

达比加群酯纳米乳的制备及体外评价

张雅捷¹, 刘晓庆², 陈敏², 柴夫娟¹, 郑春丽^{1*}, 刘建平^{1**}(¹中国药科大学药剂学教研室, 南京 210009; ²上海市浦东新区周浦医院药剂科, 上海 201318)

摘要 为改善难溶弱碱性药物达比加群酯的生物利用度, 制备达比加群酯水包油型纳米乳并对其进行体外质量评价。通过测定达比加群酯在油性溶媒中的溶解度和绘制伪三元相图筛选出油相、乳化剂和助乳化剂; 在此基础上以粒径和稳定性为评分指标, 采用正交试验设计进一步优化达比加群酯纳米乳的处方和工艺。对达比加群酯纳米乳的形态、粒径、Zeta 电位、包封率和稳定性进行考察。实验结果为: 达比加群酯纳米乳系统为油酸/中链甘油三酯/聚氧乙烯氢化蓖麻油/乙二醇单乙基醚/水; 该纳米乳的粒径为 (57.5 ± 0.2) nm、电位为 $-(20.9 \pm 1.4)$ mV、包封率为 $(85.2 \pm 1.0)\%$, 且在室温下储存 3 个月后, 其粒径、稳定常数和药物含量均未发生显著变化。结果表明: 通过处方和工艺的优化后, 可制备得到澄清透明、粒径均一、稳定性良好的达比加群酯纳米乳, 这为提高达比加群酯及其他难溶碱性药物的生物利用度提供了新的研究思路。

关键词 达比加群酯; 纳米乳; 伪三元相图; 正交设计; 难溶弱碱性药物; 体外评价

中图分类号 R944 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2016)06-0688-06

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20160610

引用本文 张雅捷, 刘晓庆, 陈敏, 等. 达比加群酯纳米乳的制备及体外评价[J]. 中国药科大学学报, 2016, 47(6):688-693.

Cite this article as: ZHANG Yajie, LIU Xiaoqing, CHEN Min, et al. Preparation and *in vitro* evaluation of dabigatran etexilate nanoemulsion[J]. *J China Pharm Univ*, 2016, 47(6):688-693.

Preparation and *in vitro* evaluation of dabigatran etexilate nanoemulsionZHANG Yajie¹, LIU Xiaoqing², CHEN Min², CHAI Fujuan¹, ZHENG Chunli^{1*}, LIU Jianping^{1**}¹Department of Pharmaceutics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009;²Department of Pharmacy, Shanghai Pudong New District Zhoupu Hospital, Shanghai 201318, China

Abstract The purpose of this study was to prepare dabigatran etexilate nanoemulsion to improve bioavailability of dabigatran etexilate, a poorly water-soluble drug. The physicochemical properties and the stability of dabigatran etexilate nanoemulsion were investigated. Equilibrium solubility of dabigatran etexilate in commonly used oil materials for nanoemulsion were determined for selection. Then, surfactant and co-surfactant were chosen based upon the plotted pseudo-ternary diagrams. The formulation and preparation process were further optimized with orthogonal design. As a result, the dabigatran etexilate nanoemulsion was formulated based on the system consisting of Oil Acid/Labrafac Lipophile WL1394/Cremophor RH40/Transcutol P/H₂O. The dabigatran etexilate nanoemulsion was found to have a mean diameter of (57.5 ± 0.2) nm, Zeta potential of $-(20.9 \pm 1.4)$ mV, and the drug encapsulation efficiency of $(85.2 \pm 1.0)\%$. Besides, the droplet size, stability constant and drug content of the nanoemulsion was found to have no significant changes in at least 3 months under room temperature. In conclusion, the uniform and stable dabigatran etexilate nanoemulsion with a clear and translucent appearance was obtained after the optimization of formulation and preparation process. Thus nanoemulsion could be a promising way for the improvement of bioavailability of dabigatran etexilate and other poorly water-soluble drugs.

