

促进雷洛昔芬口服吸收的纳米乳处方设计、吸收机制及生物利用度研究

黄传利¹, 吴永秋², 黄蓓², 杨健峰², 万君晗¹, 张彩凤¹, 龙晓英^{2,3*}

(广东药科大学 1. 药学院, 2. 中药学院, 3. 广东省局部精准药物递药制剂工程技术研究中心, 广东 广州 510006)

摘要: 系统进行口服纳米乳 (nanoemulsions, NE) 处方设计, 并研究其对雷洛昔芬 (raloxifene, RAL) 口服吸收的影响及吸收机制。考察 RAL 水溶解度及 NE 各种辅料成分中的饱和溶解度、油水分配系数 [oil-water partition coefficient, $P_{(O/W)}$], 并通过乳化能力确定 NE 的乳化剂与油的最佳配伍; 由伪三元相图确定 NE 各成分比例, 并由载药量确定最终 RAL-NE 处方; 通过测定 NE 粒径、zeta 电位、形态和 RAL-NE 在模拟胃肠液中的稳定性及包封率等评价其质量。采用 MDCK 细胞模型对 RAL-NE 体外跨膜转运及机制进行研究; 最后测定 RAL-NE 的大鼠口服生物利用度。根据其溶解度及 $P_{(O/W)}$, RAL 可归为 BCSII, RAL-NE 最佳处方为亚油酸 (LOA): 棕榈酸异丙酯 (IPP): 聚氧乙烯化蓖麻油 (RH40): 乙醇 = 1.67:3.33:3:2, 预纳米乳的载药量为 $15 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$; RAL-NE 包封率为 $(79.4 \pm 0.4)\%$, 在模拟胃肠液中的粒径、zeta 电位及药物含量基本保持不变; RAL 在 MDCK 细胞水平的转运机制为网格蛋白介导内吞; RAL-NE 相对于 RAL 混悬剂的口服生物利用度为 171.9%, 吸收显著提高 ($P < 0.05$)。体内外研究证明, 经过系统研究的 RAL-NE 最佳处方能显著提高 RAL 的口服吸收。本文为口服 NE 研究与产品开发提供参考。

关键词: 雷洛昔芬; 纳米乳; 处方设计; 细胞转运; 生物利用度

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 10-1726-10

Formulation design, absorption mechanism and bioavailability of nanoemulsions for enhancing oral absorption of raloxifene

HUANG Chuan-li¹, WU Yong-qiu², HUANG Bei², YANG Jian-feng², WAN Jun-han¹,
ZHANG Cai-feng¹, LONG Xiao-ying^{2,3*}

(1. School of Pharmacy, 2. School of Traditional Chinese Medicine, 3. Guangdong Engineering and Technology Research Center of Topical Precise Drug Delivery System, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Oral formulations of nanoemulsions (NE) were systematically designed, and then their effects on oral absorption of raloxifene (RAL), including their absorption mechanisms were investigated. RAL solubility in water and various excipients of NE and oil-water partition coefficient [$P_{(O/W)}$] of RAL were examined. Next the optimal compatibility between emulsifiers and oils in NE were ascertained by emulsification ability. Proportions of each component and optimal RAL-NE were fully confirmed by a pseudo-ternary phase diagram and drug loading, respectively. RAL-NE quality was evaluated by particle size, zeta potential, morphology, entrapment efficiency and stability in simulated gastrointestinal fluid. A MDCK cell model was used to study the *in vitro* transport mechanism of RAL-NE. Oral bioavailability of RAL-NE was eventually performed in SD rats. RAL can be classified as BCSII based on the solubility and $P_{(O/W)}$. The best formulation of RAL-NE

收稿日期: 2018-06-01; 修回日期: 2018-06-29.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81573353).

*通讯作者 Tel: 86-20-39352168, Fax: 86-20-39352174, E-mail: longxy3156@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0514

was composed of linoleic acid (LOA) : isopropyl palmitate (IPP) : cremophor RH40 (RH40) : alcohol as 1.67 : 3.33 : 3 : 2. Drug loading in pre-nanoemulsion was $15 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ and entrapment efficiency of RAL in NE was $(79.4 \pm 0.4) \%$. The particle size, zeta potential and drug content of RAL-NE were maintained in the simulated gastrointestinal fluid. The *in vitro* transport mechanism of RAL-NE in MDCK cells was mainly clathrin-mediated endocytosis. The oral bioavailability of RAL in RAL-NE relative to RAL-suspension was 171.9%. The best formulation of RAL-NE studied systematically was confirmed to significantly improve the RAL absorption by *in vitro* and *in vivo* evaluations ($P < 0.05$). This paper provides references for oral NE research and development.

Key words: raloxifene; nanoemulsion; formulation design; transcellular cell migration; bioavailability

微粒给药系统通过改变药物的理化性质及生物学性质, 为实现更好递送药物的目的, 在新药的研究与开发中一直都受到国内外学者的极大关注。其中, 口服纳米乳 (nanoemulsions, NE) 具有增加药物溶解度^[1]、增强药物胃肠道黏膜渗透性、避免药物在胃肠道的首过代谢、从而达到提高生物利用度的特点^[2-4]。同时, NE 是由油、乳化剂、助乳化剂和水组成的热力学稳定分散体系, 制备工艺简单、易于大规模生产, 加之口服给药途径顺应性高, 这些优点使 NE 成为难溶性药物的理想载体和微粒给药系统的研究热点。

近年来, 关于口服 NE 的研究虽然越来越多, 但 NE 上市品种比较少, 原因是多方面的。NE 稳定性是原因之一, 而奥斯特瓦尔德熟化 (Ostwald ripening coalescence) 和合并是导致 NE 不稳定主要机制^[5, 6]。NE 进入胃肠道后, NE 稳定性还会受到胃肠液 pH、酶和胆盐等影响, 使其包裹药物的吸收重复性较差。最后由于药物性质的多样性 [水溶解度与 $P_{(O/W)}$ 等], 导致口服 NE 的处方随之呈现出多样性的变化, 然而可供选择并能满足安全性、NE 成乳能力, 具有较高药物载药率的 NE 辅料并不多, 因此需要精心设计。

本文以雷洛昔芬 (raloxifene, RAL) 为模型药物, 根据其本身性质, 对口服 NE 进行系统性设计, 并对相关的稳定性进行评价; 然后对 RAL-NE 提高 RAL 的口服吸收机制及生物利用度进行研究。RAL 是第二代选择性雌激素受体调节剂, 对绝经期或绝经后妇女的骨质疏松症疗效显著, 如 Jiang 等^[7]通过 RAL 对患者进行 12 个月的治疗, 发现其骨密度有所升高。同时, 具有改善妇女焦虑和惊恐情绪等^[8]。然而, 虽然口服后 RAL 约 60% 被快速吸收, 但绝对生物利用度仅为 2%^[9, 10]。本文旨在为口服 NE 系统性研究与开发提供有价值的参考。

