

酶控渗透泵型结肠定位微丸的制备及体外释放度考察

杨志欣, 常爽, 谢丽, 杜素美(黑龙江中医药大学药学院, 哈尔滨 150040)

摘要: 目的 制备以果胶钙和醋酸纤维素为包衣材料, 5-氨基水杨酸(5-ASA)为模型药物的酶触发渗透泵型结肠定位微丸, 并考察其体外释药特征及释药机制。方法 采用包衣锅法制备含药丸芯, 选用 $L_9(3)^4$ 正交实验设计, 以体外释放度为评价指标优化包衣液处方及丸芯中渗透剂的用量, 并进行体外释药模型拟合。结果 制备 5-ASA 渗透泵酶触发微丸最佳工艺参数为: 包衣增重 25%; 药物与 NaCl(丸芯)比为 3:1; 醋酸纤维素与果胶钙(包衣液)用量比为 2:3。所得微丸在人工胃液中 2 h, 人工小肠液中 4 h 累计释放率 < 8%, 人工结肠液 12 h 累计释放率 > 70%, 表明结肠定位性较为突出, 且可以在结肠持续释放药物以维持局部药物浓度, 进一步研究释药机理表明为零级释放。结论 采用果胶钙与醋酸纤维素为包衣材料制备渗透泵酶触发结肠定位微丸可实现结肠定位作用。

关键词: 5-氨基水杨酸; 果胶钙; 微丸; 渗透泵

中图分类号: R943.4

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2011)05-0451-05

Preparation for Colon-specific Pellets Controlled by Enzyme Triggering Osmotic Pump and Its Investigation of the Release *in Vitro*

YANG Zhixin, CHANG Shuang, XIE Li, DU Sumei(College of Pharmacy, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To prepare colon-specific pellets controlled by enzyme triggering osmotic pump with coating materials of calcium pectate and cellulose acetate, and with 5-amino salicylic acid(5-ASA) as a model drug, as well as to investigate the characteristics and mechanisms of drug delivery *in vitro*. **METHODS** Pan coating was adopted to prepare medicine containing pellets. $L_9(3)^4$ orthogonal design was applied to optimize the formulation of coating solution and dosage of penetrant in pellets with evaluation index of release *in vitro*, while mathematical models of the *in vitro* drug release was fitted. **RESULTS** The optimum process parameters preparing for 5-ASA colon-specific pellets controlled by enzyme triggering osmotic pump was as follows: coating weight gain was 25%, the dosage ratio of 5-ASA to NaCl in pellets was 3:1, the dosage ratio of cellulose acetate to calcium pectate in coating solution was 2:3. The cumulative release rate of prepared pellets was lower than 8% in simulated gastric fluid (2 h) and in simulated intestinal fluid (4 h) while over 70% in simulated colonic fluid(12 h). All this showed that the pellets possessed excellent colon-specific performance and maintained local drug concentrations by a sustained release in colon. A further study on the release mechanism demonstrated that the *in vitro* drug release performance belonged to zero-order release. **CONCLUSION** Colon-specific pellets controlled by enzyme triggering osmotic pump with coating materials of calcium pectate and cellulose acetate have the function of colon-targeting.

KEY WORDS: 5-amino salicylic acid; calcium pectate; pellet; osmotic pump

一个理想的结肠定位给药系统应能阻止药物在胃和小肠中释放, 进入结肠时应能引起突然释放, 这就需要能感应结肠生理变化的触发因子。研究人员已经提出了几种结肠定向传递路径, 如: 药物前体、pH 依从性系统、时间依从性系统、微生物活化系统^[1-5]。目前已上市的 5-氨基水杨酸(5-ASA)结肠定位制剂主要为前 3 种, 但似乎均未达到理想状态。结肠菌的发酵活动逐渐被认作是实

现结肠定位给药的较好触发机制^[6-7], 本试验即采用此种释药机制, 通过薄膜包衣技术实现结肠定位。

1 仪器与材料

1.1 仪器

高效液相色谱仪系统(美国 Waters 公司, 2996 光电二极管阵列检测器, 2695 分离单元, Empower 色谱工作站); BY300A 型小型包衣机(上海黄海药检仪器有限公司); MP2000 电子天平(上海第二天