Key words dabigatran etexilate; nanoemulsion; pseudo-ternary diagrams; orthogonal design; weakly basic drug;

收稿日期 2016-01-14 通信作者 * Tel:13337828767 E-mail: clz3330@yahoo.com.cn

** Tel:025-83271316 E-mail: liujianpinglj@hotmail.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 81402878); 中央高校基本科研业务项目资助项目(No. 2015PT050); 上海浦东新区科技发展基金资助项目(No. PKJ2015-Y41)

in vitro evaluation

The study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81402878); the Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. 2015PT050); and the Science and Technology Development Funds of Pudong New Area in Shanghai (No. PKJ2015-Y41)

达比加群酯(dabigatran etexilate, DE)是一种新型合成的直接凝血酶抑制剂,是达比加群的前体药物,属于非肽类的凝血酶抑制剂^[1]。市售制剂为德国勃林格殷格翰公司开发的达比加群酯胶囊(商品名:Pradaxa),于 2008 年先在德国和英国上市,2010 年获得 FDA 批准,用于人工关节置换术后并发深静脉血栓形成和肺动脉栓塞。与华法林相比,DE 具有起效快,疗效强,半衰期长,无需特殊用药监测,药物相互作用少等优点,具有良好的临床应用前景^[2-3]。然而,DE 是典型的难溶弱碱性药物,在水中的溶解度仅有 0.83 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ^[4],且溶解度会随 pH 升高而迅速下降。难溶弱碱性药物的特点使 DE 在胃肠道传递中容易结晶析出,从而很难被小肠吸收^[5]。DE 市售制剂为酒石酸颗粒,虽利用酒石酸来提高 DE 的溶解度,但由于酒石酸增溶有限且容易消散到外介质中,大部分 DE 在肠中仍会结晶析出,导致其生物利用度仅为 3%~7%^[6]。因此,如何提高生物利用度已成为 DE 以及其他难溶弱碱性药物的制剂学研究的重要课题^[7]。

纳米乳是提高生物利用度的重要手段之一。一方面,纳米乳对难溶性药物有较强的增溶能力,可增加载药量和稳定性,且难溶弱碱性药物包封在纳米乳的油相中也可减少因胃肠道环境 pH 的改变而引起的药物析出^[8],促进药物吸收;另一方面纳米乳对胃肠道淋巴组织具有良好的亲和性,口服后可经淋巴系统吸收,从而避免了首过效应,而且纳米乳也易透过胃肠道水化层,使包裹在其中的药物直接和胃肠道细胞接触,从而促进药物吸收^[9-10]。因此,本研究制备了 DE 纳米乳,通过 DE 溶解度测定、绘制为三元相图以及正交试验的方法筛选并优化处方和制备工艺,并对 DE 纳米乳的形态、粒径等理化性质以及稳定性进行考察。

1 材 料

1.1 药品与试剂

达比加群酯(纯度 99.8%,上海谱振生物科技有限公司);油酸(南京化学试剂有限公司);中链

甘油三酯(LabrafacTM Lipophile WL1394, MCT)、单亚油酸甘油酯(MaisineTM 35-1)、辛酸癸酸聚乙二醇甘油酯(Labrasol[®])、单油酸甘油酯(PeceolTM)、月桂酸聚乙二醇-32 甘油酯(Gelucire[®] 44/14)、乙二醇单乙基醚(Transcutol P)(法国 Gattefosse 公司);聚氧乙烯氢化蓖麻油(Cremophor[®] RH40,德国 BASF 公司);肉豆蔻酸甘油三酯(isopropyl myristate, IPM, 国药集团化学试剂有限公司);烷基酚聚氧乙烯醚(OP-10)、聚乙二醇 400(PEG400)(上海凌峰化学试剂有限公司);其余试剂均为市售分析纯。

1.2 仪 器

UV-2102PC 紫外分光光度计(上海尤尼柯仪器有限公司);BS124S 精密电子天平(德国 Sartorius 仪器有限公司);Optima L-80XP 超速离心机(美国贝克曼库尔特有限公司);Zetasizer Nano ZS 激光粒子测定仪(英国马尔文公司)。

2 方 法

2.1 DE 纳米乳的制备

2.1.1 DE 在油性溶媒中的平衡溶解度测定 过量 DE,加入到常用的油相、乳化剂和助乳化剂 1 mL 中超声溶解并涡旋,然后置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、100 r/min 的恒温水浴振荡器中振摇 48 h,取出,7 000 r/min 离心 10 min 后取上清用乙醇稀释一定倍数,采用 UV 测定 DE 含量,初步筛选出 DE 纳米乳的油相、乳化剂和助乳化剂。