材料与方法

仪器 Zetasizer Nano ZS90 粒度仪 (英国马尔文

仪器有限公司); UV-6100s 型紫外可见分光光度计 (上海美谱达仪器有限公司); TGL-16 台式高速冷冻离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); RCT basic S025 恒温磁力搅拌器 (德国 IKA 仪器设备有限公司); SPH-200B 恒温培养摇床 (上海世平实验设备有限公司); 倒置显微镜 (OLYMPUS 公司); 酶联免疫检测仪 (西化仪科技有限公司); 120 kV 高反差型透射电镜 (JEM-1400, 日本电子株式会社); Millicell-ERS 电阻测定仪 (上海蜀人生物科技有限公司); Waters 2695 型高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司) 等。

药品与试剂 RAL (武汉鸿睿康试剂有限公司, 批号: 14RL0410, 纯度 > 99.8%); 柠檬油 (lemon oil, LMO, 吉安市国光香料厂); 卵磷脂 (phosphatidylcholine, PC, 德国 Lipoid 公司); 二乙二醇单乙基醚 (ethoxydiglycol, Transcutol HP, 法国嘉法狮有限公司); 大豆油 (soybean oil, SBO) 和棕榈酸异丙酯 (isopropyl palmitate, IPP) [阿拉丁试剂 (上海) 有限公司]; DMEM 高糖培养基、胰蛋白酶和胎牛血清 (美国 GIBCO 公司); 制霉菌素 (nystatin)、氯丙嗪 (chlorpromazine) 和阿米洛利 (amiloride) (Solarbio 公司); 聚氧乙烯氢化蓖麻油 (cremophor RH40, RH40)、聚氧乙烯蓖麻油 (cremophor EL, EL35)、泊洛沙姆 188 (poloxamer 188, P188) 和泊洛沙姆 407 (poloxamer 407, P407) (德国巴斯夫有限公司); 1,2-丙二醇 (1,2-propanediol)、油酸 (oleic acid, OA)、亚油酸 (linoleic acid, LOA) 和无水乙醇 (天津市大茂化学试剂厂); 牛磺脱氧胆酸钠 (sodium taurodeoxycholate hydrate, NaTDC, 美国 Sigma 公司)。其余未标明的试剂都为分析纯或色谱纯。

细胞株与动物 犬肾细胞 (MDCK) 购置于 GIBCO 公司。健康雌性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠, 体重 180~220 g, 由中山大学实验动物中心提供 [许可证号: SCXK (粤) 2016-0029]。动物分笼饲养于 12 h 昼夜交替的环境中, 温度约 20~24 °C, 湿度 (60±5)%,

SPF 级条件下适应性饲养 1 周, 动物福利和实验过程遵循广东药科大学动物伦理委员会的规定。

色谱条件与方法学考察

色谱柱为 Phenomenex Kinetex® C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-20 mmol·L⁻¹ 醋酸铵 (35 : 65, pH 4.0); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长 289 nm; 柱温 30 °C; 进样量 10 μL。

分别取空白 NE、空白细胞样品和空白血浆, 加入相应浓度的 RAL 标准溶液, 分别配制如下系列浓度为 0.10、0.25、1.0、2.0 和 3.0 μg·mL⁻¹ 的 NE 样品溶液, 0.01、0.02、0.08、0.10 和 1.00 μg·mL⁻¹ 细胞样品溶液和 0.10、0.20、0.50、0.75、1.00、1.50、2.00 和 2.50 μg·mL⁻¹ 的血浆样品溶液, 按样品处理方法处理后采用 HPLC 测定, 以 RAL 峰面积对 RAL 浓度作线性回归, 建立 NE 质量评价样品、细胞样品和血浆样品的标准曲线。NE 质量评价样品、细胞样品和血浆样品中 RAL 的低、中、高浓度 ($n=6$) 分别为 0.1、1、3 μg·mL⁻¹, 0.02、0.1、1 μg·mL⁻¹, 0.2、1、2 μg·mL⁻¹, 并进行精密密度、回收率、重复性和稳定性等方法学考察。

RAL 紫外含量测定方法 精密吸取 RAL 标准液适量, 于 10 mL 量瓶中, 用磷酸盐缓冲液 (PBS)、水或乙醇稀释定容, 制定标准溶液, 289 nm 处测定吸光度值 (A), 绘制标准曲线。配制 RAL 在 PBS (3、7、11 μg·mL⁻¹)、蒸馏水 (3、7、11 μg·mL⁻¹) 及辅料组成 (4、8、12 μg·mL⁻¹) 的低、中、高 RAL 标准溶液 ($n=3$), 在 289 nm 处测定 A , 重复 3 次, 按标准曲线计算回收率与日内精密密度; 于 1 周内第 1、4、7 天的同一时间, 取重新配制的标准溶液进行测定, 重复 3 次, 计算日间精密密度。

RAL 在胃肠液不同 pH 的溶解度及 $P_{(O/W)}$ 测定 PBS (pH 1.2、5.0 和 6.8) 及蒸馏水于西林瓶中, 加入过量 RAL, 超声溶解 30 min 后, 37 °C 恒温振荡 (100 r·min⁻¹) 72 h, 静置后经 0.45 μm 滤膜过滤, 续滤液分别用相应溶液稀释定容, 紫外分光光度计 289 nm 处测定 A , 并计算 RAL 在不同上述介质的溶解度。

精密移取 RAL 正辛醇溶液 5.0 mL (30.08 μg·mL⁻¹), 按油水比例为 1 : 3 加入正辛醇饱和的各 pH 值缓冲液及蒸馏水, 于 37 °C 水浴恒温振荡 (100 r·min⁻¹) 24 h 后静置, 精密移取上清液 2.0 mL, 乙醇定容至 10 mL, 在 289 nm 处测定 A , 并计算 RAL 在油层中的质量, 按下列公式计算 RAL 在上述介质中的 $P_{(O/W)}$ 。

$$P_{(O/W)} = m_{\text{油}}/m_{\text{水}} = m_{\text{油}}/(m_{\text{总}} - m_{\text{油}})$$

式中, $m_{\text{油}}$ 为 RAL 在水饱和正辛醇中的质量, $m_{\text{水}}$

为 RAL 在正辛醇饱和水中的质量, $m_{\text{总}}$ 为药物初始加入时的总质量。

RAL 在 NE 成分中的溶解度测定 RAL-NE 处方设计选取的油、乳化剂及助乳化剂等辅料见图 1。同上测定 RAL 溶解度。

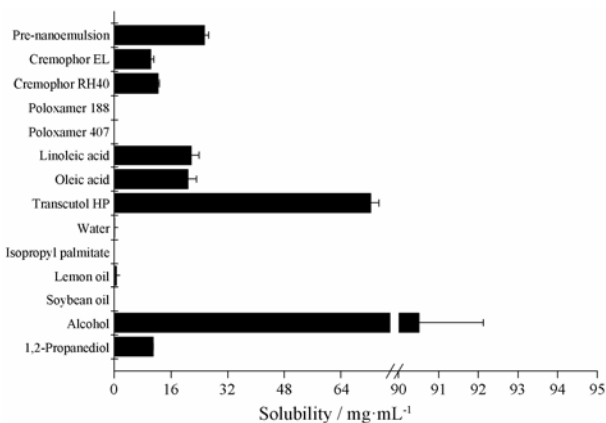


Figure 1 The solubility of raloxifene (RAL) in water, pre-nanoemulsion and different components of nanoemulsions (NE). $n=6$, $\bar{x} \pm s$

