\text{g/L}$ 和 $(2.00 \pm 0.17) \text{ h}$, EABLN 的相对生物利用度为 143%。EAB 和 EABLN 的 $AUC_{0-72\text{ h}}$ 和 C_{max} 生物等效性合格, 但 t_{max} 生物等效性不合格。结论 EABLN 改善了 EAB 在大鼠体内的药动学行为, 明显提高了 EAB 的口服生物利用度, 且 EABLN 与 EAB 之间不具有生物等效性。

关键词: 吴茱萸碱; 吴茱萸碱丁酰基衍生物; 固体脂质纳米粒; 药动学; 生物等效性

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)09-2114-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.09.021

Pharmacokinetics and bioequivalence of evodiamine butyryl derivative-loaded lipid nanoparticles in rats

YANG Lan¹, WAN Kun², YANG Jian-bo¹, YAN Sheng-lei¹, ZHANG Qi-rao¹, ZHANG Jing-qing¹, HU Xue-yuan¹

1. Medicine Engineering Research Center, College of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

2. Meishan Cardio Cerebrovascular Disease Hospital, Meishan 620020, China

Abstract: Objective To study the pharmacokinetic characteristics and bioequivalence of evodiamine butyryl derivative (EAB) and evodiamine butyryl derivative-loaded lipid nanoparticles (EABLN) in rats. **Methods** EABLN were prepared by a film ultrasound method, 16 male SD rats were randomly divided into two groups, and their blood were extracted from eye socket after they were intragastric administrated EAB or EABLN (100 mg/kg) for a given time period. Plasma concentration of EAB was determined by HPLC, then pharmacokinetic data, bioequivalence between EAB and EABLN were analyzed by DAS software. **Results** The main pharmacokinetic parameters of EABLN were listed, $AUC_{(0-72\text{ h})}$, C_{max} , and t_{max} were $(11\,535.39 \pm 261.08) \mu\text{g}\cdot\text{h/L}$, $(886.73 \pm 15.40) \mu\text{g/L}$, and $(2.00 \pm 0.17) \text{ h}$, respectively. Relative bioavailability of EABLN to EAB was 143%, the bioequivalence of $AUC_{(0-72\text{ h})}$ and C_{max} in EAB and EABLN were eligible, but bioequivalence of t_{max} was not eligible. **Conclusion** EABLN improved the pharmacokinetics of EAB in rats, meanwhile, oral bioavailability of EAB was significantly increased, and there was not bioequivalence between EABLN and EAB.

Key words: evodiamine; evodiamine butyryl derivative; solid lipid nanoparticle; pharmacokinetics; bioequivalence

吴茱萸碱 (evodiamine, EA) 是从芸香科植物吴茱萸 *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. 的干燥成熟果实中提取得到的一种吲哚喹啉类生物碱, 具有抗

癌、镇痛、减肥、降血压、抗炎、保护心脏等多种功效^[1-2]。研究报道^[3-4], EA 具有广泛的抗癌活性, 对肺癌、肝癌等多种癌症均有显著的治疗作用。但

收稿日期: 2018-01-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30973645); 重庆市研究生科研创新项目资助 (CYS17172); 重庆医科大学大学生科学研究与创新实验项目 (201724)

作者简介: 杨 兰 (1993—), 女, 在读硕士, 研究方向为药物新剂型与新技术。E-mail: 1670154703@qq.com

*通信作者 胡雪原 (1971—), 女, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为药物合成与研究。Tel: 13308366296 E-mail: xueyuanhu96@163.com

EA 的水溶性和渗透性均极差, 其绝对生物利用度低至 0.1%^[5], 使得 EA 很难被临床上广泛使用。

本课题组采用化学结构修饰的方法, 在 EA 的 N-13 位引入丁酰基, 合成了水溶性和渗透性均增强的 EA 丁酰基衍生物 (evodiamine butyryl derivative, EAB, 图 1)。前期体内外研究已经表明, EAB 仍具有明显的抗肿瘤作用, 但仅通过化学结构修饰对 EA 口服生物利用度的提高很有限。本实验结合了纳米制剂技术的优点, 将 EAB 制备成 EAB 固体脂质纳米粒 (evodiamine butyryl derivative-loaded lipid nanoparticles, EABLN)。固体脂质纳米粒 (solid lipid nanoparticle, SLN) 可增强药物的溶解度和渗透性、延长药物的半衰期, 并实现缓释效应, 常被作为难溶性药物的载体, 以提高药物的口服生物利用度, 降低毒副作用, 尤其适用于难溶性抗肿瘤药物的靶向治疗^[6]。本实验首次研究了 EABLN 在大鼠体内的药动学行为, 并比较了 EAB 与 EABLN 之间的生物等效性。为 EAB 在临床上的应用提供一定的参考。

