

利用体外脂解模型评价 I 型脂质制剂

刘颖, 易涛*, 宦娣, 肖璐, 何吉奎

(西南大学药学院, 重庆 400715)

摘要: 以吲哚美辛为模型药物, 分别以中链混合甘油酯 Capmul MCM 和长链极性油 Labrafil M 1944 CS 为 I 型脂质制剂, 利用体外脂解模型研究药物的肠道分配和增溶作用。结果发现, 脂质制剂消化后水性分散相对吲哚美辛的增溶能力较强; 脂解程度和速度与脂质辅料的结构有关, 长链极性油脂质溶液消化后分配进入水性分散相的药物比中链混合甘油酯少, 不利于吸收; 脂质制剂消化后水性分散相中药物浓度随载药率提高呈现线性增加。研究结果提示, 在筛选脂质制剂的处方时, 需考虑脂解程度和速率可能对药物吸收产生的不利影响; 脂质混悬液比载药量低的脂质溶液可能更有利于药物吸收。体外脂解模型能为 I 型脂质制剂的处方筛选和评价以及体内外相关性研究提供依据。

关键词: I 型脂质制剂; 脂质溶液; 脂质混悬液; 体外脂解模型; 吲哚美辛

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 10-1307-05

Use of an *in vitro* lipolysis model to evaluate type I lipid formulations

LIU Ying, YI Tao*, HUAN Di, XIAO Lu, HE Ji-kui

(College of Pharmaceutical Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: The distribution fate and solubilization behavior of indomethacin through the intestinal tract were investigated with *in vitro* lipolysis model, by comparing the Capmul MCM and Labrafil M 1944 CS type I lipid formulations. The results showed that the more favorable solubilization was in the aqueous digestion phase from each lipid formulations for indomethacin. The lipolysis rate and extent were decided with chemical constitution of the lipid excipients, which meant that less indomethacin was transferred from the long chain polar oil lipid solution into the aqueous digestion phase. Increasing the concentration of indomethacin in the lipid formulations from a solution to a suspension led to a linear increase in the concentration of indomethacin attained in the aqueous digestion phase from lipid formulations. This study also implied that adverse effects of the lipolysis rate and extent on drug absorption were could be taken into consideration when screening lipid formulations. Lipid suspensions likely had better enhancement of drug absorption. Last, this study demonstrated that a potential basis for optimizing and assessing type I lipid formulations and also researching *in vivo* - *in vitro* correlations of lipid formulations were provided by an *in vitro* lipolysis model.

Key words: type I lipid formulation; lipid solution; lipid suspension; *in vitro* lipolysis model; indomethacin

收稿日期: 2010-05-20.

基金项目: 重庆市自然科学基金资助项目 (CSTC2009BB5106); 中央高校基本科研业务费专项资金资助 (XDJK2009C076); 西南大学博士基金项目 (SWUB2008032).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-23-68251225, E-mail: konglingwater@hotmail.com

脂质制剂能有效提高水难溶性药物的口服生物利用度。Pouton 等^[1]根据脂质制剂的组成和性质将其分为 4 种类型, 其中 I 型脂质制剂只含油而不含表面活性剂, 药物遇水易分散沉淀; 而该制剂的主要优势在于外源性脂质基质的消化产物与内源性胆盐、磷脂等混合而形成胶体分散态, 对药物具有明显的体内增溶作用, 有利于药物吸收, 因此肠道消化行为对 I 型脂质制剂具有关键影响作用^[2, 3]。以往研究者常通过药物的溶解度和自乳化能力等体外参数筛选和评价脂质制剂^[4, 5]。事实上, 肠道消化行为可能使脂质制剂的增溶能力丧失, 导致药物沉淀, 因此需要建立能反映脂质制剂肠道行为的评价方法^[1]。

体外脂解模型不仅能够研究脂质消化动力学及其消化产物与内源性物质相互作用, 更能准确地反映脂质制剂在肠道中的变化^[6]。目前利用体外脂解模型系统研究 I 型脂质制剂药物在肠道中分配和增溶作用的报道还不多, 尤其是对脂质制剂载药量与药物体内增溶作用的相互关系研究。

