

· 研究报告 ·

基于体外溶出度与体内生物利用度的西罗莫司增溶技术研究

张雪婷^{1,2}, 云超^{1,2}, 陈珍珍^{1,2}, 陶春¹, 宋洪涛¹ (1. 福建医科大学福总临床医学院 / 第九〇〇医院药学科, 福州, 350025; 2. 福建医科大学药学院, 福州, 350108)

[摘要] 目的 评价不同增溶技术对西罗莫司(sirolimus, SRL)的体外溶出与体内吸收的影响。方法 选取固体分散体(SD)、包合物(IC)、自微乳(SMEDDS)和纳米结构脂质载体(NLC)为SRL的增溶技术。SRL-SMEDDS和SRL-NLC已在前期研究中获得最优处方。另外,以包封率、体外溶出度等为指标,筛选SRL-SD和SRL-IC的处方工艺。分别采用0.4% SDS,水,及pH 1.2、pH 4.5、pH 6.8、pH 7.4缓冲液为溶出介质,考察市售制剂Rapamune[®],以及自制的各增溶制剂的溶出曲线。采用比格犬体内药动学试验,考察上述制剂的体内吸收度。结果 在0.4%十二烷基硫酸钠(SDS)中,各制剂在2h的溶出度均超过80%。在pH 1.2的介质中,无法测得SRL-SD的溶出度,而IC、SMEDDS和NLC的溶出度呈先增大后减小的趋势。在其他介质中,SRL的溶出度均有所降低,而SRL-IC显示了最佳的溶出度,未出现明显的降低趋势。体内药动学试验结果显示,原料药、SRL-SD、SRL-IC、SRL-NLC和SRL-SMEDDS的相对生物利用度分别为9.1%、18.7%、33.2%、78.0%、97.6%。结论 SD、SMEDDS、NLC、IC均可提高SRL的体外溶出度和体内吸收度,其中,SMEDDS对SRL的生物利用度改善最为明显。

[关键词] 西罗莫司; 固体分散体; 包合物; 自微乳; 纳米结构脂质载体; 溶出度; 生物利用度

[中图分类号] R927 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2020)05-0441-06

[DOI] 10.12206/j.issn.1006-0111.201910022

Study on sirolimus solubilization technology based on in vitro dissolution and in vivo bioavailability

ZHANG Xueting^{1,2}, YUN Chao^{1,2}, CHEN Zhenzhen^{1,2}, TAO Chun¹, SONG Hongtao¹ (1. Department of Pharmacy, Fuzong Clinical Medical College of Fujian Medical University, Fuzhou 350025, China; 2. College of Pharmacy, Fujian Medical University, Fuzhou 350108, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the effects of different solubilizing techniques on the in vitro dissolution and in vivo pharmacokinetics of Sirolimus (SRL). **Methods** Solid dispersions (SD), inclusion complex (IC), self-micro emulsifying drug delivery system (SMEDDS) and nano-structured lipid carrier (NLC) were selected as the solubilization technology for SRL. SRL-SMEDDS and SRL-NLC have obtained the optimal prescription in the previous studies. Additionally, the formulation process of SRL-SD and SRL-IC was screened by using inclusion rate and dissolution profiles as indicators. 0.4% SDS, water and buffer solutions with pH 1.2, 4.5, 6.8, 7.4 were used as dissolution media. The dissolution profile of the commercially available formulation Rapamune[®] and the lab-made solubilized preparations were investigated. The in vivo absorption of the above preparations was examined using a pharmacokinetic test in Beagle dogs. **Results** In 0.4% SDS, the dissolution of each preparation exceeded 80% in 2 h. In the medium of pH 1.2, the dissolution of SRL-SD could not be measured while the dissolution of IC, SMEDDS and NLC increased first and then decreased. In other media, the dissolution of the SRL was reduced. The SRL-IC showed the best dissolution without a significant decrease. The relative bioavailability of APIs, SRL-SD, SRL-IC, SRL-NLC and SRL-SMEDDS were 9.1%, 18.7%, 33.2%, 78.0%, and 97.6% respectively in vivo pharmacokinetic tests. **Conclusion** SD, SMEDDS, NLC, and IC can improve the in vitro dissolution and in vivo absorption of SRL. Among them, SMEDDS has the most significant improvement in the bioavailability of SRL.

