

辛伐他汀自微乳化胶囊的体内评价

田大丰¹ 李 英¹ 莫凤奎¹ 俞红凯² 王中彦¹

(1 沈阳药科大学药学院 辽宁 沈阳 110016 2 北京红太阳药业 北京 100020)

摘要 目的: 研究辛伐他汀(SV)自微乳化胶囊在比格犬体内的药代动力学。**方法:** 采用 HPLC 法测定比格犬血浆药物浓度, 与市售片比较, 考察 SV 自微乳化胶囊的体内药代动力学。**结果:** 药代动力学测定结果表明: 与市售片比较, 自微乳化胶囊血药浓度达峰时间提前、最高血药浓度增大, $T_{max} = 1.41h$, $C_{max} = 46.22ng \cdot mL^{-1}$, 而市售片的 $T_{max} = 2.65h$, $C_{max} = 12.43ng \cdot mL^{-1}$; $AUC_{0-\infty}$ 为市售片剂的 227.5%。**结论:** 自微乳化胶囊可以显著提高 SV 的体内吸收。

关键词: 辛伐他汀; 自微乳化; 胶囊; HPLC; 生物利用度

中图分类号: R969.1 **文献标识码:** A

Assessment of simvastatin with a self-emulsifying capsule in vivo

TIAN Da-feng¹, LI Ying¹, MO Feng-kui¹, YU Hong-kai², WANG Zhong-yan¹

(1. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016

2. Beijing Red Sun Pharmaceutical co., Ltd., Beijing 100020)

ABSTRACT Objective: To evaluate the self-microemulsifying ability and dissolution behavior of simvastatin in vitro and the pharmacokinetic behavior in beagle dogs. **Methods:** The plasma concentrations were evaluated by HPLC and dissolution and pharmacokinetic behavior of self-microemulsifying formulations were evaluated by comparison with commercial tablets. **Results:** The area under the curve (AUC) was significantly higher in the simvastatin self-microemulsifying capsules group than that in the commercial tablets group. Also, T_{max} was smaller and C_{max} was much higher in the simvastatin self-microemulsifying capsules group compared with market products. **Conclusion:** The self-microemulsifying capsule can increase absorption in vivo significantly.

Key words: Simvastatin; Self-microemulsifying; Capsule; HPLC; Bioavailability

前言

辛伐他汀(Simvastatin, 简称 SV)是一种新型的高效降血脂药, 为甲基羟戊二酰辅酶 A(HMG-CoA)还原酶抑制剂。辛伐他汀是具有内酯环的前体药物, 服后在肝脏内迅速转变为有活性的 β -羟基酸(辛伐他汀羟基酸, 简称 SVA)。通过竞争性抑制 HMG-CoA 还原酶, 减少内源性胆固醇的合成, 是目前调血脂药物中的首选药物^[1], 主要有片剂、胶囊、分散片及滴丸等剂型供临床使用。辛伐他汀是脂溶性很强的药物, 水中几乎不溶, 这很大程度上影响了药物在体内的吸收, 使其口服生物利用度低。自微乳化药物传递系统(Self-Microemulsifying Drug Delivery system, SMEDDS)是包含油相、表面活性剂和助表面活性剂的固体或液体剂型, 这一系统的基本特征是在胃肠道内或在环境温度(通常指体温 37℃)及温和搅拌的情况下能自发形成水包油微乳剂^[2]。由于 SMEDDS 形成的粒子较小, 有较大的油/水界面, 可以提高药物的生物利用度, 改善难溶性药物的吸收。SMEDDS 系统可以为溶液型, 分装于软胶囊或特殊的硬胶囊中, 也可以为固体, 直接分装胶囊或压制成片剂, 制备工艺简单, 性质稳定, 是一种提高水难溶性药物口服吸收的有效方法^[3]。

