

肝素和低分子肝素口腔给药系统的研究

李 丁, 侯惠民*

(药物制剂国家工程研究中心, 上海 201203)

摘要: 本研究分别比较了肝素 (unfractionated heparin, UFH) 和低分子肝素 (low molecular weight heparin, LMWH) 通过口服和口腔给药吸收的差别, 筛选出适合两种药物口腔给药的吸收促进剂, 并采用生物黏附材料卡波普和海藻酸钠制备了两种药物的口腔给药膜剂。采用活化部分凝血活酶时间 (activated partial thromboplastin time, APTT) 法测定了经口服、口腔和皮下注射给药后大鼠血浆中的肝素和低分子肝素。吸收促进剂 (Labrasol) 对促进膜剂中的药物经大鼠口腔途径吸收的作用有限。离子电渗技术能显著增加 UFH 和 LMWH 通过口腔途径给药的吸收量, 促进二者通过口腔黏膜吸收。

关键词: 肝素; 低分子肝素; 大分子药物; 离子电渗; 口腔; 活化部分凝血活酶时间; 膜剂

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 10-1317-05

Oral cavity delivery system of unfractionated and low molecular weight heparin

LI Ding, HOU Hui-min*

(National Pharmaceutical Engineering & Research Center, Shanghai 201203, China)

Abstract: The difference between absorption of unfractionated heparin (UFH) and low molecular weight heparin (LMWH) after oral and oral cavity administration were studied respectively, and the compatible enhancer for oral cavity delivery system of both drugs was found. The LMWH and UFH films were prepared with two bioadhesive materials Carbopol and alginate sodium for oral cavity delivery. The activated partial thromboplastin time (APTT) was used to determine LMWH and UFH in plasma after oral, oral cavity and sc administration in rats. The results show that the enhancer (Labrasol) can increase the absorption of LMWH and UFH through oral cavity in rats but not obviously. The oral cavity iontophoretic delivery system is a useful method to improve the absorption of LMWH and UFH through oral cavity mucosa.

Key words: unfractionated heparin; low molecular weight heparin; macromolecular drug; iontophoresis; oral cavity; activated partial thromboplastin time; film

肝素 (unfractionated heparin, UFH) 是一类糖胺聚糖, 相对分子质量为 14 000 左右。低分子肝素 (low molecular weight heparin, LMWH) 由 UFH 经降解或解聚获得, 相对分子质量为 5 000 左右。2-O-硫酸- α -L-艾杜糖醛酸及 6-O-硫酸-N-硫酸- α -D-葡萄糖胺是二者的主要单糖, 由它们组成的三硫酸二糖的

重复单位是 LMWH 和 UFH 的主要部分。LMWH 和 UFH 作为一种有效的抗凝剂, 可用于预防或治疗深部静脉血栓和肺栓塞等疾病。与许多大分子药物一样, 二者同样具有水溶性、多氢键和荷负电的特点, 口服给药后不易通过胃肠道黏膜吸收、半衰期短、口服生物利用度低, 临床上需频繁注射给药, 给患者带来诸多不便^[1]。因此, 其非注射给药途径的开发越来越受到人们的关注, 尤其是口腔黏膜给药。口腔黏膜可分为颊黏膜、舌下黏膜、硬腭黏膜和牙龈黏膜。药

收稿日期: 2010-06-08.

基金项目: 重大新药创制科技重大专项资助项目 (2009ZX09310-003).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-21-51320211, E-mail: ld.michael@163.com

物经口腔途径吸收可以避免肝脏首过效应和在胃肠道中的代谢。与其他黏膜给药途径相比,此种给药方式方便易行,患者顺应性好^[2]。

为使药物能够更好的被机体吸收,在给药时常加入吸收促进剂。但吸收促进剂在促进某些小分子药物透过机体屏障方面有效,在促进大分子药物吸收的效果有限。因此,需要其他方法促进 LMWH 和 UFH 等大分子药物通过口腔黏膜吸收。

离子电渗技术应用于口腔给药有局部麻醉、治疗牙本质过敏、炎症或唇单纯性疱疹感染等报道^[3]。如 Giannola 等^[4]研究了纳曲酮在吸收促进剂和离子电渗技术作用下的口腔黏膜透过性,发现单独使用吸收促进剂,药物的透过速率与不加促进剂相比无明显增加,表明化学促渗方法不能帮助纳曲酮透过口腔黏膜;但在 1 mA/cm² 和 2 mA/cm² 直流电流下,纳曲酮的透过量显著增加。

