

不同处方喷昔洛韦微乳体外特性及小鼠体内分布研究

刘杰^{1,2}, 王荣昌¹, 傅静奕², 张志荣³, 何岚¹, 胡海燕^{1*} (1.中山大学药学院, 广州 510006; 2.中山大学附属第三医院, 广州 510630; 3.四川大学靶向药物与释放系统教育部重点实验室, 成都 610041)

摘要: 目的 探讨微乳处方(表面活性剂种类及用量)及制备工艺对喷昔洛韦微乳体内分布的影响。方法 考察 Cremophor EL 自发微乳(PCV-ME6)、Cremophor EL 均质微乳(PCV-MEho)和去氧胆酸钠微乳(PCV-MEde)此3种载喷昔洛韦微乳的粒径分布、zeta 电位、体外释放及在小鼠体内分布特征。结果 各载药微乳粒径均小于 100 nm, zeta 电位在-3 mV 至 0 mV 之间; 各载药微乳均延缓了喷昔洛韦的体外释放, 其中 PCV-MEde 与喷昔洛韦溶液(PCV-S)相比释放呈现显著差异($f_2 < 50$); PCV-MEde 使喷昔洛韦肾脏消除明显变慢, AUC 为 PCV-S 的 3.5 倍。PCV-MEde 在各组织和血浆的 AUC 也均明显大于其它微乳和 PCV-S。结论 表面活性剂种类对喷昔洛韦的体内分布有显著影响。PCV-MEde 静注后, 表面活性剂去氧胆酸钠与磷脂发生相互作用, 结合形成脂质囊泡。喷昔洛韦由于被包裹在亲水内核, 从而改变了喷昔洛韦的释放和体内过程。而微乳制备工艺引起药物的体内过程的差异, 可能是由于表面活性剂用量小造成微乳粒径较大所致。

关键词: 去氧胆酸钠; 微乳; 喷昔洛韦; 体内分布

中图分类号: R944.9; R965.2

文献标识码: A

文章编号: 1007-7693 (2009) 05-0356-05

In Vitro Release and *in Vivo* Distribution in Mice of Penciclovir-loaded Microemulsions with Different Formulation and Process

LIU Jie^{1,2}, WANG Rongchang¹, FU Jingyi², ZHANG Zhirong³, HE Lan¹, HU Haiyan^{1*} (1.School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China; 2.The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China; 3.Key Lab of Drug Targeting and Delivery System of Education Ministry, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the effect of various surfactants and various preparing process on *in vivo* distribution of penciclovir-loaded microemulsions. **METHODS** Drop sizes, zeta potential and *in vitro* release and *in vivo* distribution of three penciclovir-loaded microemulsions were investigated. They are Cremophor EL microemulsion by self-emulsifying (PCV-ME6), Cremophor EL microemulsion by homogenizing (PCV-MEho), sodium deoxycholate microemulsion by self-emulsifying (PCV-MEde). **RESULTS** Drop sizes of all penciclovir-loaded microemulsions were smaller than 100 nm, zeta potential between -3 mV and 0 mV. *In vitro* release of all penciclovir-loaded microemulsions were delayed, but only PCV-MEde showed evident difference from that of penciclovir solution (PCV-S) with f_2 less than 50. PCV-MEde obviously increased penciclovir concentration in the brain and decelerated the clearance of penciclovir from kidney with AUC 3.5 folds higher than PCV-S. AUCs of PCV-MEde in plasma and other tissues also were distinctly higher than those of PCV-S and other penciclovir-loaded microemulsions. **CONCLUSION** What surfactants we choose greatly affect *in vivo* disposition of penciclovir. The microstructure of PCV-MEde

基金项目: 广东省中医局建设中医药强省科研课题(2007096)

作者简介: 刘杰, 男, 硕士研究生, 主管药师 *通信作者: 胡海燕, 女, 博士 Tel: (020)39943118 E-mail: huhaiyan73@gmail.com

might have changed during dilution after iv administration. A reassembly could take place between lecithin and sodium deoxycholate due to their strong interaction, which resulted in formation of lipid vesicles. Penciclovir is then solubilized into hydrophilic core of lipid vesicles and its release and disposition were changed. The different *in vivo* disposition of microemulsions made by self-emulsifying and homogenizing (PCV-ME6 & PCV-MEho) likely depended on less surfactant content of the later which is related to bigger drop sizes.

