

对乙酰氨基酚通过共晶形成提高阿德福韦酯的溶出及肠吸收

邱培桑¹, 高静², 钱帅², 魏元锋², 张建军^{1*}

(中国药科大学 1. 药剂学教研室, 2. 中药制剂教研室, 江苏 南京 210009)

摘要: 本研究采用溶剂挥发法制备阿德福韦酯-对乙酰氨基酚共晶 (摩尔比为 1 : 1), 通过差示扫描量热法、粉末 X-射线衍射法和红外光谱法等分析手段对其进行表征。结果表明, 阿德福韦酯分子中的磷酸基与对乙酰氨基酚分子中的酰胺基通过氢键连接形成阿德福韦酯-对乙酰氨基酚共晶。与对乙酰氨基酚形成共晶后, 阿德福韦酯的溶解度与溶出速率均得到显著改善。此外, 对乙酰氨基酚还可通过抑制阿德福韦酯外排而提高其肠渗透性、促进其肠吸收, 这将有助于提高低渗透性药物阿德福韦酯的体内吸收。

关键词: 阿德福韦酯; 对乙酰氨基酚; 共晶; 溶出速率; 肠渗透性

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 06-0993-09

Enhanced dissolution and intestinal absorption of adefovir dipivoxil by cocrystal formation with acetaminophen

QIU Pei-shen¹, GAO Jing², QIAN Shuai², WEI Yuan-feng², ZHANG Jian-jun^{1*}

(1. Department of Pharmaceutics, 2. Department of Traditional Chinese Pharmaceutics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract: In current study, adefovir dipivoxil (AD)-acetaminophen (AP) cocrystal (molar ratio, 1 : 1) was prepared by slow evaporation from acetonitrile, followed by physicochemical characterizations using differential scanning calorimetry, powder X-Ray diffraction and Fourier transform infrared spectroscopy. Molecular modeling showed that the phosphoester group of AD was connected with the amide group of AP through hydrogen bonds. In comparison to crystalline AD, the solubility and dissolution rate of AD from AD-AP cocrystal were significantly enhanced by 1.5-fold and 1.6-fold, respectively. In addition, based on the rat single-pass intestinal perfusion study, the permeabilities of AD in various intestinal sections (i.e., duodenum, jejunum, ileum and colon) were significantly improved (e.g., about 3-fold enhancement in duodenum) after cocrystallization with AP by inhibiting P-glycoprotein mediated efflux of AD, which will benefit absorption *in vivo* and subsequent oral bioavailability of poorly permeable drug AD.

Key words: adefovir dipivoxil; acetaminophen; cocrystal; dissolution rate; intestinal permeability

共晶是两种或两种以上的分子, 通过非共价键 (如氢键、离子键等) 结合在同一晶格中形成的晶

体^[1, 2]。而药物共晶则是特指组成共晶的成分中包含了一种或多种活性药物成分^[2]。对药物进行共晶修饰可以改变药物的溶解度和溶出速率, 影响药物的临床疗效^[3], 同时还可获得专利保护^[4]。因此, 近年来共晶技术已成为固体药物开发的一种新途径^[5]。

阿德福韦酯 (adefovir dipivoxil, AD, 图 1a) 属于生物药剂学分类系统 III 类低渗透性药物^[6], 其为腺嘌呤磷酸酯化合物阿德福韦的前药, 口服后可迅

收稿日期: 2018-01-16; 修回日期: 2018-03-08.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81703712, 81773675); 江苏省自然科学基金资助项目 (BK20150703, BK20151438); 江苏省青蓝工程资助项目; 江苏省高校品牌专业建设工程资助项目; 江苏省双创计划资助项目 (2015).

*通讯作者 Tel: 86-25-83379418, E-mail: myamicute@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0062

速水解为活性母体药物阿德福韦^[7], 阿德福韦可以通过抑制乙肝病毒脱氧核糖核酸聚合酶的活性来抑制乙肝病毒的复制与繁殖^[8]。由于 AD 是 P-糖蛋白转运体 (P-glycoprotein, P-gp) 的底物^[9–12], 故 AD 易被肠道的 P-gp 外排而导致其渗透性低, 口服生物利用度差。此外, 临床研究表明, 长期服用 AD 会引起肾毒性, 主要表现为血清肌酐的升高和血磷的下降^[13], 这主要是由于 AD 活性代谢物阿德福韦经有机阴离子转运体 1 (human organic anion transporter 1, hOAT1) 转运而蓄积于肾小管导致的^[14]。

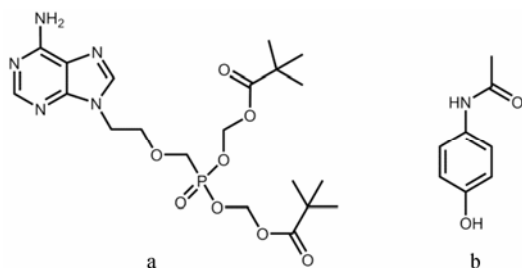


Figure 1 Chemical structures of adefovir dipivoxil (AD, a) and acetaminophen (AP, b)

非甾体抗炎药具有抗炎、抗风湿、止痛和退热等作用, 在临床上广泛用于骨关节炎、类风湿性关节炎、多种发热和各种疼痛症状的缓解^[15]。研究表明, 非甾体抗炎药对乙酰氨基酚 (acetaminophen, AP, 图 1b) 还可通过抑制肠道 P-gp 的转运活性而抑制 P-gp 底物的外排, 故 AP 可促进 AD (P-gp 底物) 转运进入肠细胞而促进其肠吸收^[16, 17]。此外, 一些非甾体类抗炎药 (如对乙酰氨基酚、吲哚美辛和萘普生等) 可抑制 hOAT1 的活性, 从而降低阿德福韦蓄积产生的肾毒性^[14, 18, 19]。故本研究选择 AP (美国食品药品监督管理局公认的安全物质^[20]) 作为共晶形成物, 与 AD 制备形成共晶, 旨在通过共晶技术提高 AD 溶出并利用 P-gp 抑制剂促进 AD 肠吸收。