本研究以两种大分子药物 LMWH 和 UFH 为模型药物,以离子电渗技术为手段,寻找适合的吸收促进剂来研制一种适于口腔给药的组合系统,并通过动物口腔离子电渗给药来探讨该组合系统用于大分子药物口腔给药的可行性。

材料与方 法

仪器 HWS12 型电热恒温水浴锅 (上海一恒科技有限公司); XW-80C 涡旋混合器 (上海医科大学仪器厂); 离子电渗仪 (自制)。

药品与试剂 LMWH (100 u·mg⁻¹, 平均相对分子质量 5 000, 中港亚诺化学技术有限公司赠送); UFH (170 u·mg⁻¹, 平均相对分子质量 14 000, 东营天东生化工业有限公司); APTT 试剂盒 (上海太阳生物技术有限公司); 卡波普 (Carbopol 971P, 诺誉化工有限公司); 海藻酸钠 (alginate sodium, 国际特品公司); 甘油 (glycerol, 国药集团化学试剂有限公司); 脱氧胆酸钠 (SDC)、月桂氮草酮 (Azone) 和 *N*-甲基吡咯烷酮 (NMP) 均由友人赠送; 卡必醇 (Transcutol P, 佳法赛公司); 聚乙二醇辛酸/癸酸甘油酯 (Labrasol, 佳法赛公司); 枸橼酸钠、氯化钙和氯化钠 (国药集团化学试剂有限公司, 分析纯); 乌拉坦 (国药集团化学试剂有限公司, 化学纯)。

动物 雄性 SD 大鼠, 体重 (300 ± 25) g, 中国科学院上海实验动物中心。

APTT 测定方法 取大鼠血浆 0.1 mL 加入活化部分凝血活酶试剂 0.1 mL, 37 °C 保温 5 min, 加入

37 °C 0.025 mol·L⁻¹ CaCl₂ 溶液 0.1 mL, 混匀, 记录血浆凝固时间, 各样品均测定两次, 取平均值。

LMWH 和 UFH 体内分析方法的建立 分别称取 LMWH 1 500 u 和 UFH 50 u 于 50 mL 量瓶中, 以 pH 7.4 磷酸盐缓冲液溶解并定容后作为储备液 (LMWH 30 u·mL⁻¹ 和 UFH 10 u·mL⁻¹)。精密量取 LMWH 储备液 0.4、0.8、1.2、2、4、6、8 和 10 mL, 以 pH 7.4 磷酸盐缓冲液定容至 10 mL 量瓶, 得到 1.2、2.4、3.6、6、12、18、24 和 30 u·mL⁻¹ LMWH 溶液。另取 UFH 储备液 0.6、1.2、2.4、3.6、4.8、7.2 和 9 mL 定容至 10 mL 量瓶, 得到 0.6、1.2、2.4、3.6、4.8、7.2 和 9 u·mL⁻¹ UFH 溶液。分别精密量取上述药物溶液 0.02 mL 加至 0.1 mL 大鼠血浆中, 混匀, 得到 0.2、0.4、0.6、1、2、3、4 和 5 u·mL⁻¹ 含 LMWH 血浆和 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.2 和 1.5 u·mL⁻¹ 含 UFH 血浆。分别量取不同浓度的含药大鼠血浆 0.1 mL, 测定血浆凝固时间, 计算含药血浆与空白血浆相比血浆凝固的延长时间 ΔAPTT, 将 ΔAPTT (s) 与药物浓度 (u·mL⁻¹) 以最小二乘法线性回归, 得标准曲线方程。分别配制 0.4、2、4 u·mL⁻¹ 的 LMWH 溶液和 0.2、0.6、1.2 u·mL⁻¹ 的 UFH 溶液, 于同一天内重复测定 5 次及连续 5 天测定, 记录 ΔAPTT 值, 计算日内及日间精密密度。另分别配制上述高、中、低浓度样品各 3 份, 计算回收率。

不同药物溶液的配制 大鼠口服及口腔给药的 UFH 溶液: 44 和 235 mg UFH 分别以不含和含 5% Labrasol 的生理盐水 5 mL 溶解, 得不含和含 5% Labrasol 的 1 500 和 8 000 u·mL⁻¹ UFH 溶液。

