

蒿甲醚口服微乳原位凝胶的制备与评价

薛鸿娇¹, 唐华争¹, 张琪¹, 郭坤坤¹, 杨兆祥², 蔡铮^{1*}

(1. 南方医科大学药学院, 广东省新药筛选重点实验室, 广州 510515;

2. 昆药集团股份有限公司 药物研究院, 昆明 650100)

[摘要] 目的: 优选蒿甲醚口服微乳原位凝胶的处方, 并对其性质进行评价。方法: 以流动性和凝胶性为指标筛选水相, 通过溶解度、相容性、制剂稳定性和黏附性的考察确定处方组分, 采用伪三元相图筛选微乳原位凝胶区域, 优选蒿甲醚微乳原位凝胶的最优处方, 并对其形态、粒径、Zeta 电位、黏度、稳定性、凝胶性以及体内胃滞留时间进行评价。结果: 蒿甲醚微乳原位凝胶的最优处方为蒿甲醚-三乙甘油酯-聚氧乙烯蓖麻油-二乙二醇单乙基醚-(0.3% 结冷胶-0.1% 低黏度海藻酸钠) (0.5:4.5:5:5:5:85), 药物浓度约 $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 透射电镜下观察乳滴呈球形, 平均粒径 20.90 nm, 多分散指数 (PDI) 0.172, Zeta 电位 -19.5 mV , 黏度 $15.32 \text{ mPa}\cdot\text{s}$, 在室温条件下稳定。大鼠口服蒿甲醚微乳原位凝胶后, 微乳原位凝胶在胃中快速发生相变形成凝胶, 6 h 后依然能在大鼠的胃中观察到凝胶并检测出蒿甲醚。结论: 蒿甲醚微乳原位凝胶改善了蒿甲醚的溶解度, 在胃部凝胶性能良好, 能有效延长蒿甲醚的胃滞留时间, 且黏度适宜, 适合口服给药。

[关键词] 蒿甲醚; 微乳; 原位凝胶; 口服给药; 伪三元相图; 胃滞留时间; 结冷胶

[中图分类号] R22; R289; R283.6; R284; R94 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)09-0029-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20180903

Preparation and Evaluation of Artemether Oral Microemulsion-*in situ* Gel

XUE Hong-jiao¹, TANG Hua-zheng¹, ZHANG Qi¹, GUO Kun-kun¹, YANG Zhao-xiang², CAI Zheng^{1*}

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory of New Drug Screening, School of Pharmaceutical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China;

2. Institute of Pharmaceutical Research, KPC Pharmaceuticals Inc., Kunming 650100, China)

[Abstract] **Objective:** To screen the optimal formula for artemether oral microemulsion-*in situ* gel and evaluate its properties. **Method:** With liquidity and gelation capacity as indexes, the water phase was determined. The composition was screened by solubility assay, compatibility test, stability and adhesiveness of microemulsion-*in situ* gel system. Pseudoternary phase diagram was used to optimize the formula. The morphology, particle size, Zeta potential, viscosity, stability, gelation and gastric retention time *in vivo* of artemether microemulsion-*in situ* gel were investigated, respectively. **Result:** The optimal formula was as follows: artemether: glyceryl triacetate: cremophor EL35: transcitol HP: (0.3% gellan gum-0.1% sodium alginate with low viscosity) = 0.5:4.5:5:5:5:85, the concentration of artemether in the microemulsion-*in situ* gel about $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Artemether microemulsion-*in situ* gel in transmission electron microscope consisted of small spherical droplets, mean particle size, polydispersity index (PDI), Zeta potential, viscosity of the drug delivery system were 20.90 nm, 0.172, -19.5 mV and $15.32 \text{ mPa}\cdot\text{s}$, respectively. After oral administration, it gelled in the stomach of rats immediately; six hours later, gel could still be observed and artemether could be detected in the stomach. **Conclusion:** The solubility of artemether is significantly increased in microemulsion-*in situ* gel. The artemether

[收稿日期] 20170915(012)

[基金项目] 广东省自然科学基金项目(2016A030313562)

[第一作者] 薛鸿娇, 硕士, 从事新型给药系统的研究, Tel:020-61648597, E-mail: xuehongjiao@sina.com

[通信作者] * 蔡铮, 博士, 副教授, 从事新型给药系统的研究, Tel:020-61648597, E-mail: caizheng2002@sina.com

microemulsion-*in situ* gel has characteristics of good gelation in stomach and suitable viscosity, it not only can prolong the gastric retention time of artemether but also is suitable for oral administration.