乳化剂与油的配伍性能 将 4 种乳化剂 (RH40、EL35、P407、P188) 与 5 种油 (LMO、LOA、IPP、SBO、OA) 分别混合均匀, 保持预纳米乳 (油与乳化剂) 总量 1 g, 油含量在 5%~90% 内的比例逐渐增加、乳化剂则相应减少, 用磁力搅拌器 (25 °C, 1000 r·min⁻¹) 将油与乳化剂充分混合均匀, 然后滴加纯水进行乳化获得 5 mL NE。《中国药典》2015 年版规定 NE 的粒径在 1000 nm 内^[11], 但一般认为 NE 的粒径应为 50~200 nm^[12-14]。本文以粒径 ≤ 100 nm 与多分散系数 (polydispersity index, PDI) < 0.3 为指标, 考察乳化剂与油相互配伍的能力。结合油对药物的溶解度与乳化剂的配伍性能, 加上 LOA 益于健康^[15]的性质, 选择 LOA 和 IPP 作为复合油, 并按 1 : 2、1 : 1 和 2 : 1 比例, 与乳化剂 (EL35 和 RH40) 组合, 通过粒径及 PDI 进一步考察乳化剂与混合油的最佳组合, 确定 NE 的油及乳化剂种类。

NE 伪三元相图的绘制 根据对 RAL 溶解度和较强的助乳化能力 (数据未显示), 选择乙醇作为助乳化剂; 选择复合油 (LOA : IPP = 1 : 2, v/v) 和 RH40, 按上述方法制备 NE, 并绘制伪三元相图, 确定 NE 的乳化区域。

RAL-NE 最佳处方确定 在保证 NE 稳定 (粒径及 PDI)、载药量最大和辅料最低原则的前提下, 于伪三元相图实际乳化区域中, 选取油量较高和乳化剂较低的两种比例, 即混合油 : RH40 : 乙醇的比例分

别为 5:3:2 (NE 1) 和 4:4:2 (NE 2), 并测定 RAL 在最佳处方预纳米乳中的溶解度 (图 1), RAL 的载药量为 $15 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (根据 RAL 在预纳米乳的溶解度及预实验结果, 数据未显示), 以电位、粒径及 RAL 析出为指标对两种处方进行考察, 确定最佳 RAL-NE 处方。

RAL-NE 粒径、zeta 电位与形态测定 测定最佳 RAL-NE 粒径、PDI 和 zeta 电位; 采用透射电子显微镜观察 RAL-NE 显微结构。

RAL-NE 质量评价

RAL-NE 在模拟胃肠液中的稳定性研究 制备含 0.2% NaCl 和 0.7% 盐酸的模拟胃液 (simulated gastric fluid, SGF, pH 1.2) 及含 PC ($1.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)、NaTDC ($5.00 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)、 $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 和 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Trizma maleate 的模拟肠液 (simulated intestinal fluid, SIF, pH 6.8)。6 mL RAL-NE 分别用 SGF 或 SIF 稀释至 50 mL, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴 $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 搅拌, 并于 0、1、2 h 或 0、2、4、6 h 取样, 测 RAL-NE 在 SGF 及 SIF 中的粒径和 PDI。当液体变浑浊时, 取样于 $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 上清液经甲醇破乳并过滤后采用 HPLC 测定 RAL 含量。

RAL-NE 分离考察、包封率和载药率的测定 取充分溶胀后的葡聚糖凝胶填充至注射器并离心, 获得葡聚糖凝胶柱。将 RAL 溶液 $100 \text{ } \mu\text{L}$ 滴于凝胶柱顶端, 持续洗脱至 RAL 被洗出, 收集洗脱液采用 HPLC 测定含量。取同体积 RAL-NE 加入凝胶柱顶端, $1500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 0.5 min, 获得第 1 次洗脱液, 其余操作同游离 RAL 洗脱。根据分离洗脱后 RAL-NE 中的 RAL 含量 ($W_{\text{包}}$) 与未分离的 RAL-NE 中 RAL 的总量 ($W_{\text{总}}$), 由下式计算 RAL-NE 的包封率 (entrapment efficiency, EE, $\text{mg} \cdot \text{mg}^{-1}$) 和载药率 (drug loading, DL, $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)。其中 NE 中的辅料总量为 $W_{\text{NE 辅料量}}$ 。

$$\text{EE} (\%) = W_{\text{包}} / W_{\text{总}} \times 100\%$$

$$\text{DL} (\%) = W_{\text{包}} / (W_{\text{NE 辅料量}} + W_{\text{包}}) \times 100\%$$

RAL-NE 体外细胞跨膜转运及其抑制剂的影响 将 MDCK 细胞以每毫升 3×10^4 个接种于 Transwell 板 (滤膜直径 6.5 mm, 孔径 $0.4 \text{ } \mu\text{m}$), 在肠腔侧 (apical side, AP) 加入 $200 \text{ } \mu\text{L}$ 细胞混悬液, 基底侧 (basolateral side, BL) 加高糖培养基 $600 \text{ } \mu\text{L}$ 作为接收液。 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 细胞培养箱中孵育, 当细胞单层模型的电阻值达到 $180 \text{ } \Omega \cdot \text{cm}^2$ 时^[16, 17], 用 PBS 洗净 AP 培养基, 分别加入适宜浓度的游离 RAL 和 RAL-NE 高糖培养基溶液, 于 30、60、90、120、150 和 180 min 分别从 BL 侧取适量体积的接收液, 经 $0.22 \text{ } \mu\text{m}$ 滤膜过滤后采用 HPLC 测定含量, 按下式计算累积转运量 (Q)。

$$Q = C_n \cdot V_1 + \sum_{m=1}^{n-1} C_m \cdot V_2$$

其中, C_n 为第 n 个时间点所取样品的浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 为第 1 至 $n-1$ 个时间点所取样品浓度之和 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), C_0 为药物初始浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), V_1 为药物接收端的体积 (mL), V_2 为各个时间点的取样体积 (mL)。

抑制转运实验前分别加入 3 种抑制剂 (阿米洛利 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、氯丙嗪 $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和制霉菌素 $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$); 在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 细胞培养箱中孵育 30 min 后用 PBS 洗净抑制剂, 其余操作同上。

SD 大鼠口服生物度实验 健康 SD 雌性大鼠 12 只, 随机分成 2 组。给药前禁食 12 h, 自由饮水, 分别灌胃 (ig) 给予 $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量的 RAL-NE 和 RAL 混悬剂 (0.5% 羧甲基纤维素)。给药前和给药后 0.25、0.5、1.0、1.5、2.0、3.0、4.0、6.0、8.0、10、12 和 24 h 经眼球后静脉丛取血约 0.4 mL , 至含肝素钠的离心管中, $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min 分离血浆, 保存在 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 待测。

