文章编号:1000-5404(2014)22-2263-04

论著

和厚朴酚自微乳结冷胶钙微丸的制备及其特性研究

甘 露[1],田 睿[2],贾运涛[3],郭 锋[1],邓 萍[1],张良珂[1] (400016 重庆,重庆医科大学:药物高校工程研究中心和生物化学与分子药理学重点实验室[1],实验教学中心[2];400010 重庆,重庆医科大学附属儿童医院药剂科[3])

[摘要] **目的** 制备载和厚朴酚自微乳结冷胶钙微丸(calcium-gellan beads containing honokiol self-microemulsifying drug delivery system, GB-HSMEDDS),研究其特性。**方法** 采用离子凝胶法制备 GB-HSMEDDS,以包封率为指标,单因素实验考察结冷胶浓度、钙离子浓度、交联时间、投药量对药物包封率的影响,对优化后的微丸在 HCl(pH 1.2)及 PBS(pH 6.8)溶液中的溶胀及释放特性进行研究。**结果** 通过优化,选取结冷胶浓度为 1.25%,$CaCl_2$ 浓度 8%,和厚朴酚自微乳化给药系统(self-microemulsifying drug delivery system, SMGDDS)与结冷胶溶液质量比(g/g)为 0.15,交联时间 15 min 为制备条件,包封率为(64.0±2.8)%,微丸在 PBS 中的溶胀度大于在 HCl 溶液中的,药物在 HCl 溶液中 2 h 的累积释放超过 50%,而在 PBS 中的不足 20%。**结论** 成功制备了含和厚朴酚 SMEDDS 的结冷胶钙微丸,有望成为 SMEDDS 固体化的良好载体。

[关键词] 和厚朴酚;自微乳给药系统;结冷胶钙微丸;固体化
[中图法分类号] R282.71;R943;R944.9 [文献标志码] A

Preparation and characterization of calcium-gellan beads containing honokiol self-microemulsifying drug delivery system

Gan Lu[1], Tian Rui[2], Jia Yuntao[3], Guo Feng[1], Deng Ping[1], Zhang Liangke[1] ([1]Medicine Engineering Research Center, Chongqing Key Laboratory of Biochemical & Molecular Pharmacology, [2]Experimental Teaching Center, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [3]Department of Pharmacy, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the preparation and characterization of calcium-gellan beads containing honokiol self-microemulsifying drug delivery system (GB-HSMEDDS). **Methods** GB-HSMEDDS were prepared by ionotropic gelation. With the encapsulation efficiency as indicators, the concentration of gellan gum and Ca^{2+}, cross-linking time and amount of added drug were selected as variables for single-factor experiment design. The swelling and release characteristics of the beads at pH 1.2 and 6.8 were investigated. **Results** The optimal preparation method included: gellan gum concentration 1.25%, $CaCl_2$ concentration 8%, the weight ratio of honokiol microemulsifying drug delivery system (SMEDDS) to gellan gum solution 0.15, and the cross-linking time 15 min. The encapsulation efficiency of GB-HSMEDDS was (64.0±2.8)%. The swelling degree of GB-HSMEDDS in PBS was greater than those in HCl solution. The cumulative release of honokiol was more than 50% in HCl solution but less than 20% in PBS for 2 h. **Conclusion** We successfully prepare gellan gum beads containing honokiol SMEDDS, a good carrier for producing solid SMEDDS.

[**Key words**] honokiol; SMEDDS; calcium-gellan beads; solidification

[基金项目] 重庆市自然科学基金(CSTC2012jjA10021);高等学校博士学科点专项科研基(20125503120003);重庆市卫生局医学科研项目(2013-2-060);重庆医科大学大学生科研与创新实验项目(201432, 201244, 201217);重庆市教育委员会科学技术研究项目(KJ120307);海扶之星学生科研基金项目(XS201309)
[通信作者] 张良珂, E-mail:zlkdyx@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140930.1159.016.html(2014-09-30)

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2012jjA10021), the Research Fund for Doctoral Program of Higher Education of China (20125503120003), the Project of Medical Scientific Research of Chongqing Municipal Health Bureau (2013-2-060), the Students' Research and Innovation Experimental Project of Chongqing Medical University (201432, 201244, 201217), the Scientific and Technological Research Program of Chongqing Municipal Education Commission (KJ120307) and the Students' Scientific Research Fund of "Star of HIFU" (XS201309). Corresponding author: Zhang Liangke, E-mail: zlkdyx@126.com