[Key words] artemether; microemulsion; *in situ* gel; oral administration; pseudoternary phase diagram; gastric retention time; gellan gum

蒿甲醚是青蒿素的甲基醚衍生物,目前在临床上主要用于疟疾的治疗。近年来,蒿甲醚的抗肿瘤作用日益受到重视,相关的研究也越来越多,其作为抗肿瘤药物已逐渐被国内外学者认可^[1]。其中,有研究报道蒿甲醚在体外对胃癌细胞有一定的杀伤和抑制作用,体内可显著抑制人胃癌细胞裸鼠移植瘤的生长,其抑制作用可能与蒿甲醚抑制增殖细胞核抗原(PCNA)和 B 淋巴细胞瘤-2 基因(Bcl-2)蛋白表达,促进 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)表达,从而阻滞细胞周期、诱导细胞凋亡和坏死有关^[2-4]。与其他肿瘤化疗药物相比,蒿甲醚毒副作用小且价廉,因此将其开发成新型有效的肿瘤化疗药物或辅助化疗药物并运用于临床上胃癌的治疗,具有广泛的应用前景。但蒿甲醚存在水溶性差、半衰期短、生物利用度低等缺点^[5-6]。目前国内蒿甲醚市售的制剂主要是片剂、胶囊剂和油溶注射剂^[7-9]。对于普通的制剂,很难在病灶部位达到足够的药物浓度。因此,为增加蒿甲醚在胃部的浓度,延长作用时间,达到有效治疗胃癌的目的,需对蒿甲醚进行新剂型的开发。

将药物直接输送到病灶部位,增大病灶部位的药物浓度,是提高药效的有效途径。例如 Ohta 等^[10]研制了顺铂原位凝胶剂,腹腔注射后,在腹腔内形成凝胶,延缓了顺铂释放并有效抑制了胃癌腹膜转移;WANG 等^[11]制备了 5-氟尿嘧啶温敏性微乳原位凝胶,可提高结肠部位 5-氟尿嘧啶的浓度,用以结肠癌的治疗。微乳原位凝胶是指以适宜的成分和比例将药物、油、表面活性剂、助表面活性剂、凝胶基质混匀后形成外观透明、澄清的热力学稳定体系,该体系以溶液状态给药后,在生理条件下可迅速形成凝胶。作为新型的给药载体,微乳原位凝胶结合了微乳和凝胶的优点,可提高亲脂性药物的水溶性、延长药物在疾病部位的滞留时间、提高药物的生物利用度,且给药剂量准确、重复性好^[12-13]。近年来微乳原位凝胶已被广泛用于局部用药研究,如眼部、鼻腔和直肠给药等^[11,14-15],但有关其用于口服胃肠道定位给药的研究报道较少。

本实验通过绘制伪三元相图对凝胶基质(水相)和油相、表面活性剂、助表面活性剂进行处方优选,以制备蒿甲醚口服微乳原位凝胶,并对该制剂的质量进

行评价,为蒿甲醚临床用于治疗胃癌提供一种合理、有效且较易实现工业化生产的新型纳米给药系统。

1 材料

Infinity 1290 型超高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),BT25S 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司),JK-DMS-II 型磁力加热搅拌器(上海精学科学仪器有限公司),RC806D 型溶出试验仪(天津市天大天发科技有限公司),MS3 digital 型涡旋振荡器(德国 IKA 公司),S14-2 型空气摇床(美国 Shellab 公司),5810R 型冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司),Zetasizer Nano ZSP 型纳米粒度电位仪(英国马尔文仪器有限公司),NDJ-8S 型数显式旋转黏度计(上海衡平仪器仪表厂),H-9500 型透射电镜(日本日立公司)。

蒿甲醚(昆明制药集团股份有限公司,批号 I20141022,纯度 $\geq 99.8\%$),橄榄油和三乙酸甘油酯[阿拉丁试剂(上海)有限公司],油酸乙酯(上海飞祥化工厂),油酸聚乙二醇甘油酯、辛酸癸酸聚乙二醇甘油酯(labrasol)和二乙二醇单乙基醚(transcutol HP)均购于法国佳法赛公司,聚山梨酯-80(tween-80)和 tween-20(广州化学试剂厂),聚氧乙烯蓖麻油(cremophor EL35,德国 BASF 公司),聚乙二醇 400(PEG400,国药集团化学试剂有限公司),结冷胶(Kel,Kelcogel® CG-LA,美国 Kelco 公司),低黏度海藻酸钠(L-Alg)和高黏度海藻酸钠(H-Alg)均购自 FMC 公司,羟丙基甲基纤维素 K4M(HPMC,上海卡乐康包衣技术有限公司),羧甲基纤维素钠(CMC-Na,天津市福晨化学试剂厂),卡波姆 971(carbopol,上海昌为医药辅料辅料技术有限公司),明胶(gelatin,法国 Rousselot 公司),水为超纯水,乙腈、甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