[Key words] sirolimus; solid dispersion; inclusion complex; SMEDDS; nano-structured lipid carrier; dissolution; bioavailability

[基金项目] 福建省自然科学基金面上项目(2018J01347); 福建医科大学启航基金项目(2017XQ1202); 福州总医院院立项目(2017Q06); 福建省科技计划引导性项目(2019Y0071)

[作者简介] 张雪婷, 硕士研究生, Email: Carolingg@163.com

[通讯作者] 陶春, 博士, 主管药师, 研究方向: 药物新剂型与制剂新技术, Email: pleciestao@163.com; 宋洪涛, 博士, 主任药师, 博士生导师, 研究方向: 药物新剂型与制剂新技术, Email: sohoto@vip.163.com

西罗莫司(sirolimus, SRL), 又称雷帕霉素, 是第三代免疫抑制剂, 在临床上常用于抑制肝、肾等器官移植后的免疫排斥反应。SRL 属于生物药剂学分类 II 类药物, 在水中的溶解度极低, 而渗透性良好^[1-4]。SRL 药理活性高, 但因水溶性差, 且易被肠壁和肝中的 CYP3A4 同工酶广泛代谢, 致使其口服生物利用度较低。这是临床应用 SRL 的重要缺陷之一。目前, 已上市的 SRL 制剂主要是纳米结晶片, 生物利用度约为 17%^[5-7]。

通过适当的制剂技术提高 SRL 在胃肠道中的溶解度, 可提高其口服生物利用度。在前期研究中, 课题组分别独立进行了含 SRL 的自微乳(self-microemulsifying drug delivery system, SMEDDS)、固体分散体(solid dispersion, SD)和纳米结构脂质载体(nanostructured lipid carriers, NLC)的构建, 均显著改善了 SRL 的体外溶出。本实验在前期研究的基础上, 新增环糊精衍生物对 SRL 的增溶研究, 结合体外溶出度和体内生物利用度, 综合分析和评价各增溶制剂的优势和缺陷, 从而为解决口服难溶性药物的研究提供参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1200 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); Starter 2C 型 pH 计(上海奥豪斯仪器公司); RCZ-6BZ 型药物溶出仪(上海黄海药检仪器公司); 真空冷冻干燥箱(北京博医康试验仪器公司); NS1001L2K 高压匀质机(意大利 NiroSoavi 公司); UV-2800AH 型紫外可见分光光度计(上海优尼科仪器有限公司); 液相色谱-质谱联用仪(美国 AB-SCIEX 有限公司)。

1.2 试剂

SRL 对照品(含量 99.9%)、SRL 原料药(含量 99.6%), 购自福建科瑞药业有限公司; 子囊霉素对照品(上海齐奥化工科技有限公司), Rapamune[®](美国惠氏制药)。聚乙二醇 6000(PEG 6000)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP K30)均购自国药集团化学试剂有限公司; 聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物(Poloxamer 188)、聚氧乙烯 35 蓖麻油(Cremophor EL)、聚氧乙烯氢化蓖麻油(Cremophor RH40)均购自德国 BASF 公司; 油酸聚乙二醇甘油酯(Labrafil M1944CS)、二乙二醇单乙基醚(Transcutol P)、辛酸癸酸聚乙二醇甘油酯(Labrasol)、棕榈酸硬脂酸甘油酯(Precirol ATO5)、月桂酸聚乙二醇甘油酯(Gelucire 44/14)均购自法国 GATTEFOSSE 公司;

HP- β -CD、DM- β -CD、SBE- β -CD(山东滨州智源生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 SRL 含量测定方法