厚朴为我国的传统中药,和厚朴酚为厚朴中的有效成分之一,研究表明和厚朴酚单体在抗菌、抗炎和抗肿瘤[1-3]方面有良好的效果,因此将其开发成临床用药的潜力很大。

自微乳化给药系统(self-microemulsifying drug delivery system,SMEDDS),由油、表面活性剂、助表面活性剂和药物构成[4],能显著提高难溶性药物的溶解度,并且遇水能自发形成粒径在100 nm以内的乳滴,但由于其为液体给药系统,在稳定性、贮藏时间、药物携带等方面不及固体制剂,人们对液态自微乳给药系统进行了进一步改进,通过添加固体材料,制备成固体自微乳化给药系统,比如自微乳化微丸、微球和片剂等[5-6]。

结冷胶是一种高分子线性多糖,分子主链由重复的四糖单元组成。参与形成四糖单元的单糖依次为β(1→3)-D-葡萄糖、β(1→4)-D-葡萄糖醛酸、β(1→4)-D-葡萄糖、α(1→4)-L-鼠李糖[7]。在Ca^{2+}、Mg^{2+}、Zn^{2+}、Ba^{2+}等阳离子的诱导下,结冷胶在水中可由双螺旋结构进一步形成三维网状结构,形成凝胶。结冷胶安全性高,在较低浓度下即能形成凝胶,因此具有良好的应用前景。

本研究拟将自微乳给药系统与结冷胶结合,将难溶性药物和厚朴酚制备成自微乳给药系统,提高其在水中的溶解度,然后将其包裹入结冷胶钙微丸,以实现液态自微乳的固体化,以期为制剂开发和临床研究提供一定的基础,并对其制备工艺和体外释药特性进行考察。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器 AR 2140精密电子天平(美国OHAUS公司),HZ-881S台式水浴恒温振荡器(江苏太仓市实验设备厂),UV-3150紫外分光光度计(日本岛津公司),集热式恒温加热磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限责任公司),台式离心机(上海安亭科学仪器厂),电热鼓风干燥箱(重庆试验设备厂)。

1.1.2 试药 和厚朴酚(Honokiol,西安小草植物科技有限公司),结冷胶(郑州仁恒化工产品有限公司),无水氯化钙(江苏强盛化工有限公司),辛癸酸甘油酯(MCT,浙江省建德市千岛精细化工实业有限公司),聚氧乙烯氢化蓖麻油(Cremophor RH40,德国BASF),二乙二醇单乙基醚(Transcutol P,法国佳法赛),其余试剂均为分析纯。

1.2 和厚朴酚SMEDDS的制备

按质量比为20∶53.3∶26.7分别称取MCT、Cremophor RH40、Transcutol P共1 g,和厚朴酚100 mg,于37 ℃恒温搅拌得澄明溶液,得和厚朴酚SMEDDS[8]。

1.3 和厚朴酚自微乳结冷胶钙微丸(calcium-gellan beads containing honokiol self-microemulsifying drug delivery system, GB-HSMEDDS)的制备

将适量的结冷胶溶解于双蒸水中,制成不同浓度结冷胶溶液,按不同质量比(g/g)加入SMEDDS,搅匀后,用一次性注射器吸入,使用针头滴入不同浓度的$CaCl_2$溶液中,交联不同时间,漏斗过滤,并用双蒸水洗涤3次,放入干燥箱,40 ℃干燥2 h。

1.4 包封率的测定

取一定量的干燥GB-HSMEDDS置于研钵中,加入无水乙醇,研碎并定容,浸泡12 h后,3 000 r/min离心15 min,取上清液经稀释后在294 nm处测定含量。包封率=实际含药量/投药量×100%。

1.5 GB-HSMEDDS的处方优化

以包封率为指标,结冷胶浓度(A)、氯化钙浓度(B)、和厚朴酚SMEDDS与结冷胶溶液的质量比(C,g/g)、交联时间(D)为变量,采用单因素实验设计优化处方。实验设计见表1。

表1 单因素考察表

处方	A(%)	B(%)	C	D(min)
1	1.25	8	0.15	5
2	1.25	8	0.15	15
3	1.25	8	0.15	30
4	1.25	8	0.15	45
5	1.25	2	0.15	15
6	1.25	4	0.15	15
7	1.25	8	0.15	15
8	1.25	16	0.15	15
9	1.25	8	0.05	15
10	1.25	8	0.10	15
11	1.25	8	0.15	15
12	1.25	8	0.20	15
13	0.50	8	0.15	15
14	1.00	8	0.15	15
15	1.25	8	0.15	15
16	1.50	8	0.15	15

