

DOI:10.16781/j.0258-879x.2016.11.1387

• 研究快报 •

吴茱萸碱羟丙基- β -环糊精包合物大鼠在体肠吸收特征

张雪, 刘宏明, 雷婷婷, 邓罗文, 张景劼*

重庆医科大学重庆高校药物工程研究中心, 重庆 400016

[摘要] **目的** 研究吴茱萸碱(EVO)羟丙基- β -环糊精包合物(EHD)的大鼠在体肠吸收特征。**方法** 制备 EHD 并测定其理化性质。将健康雄性 SD 大鼠随机分为 2 组, 运用单向肠灌注模型对大鼠各肠段 EVO 的吸收情况进行考察, 使用 HPLC 法测定 EVO 的含量: Lichrospher C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m), 流动相为甲醇:水=75:25(体积比), 流速 1.0 mL/min, 检测波长 225 nm, 柱温 35℃, 并对吸收速率常数(K_a)及有效渗透系数(P_{eff})进行计算。**结果** EHD 的傅里叶红外扫描图谱中, EVO 特征吸收峰减弱; 差示扫描量热图谱中, EVO 的吸热峰明显减小; EHD 的电镜下形态与 EVO 和羟丙基- β -环糊精的物理混合物明显不同; 肠灌注液中 EVO 的回收率与精密度均符合要求。EHD 在十二指肠、空肠、回肠、结肠中的 K_a 值分别为 EVO 的 9.07、16.22、11.04、28.86 倍, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); P_{eff} 值分别为 EVO 的 2.41、1.52、1.82、1.09 倍, 在十二指肠处差异有统计学意义 ($P<0.05$), 在其他肠段处差异均无统计学意义。**结论** EHD 能使 EVO 在大鼠体内的肠吸收得到明显改善。

[关键词] 吴茱萸碱; 包合物; 高效液相色谱法; 在体肠吸收

[中图分类号] R 961 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2016)11-1387-05

Intestinal absorption characteristics of evodiamine hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex in rats

ZHANG Xue, LIU Hong-ming, LEI Ting-ting, DENG Luo-wen, ZHANG Jing-qing*

Chongqing Medicine Engineering Research Center, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

[Abstract] **Objective** To study the intestinal absorption characteristics of evodiamine (EVO) hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex (EHD) in rats. **Methods** EHD was prepared and its physicochemical properties were determined. Healthy male SD rats were randomly divided into two groups. One-way intestinal perfusion rat model was employed to investigate the intestinal absorption of EVO in each segment. The concentrations of the EVO were determined by HPLC (Lichrospher C₁₈ column [250 mm×4.6 mm, 5 μ m]), with the mobile phase being methanol-water (75:25), flow rate being 1.0 mL/min, the detection wavelength being set at 225 nm, and the column temperature being 35℃. The absorption rate constants (K_a) and effective permeability coefficients (P_{eff}) were calculated. **Results** The characteristic endothermal peak of EVO was decreased in the fourier transform infrared spectroscopy of EHD, and differential scanning calorimetry (DSC) of EHD showed that the endothermic peak of EVO was greatly reduced. The morphological character of EHD under electron microscope was obviously different from that of the physical mixture of EVO and hydroxypropyl- β -cyclodextrin. The coefficient of recovery and precision of EVO in the intestinal perfusion liquid met the requirement. The K_a values of EHD in the duodenum, jejunum, ileum, and colon were 9.07, 16.22, 11.04, and 28.86 folds that of the free EVO, respectively, showing significant differences between the two groups ($P<0.05$). The P_{eff} values of EHD in the duodenum, jejunum, ileum, and colon were 2.41, 1.52, 1.82, and 1.09 folds that of the free EVO, respectively, showing significant difference between the two groups only at the duodenum ($P<0.05$), not at the jejunum, ileum or colon. **Conclusion** EHD can significantly improve the intestinal absorption of the EVO in rats.

[Key words] evodiamine; inclusion complex; high performance liquid chromatography; *in situ* intestinal absorption

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37(11): 1387-1391]

[收稿日期] 2016-01-25 **[接受日期]** 2016-06-21

[基金项目] 重庆市科委资助项目 (csct2015jcyjBX0027). Supported by Grants from Chongqing Science and Technology Committee (csct2015jcyjBX0027).