材料与方法

药品与试剂 阿德福韦酯 (AD, 晶型 I, 江西乐平市赛复乐医药化工有限公司, 纯度 99.75%); 对乙酰氨基酚 (AP, 杭州海阳医药化工有限公司, 纯度 99.40%); 乌拉坦 (国药集团化学试剂有限公司, 纯度 98%); 自制 Krebs-Ringer 缓冲液 (即 K 氏液, 分别取 NaCl 7.80 g、KCl 0.35 g、CaCl₂ 0.37 g、MgCl₂ 0.22 g、NaH₂PO₄ 0.22 g、葡萄糖 3.00 g 和 NaHCO₃ 1.37 g, 用水溶解并稀释至 1 L); 甲醇、乙腈 (色谱纯, 上海安谱科学仪器公司); 实验用水采用 Milli-Q 水

纯化系统 (美国 Millipore 公司) 制得; 其余试剂均为分析纯。

主要仪器 RY-1 熔点仪 (天津分析仪器厂); NETZSCH DSC 204 F1 Phoenix 差示扫描量热分析仪 (德国 NETZSCH 公司); X'TRA 粉末 X 射线衍射仪 (瑞士 ARL 公司); Nicolet Impact 410 型红外光谱仪 (美国赛默飞世尔科技公司); RC-806 溶出仪 (天津市天大天发科技有限公司); Shimadzu 高效液相色谱仪 (日本 Shimadzu 公司, LC-10AD 泵, SPD-10A 检测器)。

动物 清洁级 SD 大鼠, 体重 (220±20) g, 青龙山实验动物中心提供, 动物合格证号: SCXK (浙) 20080033。

阿德福韦酯-对乙酰氨基酚 (AD-AP) 共晶的制备 称取 AD 752.0 mg 与 AP 226.7 mg (摩尔比为 1:1) 于烧杯中, 加入乙腈 15 mL, 搅拌使药物溶解完全后, 转移至玻璃培养皿中, 于通风橱中在室温条件下缓慢挥发除去溶剂。最后将上述产物在 25 °C 真空干燥箱中减压干燥, 即得 AD-AP 共晶, 置无水氯化钙干燥器中备用。

差示扫描量热法 (differential scanning calorimetry, DSC) 分别将 AD 晶体、AP 晶体、AD 晶体与 AP 晶体摩尔比为 1:1 的物理混合物 (AD+AP) 及 AD-AP 共晶过 100 目筛, 取上述样品置于铝坩埚中进行热扫描。升温速率为 10 °C·min⁻¹, 升温范围为 25~250 °C。数据用 NETZSCH Proteus 热分析软件 (Version 4.2) 处理。

粉末 X-射线衍射法 (powder X-ray diffraction, PXRD) 分别将 AD 晶体、AP 晶体、AD+AP 及 AD-AP 共晶过 200 目筛。实验采用 Cu-Kα 靶, 设定波长为 1.540562 Å, 管压为 40 kV, 管流为 40 mA, 步长为 0.02°, 扫描速度为 2°·min⁻¹, 扫描范围为 5~45° 2θ。数据用 Materials Studio 模拟软件 (version 5.0) 进行分析。

傅里叶红外光谱法 (Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR) 分别将 AD 晶体、AP 晶体、AD+AP 及 AD-AP 共晶与溴化钾压成薄片, 在 4000~400 cm⁻¹ 内进行红外扫描, 数据用 Nicolet Omnic 红外光谱处理软件 (version 8.0) 处理。

共晶分子结构模拟 运用分子模拟软件 Materials Studio (version 5.0) 的 Reflex 模块对共晶的 PXRD 谱图进行指标化, 确定样品所属晶系及空间群; 再对 PXRD 数据进行 Pawley 精修、Powder Solve 解析和 Rietveld 精修来模拟其晶体结构。

平衡溶解度的测定 量取纯化水 5 mL 于西林瓶

中, 分别加入过量的 AD 晶体、AD+AP 及 AD-AP 共晶, 密封后置于 25 °C 恒温振荡器中, 振摇 24 h 以达到平衡, 后移取上清液用甲醇适当稀释, 采用 HPLC 法测定溶解度, 所有样品平行测定 3 次。

HPLC 系统采用 Shim-pack VP-ODS 色谱柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 设定柱温为 30 °C; 以甲醇-pH 6.0 磷酸盐缓冲液 (50 : 50) 为流动相, 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长为 260 nm; 进样体积为 20 μL。在该色谱条件下, AD 与 AP 分离度 (*R*) 良好 (*R* > 1.5) 且不受溶剂峰干扰; AD 线性方程为 $C = 0.000\ 298A + 0.546$ ($r = 0.999\ 8$), 线性范围为 5.0~250.5 μg·mL⁻¹; AP 线性方程为 $C = 0.000\ 139A - 0.701$ ($r = 0.999\ 5$), 线性范围为 1.5~72.5 μg·mL⁻¹; 平行测量数值的相对标准偏差均小于 2%, 且 AD 与 AP 回收率均在 98%~102%, 表明该方法重复性好且准确度高。

溶出度测定 将 AD 晶体、AP 晶体、AD+AP 及 AD-AP 共晶过 100 目筛 (149 μm), 使样品粉末粒径范围均一。溶出实验依照 2015 版《中华人民共和国药典》溶出度与释放度测定法第二法 (浆法) 的要求进行, 分别量取 500 mL 的 0.01 mol·L⁻¹ 盐酸介质 (漏槽条件) 置各溶出杯中, 设定搅拌桨转速为 50 r·min⁻¹, 待溶出介质温度恒定在 37 °C 后, 称取过筛的 AD 晶体、AP 晶体、AD+AP 及 AD-AP 共晶 (相当于 AD 50 mg、AP 15 mg) 加入溶出介质中, 开始计时。后于 5、10、15、20、30 和 45 min 取样 3 mL, 同时及时补充相同体积、温度为 37 °C 的空白溶出介质, 立即用 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液, 采用上述 HPLC 法测定 AD、AP 的浓度, 计算溶出量。

特性溶出速率的测定 分别称取约 200 mg AD 晶体、AD+AP 及 AD-AP 共晶, 用液压机压制成直径为 13 mm 的致密规整药片。将药片的底面和侧面用蜂蜡包裹, 使其只有一面 (表面积约为 1.3273 cm²) 与溶出介质接触。

溶出实验依照 2015 版《中华人民共和国药典》溶出度与释放度测定法第二法 (浆法) 的要求进行, 分别量取纯化水 500 mL 置各溶出杯中, 设定搅拌桨转速为 50 r·min⁻¹, 待溶出介质温度恒定在 37 °C 后, 取蜂蜡包裹的药片 6 片, 分别投入 6 个溶出杯内, 开始计时。在 3 h 内, 每隔 30 min 吸取溶出样品 3 mL, 同时及时补充相同体积、温度为 37 °C 的空白介质, 立即用 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液, 采用上述 HPLC 法测定 AD 的浓度, 计算溶出量。

