

青藤碱结肠给药微球的设计及体外释放研究

田亮¹,徐珊珊¹,薛洁¹,朱丽敏¹,胡欢^{2△}

(1. 上海德济医院·青岛大学第九临床医学院,上海 200331; 2. 上海市浦东新区浦南医院,上海 200125)

摘要:目的 以壳聚糖为囊材,丙烯酸树脂为包衣制备结肠释药微球,并评价其体外释药性能。方法 采用乳化交联法制备青藤碱壳聚糖微球,以粒径分布、载药量、包封率为考察指标,采用正交设计试验优化其制备工艺;将最佳工艺制备的微球用乳化干燥法包裹丙烯酸树脂肠衣,对所制得微球采用扫描电镜观察形态,并在模拟体内消化道实时 pH 变化环境下测试其体外释放能力。结果 制备的包肠衣载药微球在电镜下观察,呈球形,包衣均匀,粒径分布适宜,微球平均粒径为 $(23.51 \pm 7.12) \mu\text{m}$,平均包封率为 $(75.11 \pm 1.76)\%$;微球在 pH 动态药物释放中,前 3 h 人工胃液(pH=1.2)和胃肠混合液(pH=4.5)不释药,在人工肠液(pH=6.8)2 h 释药小于 7%,在人工大肠液(pH=7.4)24 h 释药接近 60%,而在含大鼠结肠内容物中 24 h 释药可达 70%。结论 按此优化处方及工艺制备、用丙烯酸树脂包衣的青藤碱壳聚糖微球具有良好的形态和包封率,并符合结肠释药的要求,为进一步研究奠定了基础。

关键词:青藤碱;结肠释药系统;壳聚糖;丙烯酸树脂;微球;体外释放

中图分类号:R965.2;R979.5

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2018)10-0008-04

Design and *in Vitro* Release of Chitosan Microspheres Containing Sinomenine for Colonic Drug Delivery

Tian Liang¹, Xu Shanshan¹, Xue Jie¹, Zhu Limin¹, Hu Huan²

(1. Shanghai Neuromedical Center, The Ninth Clinical Medicine School of Qingdao University, Shanghai, China 200331; 2. Shanghai Punan Hospital of Pudong New District, Shanghai, China 200125)

Abstract: **Objective** To prepare the colon drug delivery microspheres with chitosan as carrier and acrylic resin as coating material, and to evaluate their release properties *in vitro*. **Methods** Chitosan microspheres containing sinomenine emulsion was prepared by emulsion cross-linking method. The particle size distribution, drug loading, entrapment efficiency were taken as indicators, the orthogonal experimental design was used to optimize preparation. The microspheres prepared by the best process were encapsulated acrylic resin casing by emulsion drying method, and the morphology of prepared microspheres were observe by scanning electron microscopy, and the release properties *in vitro* were tested under pH real-time change of in the simulation digestive tract. **Results** The coated microspheres were observed by electron microscopy, they were spherical with coated uniformly, and the particle size distribution was suitable. The average diameter of the microspheres was $(23.51 \pm 7.12) \mu\text{m}$ and the average entrapment efficiency was $(75.11 \pm 1.76)\%$. No release of sinomenine from the microspheres was observed in the artificial gastric juice(pH=1.2) and in the artificial intestinal juice(pH=4.5) in the former 3 h, the release of sinomenine in artificial intestinal juice(pH=6.8) was less than 7% in 2 h, and the release of drug in artificial colon juice(pH=7.4) was close to 60% in 24 h, and the release in juice containing rat colon contents could reach 70% in 24 h. **Conclusion** Sinomenine chitosan microspheres prepared by the optimized formulation and technology and coated with acrylic resin have good morphology and encapsulation efficiency, which can conform to the requirements of colon-specific drug delivery, and lay a foundation for further research.