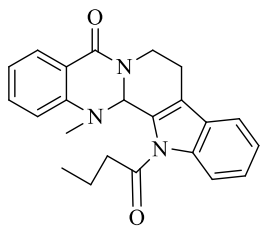


图 1 EAB 的化学结构

Fig. 1 Chemical structural of EAB

1 材料

1.1 药品

EAB (实验室自制^[7], 分子式 $C_{23}H_{23}N_3O_2$, 淡黄色针状结晶, 质量分数 >99.1%); 对照品和厚朴酚 (质量分数 >99%, 批号 201614) 购自中国食品药品检定研究院。

1.2 试剂

单硬脂酸甘油酯 (成都科龙化工试剂厂); 注射用大豆卵磷脂 (上海太伟药业有限公司); 甲醇 (色谱纯, 美国新天地科技有限公司); 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na, 国药集团化学试剂有限公司); 聚山梨酯-80 (成都科龙化工试剂厂), 其余试剂为分析纯。

1.3 仪器

Agilent1100 液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); AB 204 S 电子分析天平 (瑞士 Mettler Toledo 仪器公司); RE-2000 型旋转蒸发器 (上海亚荣有限公

司); SHZ-D (III) 型循环水式真空泵 (巩义市予华仪器有限责任公司); G20 型医用离心机 (北京白洋医疗器械有限公司); Nano-ZS90 型马尔文粒径测定仪 (英国马尔文公司)。

1.4 实验动物

清洁级 SD 雄性大鼠 16 只, 体质量 230~270 g, 由重庆医科大学实验动物中心提供, 许可证号 SCXK (渝) 2017-0001。

2 方法与结果

2.1 EABLN 的制备和表征

采用薄膜超声法制备 EABLN。称取适量 EAB、单硬脂酸甘油酯 100 mg、大豆卵磷脂 150 mg 溶于适量无水乙醇中, 待充分溶解后旋蒸除去溶剂, 形成均匀分布的薄膜。加入 3% 的聚山梨酯-80 溶液 300 mg, 超声至薄膜完全脱落, 即得乳白色 EABLN 混悬液。测定 EABLN 的平均粒径为 245 nm, 平均电位为 -27.51 mV, 平均包封率为 86.31%。

2.2 EAB 混悬液的制备

称取一定量的 EAB, 加入到 0.5% 的 CMC-Na 水溶液中, 超声后形成均匀分散的 EAB 混悬液。

2.3 EAB 及和厚朴酚对照品储备液的制备

准确称量 10 mg EAB, 用适量甲醇溶解后, 移至 100 mL 量瓶中, 定容至刻度, 得 EAB 储备液。取适量储备液配制成质量浓度为 0.3、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 $\mu\text{g/mL}$ 的 EAB 系列对照品溶液。

准确称量和厚朴酚对照品 5 mg, 移至 100 mL 棕色量瓶中, 甲醇定容至刻度, 得和厚朴酚内标溶液。

2.4 给药方案和样本处理

实验前将 16 只 SD 雄性大鼠随机分为 2 组, 每组 8 只, 禁食 12 h (自由饮水) 后, 分别 ig EAB 或 EABLN (100 mg/kg), 并分别在给药后 0、0.083、0.25、0.50、0.75、1、2、5、8、12、24、48、72 h 对大鼠进行眼眶后静脉丛取血, 将血样置于肝素化管中, 混匀, 离心 5 min (12 000 r/min), 吸取上层血浆, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。

2.5 血浆样品的处理

吸取 200 μL “2.4” 项下血浆样品后, 按文献报道的方法^[8]先后加入一定量的内标物和厚朴酚、氨水及乙醚, 充分混匀后离心。取少许得到的上清液经 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴挥干乙醚后, 加入甲醇, 混匀后离心, 分离上清液备用。