基金项目: 黑龙江省自然科学基金(D200627); 黑龙江中医药大学科研基金(200704)

作者简介: 杨志欣, 女, 博士, 副教授

Tel: (0451)82195724

E-mail: zhixin.y@163.com

平仪器厂); TN 型托盘式扭力天平(上海天平仪器厂); RC-8DS 智能溶出度测试仪(天津新天光分析仪器技术有限公司); 85-2A 数显测速恒温磁力搅拌器(江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司); 标准检验筛(浙江省上虞县纱筛厂); DZF-6090 型真空干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司)。

1.2 试药与试剂

5-ASA(上海金贸泰化工有限公司, 药用级, 含量 99.0%); 微晶纤维素(MCC, 上海金科贸易有限公司, 药用级辅料, 含量 97.0%~102.0%); PVP K30(上海蓝季科技发展有限公司, 进口分装, 纯度 $\geq 99\%$); 醋酸纤维素(CA, 上海醋酸纤维素厂, 分析纯); 果胶钙(实验室自制)。甲醇为色谱纯, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Diamonsil(R) C_{18} 柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m); 流动相: 甲醇-0.1 mol \cdot L $^{-1}$ 磷酸二氢钠水溶液(5:95); 流速: 1.0 mL \cdot min $^{-1}$; 检测波长: 296 nm; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 进样量: 20 μ L。

2.2 标准曲线制备

取五氧化二磷干燥器中干燥至恒重的 5-ASA 适量, 精密称取 12.8 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加入流动相定容至刻度, 摇匀备用。分别精密移取备用液 0.1, 0.25, 0.5, 1.25, 2.5, 5 mL 置 10 mL 量瓶中, 用流动相定容至刻度, 摇匀后经 0.45 μ m 微孔滤膜过滤, 取续滤液, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 记录色谱图, 以 5-ASA 峰面积(A)为纵坐标, 浓度(C , mg \cdot mL $^{-1}$)为横坐标进行线性回归, 在 5.2~260 μ g \cdot mL $^{-1}$ 内, 回归方程为 $A=8.13 \times 10^6 C-6490$, $r=0.9998$ 。见图 1。

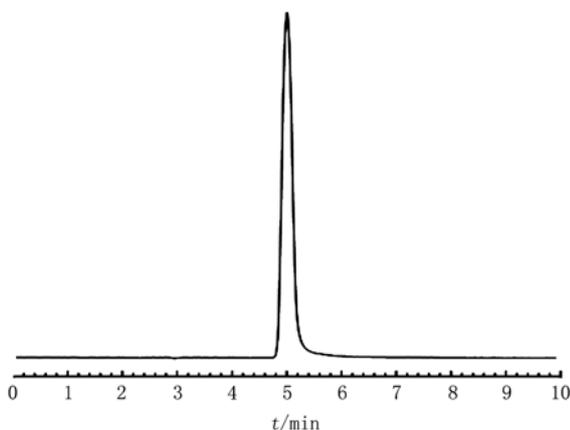


图 1 5-ASA 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatogram of 5-ASA

2.3 辅料干扰实验

5-ASA 微丸辅料的紫外吸收光谱(200~400 nm)表明辅料不存在紫外吸收, 不干扰测定。

2.4 回收率与精密度试验

按处方量 120%, 100%, 80% 精密称取 5-ASA 对照品适量, 分别加处方比例辅料, 以流动相配制高、中、低 3 种浓度的 5-ASA 溶液。按“2.1”项下测定峰面积, 得测定值。测定值与加入量比较, 计算 5-ASA 平均回收率为 $(100.07 \pm 2.21)\%$ 。低、中、高 3 个浓度, 分别于 1 d 内测定 3 次, 连续 3 d, 每日测定 1 次, 根据药物峰面积计算日内、日间精密度。结果日内精密度 RSD $<1.23\%$, 日间精密度 RSD $<1.23\%$ 。