用单位表面积累积溶出量与时间绘制回归曲线, 其斜率即为特性溶出速率^[21], 计算公式为:

$$\text{IDR} = \frac{d_w}{d_t S} = \frac{DC_s}{h} \quad (1)$$

其中, IDR 为特性溶出速率 (mg·min⁻¹·cm⁻²), d_w 为药物溶出的变化量 (mg), d_t 为时间的变化量 (min), S 为药片的表面积 (cm²), D 为扩散系数 (cm²·min⁻¹), C_s 为物质的饱和溶解度 (mg·mL⁻¹), h 为扩散层的厚度 (cm)。

共晶在体肠吸收的研究——大鼠在体单向肠灌流实验 取禁食 24 h (可自由饮水) 的大鼠, 腹腔注射 20% 乌拉坦麻醉 (1.0 g·kg⁻¹), 置于红外灯下维持体温。沿腹中线打开腹腔 (约 2~3 cm), 分离出待考察肠段, 取约 10 cm 肠段于两端切口, 于切口处插管后用灭菌的手术线结扎, 伤口处用浸有生理盐水的脱脂棉覆盖保湿, 红外灯下保温^[22]。先用预热至 37 °C 的等渗生理盐水将肠段冲洗干净, 再用 K 氏液灌流 10 min。取供试液 250 mL, 先以 1.0 mL·min⁻¹ 流速灌流 10 min 使其平衡, 再将流速调为 0.2 mL·min⁻¹, 开始计时。进口处用已知质量的装有供试液的小瓶以一定流速进行灌流, 在出口处用另一已知质量的小瓶收集, 每隔 15 min 迅速更换 1 次供试液小瓶和收集液小瓶, 并称重, 持续 105 min^[23]。收集液小瓶内加入一定体积的冰甲醇, 以终止流出的灌流液中酶的活性。实验结束后处死大鼠, 剪下被考察的肠段, 测量其长度和内径。

将所取样品于冷冻离心机中离心 5 min (转速为 10000 r·min⁻¹) 后, 精密量取上清液 20 μL, HPLC 测定 AD 的浓度。根据灌流前后药量之差, 计算 AD 的吸收速率常数 (K_a)、表观渗透系数 (P_{eff}) 及吸收量 (F_a)。

AD 浓度对其肠吸收的影响 分别配制含 30、100、180 μg·mL⁻¹ AD 的肠灌流液, 于十二指肠进行单向灌流实验。

AP 对 AD 肠吸收的影响 配制 100 μg·mL⁻¹ AD 肠灌流液, 分别加入不同量的 AP, 使各灌流液中 AP 的浓度分别为 10、33.3 和 60 μg·mL⁻¹, 分别于十二指肠进行单向灌流实验。

AD 在大鼠各肠段的吸收情况 分别配制 AD、AD+AP 及 AD-AP 共晶肠灌流液 (相当于 AD 浓度 100 μg·mL⁻¹), 分别于十二指肠、空肠、回肠和结肠 4 个肠段进行单向灌流实验。

数据分析 采用质量法, 按下式 (2)、(3)、(4) 分别计算 K_a 、 P_{eff} 及 F_a ^[23]:

$$K_a = \left(1 - \frac{C_{\text{out}}}{C_{\text{in}}}\right) \frac{Q}{Q_{\text{in}} V} \quad (2)$$

$$P_{\text{eff}} = \frac{-Q \ln \left(\frac{C_{\text{out}}}{C_{\text{in}}} \cdot \frac{Q_{\text{out}}}{Q_{\text{in}}} \right)}{2prl} \quad (3)$$

$$F_a = \frac{c_0 V_0 - c_t V_t}{lt} \quad (4)$$

其中, C_{in} 和 C_{out} 分别为肠道进、出口灌流液中药物的浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); Q_{in} 和 Q_{out} 分别为肠道进、出口灌流液的体积 (mL, 假定进、出口灌流液密度为 $1.0\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$); Q 为灌流速度 ($0.2\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$); V 为灌流肠段的体积 (mL); l 和 r 分别为被灌流肠段的长度 (cm) 和横截面半径 (cm); c_0 和 c_t 分别表示药物初始浓度和终浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); V_0 和 V_t 分别表示初始体积和终体积 (mL); t 为灌流时间 (h)。

统计学分析 以上数据分析均采用单因素方差分析 (SPSS 17.0), $P < 0.05$ 表明差异有统计学意义。

结果与讨论

1 共晶的表征

1.1 差示扫描量热法 由 DSC 谱图 (图 2) 可知, AD 晶体在 $98.9\text{ }^\circ\text{C}$ 附近有明显的吸热峰, 与文献^[24]报道 AD 晶型 I 的吸热峰的位置一致。AP 晶体在 $169.1\text{ }^\circ\text{C}$ 附近出现尖锐的晶体吸热峰, 与文献^[25]报道一致。AD+AP 在 $91.7\text{ }^\circ\text{C}$ 附近有 1 个较宽的吸热峰, 这可能是由于 AD+AP 在 DSC 加热过程中形成了低共熔物; 与之不同的是, AD-AP 共晶在 $62.2\text{ }^\circ\text{C}$ 左右具有单一尖锐的吸热峰。这表明形成了具有更低熔点的 AD-AP 共晶, 明显区别于其物理混合物。

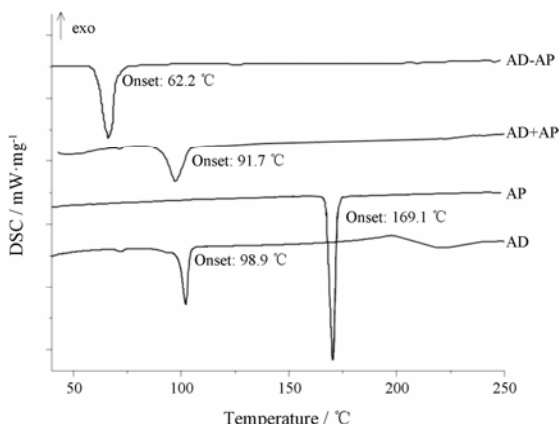


Figure 2 Differential scanning calorimetry thermograms for AD, AP, physical mixture of adefovir dipivoxil and acetaminophen (AD+AP) and adefovir dipivoxil-acetaminophen (AD-AP) cocrystal