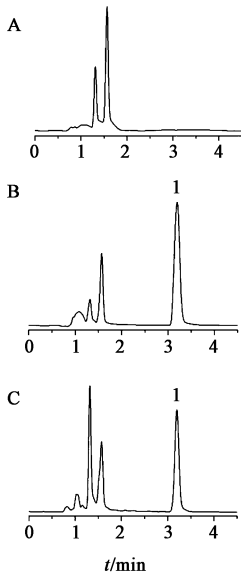
健康雄性 SD 大鼠,清洁级,体质量 250~280 g,由南方医科大学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(粤)2011-0015,本文涉及的动物实验均符合实验动物福利和伦理学要求;新鲜猪胃购自广州市广之福购物中心。

2 方法与结果

2.1 蒿甲醚分析方法的建立

2.1.1 色谱条件 Bonshell C₁₈ 色谱柱(3.0 mm ×

100 mm, 2.7 μm), 流动相乙腈-水 (75 : 25), 流速 0.4 mL \cdot min⁻¹, 检测波长 210 nm, 进样量 10 μL , 见图 1。



A. 空白溶剂[乙腈-水(2:1)]; B. 对品; C. 供品; 1. 蒿甲醚
图 1 蒿甲醚的 UPLC

Fig.1 UPLC chromatograms of artemether

2.1.2 标准曲线的绘制 精密称取蒿甲醚 100 mg 于 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容, 得 10 g \cdot L⁻¹蒿甲醚储备液。精密量取蒿甲醚储备液, 加乙腈-水 (2:1) 稀释并定容, 得质量浓度为 12.5, 25, 50, 100, 200, 400, 800 mg \cdot L⁻¹的系列溶液, 按 2.1.1 项下色谱条件测定, 以峰面积为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 得回归方程 $Y = 1.0858X + 0.2046$ ($r = 0.9999$), 线性范围 12.5 ~ 800 mg \cdot L⁻¹。

2.1.3 精密度考察 配制质量浓度分别为 12.5, 200, 800 mg \cdot L⁻¹的蒿甲醚溶液, 按 2.1.1 项下色谱条件测定, 同 1 d 内连续进样 5 次, 连续测定 3 d, 记录蒿甲醚峰面积, 结果日内精密度的 RSD 依次为 2.6%, 1.1% 和 0.5%, 日间精密度的 RSD 依次为 2.7%, 2.0% 和 1.2%, 说明仪器的精密度良好。

2.1.4 重复性试验 精密量取蒿甲醚储备液适量, 用乙腈-水 (2:1) 稀释成质量浓度分别为 12.5, 200, 800 mg \cdot L⁻¹的溶液, 各按 2.1.1 项下色谱条件进样 6 次, 计算蒿甲醚的质量浓度分别为 11.6, 201.7, 868.7 mg \cdot L⁻¹, RSD 分别为 2.6%, 1.1%, 0.5%, 表明该方法重复性良好。

2.2 模拟胃液的配制 分别称取 CaCl₂·2H₂O 0.27 g, MgCl₂·6H₂O 0.15 g, KCl 0.86 g, NaCl 2.86 g 至烧杯中, 加水 1 L, 搅拌使溶解, 加浓盐酸 7 mL 至

pH 1.0, 即得。

2.3 蒿甲醚微乳原位凝胶的制备 准确称取处方辅料, 配制凝胶基质溶液, 表面活性剂和助表面活性剂混匀后得混合表面活性剂。将蒿甲醚溶解于油相中, 依次加入混合表面活性剂和凝胶基质溶液, 在磁力搅拌器下室温搅拌均匀, 得透明澄清溶液。

2.4 空白微乳原位凝胶处方的初步筛选 以常用的橄榄油、三乙酸甘油酯、油酸乙酯、油酸聚乙二醇甘油酯为备选油相; 选择毒性较低且性质不易受 pH 和盐浓度影响的非离子型表面活性剂 tween-80, tween-20, cremophor EL35, labrasol 作为备选表面活性剂; 以黏度较低的无水乙醇, 丙二醇, PEG400, transcutool HP 为备选助表面活性剂; 选择离子敏感型的凝胶材料 Kel, L-Alg, H-Alg 为备选水相进行处方筛选。

2.4.1 水相考察 分别配制不同浓度的 Kel, L-Alg, H-Alg 溶液。利用溶出试验仪考察水相的凝胶性, 于溶出杯中加入模拟胃液至刚好没过搅拌桨, 分别于玻璃皿中称取各水相溶液等量, 放入溶出杯底部, 观察是否形成凝胶。在 37 $^{\circ}\text{C}$, 75 r \cdot min⁻¹的条件下搅拌 5 min, 观察凝胶状态。将各溶液置于西林瓶中, 倾斜瓶身, 目测法考察水相的流动性, 见表 1。结果发现 Kel 的流动性较好, 且形成凝胶所需的用量少, 故选取 0.3% Kel 为水相。

