论著

文章编号:1000-5404(2014)16-1670-04

酶降解-时滞型载姜黄素结肠定位胶囊的体外释药研究

张玉霞[1],辜鹏程[2],田 睿[2],贾运涛[3],郭 锋[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** 研究以低酯果胶为材料的载姜黄素结肠定位栓塞型胶囊的体外释药情况,评价其结肠定位的释药特性。**方法** 将非渗透性胶囊体、姜黄素自微乳微丸、栓塞片以及肠溶性囊帽组装成栓塞型胶囊,考察栓塞片处方中各因素对释药时滞的影响,评价其在模拟结肠环境中的体外释药行为。**结果** 当羟丙甲纤维素的型号为K4M、低酯果胶:羟丙甲纤维素=9.5∶0.5和片重为100 mg时,可达到结肠定位需要的释药时滞。具有相同处方栓塞片的胶囊在5%大鼠盲肠内容物溶液和0.5%果胶酶溶液中的释药时滞均缩短,说明其具有酶降解性。**结论** 载姜黄素低酯果胶栓塞型胶囊具有酶降解-时滞型结肠定位释药特性。

[关键词] 姜黄素;酶降解-时滞型;结肠定位胶囊;低酯果胶

[中图法分类号] R282.71;R944.9;R965.1 [文献标志码] A

In vitro release of enzymatic degradation and time-based capsule of curcumin for colon-specific delivery

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

[**Abstract**] Objective To investigate the *in vitro* release of curcumin from low methoxy pectin (LMP) plug capsule and evaluate its colon-specific drug delivery characteristics. Methods Plug capsule was assembled with impermeable capsule bodies, curcumin-loaded self-microemulsifying beads, plug tablet and enteric cap. The factors affecting the lag-time in the plug tablet were investigated, and *in vitro* release of curcumin was evaluated in the artificial medium of the colon. Results When the type of hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) was K4M, the ratio of LMP/HPMC was 9.5∶0.5 and the weight of plug tablet was 100 mg, the lag-time was achieved to satisfy the colon-specific characteristics. The lag-time of the capsule was shortened in 5% rat cecal content solution and 0.5% pectinase solution, indicating the capsule having the property of enzymatic degradation. Conclusion The plug capsule may be an enzymatic degradation and time-based colon-specific drug delivery system.

[**Key words**] curcumin; enzymatic degradation and time-based; colon-specific capsule; low methoxy pectin

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2012jjA10021), the Special Research Fund for Doctoral Program of Higher Education (20125503120003), the Project of Scientific Research of Chongqing Municipal Health Bureau (2013-2-060), the Project of Students' Research and Innovation Experiment of Chongqing Medical University (201244, 201229, 201217), the Project of Scientific and Technological Research of Chongqing Municipal Commission of Education (KJ110323 and KJ120307) and the HIFU Star Fund of Students' Scientific Research (XS201309). Corresponding author: Zhang Liangke, Tel: 86-23-68485161, E-mail: zlkdyx@126.com

[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金(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(201244, 201229, 201217);重庆市教育委员会科学技术研究项目(KJ110323, KJ120307);海扶之星学生科研基金(XS201309)

[通信作者] 张良珂,电话:(023)68485161,E-mail: zlkdyx@126.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140219.1115.014.html(2014-02-19)

口服结肠定位给药系统(oral colon-specific drug delivery system,OCDDS)是指通过口服给药,避免药物在胃肠道上部释放,而在结肠内大部分或全部释放的,具有局部或全身治疗作用的一种新型给药系统。目前,OCDDS主要有pH依赖型、时间依赖型、压力控制型、酶降解型等多种类型,其中酶降解型具有生物相容性好、定位释药准确可靠、特异性强等优点,是利用菌群产生的酶可特异性降解多糖为原理的给药系统[1],药物剂型则主要有包衣片、胶囊、骨架片等。近年学者致力于生物可降解天然多糖的研究,因为其具有生物可降解性、无毒、可调节的控制释放特性和良好的生物相容性等特点[2-4]。果胶是应用最广泛的多糖之一,能抵抗在胃肠道活性较高的蛋白酶和淀粉酶,而被结肠部位的果胶酶特异性降解[5]。

