

鸦胆子油微囊-原位凝胶的制备及体外释药机制的研究

陈钢^{1,2}, 张晓¹, 卢刚³, 邵阿丽¹, 刘广泉¹, 蔡冰¹

1. 广东药学院药科学院, 广东 广州 510006

2. 广东省药物新剂型重点实验室, 广东 广州 510006

3. 上海博爱医院, 上海 200031

摘要: 目的 制备鸦胆子油微囊-原位凝胶, 并探讨其体外释药性能。方法 以复凝聚法制备鸦胆子油微囊, 并将微囊载于泊洛沙姆 407 形成的原位凝胶中, 采用无膜溶出模型考察其体外溶蚀及释放情况。结果 制得的微囊大小均匀, 平均粒径为 89.399 μm , 包封率和载药量分别为 94.5%~97.4% ($n=3$) 和 48.3%~52.6% ($n=3$); 加入微囊后泊洛沙姆 407 凝胶的相变温度提高了 6 $^{\circ}\text{C}$ 左右, 微囊-原位凝胶的体外释药符合 Higuchi 方程, 且持续释放可达 96 h 以上。结论 鸦胆子油微囊-原位凝胶制备方法简便, 载药量高, 并有一定的缓释作用。

关键词: 鸦胆子油微囊; 原位凝胶; 体外释放; 复凝聚法; 无膜溶出模型

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)07-1306-04

Preparation of *Brucea javanica* oil microcapsule *in situ* gel system and its *in vitro* release mechanism

CHEN Gang^{1,2}, ZHANG Xiao¹, LU Gang³, SHAO A-li¹, LIU Guang-quan¹, CAI Bing¹

1. School of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Advanced Drug Delivery, Guangzhou 510006, China

3. Shanghai Humanity Hospital, Shanghai 200031, China

Abstract: Objective To prepare *Brucea javanica* oil microcapsule (BOM) *in situ* gel system and investigate its *in vitro* drug releasing properties. **Methods** BOM was prepared by complex coacervation method. The BOM *in situ* gel system was prepared by loading microcapsules to Poloxamer 407. A membraneless dissolution model was used to determine *in vitro* release and gel erosion of BOM *in situ* gel system. **Results** The microcapsules were with uniform size and the mean diameter was 89.399 μm . The entrapment efficiency and drug loading of the microcapsules were in the range of 94.5%—97.4% ($n=3$) and 48.3%—52.6% ($n=3$), respectively. The phase transition temperature of Poloxamer 407 gel loaded by microcapsules increased about 6 $^{\circ}\text{C}$. The *in vitro* release behavior of the BOM *in situ* gel system exhibited the characteristics of Higuchi equation and the drug could sustained-release for over 96 h. **Conclusion** It is easy to prepare BOM *in situ* gel system with suitable formulation. A high drug loading and sustained-release effect could be obtained. **Key words:** *Brucea javanica* (L.) Merr. oil microcapsule (BOM); *in situ* gel; *in vitro* release; complex coacervation method; membraneless dissolution model

鸦胆子油是鸦胆子 *Brucea javanica* (L.) Merr. 的脂肪油, 可用于治疗肺癌、转移性脑瘤、消化道肿瘤等多种恶性肿瘤及消化道溃疡、尖锐湿疣等非肿瘤疾病^[1-2]。鸦胆子油的剂型种类较少, 目前临床应用最广泛的为水包油型乳剂, 主要用于注射(鸦胆子油乳注射液)或口服(鸦胆子油口服乳液), 但是多年的生产和临床实践证明这两种制剂均存在一

定的局限性, 因此需要开发鸦胆子油的新剂型, 为临床使用提供更多选择。

原位(在体)凝胶是指以液体状态给药后, 能在需要的组织、器官或体腔内发生相变, 形成非化学交联的半固体制剂^[3-5]。其中温度敏感型的原位凝胶能在体温作用下发生相变, 而不需要有机溶剂、聚合交联试剂以及其他外在因素, 近年来越来越多

收稿日期: 2011-11-02

基金项目: 广东省科技计划项目(2011B031700016); 广东省大学生创新实验项目(1057310012); 广东药学院学生科技活动专项经费资助; 广东药学院师资队伍建设工程资助

作者简介: 陈钢(1978—), 男, 四川成都人, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事中西药物新制剂及新型给药系统的研究。

Tel: (020)39352117 E-mail: cg753@126.com

网络出版时间: 2012-04-23 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20120423.1121.002.html>