本研究采用体外脂解模型模拟 I 型脂质制剂在肠道中的消化行为, 研究油相结构 (中链混合甘油酯和长链极性油) 和不同剂型 (脂质溶液、脂质混悬液) 对药物体内增溶作用的影响, 并探讨制剂载药量与其体内增溶作用的关系, 为 I 型脂质制剂的处方筛选和评价以及体内外相关性研究提供依据。

材料与方法

试剂与仪器 Labrafac CC 和 Labrafil M 1944 CS (法国 Gattefossé 公司); Captex 355 和 Capmul MCM (美国 Abitec 公司); 三羟甲基氨基甲烷-马来酸酯 (trizma mealate, 含量 99.5%), 牛磺脱氧胆酸钠 (sodium taurodeoxycholate, NaTDC, 含量 97%), 猪胰脂酶 (pancreatin, 8×USP) (美国 Sigma 公司); 卵磷脂 (phosphatidylcholine, PC, 含量 80%, 日本丘比株式会社); 4-溴苯硼酸 (4-bromophenylboronic acid, 4-BPB, 含量 97%, 美国 Alfa 公司); 吲哚美辛 (indomethacin, IMC, 含量 99.5%, 北京紫竹药业有限公司), 其他化学试剂均为分析纯。

TitraLab pH-stat 滴定仪 (854 型, 雷迪美特中国有限公司); 超高速冷冻离心机 (CP100MX 型, 日本 Hitachi 公司); 高速冷冻离心机 (Multifuge 1L-R 型, 美国热电集团); Agilent 1200 高效液相色谱系统 (四元泵、紫外检测器、自动进样器、Agilent 化学工作

站, 美国 Agilent 公司)。

IMC 的高效液相色谱法 (HPLC) 检测 色谱条件: Platisil ODS 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); Easy Guard 预柱 (4.6 mm × 10 mm); 流动相为甲醇: 0.4%冰醋酸 (80:20, v/v); 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 柱温为 30 °C; 检测波长 260 nm。采用 Agilent 1200 高效液相色谱系统, 通过方法专属性考察、标准曲线的制备、精密度试验、稳定性试验和回收率试验建立 IMC 的 HPLC 含量测定方法。

脂质溶液与脂质混悬液 脂质溶液的制备: 取适量 IMC 置于脂质辅料中, 密封, 涡旋 5 min, 超声直至药物完全溶解。脂质混悬液的制备: 取过量药物置于脂质辅料中, 密封, 涡旋 5 min, 超声至均匀分散。

药物溶解度考察^[5] 将过量 IMC 加入分别装有适量 Captex 355、Labrafac CC、Capmul MCM 和 Labrafil M 1944 CS 的试管中, 密封后涡旋, 40 °C 水浴 30 min 并将样品置于 37 °C 恒温摇床振荡平衡 48 h, 8 000 r·min⁻¹ 下离心 10 min, 精密称取上清液, 经流动相稀释后用 HPLC 法检测, 计算溶解度。同法测定 IMC 在消化液 (trizma mealate 50 mmol·L⁻¹、NaCl 15 mmol·L⁻¹、CaCl₂·2H₂O 5 mmol·L⁻¹, pH 7.5)、胆盐混合胶束溶液^[7] (5 mmol·L⁻¹ PC 溶于装有一定量氯仿的圆底烧瓶中, 旋转蒸发使烧瓶底部形成蛋黄色薄膜后, 加入 20 mmol·L⁻¹ NaTDC 与消化液 10 mL, 搅拌 12 h 直至形成黄色透明溶液, NaTDC/PC) 和各空白脂质制剂消化后的水性分散相中的溶解度。

