

一种榄香烯口服微乳相对生物利用度的初步研究*

曾昭武^{1,2} 周广林² 王小丽^{3△} 刘星言³ 展晓日²

(1 浙江中医药大学 浙江 杭州 310053 2 杭州师范大学 浙江 杭州 311121 3 广东医学院 广东 东莞 523808)

摘要 目的:研究口服榄香烯微乳在大鼠体内的相对生物利用度。方法:大鼠口服给予榄香烯微乳、榄香烯乳剂后,在不同时间点采血,采用超快速液相色谱法检测血浆榄香烯的浓度,计算其药动学参数与相对生物利用度。结果:榄香烯微乳粒径为 (67 ± 13) nm, Zeta 电位为 (3.2 ± 0.4) mV, pH 值为 5.16, 粘度为 6 mPa·s, 表面张力为 31.7 mN·m⁻¹。榄香烯微乳中 β - 榄香烯含量为 (8.273 ± 0.018) mg·mL⁻¹。榄香烯微乳相对生物利用度为 163.1%。结论:大鼠口服榄香烯微乳与榄香烯口服乳相比其生物利用度有较大提高。

关键词 榄香烯;微乳;口服;相对生物利用度

中图分类号:R944.1 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2012)02-218-03

Study of the Relative Bioavailability of an Elemene Oral Microemulsion*

ZENG Zhao-wu^{1,2}, ZHOU Guang-lin², WANG Xiao-li^{3△}, LIU Xing-yan³, ZHAN Xiao-r²

(1 Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou, 310053, China; 2 Hangzhou Normal University, Hangzhou, 311121, China;

3 Guangdong Medical College, Dongguan, 523808 China)

ABSTRACT Objective: To study the relative bioavailability of an elemene oral microemulsion on rats in vivo. **Methods:** After oral administration of elemene microemulsion and emulsion, blood was taken out from rats at different time. Plasma concentration of elemene was detected by ultra-fast liquid chromatography to calculate its pharmacokinetics parameters and relative bioavailability. **Results:** The elemene microemulsion was characterized as (67 ± 13) nm in size, (3.2 ± 0.4) mV in zeta potential, 5.16 in pH, 6 mPa·s in viscosity, 31.7 mN·m⁻¹ in surface tension, (8.273 ± 0.018) mg·mL⁻¹ in content of β -elemene. The relative bioavailability of elemene microemulsion was 163.1%. **Conclusion:** The relative bioavailability of elemene microemulsion is higher than that of elemene emulsion.

Key words: Elemene; Microemulsion; Oral; Relative bioavailability

Chinese Library Classification: R944.1 Document code: A

Article ID:1673-6273(2012)02-218-03

前言

榄香烯(Elemene)是温莪术抗肿瘤作用的主要物质基础,具有抗癌谱广泛、疗效确切、不良反应少等突出优点^[1]。目前榄香烯乳剂在临床广泛用于恶性浆膜腔积液、肺癌、消化道肿瘤、脑瘤、妇科肿瘤、乳腺癌、皮肤癌等多种肿瘤的治疗^[2,3]。榄香烯主要成分是 β 、 γ 、 δ - 榄香烯三种同分异构体, β - 榄香烯是主要有效成分^[2], 一般选择 β - 榄香烯用于含量测定。微乳是由油相、水相、乳化剂及助乳化剂在适当比例自发形成的一种透明或半透明、低粘度、各向同性且热力学稳定的油水混合系统,其作为药物载体可用于口服液体制剂、经皮给药制剂、眼用制剂和注射剂中,主要具有以下几个优点:①呈各向同性的透明液体,热力学稳定,且可以过滤,易于制备和保存。②可同时增溶不同脂溶性的药物。③药物分散性好,利于吸收,可提高药物的生物利用度。④可延长水溶性药物的释放时间。⑤对于易水解的药物,采用油包水型微乳可起到保护作用。⑥低粘度,注射时不会引起疼痛^[4,5]。由于市售榄香烯口服乳生物利用度较低,因此作者拟将榄香烯制成微乳以期提高生物利用度。