2.4.2 蒿甲醚溶解度考察 称取过量的蒿甲醚分别加至各种油, 质量分数为 15% 的表面活性剂和助表面活性剂水溶液中, 涡旋 3 min 后, 置于空气摇床中, 于 25 $^{\circ}\text{C}$, 50 r \cdot min⁻¹平衡 72 h 后, 12 000 r \cdot min 离心 10 min, 取上清液用乙腈-水 (2:1) 混合液稀释至适宜浓度, 采用 UPLC 检测药物含量, 计算溶解度, 见表 2。结果确定分别以油酸乙酯、三乙酸甘油酯为油相, cremophor EL35 和 labrasol 为表面活性剂, transcutool HP 和无水乙醇为助表面活性剂进行进一步筛选。

2.4.3 油相与表面活性剂的相溶性考察 根据溶解度的测定结果, 分别取质量分数为 15% 的 cremophor EL35, labrasol 水溶液 3 mL 于离心管中, 以 5 μL 为单位分别将油酸乙酯和三乙酸甘油酯加入上述表面活性剂溶液中, 涡旋后观察溶液状态, 若溶液变浑浊, 记录油相的加入量。结果发现油酸乙酯-cremophor EL35, 油酸乙酯-labrasol, 三乙酸甘油酯-cremophor EL35, 三乙酸甘油酯-labrasol 的互溶比例分别为 0.5 : 100, 2.67 : 100, 9 : 100, 6.67 : 100, 故分别将油酸乙酯与 labrasol 配伍, 三乙酸甘油酯与

表 1 水相凝胶性和流动性的考察

Table 1 Study on gelation capacity and liquidity of water phase

试剂	质量分数/%	凝胶性	流动性
Kel	0.1	+	√
	0.2	++	√
	0.3	+++	√
	0.4	+++	√
	0.5	+++	×
L-Alg	0.5	-	√
	1	++	√
	1.5	+++	×
	2	+++	×
	2.5	+++	×
H-Alg	0.5	+	√
	1	++	√
	1.5	+++	×
	2	+++	×
	2.5	+++	×

注：“-”表示未能形成凝胶；“+”表示形成的凝胶迅速分散溶解；“++”表示凝胶质地较软；“+++”表示迅速形成质地较硬的凝胶。倾斜瓶身，若微乳原位凝胶快速流动，用√表示；若呈凝胶状黏附于瓶底或较黏稠，用×表示(表 3 同)。

表 2 蒿甲醚在不同油相、表面活性剂、助表面活性剂中的溶解度 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Solubility of artemether in different solvent ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

溶剂类别	溶剂	溶解度 $g \cdot L^{-1}$
油相	橄榄油	140.26 ± 0.03
	三乙酸甘油酯	207.88 ± 0.08
	油酸乙酯	256.08 ± 0.03
	油酸聚乙二醇甘油酯	165.12 ± 0.06
表面活性剂	tween-80	5.03 ± 0.02
	tween-20	6.53 ± 0.07
	cremophor EL35	9.51 ± 0.08
	labrasol	9.05 ± 0.05
	助表面活性剂	无水乙醇
助表面活性剂	丙二醇	28.29 ± 0.29
	PEG400	43.73 ± 0.04
	transcutol HP	268.24 ± 0.05

cremophor EL35 配伍进行后续处方的筛选。

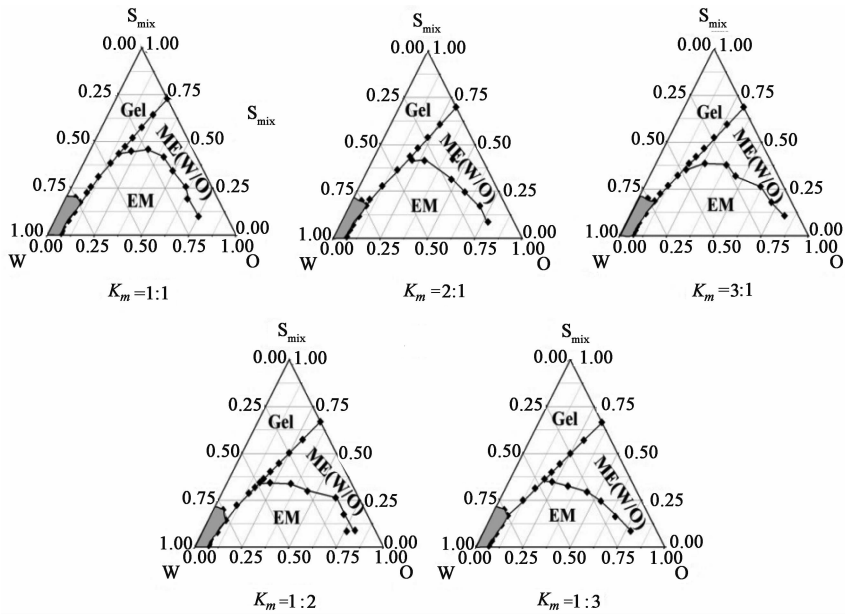
2.5 空白微乳原位凝胶处方组分的确定 根据上文结果,确定备选微乳原位凝胶体系分别为①油酸乙酯/labrasol/无水乙醇/Kel_(aq)(aq 表示水溶液,下