A:结冷胶浓度;B:氯化钙浓度;C:和厚朴酚SMEDDS与结冷胶溶液的质量比;D:交联时间

1.6 溶胀特性研究

称取干燥后的空白及含药微丸,分别放入装有10 mL pH 1.2的HCl和pH 6.8的PBS的烧杯中,以37 ℃,100 r/min恒温振荡,分别于0.25、0.5、1、2、4、6、8 h取出,并用滤纸吸干表面水分后称重,溶胀度按下式进行计算:S = Wt/ Wo[9]。式中Wo:微丸初始质量;Wt:不同时刻微丸的质量。

1.7 释放曲线

取一定质量的GB-HSMEDDS置于50 mL的pH 1.2的HCl和pH 6.8的PBS中,37 ℃恒温振荡,转数设为100 r/min,分别于0.25、0.5、1、2、4、6、8 h取样,并补充相同体积的释放介质,离心后取上清液测定。

1.8 GB-HSMEDDS的体外释药机制的分析

应用零级动力学模型、一级动力学模型、Higuchi模型、Hixson-Crowell模型和Ritger-Peppas模型对GB-HSMEDDS的体外释药数据进行拟合,计算模型的释药参数和相关系数。

2 结果

2.1 制备工艺对包封率的影响

2.1.1 交联时间 当交联时间为5、15、30 min和45 min时,包封率分别为(52.6 ± 2.8)%、(64.0 ± 2.8)%、(60.5 ± 0.2)%、(50.8 ± 1.3)%。随着交联时间的增加,GB-HSMEDDS包封率有所下降,因此交联时间以15 min为宜。

2.1.2 离子浓度 当离子浓度为2%、4%、8%和16%时,包封率分别为(57.1 ± 0.2)%、(60.2 ± 0.6)%、(64.0 ± 2.8)%、(80.7 ± 0.9)%。随着$CaCl_2$浓度的增加,GB-HSMEDDS包封率随之增加,但$CaCl_2$为16%时,干燥后所形成的GB-HSMEDDS流动性差,结构松软,易粘黏,故选择8%为$CaCl_2$浓度。

2.1.3 结冷胶溶液与SMEDDS的质量比 当两者质量比为0.05、0.10、0.15和0.20时,包封率分别为(53.7 ± 2.8)%、(50.5 ± 2.0)%、(64.0 ± 2.8)%、(55.3 ± 3.0)%。随着SMEDDS质量增加,包封率先增加后减小,比值为0.15时最大,SMEDDS质量再增加时,由于结冷胶所占比重少,造成凝胶的通透性增加,微乳扩散,导致包封率降低。故结冷胶溶液与SMEDDS的质量比选择0.15较佳。

2.1.4 结冷胶浓度 当结冷胶浓度为1%、1.25%和1.5%时,包封率分别为(49.2 ± 0.8)%、(64.0 ± 2.8)%、(56.1 ± 4.4)%。当结冷胶浓度为0.5%时,干燥后的GB-HSMEDDS无固定形态,推测是由于结冷胶浓度过低,与Ca^{2+}交联所形成凝胶的强度小,干燥除去水分后,结构松散。当结冷胶浓度增加到1.5%时,包封率有所下降,可能是交联太强,所包裹的微乳被挤压出来,结冷胶浓度为1.25%较佳。

根据单因素考察结果,以包封率为评价指标,选取$CaCl_2$浓度8%,结冷胶浓度1.25%,HK-SMEDDS与结冷胶溶液质量比0.15,交联时间15 min为GB-HSMEDDS的制备条件。

2.2 溶胀曲线

图1所示为实验得到的在pH 1.2 HCl溶液中的溶胀曲线,可以看出空白微丸的溶胀度比含药微丸的溶胀度要小,可能是由于含药微丸中微乳与水有一定的亲和力,与结冷胶一起吸水的双重作用的影响。虽然微丸在HCl溶液中发生溶胀,但吸水量极少,因此从外部观察微丸形态并无明显变化,而且溶胀最大值出现在刚接触HCl溶液的一段时间里,之后基本保持平衡。当微丸置于pH 6.8 PBS中时(图2),粒径明显变大,微丸在刚接触pH 6.8 PBS时,介质中即有絮状物产生,可能是微丸中的Ca^{2+}与介质中的磷酸根生成了磷酸钙沉淀,表层发生脱落。图2中空白微丸在pH 6.8 PBS中的溶胀度比含药微丸的溶胀度要大,这可能是因为同样质量的空白微丸所含结冷胶的比例较大。由图1、2可知微丸在PBS中的溶胀度显著大于HCl溶液。