采用高效液相色谱仪(HPLC)测定样品中的 SRL 含量^[8]。色谱柱为 Eclipse XDB-C₁₈(150 mm \times 4.6 mm, 5 μ m), 流动相为乙腈-甲醇-水(45 : 34 : 21), 流速为 1 ml/min, 检测波长为 278 nm, 柱温为 50 $^{\circ}$ C, 进样量为 20 μ l。配制浓度为 2、4、8、12、16、20 μ g/ml 的 SRL 对照品溶液, 得标准曲线为 $Y=54.712X+1.221$, $r=0.9999$, 表明在 2~20 μ g/ml 浓度范围内线性关系良好。另外, 精密性、回收率符合要求。

2.2 SRL 增溶方法

2.2.1 SRL-SMEDDS 的制备

参考前期研究^[9], 称取 1 g SRL 原料药, 加入 19 g 的助乳化剂 Transcutol HP, 超声至全部溶解后, 加入 22 g 油相 Labrafil M1944CS 及 39 g 乳化剂 Cremophor EL, 涡旋混匀, 得到淡黄色澄清溶液, 即 SRL-SMEDDS。

2.2.2 SRL-NLC 的制备

参考前期研究^[10-11], 取 Gelucire44/14 和 Crodamol GTCC 在 75 $^{\circ}$ C 水浴中完全熔融后, 加入 SRL 原料药搅拌均匀成澄明油相, 再将同温度吐温-80 的水溶液迅速倒入油相, 以 300 r/min 搅拌 30 min 制备初乳, 再经高压匀质机 90 MPa 乳匀 5 次, 即得 SRL-NLC 分散液, 其中 SRL 为 0.21%, Gelucire44/14: Crodamol GTCC(1 : 2.1), 脂质总量为 10%, 吐温-80 为 7.33%。随后, 将 SRL-NLC(42.6%)加入微晶纤维素和聚乙烯吡咯烷酮(50%, 4 : 1)中, 研磨混合并放置过夜以充分吸附, 加入甘露醇(冻干保护剂, 3%), 经冷冻干燥过夜后, 所得固体粉末中加入低取代羟丙基纤维素(崩解剂, 4%)和二氧化硅(助流剂, 0.4%)即得固化纳米脂质体。

2.2.3 SRL-SD 的制备

采用溶剂-熔融法制备 SRL-SD。称取载体材料, 于 80 $^{\circ}$ C 水浴加热熔融, 滴入 SRL 乙醇溶液, 充分混匀, 待乙醇挥发完全后, 迅速将其倾倒在冰浴条件下的不锈钢板上成薄膜, 固化, 再于 -18 $^{\circ}$ C 放置 4 h 后, 将固体分散体从不锈钢板上刮下, 置真空干燥器中干燥, 待脆化后研细, 过 80 目筛, 即得 SRL-SD。以载体种类、药物-载体比例为考察因素, 以 0.4% SDS 中的溶出度为指标, 对 SRL-SD 进行单因素分析。

2.2.4 SRL-IC 的制备

称取适量 β -环糊精衍生物溶于去离子水中,缓慢滴加SRL乙醇溶液,在一定温度下磁力搅拌至澄清透明,减压挥发4 h,使乙醇挥发完全,再置于4℃冰箱冷藏12 h,降低SRL的溶解度,从而使游离的SRL发生结晶。经0.22 μm 微孔滤膜过滤除去结晶,滤液冷冻干燥24 h,所得固体研磨细化,过80目筛,即得SRL-IC。

称取一定量的SRL-IC置10 ml容量瓶中,加入50%甲醇水溶液,超声至全部溶解后,定容至刻度,并采用HPLC测定SRL含量,根据公式:包封率(%)=[(SRL投入量-SRL测定量)/SRL投入量] \times 100%,进行计算。以环糊精衍生物的种类、浓度、温度、乙醇体积和投药量为考察因素,以包封率为指标,对SRL-IC进行单因素分析。