[作者简介] 张雪, 硕士生. E-mail: zhangxue921106@163.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 023-68485161, E-mail: zjqrac01@163.com

吴茱萸碱(evodiamine, EVO)是植物吴茱萸中一种色胺吲哚类生物碱^[1]。EVO具有抗肿瘤、抗炎、扩张血管、降血压、减肥、免疫抑制等药理作用^[2],抗肿瘤活性是其最受关注的药理活性之一^[3-5]。但EVO水溶性极差,生物利用度低。包合物作为新的药物载体能够提高难溶性药物的溶解性,提高药物的疗效、减少药物对皮肤黏膜以及胃部的刺激性^[6]。近年来少有研究对EVO及其制剂的在体肠吸收进行报道,本课题首次将EVO与羟丙基-β-环糊精(hydroxypropyl-β-cyclodextrin, HP-β-CD)制备成吴茱萸碱羟丙基-β-环糊精包合物(evodiamine hydroxypropyl-β-cyclodextrin inclusion complex, EHD),并采用单向肠灌注法研究EHD在大鼠各肠段的吸收特征,为EVO的临床研究提供一定依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 药品与试剂 EVO(纯度>99%,武汉远城科技发展有限公司);HP-β-CD(>99%,江苏泰兴新鑫医药辅料有限公司);Krebs-Ringer 缓冲液^[7](自制:NaCl 7.80 g, KCl 0.35 g, CaCl₂ 0.37 g, NaHCO₃ 1.37 g, KH₂PO₄ 0.32 g, MgCl₂ 20 mg, D-葡萄糖1.40 g,蒸馏水溶解定容至1 000 mL, HCl和NaOH调节pH至6.5);甲醇(色谱纯,上海国药集团化学试剂有限公司);其余试剂均为分析纯。

1.1.2 仪器与设备 1100型高效液相色谱仪(美国Agilent公司);STA449型综合热分析仪(德国Netzsch公司);HL-1型恒流泵(上海青浦沪西仪器厂);TGL-16B型高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂);HHS-4S型电子恒温不锈钢水浴锅(上海康路仪器设备有限公司)。

1.1.3 实验动物 清洁级雄性SD大鼠购自重庆医科大学实验动物中心[动物许可证号:SCXK(渝)2012-0001],体质量(250±20)g。

1.2 EHD的制备 按处方量(HP-β-CD与EVO的摩尔比为1:1)称取约120 mg HP-β-CD和30 mg EVO于干净的研钵内,加蒸馏水后研磨1 h,40℃真空干燥2 h,用丙酮洗涤,干燥后即得EHD。

1.3 EHD理化性质的检测

1.3.1 傅里叶红外光谱分析 采用KBr压片法分

别对EVO、HP-β-CD、EVO与HP-β-CD的物理混合物以及EHD在400~4 000 cm⁻¹内进行红外扫描^[8]。

1.3.2 差示扫描量热分析 以空铝坩埚为对照物,另一铝坩埚加入10 mg样品,升温速率为10℃/min,扫描范围0~350℃,量程±25 V,气体为氮气^[9]。分别对EVO、HP-β-CD、EVO与HP-β-CD的物理混合物和EHD进行差示扫描量热分析。

1.3.3 光镜分析 分别取少量的EVO、HP-β-CD、EVO与HP-β-CD的物理混合物和EHD置于不同的载玻片上,将载玻片置于显微镜上,放大200倍观察并照相。

1.4 HPLC含量测定方法的建立

1.4.1 色谱条件 所用色谱柱为大连依利特Lichrospher C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);柱温35℃;流动相甲醇:水=75:25(体积比),流速1.0 mL/min;检测波长225 nm;进样量20 μL。

