

雷公藤红素环糊精与油自组装小珠载药系统的制备及其体外评价

夏海建^{1,2}, 张振海¹, 蒋俊^{1,2}, 孙桂青¹, 贾晓斌^{1,2*}

1. 江苏省中医药研究院 国家中医药管理局中药释药系统重点实验室, 江苏 南京 210028

2. 南京中医药大学, 江苏 南京 210046

摘要: 目的 制备雷公藤红素环糊精与油自组装小珠, 并对其进行体外评价。方法 采用连续振摇法制备雷公藤红素自组装小珠, 通过显微方法观察小珠的粒径和药物分布; 差示扫描量热方法考察药物形态; HPLC 法测定小珠的载药量和包封率; 并对载药小珠体外释放度进行了测定。结果 制得的载药小珠粒径 (1.49 ± 0.20) μm ; 载药量为 (87.21 ± 0.58) $\mu\text{g/g}$; 包封率为 $(80.14 \pm 1.24)\%$ 。差示扫描量热表明药物以非晶形态存在。荧光标记后激光共聚焦显微镜观察显示, 水难溶性药物主要分布在大豆油内核中。小珠在模拟肠液中 6 h 最大累积释药量可达 80%。结论 制备的自组装小珠载药系统工艺简单, 是一种有发展潜力的适用于水难溶性中药的药物传递系统。

关键词: 雷公藤红素; 自组装小珠; 体外评价; 差示扫描量热法; 非晶形态

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)19-2672-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.19.008

Preparation of self-assembled beads drug delivery system of tripterine based on cyclodextrin and oil as well as its *in vitro* evaluation

XIA Hai-jian^{1,2}, ZHANG Zhen-hai¹, JIANG Jun^{1,2}, SUN Gui-qing¹, JIA Xiao-bin^{1,2}

1. Key Laboratory of New Drug Delivery System of Chinese Materia Medica, Jiangsu Provincial Academy of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

2. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China

Abstract: Objective To prepare the self-assembled beads drug delivery system of tripterine based on cyclodextrin and oil, and to carry out its *in vitro* evaluation. **Methods** The beads were prepared by a continuously shaking starting from a mixture of cyclodextrin aqueous solution and oil. The bead diameter and drug distribution were investigated by microscopic observations, and drug disperse state was observed by differential scanning calorimetry (DSC). The drug-loading and entrapment efficiency of tripterine in beads were investigated by HPLC. The *in vitro* dissolution of tripterine in beads was also determined. **Results** The diameter was in the range of (1.49 ± 0.20) μm . The drug-loading and encapsulation efficiency of the prepared beads were (87.21 ± 0.58) $\mu\text{g/g}$ and $(80.14 \pm 1.24)\%$, respectively. DSC suggested that tripterine existed as amorphous form in beads. Confocal microcopy showed that the hydrophobic drug was localized inside the beads. The maximum cumulative release amount of tripterine in simulated intestinal fluid was more than 80% at 6 h. **Conclusion** The formulation and preparation process are practical and simple, and these beads have great potentialities for carrying hydrophobic drug.

Key words: tripterine; self-assembled beads; *in vitro* evaluation; differential scanning calorimetry; amorphous form

雷公藤红素是从传统中药雷公藤中提取的一种三萜类活性成分, 具有抗肿瘤、抗炎、免疫抑制和抗氧化等作用^[1-4]。但雷公藤红素脂溶性强, 几乎不溶于水, 口服生物利用度低, 严重影响了其临床疗效^[5]。本课题组在提高雷公藤红素口服生物利

用度方面做了系列探索研究^[6-8]。

最近有研究报道 1 种基于环糊精(cyclodextrin, CD)与油相互作用的新型自组装载药系统, 仅使用 CD、油和水 3 种材料在室温下连续振荡, 即可获得毫米尺寸的球状颗粒, 称为小珠(beads)^[9-10]。

收稿日期: 2013-05-02

基金项目: 江苏省中医药领军人才专项(2006 贾晓斌); 江苏省高等学校大学生创新训练计划项目(011042004000)