血浆样品处理 精密吸取血浆样品 $100 \text{ } \mu\text{L}$, 置 1.5 mL 离心管, 加入两倍体积乙腈, 涡旋混合 2 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 上清液经 $0.22 \text{ } \mu\text{m}$ 滤膜过滤后采用 HPLC 测定含量。

计算及统计学分析 实验结果以平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, C_{max} 和 T_{max} 为实测值, AUC_{0-t} 由梯形法计算, 相对生物利用度用 $F_r = (\text{AUC}_{(0-t)\text{NE}}) / (\text{AUC}_{(0-t)\text{对照组}}) \times 100\%$ 表示。采用 SPSS 22.0 软件进行统计学数据分析, 参数之间进行单因素方差分析和 t 检验, 显著性水平设为 0.05。

结果

1 RAL 含量测定方法学

1.1 RAL-HPLC NE 质量评价样品、细胞样品和血浆样品的内源性杂质不干扰 RAL 测定, 且峰型良好, 保留时间分别为 8.6、9.2 和 9.3 min。NE 质量评价样品、细胞样品和血浆样品的标准曲线分别为 $y = 39606x + 762.23$ ($R^2 = 1$)、 $y = 43658x - 24.934$ ($R^2 = 0.9999$) 和 $y = 24084x - 371.44$ ($R^2 = 0.9995$), RAL 在 $0.10 \sim 3.00 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (质量评价样品)、 $0.01 \sim 1.00 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (细胞样品) 和 $0.10 \sim 2.50 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (血浆样品) 均具有良好的线性关系, 信噪比 $S/N = 10$ 时定量限为 $0.10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。NE 质量评价样品、细胞样品和血浆样品对应的 RAL 低、中、高浓度 ($n=6$) 的日内、日间 RSD 均小于 0.6%、回收率在 96.11% \sim 99.75% ($\text{RSD} < 2\%$)、

重复性 RSD 在 0.3%~0.4% 和稳定性 RSD 均小于 3.0%，符合样品分析要求。

1.2 RAL 紫外分光光度计 3.00~11.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ RAL 在 pH 1.2、5.0 和 6.8 PBS 及蒸馏水中呈良好的线性关系，标准曲线方程分别为 $A=0.0629C+0.0069$ ($R^2=0.9997$)、 $A=0.0634C+0.0067$ ($R^2=0.9998$)、 $A=0.0631C+0.0274$ ($R^2=0.9999$) 及 $A=0.0606C+0.0092$ ($R^2=0.9994$)，RAL 低、中、高质量控制浓度的回收率在 95%~105%，RSD 均 < 2%，日内、日间 RSD 均 < 2%，符合方法学要求。同样，在 2.0~12.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内 RAL 在辅料组成中呈良好的线性关系，标准曲线为 $A=0.0639C-0.0014$ ($R^2=0.9994$)，低、中、高质量控制浓度的日内、日间 RSD 均 < 3%，回收率在 95%~104% (RSD < 3%)，方法学结果均符合实验要求。

2 RAL 在胃肠液不同 pH 溶解度及 $\lg P_{(O/W)}$

由表 1 可知，RAL 在不同 pH 的 PBS 中平衡溶解度极小，在 pH 1.2~7.12 内随 pH 值的升高而降低。 $\lg P_{(O/W)}$ 在 pH 1.2~7.12 内却随 pH 值的升高而升高，当 $\text{pH} \geq 5.0$ 时， $\lg P_{(O/W)} > 1$ 。

Table 1 Solubility and oil-water partition coefficient [$P_{(O/W)}$] of RAL in water and phosphate buffer solution (PBS) at different pH. $n=3, \bar{x} \pm s$

| pH | Solubility / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ | $\lg P_{(O/W)}$ |
|-----------|---|-----------------|
| PBS 1.2 | 30.8 ± 0.2 | 0.8 ± 0.1 |
| 5.0 | 14.9 ± 0.6 | 1.1 ± 0.2 |
| 6.8 | 13.4 ± 0.6 | 1.4 ± 0.1 |
| Water 7.1 | 3.6 ± 0.1 | 1.5 ± 0.4 |

3 RAL-NE 的处方设计

3.1 RAL 在 NE 成分中饱和和溶解度 从图 1 可见，RAL 在预纳米乳、OA、LOA、Transcutol HP、EL35 和 RH40 中的溶解度均较高，其中在乙醇中最高，达到 $90.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，而在其他辅料中的溶解度均较低。

3.2 乳化剂与油的配伍性能 在满足粒径 $\leq 100 \text{ nm}$ 、 $\text{PDI} < 0.3$ 前提下，同量乳化剂能乳化油量越大，说明两者配伍能力越强，结果见图 2。RH40 与 EL35 对 IPP 乳化能力均明显强于 SBO、LOA、LMO 和 OA；而 P407 与 P188 对 5 种油的乳化能力均非常弱。结合 NE 各成分对 RAL 的溶解度 (图 1) 及乳化剂与油的配伍性 (图 2)，进一步考察 RH40、EL35 与混合油中 LOA 和 IPP 不同比例的配伍性，结果见图 3。RH40 对 3 种混合油的乳化能力明显强于 EL35，同时 LOA 和 IPP 按 1:2 混合时，RH40 对混合油的乳化能

力最强，由此确定为 NE 的油及乳化剂组成。

3.3 伪三元相图 NE 满足粒径 $\leq 100 \text{ nm}$ 、 $\text{PDI} < 0.3$ 的区域较大。但只有当乙醇小于 20% 时 (图 4)，24 h

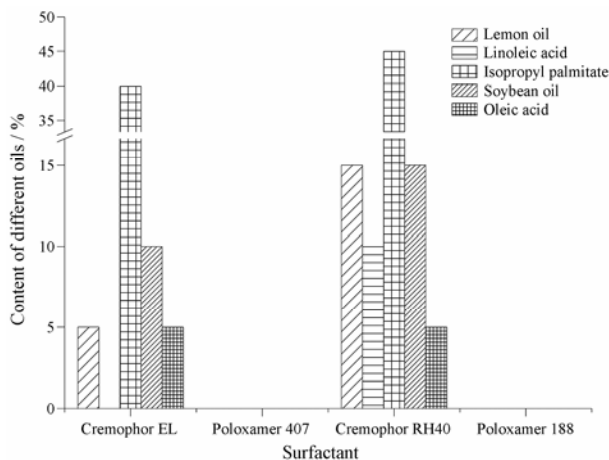


Figure 2 Emulsification efficiency of surfactants for using various oils. $n=6, \bar{x} \pm s$