1.4.2 样品处理 取适量待测肠灌注液,加入适量甲醇,涡旋混合5 min,16 000×g离心10 min,吸取上清液待测。

1.4.3 专属性实验 按照1.4.1项下色谱条件,将空白肠灌注液、EVO对照品溶液、EHD肠灌注液按1.4.2项处理后分别进样,考察其专属性。

1.4.4 标准曲线的建立 精密称取EVO 10.5 mg,用适量甲醇溶解后,转移至100 mL棕色容量瓶中,甲醇定容至刻度,摇匀,得100 μg/mL对照品溶液。精密量取对照品溶液100、300、500、1 000、2 000、3 000、4 000 μL,分别置于10 mL棕色容量瓶中,加甲醇稀释,定容,摇匀,得到质量浓度为1~40 μg/mL的系列标准溶液。分别取各标准溶液20 μL进样,记录峰面积,以峰面积(A)对EVO的浓度(C)进行线性回归。

1.4.5 精密度和回收率 分别制备低、中、高质量浓度(1、10、30 μg/mL)的EVO溶液,各质量浓度分别平行配制3份,测定回收率。同日内每个浓度连续进样5次,计算日内精密度;连续5 d测定浓度,计算日间精密度。

1.4.6 肠灌注液的稳定性 用大鼠空白肠灌注液配制低、中、高质量浓度(1、10、30 μg/mL)的EVO溶液,各质量浓度平行配制3份,置于(37.0±0.5)℃的水浴中孵育,分别于0、1、2、4 h取样测定EVO含量。

1.5 灌流液的配制

1.5.1 EVO 灌流液的配制 称取 EVO 18.0 mg, 用 Krebs-Ringer 液稀释并定容至 200 mL, 配制成质量浓度为 90 μg/mL 的 EVO 灌流液。

1.5.2 EHD 灌流液的配制 称取含 EVO 18.0 mg 的 EHD, 用 Krebs-Ringer 液稀释并定容至 200 mL, 配制成质量浓度为 90 μg/mL 的 EHD 灌流液。

1.6 大鼠肠灌流实验 将 SD 大鼠随机分成 2 组, 禁食 12 h, 全程不禁水, 分别用 EVO 及 EHD 进行在体肠灌流实验。每只大鼠分别腹腔注射 3.5% 水合氯醛 (10 mL/kg) 麻醉后固定。沿腹中线打开腹腔约 3 cm。分别在十二指肠上端和往下 10 cm 处、空肠上端和往下 10 cm 处、盲肠上端往上 10 cm 处, 以及结肠上端往下 10 cm 处剪开一个小口, 插管结扎。将这 4 个肠段用生理盐水浸润的纱布盖上, 并将肠内容物冲洗干净。将 100 mL Krebs-Ringer 循环液放入恒温水浴 (37℃) 中, 再将恒温至 37℃ 的 Krebs-Ringer 液以 0.4 mL/min 流速在肠段灌流 10 min, 平衡后将 Krebs-Ringer 液排空。然后换 15 mL 的 EHD 或 EVO 药物循环液 (相当于含 EVO 90 μg/mL), 以流速 0.25 mL/min 进行单向灌流实验。4 肠段出口处分别用 25 mL 的容量瓶接流出液体, 1 h 后结束灌流实验。

取下 4 个 25 mL 容量瓶用 Krebs-Ringer 液稀释至刻度。实验结束后处死大鼠, 剪下肠段, 测量长度 (L) 和内径 (R), 计算药物的吸收速率常数 (K_a) 和有效渗透系数 (P_{eff})。 $K_a = (X_0 - X_t) / C_0 t \pi R^2 L$; $P_{\text{eff}} = Q \times \ln(X_{\text{in}} / X_{\text{out}}) / 2 \pi R L$; 其中, X_0 为 0 时药物量, X_t 为 t 时灌流液中剩余药物量, C_0 为 0 时药物浓度, t 为灌注时间, Q 为流速, X_{in} 和 X_{out} 分别为流入和流出的药物量, R 和 L 分别为各灌流肠段的内径和长度^[10]。