同),②油酸乙酯/labrasol/transcutol HP/Kel_(aq),③三乙酸甘油酯/cremophor EL35/无水乙醇/Kel_(aq),④三乙酸甘油酯/cremophor EL35/transcutol HP/Kel_(aq)。对上述微乳原位凝胶体系作进一步筛选,将表面活性剂和助表面活性剂按质量比 1:1 混匀,得混合表面活性剂(S_{mix})。按质量比 9:1 精密称取 S_{mix} 和油相,磁力搅拌均匀后滴加 0.3% Kel 水溶液,以外观澄明度和稳定性(静置 10 min,观察体系是否发生相分离)为指标考察各体系的成乳状况。结果发现仅体系③和体系④能形成透明澄清且稳定的微乳。考虑到乙醇具有易挥发的特性,可能会影响微乳的长期稳定性,故选定三乙酸甘油酯/cremophor EL35/transcutol HP/Kel_(aq) 为空白微乳原位凝胶体系,采用伪三元相图对微乳原位凝胶区域进行筛选。

2.6 空白微乳原位凝胶区域的筛选 采用水滴定法绘制三乙酸甘油酯/cremophor EL35/transcutol HP/Kel 在表面活性剂与助表面活性剂的质量比(K_m)分别为 1:1,1:2,1:3,2:1,3:1 下的伪三元相图,按 K_m 精密称取 cremophor EL35 和 transcutol HP,混匀后得 S_{mix}。将各 S_{mix} 与油相按质量比为 1:9,2:8,3:7,4:6,1:1,6:4,7:3,8:2,9:1 混合,磁力搅拌下逐滴加入 0.3% Kel 水溶液。目测法判断相变点,当体系由初始状态突变为浑浊、澄清或者黏稠状时判定为相变点,通过稀释法鉴别微乳类型。记录相变点加入 Kel 水溶液的量,计算体系中各成分的质量分数,使用 Origin. 8.0 软件绘制伪三元相图,见图 2。

2.7 载药微乳原位凝胶处方比例的确定 精密称取一定量的蒿甲醚和三乙酸甘油酯,混匀,得 10% 载药油相。根据图 2 选取微乳原位凝胶的备选比例,并于西林瓶中配制各比例项下载药微乳原位凝胶,室温放置 10 d,以流动性和稳定性为指标进行处方比例的筛选,见表 3。结果发现当 K_m = 1:1,载药油相-S_{mix}-Kel(1:2:17)时,载药微乳原位凝胶体系的稳定性和流动性均较好,故将其选定为最佳处方比例。

2.8 黏附性辅料的优选 以黏附时间为指标,考察微乳原位凝胶的生物黏附性。购买新鲜猪胃 3 个,分离胃幽门腺区黏膜,剪成 2 cm × 2.5 cm 小块,用胶水将黏膜层固定于玻璃皿表面。称取适量蒿甲醚微乳原位凝胶于西林瓶中,加入模拟胃液,静置 2 min 使凝胶成形。将成形的凝胶置于胃黏膜表面,静置 20 min,使凝胶与胃黏膜完全接触。利用溶出



Gel. 凝胶区; ME(W/O). W/O 微乳区域; EM. 普通乳; W. 结冷胶水溶液; O. 三乙酸甘油酯; S_{mix} . cremophor EL35 与 transcitol HP 的混合液。阴影部分表示微乳原位凝胶区域

图 2 三乙酸甘油酯/cremophor EL35/transcitol HP/Kel 的伪三元相

Fig. 2 Pseudoternary phase diagram of glyceryl triacetate/cremophor EL35/transcitol HP/Kel with different K_m

表 3 蒿甲醚微乳原位凝胶处方比例的筛选

Table 3 Screening of formula proportion of artemether microemulsion-in situ gel

K_m	质量分数/%		稳定性	流动性
	S_{mix}	Kel		
1:1	5	90	有沉淀析出	√
	10	85	澄清透明	√
	15	80	澄清透明	×
2:1	5	90	有沉淀析出	√
	10	85	澄清透明	×
	15	80	澄清透明	×
3:1	5	90	有沉淀析出	×
	10	85	澄清透明	×
	15	80	澄清透明	×
1:2	5	90	有沉淀析出	√
	10	85	有沉淀析出	√
	15	80	澄清透明	×
1:3	5	90	有沉淀析出	√
	10	85	有沉淀析出	×
	15	80	有沉淀析出	×