2.6 色谱条件

色谱柱为 Chrospher C_{18} 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6

mm, 5 μ m), 柱温 30 $^{\circ}$ C, 流动相为水-甲醇 (25 : 75), 体积流量 1 mL/min, 检测波长 240 nm, 进样量 40 μ L。

2.7 方法学考察

2.7.1 标准曲线及定量限 精密量取 200 μ L 空白血浆, 加入 40 μ L EAB 系列对照品溶液, 得 EAB 系列血浆样品溶液, 按“2.5”项下方法处理后, 按照“2.6”项色谱条件进样分析。以 EAB 峰面积和内标峰面积的比值 (Y) 对 EAB 的质量浓度 (C) 做线性回归, 求得 EAB 线性回归方程: $Y=4.621\ 0\ C+0.015\ 0$ ($r=0.999\ 4$), EAB 在 0.05~0.5 μ g/mL 呈良好的线性关系, 定量限为 0.05 μ g/mL。

2.7.2 精密度试验 取大鼠空白血浆 200 μ L, 加入 EAB 对照品溶液, 分别制备质量浓度为 0.05、0.25、0.5 μ g/mL 的血浆样品溶液各 5 份, 按“2.5”项下方法处理后, 按照“2.6”项下色谱条件进样分析, 在同 1 d 内考察日内精密度, 在连续 3 d 内考察日间精密度, 得到 3 个质量浓度 EAB 血浆样品的日内精密度分别为 4.17%、5.69%、3.19%, 日间精密度分别为 4.21%、3.66%、5.47%。实验结果表明本方法的精密度符合方法学要求。

2.7.3 回收率试验 量取大鼠空白血浆 200 μ L, 加入 EAB 对照品溶液, 分别制备质量浓度为 0.05、0.25、0.50 μ g/mL 的血浆样品溶液各 5 份, 按“2.5”项下方法处理后, 按照“2.6”项下色谱条件进样分析, 测定血浆样品中 EAB 及内标的峰面积, 并分别与空白血浆经相同方法处理后的残渣加入 EAB 对照品溶液制备的相同质量浓度的峰面积比较, 计算 EAB 提取回收率和方法回收率。3 个质量浓度的 EAB 血浆样品提取回收率分别为 103.21%、97.38%、105.17%, 方法回收率分别为 109.14%、97.21%、103.55%。实验结果表明本方法的回收率符合生物样品分析要求。

2.8 EABL N 的药动学研究和生物等效性比较

采用 DAS 软件 (2.1.1 版) 分析处理所有的药动学数据, 结合统计矩法分别对 EAB 和 EABL N 进行房室模型拟合, 并比较它们之间的口服生物利用度差异。采用 SPSS 17.0 统计软件分析所有数据, 检验方法为配对 t 检验 ($\alpha=0.05$), 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2.8.1 平均血药浓度-时间曲线 结果如图 2 所示, EAB 和 EABL N 经单次 ig 给药后, 在大鼠体内表现出明显的吸收、分布和消除过程。且 EABL N 的药时曲线下面积 (AUC) 明显大于 EAB, 峰浓度

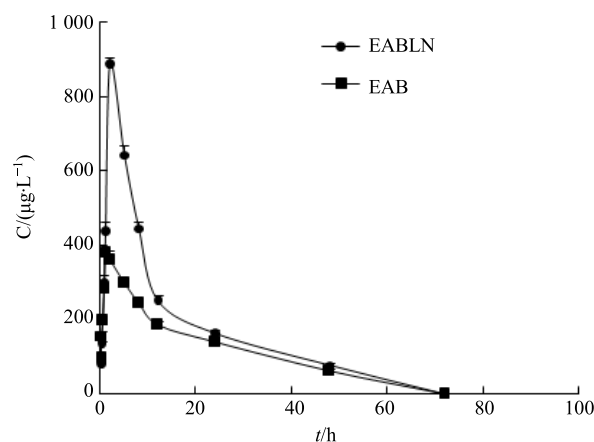


图 2 大鼠 ig 给予 EAB 或 EABL N 后的平均血药浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 2 Mean plasma concentration-time curve of EAB or EABL N after intragastric administration in rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

($C_{\max}$) 也大于 EAB, 但 EAB 的达峰时间 ($t_{\max}$) 小于 EABL N, 在 72 h 二者的血药浓度均为 0。这表明在相同剂量下 EABL N 被机体的吸收程度更大, 但吸收速度更缓慢。