作者简介: 田大丰(1977-), 男, 硕士研究生, 从事药物新剂型的研究。

联系电话: (024) 23986292, E-mail: tdfobert@sina.com.cn

通讯作者: 王中彦(1964-), 男, 副教授, 博士研究生从事药物新剂型的研究。

联系电话: (024) 23986292, E-mail: wangzhongyan1028@yahoo.com.cn

(收稿日期: 2006-04-16 接受日期: 2006-05-20)

1 设备与方法

1.1 材料与试剂

TG328A 型电光分析天平(上海天平仪器厂); SYP 型玻璃恒温水浴(南京桑力电子设备厂); 380ZLS Nicomp particle sizer (Santa Barbara, California, USA); SPD-10A VP 高效液相色谱仪(日本岛津株式会社); TG 328B 电光分析天平(上海精科天平仪器厂); TDL80-213 型高速离心机(上海安亭科学仪器厂)。辛伐他汀自乳化胶囊(5 mg/粒, 自制); 辛伐他汀片, 5 mg/片, 海南先灵制药厂。辛伐他汀(SV)对照品及内标洛伐他汀(LV)对照品为浙江省药检所提供。辛伐他汀羟基酸(SVA, 纯度 > 99.5%)为浙江海正药业提供。甲醇、乙腈为色谱纯, 水为超纯水, 其它试剂为分析纯。Beagle 犬 10 只, 体重 $10 \pm 1.8kg$, 试验前一周内未服用任何其它药物, 由沈阳药科大学实验动物室提供。

1.2 方法

1.2.1 SV 自乳化胶囊的制备: 经预试验以表面活性剂、助表面活性剂与油对主药的溶解性能为指标, 兼考虑其乳化能力和熔点, 对表面活性剂、助表面活性剂与油进行筛选, 最后选择 TPGS 为表面活性剂, 1, 2-丙二醇为助表面活性剂, 油相采用亚油酸甘油酯。最终确定的处方为:

TPGS 15g, 1, 2-丙二醇 10g, 亚油酸甘油酯 20g, 辛伐他汀 5g, 制成 1000 粒。

按处方比例称取亚油酸甘油酯、TPGS 及 1, 2-丙二醇的混合表面活性剂, 加入处方量的辛伐他汀, 在 60℃ 下搅拌 10min, 混合均匀后, 在 60℃ 下准确量取分装胶囊, 放冷, 即可。

1.2.2 SV 自微乳化胶囊在 Beagle 犬体内药物动力学研究

1.2.2.1 服药方案及样品采集: 将 10 只 Beagle 犬随机分为 2 组(每组 5 只), 甲组服用辛伐他汀自微乳剂(相当于 SV 20mg), 乙组服用市售片(相当于 SV 20mg); 一周后两组交叉试验。用药前禁食 12h。分别在口服给药后 0.25、0.5、1、1.5、2、2.5、3、4、6、8、10 和 14 h, 由前腿静脉取血约 5mL 置于涂有肝素的试管中, 离心 10min($4000r \cdot \min^{-1}$), 吸取上层血浆, 置于 -20°C 冰箱中保存, 备用。

1.2.2.2 血浆样品的处理: 精密量取经 $4000r \cdot \min^{-1}$ 离心后的血浆样品 1.0mL 于 5mL 具塞离心管中, 加入内标液 10 μL , 用 $0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸溶液调整 pH 为 4~5, 涡旋混合 40s, 加入乙腈 2.5mL, 涡旋混合 1min, 离心 3min($10000r \cdot \min^{-1}$), 移取上清液 1mL 至 5mL 离心试管中, 35°C 水浴 N_2 吹干, 加溶媒 A[甲醇- 磷酸二氢钠/磷酸缓冲液溶液 (PH 4.0) (80:20)] 50 μL , 涡旋混合 1min, 离心 5min($4000r \cdot \min^{-1}$), 取上清液 10 μL 注入液相色谱仪, 内标法以峰面积计算 SVA 浓度。