2.3 体外溶出试验

参考《中国药典》2015年版四部通则0931项下溶出度与释放度测定法,考察SRL原料药、市售片(Rapamune[®])、SRL-SMEDDS、SRL-NLC、SRL-IC及SRL-SD的溶出曲线。除市售片外,其余样品均装入硬胶囊中,每个胶囊含1 mg SRL。采用桨法,搅拌速度为100 r/min,溶出介质体积为250 ml,分别以0.4% SDS、水、pH 1.2盐酸溶液、pH 4.5醋酸缓冲液、pH 6.8磷酸盐缓冲液、pH 7.4磷酸盐缓冲液为溶出介质。将两颗胶囊或药片置于沉降篮中,投入溶出介质,在10、30、45、60、90、120 min,吸取2 ml介质,并补充等温等体积的介质,采用HPLC测定样品中的药物含量,绘制溶出曲线。

2.4 体内药代动力学试验

选用比格犬为实验动物,采用6周期6交叉实验设计,进行SRL原料药、市售片(Rapamune[®])、SRL-SMEDDS、SRL-NLC、SRL-IC及SRL-SD的药代动力学试验。给药剂量为1 mg SRL,实验动物试验开始前12 h禁食不禁水,给药4 h后自由饮水,2次给药间隔2周以上的清洗期。于给药前,0.25、0.5、0.75、1、1.5、2、3、4、6、8、10、12、24、36、48及72 h分别经前肢小静脉采血2 ml,置于含肝素和EDTA的抗凝管中,-20℃保存备用。血样处理与测定方法参照课题组前期研究^[12]。

3 结果

3.1 SRL-SD的制备

3.1.1 载体种类

如图1A所示,不同载体材料制备的SRL-SD的溶出曲线显示了明显的差异,溶出速率为PEG6000>F68>PVP K30>HPMC606>HPMC-AS-

MF。同时,各载体材料的溶出度均不理想(\leq 50%),因此进一步考察采用二元载体制备SRL-SD。

选择PEG6000联合F68制备二元载体固体分散体^[13],两者比例为3:1、2:1、1:1、1:2、1:3。随PEG6000/F68比例的增大,则SRL溶出度呈增大趋势,在PEG6000/F68为2:1时的溶出度达到最大(图1B)。

3.1.2 药物-载体比例

在PEG6000/F68=2:1的基础上,进一步考察药物-载体比例对SRL-SD溶出的影响。药物-PEG6000/F68载体比例为1:2:1、1:4:2及1:6:3所制的SRL-SD的溶出曲线相似,没有明显差别,2 h的溶出度都接近100%(图1C)。因此优选载药量最大,即药物-PEG6000/F68载体比例为1:2:1。

3.2 SRL-IC的制备

3.2.1 β -环糊精衍生物种类

在其他条件相同的情况下,HP- β -CD、SBE- β -CD和DM- β -CD对SRL的包封率分别为(11.21 \pm 3.35)%、(8.24 \pm 3.11)%和(31.86 \pm 3.26)% ,见图2A。因此,优选DM- β -CD制备SRL-IC。

3.2.2 温度

采用DM- β -CD制备SRL-IC,考察不同温度对包封率的影响。结果显示(图2B),温度越低,包封率越高,10℃条件下制备的SRL-IC的包封率显著高于30℃和50℃($P<0.01$),为(58.61 \pm 4.16)%。因此,优选10℃制备SRL-IC。

3.2.3 环糊精衍生物浓度

DM- β -CD的浓度由200 mg/ml增大至300 mg/ml, SRL的包封率由(52.12 \pm 4.17)%增大至(58.61 \pm 4.11)%($P<0.05$,图2C)。进一步增大DM- β -CD的浓度至600 mg/ml,包封率没有明显变化($P>0.05$)。因此,优选DM- β -CD的浓度为300 mg/ml制备SRL-IC。

3.2.4 乙醇体积

乙醇体积由0.5 ml增大至2 ml,包封率呈增大趋势(图2D)。因此,优选乙醇体积为0.5 ml制备SRL-IC。

3.2.5 投药量

SRL的投药量6 mg增大至8 mg,包封率显著降低,6 mg SRL的包封率为(95.21 \pm 1.10)% ,见图2E。因此,优选SRL的投药量为6 mg。