KEY WORDS: sodium deoxycholate; microemulsion; penciclovir; biodistribution

我们的前期研究表明, Cremophor EL/大豆磷脂/无水乙醇(4:1:2)作为混合表面活性剂、Labrafac CC 作为油相、1,2-丙二醇/水(1:1)作为水相制备得到喷昔洛韦微乳(PCV-ME), 经静脉注射后在体内快速消除, 体内分布呈现一定的脑靶向特征^[1]。为了深入探讨微乳处方和工艺对微乳体内分布的影响, 本文以喷昔洛韦为模型药物, 采用不同表面活性剂及用量, 不同制备工艺制备了三种载药微乳: PCV-ME6(混合表面活性剂、油相和水相与PCV-ME相同, 但混合表面活性剂总量为34%, 油量为6%)、PCV-MEde(大豆磷脂/去氧胆酸钠/无水乙醇为9:2:8时作为混合表面活性剂, 混合表面活性剂总量24%, 油量为6%)、PCV-MEho(微乳组成与PCV-ME6同, 仅混合表面活性剂总量24%, 必须经高压均质方可得到粒径小于100 nm的微乳)。通过研究以上各微乳经静脉注射后喷昔洛韦在小鼠的体内分布, 探讨表面活性剂种类及用量、制备工艺对喷昔洛韦微乳小鼠体内分布的影响。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters高效液相色谱仪(1525双泵, 2487双波长紫外检测器, 717 plus自动进样器, 美国); Zetasizer 900激光粒度仪(Marven, 英国); RH-KT/C型磁力搅拌器(IKA, 德国); Fluko均质机(上海弗鲁克流体机械制造有限公司); NIRO-SOAVI高压均质机(Soavi S.P.A, 意大利); VISKING透析袋(截留分子量12000-14000, 德国); HZS-H水浴振荡器(哈尔滨市东明医疗仪器厂); TL-510台式离心机(上海市离心机械研究所); DV-III Ultra流变仪(Brookfield®, 美国); WAY-2S数字阿贝折射仪(上海精密科学仪器有限公司); XW-80旋涡混合器(南京电器三厂)。

1.2 试剂

喷昔洛韦(penciclovir, 四川抗菌素研究所赠, 纯度>98%); 拉米夫定(lamivudine, 天津葛兰素史克, 纯度>98%); Cremophor EL(Sigma, 美国); 注射用大豆磷脂(lecithin, 上海太伟药业有限公司); 去氧胆酸钠(国药集团化学试剂有限公司);

Labrafac CC(Gattefossé, 法国); 肝素钠(效价≥150 u·mg⁻¹, 上海白奥生物科技有限公司); 制备用水为双蒸水; 甲醇为色谱纯; 其他试剂均为分析纯。

$$f_2 = 50 \lg \left\{ \left[1 + \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n W_i (R_i - T_i)^2 \right]^{-0.5} \times 100 \right\}$$

1.3 实验动物

昆明种小鼠18~22 g, ♀ ♂各半(中山大学实验动物中心, 实验动物证号: 2005A089)。

2 方法

2.1 喷昔洛韦溶液(PCV-S)的制备

将喷昔洛韦溶于1,2-丙二醇-水(1:1)溶液中, 制成浓度为4.0 g·L⁻¹的喷昔洛韦溶液。

2.2 喷昔洛韦微乳的制备

2.2.1 喷昔洛韦Cremophor EL自发微乳(PCV-ME6) 取处方量的Cremophor EL、大豆磷脂和无水乙醇, 超声混合均匀, 加入Labrafac CC, 混匀。在磁力搅拌下, 滴加1,2-丙二醇-水(1:1)到全量, 得透明澄清的空白微乳。加喷昔洛韦搅拌溶解, 制成浓度为4.0 g·L⁻¹的载药微乳。

2.2.2 喷昔洛韦Cremophor EL均质微乳(PCV-MEho) 将处方量的油相、水相和混合表面活性剂混合, 40℃, 400 bar条件下高压均质15次。得至半透明的空白微乳, 遂加喷昔洛韦搅拌溶解, 制成浓度为4.0 g·L⁻¹的载药微乳。