2.5 样品含量测定

取 3 批干燥至恒重的 5-ASA 未包衣微丸适量, 分别置于研钵中, 用适当的力度将微丸研碎(保证空白丸芯不被研碎), 去除空白丸芯, 将研细的粉末过 100 目筛。取过筛的 3 批上述细粉适量, 精密称取 4.13, 4.01, 4.11 mg, 分别置 25 mL 量瓶中, 加入流动相约 20 mL, 超声 30 min, 放置到室温, 用流动相定容, 摇匀, 过 0.45 μ m 微孔滤膜过滤, 取续滤液按“2.1”项下色谱条件进行测定, 记录峰面积, 代入标准曲线, 计算 3 批未包衣微丸(不含空白丸芯)中 5-ASA 含量, 结果平均含量为 66.54%。色谱图见图 2。

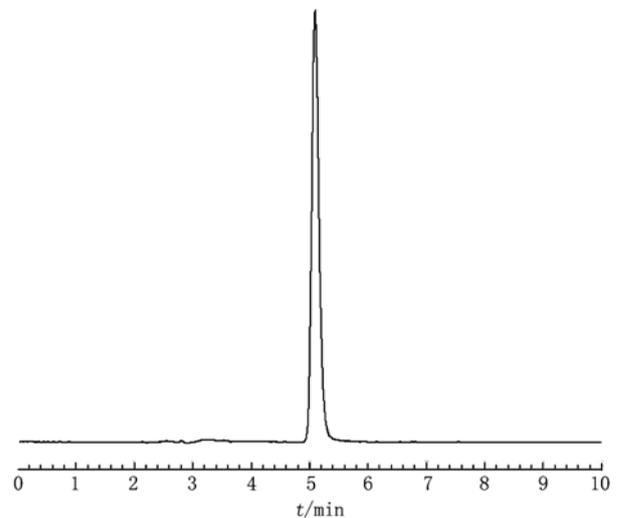


图 2 样品高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatogram of sample

2.6 大鼠盲肠内容物(RCM)的配制^[7]

取 5 只 SD 大鼠[每只体重 200~300 g, 正常饮食, 实验动物由长春高新医学动物实验研究中心提

供, 动物质量合格证号: SCXK(吉)20030004]。在试验前7 d开始每日灌胃2%果胶溶液2 mL, 以此来激活存在于结肠的果胶酶。试验前30 min将大鼠腹腔注射过量的乌拉坦, 使之死亡。打开腹腔, 找出盲肠, 结扎两端, 剪下后用减重法将盲肠内容物称重, 并将内容物混悬于5%碳酸氢盐缓冲溶液(称取NaHCO₃ 9.240 g, Na₂HPO₃ 7.125 g, NaCl 0.47 g, KCl 0.45 g, CaCl₂ 0.073 g, MgCl₂ 0.087 g, 加蒸馏水稀释至1 000 mL, 即得)中, 取其上清液备用。在RCM的制备过程和模拟结肠环境的体外释放度实验过程中, 始终通入N₂以模拟人体结肠道内的无氧环境。

2.7 释放度测定

按中国药典2010年版二部附录XD释放度测定法, 称取适量包衣微丸, 依次置于3种[0.1 mol·L⁻¹ HCl、pH 6.8磷酸盐缓冲溶液(PBS)、RCM]去空气的新鲜溶出介质中, 温度37 °C, 转速75 r·min⁻¹, 在900 mL 0.1 mol·L⁻¹ HCl溶出2 h, 在900 mL pH 6.8 PBS溶出4 h, 均采用转篮法, 在100 mL RCM中溶出12 h, 采用小杯浆法。每次变换溶出介质时, 微丸用蒸馏水冲洗3次, 变换操作在5 min内完成。定时取样2 mL, 及时补加2 mL相应的释放介质, 0.45 μm微孔滤膜过滤, 取续滤液, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 记录峰面积, 代入标准曲线方程, 计算各取样点5-ASA的浓度, 计算释药量及累积释药百分率。

2.8 微丸的制备

2.8.1 载药微丸的制备 采用包衣锅法, 将MCC空白丸芯置包衣锅中, 将药物、MCC和NaCl按一定比例(见正交表1)混匀后, 以4%PVPK30溶液为黏合剂, 喷入适量黏合剂使空白丸芯表面湿润, 撒入药物与辅料的混合粉, 滚圆, 干燥后再如上操作, 使之滚转长大, 直至得到大部分粒度范围在16~20目间的小丸, 停止供粉和黏合剂, 将微丸在包衣锅内继续滚转45 min使其滚实, 60 °C干燥4 h, 收集16~20目微丸, 即得。