1.7 统计学处理 应用 Origin 8 软件分别对 K_a 和 P_{eff} 进行统计学分析, 检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 EHD 傅里叶红外光谱扫描结果 由图 1 可知, EVO 的特征吸收峰是 1 144 cm^{-1} (C-N)、1 510 cm^{-1} 和 1 507 cm^{-1} (苯环的吸收峰)、746 cm^{-1} 和 733 cm^{-1} (苯环上的邻位取代基), HP-β-CD 的特征吸收峰是 1 630 cm^{-1} (糖苷键结构), EHD 和 EVO 与 HP-β-CD 的物理混合物图谱中药物特征吸收峰 1 144 cm^{-1} 峰消失, 746 cm^{-1} 和 733 cm^{-1} 峰消失, 代表苯环的 1 510 cm^{-1} 吸收峰减弱, 且 EHD 减弱程度明显强于 EVO 与 HP-β-CD 的物理混合物, 表明 EHD 形成。

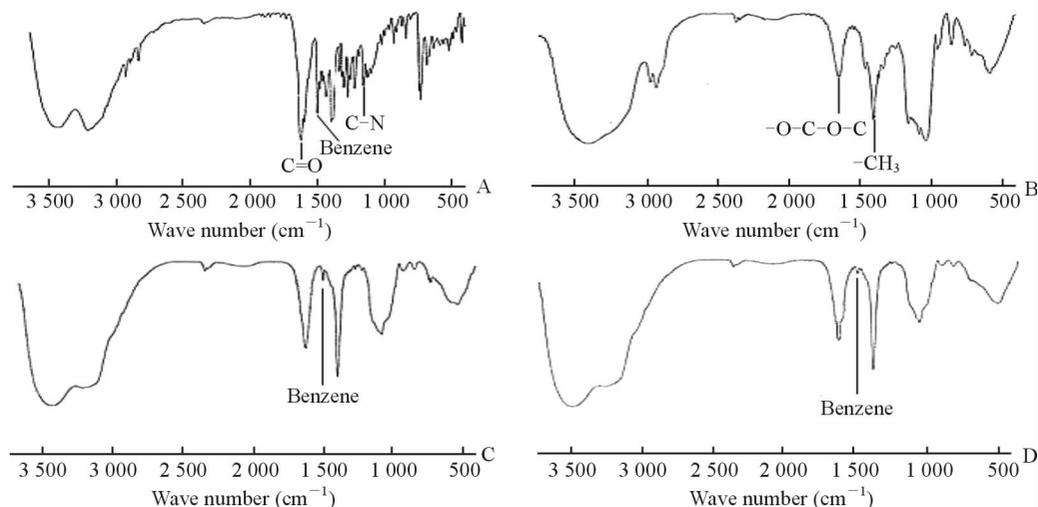


图 1 EVO、HP-β-CD、EVO 与 HP-β-CD 的物理混合物和 EHD 的红外图谱

Fig 1 FTIR of EVO, HP-β-CD, physical mixture and EHD

A: EVO (evodiamine); B: HP-β-CD (hydroxypropyl-β-cyclodextrin); C: Physical mixture (physical mixture of EVO and HP-β-CD); D: EHD (evodiamine hydroxypropyl-β-cyclodextrin inclusion complex). FTIR: Fourier transform infrared spectroscopy