2.2.3 去氧胆酸钠自发微乳(PCV-MEde) 取处方量的注射用大豆磷脂、去氧胆酸钠、乙醇超声混合均匀, 加入Labrafac CC, 混匀。在磁力搅拌下, 滴加1,2-丙二醇-水(1:1)到全量, 得透明澄清的空白微乳, 遂加喷昔洛韦搅拌溶解, 制成浓度为4.0 g·L⁻¹的载药微乳。

2.3 载药微乳粒径及分布

微乳用双蒸水稀释3倍, 测定粘度及折光率, 以此作为粒径测定参数。在温度(25±0.1)℃, 散射角θ=90°, 进行测定。

2.4 微乳的zeta电位的测定

用激光粒度仪测定微乳的zeta电位。

2.5 载药微乳体外释放

精密量取1.0 mL PCV-S及各载药微乳置预先盛有4.0 mL释放介质(含0.5%吐温80的pH 7.4磷酸盐缓冲液)的透析袋(截留分子量12 000~14 000)中,立即扎紧,置150 mL, (37±1)℃保温的相同释放介质中,保持80次·min⁻¹的速度恒温振荡。分别于0.17, 0.33, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 9, 12 h取样500 μL,同时补加等温同体积的释放介质。样液经微乳滤膜(0.45 μm)过滤后HPLC法测定,计算药物累积释放百分率。

喷昔洛韦载药微乳与喷昔洛韦溶液体外释放的差异按下式计算相似因子(f₂),并进行f₂因子检验:

其中,R_t为喷昔洛韦溶液t时间的累积释放率(参比),T_t为喷昔洛韦微乳t时间的累积释放率,n为取样点个数,W_t为适宜的权重因子,文中取W_t=1。当f₂值在0~50之间时,两释放曲线之间有差异;当f₂值在50~100之间时两释放曲线无差异。

表 1 药物溶液及载药微乳处方

Tab 1 The formulation of drug-loaded solution or microemulsions

	油相/%	Stot 1/%	Stot 2/%	丙二醇-水(1:1)/%	含药量/g·L ⁻¹	外 观
PCV-S	-	-	-	100	4.0	透 明
PCV-MEho	6	24	-	70	4.0	半透明
PCV-MEde	6	-	24	70	4.0	透 明
PCV-ME6	6	34	-	60	4.0	透 明

注: Stot 1为Cremophor EL/大豆磷脂/乙醇(4:1:5),而Stot 2为大豆磷脂/去氧胆酸钠/乙醇(9:2:8)

Note: Stot 1 was formed by cremophor EL/lecithin/ethanol (4:1:5), and Stot 2 was formed by lecithin/sodium deoxycholic/ethanol (9:2:8)

3.2 微乳粒径及分布

各微乳粒径及分布见表 2。

表 2 空白微乳和载药微乳的粒径大小和分布(n=3)

Tab 2 Droplet sizes and distribution of drug-free or drug-loaded microemulsions (n=3)

		粒径大小/nm	PDI
PCV-MEho	空白微乳	48.4±0.4	0.145±0.016
	载药微乳	92.4±2.6	0.312±0.034
PCV-MEde	空白微乳	19.3±1.0	0.171±0.014
	载药微乳	22.6±0.8	0.287±0.018
PCV-ME6	空白微乳	18.6±1.7	0.114±0.022
	载药微乳	21.8±0.8	0.095±0.006

PCV-MEde和PCV-ME6载药前后粒径没有明显的变化;PCV-MEho载药后粒径增大。

3.3 微乳 zeta 电位

各空白微乳及载药微乳 zeta 电位见表 3。

表 3 不同微乳的 zeta 电位 (n=3)

Tab 3 Zeta potential of various microemulsions (n=3)

	Zeta 电位/mV	
	空白微乳	含药微乳
PCV-MEho	0.178±0.05	0.231±0.04
PCV-MEde	-3.34±0.15	-3.03±0.12
PCV-ME6	0.295±0.06	0.104±0.08