3.3 体外溶出度

考察SRL-SD、SRL-IC、SRL-SMEDDS及SRL-

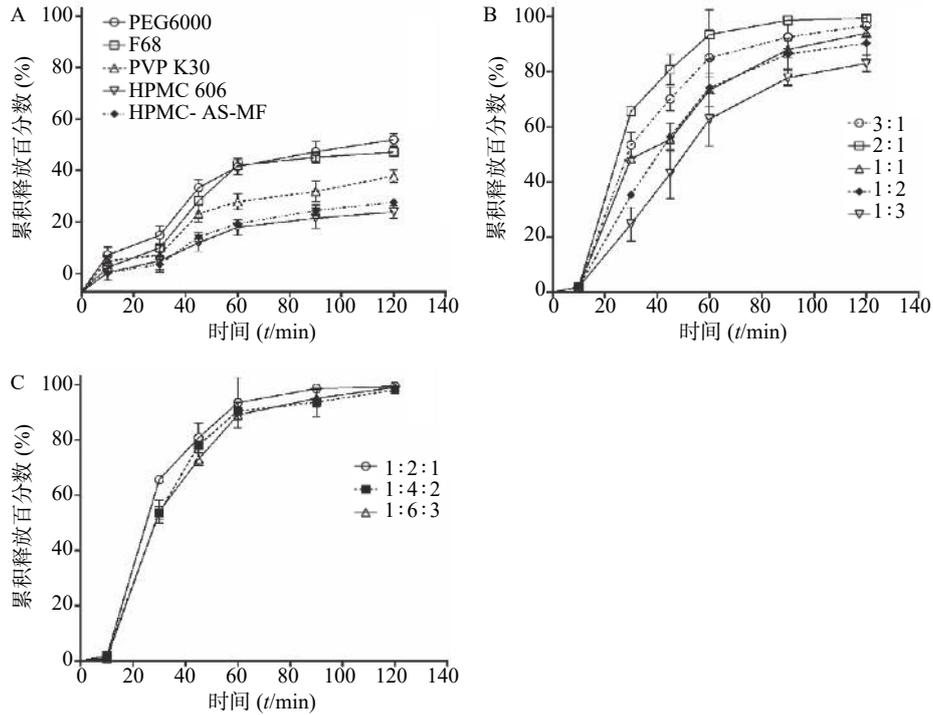


图1 单因素考察固体分散体的制备对体外溶出曲线的影响

A. 单一载体种类的影响; B. 二元载体比例的影响; C. 药物与载体比例的影响

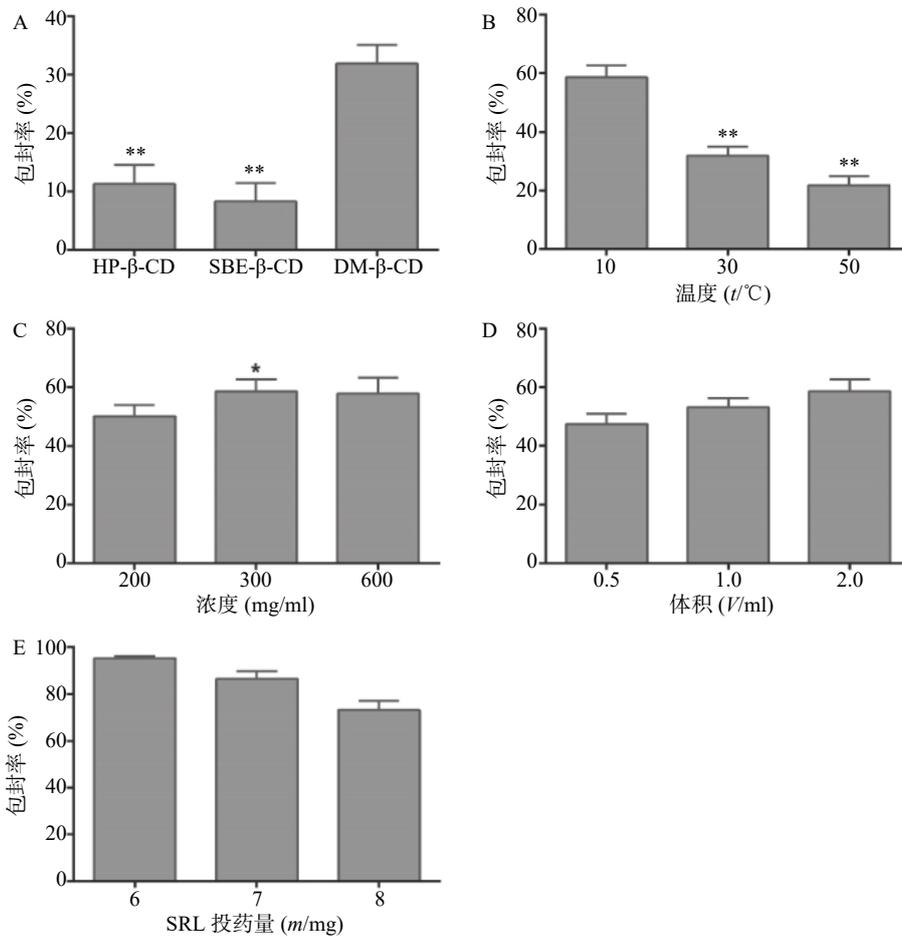


图2 单因素考察包合物的制备工艺对包合率的影响

A. β-环糊精衍生物种类的影响, ** $P < 0.01$, 与 DM-β-CD 比较; B. 温度的影响, ** $P < 0.01$, 与 10 °C 比较; C. 环糊精衍生物浓度的影响, * $P < 0.05$, 与 200 mg/ml 比较; D. 乙醇体积的影响; E. SRL 投药量的影响

NLC在不同介质中的溶出曲线。如图3所示,在0.4% SDS中,各制剂在2 h的溶出度均超过80%,尤其是SMEDDS和NLC的溶出度接近100%。

在pH 6.8和水中,SRL-SD的溶出速率减小,2 h的溶出度分别为(65.00±4.90)%和(76.70±1.95)%。在pH 4.5和pH 7.4的介质中,SRL-SD的溶出在1 h达到最大值,分别为(53.20±4.34)%和(55.20±4.34)%,随后溶出度逐渐降低。在pH 1.2的介质中,未检测到SRL。