体外消化实验 利用 pH-stat 滴定仪 (恒定 pH 7.5, 37 °C, 0.2 mol·L⁻¹ NaOH 滴定液) 模拟体外消化实验, 将 IMC 脂质溶液和混悬液分别加入适量 NaTDC/PC 中, pH 调至 7.5, 700 r·min⁻¹ (37 °C) 下搅拌 15 min 后, 加入相当于 10 000 TBU (1 TBU 相当于每分钟能分解三丁酸甘油酯产生 1 μmol 脂肪酸所需的酶量) 的胰脂酶提取液^[7] (1 g 猪胰脂酶溶于 5 mL 消化液, 冰上搅拌 15 min 后于 1 600×g、5 °C 下离心 15 min, 收集上清液) 模拟肠道消化开始脂解, 60 min 后加入 4-BPB (9 μL·mL⁻¹) 终止反应。记录整个滴定过程中不同时间的滴定体积, 并将消化产物在 334 000×g (37 °C) 条件下超高速离心 30 min, 分离水性分散相、油相和沉淀相, 分别测定其中药物含量。同法将空白脂质制剂脂解, 取消化后水性分散相备用。

结果与讨论

1 IMC 的 HPLC 检测方法学

IMC 在 1.2~240 mg·L⁻¹ 内线性良好, 加权回归方程为 $y = 25.672\ 12x + 11.217\ 86$ ($n = 8$), $r = 0.999\ 95$ 。该方法专属性强; 日内精密度 $RSD < 2.0\%$, 日间精密度 $RSD < 2.5\%$; 回收率为 $(101.17 \pm 0.17)\%$ ($n = 5$)。IMC 在 37 °C、避光条件下稳定性良好。

2 药物溶解度

2.1 药物在各脂质辅料中的溶解度 药物在脂质辅料中的溶解度是影响脂质制剂的重要因素。Captex 355 和 Labrafac CC 为中链甘油三酯, Capmul MCM 和 Labrafil M 1944 CS 分别为中链混合甘油酯和长链极性油。由表 1 可见, IMC 在 Capmul MCM 和 Labrafil M 1944 CS 中溶解度较高, 因此分别选用这两种脂质辅料制备脂质制剂。

Table 1 Equilibrium solubilities of indomethacin in lipid excipients. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs Captex 355 or Labrafac CC

Lipid excipient	Equilibrium solubility /mg·g ⁻¹
Captex 355	5.42 ± 0.04
Labrafac CC	6.46 ± 0.18
Capmul MCM	22.29 ± 2.04**
Labrafil M 1944 CS	17.3 ± 1.01**

2.2 药物在消化液、NaTDC/PC 及制剂消化后水性分散相中的溶解度 由于忽视脂质制剂在肠腔中对药物的增溶作用, 在设计脂质制剂时常常局限于制剂的溶解能力 (表 1), 导致脂质制剂的载药量较低。但测定脂质制剂中水难溶性药物 IMC 在体内的溶解度, 发现 I 型脂质制剂消化后水性分散相对药物的增溶作用明显高于消化液和 NaTDC/PC (表 2), 也高于脂质制剂体外同倍稀释于 NaTDC/PC 后的溶解能力。原因可能是脂质的消化产物与内源性胆盐、卵磷

Table 2 Equilibrium solubilities at 37 °C of model compounds in digestion buffer pH 7.5, in digestion buffer containing BS/PL, and in blank aqueous phases obtained from drug-free lipid formulation digests. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$ vs Digestion buffer or NaTDC/PC

Phase	Equilibrium solubility at 37 °C /μg·mL ⁻¹
Digestion buffer	299.73 ± 22.15
NaTDC/ PC	2 009.55 ± 45.92
Aqueous phase from lipid formulation digested (Capmul MCM)	4 702.30 ± 323.21***
Aqueous phase from lipid formulation digested (Labrafil M 1944 CS)	4 951.51 ± 212.65***

脂等相互作用产生一系列胶体分散态, 包括胶束、混合胶束、囊泡和乳滴等^[8], 从而显著提高对药物的溶解能力。这提示脂质制剂的载药量可能超过其溶解能力, 如制成脂质混悬液。