大鼠口服及口腔给药的 LMWH 溶液: 75 和 400 mg LMWH 分别以不含和含 5% Labrasol 的生理盐水 5 mL 溶解, 得不含和含 5% Labrasol 的 1 500 和 8 000 u·mL⁻¹ LMWH 溶液。

大鼠皮下注射给药的 LMWH 和 UFH 溶液: 分别量取 25 mg LMWH 和 14.7 mg UFH, 以生理盐水 5 mL 溶解, 得 500 u·mL⁻¹ 的 LMWH 和 UFH 溶液。

口服给药 自由饮水, 禁食 8 h 的 SD 大鼠灌胃给予不含和含 5% 不同吸收促进剂的 LMWH 溶液 (剂量 50 mg·kg⁻¹)。于给药前及给药后 0.33、0.67、1、2、3、4、6、8 和 12 h 眼眶取血 0.4 mL, 置于含有 40 μL 0.109 mol·L⁻¹ 枸橼酸钠溶液的离心管中, 混匀, 2 500×g 离心 15 min, 取血浆测定药物浓度。

口腔给药 以 Labrasol 为吸收促进剂, 考察不同因素对口腔给药的影响, 进而确定口腔给药的具体实验方法。自由饮水、禁食 8 h 的 SD 大鼠腹腔注射

20%乌拉坦 (剂量 $1.0 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) 麻醉, 结扎食管, 分别配制不含和含 5% Labrasol 的 LMWH 溶液, 取药液 (剂量 $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 给予大鼠口腔, 15 min 后松开结扎部位。取血及样品处理方法同上。

LMWH 和 UFH 膜剂的制备 按下列处方将药物、甘油和 Labrasol 加水溶解后加到 Carbopol 和海藻酸钠中, 高分子材料溶解后在玻璃板上铺膜, 刮刀间隙为 0.8 mm , 干燥器中干燥过夜即得。处方如下: Carbopol 971P 100 mg , 海藻酸钠 100 mg , 甘油 200 mg , LMWH 150 mg 或 UFH 88 mg , Labrasol 100 mg , 水 2 mL 。

LMWH 和 UFH 膜剂的大鼠口腔给药 大鼠禁食过夜 (自由饮水), 以 20% 乌拉坦腹腔注射麻醉 ($1.0 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) 固定四肢, 保持俯卧。分别将 65 mg LMWH 和 59 mg UFH 膜剂 (约合 LMWH 和 UFH 1500 u) 加少量水润湿后置于大鼠口腔, 剂量 $5000 \text{ u}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。取血及样品处理方法同上。

LMWH 和 UFH 溶液的大鼠皮下注射给药 大鼠皮下注入 LMWH 和 UFH 生理盐水溶液 (剂量均为 $1000 \text{ u}\cdot\text{kg}^{-1}$), 取血及样品处理方法同上。

LMWH 和 UFH 膜剂的脉冲离子电渗大鼠口腔给药 大鼠禁食过夜 (自由饮水), 以 20% 乌拉坦腹腔注射麻醉 ($1.0 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), 下颚剃毛, 固定四肢, 保持俯卧。电极正极固定于大鼠下颚, 分别将 65 mg LMWH 和 59 mg UFH 膜剂 (约合 LMWH 和 UFH 1500 u) 加少量水润湿后固定于电极负极一侧, 将附有膜剂的电极置于大鼠口腔, 剂量 $5000 \text{ u}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。开启电源, 保持脉冲电流密度为 $0.45 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$, 通断周期 60 次/分钟, 占空比 1:1, 2 h 后关闭电源。取血及样品处理方法同上。

统计学方法 采用 t 检验进行统计学分析, 采用 DAS 2.0 软件计算药物动力学参数。

结果

1 LMWH 和 UFH 体内分析方法的建立

APTT 法测定 LMWH 浓度在 $0.2\sim 5 \text{ u}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性良好 ($r = 0.9929$), 标准曲线方程为 $\Delta\text{APTT} (\text{s}) = 30.83C - 4.90$, 日内精密密度在 $3.3\%\sim 4.2\%$, 日间精密密度在 $5.6\%\sim 7.4\%$, 高、中、低浓度 LMWH 的回收率均在 $83.7\%\sim 107.9\%$, 表明该方法可以有效测定大鼠血浆中的 LMWH。

该法测定 UFH 浓度在 $0.1\sim 1.5 \text{ u}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性良好 ($r = 0.9904$), 标准曲线方程为 $\Delta\text{APTT} (\text{s}) =$