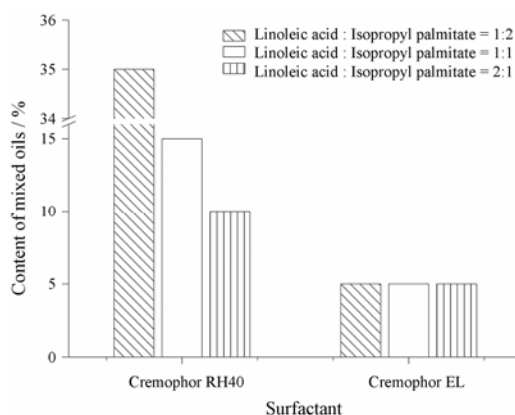


Figure 3 The emulsifying efficiency between RH40 and EL35 with mixed oils. $n=6, \bar{x} \pm s$

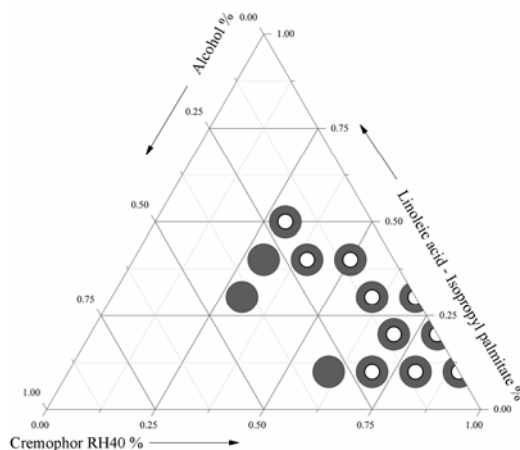


Figure 4 The pseudo ternary phase diagram of NE. Hollow circle represents no drug precipitation from RAL-NE within 24 h. Solid circle represents drug precipitation from RAL-NE within 24 h

内 NE 未出现药物析出的情况。因此, 实际 NE 区域内 NE 未出现药物析出的情况, 实际 NE 区域为: 0%~20% 乙醇、30%~90% RH40 和 10%~50% 混合油相。

3.4 RAL-NE 最佳处方 由图 5 显示, NE1 粒径大于 NE2 ($P<0.05$)。载药后 (15 mg RAL) 与空白 NE 比较, RAL-NE1 的粒径与电位绝对值均有所下降, 但放置后粒径有所增大。而 RAL-NE2 与空白 NE 的粒径与电位在 0 h 与 24 h 时无明显变化, 但 24 h 内有药物析出。因此, 确定 RAL-NE 最佳处方即混合油: RH40: 乙醇比例为 5 (LOA: IPP=1:2): 3:2。

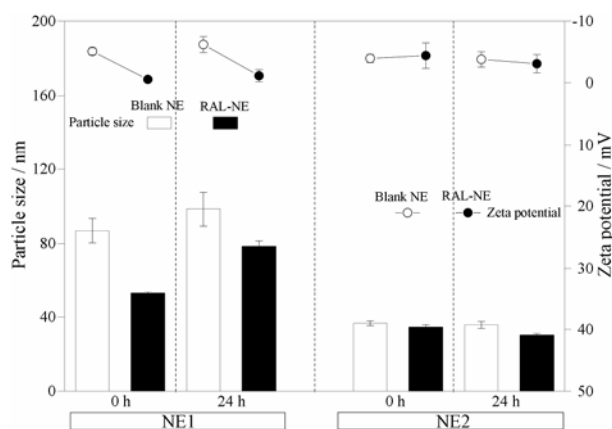


Figure 5 The effects of drug loading on particle sizes and zeta potential of NE. $n=6$, $\bar{x}\pm s$

4 RAL-NE 的质量评价

4.1 RAL-NE 粒径、zeta 电位与形态 RAL-NE 粒径为 52.9 ± 0.9 nm, zeta 电位为 -0.09 ± 0.16 , PDI 为 0.09 ± 0.02 (<0.30), 粒径小且分布均匀。透射电镜结果见图 6, RAL-NE 乳滴为分布较均匀的类型球形。

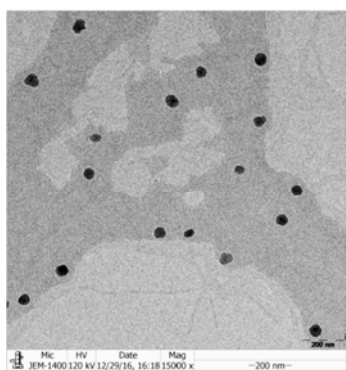


Figure 6 Transmission electron microscopy photograph of RAL-NE ($\times 15000$)

4.2 RAL-NE 在模拟胃肠液中的稳定性 由图 7 表明, RAL-NE 在 SGF 2 h 内 (PDI <0.2) 和 SIF 4 h 内

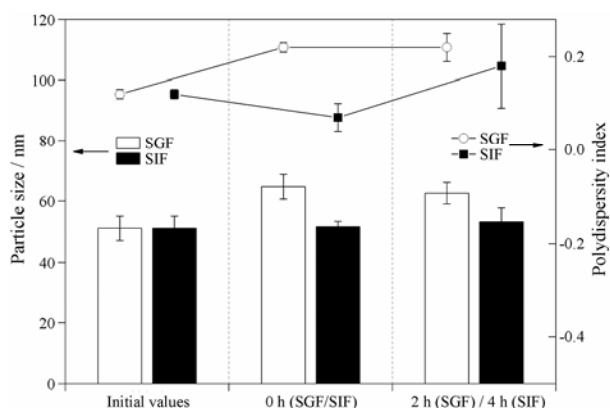


Figure 7 The particle size and polydispersity index (PDI) of raloxifene nanoemulsions (RAL-NE) in simulated gastric fluid (SGF) and simulated intestinal fluid (SIF). $n=6$, $\bar{x}\pm s$

的粒径大小及 PDI 都无明显变化, 溶液体系也无药物析出。同时 RAL-NE 在 SIF 加入前、后 0 和 4 h 的 RAL 含量分别为 (2.3 ± 0.1) 、 (2.4 ± 0.2) 和 (2.1 ± 0.1) $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。说明 RAL-NE 在模拟胃肠液中稳定。

4.3 RAL-NE 包封率和载药率 游离 RAL 在微型凝胶柱中洗脱至 11 次时才会被洗出, 而 RAL-NE 在第 4 次洗脱时已经被完全洗出。因此, 两者在微型凝胶柱中的分离互不干扰, 测得 RAL-NE 的包封率为 $(79\pm 0.4)\%$, 载药率为 $(161.7\pm 2.4)\%$ 。

5 RAL-NE 的 MDCK 细胞转运

5.1 RAL-NE 在 MDCK 细胞模型的转运 接种后随着培养时间的增加, MDCK 细胞模型的跨膜电阻值逐渐增加, 第 5 天时单位面积跨膜电阻值为 $398\ \Omega\cdot\text{cm}^2$ ($>180\ \Omega\cdot\text{cm}^2$), 连续至第 6、7 天, 跨膜电阻值趋于稳定, 因此 MDCK 细胞转运实验的培养时间为 5~7 天。由图 8A 可以看出, 3 h 内 RAL 的 MDCK 细胞的累积转运量逐渐增加, 但从 2 h 开始, RAL 混悬剂的 RAL 累积转运量明显高于 RAL-NE ($P<0.05$)。