2.1.2 伪三元相图绘制 先将乳化剂和助乳化剂按照质量比(K_m)1:1 混合均匀得到混合物(S_{mix}),再与油相按照质量比 1:9、2:8、3:7、4:6、5:5、6:4、7:3、8:2、9:1 混匀,室温搅拌逐滴加蒸馏水,观察体系的外观变化,以形成澄清透明或半透明的带淡蓝色乳光的溶液作为纳米乳形成的临界点,记录临界点时各组分的百分比。以 S_{mix} 、油相、水分别作为 3 个顶点,3 条边各为相应两组分的比例关系,绘制伪三相图^[11],考察乳化剂和助乳化剂种类对三相图中乳化区域的影响。然后,固定油相、乳化剂和助乳化剂,分别选择 K_m 为 3:1、2:1、1:1、1:2,用蒸

馏水滴定,绘制伪三元相图,考察 K_m 对乳化区域的影响。

2.1.3 正交试验设计优化处方与工艺 精密称取适量 DE,加入油相、乳化剂和助乳化剂的均匀混合液中,超声溶解并搅拌均匀,然后逐滴加入蒸馏水中磁力搅拌进行乳化,即得到 DE 纳米乳。选择影响 DE 纳米乳制备的 4 个因素:投药量(DE 占油相与 S_{mix} 混合液的百分比)、油相比比例(以油相和 S_{mix} 混合液为 100%)、乳化温度、搅拌速度,每个因素取 3 水平,按照 $L_9(3^4)$ 正交试验表进行处方工艺优化。以 DE 纳米乳粒径和稳定常数(K_e)为评价指标,对每个指标进行评分。其中,粒径在 50 nm 以内为 5 分,每增加 10 nm 减 0.2 分;稳定常数 $K_e \leq 15\%$ 为 5 分,每增加 3% 减 0.2 分。然后将各指标得分相加得总分^[12]。

2.2 DE 纳米乳的理化性质

2.2.1 形态、粒径与电位 按照最处方和工艺制备 DE 纳米乳,用去离子水稀释后,再用 3% 磷钼酸染色,于透射电子显微镜下观察纳米乳的具体形态并拍照。取 DE 纳米乳,用去离子水稀释 100 倍,用马尔文激光粒度仪分别测定粒径和 Zeta 电位,每个样品测定 3 次并计算均值。

2.2.2 包封率测定 制备 DE 纳米乳 5 批,将 DE 纳米乳 0.2 mL 分别加于葡聚糖凝胶微柱上端,然后将微柱放于 10 mL 离心管中以 2 500 r/min 离心 5 min,取出,继续加蒸馏水 0.2 mL,再以 2 500 r/min 离心 5 min,收集离心管中微柱洗脱下来的带乳光部分,用乙醇破乳后测 DE 的含量,计算包封率^[13]。

2.2.3 稀释对粒径的影响 取 DE 纳米乳,分别以 HCl(pH 1.2)、HCl(pH 2.0)、HCl(pH 3.0)、PBS(pH 4.0)、PBS(pH 6.86)、蒸馏水为稀释介质,将 DE 纳米乳稀释 100 倍测定粒径。同时,以蒸馏水为稀释介质,将 DE 纳米乳分别稀释 10、50、100、200、250 倍,测定粒径。

2.3 DE 纳米乳的稳定性考察

将 DE 纳米乳密封于西林瓶后分别置于室温(25 ℃)、高温(60 ℃)、强光照(4 500 lx)条件下放置。将室温条件下放置的 DE 纳米乳分别于第 1 个月(30 d)和 3 个月(90 d)取样,将高温和强光照条件下放置的 DE 纳米乳分别于第 5 天和第 10 天取样,测定其粒径、DE 含量和稳定常数并记录,与第 0 天时进行比较。

其中,DE 含量的测定采用 UV 法于 315 nm 波长下进行测定,并将测得的吸收度 A 代入回归方程 $A = 0.035 1c + 0.054 2$ 中计算 DE 含量(该方法精密度与准确度高且在 4 ~ 20 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度范围内 DE 的浓度与吸收度线性良好, $r = 0.999 3$)。