为了进一步确证 AD+AP 在 DSC 加热过程中形成了低共熔物, 本研究还考察了 AD 晶体与 AP 晶体不同摩尔比物理混合物 (摩尔比分别为 1 : 1、2 : 1、

3 : 1、1 : 2、1 : 3) 的熔点。熔点测定依照 2015 版《中华人民共和国药典》熔点测定法第一法的要求进行, 调节升温速率为 $1.0\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 。熔点测定结果表明, 不同比例物理混合物的熔点相近 (约为 $90\text{ }^\circ\text{C}$), 且均低于 AD 晶体 ($100\text{ }^\circ\text{C}$) 和 AP 晶体 ($170\text{ }^\circ\text{C}$) (图 3), 这表明物理混合物在 DSC 加热过程中形成了低共熔物^[26]。

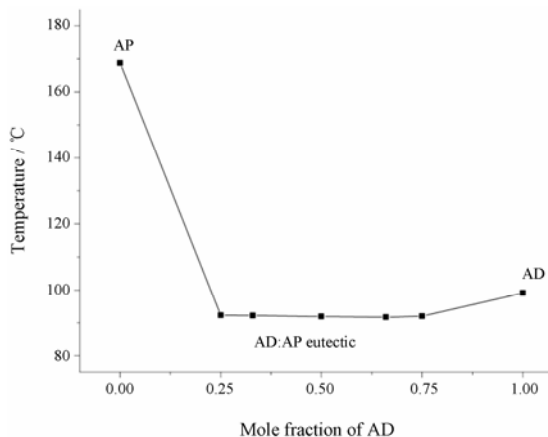


Figure 3 Binary phase diagram of AD and AP physical mixtures exhibits a typical pattern characteristic of eutectics

药物共晶由于引入了配体而改变了原料药晶体的分子排列和堆积方式, 故共晶的熔点与原料药晶体相比会发生变化^[3]。研究表明, 低熔点晶体比具有类似结构的高熔点晶体更易溶解^[27]。与 AD 原料药相比, AD-AP 共晶熔点显著降低, 因此可以推测, 与 AP 形成共晶可能会提高 AD 的溶解度和溶出速率。

1.2 粉末 X-射线衍射法 由 PXRD 谱图 (图 4) 可知, AD 的 PXRD 谱图与文献^[24]所述晶型 I 一致, 2θ 特征峰位于 7.20° 、 17.40° 、 20.94° 和 21.64° 。AP 的 2θ 特

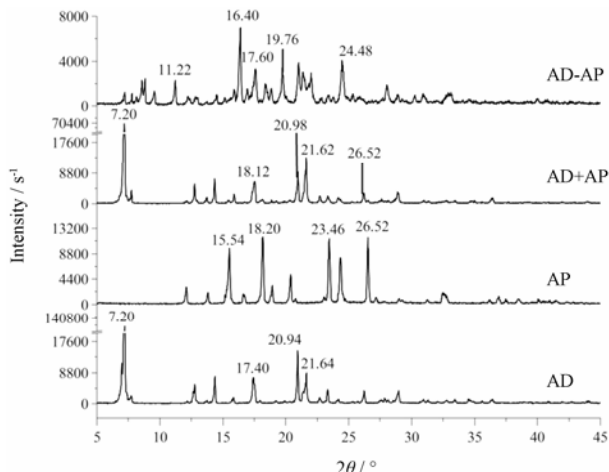


Figure 4 X-Ray powder diffraction patterns for AD, AP, physical mixture of AD+AP and AD-AP cocrystal

征峰位于 15.54° 、 18.20° 、 23.46° 和 26.52° , 与文献^[25]报道一致。AD+AP 的 PXRD 谱图为两种单体药物谱图的叠加。与 AD+AP 不同, AD-AP 共晶在 11.22° 、 16.40° 、 17.60° 、 19.76° 和 24.48° 有新的强衍射峰出现, 这表明 AD-AP 共晶是不同于物理混合物的新物质。

1.3 傅里叶红外光谱法 由 FTIR 谱图 (图 5) 可知, AD 的磷酸基 $\nu_{\text{P=O}}$ 峰位于 1293 cm^{-1} , 酯基 $\nu_{\text{C=O}}$ 峰位于 1751 cm^{-1} , 伯胺基团 $\nu_{\text{N-H}}$ 峰位于 3275 和 3124 cm^{-1} , 咪唑环上的 $\nu_{\text{C=N}}$ 峰位于 1681 cm^{-1} , 与文献^[24]报道的晶型 I 吻合。AP 在 3233 和 3159 cm^{-1} 分别有亚酰胺的 $\nu_{\text{N-H}}$ 峰和酚羟基的 $\nu_{\text{O-H}}$ 峰, 而 1653 cm^{-1} 对应其 $\nu_{\text{C=O}}$ 峰。AD+AP 的 FTIR 谱图为两种单体药物

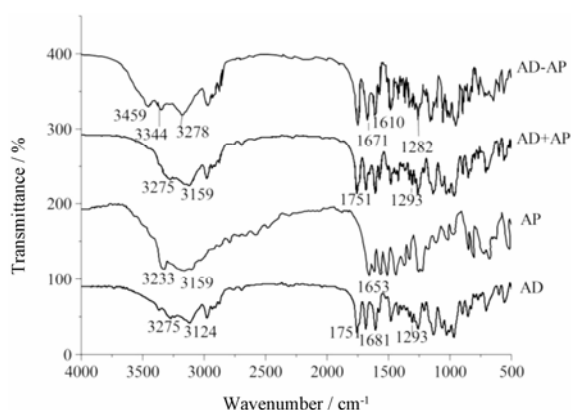


Figure 5 FTIR spectra for AD, AP, physical mixture of AD+AP and AD-AP cocrystal

谱图的叠加。形成 AD-AP 共晶后, AD 的 $\nu_{\text{P=O}}$ 峰由 1293 cm^{-1} 红移到 1282 cm^{-1} , $\nu_{\text{N-H}}$ 峰由 3275 和 3124 cm^{-1} 分别蓝移到 3459 和 3278 cm^{-1} , $\nu_{\text{C=N}}$ 峰由 1681 cm^{-1} 红移到 1671 cm^{-1} ; AP 的 $\nu_{\text{N-H}}$ 峰由 3233 cm^{-1} 蓝移到 3344 cm^{-1} , $\nu_{\text{C=O}}$ 峰由 1653 cm^{-1} 红移到 1610 cm^{-1} 。由上述结果可知, AD 的 $\nu_{\text{P=O}}$ 峰、 $\nu_{\text{N-H}}$ 峰、 $\nu_{\text{C=N}}$ 峰和 AP 的 $\nu_{\text{N-H}}$ 峰、 $\nu_{\text{C=O}}$ 峰均发生明显位移, 这表明