3 体外消化实验

3.1 消化速率的比较 将 Capmul MCM 和 Labrafil M 1944 CS 制得的脂质溶液分别进行体外消化实验, 记录不同时间消化释放脂肪酸的摩尔量 (图 1)。将不同时间段内释放脂肪酸的摩尔量与反应时间进行线性回归, 所得斜率 (K) 为处方消化速率 (表 3)。结果显示, 这两种脂质溶液均经过前 5 min 的快速消化期后进入慢速消化期。在快速消化期内, Capmul MCM 单位时间释放脂肪酸的量是 Labrafil M 1944 CS 的 1.65 倍 ($P < 0.05$, 图 1), 且 Capmul MCM 消化速率明显快于 Labrafil M 1944 CS ($P < 0.01$, 表 3), 这可能是由于两者的结构差异引起的。Capmul MCM 是由椰子油和 1, 2, 3-三丙醇经醇解而成的甘油单、双酯混合物, 为中链混合甘油酯; 而 Labrafil M 1944 CS 是由杏仁油和聚乙二醇 300 经醇解而成的甘油单、双、三酯及聚乙二醇的单、双脂肪酸酯混合物, 为长链极性油^[9]。相对于 Capmul MCM, Labrafil M 1944 CS 的酯链较长, 且酯链的不饱和程度较高, 所以脂解程度较小, 脂解速率较慢。

3.2 药物在消化后的分配行为 为进一步研究肠道消化对药物的影响, 分别测定两种脂质溶液 (250 mg,

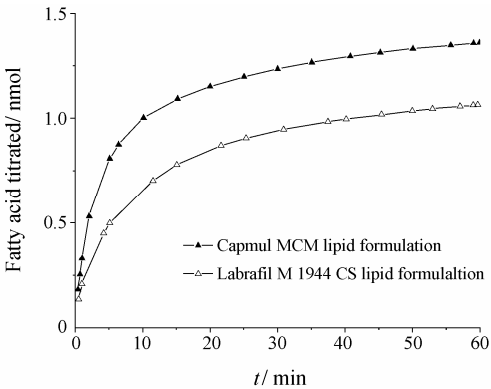


Figure 1 The amount of fatty acids titrated during 60 min *in vitro* digestion period for lipid formulations ($n = 3$)

Table 3 Comparison of the lipolysis rate of lipid formulations. $n = 3$. ** $P < 0.01$ vs Labrafil M 1944 CS (0-5 min)

Formulation	Period/min	K /nmol·min ⁻¹	R^2
Capmul MCM	0-5	128.7**	0.955
	6-60	6.346	0.920
Labrafil M 1944 CS	0-5	77.19	0.991
	6-60	6.538	0.910

载药量均为溶解度的50%) 体外消化 60 min 后, 药物分配进入水性分散相、油相和沉淀相的比例。结果显示, Capmul MCM 脂质溶液消化后制剂中总药量的 96.26% 进入水性分散相; 而 Labrafil M 1944 CS 脂质溶液消化后水性分散相中仅含有 56.7% 的药物, 仍有 42.3% 的药物保留在油相中 (图 2)。由此可见, 尽管 Labrafil M 1944 CS 脂质溶液消化后水性分散相的溶解能力提高, 消化后沉淀的药物也很少 (图 2), 但是由于其消化较慢, 消化 60 min 后仍存在相对较多的油相, 油相的蓄积限制了水难溶性药物分配进入水性分散相的能力, 从而不利于药物的肠道吸收。这提示, 在筛选脂质制剂的处方时, 有必要利用体外脂解模型研究其消化速率和程度, 特别是对于脂解程度较小和速率较慢的脂质, 需要考虑可能对药物吸收产生的不利影响。

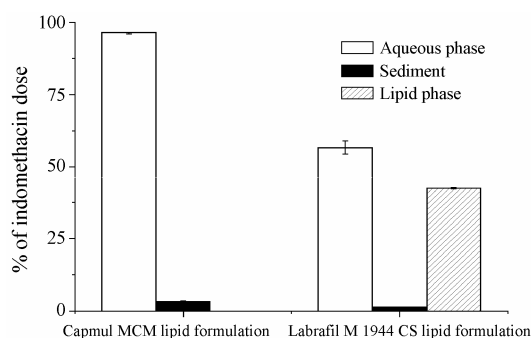


Figure 2 Distribution of indomethacin molecules across the aqueous phase, sediment of the *in vitro* digestion model following lipid formulations ($n = 3$)