5.2 抑制剂对 RAL-NE 跨膜转运的影响 由图 8B 可以看出, 与不加抑制剂的 RAL-NE 比较, 3 种抑制剂均导致 RAL-NE 中 RAL 累积转运量不同程度降低, 其中氯丙嗪使 RAL-NE 中 RAL 累积转运量最低。

6 RAL-NE 的大鼠体内口服生物利用度

以 RAL 混悬剂为对照, 比较 RAL-NE 口服给药后的血药浓度-时间曲线见图 9。RAL-NE 与 RAL 混悬剂的 T_{max} 、 C_{max} 、 $AUC_{0-24\text{h}}$ 分别为 (4.0 ± 1.3) h、 $(0.4\pm 0.9)\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $(4.9\pm 0.5)\ \text{mg}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$ 及 (1.9 ± 0.9) h、 $(0.4\pm 0.1)\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $(2.9\pm 0.8)\ \text{mg}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$, RAL-NE 的 F_r 为 171.9%, RAL-NE 显著提高了 RAL 的口服吸收 ($P<0.05$)。

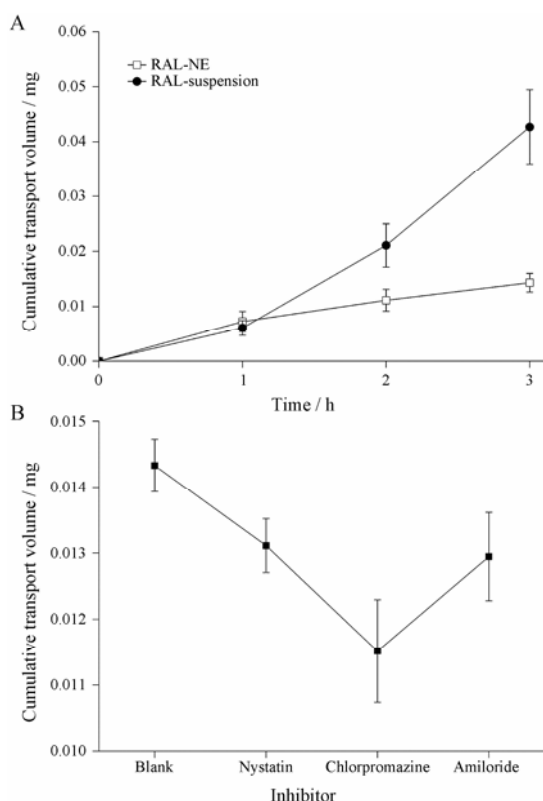


Figure 8 The cumulative transport volume of RAL-suspension and RAL-NE in MDCK cell monolayer(A), RAL-NE in 2 h after adding inhibitors (B). $n=6, \bar{x} \pm s$

讨论

RAL 的平衡溶解度和 $\lg P_{(O/W)}$ 与 Lu 等^[18]报道相一致, 水溶解度与 $\lg P_{(O/W)}$ 随 pH 变化规律由其自身结构决定。RAL 分子结构中含有叔氨基, 具有一定的弱碱性, 低 pH 有利其成盐而使得溶解度较高, $\lg P_{(O/W)}$ 则相反。RAL 的特殊结构同样可以解释酸性的 OA 与 LOA 可提高 RAL 在油中溶解度。根据溶解度及 $\lg P_{(O/W)}$, RAL 可归为低溶解度、高生物膜渗透的 BCSII 类。因此, 可采用 NE 来增加其口服吸收。

RAL 在不同 NE 辅料中的溶解度差异较大。4 种

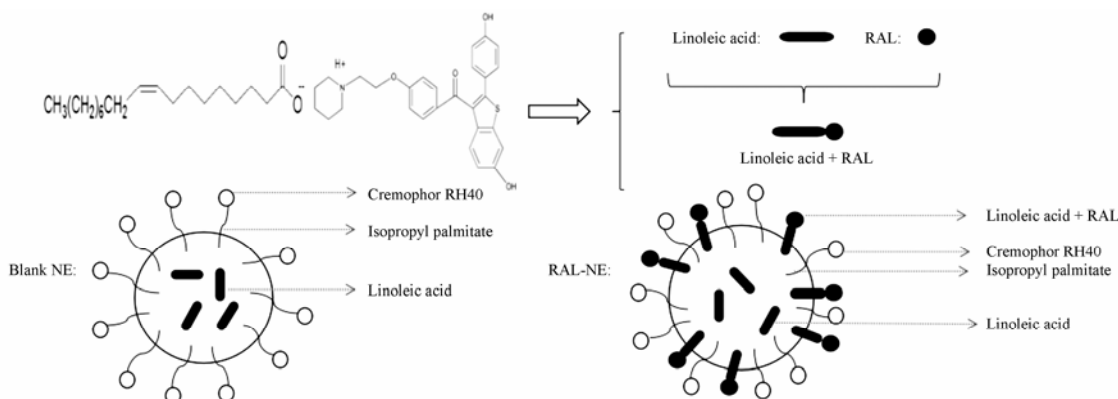


Figure 10 The schematic diagram of blank-NE and RAL-NE

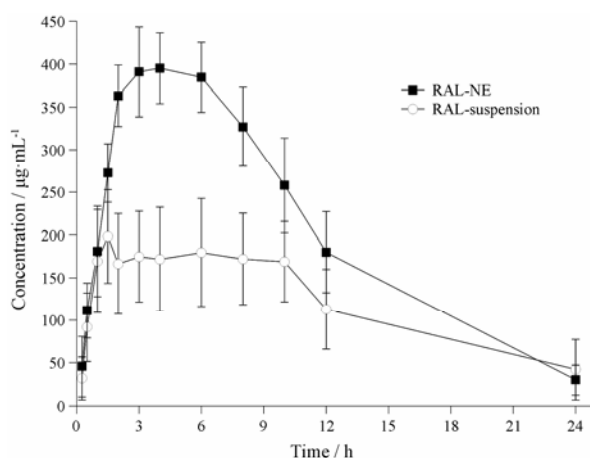


Figure 9 Plasma concentration-time profiles of raloxifene following peroral administration of RAL-suspension or RAL-NE at $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ to rats. $n=6, \bar{x} \pm s$

乳化剂均为 NE 常用乳化剂, 与聚氧乙萘蓖麻油类相比, 氧乙烯氧丙烯类乳化剂 P407 和 P188 无论对 RAL 的溶解性还是对所用油的乳化能力均较差, 这可能与这类乳化剂的分子质量大^[19,20]、黏度高有关, 而本文在室温制备 NE 不利于乳化剂的分散及对 RAL 的溶解。NE1 与 NE2 的粒径相比具有显著性差异 (图 5), 因为 NE1 中油含量高及表面活性剂含量低, 所以粒径大。有趣的是, 与空白 NE1 相比, RAL-NE1 粒径反而显著降低。一般而言, 在 NE 处方不变的条件下, 加入药物会撑大油相, 使得粒径增加。这可能是因为弱碱性 RAL 与弱酸性 LOA 的电性中和 (图 5 也显示 RAL-NE1 的电位绝对值确实降低了), 不仅增加了 RAL 在油中的溶解度, 而且二者的结合物形成类似于两亲性物质 (图 10), 聚集在油水界面起到一定的弱乳化剂的作用, 增强了乳化能力从而使得粒径变小, 这也与 24 h 后 RAL-NE1 无药物析出有关。而 RAL-NE2 含油量较低, 虽然粒径小, 但载药量也低且 24 h 后有药物析出。放置 24 h 后 NE1 粒径稍有增加,