Key words: sinomenine; colon-specific drug delivery system; chitosan; acrylic resin; microsphere; *in vitro* release

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一组病因不明的慢性免疫性疾病,其发病机制可能为感染、饮食等环境因素作用于遗传易感人群,使肠免疫反应过度亢进导致肠黏膜受损^[1]。目前的传统治疗方法疗效不佳,且生物治疗价格又昂贵。青藤碱(sinomenine, SN)是从防己科植物青风藤及毛青藤的藤茎中提取的生物碱单体,临床常采用其盐酸盐形式来治疗多种免疫相关类疾病,如风湿、类风湿关节炎及红斑狼疮等,疗效显著^[2]。研究发现,SN可抑制小鼠肠道黏膜促炎因子

的分泌、显著改善结肠的病理状态,具有抗炎、抗溃疡及免疫调节作用^[3-4]。但盐酸青藤碱的半衰期短、生物利用度较低,有胃肠道刺激^[5],临床疗效不佳。结肠释药系统(colon specific drug delivery systems, CDDS)的优点是可避免口服药物在上消化道被破坏和释放,将药物直接输送到结肠,再以速释(脉冲)或缓释、控释方式给药,发挥局部或全身疗效。本研究中采用乳化交联法制备青藤碱壳聚糖微球,再用液中干燥法在微球表面包裹丙烯酸树脂,使用正交试验设计优选条件,以制备特异性高的

第一作者:田亮(1978-),男,硕士研究生,主管药师,研究方向为免疫药理学,(电子信箱)til777@foxmail.com。

△通信作者:胡欢(1979-),女,硕士研究生,副主任医师,研究方向为药理学,(电子信箱)huhuan@rhmg.org。

结肠释药系统应用于 IBD 的治疗。

1 材料与仪器

1.1 材料

盐酸青藤碱(西安森弗制药有限公司,批号 201007,含量 > 98%);青藤碱对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110774,含量 99%);壳聚糖(济南海得贝海洋生物工程有限公司,脱乙酰度 90.6%);丙烯酸树脂 II、III(上海浦力膜制剂辅料有限公司);丙酮、乙醚、冰醋酸、乙酸乙酯、span 80、无水乙醇等均为分析纯,戊二醛饱和甲苯溶液自行配置。

1.2 仪器

LD-101021 型冷冻干燥机(德国 Christ 公司);RHbasic-1 型磁力搅拌仪(德国 IKA 公司);S-3000N 型扫描电镜,U-0080D 型紫外分光光度仪(日本日立公司);光学显微镜(日本奥林巴斯公司);Shimadzu 200 型电子分析天平(日本岛津公司)。

2 方法与结果

2.1 青藤碱壳聚糖微球的制备

采用乳化交联法制备壳聚糖微球。取一定量的壳聚糖,逐量加入 3% 醋酸溶液中,40℃ 水浴加热至溶解,静置除去气泡后备用。精密称取盐酸青藤碱适量,溶于适量水中至完全溶解,再与壳聚糖溶液混合均匀作为水相。将青藤碱壳聚糖溶液缓慢匀速逐滴滴加到 5% span 80 的液状石蜡油相中,以不同速度搅拌,乳化 1 h 后,逐滴加入戊二醛饱和甲苯溶液,30 min 后再次加入戊二醛进一步交联固化 30 min,之后停止搅拌,以 2 000 r/min 的速率离心 5 min 使微球沉降。倾倒入上清液,沉淀微球分别用乙醚、乙酸乙酯清洗数次,丙酮挥干。精确称量所得微球质量,放入冷冻干燥机中干燥备用。

2.2 青藤碱壳聚糖微球的包衣

适量称取丙烯酸树脂 II、丙烯酸树脂 III(1:1, W/W)溶于 10 mL 丙酮与甲醇(1:1, V/V)的混合溶液中,混合均匀。称取上述制备好的含药壳聚糖微球按核:衣 = 1:1 或 1:2 加入到该溶液中,混合均匀。将此混合液逐滴加入到含 5% span 80 的 100 mL 液状石蜡中,1 000 r/min、40℃ 搅拌 4 h,直至丙酮、甲醇挥发干,停止搅拌,清洗、干燥同上,并称量微球质量。

2.3 粒径测量与表面形态分析

使用目镜含有标尺的光学显微镜分别测量青藤碱壳聚糖微球及包衣微球,随机测量其中 100 个微球的粒径,取平均值。使用扫描电镜观察微球表面形态,碳带固定,加速电压 20 kV,并照相。