AD-AP 共晶中 AD 与 AP 间可能通过氢键连接而形成新物质, 形成氢键的具体位点可通过共晶结构模拟进一步确证。

2 共晶分子结构模拟

Materials Studio (version 5.0) 分子模拟结果表明, AD-AP 共晶属三斜晶系, P1 空间群, 共晶中 AD 与 AP 通过氢键连接, 与 FTIR 结果相符; 共晶晶体结构如图 6a, 分子间的氢键连接方式如图 6b。从图 6b 中可以看出, 共晶的不对称结构单元中含有 1 分子 AD 和 1 分子 AP, 其中 AD 的 P=O 基团与 AP 的 N-H 基团形成氢键; 而两个结构单元间, AD 的 C=N 基团与另一个 AD 的 -NH₂ 基团形成氢键。该氢键连接方式也与 FTIR 结果中 AD-AP 共晶的红外特征峰位移相符。

对结构模拟所得 AD-AP 共晶的晶体结构进行 Rietveld 结构精修后可得 PXRD 模拟谱图, 将 PXRD 模拟谱图与上述 PXRD 实验所得谱图进行对比 (图 7) 可验证上述分子模拟结果。由图 7 可知, PXRD 模拟谱图与实验谱图基本一致, 计算得到的峰强度与实验数据相符性均较好, 这表明结构模拟所得的晶体结构可信度较高。

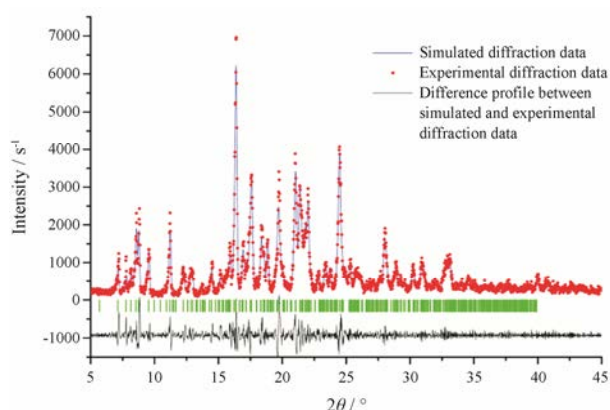


Figure 7 Rietveld refinement results of AD-AP cocrystal

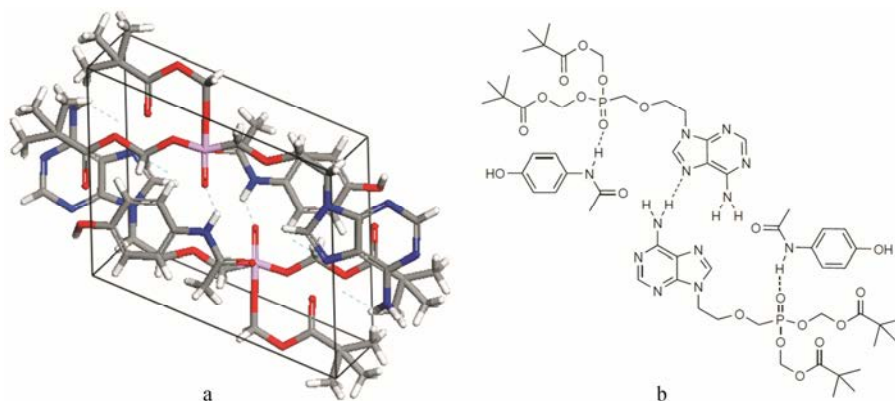


Figure 6 Crystal structure (a) and hydrogen bonds (b) in AD-AP cocrystal

3 平衡溶解度的测定

由平衡溶解度实验结果可知, AD 晶体、AD+AP 及 AD-AP 共晶中 AD 在水中的溶解度分别为 (0.30 ± 0.05) 、 (0.39 ± 0.03) 和 $(0.61 \pm 0.03) \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。AD+AP 及 AD-AP 共晶中 AD 在水中的溶解度相比于 AD 原料药均有显著增加 ($P < 0.05$)。与 AD+AP 相比, AD-AP 共晶仍有显著的溶解度优势 ($P < 0.05$)。由于晶体药物的溶解需要经历药物脱离晶格和脱离晶格的药物溶剂化这两个独立的过程, 故晶体药物的溶解需要克服晶格能 ($\Delta G_{\text{lattice}}$) 和溶剂化能 ($\Delta G_{\text{solvation}}$)^[28, 29]。形成共晶可改变原料药晶体的排列方式而改变其 $\Delta G_{\text{lattice}}$ 和 $\Delta G_{\text{solvation}}$ ^[28], 进而影响药物的溶解。

在理想溶液中, 物质的溶解度仅取决于其熔点及熔融焓, 而物质的 $\Delta G_{\text{lattice}}$ 与其熔点及熔融焓相关^[30], 故仅考虑 $\Delta G_{\text{lattice}}$ 时 (即理想溶液中), 物质的溶解度公式可表示如下^[28, 31, 32]:

$$\ln X_{\text{ideal}} = -\frac{\Delta H_{\text{m}}}{R} \left(\frac{T_{\text{m}} - T}{TT_{\text{m}}} \right) \quad (5)$$

其中, X_{ideal} 为物理想溶解度, T_{m} 为药物熔点, ΔH_{m} 为药物熔化焓, R 为常数, T 为溶液温度。晶体药物的 T_{m} 、 ΔH_{m} 可由药物的 DSC 谱图获取。

然而实际的溶解过程中, 还经历了溶质的溶剂化过程, 而在溶剂化过程中药物与溶剂会发生相互作用, 故药物的实测溶解度与药物的理想溶解度之间必然存在差异。此时药物的实测溶解度可以用下式表示^[28, 29]:

$$\ln X = \ln X_{\text{ideal}} - \ln \gamma \quad (6)$$

其中, X 为药物实测溶解度, X_{ideal} 为物理想溶解度, γ 为药物在溶剂中的活度系数。

在式 (6) 中 $\ln X_{\text{ideal}}$ 与 $\Delta G_{\text{lattice}}$ 有关, $-\ln \gamma$ 与 $\Delta G_{\text{solvation}}$ 有关^[28, 29]。利用 Pinal 等提出的方法计算