2.8.2 主要药动学参数和统计分析 非房室模型下 EAB 和 EABL N 在 SD 大鼠体内的主要药动学参数见表 1。EABL N 的 $AUC_{0-72\ h}$ 、 $C_{\max}$ 、 $t_{\max}$ 分别是 EAB 的 1.53、2.29、1.50 倍, 以 EAB 为参比制剂, EABL N 的相对生物利用度为 153%。表明 EABL N 显著增大了 EAB 的口服生物利用度。但 EABL N 的 $MRT_{0-72\ h}$ 、表观分布容积 (V_d)、清除率 (CL) 均低于 EAB, 分别是 EAB 的 85.51%、69.29%、67.57%, 表明 EABL N 在体内分布相对较集中, 且更不容易被清除, 从而增强了靶点部位的药物浓度, 减少了 EAB 对机体其他部位的损害, 延长了其作用时间。

房室模型下 EAB 和 EABL N 在 SD 大鼠体内的主要药动学参数见表 2。EABL N 的 $AUC_{0-72\ h}$ 、 $C_{\max}$ 、 $t_{\max}$ 分别是 EAB 的 1.43、2.30、1.50 倍, 且吸收速率常数 (K_a) 比 EAB 减小了 $1.11\ h^{-1}$, CL 减少约 27%, 以 EAB 为参比制剂, EABL N 的相对生物利用度为 143%。结果说明 EABL N 能增强 EAB 的吸收程度, 但减缓了 EAB 吸收速度, 并降低了机体清除率。

综合以上结果可看出, 在大鼠体内, 非房室模型和房室模型中 EABL N 均改善了 EAB 的药动学行为, 显著提高了 EAB 的口服生物利用度。

2.8.3 生物等效性比较 采用 DAS 软件 (2.1.1 版)

表 1 非房室模型下 EAB 和 EABLN 的主要药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Non-compartment main pharmacokinetic model parameters of EAB and EABLN ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

参数	单位	EAB	EABLN
AUC _{0~72 h}	μg·h·L ⁻¹	7 531.20±337.12	11 535.39±261.08**
C _{max}	μg·L ⁻¹	386.24±9.06	886.73±15.40**
t _{max}	h	1.33±0.52	2.00±0.17*
MRT _{0~72 h}	h	16.63±0.42	14.22±0.34
V _d	L·kg ⁻¹	315.98±23.92	218.93±7.44
CL	L·h ⁻¹ ·kg ⁻¹	10.73±0.61	7.25±0.25**

与 EAB 组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下同

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs EAB group, same as below

表 2 房室模型下 EAB 和 EABLN 的主要药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Compartment main pharmacokinetic model parameters of EAB and EABLN ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

参数	单位	EAB	EABLN
AUC _{0~72 h}	μg·h·L ⁻¹	7 660.03±328.92	10 932.89±400.33**
C _{max}	μg·L ⁻¹	386.24±9.06	886.73±15.40**
t _{max}	h	1.33±0.52	2.00±0.17*
K _a	h ⁻¹	2.30±0.26	1.19±0.08**
CL	L·h ⁻¹ ·kg ⁻¹	10.70±0.62	7.82±0.35**
t _{1/2}	h	18.71±1.19	14.78±0.53**

表 3 EAB 和 EABLN 在大鼠体内的生物等效性比较

Table 3 Bio-equivalence comparison of EAB and EABLN in rats

参数	90%置信区间	P 值	生物等效性标准	生物等效性结果
AUC _{0~72 h}	104.1%~105.0%	—	80%~125%	等效
C _{max}	113.6%~114.3%	—	70%~143%	等效
t _{max}	—	<0.05	>0.05	不等效

究报道。

本研究比较了 EAB 和 EABLN 的体内药动学行为和生物等效性, 结果显示 EABLN 显著改善了 EAB 的药动学特征, 且 EABLN 和 EAB 之间生物不等效, 说明了纳米制剂技术在提高药物生物利用度方面起着至关重要的作用。EABLN 能改善 EAB 药动学行为的原因主要是: (1) 采用薄膜超声法制备得到粒径大小分布均匀的 EABLN, 这有利于 EABLN 稳定存在, 进一步保证了抗癌的靶向性能。与其他 SLN 的制备方法相比, 薄膜超声法具有操作简单、快速可靠、包封率高且辅料用量低的优点^[10]。(2) 药用辅料, 包括强脂溶性的单硬脂酸甘油酯和