作者简介: 夏海建, 男, 硕士研究生, 研究方向为中药药剂新剂型研究。E-mail: haij-1988@163.com

*通信作者 贾晓斌 Tel/Fax: (025)85637809 E-mail: xiaobin_jia_nj@126.com

水难溶性药物溶解在油中,充分分散,有利于药物的吸收^[11]。其次,CD对于提高小珠的生物利用度也有很大的帮助^[12-13]。作为一种新型自组装载药系统,小珠为水难溶性药物和脂溶性药物的口服给药提供了新的解决方案,其在制备过程中不需使用任何表面活性剂或者有机溶剂,是很有发展前景的口服新剂型。本研究采用了不同类型的CD和油,以雷公藤红素为模型药物,来初步研究其制备工艺并对其进行体外评价。

1 仪器与试药

Waters 高效液相色谱仪(600 型泵,717 自动进样器,2996DAD 紫外检测器,Empower 数据处理系统,Waters 公司);DM4000 M 光学电子显微镜、TCS—SP5 激光共聚焦显微镜(德国徕卡公司);6390LV 扫描电子显微镜(日本电子公司),I—6 真空冷冻干燥仪(德国 Ehrsia 公司),DSC204 差热分析仪(德国 Netzsch 公司);数显气浴恒温振荡器(金坛市双捷实验仪器厂);ZRS—8G 型智能溶出试验仪(天津大学无线电厂);Mettler 204 十万分之一天平(梅特勒-托利多仪器有限公司)。

雷公藤红素对照品(质量分数 98%,上海源叶生物科技有限公司,批号 90106);雷公藤红素(南京泽郎医药科技有限公司,批号 ZL2012AAS,质量分数 >98%); α -CD(批号 C106777)、 β -CD(批号 C104384)、 γ -CD(批号 C103968)、大豆油(批号 S110245)均为药用级,阿拉丁试剂;丙三醇(南京化学试剂有限公司);液体石蜡(南京化学试剂有限公司);乙腈、甲醇为色谱纯,水为高纯水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 雷公藤红素小珠体外释放度测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Hedera ODS-2 C_{18} 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m);流动相为甲醇-水(85:15);检测波长 425 nm;柱温 30 $^{\circ}$ C;体积流量 1.0 mL/min;进样量 20 μ L。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取雷公藤红素对照品 6.56 mg 置 10 mL 量瓶中,用色谱甲醇溶解并定容至刻度,得到 0.656 mg/mL 对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密称取雷公藤红素小珠适量,精密加入 10 mL 的四氢呋喃-甲醇溶液(1:1),超声溶解,摇匀,11 000 r/min 离心 15 min,取上清液作为供试品溶液。

2.1.4 线性关系考察 精密吸取 1 mL 雷公藤红素

对照品溶液置于 25 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,得质量浓度为 26.24 μ g/mL 的对照品储备液,分别精密吸取储备液 0.5、1.0、2.0、3.0、5.0、8.0 mL 置于 10 mL 量瓶中,加入甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,分别进样,HPLC 测定。以雷公藤红素质量浓度为横坐标(X),其峰面积积分值为纵坐标(Y),得回归方程为 $Y=22.495 X-14.017$, $r=0.999 7$,结果表明雷公藤红素在 1.312~20.992 μ g/mL 线性关系良好。

2.1.5 体外释放度测定 精密称取雷公藤红素原料药和雷公藤红素小珠(相当于含等量的雷公藤红素),按照《中国药典》2010 年版二部附录 XC 桨法,以人工模拟肠液为释放介质^[11],调节转速 100 r/min,温度(37 $\pm$ 0.5) $^{\circ}$ C。每份样品平行测定 3 次,分别于 5、10、15、20、30、60、120、240、360、420 min 取样 5 mL,并立即补充同温度等体积的释放介质,以 0.45 μ m 微孔滤膜滤过,取续滤液按“2.1.1”项下方法进行 HPLC 测定,计算释放介质中雷公藤红素的量,并换算成累积释放率,绘制体外释放时间曲线图,结果见图 1。药物在小珠中的溶出速率和程度明显大于其原料药。雷公藤红素小珠在 5、15、30、60 min 时分别溶出 12.7%、34.81%、49.18%、60.74% 的药物,载药小珠在加入到肠液中能快速溶出,且在 6 h 雷公藤红素小珠在模拟肠液中的累积溶出率可达 80%,而雷公藤红素原料药溶出较慢,6 h 溶出量仅为 30%左右,这可能由于小珠在肠液的作用下,能够快速地破裂并释放出内部的药物,这与文献报道相一致^[14-15]。该结果说明小珠能够有效地促进药物在肠内的溶出。