这可能与体系电位值较低、乳滴聚集有关。而 NE2 在 24 h 后粒径变小则与 RAL 析出、乳滴收缩有关。

比较图 3 与图 4, 未加入助乳化剂时, 乳化剂最大乳化油量仅为 30%, 但加入乙醇后乳化区域扩大到油量为 50%。根据溶解度结果, 加入乙醇作为助乳化剂, 不仅增加 RAL 溶解度, 还增加了油与乳化剂的互溶、进一步降低体系黏度及表面张力, 提高了乳化效率。因此, NE 中选择合适的助乳化剂也同样很重要。但因为乙醇为水溶性, 如果用量过大, 形成 NE 后, 由于乙醇分配至水相, 会影响 NE 稳定性, 包括 NE 粒径变大、药物析出等, 根据研究结果, 乙醇在预纳米乳中含量低于 20% 时, RAL-NE 最稳定 (图 4)。

转运结果表明, RAL-NE 在 MDCK 细胞中可能涉及多种内吞途径的转运, 包括网格蛋白 (chlorpromazine)、小窝蛋白 (nystatin) 和巨饱饮 (amiloride), 但主要通过网格蛋白介导的内吞机制, 这与文献^[21, 22]报道相一致。粒径小于 40 nm 的粒子不能产生足够的自由能包裹在细胞膜表面, 从而避免被细胞内吞。而 45~76 nm 均可能被网格蛋白和小窝介导的内吞作用所内化, 这个双吸收途径可以解释其优越的细胞吸收性能。除此之外, 内吞还与微粒表面电荷有关^[23], 这将在今后进行深入研究。

特别值得关注的是, RAL 混悬剂的 RAL 体外细胞累积转运量明显高于 RAL-NE, 与体内吸收结果相反, 这也被一些类似微粒的体外转运结果所证明^[24, 25]。如雌二醇和孕酮在 NE 液中的溶解度增加 400 多倍, 但当使用合成半透膜进行转运实验时, P_{app} 仅为其饱和水溶液的 0.8%^[26, 27]。Bibi 等^[28]也发现桂利嗪在预纳米乳中的溶解度增加了约 600 倍, 但 4 h 仅有总剂量的 0.000 12% 桂利嗪透过亲水聚合膜。这些结果可能与体内外转运机制不同有关。在体外模型中, RAL 主要是以游离的小分子被动扩散地转运, RAL 混悬剂的药物处于饱和溶解状态, 可不断补充游离 RAL, 而 RAL-NE 中药物大多包裹于油滴中, 好比一个大分子, 甚至比多数的大分子更大^[29-33], 显然吸收效率较低; 文献^[34]报道, 直径每增加 0.8 nm 将导致 50% P_{app} 的降低。然而, NE 体内吸收环境与细胞不同。本文已证明 NE 是通过包吞途径转运。体内模型中, 口服 RAL-NE 与含油的食物类似, 在胃肠道可能也先要经历胰脂肪酶的脂解, 导致 RAL-NE 瓦解与破裂而释放药物, 药物也可能以游离形式被吸收; 同时, 淋巴转运途径可能参与脂质制剂中药物转运, 对提高生物利用度也有贡献^[35-37]。总之, 药物在整体动物胃肠道的吸收要比体外复杂得多, 是多种因素共

同影响的结果。因此, 体外模型预测 NE 吸收具有局限性。当然, 体外细胞模型也有助于 NE 的研究, 特别是面对大量候选药物的选择、动物保护等因素使动物实验受限等问题时, 细胞水平的研究是有益的补充, 但 NE 促进药物吸收的结论应以整体动物为准。

从图 9 可知, 两者的血药浓度-时间曲线明显不同, RAL-NE 比较符合大部分口服药物吸收的血药浓度-时间曲线, 但 RAL 混悬剂的 T_{max} 持续近 10 h, 即出现了一个吸收的平台区, 这主要是 RAL 在胃肠液中溶解度低, 长时间处于饱和的溶解状态, RAL 被吸收的同时也不断从 RAL 混悬剂的溶解而得到补充, 以至吸收量与消除量相当, 所以相当长时间血药浓度维持不变, 直至 RAL 混悬剂中的药物全部溶解并被吸收。本文主要是评价 NE 对 RAL 吸收的影响, 加之吸收曲线不典型, 因此未做有关药动学模型及参数处理, 仅通过生物利用度参数评价两种剂型中 RAL 的吸收。相对于 RAL 混悬剂, 虽然 RAL-NE 显著提高了 RAL 的口服吸收, 但吸收增加的程度并不高, 这与 RAL 本身的性质有关。RAL 虽然可归为 BCSII 类, 然而其溶解度极低、 $\lg P_{(O/W)}$ 也不高, 并不是非常典型的 BCSII 类, 同时还存在肠壁首过代谢^[38]。今后还需通过进一步优化 NE 以保护 RAL 不被肠道代谢来进一步提高 RAL 的吸收。

本文以 RAL 为模型药物, 对影响其口服吸收的主要理化性质溶解度、油水分配系数进行测定, 明确其 BCS 分类, 对其在 NE 成分溶解度测定、乳化剂与油之间的配伍及载药率等确定 NE 处方, 然后对 NE 质量、体内外吸收进行了评价。采用 NE 提高药物的口服吸收, 需要对药物的基本性质包括水溶性、油水分配系数进行测定, 特别是 NE 处方采用多个指标进行精心设计, 再对吸收的促进评价。本文对采用 NE 促进难溶性药物的研究开发具有一定意义。

References

- [1] Yao J, Zhou JP, Ping QN. Characteristics of nobiletin-loaded nanoemulsion and its *in vivo* distribution in mice [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2007, 42: 663-668.
- [2] Shafiq S, Shakeel F, Talegaonkar S, et al. Development and bioavailability assessment of ramipril nanoemulsion formulation [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2007, 66: 227-243.
- [3] Vyas TK, Shahiwala A, Amiji MM. Improved oral bioavailability and brain transport of saquinavir upon administration in novel nanoemulsion formulations [J]. Int J Pharm, 2008,