1.2.2.3 HPLC 条件: 流动相为 甲醇- 水- 冰乙酸 (74:26:0.5, v/v/v), 色谱柱为 Diamonsil C18 (200mm $\times$ 4.6mm i. d., 5 μm), 测定波长为 238nm, 柱温为室温, 流速为 $1.0\text{mL} \cdot \min^{-1}$, 内标物为洛伐他汀, 进样量为 10 μL 。

1.2.2.4 标准曲线与检出限: 取空白血浆 1.0 mL 于 5 mL 具塞刻度试管中, 加入系列 SVA 标准液适量, 使血浆中 SVA 浓度分别为 2、4、8、10、20、60 和 $100\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 按“血浆样品的处理”下法操作, 处理后置于 -4°C 冰箱中保存, 进样 10 μL , 记录色谱图。以 SVA 与内标物(LV)的浓度比 (C/C_i) 对样品峰与内标峰面积比 (A/A_i) 进行线性回归。

以空白血浆配制不同浓度的 SVA 样品溶液, 照“血浆样品的处理”下操作, 处理后置于 -4°C 冰箱中保存, 进样 10 μL , 按信噪比 > 3 计, 考察 SVA 的检出限。

提取回收率: 精密量取空白狗血浆 1mL 分别置于 5mL 的塑料带盖离心管中, 加入 SVA 标准液适量, 配制成 SVA 浓度约为 4、10、 $60\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ (即低、中、高) 三个浓度的血浆样品, 按“血浆样品的处理”项下操作, 处理后置于冰箱中保存, 取样 10 μL , 注入色谱仪, 记录色谱图。用溶媒 A 配制三份同样浓度的 SVA 和 SV 溶液, 取样 10 μL , 记录色谱图。计算提取回收率及 RSD/%。

1.2.2.5 方法回收率与精密度: 精密量取空白狗血浆 1mL 分别置于 5mL 的塑料带盖离心管中, 加入 SVA 标准液适量, 配制成 SVA 浓度约为 4、10、 $60\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ (即低、中、高) 三个浓度的血浆样品, 按“血浆样品的处理”项下操作, 处理后置于冰箱中保存, 于日内测定 6 次, 隔日测定 6 次, 计算日内、日间差异及回收率。

1.2.2.6 血浆样品的稳定性: 预实验中, 比格犬口服辛伐他汀自乳剂胶囊后 0.5h 的血浆样品经 3 次冷冻 (-20°C) 循环实验, 冷冻融化后再冷冻放置, 共融化 3 次, 融化后按“血浆样品的处理”下法操作。测得血浆样品中 SVA 的浓度在 3 个冷冻循环周期内无明显变化。

将处理好的待测样品溶液室温下放置, 于不同时间测定, 结果显示待测溶液室温时稳定性较差, 只能放置 12 小时, 无法完成全部样品的测定操作。放置在 4°C 冰箱中的待测溶液稳定性可达 48 小时。

1.2.2.7 犬体内血药浓度的测定: 取血浆样品 1 mL, 按“血浆样品的处理”项下操作, 记录 SVA 峰面积与内标峰面积之比 (A_i/A_i), 将其代入血浆标准曲线即可求得各时间点的 SVA 浓度。

2 结果与分析

2.1 方法学研究结果

SVA 在 $2 \sim 100\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度范围内线性关系良好, 回归方程为 $C_{\text{比}} = -0.1283 + 11.716 A_{\text{比}}$ ($n=6$), $r=0.9989$; 方法的最低检测限为 $0.5\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$; 低、中、高 3 个浓度的提取回收率分别为 $79.68\% \pm 5.25\%$, $86.64\% \pm 3.94\%$ 和 $88.25\% \pm 7.82\%$ ($n=5$); 3 个浓度的方法回收率分别为 $96.6\% \pm 3.42\%$, $95.3\% \pm 3.30\%$ 和 $92.8\% \pm 1.96\%$ ($n=5$), 其日内 RSD 分别为 2.6%, 2.4% 和 1.9%, 日间 RSD 分别为 4.8%, 4.2% 和 4.5%; 3 个冷冻循环试验周期内同一待测血浆样品 SVA 浓度测定结果无明显变化, 其 RSD 为 5.88%, 放置在 4°C 冰箱中的待测溶液稳定性可达 48 小时, 其 48 小时内的 RSD 为 6.22%。