2.4 青藤碱检测波长选择和标准曲线绘制

称取适量干燥的青藤碱对照品,置 50 mL 容量瓶中,加乙醇溶解,然后用水稀释至刻度,摇匀,制成 1 mL

含青藤碱 0.1 mg 的溶液。按照 2015 年版《中国药典(四部)》通则 0401“紫外-可见光分光光度法”^[6],在 200~400 nm 波长范围内扫描。结果表明,盐酸青藤碱的最大吸收波长为 265 nm。精密称取干燥至恒重的青藤碱对照品 25.0 mg,置 50 mL 容量瓶中,加适量乙醇溶解并以水稀释至刻度,摇匀,精密量取 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 mL,分别置 50 mL 容量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,按照紫外分光光度法,在 265 nm 波长处测定吸光度(A),以吸光度对质量浓度(C)进行线性回归,得标准曲线方程 $A = 0.0125C + 0.0184$, $r = 0.9999$ ($n = 6$)。同法绘制以人工胃液(pH = 1.2)、胃肠混合液(pH = 4.5)、人工肠液(pH = 6.8)、人工大肠液(pH = 7.4)、PBS 液为介质的标准曲线。结果表明,青藤碱质量浓度在 5~80 μg/mL 范围内与各种介质中吸光度均呈良好线性关系。

2.5 微球包封率与载药量测定

精密称取 20 mg 含药微球,加入 50 mL PBS 液(pH = 7.4),37℃ 下在摇床上以 100 r/min 的速率操作 48 h,后超声 2 min,样品以 1 000 r/min 的速率离心,取上清液过滤。精密量取滤液 5 mL 置 50 mL 容量瓶中,加 0.1 mol/L 盐酸稀释至刻度。采用紫外分光光度法在 265 nm 波长处测量吸光度,依据标准曲线算出青藤碱的质量浓度,并计算微球的载药量和包封率。含肠衣微球可将其外层肠衣先用甲醇洗尽,再测其包封率。载药量(LE,%) = 微球中青藤碱的质量/微球的质量 × 100%,包封率(ER,%) = 微球中青藤碱的质量/所投青藤碱的质量 × 100%。

2.6 正交试验设计法优化制备工艺

根据试验和文献[6],选取对微球性质影响最显著的 4 个因素为考察对象,即壳聚糖质量浓度(因素 A)、水油体积比(因素 B)、交联剂用量(因素 C)、搅拌速率(因素 D),每个因素设 3 个水平(见表 1)。

表 1 正交试验因素水平表

水平	因素 A (g/L)	因素 B (V/V)	因素 C (mL)	因素 D (r/min)
1	5	1:5	3	400
2	15	1:10	4	600
3	25	1:15	5	800

对相关因素及水平采用最佳工艺重复制备 2 批微球,取其包封率、载药量及粒径分布百分比的平均值为指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计优选最佳制备工艺条件,并用 Z 评分综合评价法^[7],对多指标进行归一化处理,评价试验结果。计算公式: $Z_i = (x_i - \bar{x}_i) / s_i$, $\bar{x}_i$ 为指标值, $\bar{x}_i$ 为指标均值, s_i 为标准差。 $\sum Z_i = \sum Z_{\text{高优}} - \sum Z_{\text{低优}}$ 。试验因素水平见表 1,正交设计结果见表 2。可

见,各因素对微球性质影响的大小顺序为 $C > A > B > D$ 。得出最优化的试验方案为 $A_2B_2C_1D_2$ 。即微球制备最佳工艺为壳聚糖质量浓度 15 g/L,水相:油相体积比为 1:10,交联剂 3 mL,搅拌速率为 600 r/min。

表2 $L_9(3^4)$ 正交试验结果

编号	因素				包封率 (%)	载药量 (%)	粒径分布 (%)	Z 评分
	A	B	C	D				
1	1	1	1	1	49.90	15.01	38.11	-0.15
2	1	2	2	2	70.60	20.57	11.23	0.94
3	1	3	3	3	47.31	15.16	20.85	-2.01
4	2	1	2	3	50.77	18.66	17.23	-0.65
5	2	2	3	1	72.50	13.71	39.41	1.01
6	2	3	1	2	81.31	19.17	26.57	2.65
7	3	1	3	2	37.07	14.52	36.61	-1.40
8	3	2	1	3	65.05	16.26	29.24	0.55
9	3	3	2	1	54.47	16.13	22.23	-0.96
K_1	-1.22	-2.20	3.05	-0.10				
K_2	3.01	2.50	-0.67	2.19				
K_3	-1.81	-0.32	-2.40	-2.11				
R	4.82	4.70	5.45	4.30				