姜黄素(curcumin,CC)是从姜科姜黄属植物郁金、莪术、姜黄等根茎中提取的一种植物多酚,可治疗结肠炎、结肠癌[6-8],但其水溶性差,生物利用度低。本研究综合酶降解型和时滞效应以达到结肠定位释药的目的,先将CC制成姜黄素自微乳(curcumin self-microemulsion,CSM)[9-10],提高其溶解度,再将其制成姜黄素自微乳微丸(curcumin self-microemulsifying beads,CSMB),置入非渗透性胶囊体(impermeable capsule body,ICB)内,与以低酯果胶(low methoxy pectin,LMP)为主要材料制成的栓塞片、肠溶性囊帽组装成栓塞型胶囊,制备工艺简单,可控制药物在体内定时定位释放,通过考察栓塞片处方中各因素对释药时滞的影响,初步筛选出能够达到结肠定位作用的处方,再评价其在模拟结肠环境中的体外释药行为。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与动物

Unico UV-2000紫外可见分光光度计(上海尤尼柯仪器有限公司),单冲压片机(江苏黎明制药机械有限公司),SHZ-88台式水浴恒温振荡器(江苏太仓实验设备厂)。

姜黄素(Aladdin,纯度为98%,批号C1301014),二乙二醇单乙基醚(法国佳法赛公司,Transcutol. P),聚氧乙烯氢化蓖麻油(德国BASF公司,Cremophor RH40),油酸乙酯(天津市光复精细化工研究所),海藻酸钠(美国FMC公司),乙基纤维素(上海Colorcon公司,EC),肠溶胶囊、明胶胶囊(广东省潮州市强基制药厂),LMP(衢州果胶有限公司),羟丙甲纤维素(HPMC,K15M,K4M,E50-LV,上海Colorcon包衣技术有限公司),果胶酶(天津利华酶制剂公司)。

8周龄SD大鼠6只,体质量(200±20)g,雌雄各半,使用许可证号SYXK(渝)2012-0001,由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 栓塞型胶囊的制备 ①CSMB的制备[9]:精密称取一定量CC加入油酸乙酯-Transcutol. P-Cremophor RH40空白微乳中,浓度为60 mg/g,于37 ℃恒温搅拌30 min,然后取0.9 g CC-SMEDDS加入至3 mL海藻酸钠溶液(浓度为3%)中混匀,将其滴入氯化钙溶液(浓度为4%)中,搅拌1 h,用布氏漏斗抽滤,再用蒸馏水冲洗3次,烘干即得。②栓塞片的制备[11]:将各原辅料过100目筛,按照处方量在研钵内充分混匀,粉末直接压片法压片,片重为100 mg。栓塞片的处方:LMP: HPMC(8∶2,8.5∶1.5,9∶1,9.5∶0.5)、1%硬脂酸镁、10% EDTA-Na_2、20% KH_2PO_4。③栓塞型胶囊的组装:ICB的制备参考文献[12]。精密称取一定量的CSMB置入ICB内,装入栓塞片与囊口齐平,再盖上肠溶性囊帽,接口处用EC溶液(浓度为8%)密封,即得。

1.2.2 栓塞型胶囊体外释放方法的确定 将组装好的栓塞型胶囊放于锥形瓶中,释放介质100 mL,置于恒温水浴振荡器中,温度(37±0.5)℃,转速100 r/min,在特定时间点取出4 mL释放介质,同时补入4 mL同温同介质。样品于4 000 r/min离心10 min,取上清液2 mL,加入2 mL无水乙醇破乳,用自制的50%乙醇定容至10 mL。分别在不同释放介质对应的检测波长处测定光密度值,计算累积释药百分率,绘制释药曲线。