2.2 比格犬体内血药浓度—时间曲线

市售片剂及自微乳剂胶囊的血药浓度—时间曲线见图 1。

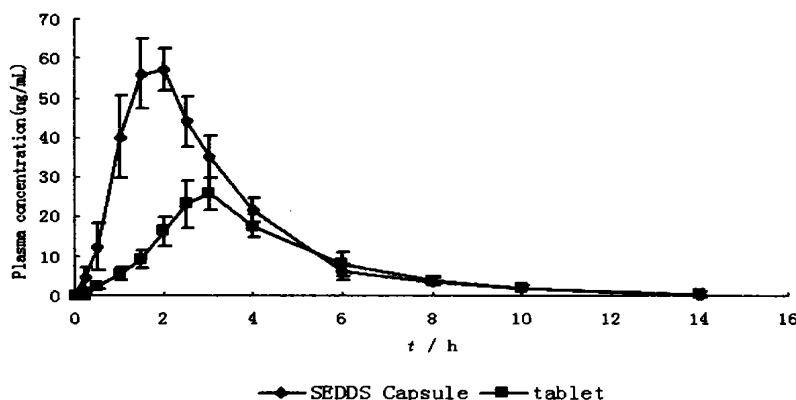


图 1 自微乳剂胶囊与市售片在 beagle 犬体内主要活性成分(SVA)药时曲线图($n=10$)

Fig 1 The mean concentration - time curve of SVA in dogs' plasma after an oral single dose of 20 mg SV- SMEDDS and SV tablets($n=10$)

3.3 内皮抑素血管生成作用的影响

在以往治疗肿瘤的基础研究与临床研究中,学者们把目光投入到药物对肿瘤细胞的直接作用上,而对间接抑制肿瘤作用研究甚少。1991年 Folkman 首次提出了“肿瘤生长依赖于血管生成”的观点,人们对抗肿瘤的概念有了进一步的认识:抗肿瘤一是直接针对肿瘤细胞,二是抑制供应肿瘤组织血管的生成。当肿瘤组织大于1-2mm³时,需要新生血管为其继续增殖提供足够的氧气和营养物质。因此抑制肿瘤细胞生长,同时抑制肿瘤内的血管生成受到广泛关注。

本实验成功建立了体外人造血管模型,在图6中我们看到体外培养12h-24h后散在的HUVEC细胞形成了网状结构,与Roberto F报道一致。这对抗血管生成药物的筛选具有非常重要的意义,并为研究血管抑制剂的作用及作用机制提供了理想的实验模型。实验结果显示,内皮抑素不但对新生的血管有抑制作用,对新生的血管网亦具有同样的破坏作用。但在临床实践中,发现的多为存在较长时间,血管已经成熟的肿瘤,对此内皮抑素的抑制作用究竟能发挥到何等地步尚待研究。

总之,本实验通过对内皮抑素作用于HUVEC细胞的一系列实验指标的观察,得到如下结论。内皮抑素可能通过诱导HUVEC的凋亡抑制其增殖,并能破坏新生的血管。内皮抑素

可能以此抑制癌症的生长与转移。我们的实验证实了最初的设想,但其具体作用机制尚有待进一步研究。但这些结果显示,利用血管生成因子抑制剂进行的抗血管生成疗效在不久的将来可能成为一种治疗癌症的新策略。希望以此能为癌症的临床治疗提供更坚实的理论基础与更广泛的临床思路。此外,关于肿瘤的治疗,主张肿瘤的综合治疗,就药物治疗方面而言,具体有关内皮抑素与其它抗血管生成抑制剂及传统的化疗药物的比较或联合应用抑制癌症的情况,亦未有人进一步探讨,我们将在今后的实验中做更进一步的努力。