2.2 雷公藤红素小珠的制备

2.2.1 环糊精和油的筛选 本实验分别尝试使用 3

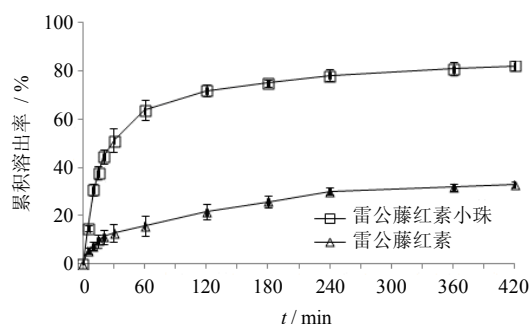


图1 雷公藤红素和雷公藤红素小珠在模拟肠液中的释药曲线

Fig. 1 Drug dissolution curves of tripterine and tripterine beads in simulated intestinal fluid

种环糊精(含6个吡喃葡萄糖单位的 α -CD、含7个吡喃葡萄糖单位的 β -CD及含8个吡喃葡萄糖单位的 γ -CD)和3种油(大豆油、甘油、液体石蜡)进行预试验。初步试验结果(表1)显示,只有 α -CD和大豆油才可以较好地形成小珠,其他组合均无法形成小珠。可能是由于 α -CD水溶性较好,而且内部空穴结构较小,能与油分子紧密结合,使用 β -CD虽然能够制备出稳定性较好的乳剂,但由于其水溶性较低,导致其与油结合形成的两性超分子较少,而难以自组装形成小珠,而 γ -CD内部空穴结构过大,影响其与油分子的结合能力而导致其乳化能力偏弱,从而难以形成小珠。因此,本实验最终选择 α -CD和大豆油来制备自组装小珠。

2.2.2 转速和温度的选择 除了辅料种类和用量之外,影响小珠制备的因素主要包括振荡速率和温度等。本实验主要研究温度和振荡速度对小珠制备的影响。研究发现, α -CD水溶液与大豆油混合振荡,

在不同制备条件下出现了油水不混溶液体、白色乳状液体、白色黏稠性混合物和小珠4种结果。实验结果表明,选择28℃、200 r/min条件能够较好地制备小珠。

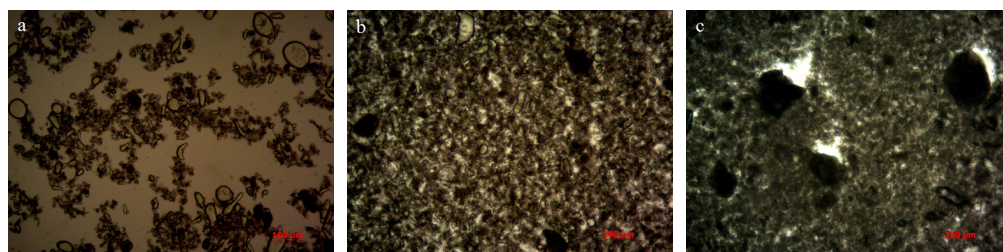
2.2.3 小珠的制备 取1.5 mL大豆油加入到含有0.405 g环糊精的10 mL水溶液中,将其置于恒温摇床中,调节转速(200 r/min)和温度(28℃),连续振荡,直至出现大量的小珠,除去其中溶液后,用蒸馏水清洗小珠,冷冻干燥48 h,即得干燥空白小珠,置于干燥器中保存备用。雷公藤红素载药小珠的制备,只需要在油中溶解一定量的药物,其余制备方法与空白小珠一致。

在空白小珠的制备过程中,分别于2、6、24 h吸取少量样品,并通过光学显微镜观察,结果见图2。振荡2 h后(图2-a)大豆油和 α -CD不能相混溶,仍可以清楚的分出油滴和固体材料 α -CD,且各自的大小和形状分布也是不均匀的;振荡6 h后(图2-b)有少量的小珠出现,且小珠的粒径较小;振荡24 h后(图2-c)可以观察到较多的小珠出现,且小珠的粒径明显增大。经6 d的振荡后,小珠大量混悬在水溶液中,呈现出半固态态且很容易被破坏。新鲜小珠照片(图3)表明,经水洗后的小珠几乎成均匀的球状,且粒径无明显差异。