2.8.2 包衣微丸的制备

2.8.2.1 包衣液的配制 将自制果胶钙用粉碎机粉碎, 过400目筛。用丙酮配制一定浓度的CA溶液, 加入邻苯二甲酸二丁酯(DBP)为增塑剂, 其用量为处方中CA的30%, 再按比例加入处方量的果胶钙, 搅匀即得。

2.8.2.2 包衣工艺 取一定量的素丸置于包衣锅

中, 将其预热5 min, 调节喷雾枪的物化压力, 包衣温度为50 °C, 包衣液流速为1.5 mL·min⁻¹, 包衣锅转速为55 r·min⁻¹。直至微丸达到一定的包衣增重, 继续吹入热空气30 min, 再在40 °C温度下干燥5 h, 取出过筛, 即得(注: 包衣过程中, 包衣液要不断搅拌)。

包衣增重=(包衣后重量-包衣前重量)/包衣前重量×100%

2.9 微丸包衣处方及助渗剂用量优选

2.9.1 正交实验优选处方组成 采用L₉(3⁴)正交试验表进行正交设计优化微丸处方。选择影响药物释放的3个因素: A: 包衣增重; B: NaCl用量(药量: NaCl); C: 果胶钙用量(CA: 果胶钙), 因素水平见表1。

本试验采用加权评分法, 对正交试验结果进行分析, 选择3个评价指标: ①药物在0~6 h的累积释放度L₁, 以0%为标准, 权重系数为1; ②药物在6~18 h的累积释放度L₂, 以80%为标准, 权重系数为2; ③药物在6~18 h的累积释放度同释放时间 t 的线性关系作为评价指标, 以 r 为0.999 9为指标, 权重系数为2。L越小, 表示处方越接近理想的结肠定位效果。计算公式为: $L=|L_1-0\%| \times 100 \times 1+|L_2-80\%| \times 100 \times 2+|r-0.999 9| \times 100 \times 2$

表1 正交实验因素水平表

Tab 1 Factors and levels of formulation for orthogonal test

水 平	因 素		
	A	B	C
1	20%	4 : 1	5 : 4
2	25%	3 : 1	1 : 1
3	27%	2 : 1	2 : 3

2.9.2 结果 按L₉(3⁴)正交表和因素水平表安排试验确定包衣最优处方, 正交试验结果见表2。

由极差R可知, 各因素对药物的释放影响顺序为C(CA: 果胶钙)>A(包衣增重百分比)>B(药量: NaCl)。因此, A, B, C 3因素的最佳水平为A₂B₂C₃。

以此条件制备包衣微丸, 3批包衣微丸进行释放度实验, 并绘制释放度曲线, 结果见图3。采用美国FDA推荐使用的相似因子法(similarity factor, f_2)分析其相似性^[8], 即 $f_2=50 \times \lg\{[1+1/n \sum (Y_{Rt}-Y_{Tt})^2]^{-0.5} \times 100\}$, 其中 Y_{Rt} 和 Y_{Tt} 分别代表参比和受试制剂在 t 时间的累积释放度; n 为测试点数。 f_2 为100时, 代表两条

表 2 正交试验设计结果表

Tab 2 The design and results of formulation for orthogonal test

序号	A	B	C	D	L ₁ /%	L ₂ /%	r	L
1	1	1	1	1	2.05	29.96	0.867 4	128.63
2	1	2	2	2	7.20	52.22	0.996 2	63.50
3	1	3	3	3	22.63	71.65	0.942 8	50.75
4	2	1	2	3	7.00	49.53	0.998 0	68.32
5	2	2	3	1	7.24	72.09	0.994 3	24.18
6	2	3	1	2	2.62	10.45	0.982 0	145.3
7	3	1	3	2	3.69	36.19	0.992 7	92.75
8	3	2	1	3	1.20	4.66	0.992 8	153.3
9	3	3	2	1	4.58	58.91	0.995 9	47.56
K1	80.960	96.567	142.410	66.79				
K2	79.267	80.327	59.793	100.517				
K3	97.870	81.203	55.893	90.790				
R	18.603	16.240	86.517	33.727				