参考文献

[1] O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth[J]. Cell, 1997, 88(2): 277-285

[2] Shichiri M, Hirata Y. Antiangiogenesis signals by endostatin[J]. FASEB-J, 2001, 15(6): 1004-1053

[3] Huang X, Wong MK, Zhao Q, et al. Soluble recombinant endostatin purified from Escherichia coli: antiangiogenic activity and antitumor effect[J]. Cancer Res, 2001, 61(2): 478-481

[4] Gasparini G. The rationale and future potential of angiogenesis inhibitors in neoplasia[J]. Drugs, 1999, 58(1): 17

(图1-图4请见封3)

(上接第28页)

2.3 药动学参数计算

用3P97药物动力学程序处理自微乳化胶囊和市售片的平均血药浓度数据^[4]。根据AIC值最小法判断SV自微乳化胶囊和市售片的隔室模型,结果表明SVA在犬体内均符合单室一级吸收模型,权重系数为1/C₂。各参数均由3P97计算可得,结果见表1。

表1 犬口服自微乳化胶囊与市售片后的SVA的药代动力学数据(n=10)

Tab. 1 Pharmacokinetic parameters of SVA from SV SMEDDS (n=10)

Parameters	Average±SD (T)	Average±SD (R)
A/ng·mL ⁻¹	169.07±37.48	95.04±53.13
K _e /h ⁻¹	0.52±0.07	0.37±0.08
K _a /h ⁻¹	1.18±0.24	0.57±0.09
T _{1/2} (K _a)/h	0.61±0.12	1.25±0.20
T _{1/2} (K _e)/h	1.35±0.17	1.98±0.50
T _{max} /h	1.41±0.20	2.65±0.42
C _{max} /ng·mL ⁻¹	46.22±7.17	12.43±2.51
AUC _{0-∞} /ng·mL ⁻¹ ·h	174.03±38.87	76.17±10.86
Fr/%	227.5	

固体形式的SMEDDS可以有更大的含药量^[5],固体内容物对囊壳的影响较小,相比较更为稳定,并且由于生产技术与普通胶囊一致,节约生产成本,有利于SMEDDS系统的工业化生产。

由于SV为前体药物,SVA是其在体内最主要的活性代谢物,所以考察SVA的体内数据具有实际意义及临床价值。以SVA的AUC计算自乳化胶囊对市售片的相对生物利用度Fr,得出Fr(SVA)为227.5%,并对SVA的AUC进行方差分析^[6],SVA的AUC周期间无显著性差异(P>0.05),而制剂间、个体间有显著性差异(P<0.05)。进一步采用双单侧检验可知,结果显示自乳化胶囊与市售片之间显著性差异。由此可见,SV自乳化胶囊可快速有效地促进体内辛伐他汀的吸收,显著提高其生物利用度。

参考文献

[1] 梁毅. 2002年~2004年调血脂药物应用分析[J]. 海峡药学, 2005, 17(2): 142-143

[2] Shah N.H, Carvajal MT, Malick AW, et al. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) with polyglycolized glycerides for improving in vitro dissolution and oral absorption of lipophilic drugs[J]. Int J Pharm, 1994, 106(1): 15-23

[3] Hill RM. A quantified analysis of the dielectric dispersion in a simple emulsion system[J]. Int J Pharm, 2001, 227(1-2): 139-148

[4] 梁文权. 生物药剂学与药物动力学[M]. 第一版. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 241

[5] Pouton C.W. Formulation of self-emulsifying drug delivery system[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 1997, 25(4): 47-58

[6] 陈家鼎, 刘婉如, 汪仁官编. 概率统计讲义[M]. 第二版. 北京: 高等教育出版社, 2002: 348

3 讨论

SMEDDS通常被设计为单剂量的胶囊剂。其内容物有液体和固体两种,现在比较多的是液体的内容物制备成软胶囊的形式。但其含有大量的表面活性剂和助表面活性剂,对明胶软胶囊囊壳的要求较高,影响软胶囊的稳定性。一般而言,