$101.13C - 2.87$, 日内精密密度 $3.8\%\sim 4.4\%$, 日间精密密度 $5.1\%\sim 6.5\%$, 高、中、低浓度 UFH 的回收率 $91.6\%\sim 116.7\%$, 表明 APTT 法亦可有效测定大鼠血浆中的 UFH。

2 吸收促进剂的筛选

研究中考察了含不同种类吸收促进剂的 LMWH 溶液经大鼠口服给药后的体内吸收情况。结果表明, 不加促进剂 LMWH 很难透过胃肠道黏膜进入体循环。从图 1 可见, Labrasol 和 SDC 的促吸收作用优于 Azone、NMP 和 Transcutol P ($P < 0.05$)。

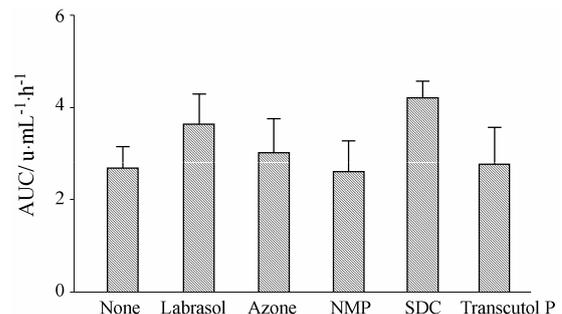


Figure 1 Effect of different enhancers on the absorption of low molecular weight heparin (LMWH, $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) after oral administration in rats. ($n = 3$)

3 口腔给药的影响因素

3.1 结扎时间 考察以 5% Labrasol 为吸收促进剂, 结扎食管 5、15 和 30 min, 对药物经大鼠口腔给药吸收的影响。图 2 表明, LMWH 通过大鼠口腔给药的吸收量明显高于经大鼠口服给药, 与结扎食管 5 min 相比, 随着食管结扎时间的延长, LMWH 在大鼠口腔的保留时间延长, LMWH 在体内吸收明显增加 ($P < 0.01$)。

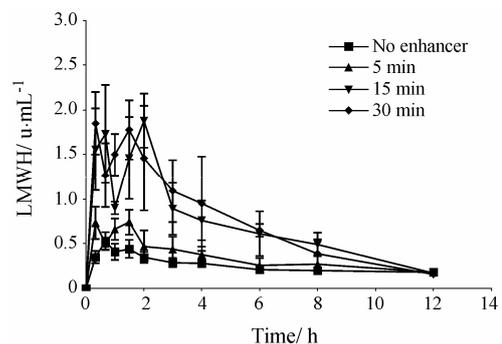


Figure 2 Effect of ligation time of esophagus on the absorption of LMWH ($50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) after oral cavity administration in rats. ($n = 3$)

3.2 Labrasol 用量 考察分别以 1%、3% 和 5% Labrasol 为吸收促进剂, 结扎食管 15 min, 对药物经

大鼠口腔给药吸收的影响。图 3 表明, 吸收促进剂 Labrasol 用量的增加, 可以帮助 LMWH 透过机体屏障, 与 1% Labrasol 用量相比, 提高促进剂浓度可以显著增加 LMWH 的体内吸收量 ($P < 0.01$)。

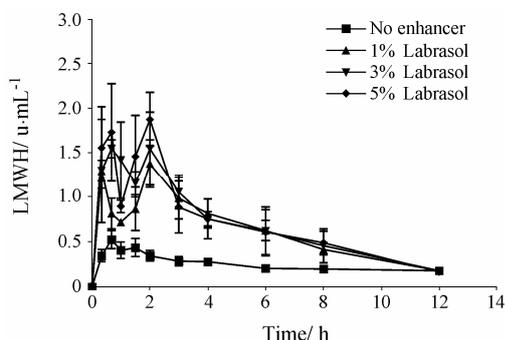


Figure 3 Effect of concentration of Labrasol on the absorption of LMWH ($50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) after oral cavity administration in rats. ($n = 3$)

4 LMWH 膜剂的药动学研究

4.1 吸收促进剂对 LMWH 经大鼠口腔吸收的影响
由图 4 可见, LMWH 不易通过大鼠口腔途径吸收; 在 Labrasol 作用下, LMWH 膜剂的体内吸收也无明显增加。