2.6 分布实验

180只小鼠按每小组5只,先随机分为36小组。36小组又随机平均分为四组,分别对应PCV-S对照组、PCV-ME6组、PCV-MEho组、PCV-MEde组。各组分别按喷昔洛韦25 mg·kg⁻¹尾静脉给药,分别于给药后0.167, 0.333, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 4, 6 h眼眶取血后处死,立即分离脑、心、肝、脾、肺和肾,置于- 40 ℃冷冻待用。血液样品于10 000 r·min⁻¹离心5 min,取上清液置- 40 ℃冷冻待用。样品处理时同组5只小鼠血液和组织样品合并,作为一个时间点的数据。

2.7 生物样品中喷昔洛韦测定方法

生物样品处理方法及喷昔洛韦测定方法参照文献^[1]所述方法进行。

3 结果

3.1 喷昔洛韦微乳的制备

各微乳的处方组成及外观见表1。

PCV-MEde、PCV-MEho和PCV-ME6载药前后 zeta 电位变化不大,药物对此3种微乳的zeta 电位影响很小。

3.4 体外释放

各载药微乳均延缓了喷昔洛韦的体外释放见图 1,释放速率PCV-S>PCV-ME6, PCV-MEho>PCV-

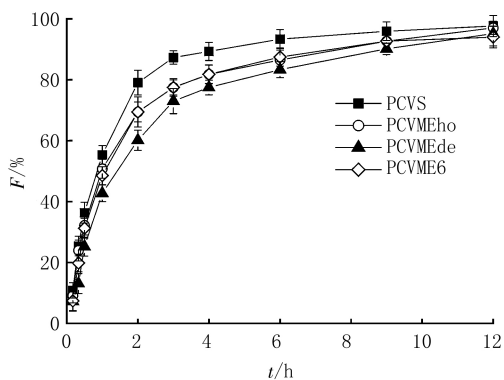


图1 喷昔洛韦溶液和载药微乳的体外释放曲线

Fig 1 In vitro release curves of penciclovir solution and penciclovir-loaded microemulsions

MEde。PCV-MEho、PCV-MEde和PCV-ME6的 f_2 因子检验结果分别为58.81、44.75和56.83。仅PCV-MEde的 $f_2 < 50$ ，与PCV-S存在差异，具有缓释效果。

3.5 体内分布

静脉注射喷昔洛韦溶液及各微乳组后，喷昔洛韦在小鼠组织和血浆中的经时曲线如图2所示。小鼠各组织和血浆药代动力学参数 $AUC_{0-\infty}$ 、MRT采用统计矩方法^[2]计算，结果如图3所示。①喷昔洛韦主要由肾脏排泄，静脉注射微乳及溶液后，喷昔洛韦在小鼠肾脏的AUC最大，与作者前期研究^[1]及YAN等^[3]的报道相符。其次为肝、血、肺和心；②经静脉注射PCV-MEde后，与PCV-S比较，喷昔洛韦在小鼠各

组织及血浆呈现了较高的药物浓度，AUC明显增大，MRT除脑组织外明显的延长；③PCV-ME6和PCV-MEde静脉注射后均呈现了较高的脑内浓度，分别在0.5和1 h出现峰值，AUC较PCV-S明显增高；④PCV-MEde静脉注射后，喷昔洛韦在小鼠血浆及除肾以外的各组织经时曲线呈现相似的特征，即在静脉注射后快速消除，随后浓度缓慢上升，在1或2 h出现一个峰值，然后缓慢下降，导致各组织和血浆的AUC明显增大，显示了较长的MRT；⑤PCV-MEde静脉注射后，喷昔洛韦在肾的消除明显变慢，其AUC大约为喷昔洛韦溶液的3.5倍；⑥与PCV-Mede相比，PCV-MEho和PCV-ME6在血浆及