注:载药油相的质量分数均为 5%。

试验仪测定凝胶的黏附时间,将玻璃皿置于溶出杯底部,加入模拟胃液,采用桨法,于设置好的 37 °C, 75 r·min⁻¹ 条件下记录凝胶脱离胃黏膜层的时间,

即黏附时间。

预试验发现以结冷胶为凝胶基质制备的微乳原位凝胶生物黏附性较差。为提高微乳原位凝胶的生物黏附性,取不同类型的黏附性辅料(L-Alg, HPMC, CMC-Na, 卡波姆, 明胶)适量,分别加入 0.3% 结冷胶溶液中,使黏附性辅料质量分数为 0.1%,以保证混合溶液具有良好的流动性,并以黏附性辅料与结冷胶的混合溶液作为水相,制备微乳原位凝胶,测定黏附时间,见图 3。对比其他黏附性辅料,海藻酸钠的加入可显著提高蒿甲醚微乳原位凝胶的黏附时间。故对蒿甲醚微乳原位凝胶的处方进行优化,以 Kel(0.3%)与 L-Alg(0.1%)的混合溶液作为蒿甲醚微乳原位凝胶的水相。综上所述,蒿甲醚微乳原位凝胶的处方确定为蒿甲醚-三乙酸甘油酯-cremophor EL35-transcitol HP-(0.3% Kel + 0.1% L-Alg)(0.5% : 4.5% : 5% : 5% : 85%)。按处方配比制备,即得质量浓度约 5 g·L⁻¹ 的蒿甲醚微乳原位凝胶。

2.9 蒿甲醚微乳原位凝胶的质量评价

2.9.1 形态观察 取蒿甲醚微乳原位凝胶适量,滴加于铜网上,室温静置 2 min,用滤纸吸去多余液体,再滴加 3% 磷钨酸溶液(pH 7.0)于铜网上负染 2 min,自然晾干,置透射电镜下观察,见图 4。结果显示该微乳原位凝胶的乳滴为球形,且乳滴之间较分散。

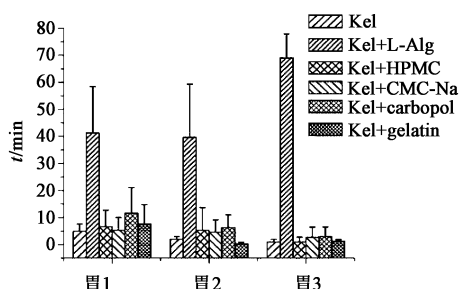


图 3 不同辅料对蒿甲醚微乳原位凝胶黏附时间的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 3 Determination of adhesive time of artemether microemulsion-in situ gel with different accessories ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

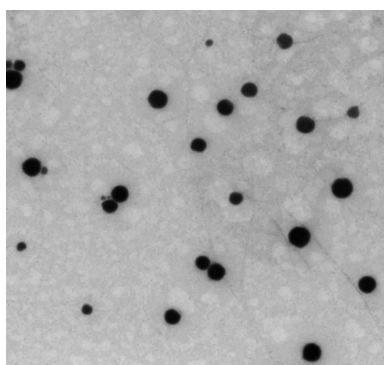


图 4 蒿甲醚微乳原位凝胶的透射电镜 ($\times 10\ 000$)
Fig. 4 Transmission electron microscopy image of artemether microemulsion-in situ gel ($\times 10\ 000$)

2.9.2 粒径分布与 Zeta 电位测定 在 25 ℃ 条件下使用 Zetasizer Nano ZSP 型纳米粒度电位仪测定蒿甲醚微乳原位凝胶的粒径及 Zeta 电位, 结果平均粒径 20.90 nm, Zeta 电位 -19.5 mV, 多分散指数 (PDI) 0.172, 说明该微乳原位凝胶的乳滴粒径分布均匀。

2.9.3 黏度的测定 按 2015 年版《中国药典》黏度测定法的第三法, 采用数显式旋转黏度计, 1 号转子, 转速设定 60 r·min⁻¹, 在室温条件下测得蒿甲醚微乳原位凝胶的黏度 15.32 mPa·s, 说明蒿甲醚微乳原位凝胶黏度低, 流动性好。

2.9.4 凝胶性考察 按 2.4.1 项下方法考察蒿甲醚微乳原位凝胶的体外凝胶性, 结果表明蒿甲醚微乳原位凝胶在模拟胃液中能立即发生胶凝。取 SD 大鼠 4 只, 实验前禁食 24 h, 自由饮水。实验时分别灌胃蒿甲醚微乳原位凝胶, 1 min 后麻醉处死, 解剖取下胃组织, 沿胃小弯剪开, 观察胃内容物。结果发现大鼠口服蒿甲醚微乳原位凝胶后, 在胃内容物中均能观察到凝胶, 说明其在胃部凝胶性较好, 能立即发生相变形成凝胶。

2.9.5 稳定性考察 取蒿甲醚微乳原位凝胶 3 份, 于 5 000 r·min⁻¹ 离心 30 min, 未见相分层或药物析

出, 说明该制剂稳定性良好。室温下放置 1 个月, 分别于第 0, 5, 15, 30 天取样观察, 测定粒径与药物含量并对其进行流动性和体外凝胶性进行考察, 见表 4, 药物含量以每次取样测得的质量浓度与初始质量浓度的比值 (C/C_0) 表示。结果发现在 1 个月内, 蒿甲醚微乳原位凝胶的外观、粒径、药物含量、流动性及体外凝胶性均保持稳定。