1.2.3 栓塞片处方工艺对释药时滞的影响 对栓塞片处方工艺进行考察时,前2 h释放介质为0.1 mol/L HCl溶液,之后更换为pH 6.8的磷酸盐缓冲液(PBS 6.8),在424 nm处测定光密度值[$D(424)$]。筛选出合适时滞的处方,使栓塞型胶囊具有时滞型结肠定位的性质。①HPMC型号:分别压制片质量为100 mg,LMP: HPMC=9.5∶0.5,HPMC型号为K15M、K4M、E50-LV的栓塞片,按照1.2.1组装得到相应的栓塞型胶囊,按照1.2.2进行体外释放度测定。②LMP与HPMC比例:分别压制片质量为100 mg,HPMC型号为K4M,LMP与HPMC比例为8∶2、8.5∶1.5、9∶1、9.5∶0.5的栓塞片,按照1.2.1组装得到相应的栓塞型胶囊,按照1.2.2进行体外释放度测定。③栓塞片片重:分别压制LMP与HPMC比例为9.5∶0.5,HPMC型号为K4M,片质量为80、100、120 mg的栓塞片,按照1.2.1组装得到相应的栓塞型胶囊,按照1.2.2进行体外释放度测定。

1.2.4 体外模拟结肠液释放 取LMP: HPMC=9.5∶0.5,HPMC型号为K4M,片质量为100 mg的栓塞片,按照1.2.1组装得到相应的栓塞型胶囊,按照1.2.2进行体外释放度测定,前2 h释放介质为0.1 mol/L HCl溶液,之后3 h更换为PBS 6.8溶液,最后分别置于以下3种介质中:PBS pH 6.8(未更换介质)、0.5%果胶酶柠檬酸盐缓冲液、5%大鼠盲肠内容物溶液。分别在424、426、422 nm处测定光密度值。

2 结果

2.1 栓塞片处方工艺对释药时滞的影响

2.1.1 HPMC型号 由图1可知,不同型号HPMC压制的柱塞片,释药时滞不同。这是因为HPMC型号不同,其黏度不同。黏度越大,与LMP形成的凝胶结构越稳定,柱塞片完全溶蚀需要的时间越长。为使药物在到达结肠部位后释放,选择HPMC的型号为K4M。

2.1.2 LMP与HPMC比例 由图2可见,释药时滞随柱塞片中LMP与HPMC比例的增加而缩短。HPMC与LMP配比会形成亲水凝胶,控制LMP的溶蚀速度,HPMC在柱塞片中的比

例越小,LMP更容易从凝胶骨架表面脱离;反之则更难脱离。当LMP与HPMC比例为9.5∶0.5时,其释药时滞能基本达到结肠定位的作用。

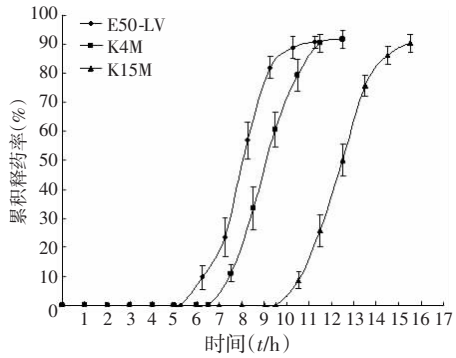


图1 不同型号HPMC对释药时滞的影响

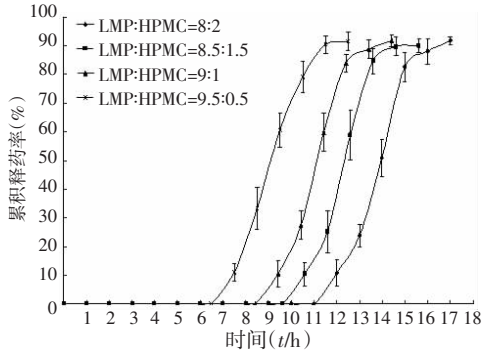


图2 LMP与HPMC不同比例对释药时滞的影响

2.1.3 栓塞片片质量 由图3可看出,随着栓塞片片质量的减少,释药时滞缩短,这是因为随着片质量的减少,栓塞片完全溶蚀需要更短的时间。当栓塞片的片质量为100 mg时,释药时滞为6 h左右,可基本满足结肠定位的需求。