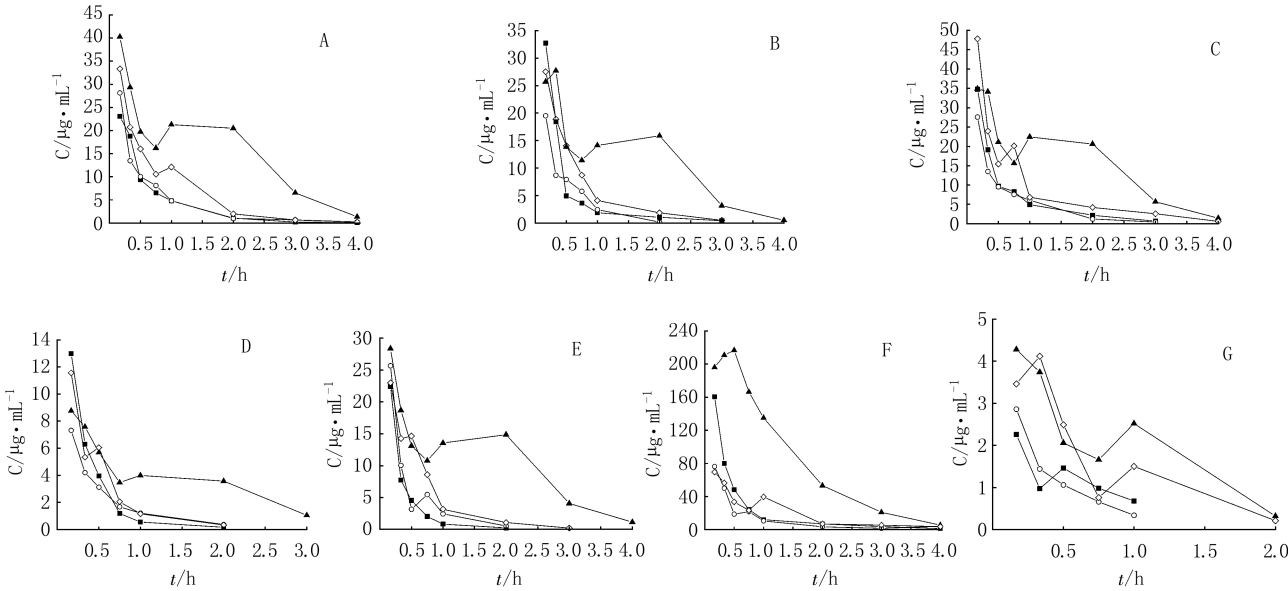


图2 载药微乳在小鼠组织及血浆分布

A-血浆；B-心；C-肝；D-脾；E-肺；F-肾；G-脑；—■— PCV-S；—○— PCV-MEho；—▲— PCV-MEde；—◇— PCV-ME6

Fig 2 Biodistribution in plasam and tissues in mice of penciclovir-loaded microemulsions

A-plasam; B-heart; C-liver; D-spleen; E-lung; F-kidney; G-brain; —■— PCV-S; —○— PCV-MEho; —▲— PCV-MEde; —◇— PCV-ME6

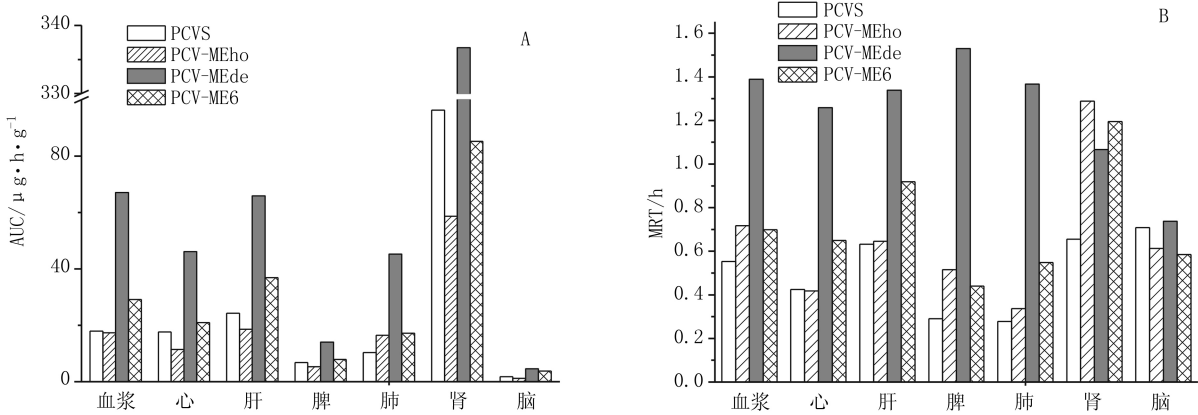


图3 载药微乳在小鼠组织和血浆的 AUC 和 MRT

A-AUC; B-MRT

图3 AUC and MRT in plasam and tissues in mice of penciclovir-loaded microemulsions