地应用于中药新剂型的开发^[6-7]。而且,原位凝胶还可与微囊、微球等微粒相结合,充分发挥两种载体的长处,控制药物的释放。本研究将鸦胆子油包裹于微囊中,装载于温度敏感型的聚合物溶液中,制成鸦胆子油微囊-原位凝胶,并考察体外释放行为,探索释药机制,为其进一步用于腔道(直肠、阴道)给药或局部注射奠定实验基础。

1 仪器与材料

Mastersizer 2000 激光粒度分析仪(英国马尔文仪器有限公司); MIT100 金相显微镜(重庆奥特光学仪器有限公司); Agilent 6820 气相色谱仪(上海安捷伦公司); 毛细管色谱柱 OV-17(苯基甲基硅酮, 30 m×0.32 mm×0.50 μm, 中国科学院兰州化学物理研究所); SHZ-82A 型恒温振荡器(常州澳华仪器有限公司); SZCL-2 型控温磁力搅拌器(金坛市富华仪器有限公司); ZH-2 型涡旋混合机(天津药典标准仪器厂); TGL-16G 型离心机(上海安亭科学仪器厂)。

精制鸦胆子油(江西吉水三达天然药用香料厂); 油酸甲酯对照品(Sigma 公司, 质量分数≥99%); 亚油酸甲酯对照品(Fluka 公司, 质量分数≥98.5%); 阿拉伯胶(上海润捷化学试剂有限公司); 明胶(杭州市微生物试剂有限公司); 泊洛沙姆 407(Poloxamer 407, BASF 公司); 胰酶(Amresco 公司); 三氟化硼-乙醚(常熟市杨园化工有限公司); 其他试剂均为分析纯, 所用水为屈臣氏蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 鸦胆子油微囊的制备

以明胶和阿拉伯胶为囊材, 采用复凝聚法制备鸦胆子油微囊: 阿拉伯胶 10 g, 加水 30 mL 研磨均匀, 滴加鸦胆子油 5 g, 乳化成初乳, 加水 300 mL 稀释, 即得①; 明胶 10 g, 加水 300 mL 搅拌均匀, 50 °C 下保温, 即得②; ①和②混合, 50 °C 下搅拌, 加 10%醋酸调节 pH 值至 3~4, 搅拌 30 min, 即得③; 取蒸馏水 500 mL 倾入③, 冰浴中 500 r/min 搅拌冷却至 10 °C, 加 36%甲醛 30 mL, 搅拌 15 min, 加 20%氢氧化钠调节 pH 值至 8~9, 搅拌 1 h, 滤过, 水洗至无醛味, 干燥得微囊。

2.2 鸦胆子油微囊-原位凝胶的制备

取“2.1”项制备得到的鸦胆子油微囊 10 g, 加水 150 g, 搅拌成混悬液, 加入 40 g 泊洛沙姆 407, 使其分散均匀, 置于 4 °C 冰箱中保存直至泊洛沙姆 407 完全溶解, 即得鸦胆子油微囊-原位凝胶。

2.3 微囊的粒径分布及形态观察

取一定量微囊充分分散于水中, 用激光粒度仪测定粒径及其分布(图 1); 采用光学显微镜观察微囊形态(图 2)。由测得鸦胆子油微囊的粒径分布的分析报告可知, 其平均粒径为 89.399 μm, 径距为 1.105, 一致性为 0.341, 大小均匀, 分布较窄。由鸦胆子油微囊的显微镜图(×100)可观察到微囊形态较均匀, 为圆整形或椭圆形的封闭囊状物。

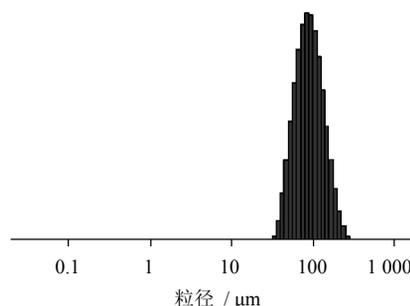


图 1 鸦胆子油微囊的粒径分布图
Fig. 1 Particle size distribution of BOM

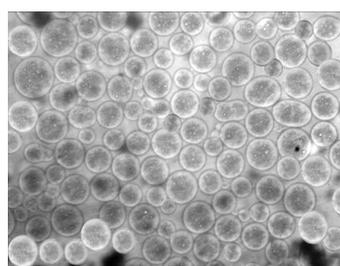


图 2 鸦胆子油微囊的显微镜图
Fig. 2 Micrograph of BOM

2.4 定量测定

按照已建立方法^[8], 采用气相色谱法测定油酸和亚油酸的量。

2.4.1 色谱条件 色谱柱为毛细管柱 OV-17, 进样口温度 230 °C, 柱温 220 °C, 氢火焰离子化检测器温度 240 °C, 载气为高纯氮气, 分流比 50:1, 进样量 2 μL。