表 4 蒿甲醚微乳原位凝胶的稳定性考察

Table 4 Stability of artemether microemulsion-in situ gel

t/d	粒径/nm	PDI	C/C ₀
0	20.90	0.172	1.00
5	20.58	0.156	0.95
15	20.81	0.144	0.92
30	20.06	0.135	0.95

注: 外观均为透明澄清, 流动相和凝胶性均很好。

2.9.6 体内胃滞留时间考察 将健康的雄性 SD 大鼠随机分成 2 组, 实验组为蒿甲醚微乳原位凝胶组, 对照组为 5 g·L⁻¹ 蒿甲醚混悬液组 (精密称取一定量蒿甲醚原料药置于研钵中, 加入适量 0.5% CMC-Na 溶液研磨均匀, 即得), 每组 24 只。大鼠实验前禁食 24 h, 自由饮水。灌胃给药 2 mL 后, 分别于 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 h 处死大鼠各 4 只, 取下胃组织, 采用 UPLC 检测胃内蒿甲醚含量, 计算大鼠胃内药物的含量与给药量的比值, 得蒿甲醚胃残留率, 见图 5。结果发现蒿甲醚混悬液组在 2 h 后便检测不到蒿甲醚, 而蒿甲醚微乳原位凝胶组经 6 h 后在大鼠胃中仍可观察到凝胶并能检测出蒿甲醚, 说明蒿甲醚微乳原位凝胶在胃部形成凝胶后可延缓蒿甲醚胃排空, 延长药物在胃部的作用时间。

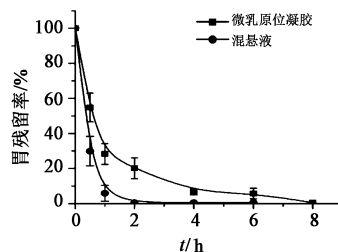


图 5 蒿甲醚不同制剂在大鼠中的胃残留率-时间曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)
Fig. 5 Gastric retention rate-time curves of different artemether preparations in rats ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

3 讨论

微乳具有制备工艺简单、性质稳定、可提高药物溶解度和生物利用度等优点, 而原位凝胶在医药领域应用广泛, 具有凝胶制剂的亲水性三维网状结构和独特的溶液-凝胶转变性质, 并可作为微球、脂质

体、纳米粒等药物传递系统的载体^[16-18],控制药物释放。根据形成机制的不同,原位凝胶可分为温度、pH 和离子敏感型。温度敏感型受环境温度的影响较大,在炎热的夏季不易保存,当温度达到生理温度时,立即形成凝胶,因此在口腔当中便可能发生胶凝,不适宜口服给药。而目前开发的 pH 敏感型凝胶基质如卡波姆、醋酸纤维素酞酸酯等需在中性或碱性环境下形成凝胶^[19],根据胃肠道中 pH 的变化,pH 敏感型凝胶在上消化道以液体的状态存在,胃液对其有稀释作用,药物很快从溶液中扩散出去而导致药物的突释。故本文以离子敏感型原位凝胶作为载药微乳的载体,设计了口服微乳原位凝胶复合剂型。该剂型在体外以低黏度的液体形式存在,口服后在胃液中阳离子的作用下立即发生相转变,形成半固体凝胶制剂,控制药物定位释放,具有巨大的开发潜力和广阔的应用前景。

对于微乳原位凝胶的制备和处方优选,常用的方法是分别筛选微乳和原位凝胶的处方后,配制载药微乳与凝胶基质溶液,将二者混匀,即得微乳原位凝胶^[20]。该方法存在一定的缺陷,在微乳体系中,只有当油相、表面活性剂、助表面活性剂和水相达到最佳配比后才可形成稳定均一的微乳,对于上述方法,在微乳体系中加入凝胶基质后会改变水相的比例,打破体系平衡;另外,油相、表面活性剂和助表面活性剂具有一定的黏性,可影响凝胶基质的流动性,进而影响微乳原位凝胶的形成和稳定性。因此,本文对微乳原位凝胶的制备和处方优选方法进行了改进,以结冷胶溶液为水相绘制伪三元相图优选处方,直接获得空白微乳原位凝胶区域,在该区域中选取比例,确定最佳处方,并按处方量将载药油相、混合表面活性剂、凝胶基质溶液(水相)搅拌均匀,即得载药微乳原位凝胶。此处方优选方法有效地缩小了处方的筛选范围,且快速简便、准确可靠,对其他微乳原位凝胶体系处方的优选具有借鉴意义;其制备工艺简单、易操作,在体外条件下具有一定的流动性,易灌装,便于工业化生产。