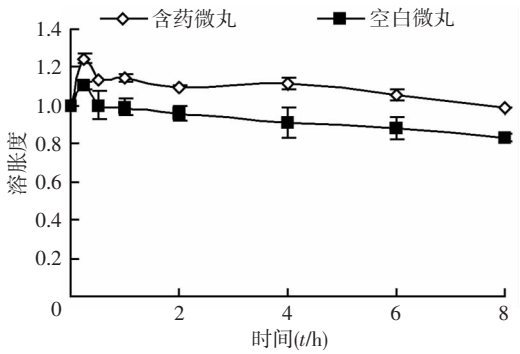


图1 含药和空白微丸在HCl溶液中的溶胀

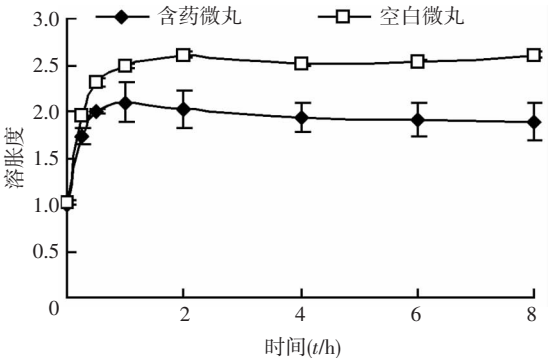


图2 含药和空白微丸在pH 6.8 PBS中的溶胀

2.3 药物累积释放曲线

从释放曲线(图3)中观察到和厚朴酚在HCl溶液中的释放明显快于PBS,可能是由于在PBS中,GB-HSMEDDS溶胀度达到最大的时间比在HCl溶液中的晚,因而释放比在HCl溶液中的慢;介质中的液体大量进入GB-HSMEDDS内部,使凝胶溶胀,粒径变大,延长了药物的释放路径,也会导致释放减慢;在PBS中产生的絮状物易附着在GB-HSMEDDS表面,使药物难以释放。相比于HCl溶液,GB-HSMEDDS在PBS中除了表层发生脱落外,两者在整个释放过程中形态基本保持完整。

2.4 释放数据拟合结果

表2显示在pH 1.2 HCl溶液中,GB-HSMEDDS中药物的释放符合Ritger-Peppas模型,在pH 6.8 PBS中,药物的释放符合Ritger-Peppas和一级方程2种模型。

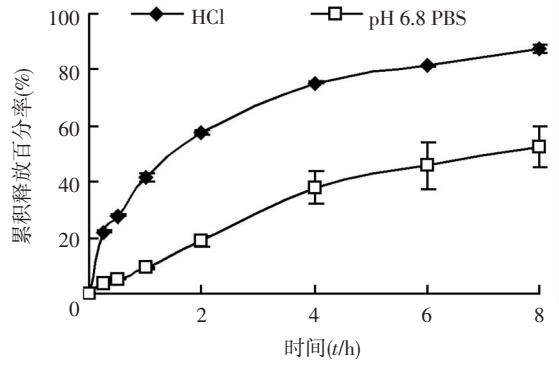


图3 GB-HSMEDDS在pH 1.2 HCl溶液及pH 6.8 PBS中的释放曲线图

表2 体外释药数据的模型拟合

模型	pH 1.2 HCl溶液	pH 6.8 PBS
零级方程	$Q=0.095\ 8t+0.231\ 1$ $r=0.908\ 6$	$Q=0.068\ 5t+0.029\ 5$ $r=0.981\ 8$
一级方程	$\ln(1-Q)=0.246\ 8t-0.219\ 2$ $r=0.983\ 3$	$\ln(1-Q)=0.096\ 7t-0.015$ $r=0.992\ 1$
Higuchi	$Q=0.311\ 8t^{1/2}+0.066\ 8$ $r=0.985\ 1$	$Q=0.205\ 8t^{1/2}-0.064\ 6$ $r=0.982\ 4$
Hixcon-Crowe Ⅲ	$(100-Q)^{1/3}=-0.001\ 5t+4.638$ $r=0.908\ 9$	$(100-Q)^{1/3}=0.001\ 1t+4.641\ 1$ $r=0.981\ 9$
Ritger-Peppas	$Q=41.38t^{0.38}$ $r=0.993\ 5$	$Q=11.73t^{0.75}$ $r=0.990\ 5$

3 讨论

结冷胶能和多种阳离子形成凝胶,但和二价阳离子形成的凝胶强度要大于一价阳离子[10],且在二价离子中 Ca^{2+} 所成凝胶在外观较好,因此本实验选用 $CaCl_2$ 为交联介质。