优化工艺验证:采用最佳工艺重复制备 6 批微球,在干燥状态下呈棕黄色粉末,溶于无水乙醇,在光学显微镜下观察,微球呈淡黄色,表面光滑,球体均匀,流动性好,粘连少。扫描电镜下微球表面含有少量的药物结晶,详见图 1。测定微球包封率为 $(59.00 \pm 13.26)\%$,载药量为 $(16.10 \pm 4.51)\%$,20~100 μm 粒径分布为 $(33.58 \pm 1.83)\%$,平均粒径为 $(15.61 \pm 7.50)\mu\text{m}$ 。结果显示,优化工艺制备稳定,重复性好。

2.7 肠衣微球评价

采用肠衣丙烯酸树脂包裹优化制备青藤碱壳聚糖微球,通过光学显微镜和扫描电镜可以观察到,包裹前后微球粒径明显增加 5~10 μm ,微球呈不规则球状(图 1),粒径、包封率见表 3。

2.8 微球体外释放

试验根据模拟胃肠液动态的 pH 变化来测试接近

表3 含肠衣微球的粒径和包封率($n=3$)

核/衣质量比	平均粒径($\bar{X} \pm s, \mu\text{m}$)	包封率(%)
1:1	20.72 $\pm$ 8.03	67.67 $\pm$ 1.20
1:2	23.51 $\pm$ 7.21	75.11 $\pm$ 1.76

生理状态下微球的体外释放度。将微球精密称量后放入透析袋中,按释放度测定法[2015 年版《中国药典(四部)》通则 0931“溶出度与释放度测定法”]操作,注入同样递质的溶液 2 mL,扎紧袋口。置 98 mL 溶剂中,按如下时间点进行。递质 A:人工胃液($\text{pH}=1.2$),时间 1 h;递质 B:肠胃混合液($\text{pH}=4.5$),时间 2 h;递质 C:人工肠液($\text{pH}=6.8$),时间 2 h;递质 D:人工大肠液($\text{pH}=7.4$),时间大于 2 h。将递质 4 换为含 3% 大鼠结肠内容物来测定其模拟结肠的释放度,其他递质和时间点同上,100 r/min, $(37.0 \pm 1.0)^\circ\text{C}$ 动态透析,在设定时间取样,同时补加相同量的稀释液。样品过滤稀释后在 265 nm 波长处测定其吸光度,根据标准曲线推算质量浓度,计算微球累积释放百分数。