$\ln X_{\text{ideal}}$ 与 $-\ln \gamma$, 将计算所得 $\ln X_{\text{ideal}}$ 与 $-\ln \gamma$ 叠加可得药物的实际溶解度 $\ln X$ (图 8)^[29]。

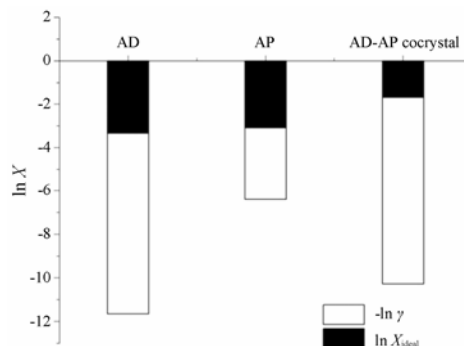


Figure 8 Lattice strength (black bar) and solvation (white bar) contribute to the solubilities of crystalline AD, AP and AD-AP cocrystal

由图 8 可知, AD 与 AD-AP 共晶的 $-\ln \gamma$ 相近, 但 $\ln X_{\text{ideal}}$ 存在明显差异, 故 $\Delta G_{\text{lattice}}$ (与 $\ln X_{\text{ideal}}$ 有关) 对 AD 溶解的影响明显大于 $\Delta G_{\text{solvation}}$ (与 $-\ln \gamma$ 有关)。因此, 结合 DSC 结果可知, 与 AP 形成共晶后, AD 溶解度显著提高可能是由于形成共晶可显著降低体系的 T_{m} 而使 $\ln X_{\text{ideal}}$ 升高、 $\Delta G_{\text{lattice}}$ 降低所致。

4 溶出度测定

AD 晶体、AD+AP 及 AD-AP 共晶中 AD 在 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸介质中的溶出曲线如图 9a 所示, AP 晶体、AD+AP 及 AD-AP 共晶中的 AP 在 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸介质中的溶出曲线如图 9b 所示。由图 9a 可知, AD-AP 共晶中 AD 的溶出速率和溶出度均明显高于 AD 原料药及 AD+AP。此外, AD-AP 共晶的溶出行为与 AD 原料药及 AD+AP 有明显区别, AD-AP 共晶中 AD 在 15 min 时已基本溶出完全, 但 AD 原料药及 AD+AP 中的 AD 在 45 min 时仍未溶出完全。故由溶出结果可知, 与 AP 形成 AD-AP 共晶可显著提高 AD

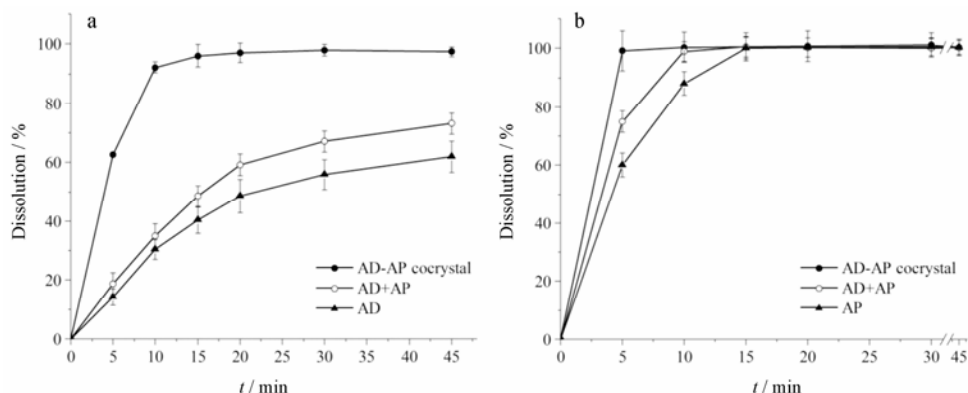


Figure 9 Dissolution of AD (a) and AP (b) in crystalline state, physical mixture of AD+AP and AD-AP cocrystal in $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl ($n=6$)

的溶出速率和溶出度。由图 9b 可知, 与 AP 原料药及 AD+AP 相比, 形成 AD-AP 共晶后 AP 溶出速度明显提高, 故与 AD 形成共晶可促进 AP 的溶出。

5 特性溶出速率的测定

在特性溶出实验中, AD 晶体、AD+AP 及 AD-AP 共晶中 AD 在水中不同时间点的单位表面积溶出量如图 10 所示。由图可知, AD 晶体、AD+AP 及 AD-AP 共晶中 AD 在水中的特性溶出速率分别为 0.020 7、0.028 7 和 0.043 3 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$ 。与 AD 原料药相比, AD+AP 与 AD-AP 共晶中 AD 的特性溶出速率均明显提高, 而 AD-AP 共晶中 AD 的特性溶出速率又明显高于 AD+AP 1.5 倍。

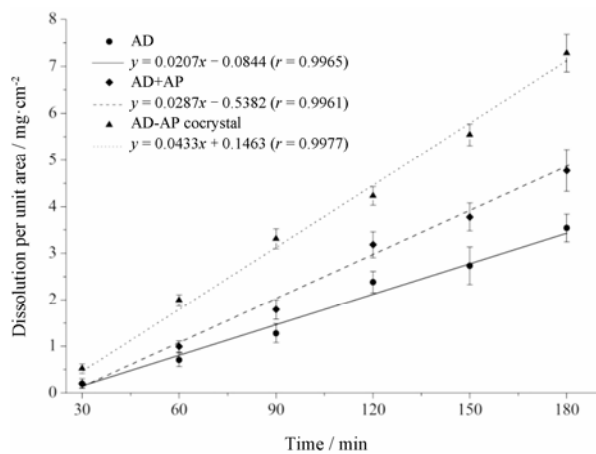


Figure 10 Dissolution amount per unit area of AD in crystal-line state, physical mixture of AD+AP and AD-AP cocrystal in distilled water ($n=6$)

6 共晶在体肠吸收的研究

6.1 AD 灌流浓度对其在十二指肠吸收的影响 由表 1 可知, 在 30~180 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内, AD 在十二指肠中 F_a 随灌流浓度的增大而线性增大, 而 K_a 与 P_{eff} 无显著性差异 ($P>0.05$), 不存在浓度依赖性, 符合 Ficks 扩散原理。这表明 AD 主要以被动扩散的机制被十二指肠吸收, 其吸收动力学为一级速率过程。