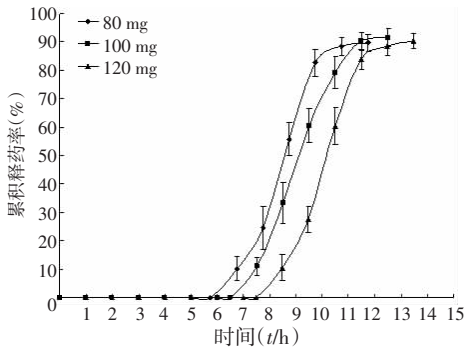


图3 栓塞片片质量对释药时滞的影响

2.2 体外模拟结肠液释放

图4所示为实验得到的体外模拟结肠液的释药曲线,采用t检验进行分析得到,与PBS pH=6.8溶液相比,5%大鼠盲肠内容物溶液和0.5%果胶酶溶液均可以促进栓塞片的降解($P<0.05$),推断其具有良好的酶降解作用。其中果胶酶的降解作用优于大鼠盲肠内容物,这是因为果胶酶是特异性降解果胶的酶,降解作用更专一。栓塞片在酶降解和自身溶蚀的双重作用下溶蚀速率明显加快,栓塞型胶囊的释药时滞缩短,说明该栓塞型胶囊具有酶降解-时滞型结肠定位释药的特点。

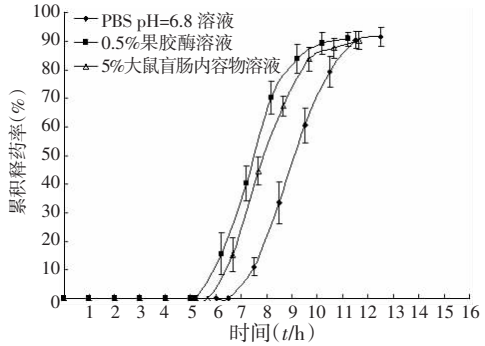


图4 药物体外模拟结肠液释放分析

3 讨论

栓塞型胶囊由不溶性囊身、可溶性囊帽、栓塞以及药物组成[13]。为了防止水分渗入胶囊,致使药物提前溶解释放,要求囊身对水无渗透性,在胃肠液中不溶解。肠溶性囊帽只有在小肠液中才能溶解,然后使栓塞暴露出来,这克服了胃排空个体差异较大这一问题。栓塞是整个体系的关键,它直接影响释药部位和释药时间,这主要由栓塞的性能决定,栓塞的类型主要有溶胀型、溶蚀型和酶降解型。类型不同,释药系统呈现出不同性质的定时定位效果。药物可有多种,比如含药速释片、含药速释颗粒、液体药物等。本研究以微丸作为给药制剂,使药物持续缓慢释放,延长药物在结肠中的滞留时间,血药浓度平稳,释药时滞重现性较好。栓塞型胶囊制备工艺简单,具有广阔的发展前途和应用前景。

0.5%果胶酶溶液和5%大鼠盲肠内容物溶液都需要临用前配制,大鼠盲肠内容物的制备需要每天给大鼠灌胃2%果胶溶液1 mL/只,以激活体内的微生物酶,在制备释放介质时,要不断地通入N_2以保持无氧环境。用大鼠盲肠内容物溶液作为结肠模拟介质,是因为它能更好地模拟结肠环境,从而获得更准确的评价结果。

释放介质为PBS pH=6.8溶液时,释药时滞由栓塞片的溶蚀时间决定;在外加果胶酶溶液和大鼠盲肠内容物溶液中,释药时滞由栓塞片溶蚀和酶降解共同作用决定。相同处方比较,外加果胶酶溶液和大鼠盲肠内容物溶液能显著加速栓塞片的降解,缩短释药时滞,说明制备的载姜黄素低酯果胶栓塞型胶囊有望实现难溶性药物的酶降解-时滞型结肠定位释药,为下一步的体内研究奠定了基础。

参考文献:

[1] Sinha V R, Kumria R. Microbially triggered drug delivery to the colon [J]. Eur J Pharm Sci, 2003, 18(1): 3-18.