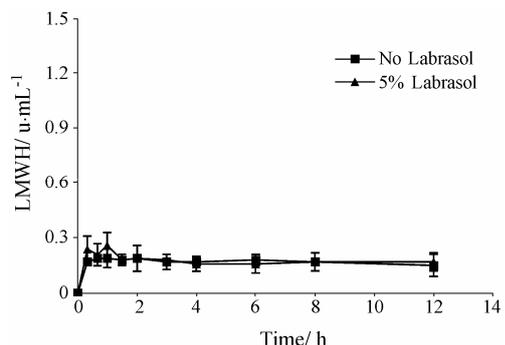


Figure 4 Effect of Labrasol on the absorption of LMWH ($50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) film after rats' oral cavity administration ($n = 3$)

4.2 口服、口腔和皮下给予 LMWH 膜剂后大鼠体内的吸收比较
大鼠口服 LMWH 溶液体内吸收有限, 生物利用度仅 7%, 药物很难通过胃肠道黏膜吸收进入体内; 给予 LMWH 膜剂后, 体内吸收有所降低; 使用离子电渗后, LMWH 膜剂经大鼠口腔给药发现, 电流能明显促进药物通过大鼠口腔黏膜吸收, 生物利用度接近 20% (图 5)。

5 UFH 膜剂的药动学研究

5.1 吸收促进剂对 UFH 大鼠口腔吸收的影响
实验发现, UFH 很难通过大鼠口腔黏膜吸收, 即使有吸收促进剂 Labrasol, 对 UFH 经大鼠口腔吸收也无明

显促进作用, 与 LMWH 相似。

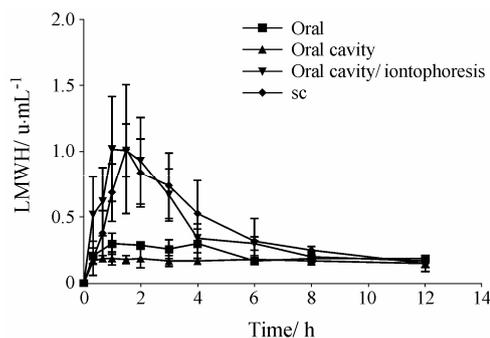


Figure 5 Plot of concentration-time after oral, oral cavity and sc administration of LMWH solution and film using iontophoresis ($0.45 \text{ mA}/\text{cm}^2 \text{ PC}$) in rats. ($n = 3$)

5.2 口服、口腔和皮下给予 UFH 膜剂大鼠体内的吸收比较
大鼠口服 UFH 溶液和口腔给予含药膜剂体内吸收均很差, 生物利用度不到 1%; 离子电渗技术能增加 UFH 经大鼠口腔吸收, 生物利用度可升高到 6% 左右, 抗凝效果明显增加 (图 6)。

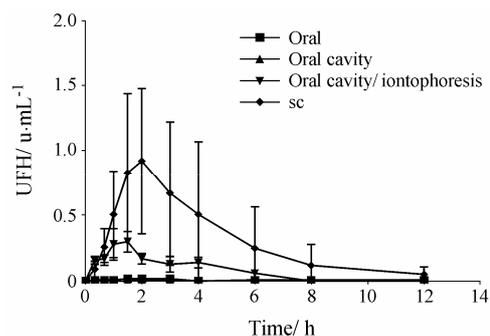


Figure 6 Plot of concentration-time after oral, oral cavity and sc administration of unfractionated heparin (UFH) solution and film using iontophoresis ($0.45 \text{ mA}/\text{cm}^2 \text{ PC}$) in rats. ($n = 3$)

讨论

有报道^[5-8] LMWH 和 UFH 很难透过皮肤或经口服给药吸收进入血液循环。本研究分别以 SDC、Labrasol、Azone、NMP 和 Transcutol 为吸收促进剂, 考察了其对 LMWH 溶液经大鼠口服吸收有无促进作用。发现 SDC 和 Labrasol 对 LMWH 的促吸收作用优于其余几种吸收促进剂, 通过口腔给药后进一步发现 Labrasol 的促吸收效果在所考察的几种促进剂中最佳。SDC 可刺激大鼠鼻黏膜和肠黏膜分泌细胞大量释放蛋白, 对黏膜有一定刺激性^[9, 10]; Azone、NMP 和 Transcutol 的促渗机制为通过提高药物在黏膜中的浓度, 帮助药物透过黏膜; 而 Labrasol 则是通过改变细胞膜的流动性, 使药物穿过细胞膜透过黏

膜,其作用机制与离子电渗相近,具有协同作用。研究结果也显示,在考察的几种吸收促进剂中 Labrasol 促吸收效果最佳,因此,本文以 Labrasol 为 LMWH 和 UFH 口腔黏膜给药的吸收促进剂。