其中,DE 纳米乳稳定常数 K_e 的测定方法^[14]为:将 DE 纳米乳于 4 000 r/min 离心 15 min,刺破管底并收集 1 mL,将收集液和离心前 DE 纳米乳用去离子水均稀释 100 倍后于 500 nm 处测离心前后的吸收度 A_0 和 A ,按公式(1)计算 K_e 。

$$K_e = \frac{(A_0 - A)}{A_0} \times 100\% \quad (1)$$

3 结果

3.1 DE 纳米乳的处方与工艺的确定

3.1.1 油相的确定 由 DE 的平衡溶解度测定结果(图 1)可知,在常用油相中,油酸对 DE 溶解能力最强。此外,油酸本身也有一定的促进药物吸收的作用^[15]。因此,初步选择油酸为油相。但是,在油酸与其他乳化剂及助乳化剂配伍时发现,油酸和其他乳化剂及助乳化剂的配伍效果并不好。这可能是因为油酸是一种长链脂肪酸,其较长的烃链结构导致纳米乳难以形成。当选择容易乳化的中链甘油三酯(Labrafac™ Lipophile WL1394, MCT)和油酸以 1:1 配合作为混合油相后发现,混合油相和其他乳化及助乳化剂的配伍效果明显改善。因此,选择 MCT 和油酸配合作为油相。

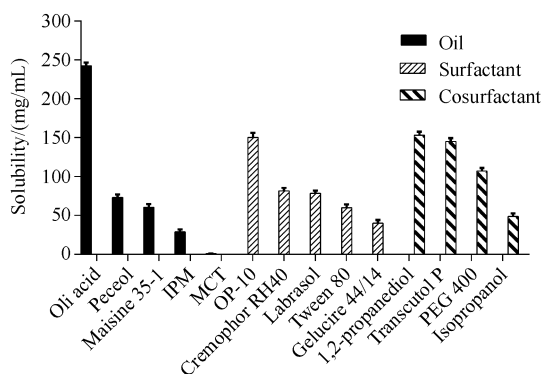


Figure 1 Equilibrium solubility of dabigatran etexilate (DE) in oil materials ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

IPM: Isopropyl; MCT: Middle chain triglyceride

3.1.2 乳化剂、助乳化剂及 K_m 对 DE 纳米乳的乳化区域的影响 由 DE 平衡溶解度测定结果(图 1),初步选择 OP-10 和 RH40 分别作为乳化剂,1,

2-丙二醇和 Transcutol P 分别作为助乳化剂绘制伪三相图。从伪三相图(图 2)可以看出,以 RH40 为乳化剂,以 Transcutol P 为助乳化剂时形成的纳米乳乳化区域更大,说明纳米乳体系稳定性更好一些。因此,最终选择 RH40 和 Transcutol P 分别作

为 DE 纳米乳给药系统的乳化剂和助乳化剂。其次,由图 3 可以看出,乳化区域随着 K_m 增大而增大,当 K_m 为 3:1 时,所形成的纳米乳区面积最大。但是,考虑到大量乳化剂会对胃肠道的刺激性^[16],选择乳化剂与助乳化剂的质量比 K_m 为 2:1。