1 材料与方法

1.1 材料

XR-UFLC 型超快速液相色谱仪, XR-ODS 型色谱 C18 柱(2.2 μ m, 75 mm $\times$ 3.0 mm), 日本岛津公司; LS230 型激光粒度分析仪, 美国贝克曼库尔特公司; Zetasizer 3000HS Zeta 电位仪, 英国马尔文公司; NDJ-5S 型数显粘度计, 上海方瑞仪器有限公司; BZY-A 型自动表面张力仪, 上海方瑞仪器有限公司。榄香烯对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 100268-200401), 榄香烯原料药(大连华立金港药业有限公司), 榄香烯口服乳剂(大连华立金港药业有限公司, 规格 0.2 g/20 mL, 批号 0904231)。SD 大鼠, 雌雄不限, 体质量 140~200 g, 由浙江省医学科学院提供, 合格证号 SCXK(浙)2008-0033。

1.2 榄香烯微乳的制备

采用榄香烯挥发油 1 g 作为油相和药物, 乙醇 5 mL、丙二醇 15 mL、甘油 15 mL 作为助表面活性剂, 吐温(80) 5g 作为表面活性剂, 混合后加水 60 mL 水浴超声 1 h, 最后定容至 100 mL 即得。采用激光粒度仪测定榄香烯微乳的平均粒径, Zeta 电

* 基金项目: 国家青年自然科学基金项目(81001647) 浙江省科技厅资助项目(2009C33005) 中国博士后科学基金面上项目(20100471757)

作者简介: 曾昭武(1977-) 男, 博士, 助理研究员, 主要研究方向: 纳米医药学。Email: artgreenking@126.com

△ 通讯作者: 王小丽 E-mail: xiaoliwangfly@yahoo.com.cn

(收稿日期: 2011-06-09 接受日期: 2011-07-13)

位仪测量 zeta 电位,表面张力仪测定其表面张力,采用粘度计测定其粘度,采用 pH 计测定其 pH 值,测定温度均为 25℃。

1.3 HPLC 测定榄香烯微乳药物含量

参与相关文献^[6],经试验选定色谱条件:色谱柱为 C18 柱(2.2 μm, 75 mm× 3.0 mm),流动相为乙腈:水为 80:20,柱温为 40℃,检测波长为 210 nm,流速为 1.0 mL·min⁻¹,进样量为 5 μL。β-榄香烯的保留时间约为 4.8 min,空白微乳在该段时间没有色谱峰,表明辅料对榄香烯的测定无干扰。标准曲线:当榄香烯在 3.94~27.58 μg·mL⁻¹ 的浓度范围内呈线性关系,回归方程为 $Y=2157.8318 \cdot C-311.4286$, $r=0.9996$ 。取榄香烯微乳样品溶液 1 mL 采用 UFLC 检测。重复 3 次,计算榄香烯微乳的药物含量。

1.4 榄香烯微乳的相对生物利用度

取 90 只 SD 大鼠,体重 140~200 g,雌雄不限,随机分为榄香烯乳剂组与榄香烯微乳组,按 100 mg/kg 口服给药,分别于给药后 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18, 24 h 取大鼠股动脉血 3~5 mL,离心 2000 × g, 4℃, 10 min,取血浆, 4℃ 保存备用。取血浆 0.5 mL,加入乙腈 1 mL,振荡 5 min,静置 5 min,离心 14000 × g, 25℃, 30 min,取上清,用 0.22 μm 一次性过滤器过滤,进样检测血浆中 β-榄香烯含量。然后采用药动学软件 DAS 2.1.1 计算药动学参数。UFLC 检测发现,血浆 β-榄香烯在 0.26~3.94 μg·mL⁻¹ 的浓度范围内呈线性关系,回归方程为 $Y=2263.19 \cdot C-27.11$, $r=0.9995$,见图 1。