LMWH 和 UFH 经大鼠口服给药,在血浆中浓度不高,加入 labrasol 后,虽然血中药物浓度有所增加,但促吸收作用有限,药物依旧很难通过胃肠道黏膜吸收进入体循环。药物口腔给药发现,LMWH 和 UFH 在口腔黏膜的透过性好于胃肠道黏膜,通过使用吸收促进剂及结扎食管延长药物在口腔的滞留时间,可以使药物的体内吸收明显增加。为了避免麻醉状态下大鼠死亡,食管结扎时间不宜过长。LMWH 和 UFH 溶液经大鼠口腔给药,吸收量与口服给药相比有所增加,加入促进剂后血浆中药物浓度增加更为明显,体内吸收明显提高。虽然大鼠作为啮齿类动物口腔黏膜为角质化黏膜,对药物透过具有天然屏障作用,但研究表明,在吸收促进剂的作用下,LMWH 和 UFH 经大鼠口腔黏膜有一定吸收。

药动学研究发现,大鼠口服药物溶液后,两种药物均很难通过胃肠道黏膜吸收,LMWH 的吸收量大于 UFH,生物利用度为 7%,而后者不足 1%。加入吸收促进剂大鼠口腔给予 LMWH 和 UFH 膜剂与不加入促进剂相比较,大鼠血浆中的药物浓度没有明显增加,与大鼠口服给药的研究结果不同。这是由于 ① 大鼠的口腔黏膜为角质化黏膜,屏障作用大;② 由于大鼠口腔中的唾液量很少,膜剂中药物溶出速度缓慢,唾液中药物浓度明显低于口服给药时直接给予的药物溶液浓度,因此吸收量明显降低。口腔离子电渗给药发现,电流对 LMWH 和 UFH 的吸收有明显促进作用,在 0.45 mA/cm^2 脉冲电流作用下,LMWH 口腔给药的生物利用度接近 20%,抗凝疗效与皮下注射给药相同,可持续 3 h。相同电场条件作用下,UFH 离子电渗口腔给药的生物利用度为 6%左右,虽然低于相同条件下的 LMWH 生物利用度,但其抗凝治疗效果却可持续 4 h 以上。以上研究表明,口腔黏膜可作为 LMWH 和 UFH 给药的有效途径,用于大分子药物非注射途径给药的研究。

References

- [1] Kompella UB, Lee VH. Delivery systems for penetration enhancement of peptide and protein drugs: design considerations [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 46: 211–245.
- [2] Li D, Wang J, Hou HM. Progress of buccal delivery system [J]. *Chin J Pharm* (中国医药工业杂志), 2009, 40: 303–307.
- [3] Jette J. Buccal iontophoretic delivery of atenolol·HCl employing a new *in vitro* three-chamber permeation cell [J]. *J Control Release*, 2001, 70: 83–95.
- [4] Giannola LI, Caro VD, Giandalia G, et al. Diffusion of naltrexone across reconstituted human oral epithelium and histomorphological features [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2007, 65: 238–246.
- [5] Betz G, Nowbakht P, Imboden R, et al. Heparin penetration into and permeation through human skin from aqueous and liposomal formulations *in vitro* [J]. *Int J Pharm*, 2001, 228: 147–159.
- [6] Jiao YY, Nathalie U, Valerie H, et al. Anticoagulant activity of heparin following oral administration of heparin-loaded microparticles in rabbits [J]. *J Pharm Sci*, 2002, 91: 760–768.
- [7] Alf L, Nathalie U, Philippe M. Oral low molecular weight heparin delivery by microparticles from complex coacervation [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2007, 67: 632–638.
- [8] Zang HC, Zhai GX. Study on preparation of low molecular weight heparin nanoliposomes and their nasal absorption in rabbits [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2003, 3: 196–198.
- [9] Yamamoto A, Uchiyama T, Nishikawa R, et al. Effectiveness and toxicity screening of various absorption enhancers in the rat small intestine: effects of absorption enhancers on the intestinal absorption of phenol red and the release of protein and phospholipids from the intestinal membrane [J]. *J Pharm Pharmacol*, 1996, 48: 1285–1289.
- [10] Merkus FW, Schipper NG, Hermensa WA, et al. Absorption enhancers in nasal drug delivery: efficacy and safety [J]. *J Control Release*, 1993, 24: 201–208.