2.2 EHD 差示扫描量热分析结果 由图 2 可知, EVO 在 287.5℃ 有一个吸热峰, 为药物的熔融峰。HP-β-CD 没有吸热峰, EVO 与 HP-β-CD

的物理混合物在该温度时有此吸热峰, 而在 EHD 中该吸热峰明显减小, 表明 EVO 与 HP-β-CD 形成了包合物 EHD。

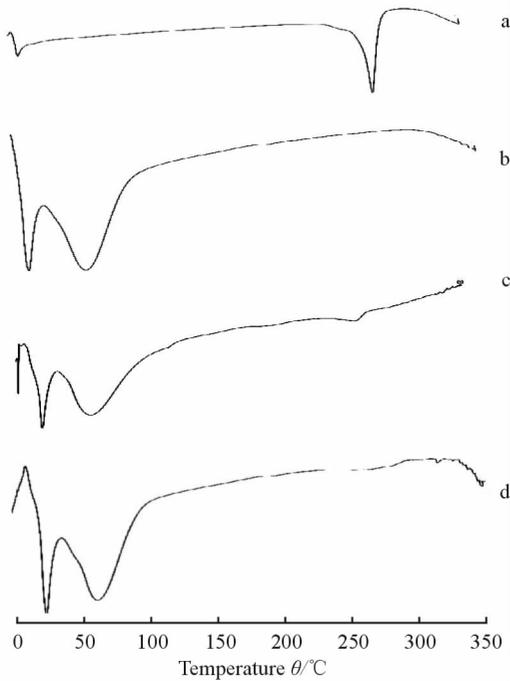


图2 EVO、HP-β-CD、EVO与HP-β-CD的物理混合物和EHD的差示扫描量热法分析图谱

Fig 2 DSC curves of EVO, HP-β-CD, physical mixture and EHD

a: EVO (evodiamine); b: HP-β-CD (hydroxypropyl-β-cyclodextrin); c: Physical mixture (physical mixture of EVO and HP-β-CD); d: EHD (evodiamine hydroxypropyl-β-cyclodextrin inclusion complex). DSC: Differential scanning calorimetry

2.3 EHD在电镜下的形态 由图3D可见有新的物质形成,即形成了包合物EHD,形态与EVO与HP-β-CD的物理混合物明显不同。

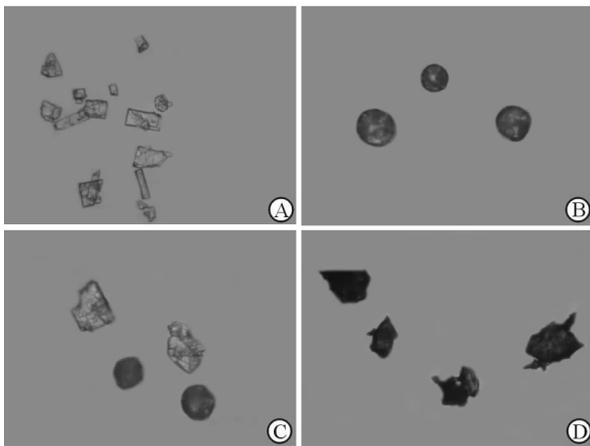


图3 EVO、HP-β-CD、EVO与HP-β-CD的物理混合物和EHD的显微照片

Fig 3 Microphotographs of EVO, HP-β-CD, physical mixture and EHD

A: EVO (evodiamine); B: HP-β-CD (hydroxypropyl-β-cyclodextrin); C: Physical mixture (physical mixture of EVO and HP-β-CD); D: EHD (evodiamine hydroxypropyl-β-cyclodextrin inclusion complex). Original magnification: ×40

2.4 方法学实验

2.4.1 专属性实验 在1.4.1项色谱条件下,EVO峰形良好且辅料不干扰其测定,保留时间为5.7 min。

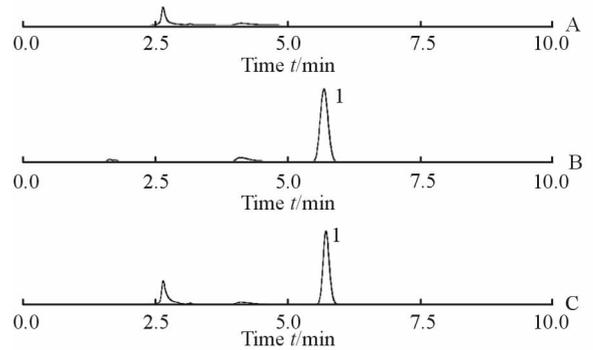


图4 肠灌流液的色谱图

Fig 4 Chromatogram of intestinal perfusion liquid

A: Blank perfusion liquid; B: Reference solution of EVO; C: Perfusion liquid sample. 1: EVO (evodiamine)

2.4.2 标准曲线的建立 建立标准曲线得回归方程: $A = 213.68C - 23.633$, $r = 0.9997$, 结果表明EVO在1~40 μg/mL浓度范围内与峰面积呈良好的线性关系。