在水、pH 4.5、pH 6.8和pH 7.4中,SRL-IC在40 min内的溶出速率有所减小,但2 h的累积溶出没有明显变化,均在80%以上。在pH 1.2的介质中,SRL-IC的溶出度在30 min达到最大值,为(49.84±7.21)%,随后溶出度逐渐降低。

SRL-SMEDDS和SRL-NLC显示了与SRL-SD相似的溶出趋势,即在水和pH 6.8中的溶出度低

于0.4% SDS,但大于80%。在pH 4.5和pH 7.4的介质中,溶出达到峰值(约80%)后逐渐降低。

3.4 比格犬体内药动学试验

SRL血药浓度-时间曲线见图4,经DAS 3.2.6软件处理后,具体参数见表1。

以原料药为参比制剂,SRL-SD、SRL-IC、SRL-SMEDDS、SRL-NLC、Rapamune®的相对生物利用度分别为332.8%、522.9%、1 228.6%、1 537.1%、1 574.3%,表明各增溶方法都显著提高了SRL的生物利用度。

以市售纳米晶片Rapamune®为参比制剂,SRL-SD、SRL-IC、SRL-NLC、SRL-SMEDDS的相对生物利用度分别为18.7%、33.2%、78.0%、97.6%,可见在各增溶方法中,SMEDDS对SRL体内吸收的作用最显著,与市售制剂相当。