实验中由于交联时间增加,包封率下降,在阿莫西林结冷胶钙微丸的制备中[11],同样观察到交联时间过久,阿莫西林扩散到介质中,导致包封率下降,Ca^{2+} 浓度过高,会占据结冷胶分子阴离子的结合位点,阻碍结冷胶双螺旋结构的有序聚集,从而减弱凝胶强度,结冷胶形成凝胶的强度跟阳离子浓度有关,但并不是浓度越高越好,当 Ca^{2+} 为最佳浓度时,所得凝胶强度最大[12]。

将SMEDDS固体化后,具有稳定性增加、贮存时间延长、胃肠道刺激性减少、服用方便、剂型更加多样等优点[13],还可通过添加各种固体辅料或采用包衣技术,制成缓控释制剂,满足临床的需要。

目前结冷胶已广泛用于食品业中的稳定剂和增稠剂,制药业中眼用及鼻用原位凝胶、口服制剂的研究[14-15]。已经上市的有噻吗洛尔长效眼用制剂 Blocarden® Depot (Timoptic XE®),临床用于治疗青光眼[7]。口服制剂中将结冷胶与SMEDDS结合,制备固体微丸的研究在国内外尚少见报道。本实验应用结冷胶的离子敏感特性,采用离子凝胶法制得和厚朴酚SMEDDS结冷胶钙微丸,制备条件温和,不含有机溶剂,工艺简单,易于大规模生产。

参考文献:

[1] 闵玲, 朱小牧, 胡丽娜. 和厚朴酚在肿瘤治疗中的研究进展[J]. 华西药学杂志, 2010, 25(1): 113-115.

[2] Gou M, Zheng X, Men K, *et al*. Self-Assembled hydrophobic honokiol loaded MPEG-PCL diblock copolymer micelles[J]. Pharm Res, 2009, 26(9): 2164-2173.

[3] Zheng X, Kan B, Gou M, *et al*. Preparation of MPEG-PLA nanoparticle for honokiol delivery *in vitro* [J]. Int J Pharm, 2010, 386(1-2): 262-267.

[4] Nekkanti V, Karatgi P, Prabhu R, *et al*. Solid self-microemulsifying formulation for candesartan cilexetil[J]. AAPS PharmSciTech, 2010, 11(1): 9-17.

[5] 宦娣, 易涛, 刘颖, 等. 微粉硅胶对固体自微乳化给药系统小肠吸收的影响[J]. 药学学报, 2011, 46(4): 466-471.

[6] Sander C, Holm P. Porous magnesium aluminometasilicate tablets as carrier of a cyclosporine self-emulsifying formulation[J]. AAPS PharmSciTech, 2009, 10(4): 1388-1395.

[7] 王海燕, 朱希强, 郭学平. 结冷胶在医药领域的应用[J]. 中国生化药物杂志, 2012, 33(2): 192-195.

[8] 甘露, 田睿, 郭锋, 等. 和厚朴酚自微乳化给药系统的研究[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(19): 2073-2076.

[9] Patil S, Sharma S, Nimbalkar A, *et al*. Study of formulation variables on properties of drug-gellan beads by factorial design[J]. Drug Dev Ind Pharm, 2006, 32(3): 315-326.

[10] 李璠, 朱家壁. 新型高分子材料结冷胶的性质和应用[J]. 中国药业, 2007, 16(9): 1-3.

[11] Babu R J, Sathigari S, Kumar M T, *et al*. Formulation of controlled release gellan gum macro beads of amoxicillin [J]. Curr Drug Deliv, 2010, 7(1): 36-43.

[12] Singh B N, Kim K H. Effects of divalent cations on drug encapsulation efficiency of deacylated gellan gum[J]. J Microencapsul, 2005, 22(7): 761-771.

[13] 白中稳, 胡容峰, 孙备, 等. 环孢素A固体自微乳的制备及初步评价[J]. 中国新药杂志, 2013, 22(12): 1455-1461.

[14] Verma A, Pandit J K. Rifabutin-loaded floating gellan gum beads: effect of calcium and polymer concentration on incorporation efficiency and drug release [J]. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2011, 10(1): 61-67.

[15] Narkar M, Sher P, Pawar A. Stomach-specific controlled release gellan beads of acid-soluble drug prepared by ionotropic gelation method [J]. AAPS Pharm Sci Tech, 2010, 11(1): 267-277.

(**收稿**:2014-06-20;**修回**:2014-07-31)

(编辑 张 维)