2.4.3 精密度和回收率 EVO的平均回收率为99.85%,RSD为0.162%,符合方法学要求。低、中、高浓度的日内精密密度RSD分别为2.2%、1.8%、1.4%,日间精密密度RSD分别为1.2%、2.7%、2.5%,符合方法学要求。

2.4.4 肠灌流液的稳定性 结果显示低、中、高浓度EVO溶液的RSD分别为1.1%、0.9%、0.7%,说明在4 h内EVO肠灌流液稳定性较好。

2.5 大鼠肠灌流实验 由图5可知,EHD在各肠段的Ka值以及P_{eff}值均高于EVO,且EHD在十二指肠、空肠、回肠、结肠中的Ka值分别为EVO的9.07、16.22、11.04、28.86倍,P_{eff}值分别为EVO的2.41、1.52、1.82、1.09倍。EHD在结肠处的Ka值大于十二指肠、空肠、回肠的Ka值(P<0.05);在十二指肠处的P_{eff}值大于空肠、回肠、结肠的P_{eff}值(P<0.05)。EVO在不同肠段的Ka值和P_{eff}值差异均无统计学意义。各肠段EHD与EVO的Ka值差异均有统计学意义(P<0.05);十二指肠处EHD与EVO的P_{eff}值差异有统计学意义(P<0.05),其他肠段处差异均无统计学意义。说明将EVO制备成EHD后能提高EVO的吸收。

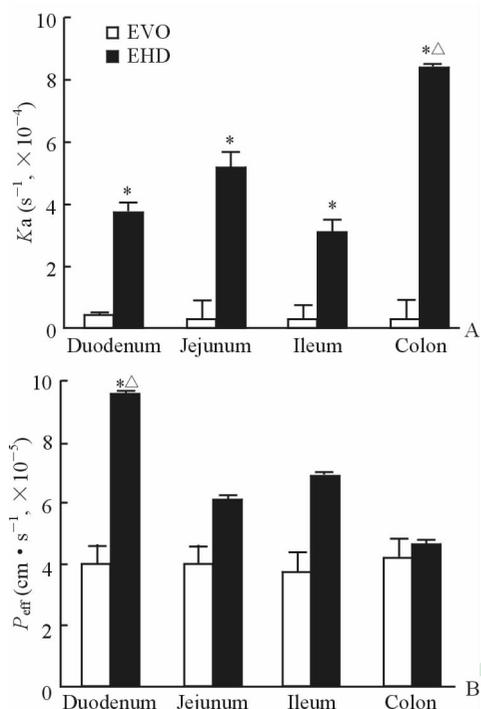


图 5 大鼠各肠段的吸收速率常数 (K_a , A) 和有效渗透系数 (P_{eff} , B)

Fig 5 Absorption rate constants (K_a , A) and effective permeability coefficients (P_{eff} , B) in each intestinal segment
EVO; Evodiamine; EHD; Evodiamine hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex. * $P < 0.05$ vs EVO group; $\Delta P < 0.05$ vs other three EHD groups. $n=3$, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

肠灌注法分为单向灌注法和循环灌注法,它是最接近体内真实吸收状态的药物肠道吸收模型,与体内情况相关性很好,可用于研究药物在肠道的吸收程度及药物透过率等^[11]。其中,单向灌注法是药物肠吸收动力学研究的主要方法。本实验采用单向灌注法对大鼠各肠段药物吸收进行研究。

实验结果表明,EHD 和 EVO 在整个肠段均有吸收,且 EHD 在肠道内的吸收高于游离 EVO。EHD 与 EVO 各肠段间的 K_a 值差异均有统计学意义($P < 0.05$),说明制备成 EHD 后 EVO 在各肠段的吸收都有明显提高;EVO 不同肠段的 K_a 值差异无统计学意义,EHD 的 K_a 值分别为结肠 $>$ 空肠 $>$ 十二指肠 $>$ 回肠,其在结肠处的 K_a 值与十二指肠、回肠、空肠处差异均有统计学意义($P < 0.05$),说明将 EVO 制备成 EHD 后药物在结肠处吸收程度最好。胡江波等^[12]将 EVO 制备成水包油型复方吴茱萸碱纳米乳,并考察其在体肠吸收情况,结果显示 EVO 的 K_a 值是十二指肠大于空肠、回肠、结肠,复方吴茱萸碱纳米乳的 K_a 值是回肠大于空肠、结肠、十二指肠,说明将 EVO 制备成制剂后不同肠段的吸收情况发生了改变。研究表明,根据 P_{eff} 的大小将吸收能力分为 3 类: $P_{eff} < 0.3 \times 10^{-5} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 表明吸收差, $P_{eff} > 2 \times 10^{-5} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 表明吸收完全,介于两