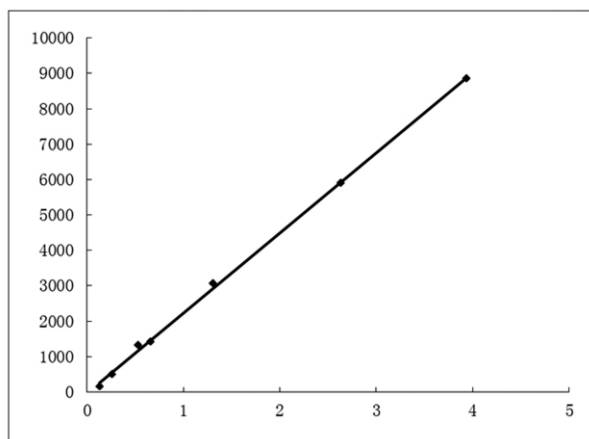


图 1 血浆 β-榄香烯标准曲线与回归方程

Fig.1 Standard curve and regression equation of β-elemene in plasma

2 结果

2.1 榄香烯微乳性质

榄香烯微乳粒径为 (67±13) nm, Zeta 电位为 (3.2±0.4) mV, pH 值为 5.16, 粘度为 6 mPa·s, 表面张力为 31.7 mN·m⁻¹。榄香烯微乳中 β-榄香烯含量为 (8.273±0.018) mg·mL⁻¹。

2.2 血浆药时曲线与相对生物利用度

绘制榄香烯乳剂与微乳的血浆药时曲线,见图 2。

采用药动学软件 DAS 2.2.1 按统计矩计算药动学参数, $AUC_{0 \rightarrow 24h}(\text{乳剂})=1.896 \text{ mg} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$; $AUC_{0 \rightarrow \infty}(\text{乳剂})=2.673 \text{ mg} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$; $AUC_{0 \rightarrow 24h}(\text{微乳})=3.092 \text{ mg} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$; $AUC_{0 \rightarrow \infty}(\text{微乳})=4.073 \text{ mg} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$; 相对生物

利用度 $F_{0 \rightarrow 24h}=AUC_{0 \rightarrow 24h}(\text{微乳}) \times D_{\text{乳剂}} / AUC_{0 \rightarrow 24h}(\text{乳剂}) \times D_{\text{微乳}}=163.1\%$; 相对生物利用度 $F_{0 \rightarrow \infty}=AUC_{0 \rightarrow \infty}(\text{微乳}) \times D_{\text{乳剂}} / AUC_{0 \rightarrow \infty}(\text{乳剂}) \times D_{\text{微乳}}=131.7\%$ 。D 乳剂为榄香烯乳剂给药剂量, D 微乳为榄香烯微乳给药剂量。 $C_{\text{max}}(\text{微乳})=1.820 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $C_{\text{max}}(\text{乳剂})=1.395 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。 $MRT_{0 \rightarrow 24h}(\text{微乳})$ 为 1.688 h, $MRT_{0 \rightarrow 24h}(\text{乳剂})$ 为 1.450 h。 $T_{1/2z}(\text{微乳})=1.03 \text{ h}$, $T_{1/2z}(\text{乳剂})=0.88 \text{ h}$; $CL_z/F(\text{微乳})=24.549 \text{ L/h/kg}$, $CL_z/F(\text{乳剂})=37.413 \text{ L/h/kg}$ 。结果发现,与榄香烯乳剂相比,榄香烯微乳的相对生物利用度是乳剂的 163.1%,峰浓度是乳剂的 1.3 倍。