4 讨论

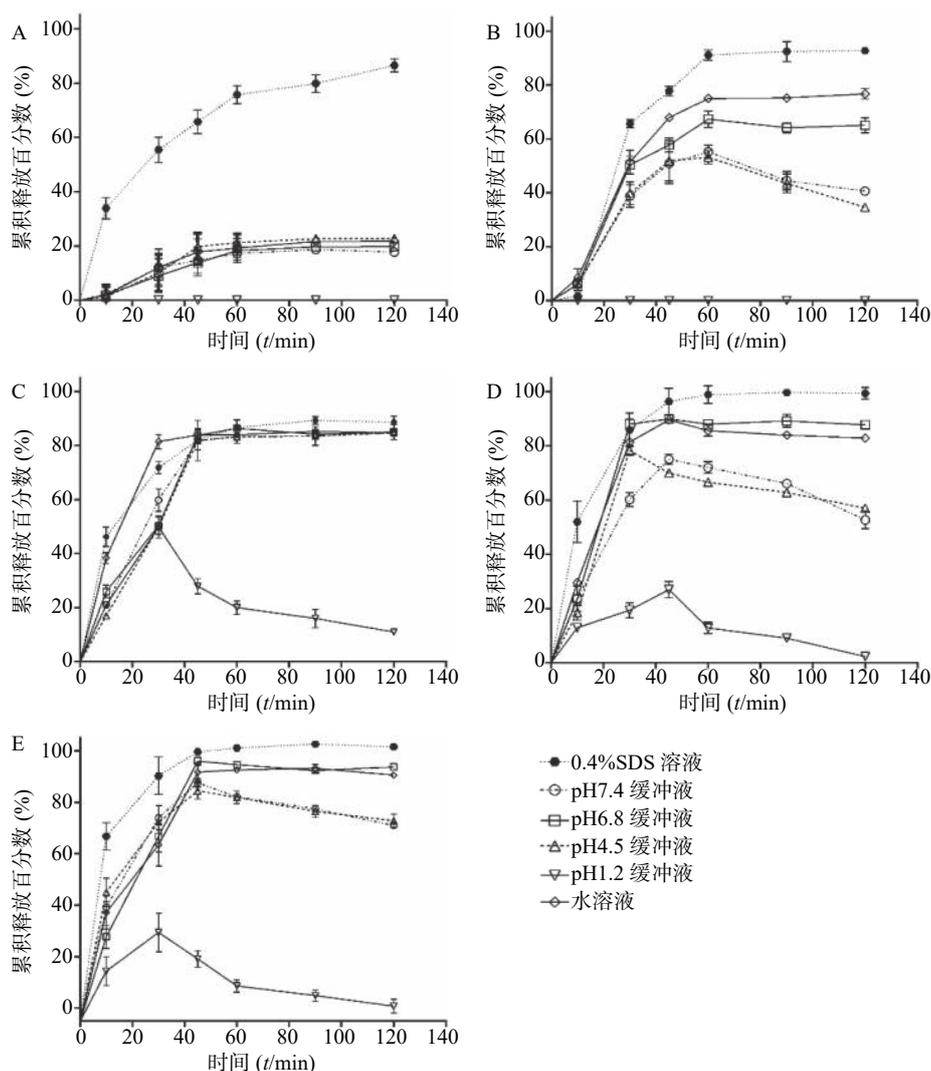


图3 不同增溶制剂的西罗莫司在溶出介质中的溶出曲线图(n=3)
A. Rapamune®; B. SRL-SD; C. SRL-IC; D. SRL-SMEDDS; E. SRL-NLC

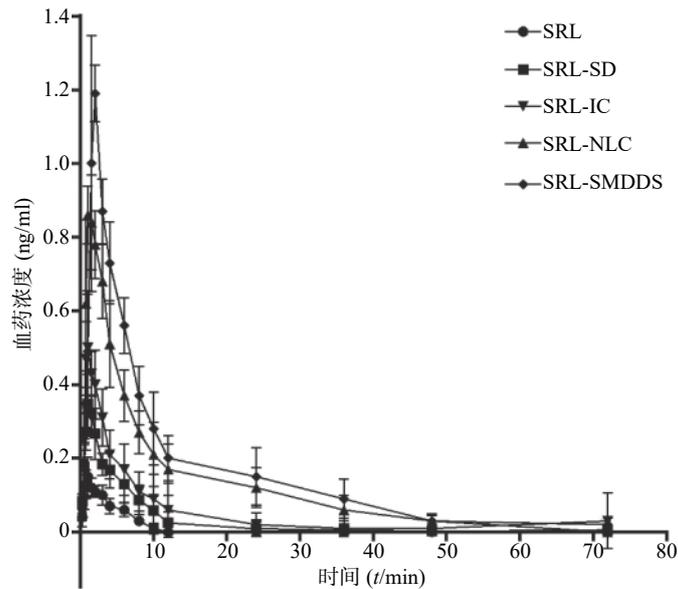


图4 参比制剂与受试剂平均血药浓度-时间曲线 (n=6)