表1 环糊精和油的筛选结果

Table 1 Results of CD and oil selection

环糊精	大豆油	甘油	液体石蜡
α -CD	可形成小珠	不可形成小珠	不可形成小珠
β -CD	不可形成小珠	不可形成小珠	不可形成小珠
γ -CD	不可形成小珠	不可形成小珠	不可形成小珠



a-振荡2 h后 b-振荡6 h后 c-振荡24 h后
a-2 h of shaking b-6 h of shaking c-24 h of shaking

图2 小珠制备过程中样品的光学电子显微镜图

Fig. 2 Optical electron micrographs of samples collected during bead process

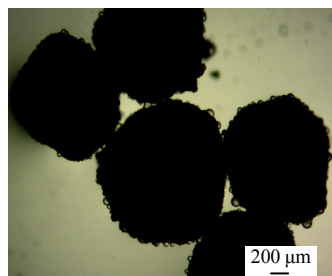


图3 水洗后空白小珠的光学显微镜图

Fig. 3 Optical micrographs of beads after washing

2.3 小珠的表征

2.3.1 粒径 随机抽取100粒冷冻干燥小珠,通过光学显微镜进行观察来测定各小珠的粒径,然后取平均值即得。图4显示,空白小珠和雷公藤红素小珠粒径没有明显的差异,制备的空白小珠的平均粒径为 (1.20 ± 0.20) mm,载药小珠的平均粒径为 (1.49 ± 0.20) mm,见表2。

2.3.2 小珠载药量和包封率 精密称取100 mg雷公藤红素小珠,研磨破碎后,向其中加入10 mL的

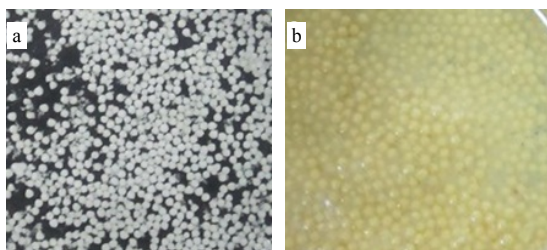


图 4 新鲜的空白小珠 (a) 和雷公藤红素小珠 (b)

Fig. 4 Photographs of fresh blank beads (a) and tripterine-loaded beads (b)

表 2 不同批次雷公藤红素小珠的粒径、载药量和包封率

Table 2 Bead size, drug loading, and encapsulation efficiency of different batches of tripterine

批次	空白小珠		载药小珠	
	粒径 / mm	粒径 / mm	载药量 / ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	包封率 / %
1	1.21 ± 0.15	1.46 ± 0.15	87.71	81.06
2	1.20 ± 0.20	1.51 ± 0.20	86.58	78.73
3	1.20 ± 0.20	1.49 ± 0.20	87.34	80.62

四氢呋喃-甲醇 (1:1) 溶液, 超声溶解, 直至雷公藤红素完全溶解, 11 000 r/min 离心 5 min, 取上清液, HPLC 测定雷公藤红素的量, 平行测定 3 次, 按公式计算载药量和包封率。载药量=小珠中雷公藤红素的质量 / 小珠的质量; 包封率=载入胶束的药物质量 / 油中雷公藤红素质量。结果见表 2。

2.3.3 扫描电镜法 (SEM) 分析 取数粒冷冻干燥后小珠, 在其表面真空镀金 70 s, 再通过扫描电镜观察雷公藤红素小珠表面结构特征。扫描电子显微镜结果 (图 5) 表明, 冷冻干燥后的小珠基本为球形, 表面凹凸不规则, 有突起物, 可能是环糊精不规则聚集的结果。