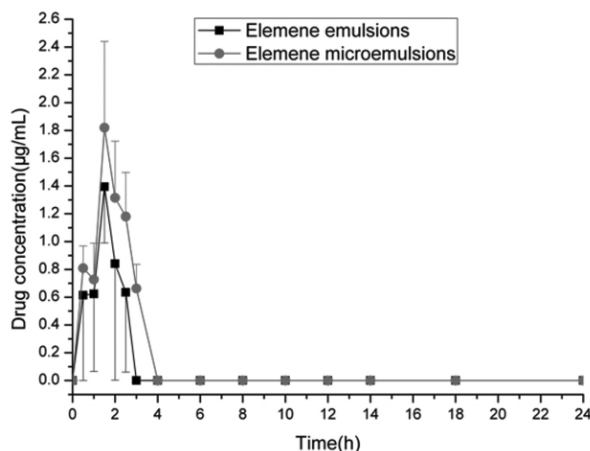


图 2 榄香烯微乳与乳剂血浆药时曲线

Fig.2 Plasma concentration-time curve of elemene microemulsion and emulsion

3 讨论

微乳可保护稳定性差的药物,增加难溶性药物的溶解度,提高生物利用度。O/W 微乳给药系统应用较多,这是由于 O/W 微乳被生理盐水稀释时仍保持其液滴结构,可经口服及胃肠道外给药^[7]。微乳的制备常采用搅拌法,作者发现,采用搅拌法可以形成榄香烯微乳,但在微乳形成边界条件下采用超声法更容易形成微乳,分散性更好,制备的微乳澄清度更佳。检测结果发现榄香烯微乳粒径为 (67±13) nm, Zeta 电位为 (3.2±0.4) mV, pH 值为 5.16, 粘度为 6 mPa·s, 表面张力为 31.7 mN·m⁻¹, 呈弱酸性, 粘度低, 表面张力较低, 适用于口服给药。在大鼠血浆样品处理方法中,作者进行了反复试验,发现采用 0.5 mL 血浆加 1 mL 乙腈处理,再在 14000 × g, 25℃ 离心 30 min,容易把血浆中的蛋白沉淀下来,且其进样的药物浓度可以达到实验要求。由于大鼠口服给药后,榄香烯微乳的药动学参数用房室模型拟合效果不佳,因此采用统计矩法计算其药动学参数。结果发现, $C_{\text{max}}(\text{微乳})$ 为 1.820 mg·L⁻¹, $MRT_{0 \rightarrow 24h}(\text{微乳})$ 为 1.688 h, $T_{1/2z}(\text{微乳})$ 为 1.03 h, $CL_z/F(\text{微乳})$ 为 24.549 L/h/kg; 与榄香烯乳剂相比,榄香烯微乳的相对生物利用度达 163.1%,峰浓度提高了 1.3 倍。一般微乳的突出优点为稳定性好,能提高生物利用度^[5,8,9],本实验结果与其一致。

参考文献(References)

[1] 孙敏鸽,李淑斌,周莉等. 榄香烯原料药的化学成分 [J]. 沈阳药科大

学学报,2009,26(8):620-622

Sun Min-ge, Li Shu-bin, Zhou Li, et al. Chemical constituents of active pharmaceutical ingredients of elemene [J]. J Shenyang Pharm Univ,2009,26(8):620-622

- [2] 陈晓,魏福祥,瞿延辉. 莪术中有效成分 --- 榄香烯的研究进展 [J].河北化工,2003,6: 9-13

Chen Xiao, Wei Fu-xiang, Qu Yan-hui. Development in the Study of Elemene---the active principle of Rhizoma Curcumae [J]. Hebei Chem Eng Ind,2003,6:9-13

- [3] 姚淑娟,刘伯阳,吕丽艳. 榄香烯提高肿瘤化疗药物疗效及抗免疫抑制作用的研究 [J].中医药学刊,2006,24(3): 456-457

Yao Shu-juan, Liu Bai-yang, Lv Li-yan. Studies of reducing poison and increasing effect of Elemene emulsions on immune function of tumor-bearing mice after chemotherapy [J].Chin Arch Trad Chin Med,2006,24(3): 456-457

- [4] 杨华,易红. 我国微乳技术在药学领域中的研究进展 [J].中国新药杂志,2006,15 (10):764-769.