者之间为中等吸收^[7,13]。EHD 和 EVO 在 4 个肠段的 P_{eff} 均大于 $2 \times 10^{-5} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$,表明其在大鼠各肠段的吸收完全。且 EHD 的 K_a 值和 P_{eff} 值与 EVO 相比都有明显的提高。可能是由于 EHD 的组成成分 HP- β -CD 能提高难溶性药物 EVO 的溶解性,减少药物对胃肠道的刺激,促进药物与肠黏膜的融合,从而提高胃肠道对药物的吸收。

[参考文献]

- [1] 晏子俊,李万玉,万 坤,张景勍. HPLC 法测定复方吴茱萸碱纳米乳中吴茱萸碱的含量[J]. 激光杂志,2014, 35:72-73.
- [2] HU J, SUN L, ZHAO D, ZHANG L, YE M, TAN Q, et al. Supramolecular evodiamine loaded water-in-oil nanoemulsions: enhanced physicochemical and biological characteristics[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2014, 88: 556-564.
- [3] SHEN H, ZHAO S, XU Z, ZHU L, HAN Y, YE J. Evodiamine inhibits proliferation and induces apoptosis in gastric cancer cells[J]. Oncol Lett, 2015, 10: 367-371.
- [4] CHEN M C, YU C H, WANG S W, PU H F, KAN S F, LIN L C, et al. Anti-proliferative effects of evodiamine on human thyroid cancer cell line ARO[J]. J Cell Biochem, 2010, 110: 1495-1503.
- [5] BAI X, MENG H, MA L, GUO A. Inhibitory effects of evodiamine on human osteosarcoma cell proliferation and apoptosis[J]. Oncol Lett, 2015, 9: 801-805.
- [6] 徐才兵,贾运涛,田 睿,刘依依,刘玉祺,张良珂. 和厚朴酚羟丙基- β -环糊精包合物制备及验证[J]. 中国药学杂志,2013,48:1385-1388.
- [7] 罗见春,何 丹,杨 梅,吴建勇,张景勍. 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,2016,37:247-250.
- [8] LUO J C, HE D, YANG M, WU J Y, ZHANG J Q. Intestinal absorption characteristics of demethoxycurcumin hydroxypropyl- β -cyclodextrin in rats[J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37: 247-250.
- [9] 恽 菲,徐晓琰,狄留庆,康 安,单进军,赵晓莉,等. 蛇床子素不同环糊精包合物的制备及其生物利用度比较研究[J]. 中草药,2014,45:341-348.
- [10] 曾 倩,纪 晖,唐慧慧,谢学渊. 白杨素-羟丙基- β -环糊精包合物的制备与表征[J]. 药学实践杂志,2014, 32:456-459.
- [11] HU J, CHEN D, JIANG R, TAN Q, ZHU B, ZHANG J. Improved absorption and *in vivo* kinetic characteristics of nanoemulsions containing evodiamine-phospholipid nanocomplex[J]. Int J Nanomedicine, 2014, 9: 4411-4420.
- [12] 谭 蓉,俞桂新,冯年平,赵继会,王 志. 乌药总生物碱的大鼠在体肠吸收研究[J]. 中成药,2011,33:787-790.
- [13] 胡江波,何 丹,吴建勇,万 坤,张景勍. 复方吴茱萸碱纳米乳的体外释放和大鼠在体肠吸收的研究[J]. 华西药理学杂志,2015,30:405-407.
- [14] 何承华,张振海,王 舒,周建平,吕慧侠. 芹菜素大鼠在体肠吸收动力学的研究[J]. 中国中药杂志,2013, 38:1416-1420.