[2] Yu C Y, Yin B C, Zhang W, *et al*. Composite microparticle drug de-

livery systems based on chitosan, alginate and pectin with improved pH-sensitive drug release property[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2009, 68(2): 245 - 249.
[3] 江涛, 李卫平, 雷健, 等. 天然多糖作为结肠定位给药系统材料的研究进展[J]. 中国药房, 2013, 24(23): 2199 - 2202.
[4] Dev R K, Bali V, Pathak K. Novel microbially triggered colon specific delivery system of 5-fluorouracil: statistical optimization, *in vitro*, *in vivo*, cytotoxic and stability assessment[J]. Int J Pharm, 2011, 411(1/2): 142 - 151.
[5] Paharia A, Yadav A K, Rai G, *et al*. Eudragit-coated pectin microspheres of 5-fluorouracil for colon targeting[J]. AAPS PharmSciTech, 2007, 8(1): 12.
[6] 卢伟东, 傅仲学, 覃勇, 等. 姜黄素逆转结肠癌裸鼠移植瘤多药耐药的研究[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(4): 376 - 380.
[7] 李晓萍, 张志坚, 屈纪富. 姜黄素对大鼠重症胰腺炎的干预效应研究[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(8): 759 - 763.
[8] 许东晖, 王胜, 金晶, 等. 姜黄素的药理作用研究进展[J]. 中草药, 2005, 36(11): 1737 - 1740.
[9] 刘文利, 张良珂, 贾运涛, 等. 姜黄素自微乳化释药系统处方优化及体外评价[J]. 中国药学杂志, 2011, 46(22): 1730 - 1733.
[10] 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.
[11] Krogel I, Bodmeier R. Evaluation of an enzyme-containing capsular shaped pulsatile drug delivery system[J]. Pharm Res, 1999, 16(9): 1424 - 1429.
[12] 刘静, 张良珂, 汪程远, 等. 新型酶解型结肠定位脉冲胶囊的制备与体外评价[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(23): 3127 - 3130.
[13] 莫良侃, 杜青. 栓塞型脉冲胶囊的研究进展[J]. 中国医药工业杂志, 2003, 34(12): 644 - 647.

(**收稿**:2013-12-10;**修回**:2014-01-22)
(编辑 张 维)

(上接 1669 页)

2 讨论

自从第 1 台腔镜甲状腺手术开展至今已有 17 年的历史[3],与传统开放手术相比,腔镜手术能够有效缩小手术创伤、减轻术后疼痛、增加美容效果等。由于甲状腺腔镜手术中缺乏自然的手术操腔隙,手术入路相对远离操作部位,不能弯曲的长直器械限制了其在较小腔隙内的精细操作,且在颈根部存在视野和操作盲区。因此在复杂甲状腺手术腔镜存在固有缺陷和技术瓶颈。而机器人腔镜手术系统能够克服上述传统腔镜手术的不足。传统腔镜手术中为镜像运动,外科医生需要反向运动才能完成正确的操作。机器人的控制原理是直觉控制,镜下动作方向与手控方向是一致的,动作影像为正像,从而消除了传统腔镜手术中支点效应。达芬奇系统中操作器械仿真手腕式的内关节(Endowrist)设计增加了操作的灵活程度,使一些传统腔镜手术下难以完成的手术操作变为容易实现的过程[4-5]。在机器人辅助的手术过程中,手术医生以非常舒服的势式坐在控制台前进行手术,能胜任长时间操作而不易疲劳[6]。