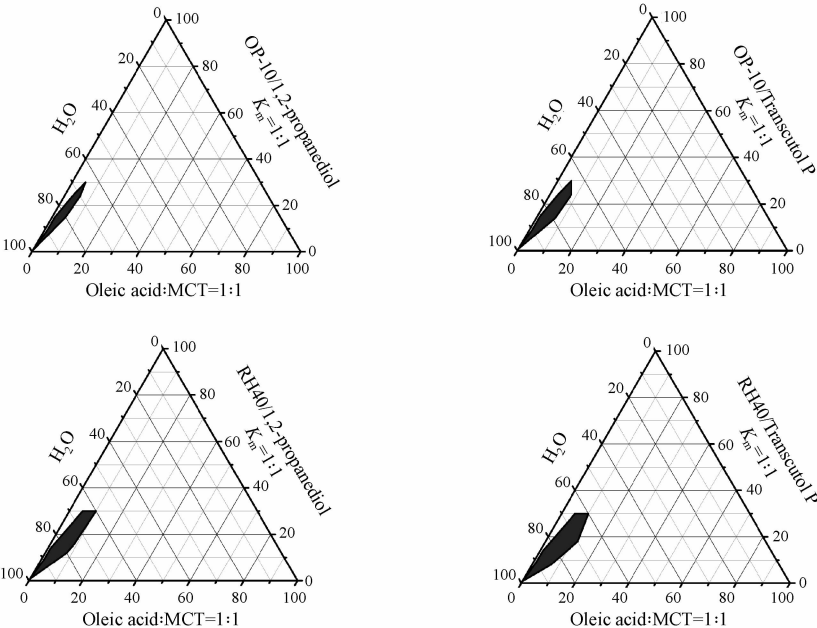


Figure 2 Pseudo-ternary diagrams with different surfactants

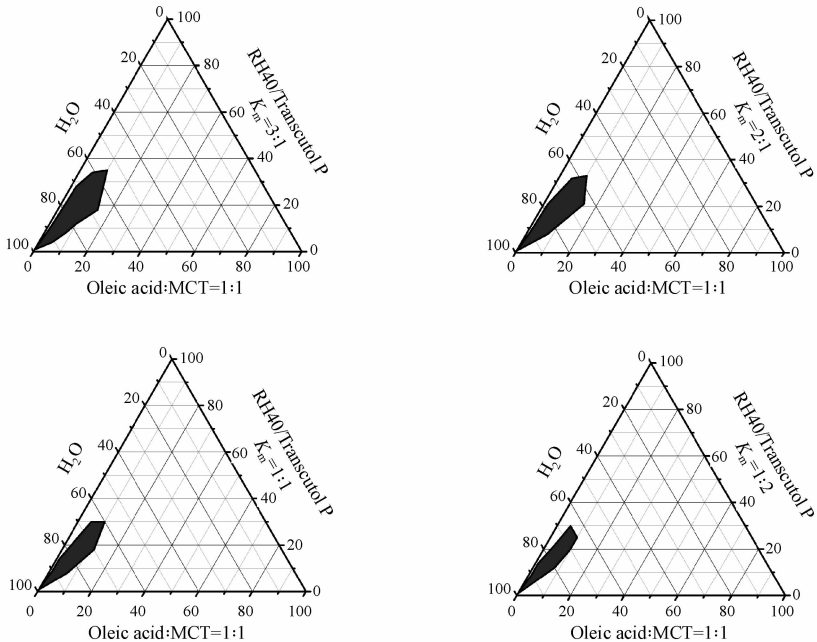


Figure 3 Pseudo-ternary diagrams with different cosurfactants

3.1.3 处方工艺的优化结果 由正交试验的直观分析结果得到,以上 4 个因素对 DE 纳米乳制备的影响由大到小依次为:载药比例、油相比例、乳化温

度、搅拌速度。最佳处方工艺为:载药比例为 1%、油相比例为 40% (以油相和 S_{mix} 混合液为 100%)、乳化温度为 37 ℃、搅拌速度为 200 r/min。由方差

分析结果得到,载药比例和油相比比例对纳米乳制备过程影响显著,乳化温度和搅拌速度没有显著影响。

3.2 DE 纳米乳的理化性质表征

3.2.1 形态、粒径与电位 DE 纳米乳外观为澄清透明带淡蓝色乳光的液体,流动性好。由透射电镜图(图 4)可以看出,DE 纳米乳呈圆球形,粒径分布均匀。激光粒度仪测定粒径的结果显示,纳米乳的平均粒径为 (57.5 ± 0.2) nm,多分散系数(PDI)为 (0.189 ± 0.006) ,纳米乳粒度分布较窄,分布均匀。DE 纳米乳电位为 $-(20.9 \pm 1.4)$ mV,表明该体系稳定,不易发生粒子聚集现象。

3.2.2 包封率 微柱离心法测定包封率的结果表明,DE 纳米乳对 DE 的包封率约为 $(85.2 \pm 1.0)\%$,这说明大部分 DE 存在于纳米乳的内相之中。对于溶解度具有显著 pH 依赖性的 DE 而言,DE 纳米乳将 DE 包封于乳滴中可以减少外界介质 pH 对 DE 的溶解性的影响,从而能减少 DE 在介质 pH 较高的小肠中的析出,进而促进 DE 的小肠吸收。此外,由于纳米乳本身具有促进淋巴吸收的作

用,DE 纳米乳对 DE 包封率高也可使更多 DE 通过淋巴吸收进入体循环。

3.2.3 不同稀释介质和稀释倍数对粒径的影响 稀释介质和稀释倍数对纳米乳粒径的影响见图 5。由图可知,不同 pH 的稀释介质和稀释倍数对 DE 纳米乳的粒径的影响均不明显,也表明 DE 纳米乳在适当的稀释介质和稀释体积下是一个比较稳定的给药体系。