4 脂质溶液和脂质混悬液比较

分别将脂质基质组成相同而载药率不同 (约为处方溶解度的 25%~210%) 的 I 型脂质制剂 (脂质溶液和脂质混悬液) 进行体外消化实验。结果显示, 脂质制剂消化后水性分散相的药物浓度 ($D_{[Aq P]}$) 基本都随着载药率 (制剂中药量与溶解度之比, $D/S_{[lipid]}$)

的提高呈线性增加, 而且 Capmul MCM 脂质制剂 $D_{[Aq P]}$ 的增加幅度略高于 Labrafil M 1944 CS 脂质制剂 (图 3)。Labrafil M 1944 CS 脂质制剂消化后水性分散相中药物浓度的增加幅度 ($D_{[Aq P]} \text{ Increase}$) 小于或趋于其载药率的增长幅度 ($D/S_{[lipid]} \text{ Increase}$), 而 Capmul MCM 脂质制剂的 $D_{[Aq P]} \text{ Increase}$ 则大于其 $D/S_{[lipid]} \text{ Increase}$ (表 4), 这可能还是由于两者的结构差异导致脂解程度和速度不同而造成的。与脂质溶液相比, $D/S_{[lipid]}$ 较高的脂质混悬液的 $D_{[Aq P]}$ 明显提高 (表 4)。这提示, 脂质混悬液不仅载药量高, 而且比载药率低的脂质溶液可能更有利于药物吸收, 成为更有应用前途的 I 型脂质制剂, 当然还需要进一步研究诸如粒径变化、均一度及黏度等问题。

另外, 脂质制剂 $D_{[Aq P]}$ 占药物在空白水性分散相中溶解度的比例很小, 最高不超过 10% (表 4), 远低于 $D/S_{[lipid]}$ 。这提示, 脂质混悬液的载药量可能还可以继续增加以提高消化后水性分散相药物含量而增加吸收, 直至消化后沉淀相的药物含量明显增加为止。

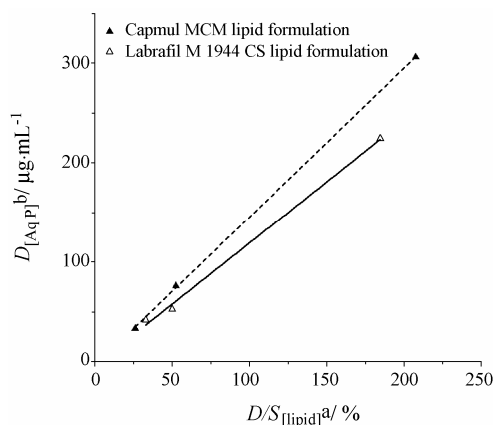


Figure 3 Linear fit of drug concentration in aqueous digestion phases with the increasing of the drug loading in formulation. a: Drug loading in the formulations expressed as a percentage of the drug solubility in lipids; b: Drug concentration in aqueous phase from the lipid formulations digested

Table 4 Concentration of indomethacin in the aqueous phase and the percentage distribution of indomethacin into the digestion phases after 60 min digestion of different drug loads. a: Drug loading in the formulations expressed as a percentage of the drug solubility in lipids. b: Drug concentration in aqueous phase from the lipid formulations digested. c: $D_{[Aq P]}$ at the end of the digestion expressed as a percentage of the equilibrium solubility in the aqueous phase obtained from a “blank” lipid digest

Lipid formulation	$D/S_{[lipid]}^a / \%$	$D/S_{[lipid]} \text{ Increase}$	$D_{[Aq P]}^b / \mu g \cdot mL^{-1}$	$D_{[Aq P]} \text{ Increase}$	$D/S_{[Aq P]}^c / \%$
Capmul MCM	26.17	1.00	33.17	1.00	0.72
	52.48	2.01	76.08	2.29	1.62
	207.58	7.93	305.94	9.22	6.51
Labrafil M 1944 CS	32.97	1.00	41.58	1.00	0.84
	50.00	1.52	52.22	1.25	1.05
	184.62	5.45	224.16	5.39	4.53