释放曲线完全重合, f_2 越小, 两条曲线的不相似性越大。美国 FDA 规定 f_2 值在 50~100 之间代表参比和受试制剂的释放曲线相似。

结果表明 3 批微丸的 f_2 值均 >50%, 相似度良好。L 平均值为 29.07, 正交试验结果相近。

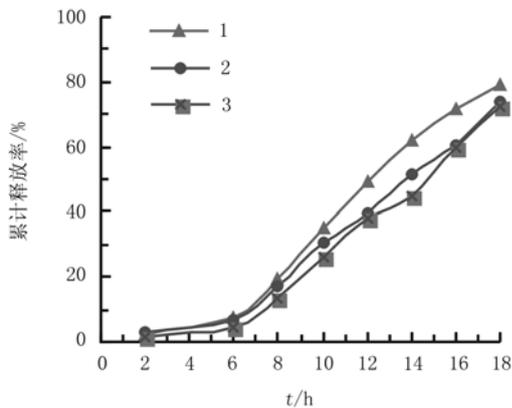


图 3 3 批样品的释放度曲线

Fig 3 The release curve of three batches coated pellets

2.10 释药动力学模型拟合^[7]

按最佳处方制备包衣微丸, 根据中国药典 2010 年版二部附录 XIX D 缓释、控释及迟释制剂指导原则, 选用了零级释药模型、一级释药模型(即单指数模型)、Higuchi 方程 3 种模型, 将 6~18 h 各取样时间点的实测数据分别与这 3 个动力学模型进行拟合, 用相关系数(r)为判断依据, 结果见表 3。可知, 5-ASA 结肠定位微丸的释药曲线以零级释药方程拟合时, r 最大, 拟合最佳。因此, 零级释药

模型为 5-ASA 结肠定位微丸释放的最佳拟合模型。

表 3 体外释放模型拟合结果

Tab 3 Results of model fitting analysis

模型	方程	r
零级释药	$M_t/M_\infty=0.055t-0.260 7$	0.998 9
一级释药	$\ln(1-M_t/M_\infty)=-0.200 6t+0.416 8$	0.981 1
Higuchi 方程	$M_t/M_\infty=0.368 7t^{1/2}-0.859$	0.996 4

3 讨论

本试验拟将渗透泵技术与酶触发结肠定位机制结合研究口服 5-ASA 结肠定位片, 一方面可以实现准确结肠定位的作用效果, 另一方面通过加入助渗透物质使药物持续向外释放。研究结果表明, 以果胶钙作为致孔剂、NaCl 作为助渗透物质基本可以实现上述设计, 且释药过程为零级释放。

实验数据表明药物在胃和小肠仍有少量释放, 分析可能果胶钙的钙化程度有关, 关于果胶钙的钙化程度、钙离子浓度对释放的影响, 将另文报道。

REFERENCES

- [1] RUBINSTEIN A. Approaches and opportunities in colon-specific drug delivery [J]. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 1995, 12(2/3): 101-149.
- [2] YANG L, CHU J S, FIX J A. Colon-specific drug delivery: new approaches and *in vitro/in vivo* evaluation [J]. Int J Pharm, 2002, 235(1/2): 1-15.
- [3] FRIEND D R. Colon-specific drug delivery [J]. Adv Drug Deliv Rev, 1981, 7(1): 149-199.
- [4] BASIT A W. Oral colon-specific drug delivery using amylose-based film coatings [J]. Pharm Tech Europe, 2000, 12(2):

30-36.

- [5] YANG L, WATANABE S, LI J, et al. Effect of colonic lactulose availability on the timing of drug release onset *in vivo* from a unique colon-specific drug delivery system (CODES™) [J]. Pharm Res, 2003, 20(3): 429-434.
- [6] MCCONNELL E L, SHORT M D, BASIT A W. An *in vivo* comparison of intestinal pH and bacteria as physiological trigger mechanisms for colonic targeting in man [J]. J Control Release,

2008, 130(2): 154-160.

- [7] HUI L. Study on budesonide colon-targeted site-specific dosage form[D]. Shenyang: Shenyang pharmaceutical university, 2007, 21.
- [8] MOORE J W, FLANNER H H. Mathematical comparison of dissolution profiles [J]. Pharm Tech, 1996, 20(6): 64-74.

收稿日期: 2010-06-30