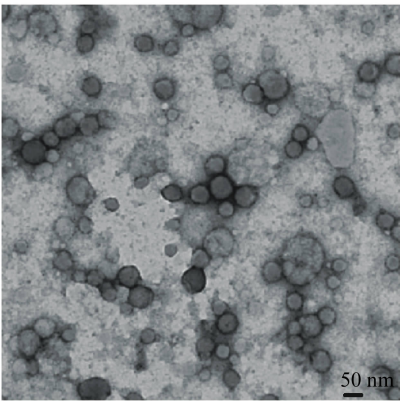


Figure 4 TEM image of dabigatran etexilate nanoemulsion

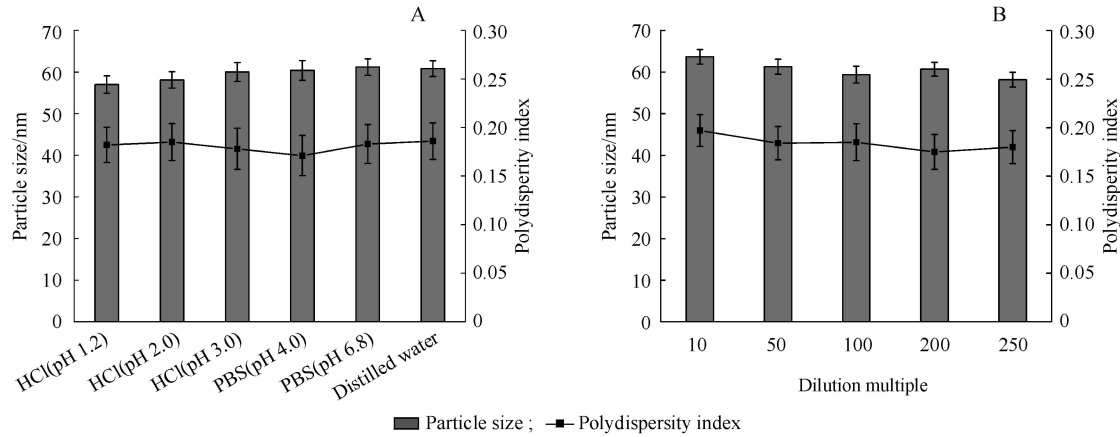


Figure 5 Effect of dilution medium (A) and dilution multiple (B) on particle size of dabigatran etexilate nanoemulsion ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.3 稳定性考察

由 DE 纳米乳在不同条件下的稳定性考察结果(表 1)可知,DE 纳米乳在室温下储存 3 个月(90 d),其粒径、稳定常数和 DE 含量基本未发生变化。在高温和强光照的剧烈条件下,DE 纳米乳在第 10 天出现了粒径增大、稳定性和 DE 含量略有下降的现象,表明纳米乳体系对 DE 有一定的保护作用,但为了避免 DE 析出和降解,应尽量在室温避光条件下储存。

Table 1 Stability of dabigatran etexilate nanoemulsion ($\bar{x} \pm s, n = 3$)				
Factor	t/d	Particle size/nm	$K_e/\%$	Content/ $\%$
60 °C	0	57.5 ± 0.2	16.9 ± 1.0	99.87 ± 0.12
	5	61.9 ± 0.7	21.1 ± 2.4	98.9 ± 1.0
	10	69.4 ± 0.5	30.7 ± 2.2	98.1 ± 1.3
4 500 lx	5	63.1 ± 0.4	22.5 ± 2.3	98.2 ± 0.8
	10	72.7 ± 0.2	34.1 ± 1.5	97.7 ± 1.9
25 °C	30	58.1 ± 1.0	17.7 ± 1.6	99.63 ± 0.07
	90	61.0 ± 0.3	19.6 ± 1.8	99.4 ± 0.5

4 讨论

通过对DE纳米乳的处方和制备工艺进行筛选和优化制备了DE纳米乳,在处方筛选中,不同的油相对DE的溶解性能有显著差别;不同的乳化剂、助乳化剂和 K_m 对DE纳米乳的乳化区域也有显著影响。筛选结果中油相由油酸和MCT以1:1混合组成,乳化剂和助乳化剂分别是RH40和Transcutol P。在处方的正交优化实验中,DE纳米乳的粒径和稳定性受处方中油相比比例、载药比例和乳化温度的影响比较显著。优化后的条件中油相比比例为40%,载药比例为1%,乳化温度为37℃。按照最优的处方和工艺可以制备可得到平均粒径(57.5 ± 0.2) nm,平均包封率(85.2 ± 1.0)%的DE纳米乳。