2.4.2 微囊中油酸和亚油酸的定量测定 先破囊提取药物: 精密称取微囊 0.5 g, 加入 0.04 g 胰酶和 10 mL 蒸馏水, 于 37 °C 水浴 3 h 分解囊材, 加入 0.5 mol/L 氢氧化钾溶液 25 mL, 在 85 °C 水浴 30 min, 加入 0.5 mol/L 盐酸 25 mL, 然后加入 30 mL 石油醚萃取, 取石油醚层于试管中, 挥干。再进行甲酯化处理: 往试管里加入 0.5 mol/L 氢氧化钾-甲醇溶液 2 mL, 60 °C 水浴 15~20 min, 加入三氟化硼-乙醚 1 mL, 水浴 60 °C 酯化 2 min, 取出。冷却后加入正

己烷 2.5 mL 萃取, 加入适量饱和氯化钠溶液, 涡旋振荡, 静置分层, 得上清液经 0.22 μm 有机滤膜滤过后进样测定。结果表明, 该方法重复性良好, 油酸和亚油酸的 RSD 分别为 1.2% 和 0.9% ($n=5$); 样品在室温和 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存 96 h 稳定性良好, 油酸的 RSD 分别为 2.6% 和 2.3%, 亚油酸的 RSD 分别为 2.8% 和 2.2%; 油酸日内精密度和日间精密度的平均 RSD 分别为 1.5% 和 1.9% ($n=6$), 亚油酸日内精密度和日间精密度的 RSD 分别为 2.2% 和 2.5% ($n=6$); 油酸和亚油酸的平均回收率分别为 97.8% 和 98.0%, RSD 分别为 1.5% 和 1.8% ($n=5$)。

2.5 包封率和载药量的测定

制备 3 批鸦胆子油微囊, 按“2.4”项下方法测定微囊中药物的量。收集 3 批微囊干燥前的滤过液, 加入正己烷萃取后氮气吹干, 再按“2.4”项下方法进行甲酯化后测定。结果包封率分别为 95.2%、94.5%、97.4%, 载药量分别为 48.3%、52.6%、51.0% (所用鸦胆子油中油酸和亚油酸的量分别为 156.7、139.6 mg/g, 载药量以鸦胆子油计算)。

包封率 = 微囊中药量 / 微囊和介质中的总药量

载药量 = 微囊中药量 / 微囊质量

2.6 微囊对原位凝胶相变温度的影响

根据已建立方法^[9], 在西林瓶中盛放原位凝胶和固定尺寸的磁力搅拌子, 插入温度计。将西林瓶放入冰水浴中, 开启电磁搅拌 (500 r/min), 使水浴缓慢升温, 升温速率约为 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 。磁力搅拌子停止转动的温度即为相变温度, 每一样品平行测定 3 次, 结果取平均值。

分别在水和鸦胆子油微囊混悬液中, 加入不同量的泊洛沙姆 407, 搅拌使其分散均匀, 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存直至泊洛沙姆 407 完全溶解, 配制成泊洛沙姆 407 质量分数为 15%、20%、25%、30% 的溶液, 测定相变温度。制得的鸦胆子油微囊-原位凝胶的相变温度为 32 $^{\circ}\text{C}$, 说明在室温 25 $^{\circ}\text{C}$ 下是自由流动的液体, 在体温 37 $^{\circ}\text{C}$ 下能发生相变形成半固体凝胶, 可达到体内应用的要求。测得在水和鸦胆子油微囊混悬液中不同质量分数 (15%、20%、25%、30%) 泊洛沙姆 407 的相变温度, 结果分别为 (34.2 \pm 0.9)、(25.4 \pm 0.6)、(21.0 \pm 0.7)、(18.6 \pm 0.8) $^{\circ}\text{C}$ 和 (40.1 \pm 0.8)、(31.2 \pm 0.6)、(27.5 \pm 0.5)、(23.7 \pm 0.8) $^{\circ}\text{C}$ ($n=3$)。可知, 泊洛沙姆 407 的相变温度呈现质量分数依赖性, 随泊洛沙姆 407 质量分数增大而降低; 微囊的加入使相变温度普遍提高