2.3.4 激光共聚焦显微镜观察 荧光标记小珠的制

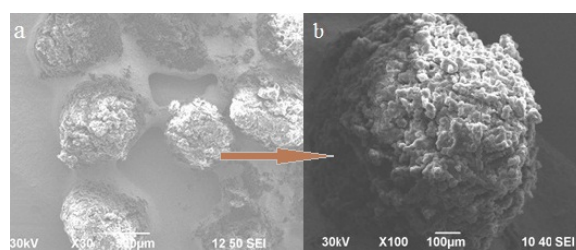


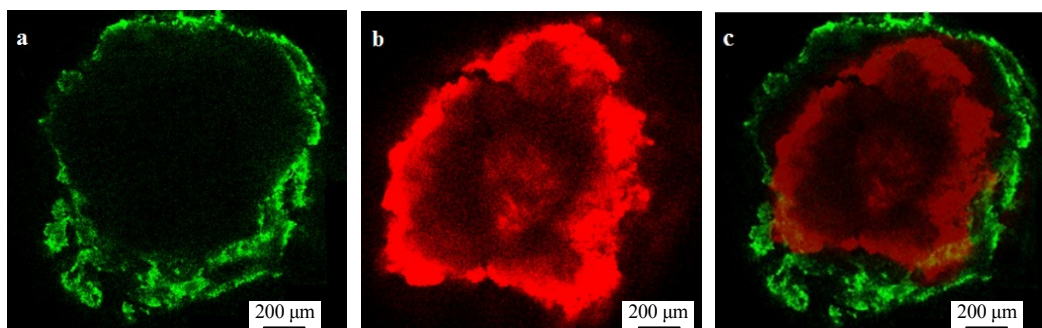
图 5 SEM 视野中的小珠

Fig. 5 SEM of beads in visual field

备与空白小珠的制备基本相同, 只是在过程中加入少量钙黄绿素 (或尼罗红) 溶解于 α -CD 水溶液 (或大豆油) 中。将不同荧光标记的小珠置于激光共聚焦显微镜下观察其荧光分布与强度。分别以 488 nm 激发波长观察钙黄绿素的分布, 获得绿色共聚焦图像; 以 543 nm 激发波长观察尼罗红的分布, 获得红色共聚焦图像。结果见图 6。实验结果表明, 钙黄绿素 (亲水性绿色荧光探针) 分布于小珠的表层 (图 6-a), 尼罗红 (亲脂性红色荧光探针) 分布于小珠的内部 (图 6-b), 这表明小珠内部有油的存在。两图叠加 (图 6-c) 推测可能是最终形成了脂质内核的小珠, 即溶有水难溶性或亲脂性药物的大豆油被包裹于环糊精之中, 且脂质性区域分布较大, 这样有利于负载更多的药物。

2.4 差示扫描量热 (DSC) 分析

以 Al_2O_3 为参比物, 升温速度 $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$, 升温范围 $0\sim400\text{ }^\circ\text{C}$, 分别对雷公藤红素原料药、 α -CD、大豆油、冷冻干燥后小珠 (将其研磨成粉末, 其中雷公藤红素的量与原料药相当) 及其相应比例的物理混合物进行 DSC 分析, 结果见图 7。从图 7 中 DSC 曲线可以看出, 雷公藤红素原料药在 $162.5\text{ }^\circ\text{C}$ 左右有一明显的放热峰, 在 $221\text{ }^\circ\text{C}$ 呈现出一明显的



a-小珠中钙黄绿素的分布图 b-小珠中尼罗红的分布图 c-前两图的叠加
a-fresh beads with calcein b-fresh beads with Nile red c-superposition of both a and b

图 6 激光共聚焦显微镜下的荧光分布图

Fig. 6 Fluorescence distribution photographs under confocal fluorescence microscope

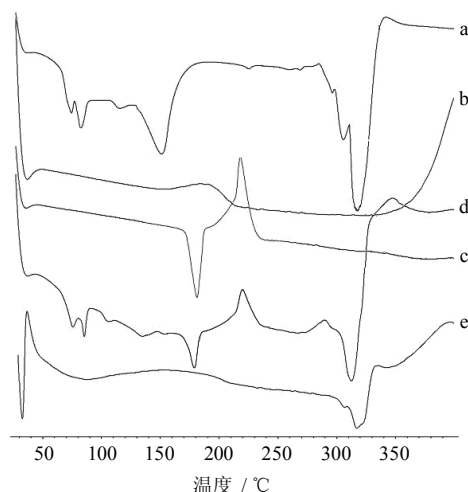


图7 α -CD (a)、大豆油 (b)、雷公藤红素原料 (c)、 α -CD 与大豆油和雷公藤红素的物理混合物 (d)、雷公藤红素载药小珠 (e) DSC 图

Fig. 7 DSC curves of α -CD (a), soybean oil (b), tripterine (c), physical mixture of α -CD, soybean oil, and tripterine (d), and tripterine beads (e)