本研究将难溶弱碱性药物DE包裹在纳米乳中,成功制备了澄清透明、粒径均一、稳定性好的DE纳米乳,为提高DE的生物利用度奠定了基础,也为提高其他难溶弱碱性药物的生物利用度提供了研究思路。本研究将对DE纳米乳的体内转运过程和体内药代动力学作进一步研究。

参考文献

- [1] Bassiouny M, Saliba W, Rickard J, et al. Use of dabigatran for periprocedural anticoagulation in patients undergoing catheter ablation for atrial fibrillation[J]. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 2013, **6**(3):460–466.
- [2] Ishikawa T, Matsunaga N, Tawada H, et al. TAK-599, a novel N-phosphono type prodrug of anti-MRSA cephalosporin T-91825: synthesis, physicochemical and pharmacological properties[J]. *Bioorg Med Chem*, 2003, **11**(11):2427–2437.
- [3] Bellamy L, Rosenthal N, Eriksson BI. Adherence to a new oral anticoagulant treatment prescription: dabigatran etexilate[J]. *Patient Prefer Adherence*, 2009, **3**:173–177.
- [4] Moreno GG, Salvatierra AA, Martin-Piedra MA, et al. Dabigatran and rivaroxaban, new oral anticoagulants. New approaches in Dentistry[J]. *J Clin Exp Dent*, 2010, **2**(1):1–5.
- [5] Yang M, He S, Fan Y, et al. Microenvironmental pH-modified solid

- dispersions to enhance the dissolution and bioavailability of poorly water-soluble weakly basic GT0918, a developing anti-prostate cancer drug: preparation, characterization and evaluation *in vivo* [J]. *Int J Pharm*, 2014, **475**(1/2):97–109.
- [6] Wang XR, Liu P, Wang SH, et al. Influence of pH on dissolution and oil-water partition coefficient of dabigatran etexilate[J]. *Chin New Drugs J*(中国新药杂志), 2013, **22**(24):2933–2937.
 - [7] Carlert S, Lennernäs H, Abrahamsson B. Evaluation of the use of classical nucleation theory for predicting intestinal crystalline precipitation of two weakly basic BCS class II drugs[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2014, **53**(1):17–27.
 - [8] Stillhart C, Dürr D, Kuentz M. Toward an improved understanding of the precipitation behavior of weakly basic drugs from oral lipid-based formulations[J]. *J Pharm Sci*, 2014, **103**(4):1194–1203.
 - [9] Yang PF, Chen WD. Research progress of nanoemulsion applications in improving the bioavailability of poor water-soluble drugs[J]. *Chin Pharm J*(中国药理学杂志), 2013, **48**(15):1238–1244.
 - [10] Yao J, Lu Y, Zhou JP, et al. Preparation of nobiletin-loaded self-microemulsifying system and its absorption kinetics in rat intestines[J]. *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 2007, **38**(1):35–38.
 - [11] Hu L, Wu H, Niu F, et al. Design of fenofibrate microemulsion for improved bioavailability[J]. *Int J Pharm*, 2011, **420**(2):251–255.
 - [12] Li JL, Zheng CL, Liu JP, et al. Formulation and process optimization of doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles and its *in vitro* release[J]. *Acta Pharm Sin*(药科学报), 2013, **48**(5):759–766.
 - [13] Liu Y, Tao SY, Guo WY. Determination of entrapment efficiency of oxaliplatin liposomes by sephadex microcolumn combined with HPLC[J]. *China J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2014, **1**(31):74–77.
 - [14] He SN. Preparation and characterization of docetaxel phospholipid complex submicron emulsion[J]. *Chin J Pharm*(中国药理学杂志), 2010, **8**(1):9–16.
 - [15] Zhao X, Liu JP, Zhu JB. Transdermal absorption and pharmacokinetics of theophylline microemulsion[J]. *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 2006, **37**(1):28–32.
 - [16] Chen J, Li B, Wu DW, et al. Preparation and evaluation of docetaxel nanoemulsion[J]. *Chin Pharm J*(中国药理学杂志), 2010, **45**(7):534–538.