A-AUC; B-MRT

组织的滞留时间较短；⑦PCV-MEho与PCV-ME6相比，前者粒径为后者的4倍。二者处方组成相似，主要区别是前者表面活性剂用量小，必须用均质方法方可得到粒径小于100 nm的系统。PCV-ME6脑内浓度比PCV-MEho高。

4 讨论

静脉注射后，PCV-ME6 和 PCV-MEde 均呈现了较高的脑内浓度。PCV-ME6 增加喷昔洛韦脑内浓度可能是由于所用表面活性剂 Cremophor EL 有明显的趋脑性^[1]。PCV-ME6 药代动力学特征与前文^[1] PCV-ME 相似，可能由于微乳所含混合表面活性剂、油相和水相相同，仅比例不同。PCV-MEde 脑内浓度较高，则是由于静注后喷昔洛韦血药浓度较高，导致脑内浓度相应增高。PCV-ME6 脑内浓度比 PCV-MEho 高，可能是由于两者表面活性剂含量不同导致粒径大小与分布不同，从而导致体内过程的差异。

静注后，PCV-MEde 在小鼠血浆和组织均快速消除，0.75 h 后药物浓度有所回升，并在 1 或 2 h 出现峰值。这可能是微乳进入体内后，在血液的稀释作用下，部分微乳解体，重新结合成稳定的去氧胆酸钠-磷脂脂质囊泡结构，将喷昔洛韦包裹在亲水的内核。由于喷昔洛韦的释放特征的改变，最终使喷昔洛韦微乳的体内特征发生改变。

已有大量的研究显示胆盐和磷脂间的相互作用。脱氧胆酸钠能够使细胞膜稳定性下降，流动性增强，膜结构的有序性降低^[4-5]。王建国^[6]采用循环伏安(CV)和交流阻抗(EIS)技术对于脱氧胆酸钠与磷脂双层膜相互作用以及其影响因素进行探讨。结果发现，脱氧胆酸钠使磷脂双层膜的结构发生了明

显改变，使其表面形成孔洞或缺陷，且有时间和浓度依赖性。不带电荷的脱氧胆酸较易进入磷脂双层膜并与其发生作用，pH 值较高时，形成脱氧胆酸的分子数目较少，进入磷脂双层膜的速度较慢。磷脂双层膜与脱氧胆酸钠作用形成缺陷后在 KCl 溶液中是可以自我修复，重新自组装，形成新的较完整的磷脂双层膜。因此，PCV-MEde 注射后，在血浆的稀释作用下，可能发生了微结构的改变，去氧胆酸钠与磷脂由于分子间强的相互作用，发生了结合，形成了类似脂质囊泡的结构。脂质囊泡的形成，将一部分喷昔洛韦增溶在囊泡的亲水内核。改变了药物的释放，继而导致了体内药代动力学的改变。其相关的机理正在研究中。

REFERENCES

- [1] HU H Y, LIN Y Z, GONG T, et al. In vivo distribution of penciclovir-loaded microemulsion in mice [J]. Chin Pharm J (中国药学杂志), 2007, 42(2): 148-151.
- [2] GIBALDI M, PERRICER D. Pharmacokinetics[M]. 2nd ed. New York: Marcel-Dekker, 1982.
- [3] YAN L, FANG Z P. The distribution and excretion of penciclovir in rats [J]. Sichuan J Phys Sci (四川生理科学杂志), 2000, 22(3): 22-25.
- [4] ALMGREN M. Mixed micelles and other structures in the solubilization of bilayer lipid membranes by surfactants [J]. BBA-Biomembranes, 2000, 1508(1-2): 146-163.
- [5] BANGHAM J A, LEA E J A. The interaction of detergents with bilayer lipid membranes [J]. BBA-Biomembranes, 1978, 511(3): 388-396.
- [6] WANG J G, JIANG L L, HUI F, et al. Study on the interaction of sodium deoxycholate with supported bilayer lipid Membrane by electrochemistry method [J]. Acta Chimica Sinica (化学学报), 2007, 65(3): 239-245.