将 3 个重要的药动学参数 AUC_{0~72 h}、C_{max} 和 t_{max} 经对数转换后采用多因素方差分析进行显著性检验, 然后用双单侧 t 检验和计算 90%置信区间的统计分析方法, 比较 EAB 与 EABLN 之间的生物等效性(表 3)。结果显示 AUC_{0~72 h} 和 C_{max} 的 90%置信区间均在各自的生物等效性标准范围内, 因此 EAB 和 EABLN 的 AUC_{0~72 h} 和 C_{max} 生物等效性合格。Wilcoxon 非参数法检验结果显示 EAB 和 EABLN 的 t_{max} 有统计学差异, 不符合 t_{max} 的生物等效性标准 ($P > 0.05$), 因此 EAB 和 EABLN 的 t_{max} 生物等效性不合格。综合 AUC_{0~72 h}、C_{max} 和 t_{max} 的生物等效性结果可知, EAB 和 EABLN 不具有生物等效性。

3 讨论

由于 EA 的水溶性和渗透性极低^[5], 不易被胃肠道吸收, 导致其口服生物利用度极低。据文献报道^[9]EAB 的水溶性是 EA 的 17 倍, 渗透性是 EA 的 2 倍。所以 EAB 在一定程度上改变了 EA 的理化性质, 且本课题组研究表明 EAB 也具有相同的抗癌作用, 因此与 EA 相比, EAB 更有望取代 EA 被运用于临床治疗和科学研究中。本实验首次结合化学结构修饰和纳米制剂技术, 成功制备得到了 EABLN, 并建立了合适的高效液相色谱方法分离并分析大鼠血浆中 EAB 的含量, 该方法的准确度和精密度均符合分析测定要求, 目前国内外暂无对 EABLN 的研

注射用大豆卵磷脂, 磷脂是生物膜的重要组成部分, 2 种脂溶性的辅料包裹 EAB 后会使制剂的脂溶性增强, 促进药物被胃肠道吸收, 从而增加了 EAB 的口服生物利用度。

参考文献

- [1] 晏声蕾, 胡江波, 王 薛, 等. 吴茱萸碱油包水型复合纳米乳的药代动力学和在体肠吸收 [J]. 第二军医大学学报, 2017, 38(2): 249-252.
- [2] 石海莲, 郑沁乐, 吴大正. 吴茱萸碱对肥胖并发血管肥厚的作用研究 [J]. 中国药理学通报, 2011, 27(12): 1687-1692.
- [3] Mohan V, Agarwal R, Singh R P. A novel alkaloid,

- evodiamine causes nuclear localization of cytochrome-c and induces apoptosis independent of p53 in human lung cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 477(4): 1065-1071.
- [4] Jiang J, Hu C. Evodiamine: A novel anti-cancer alkaloid from *Evodia rutaecarpa* [J]. *Molecules*, 2009, 14(5): 1852-1859.
- [5] Shyr M, Lin L, Lin T, *et al.* Determination and pharmacokinetics of evodiamine in the plasma and feces of conscious rats [J]. *Anal Chim Acta*, 2006, 558(1): 16-21.
- [6] Kharaji M H, Doroud D, Taheri T, *et al.* Drug targeting to macrophages with solid lipid nanoparticles harboring paromomycin: An *in vitro* evaluation against *L. major* and *L. tropica* [J]. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2016, 17(5): 1110-1119.
- [7] 杨 兰, 万 坤, 杨建波, 等. 吴茱萸碱丁酰基衍生物固体脂质纳米粒的体外释放及在体胃肠吸收研究 [J]. 中国药理学通报, 2018, 34(5): 724-728.
- [8] Hu J, Chen D, Jiang R, *et al.* Improved absorption and *in vivo* kinetic characteristics of nanoemulsions containing evodiamine-phospholipid nanocomplex [J]. *Int J Nanomed*, 2014, doi: 10.2147/IJN.S59812.
- [9] 万 坤. 吴茱萸碱衍生物 EVB 的合成及其纳米粒的初步评价 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2014.
- [10] 琚 辉, 郝存江, 尹 飞, 等. 姜黄素固体脂质纳米粒的制备及表征 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(6): 420-426.