6.2 AP 对 AD 在十二指肠吸收的影响 与单独肠灌流 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ AD 溶液相比, 加入 AP 一起灌流后,

Table 1 Absorption rate constant (K_a), apparent absorption coefficient (P_{eff}) and absorption amount (F_a) of AD crossing duodenum. $n=3$, $\bar{x}\pm s$

Concentration / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$K_a\times 10^{-2}/\text{min}^{-1}$	$P_{\text{eff}}\times 10^{-5}/\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$	$F_a/\mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$
30	0.29 ± 0.02	0.64 ± 0.04	1.24 ± 0.07
100	0.29 ± 0.03	0.67 ± 0.07	5.07 ± 0.60
180	0.30 ± 0.01	0.63 ± 0.02	8.37 ± 0.30

AD 在十二指肠中 K_a 和 P_{eff} 均显著升高, 且在 10~60 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ AP 内, AD 在十二指肠中 K_a 和 P_{eff} 值与 AP 浓度呈正相关 (表 2)。

Table 2 K_a and P_{eff} of AD crossing duodenum after the addition of AP. $n=3$, $\bar{x}\pm s$. * $P<0.05$ vs AD 100 (control group); $\blacktriangle P<0.05$ vs AD 100 + AP 10

Concentration / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$K_a\times 10^{-2}/\text{min}^{-1}$	$P_{\text{eff}}\times 10^{-5}/\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$
AD 100	0.29 ± 0.03	0.67 ± 0.07
AD 100 + AP 10	0.41 ± 0.06*	1.21 ± 0.13*
AD 100 + AP 33.3	0.64 ± 0.05* \blacktriangle	2.16 ± 0.24* \blacktriangle
AD 100 + AP 60	1.01 ± 0.05* \blacktriangle	3.84 ± 0.37* \blacktriangle

在肠道中, P-gp 广泛分布于肠成熟上皮细胞的顶端, 可主动外排细胞内 P-gp 底物, 从而减少由肠腔进入血液循环的 P-gp 底物量^[33-36]。研究表明, AP 可抑制肠道的 P-gp 转运活性^[16, 17]。由于 AD 是 P-gp 的底物^[9-12], 故 AP 可抑制 P-gp 对 AD 的外排作用而使 AD 进入肠细胞的量增加。因此, 加入 AP 灌流后 AD 肠吸收速率增加。

6.3 AD、AD+AP 及 AD-AP 共晶在不同肠段的吸收 以 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ AD 肠灌流液对大鼠各肠段进行灌流, 计算 P_{eff} , 比较不同肠段 AD 的吸收情况。结果表明, AD 在不同肠段的 P_{eff} 大小顺序为: 十二指肠>空肠>回肠>结肠 (图 11)。其中 AD 在结肠段的吸收显著低于其他肠段, AD 的主要吸收部位为十二指肠和空肠, 且以十二指肠的吸收能力最强。

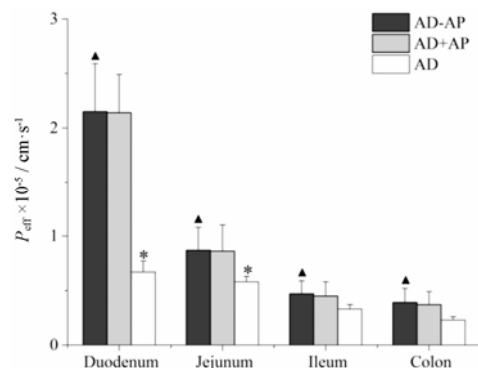


Figure 11 P_{eff} of AD in crystalline state, physical mixture of AD+AP and AD-AP cocrystal in different segments of intestines. $n=3$, $\bar{x}\pm s$. * $P<0.05$ vs AD in colon; $\blacktriangle P<0.05$ vs AD in different segments of intestines

以 AD+AP、AD-AP 共晶配制的肠灌流液 (相当于 AD 浓度 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 对大鼠各肠段进行灌流。结果表明 (图 11), 与 AD 原料药灌流相比, 以 AD-AP 共晶灌流时 AD 在 4 个肠段 P_{eff} 均显著增加 ($P<0.05$),

以十二指肠为例, AD-AP 共晶中 AD P_{eff} 约为 AD 原料药的 3 倍。虽然在各肠道中 AD+AP、AD-AP 共晶中 AD 的肠渗透性无显著差异 ($P > 0.05$), 但 AD-AP 共晶较 AD+AP 仍有显著的溶解、溶出优势, 这有助于 AD 的体内吸收。

对于被动扩散的药物, 其体内吸收往往与 P_{eff} 具有良好的正相关^[37]。不同浓度 AD 灌注实验已表明 AD 为被动扩散的药物; AD、AP 同时灌注实验表明 AP 可抑制 AD 外排而促进 AD 的肠吸收。另外, 与 AD 原料药相比, 形成 AD-AP 共晶后 AD 的溶解度、溶出速率和肠渗透性均有显著提升。故形成 AD-AP 共晶有利于 AD 的口服吸收。

结论

本研究采用溶剂挥发法制备得到 AD-AP 共晶。与 AD 晶体相比, 共晶中 AD 的溶解度和溶出速率均得到显著提高。在体肠吸收实验结果表明, AD 以被动扩散的机制被肠道吸收; 形成共晶后, AD 的肠渗透性相对于 AD 晶体显著提高, 这有利于提高 AD 的口服生物利用度。本研究选用 P-gp 转运蛋白抑制剂 AP 作为共晶配体与 AD 形成共晶, 在改善了 AD 溶解、溶出的同时, 提高了 AD 的肠渗透性, 这为低溶解性或/和低渗透性药物的开发提供了新的思路。