了 6 $^{\circ}\text{C}$ 左右, 但并不改变相变温度随泊洛沙姆 407 质量分数增加而降低的趋势。

2.7 原位凝胶的溶蚀动力学和释药行为考察

采用无膜溶出模型研究原位凝胶的溶蚀动力学^[10], 并同时考察药物的释放。精密称取鸦胆子油微囊-原位凝胶约 5 g, 加入到已知质量的 25 mL 具塞试管中, 将试管置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温振荡器中预热 10 min, 使其完全形成半固体凝胶。然后, 加入 10 mL 37 $^{\circ}\text{C}$ 经超声脱气的蒸馏水作为释放介质, 100 r/min 振荡 30 min, 立即倾出全部释放介质另存, 将试管表面拭干, 迅速称量并记录其质量, 然后重新放入恒温水浴振荡器中平衡 10 min, 再补充空白释放介质并继续振荡 30 min。如此反复操作, 直至剩余凝胶不足 10%。相邻时间点试管的质量差异为在此期间的凝胶溶蚀量, 以凝胶累积溶蚀率对取样时间作图, 得到凝胶经时溶蚀曲线。另外, 取上述另存的释放介质, 加入正己烷萃取后氮气吹干, 再按“2.4”项下方法进行甲酯化处理, 测定其油酸和亚油酸的量, 分别以两者的累积释药率对取样时间作图, 得到凝胶释药曲线。

鸦胆子油微囊-原位凝胶溶蚀和释放的经时变化曲线, 分别见图 3、4。分别采用零级动力学方程、一级动力学方程、Weibull 方程及 Higuchi 方程对体外释放进行模型拟合, 结果见表 1。结果表明, 其释放具有时相性, 前期释药稍快, 后期释药则有明显的缓释特征, 释放时间可达 96 h 以上; 油酸和亚油酸的释放速率几乎同步, 从拟合方程的 r 值可见, Higuchi 方程对二者的释放曲线拟合较好。

为了研究原位凝胶中药物释放与凝胶溶蚀的关系, 阐明其释药机制, 将累积释药率 (Y) 对累积溶蚀率 (X) 作图, 得到油酸和亚油酸的回归方程分别

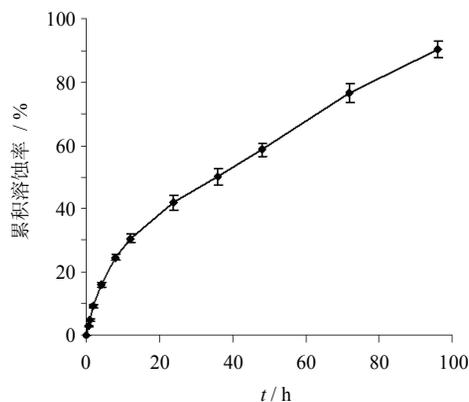


图 3 鸦胆子油微囊-原位凝胶的体外溶蚀曲线 ($n=4$)
Fig. 3 *In vitro* erosion curve of BOM *in situ* gel system ($n=4$)

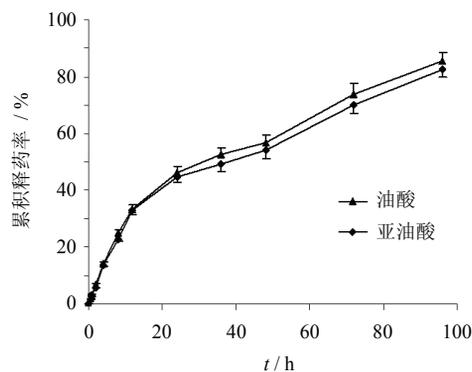


图 4 鸦胆子油微囊-原位凝胶的体外释药曲线 (n=4)

Fig. 4 *In vitro* release curves of BOM *in situ* gel system (n=4)

表 1 鸦胆子油微囊-原位凝胶体外释药的拟合模型

Table 1 Fitted model for *in vitro* release of BOM *in situ* gel system

成分	零级动力学方程	一级动力学方程	Weibull 方程	Higuchi 方程
油酸	$Mt=0.8832t+10.957,$ $r=0.9508$	$\ln(100-Mt)=-0.0188t+$ $4.543, r=0.9914$	$\ln\ln(100/100-Mt)=0.8573\ln t-$ $3.2632, r=0.9938$	$Mt=9.0819t^{1/2}-$ $2.6744, r=0.9951$
亚油酸	$Mt=0.849t+10.201,$ $r=0.9518$	$\ln(100-Mt)=-0.017t+$ $4.5421, r=0.9900$	$\ln\ln(100/100-Mt)=0.8599\ln t-$ $3.356, r=0.9930$	$Mt=8.7147t^{1/2}-$ $2.8391, r=0.9944$