结论

利用体外脂解模型可以研究脂解的速度和程度以及消化后各相的药物分配,为脂质制剂的设计和评价提供依据。本研究结果显示,脂解程度和速度与脂质辅料的结构有关,长链极性油脂质溶液消化后分配进入水性分散相的药物比中链混合甘油酯少,不利于吸收,因此在筛选脂质制剂的处方时,需要考虑脂解程度和速率可能对药物吸收的不利影响。脂质制剂消化后水性分散相对药物的增溶作用较强,而且水性分散相中药物浓度随载药率提高呈线性增加,脂质混悬液比载药量低的脂质溶液可能更有利于药物吸收。作者将进一步研究 I 型脂质制剂体外脂解的结果与其体内吸收之间的相关性,最终建立可用于处方筛选和质量评价的体外脂解模型。

References

- [1] Pouton CW. Formulation of poorly water-soluble drugs for oral administration: physicochemical and physiological issues and the lipid formulation classification system [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2006, 29: 278–287.
- [2] Pouton CW, Porter CJH. Formulation of lipid-based delivery systems for oral administration: materials, methods and strategies [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, 60: 625–637.
- [3] Porter CJH, Pouton CW, Cuine JF, et al. Enhancing intestinal drug solubilisation using lipid-based delivery systems [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, 60: 673–691.
- [4] Zhou XT, Wang J, Wang Y, et al. Design and *in vitro* evaluation of self-microemulsifying drug delivery systems for piroxicam [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2008, 43: 415–420.
- [5] Xiong Y, Liu QD, Lai L, et al. Preparation of the oral self-microemulsifying drug delivery system of GBE50 [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2009, 44: 803–808.
- [6] Brogard M, Troedsson E, Thuresson K, et al. A new standardized lipolysis approach for characterization of emulsions and dispersions [J]. *J Colloid Interface Sci*, 2007, 308: 500–507.
- [7] Sek L, Porter CJH, Charman WN. Characterization and quantification of medium chain and long chain triglycerides and their *in vitro* digestion products, by HPTLC coupled with *in situ* densitometric analysis [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2001, 25: 651–661.
- [8] Kossena GA, Charman WN, Wilson CG, et al. Low dose lipid formulations: effects on gastric emptying and biliary secretion [J]. *Pharm Res*, 2007, 24: 2084–2096.
- [9] Strickley RG. Solubilizing excipients in oral and injectable formulations [J]. *Pharm Res*, 2004, 21: 201–230.

《中国临床药理学杂志》杂志征订启事

《中国临床药理学杂志》主要报道我国临床药理学及相关领域的新成果、新技术、新方法,有关临床用药的基础研究,合理用药、药物不良反应、药物相互作用、药物动力学、血药浓度监测以及有关医院药理学学科的研究成果与实践。旨在为我国广大临床药理学工作者提供一个学术交流、信息传递和了解国内外临床药理学及相关学科发展情况的窗口与平台。作为一本专业特色明显的全国性期刊,本刊被收录为国家科技部“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊)、国家级火炬计划项目“中国科学引文数据库来源期刊”、“中国学术期刊综合评价数据库来源期刊”,“中国期刊网”、“中国学术期刊(光盘版)”和“万方数据资源系统(China info)数字化期刊群”,并从1998年起被美国《国际药文摘》(IPA)和美国化学文摘(CA)摘录刊载。

本刊的主要读者对象为医院药师、医师和大专院校、科研单位研究人员和临床药理学工作者。

本刊为双月刊,大16开本,64页,逢单月25日出版。每期定价8元,全年48元。邮发代号4-573,欢迎广大读者到本地邮局订阅。国外代号4726BM(中国国际图书贸易公司,北京399信箱)。国内统一刊号:CN31-1726;国际标准出版物编号:ISSN1007-4406。

杂志社地址:上海市医学院路138号290信箱,邮编:200032

电话:(021) 54237256; 传真:(021) 64176498; E-mail: lcyx@fudan.edu.cn; cjcpfdu@citiz.net