结果见图 2 和图 3。可知,未包衣的青藤碱壳聚糖

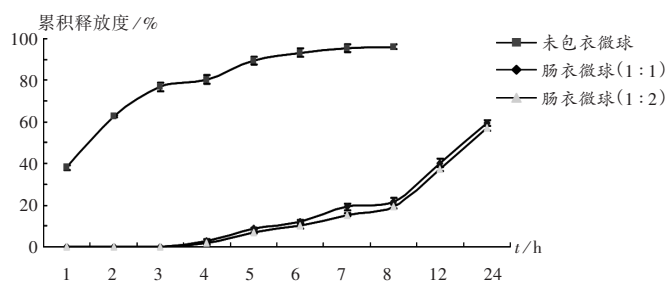


图2 37℃青藤碱微球及其肠衣微球在不同 pH 递质中的释放

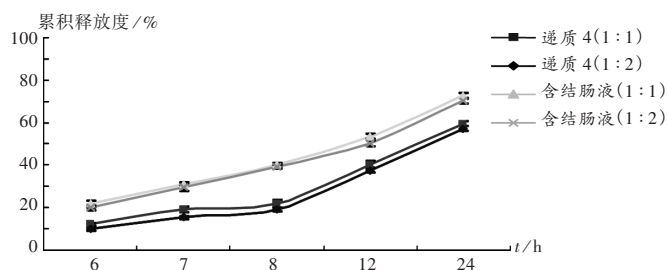
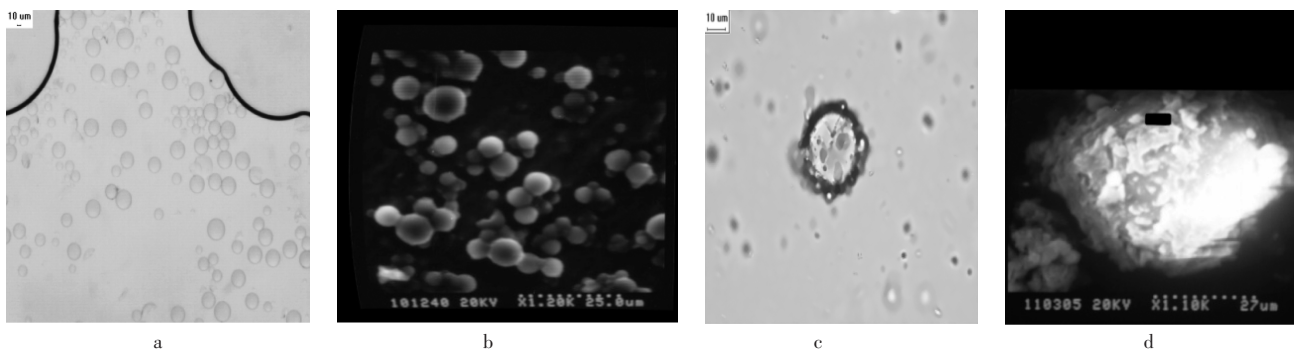


图3 不同核/衣比例肠衣微球在有/无大鼠结肠内容物的人工肠液中($\text{pH}=7.4$)的释放



a,b. 青藤碱壳聚糖微球 c,d. 丙烯酸树脂包裹的青藤碱壳聚糖微球

图1 光镜与扫描电镜下青藤碱壳聚糖微球形态

微球在前5 h内($\text{pH}=1.2\sim 6.8$)释放了将近80%的药物。包肠衣微球在模拟胃液中稳定无药物释放,直到 $\text{pH}>6$ 时才开始缓慢释放。数据显示,前3 h 2种不同比例衣材均未释放,进入 $\text{pH}=6.8$ 肠液中核衣比为1:1和1:2的微球释药的释放度分别为 $(8.91\pm 0.39)\%$ 和 $(6.73\pm 0.25)\%$,而在 $\text{pH}=7.4$ 的肠液中24 h后能达到 $(59.52\pm 1.23)\%$ 和 $(57.11\pm 1.13)\%$ 。若5 h后将 $\text{pH}=7.4$ 肠液置换成含大鼠结肠内容物肠液,结果表明,24 h未含内容物药物释放度分别为 $(72.54\pm 1.33)\%$ 和 $(70.31\pm 1.36)\%$ 。

3 讨论

目前,已开发的结肠释药系统中时滞型胃排空差,定位效果差,工艺复杂; pH 依赖型所用肠衣材料一般在 pH 介于6~7时溶解,因此可能提前释药,且肠道 pH 易受食物和疾病影响,个体差异大^[8]。壳聚糖是由甲壳素经脱乙酰化反应转变成相对分子质量为12万~59万的生物大分子,具有良好的生物相容性和生物降解性,可在结肠被特异性酶降解,同时其生物黏附性可使其黏附于黏膜表面,从而延长药物作用时间,故将其常用于结肠释药系统的载体^[9]。Dubey等^[10]用壳聚糖制成微球后采用肠溶聚合物包衣制成结肠靶向制剂,发现9 h后所载药物在结肠浓度最高,并且减少了药物在消化道的吸收和带来不良反应,具有结肠靶向释药作用。本试验中采取壳聚糖装载青藤碱,外层包裹丙烯酸树脂肠衣,制备了 pH 依赖型和酶促型相结合的口服结肠定位微球,利用丙烯酸树脂在胃中不溶,在偏中性的大肠液中可溶解的特点,将其包裹壳聚糖微球,避免壳聚糖受到强酸而溶胀的影响。使微球不受消化道介质的影响而在结肠被特定的菌群和酶降解,从而达到将装载于微球中的药物在结肠部位释放。并采用正交设计来筛选壳聚糖微球优化条件,用醛交联法制备的微球电镜观察结果显示,成球性好,形态圆整,粘连少,包封度达60%,且易制备。