吸热峰;其物理混合物仍呈现出雷公藤红素和 α -CD 的特征峰,表明该混合物只是原料药和载体的简单混合,但只有部分 α -CD 特征峰存在于物理混合物和小珠中,这需要进一步研究;而小珠中并没有出现药物的吸热峰或放热峰,说明载药小珠中雷公藤红素可能以非晶形态存在,且更利于促进药物溶出。

3 讨论

自组装小珠载药系统制备简单,小珠的整个制备过程仅使用环糊精、油和水,不涉及其他化学试剂的使用,而且制备条件温和,不会对药物造成过多的影响,其脂质内核能负载水难溶性药物和脂溶性药物,可提高药物的口服生物利用度,作为一种新型的环糊精与油自组装载药系统,小珠为水难溶性药物和脂溶性药物的口服给药提供了新的解决方案,具有很好的应用前景。然而 α -CD 价格较贵,今后可在对天然 CD 的筛选研究基础上,进一步研究内部空穴结构适中而且水溶性较好的 CD 衍生物,如羟丙基- β -环糊精。本研究中雷公藤红素小珠产率及载药量较低,有待进一步探讨。但目前小珠尚属于初步研究阶段,在处方工艺、释药性能、体内药动学等各方面还需要更多的研究。

参考文献

[1] Tozawa K, Sagawa M, Kizaki M. Quinone methide

tripterine, celastrol, induces apoptosis in human myeloma cells via NF- κ B pathway [J]. *Int J Oncol*, 2011, 39(5): 1117-1122.

- [2] 刘为萍, 刘素香, 唐慧珠, 等. 雷公藤研究新进展 [J]. 中草药, 2010, 41(7): 1215-1218.
- [3] 黄煜伦. 雷公藤红素纳米脂质体的制备及抗胶质瘤的实验研究 [D]. 苏州: 苏州大学, 2009.
- [4] Yang H J, Chen D, Cui Q C, *et al.* Celastrol, a triterpene extracted from the Chinese "thunder of god vine" is a potent proteasome inhibitor and suppresses human prostate cancer growth in nude mice [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(9): 4758-4765.
- [5] 薛 璟. 雷公藤主要成分肠吸收动力学研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2010.
- [6] 袁 菱, 周 蕾, 陈 彦, 等. 雷公藤红素纳米结构脂质载体的制备及其体外透皮研究 [J]. 中草药, 2012, 43(8): 1514-1518.
- [7] 胡绍英, 张振海, 蒋艳荣, 等. 雷公藤红素胶体二氧化硅缓释固体分散体研究 [J]. 中草药, 2013, 44(6): 692-695.
- [8] 夏海建, 张振海, 贾晓斌. 雷公藤红素缓释滴丸的研究 [J]. 中草药, 2013, 44(7): 834-838.
- [9] 刘 川, 易 涛. 环糊精与油制备自组装小珠载药系统的研究进展 [J]. 药学学报, 2012, 47(12): 1582-1586.
- [10] Bochot A, Trichard L, Le Bas G, *et al.* α -Cyclodextrin/oil beads: An innovative self-assembling system [J]. *Int J Pharm*, 2007, 339(1/2): 121-129.
- [11] Gursoy R N, Benita S. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs [J]. *Biomed Pharmacother*, 2004, 58(3): 173-182.
- [12] Leroy-Lechat F, Wouessidjewe D, Andreux J P, *et al.* Evaluation of the cytotoxicity of cyclodextrins and hydroxypropylated derivatives [J]. *Int J Pharm*, 1994, 101(1/2): 97-103.
- [13] Piel G, Piette M, Barillaro V, *et al.* Study of the relationship between lipid binding properties of cyclodextrins and their effect on the integrity of liposomes [J]. *Int J Pharm*, 2007, 338(1/2): 35-42.
- [14] Hamoudi M C, Fattal E, Gueutin C, *et al.* Beads made of cyclodextrin and oil for the oral delivery of lipophilic drugs: *In vitro* studies in simulated gastro-intestinal fluids [J]. *Int J Pharm*, 2011, 416(2): 507-514.
- [15] Hamoudi M C, Bourasset F, Domergue-Dupont V, *et al.* Formulations based on alpha cyclodextrin and soybean oil: An approach to modulate the oral release of lipophilic drugs [J]. *J Controlled Release*, 2012, 161(3): 861-867.