表1 非房室模型体内药动学参数 ($\bar{x} \pm s$)

| 参数 | SRL | SRL-SD | SRL-IC | SRL-NLC | SRL-SMEDDS | Rapamune [®] |
|--|------------|------------|------------|-----------|------------|-----------------------|
| AUC _{0→72} ($\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{ml}$) | 0.70±0.13 | 2.06±0.79 | 3.66±2.64 | 8.60±2.03 | 10.76±1.57 | 11.02±2.73 |
| AUC _{0→t} ($\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{ml}$) | 0.73±0.15 | 2.07±0.81 | 3.78±2.84 | 8.67±1.95 | 11.15±2.11 | 11.75±3.13 |
| $t_{1/2}$ (t/h) | 16.53±1.50 | 14.50±2.15 | 20.64±5.45 | 8.97±6.87 | 12.97±5.67 | 14.54±5.67 |
| t_{max} (t/h) | 1.04±0.25 | 1.25±0.28 | 1.04±0.25 | 1.13±0.31 | 1.50±0.38 | 1.83±0.26 |
| c_{max} (ng/ml) | 0.16±0.05 | 0.36±0.05 | 0.53±0.13 | 0.90±0.09 | 1.23±0.07 | 1.28±0.13 |

本研究同时制备和比较了SRL的4种增溶制剂,均显示了良好的体外溶出度。同时,各制剂都提高了SRL的生物利用度,但体内吸收程度有较明显的差异。

首先,SRL本身的性质是影响体内吸收的重要因素。在理化性质方面,SRL在电解质溶液中可发生开环水解,特别是在强酸和碱性条件下,降解速率显著增加^[14]。在生理因素方面,SRL是肠道内CYP3A4酶和P糖蛋白的底物,对肠道吸收有较大影响^[15]。

其次,制剂本身的特点对体内吸收有重要影响。SMEDDS和NLC均可形成纳米级的脂质微粒,在胃肠道消化后可形成乳糜胶束^[16-17]均减轻了胃肠液的pH对SRL的降解作用,因此SMEDDS和NLC对脂质微粒中的SRL有一定的保护作用。相比之下,SD中的SRL快速释放后,载体材料失去了对药物的隔离保护作用,导致SRL在极短的时间内发生降解。另外,环糊精的空腔可以容纳药物分子^[18],不仅提高了SRL的溶解度,而且降低了H⁺和OH⁻对SRL的作用概率,减缓了SRL的降解。本研究的体外溶出试验也证实了不同增溶

制剂中SRL稳定性的差异。

同时,SMEDDS的辅料Labrafil M1944 CS和Cremophor EL^[9, 19-21]和NLC中的脂质及其代谢产物能够抑制CYP3A4酶的代谢和P糖蛋白外排,消化后形成的乳糜胶束还可通过淋巴途径吸收^[22],从而提高了生物利用度^[10-11]。

另外,由于SRL分子量较大,分子结构可能仅有部分插入环糊精的空腔中。因此,尽管环糊精提高了SRL的溶出度,但包合物的稳定性较差,进入胃肠道后,药物可被胃肠液中的成分替换^[23],导致SRL加速降解或发生重结晶,进而生物利用度下降。

【参考文献】

- [1] RIAL M D E L C, ABBUD-FILHO M, GONÇALVES R T, et al. Individualizing early use of sirolimus in renal transplantation[J]. *Transplant Proc*, 2010, 42(10): 4518-4525.
- [2] TOSO C, MERANI S, BIGAM D L, et al. Sirolimus-based immunosuppression is associated with increased survival after liver transplantation for hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2010, 51(4): 1237-1243.