References

- [1] Lara-Ochoa F, Espinosa-PÉrez G. Cocrystals definitions [J]. *Supramol Chem*, 2007, 19: 553–557.
- [2] Shan N, Zaworotko MJ. The role of cocrystals in pharmaceutical science [J]. *Drug Discov Today*, 2008, 13: 440–446.
- [3] Schultheiss N, Newman A. Pharmaceutical cocrystals and their physicochemical properties [J]. *Cryst Growth Des*, 2009, 9: 2950–2967.
- [4] Chen XW, Song J, Tang HY, et al. Progress in screening methods and physicochemical properties of pharmaceutical co-crystals [J]. *Chin J Pharm (中国医药工业杂志)*, 2012, 43: 703–708.
- [5] Trask AV. An overview of pharmaceutical cocrystals as intellectual property [J]. *Mol Pharm*, 2007, 4: 301–309.
- [6] Cundy KC, Sue IL, Visor GC, et al. Oral formulations of adefovir dipivoxil: *in vitro* dissolution and *in vivo* bioavailability in dogs [J]. *J Pharm Sci*, 1997, 86: 1334–1338.
- [7] Dallas S, Schlichter L, Bendayan R. Multidrug resistance protein (MRP) 4- and MRP 5-mediated efflux of 9-(2-phosphonylmethoxyethyl) adenine by microglia [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2004, 309: 1221–1229.
- [8] Heijntink RA, De Wilde GA, Kruining J, et al. Inhibitory effect of 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)-adenine (PMEA) on human and duck hepatitis B virus infection [J]. *Antiviral Res*, 1993, 21: 141–153.
- [9] Annaert P, Van Gelder J, Naesens L, et al. Carrier mechanisms involved in the transepithelial transport of bis(POM)-PMEA and its metabolites across Caco-2 monolayers [J]. *Pharm Res*, 1998, 15: 1168–1173.
- [10] Maeng HJ, Chapy H, Zaman S, et al. Effects of 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ on transport and metabolism of adefovir dipivoxil and its metabolites in Caco-2 cells [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2012, 46: 149–166.
- [11] Yoon IS, Son JH, Kim SB, et al. Effects of 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ on intestinal absorption and disposition of adefovir dipivoxil and its metabolite, adefovir, in rats [J]. *Biol Pharm Bull*, 2015, 38: 1732–1737.
- [12] Annaert P, Tukker JJ, Van Gelder J, et al. *In vitro*, *ex vivo*, and *in situ* intestinal absorption characteristics of the antiviral ester prodrug adefovir dipivoxil [J]. *J Pharm Sci*, 2000, 89: 1054–1062.
- [13] Ji X, Wang J, Zhang L, et al. Application of phosphates and phosphonates prodrugs in drug research and development [J]. *Acta Pharm Sin (药理学报)*, 2013, 48: 621–634.
- [14] Mulato AS, Ho ES, Cihlar T. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs efficiently reduce the transport and cytotoxicity of adefovir mediated by the human renal organic anion transporter 1 [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2000, 295: 10–15.
- [15] Fu DX, Yang B. Adverse reactions of non-steroidal anti-inflammatory drugs and its prevention [J]. *Chin Pharm J (中国药理学杂志)*, 1999, 34: 129–130.
- [16] Novak A, Carpini GD, Ruiz ML, et al. Acetaminophen inhibits intestinal P-glycoprotein transport activity [J]. *J Pharm Sci*, 2013, 102: 3830–3837.
- [17] Novak A, Carpini GD, Ruiz ML, et al. Acetaminophen (AP) inhibits intestinal P-glycoprotein (P-gp) activity *in vitro* and *in vivo* [J]. *FASEB J*, 2013, 27: S8914.
- [18] Khamdang S, Takeda M, Noshiro R, et al. Interactions of human organic anion transporters and human organic cation transporters with nonsteroidal anti-inflammatory drugs [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002, 303: 534–539.
- [19] Apiwattanakul N, Sekine T, Chairoungdua A, et al. Transport properties of nonsteroidal anti-inflammatory drugs by organic anion transporter 1 expressed in xenopus laevis oocytes [J]. *Mol Pharmacol*, 1999, 55: 847–854.
- [20] Mkim JM Jr. *In vitro* toxicity screening in early drug discovery: importance of metabolism and reactive metabolites [M]//Lyubimov AV. *Encyclopedia of Drug Metabolism and*

- Interactions. 2nd ed. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2012: 1–28.
- [21] Wood JH, Syarto JE, Letterman H. Improved holder for intrinsic dissolution rate studies [J]. *J Pharm Sci*, 1965, 54: 1068.
- [22] Chen X, Gao Y, Zhou H, et al. Gastrointestinal absorption kinetics of methylcantharidimide in rats [J]. *Chin J New Drugs Clin Rem (中国新药与临床杂志)*, 2011, 30: 343–349.
- [23] Nie SF, Pan WS, Yang XG, et al. Evaluation of gravimetry in the rat single-pass intestinal perfusion technique [J]. *Chin J New Drugs (中国新药杂志)*, 2005, 14: 1176–1179.
- [24] Arimilli MN, Kelly DE, Lee TTK, et al. Nucleotide analog compositions: US, 6451340 [P]. 2002-09-17.
- [25] Zimmermann B, Baranović G. Thermal analysis of paracetamol polymorphs by FT-IR spectroscopies [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2011, 54: 295–302.
- [26] Cherukuvada S, Row TNG. Comprehending the formation of eutectics and cocrystals in terms of design and their structural interrelationships [J]. *Cryst Growth Des*, 2014, 14: 4187–4198.
- [27] Yalkowsky SH, Valvani SC, Roseman TJ. Solubility and partitioning VI: octanol solubility and octanol–water partition coefficients [J]. *J Pharm Sci*, 1983, 72: 866–870.
- [28] Alhalaweh A, Roy L, Rodríguez-Hornedo N, et al. pH-dependent solubility of indomethacin-saccharin and carbamazepine-saccharin cocrystals in aqueous media [J]. *Mol Pharm*, 2012, 9: 2605–2612.
- [29] Miyako Y, Tai H, Ikeda K, et al. Solubility screening on a series of structurally related compounds: cosolvent-induced changes on the activity coefficient of hydrophobic solutes [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2008, 34: 499–505.
- [30] Jayasankar A, Good DJ, Rodríguez-Hornedo N. Mechanisms by which moisture generates cocrystals [J]. *Mol Pharm*, 2007, 4: 360–372.
- [31] Good DJ, Rodríguez-Hornedo N. Solubility advantage of pharmaceutical cocrystals [J]. *Cryst Growth Des*, 2009, 9: 2252–2264.
- [32] Liang SJ, Zhou SY, Yang ST, et al. Thermodynamic studies of naringenin-isonicotinamide cocrystals [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2017, 52: 625–633.
- [33] Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, et al. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987, 84: 7735–7738.
- [34] Van De Water FM, Boleij JM, Peters JGP, et al. Characterization of P-glycoprotein and multidrug resistance proteins in rat kidney and intestinal cell lines [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2007, 30: 36–44.
- [35] Amo EMD, Heikkinen AT, Mönkkönen J. *In vitro-in vivo* correlation in P-glycoprotein mediated transport in intestinal absorption [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2009, 36: 200–211.
- [36] The International Transporter Consortium. Membrane transporters in drug development [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2010, 9: 215–236.
- [37] Artursson P, Karlsson J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991, 175: 880–885.