结肠释药系统不但要保护所载药物在通过胃和小肠时不被破坏,而且要使药物在结肠释放,判断是否实现了结肠定位,是评价的关键。传统的体外溶出试验,由于不能模拟动态的胃肠道 pH 变化和结肠中大量细菌及内容物存在的生理环境,而不能准确地预测体内行为。Chourasia等^[11]的研究指出,以一定的 pH 时间变化梯度及加入啮齿类动物盲肠内容物的改良法,可弥补传统方法的不足。结果显示,释放试验中未包肠衣青藤碱壳聚糖微球,在最初的4 h突释了73%~80%,这并不符合药物结肠靶向的目的。而包裹丙烯酸树脂的微球,在 $\text{pH}>6.8$ 才开始释药,可显著阻止青藤碱在肠上段

释放。使用液中干燥法制备的含肠衣壳聚糖微球,根据核/衣质量比的不同平均粒径可为19~25 μm ,主要归因于多聚物浓度增加导致较大的乳化液滴,从而降低了药物的释放。本试验中将5 h之后的溶液换成 $\text{pH}=7.4$ 含有3% (W/V)大鼠结肠内容物来测量微球释放。当上述溶液中药物的释放度显著提高时,肠衣微球12 h释放50%以上,可推断结肠中含有的一些特异性酶加速了壳聚糖的生物降解。

本试验中采用醛交联法制备的青藤碱壳聚糖微球,经丙烯酸树脂肠衣包裹后能特异性地在结肠部位释放青藤碱,以初步探究中药结肠靶向药物在治疗IBD中应用的可能性,改善中药在吸收和定位方面的问题,但其治疗价值还需进一步通过动物试验和人体生物利用度的评价来证实。

参考文献:

- [1] Abraham C, Cho JH. Inflammatory bowel disease[J]. N Engl J Med, 2009, 361(21): 2066-2078.
- [2] 黄小鲁, 王 勇, 郝 飞. 青藤碱对机体免疫系统的影响及临床应用进展[J]. 医药导报, 2007, 26(4): 397-399.
- [3] 周国胜, 吴正祥, 杨九华, 等. 青藤碱对结肠炎大鼠基质金属蛋白酶的作用[J]. 世界华人消化杂志, 2008, 16(30): 3387-3393.
- [4] Cheng H, Xia B, Guo Q, et al. Sinomenine attenuates 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice[J]. Int Immunopharmacol, 2007, 7(5): 604-611.
- [5] 陈万一, 周远大, 康纪平, 等. 青藤碱在Beagle犬体内的药理学和绝对生物利用度研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(4): 468-471.
- [6] Kriznar B, Mateovic T, Bogataj M, et al. The influence of chitosan on in vitro properties of Eudragit RS microspheres[J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2003, 51(4): 359-364.
- [7] 赵应征, 鲁翠涛, 梅兴国. 常用多指标综合评价法在优选实验中的应用[J]. 医学研究生学报, 2004, 17(7): 624-626.
- [8] 于小华, 刘晓华, 赵浩如. 口服结肠靶向给药系统的研究概况[J]. 海峡药学, 2009, 21(7): 19-21.
- [9] Kosaraju SL. Colon targeted delivery systems: review of polysaccharides for encapsulation and delivery[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2005, 45(4): 251-258.
- [10] Dubey R, Dubey R, Omrey P, et al. Development and characterization of colon specific drug delivery system bearing 5-ASA and Camylofine dihydrochloride for the treatment of ulcerative colitis[J]. J Drug Target, 2010, 18(8): 589-601.
- [11] Chourasia MK, Jain SK. Design and development of multiparticulate system for targeted drug delivery to colon[J]. Drug Deliv, 2004, 11(3): 201-207.

(收稿日期: 2017-11-22)