溶液-凝胶相转变界限的确定有许多测定方法,如动态流变学方法、DSC 分析法、试管倒相法、落球法及观察搅拌子转动法等。前两种方法客观、精确、全面,但需用特殊仪器;后 3 种简便易行,但影响测定结果的因素较多。以往研究发现,若只需简单了解溶液-凝胶的转变状况(相变温度),观察搅拌子转动方法在接近恒定的升温速率、相同的玻璃器壁厚度和保持搅拌子转速、形状及大小一致的条件下进行,测得的相变温度与动态流变学方法、DSC 分析法基本一致^[9,11]。因此,本研究采用更简便的观察搅拌子转动法来测定相变温度。

泊洛沙姆在溶液中生成以疏水性 PPO 嵌段为内核,包裹着亲水性 PEO 外壳的球状胶束,其胶凝机制常被认为是随着温度升高胶束间相互缠结和堆砌的结果^[12]。阿拉伯胶是阿拉伯酸的钠、钙、镁盐的混合物,明胶是氨基酸与肽交联形成的聚合物,分子中含有较多的羧基或氨基,将由二者为囊材制成的微囊载入到泊洛沙姆 407 溶液中,羧基和氨基可能与其 PEO-PPO-PEO 发生相互作用,形成氢键结合,阻碍链间的交联,只有当温度上升,交联发生几率增大,才能发生胶凝。所以,微囊的加入使相变温度有升高的趋势。

参考文献

[1] 林宏英, 吴建梅, 张文生. 鸦胆子油的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(4): 65-69.

为: $Y=0.9793X+0.1915, r=0.9963$; $Y=0.9401X-0.105, r=0.9960$ 。两者线性关系良好,且拟合方程的斜率接近 1,表明凝胶溶蚀是控制其释放的主要因素。

3 讨论

鸦胆子油含有三油酸甘油酯(水解后的产物为油酸),其他类型的结合脂肪酸以及非酯化部分(包括油酸、亚油酸、亚麻酸、硬脂酸、棕榈酸、豆蔻酸、山嵛酸、花生烯酸等)。其中油酸和亚油酸被认为是其主要有效成分^[1-2],故本研究制备的鸦胆子油新制剂以油酸和亚油酸作为主要的评价指标。

[2] 石修璞, 赵浩如. 鸦胆子油的研究进展 [J]. 西北药学杂志, 2010, 25(3): 240-242.

[3] Jeong B, Kim S W, Bae Y H. Thermosensitive sol-gel reversible hydrogels [J]. *Adv Drug Deliver Rev*, 2002, 54(1): 37-51.

[4] Ruel-Gariépy E, Leroux J C. *In situ*-forming hydrogels-review of temperature-sensitive systems [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2004, 58(2): 409-426.

[5] 胡人杰, 董岸杰. 抗肿瘤药物可注射原位凝胶系统的药理学评价 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(3): 194-198.

[6] 郝吉福, 赵雪梅, 王建筑, 等. 温度敏感型盐酸小檗碱眼用原位凝胶的制备研究 [J]. 中草药, 2010, 41(4): 550-555.

[7] 朱静, 姜锋, 阎卉, 等. 硝酸毛果芸香碱眼用原位凝胶的制备和评价 [J]. 中草药, 2010, 41(5): 720-724.

[8] 蔡冰, 陈钢, 温露, 等. 鸦胆子油微囊中油酸与亚油酸含量的气相色谱法测定 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(5): 1057-1058.

[9] 陈钢, 胡平, 李晓芳. 地塞米松磷酸钠温敏凝胶的制备 [J]. 广东药学院学报, 2007, 23(5): 518-521.

[10] Desai S D, Blanchard J. *In vitro* evaluation of pluronic F127-based controlled-release ocular delivery systems for pilocarpine [J]. *J Pharm Sci*, 1998, 87(2): 226-230.

[11] 陈钢, 侯世祥, 秦凌浩. 动态流变实验评价温敏凝胶的方法研究 [J]. 中国药理学杂志, 2008, 43(6): 444-447.

[12] Cabana A, Ait-Kadi A, Juhász J. Study of the gelation process of polyethylene oxide_a-polypropylene oxide_b-polyethylene oxide_a copolymer (Poloxamer 407) aqueous solutions [J]. *J Colloid Interface Sci*, 1997, 190(2): 307-312.