Yang Hua, Yi Hong. Advances on pharmaceutical microemulsion in China [J].Chin J New Drugs,2006,15 (10):764-769

- [5] Yin YM, Cui FD, Mu CF, et al. Docetaxel microemulsion for en-

hanced oral bioavailability: preparation and in vitro and in vivo evaluation [J]. J Control Release, 2009, 140(2): 86-94

- [6] 曾昭武,李铨璐,周广林. 超快速液相色谱法测定榄香烯脂质体的含量及包封率的研究[J].中医药导报,2010,16(7):100-101

Zeng Zhao-wu, Li Cheng-lu, Zhou Guang-lin. Determination of the content and entrapment efficiency of Elemene liposomes with UFLC [J]. Guiding J Trad Chin Med and Pharm,2010,16(7):100-101

- [7] 周颖,刘玮. 微乳及自微乳给药系统的药学应用进展 [J].西北药学杂志,2008,23(1):56-58

Zhou Yin, Liu Wei. Advances on pharmaceutical application of microemulsion and self-microemulsion drug delivery system [J]. North-west Pharm J,2008,23(1):56-58

- [8] Cheng MB, Wang JC, Li YH, et al. Characterization of water-in-oil microemulsion for oral delivery of earthworm fibrinolytic enzyme [J]. J Control Release, 2008, 129(1): 41-48

- [9] Vikas Bali, Mushir Ali, Javed Ali. Study of surfactant combinations and development of a novel nanoemulsion for minimising variations in bioavailability of ezetimibe [J].Colloids Surf B: Biointerfaces, 2010,76 (2):410-420

(上接第 230 页)

- [16] Zhao M, Xiao G, Berry J E, et al. Bone morphogenetic protein 2 induces dental follicle cells to differentiate toward a cementoblast/osteoblast phenotype[J]. Bone Miner Res, 2002, 17(7): 1441-1451

- [17] Luan X, Ito Y, Dangaria S, et al. Dental follicle progenitor cell heterogeneity in the developing mouse periodontium [J]. Stem Cells Dev, 2006, 15(5): 595-608

- [18] Morszeck C, Moehl C, Gotz W, et al. In vitro differentiation of human Dental Follicle Stem Cells with dexamethasone and insulin [J]. Cell Biol Int, 2005, 29(3): 567-575

- [19] Yalvac ME, Ramazanoglu M, Gumru OZ, et al. Comparison and optimisation of transfection of human Dental Follicle Stem Cells, a novel source of stem cells, with different chemical methods and electroporation [J]. Neurochem Res, 2009, 34(7):1272-1277

- [20] Honda MJ, Tsuchiya S, Sumita Y, et al. The sequential seeding of epithelial and mesenchymal cells for tissue-engineered tooth regenera-

tion [J]. Biomaterials, 2007, 28(4):680-689

- [21] Lu H, Wu ZF, Tian Y, et al. A study on the effects of cells and scaffolds tissue engineering on the periodontal regeneration [J]. Chinese stomatology, 2004, 39(3): 189-192

- [22] Wang Zheng-Qian, Wang Guang-Yao, et al. Oral epidemiological investigation and analysis of 16-19 year olds in Wenzhou City [J]. Chinese Clinical Medicine, 2003, 69(6):11552-11553

- [23] Bettina Lindroos, et al. Characterisation of human dental stem cells and buccal mucosa fibroblasts [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2008, 368(6): 329-335

- [24] Takahiro Yagyu, Etsuko Ikeda, Hajime Ohgushi, et al. Hard tissue-forming potential of stem/progenitor cells in human dental follicle and dental papilla[J]. Archives of oral biology, 2010, 55(6): 68-67

- [25] Flores MG, Yashiro R, Washio K, et al. Periodontal ligament cell sheet promotes periodontal regeneration in athymic rats [J]. Clin Periodontol, 2008, 35(6): 1066-1072