本例患者在达芬奇机器人下顺利完成腔镜右侧甲状腺瘤切除手术,作为我们的第 1 例机器人甲状腺手术,还不全完全适应机器人的操作方式,手术时间与熟练状态下的相同的开放手术和腔镜手术相比,手术时间略长,达到了 120 min。手术操作中体会到能自由活动的机械臂以及带有仿生关节的操作器械能为手术操作提供多种方便。由于锁骨以及胸骨的影响,常规腔镜器械在进行较为深层次的手术操作时可能会感到鞭长莫及,而带有关节的机器人器械则可随心所欲地到达术野中的任何部位。双镜头形成的 3D 视野使手术操作者在术中能更准确判断操作部位位置,有利于术中进行精细操作。文献报道机器的手术的学习曲线与传统腔镜手术相比有明显缩短,机器人手术的技术相比传统腔镜手术更容易掌握,在机器人腔镜手术训练系统中,没有腔镜手术基础的新手经过 10 次左右的训练即可达到与腔镜外科专家相同的成绩[7]。而对于已熟练掌握腔镜技术的操作者则能更快地适应机器人手术。由于结合了机器人手术的操作精细特点以及腔镜手术的美容效果,达芬奇机器人甲状腺手术技术比传统腔镜甲状腺手术在微创和美观方面有更加明显的优势。本例患者手术过程顺利,术后恢复快,未出现皮瓣损伤、神经损伤以及甲状旁腺功能低下等并发症。

达芬奇机器人手术在我国开展尚不多,曾有作者报道过机器人甲状腺手术的病例[8-9],但采用的手术入路为腋窝入路或胸前入路。而我们所采用的则为创伤更小、对外观影响更小的腋窝联合乳晕入路,避免了腋窝较大切口、胸壁皮下大面积分离创伤和胸骨前的明显疤痕,因此术后患者对手术效果和外观非常满意。达芬奇机器人手术也有自身不足之处,如术中放置无菌塑料套以及连接机械臂与传统腔镜手术相比需多用 20 min 以上的时间;机器人手术过程中仍需要对腔镜手术较为熟练的助手穿无菌手术衣在患者床旁协助操作,以完成调换机械臂上的操作器械、吸引冲洗、协助显露术野以及取出标本等;机器人使用费较高以及限制次数使用的器械也明显增加了患者的费用。相信随着临床应用技术的成熟和对机器人效能操控的深入理解,达芬奇机器人将可以解决某些复杂的甲状腺外科问题。

参考文献:

[1] Lobe T E, Wright S K, Irish M S. Novel uses of surgical robotics in head and neck surgery[J]. J Laparoendosc Adv Surg Tech A, 2005, 15(6): 647 - 652.
[2] Holsinger F C, Chung W Y. Robotic thyroidectomy[J]. Otolaryngol Clin North Am, 2014, 47(3): 373 - 378.
[3] Hüscher CS, Chiodini S, Napolitano C, *et al*. Endoscopic right thyroid lobectomy[J]. Surg Endosc, 1997, 11(8): 877.
[4] Chen C C, Falcone T. Robotic gynecologic surgery: past, present, and future[J]. Clin Obstet Hynecol, 2009, 52(3): 335 - 343.
[5] Garg A, Dwivedi R C, Sayed S, *et al*. Robotic surgery in head and neck cancer: a review[J]. Oral Oncol, 2010, 46(8): 571 - 576.
[6] Fan L J, Jiang J. Present and future of robot - assisted endoscopic thyroid surgery[J]. Chin Med J (Engl), 2012, 125(5): 926 - 931.
[7] Judkins T N, Oleynikov D, Stergiou N. Objective evaluation of expert and novice performance during robotic surgical training tasks[J]. Surg Endosc, 2009, 23(3): 590 - 597.
[8] 周宁新, 陈军周, 刘全达, 等. "达芬奇"机器人普通外科手术 180 例: 中国单中心报道[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2011, 18(7): 698 - 704.
[9] 贺青卿, 周鹏, 庄大勇, 等. 经腋窝与胸前径路 da Vinci Si 机器人甲状腺腺叶切除二例[J]. 国际外科学杂志, 2014, 41(2): 104 - 107.

(**收稿**:2014-07-17;**修回**:2014-08-05)
(编辑 王 红)