- 347: 93–101.
- [4] Yu H, Huang Q. Improving the oral bioavailability of curcumin using novel organogel-based nanoemulsions [J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60: 5373–5379.
- [5] Taylor P. Ostwald ripening in emulsions [J]. *Colloids Surf A*, 1995, 99: 175–185.
- [6] Capek I. Degradation of kinetically-stable o/w emulsions [J]. *Adv Colloid Interface Sci*, 2004, 107: 125–155.
- [7] Jiang HY, Wang R, Sun LJ. Effect of raloxifene on postmenopausal osteoporosis [J]. *Pract Prev Med (实用预防医学)*, 2010, 17: 551–552.
- [8] Strickler R, Stovall DW, Merritt D, et al. Raloxifene and estrogen effects on quality of life in healthy postmenopausal women: a placebo-controlled randomized trial [J]. *Obst Gynecol*, 2000, 96: 359–365.
- [9] Jeong EJ, Liu Y, Lin H, et al. Species- and disposition model-dependent metabolism of raloxifene in gut and liver: role of UGT1A10 [J]. *Drug Metab Dispos*, 2005, 33: 785–794.
- [10] Ravi PR, Aditya N, Kathuria H, et al. Lipid nanoparticles for oral delivery of raloxifene: optimization, stability, *in vivo* evaluation and uptake mechanism [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2014, 87: 114–124.
- [11] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (2015) Vol IV [S]. 2015 ed. Beijing: China Medical Science Press, 370.
- [12] Rao J, McClements DJ. Formation of flavor oil microemulsions, nanoemulsions and emulsions: influence of composition and preparation method [J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59: 5026–5035.
- [13] Anton N, Vandamme TF. Nano-emulsions and microemulsions: clarifications of the critical differences [J]. *Pharm Res*, 2011, 28: 978–985.
- [14] Lu B. *New Drug Formulation and New Technology (药物新剂型与新技术)* [M]. Beijing: People's Health Publishing House, 1998: 59–60.
- [15] Shepherd J, Packard CJ, Patsch JR, et al. Effects of dietary polyunsaturated and saturated fat on the properties of high density lipoproteins and the metabolism of apolipoprotein A-I [J]. *J Clin Invest*, 1978, 61: 1582–1592.
- [16] Khatri P, Shao J. Transport of lipid nano-droplets through MDCK epithelial cell monolayer [J]. *Colloids Surf B*, 2017, 153: 237–243.
- [17] Khatri P, Shao J. Impact of digestion on the transport of dextran-loaded self-emulsified nanoemulsion through MDCK epithelial cell monolayer and rat intestines [J]. *Int J Pharm*, 2018, 536: 353–359.
- [18] Lu YM, Chen CQ, Yang FP, et al. Determination of equilibrium solubility and apparent oil/water partition coefficient of raloxifene hydrochloride [J]. *J Guangdong Pharm Univ (广东药学院学报)*, 2014, 30: 269–273.
- [19] Rowe RC, Sheskey PJ, Weller PJ, et al. *Handbook of Pharmaceutical Excipients* [M]. 4th ed. London: Pharmaceutical Press, 2003.
- [20] Gelderblom H, Verweij J, Nooter K, et al. Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation [J]. *Eur J Cancer*, 2001, 37: 1590–1598.
- [21] Abdelbar HM, El Basset Sanad RA. Endocytic pathways of optimized resveratrol cubosomes capturing into human hepatoma cells [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 93: 561–569.
- [22] Bao H, Zhang Q, Xu H, et al. Effects of nanoparticle size on antitumor activity of 10-hydroxycamptothecin-conjugated gold nanoparticles: *in vitro* and *in vivo* studies [J]. *Int J Nanomedicine*, 2016, 11: 929–940.
- [23] Sadat SMA, Jahan ST, Haddadi A. Effects of size and surface charge of polymeric nanoparticles on *in vitro* and *in vivo* applications [J]. *J Biomater Nanobiotechnol*, 2016, 7: 91–108.
- [24] Zhang Q, He N, Zhang L, et al. The *in vitro* and *in vivo* study on self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) based on insulin-phospholipid complex [J]. *J Biomater Nanobiotechnol*, 2012, 8: 90–97.
- [25] Fischer SM, Brandl M, Fricker G. Effect of the non-ionic surfactant Poloxamer 188 on passive permeability of poorly soluble drugs across Caco-2 cell monolayers [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2011, 79: 416–422.
- [26] Land LM, Li P, Bummer PM. Mass transport properties of progesterone and estradiol in model microemulsion formulations [J]. *Pharm Res*, 2006, 23: 2482–2490.
- [27] Miller JM, Beig A, Krieg BJ, et al. The solubility-permeability interplay: mechanistic modeling and predictive application of the impact of micellar solubilization on intestinal permeation [J]. *Mol Pharm*, 2011, 8: 1848–1856.
- [28] Bibi AH, Holm R, Bauerbrandl A. Simultaneous lipolysis/permeation *in vitro* model, for the estimation of bioavailability of lipid based drug delivery systems [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2017, 117: 300–307.
- [29] Wang S, Chen K, Li L, et al. Binding between proteins and cationic spherical polyelectrolyte brushes: effect of pH, ionic strength, and stoichiometry [J]. *Biomacromolecules*, 2013, 14: 818–827.
- [30] Dembczynski R, Jankowski T. Determination of pore diameter and molecular weight cut-off of hydrogel-membrane liquid-core capsules for immunoisolation [J]. *J Biomater Sci*

- Polym Ed, 2001, 12: 1051–1058.
- [31] Stadalius MA, Ghrist BFD, Snyder LR. Predicting bandwidth in the high performance liquid chromatographic separation of large biomolecules. II. A general model for the four common high-performance liquid chromatography methods [J]. *J Chromatogr A*, 1987, 387: 21–40.
- [32] Reddy ST, Berk DA, Jain RK, et al. A sensitive *in vivo* model for quantifying interstitial convective transport of injected macromolecules and nanoparticles [J]. *J Appl Physiol*, 2006, 101: 1162–1169.
- [33] Drisko GL, Cao L, Kimling MC, et al. Pore size and volume effects on the incorporation of polymer into macro- and mesoporous zirconium titanium oxide membranes [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2009, 1: 2893–2901.
- [34] Lane ME, O'Driscoll CM, Corrigan OI. The relationship between rat intestinal permeability and hydrophilic probe size [J]. *Pharm Res*, 1996, 13: 1554–1558.
- [35] Garg B, Beg S, Kaur R, et al. Long-chain triglycerides based self-nanoemulsifying oily formulations (SNEOFs) of darunavir with improved lymphatic targeting potential [J]. *J Drug Target*, 2018, 26: 252–266.
- [36] Murota K, Cermak R, Terao J, et al. Influence of fatty acid patterns on the intestinal absorption pathway of quercetin in thoracic lymph duct-cannulated rats [J]. *Br J Nutr*, 2013, 109: 2147–2153.
- [37] Imada C, Takahashi T, Kuramoto M, et al. Improvement of oral bioavailability of N-251, a novel antimalarial drug, by increasing lymphatic transport with long-chain fatty acid-based self-nanoemulsifying drug delivery system [J]. *Pharm Res*, 2015, 32: 2595–2608.
- [38] Tran TH, Poudel BK, Marasini N, et al. Preparation and evaluation of raloxifene-loaded solid dispersion nanoparticle by spray-drying technique without an organic solvent [J]. *Int J Pharm*, 2013, 443: 50–57.