蒿甲醚生物利用度低的原因包括溶解度低导致的口服吸收率差以及性质不稳定在体内易被代谢引起的半衰期短。故本文制备了蒿甲醚微乳原位凝胶,其外观透明澄清,药物质量浓度约 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,乳滴呈球形,黏度 $15.32 \text{ mPa} \cdot \text{s}$,室温条件下稳定,在胃部凝胶性好,可延长药物的胃滞留时间。说明微乳原位凝胶能有效改善蒿甲醚的水溶性和稳定性,直接将蒿甲醚输送并储存于胃部,延缓药物的胃排空,

增大胃部蒿甲醚的浓度,且黏度适宜,适合口服给药。实现蒿甲醚的口服胃部定位释药有望提高蒿甲醚的生物利用度及相关药物的患者顺应性,增强蒿甲醚对胃癌的治疗效果。综上所述,该剂型设计合理、制法简易,可实现蒿甲醚口服胃部定位释药,为蒿甲醚用于胃癌的治疗奠定了基础;对难溶性药物的剂型设计、胃部疾病的治疗以及胃肠道定位释药系统的开发具有重要意义。后续还将对蒿甲醚口服微乳原位凝胶的刺激性、药物释放特性、膜渗透性、药动学特征等作进一步研究和探讨。

[参考文献]

- [1] 陆金健. 青蒿素类化合物抗肿瘤研究进展[J]. 中国药理学通报, 2010, 26(6): 818-820.
- [2] 谢茹燕, 乔敏敏, 章永平, 等. 蒿甲醚对胃癌细胞和胰腺癌细胞体外杀伤作用[J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2008, 28(3): 302-306.
- [3] 李遐方, 刘萍霞. 蒿甲醚在体外及荷瘤小鼠体内条件下抑制人胃癌 SGC-7901 细胞增殖的机制[J]. 世界华人消化杂志, 2015, 23(4): 590-595.
- [4] Alcantara D D, Ribeiro H F, Cardoso P C, et al. *In vitro* evaluation of the cytotoxic and genotoxic effects of artemether, an antimalarial drug, in a gastric cancer cell line (PG100) [J]. J Appl Toxicol, 2013, 33(2): 151-156.
- [5] 伍飞臻, 杨立基, 张琪, 等. 肠道中胆酸盐及脂类对难溶性药物蒿甲醚的增溶作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(20): 6-9.
- [6] 王晓蕾, 孙艺丹, 王锐利, 等. 蒿甲醚在不同介质中的平衡溶解度及表观油水分配系数的测定[J]. 药物评价研究, 2013, 36(2): 114-118.
- [7] 孙志伟, 单承启, 李国福, 等. 复方蒿甲醚和组份之一本芴醇两种剂型治疗恶性疟疾临床对比试验[J]. 中国临床药理学与治疗学, 1999, 4(1): 21-24.
- [8] 邓丹琪, 陈浩, 周晓鸿, 等. 蒿甲醚治疗多形性日光疹、慢性光化性皮炎的临床疗效观[J]. 昆明医学院学报, 2006, 27(6): 55-58.
- [9] 王同寅, 马云生, 张德顺, 等. 蒿甲醚注射剂治疗疟疾 III 期临床研究[J]. 云南医药, 1991, 12(2): 114-116.
- [10] Ohta S, Hiramoto S, Amano Y, et al. Intraperitoneal delivery of cisplatin via a hyaluronan-based nanogel/*in situ* cross-linkable hydrogel hybrid system for peritoneal dissemination of gastric cancer[J]. Mol Pharm, 2017, 14(9): 3105-3113.
- [11] WANG L L, HUANG S, GUO H H, et al. *In situ* delivery of thermosensitive gel-mediated 5-fluorouracil microemulsion for the treatment of colorectal cancer[J].

- Drug Des Devel Ther, 2016, 10:2855-2867.
- [12] 杜茂波, 刘亚梅, 何爱萍, 等. 川芎眼用微乳原位凝胶的流变学及释放动力学分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(24):23-27.
- [13] 马守伟, 甘勇, 甘莉, 等. 新型眼用阳离子微乳-原位凝胶的制备及其体外角膜滞留特性的研究[J]. 药学学报, 2008, 43(7):749-755.
- [14] Hosny K M, Hassan A H. Intranasal *in situ* gel loaded with saquinavir mesylate nanosized microemulsion: preparation, characterization, and *in vivo* evaluation[J]. Int J Pharm, 2014, 475(1/2):191-197.
- [15] Tayel S A, El-Nabarawi M A, Tadros M I, et al. Promising ion-sensitive *in situ* ocular nanoemulsion gels of terbinafine hydrochloride: design, *in vitro* characterization and *in vivo* estimation of the ocular irritation and drug pharmacokinetics in the aqueous humor of rabbits[J]. Int J Pharm, 2013, 443(1/2):293-305.
- [16] 何文, 毛妮娜, 郭咸希, 等. 维生素 A 棕榈酸酯阳离子脂质体原位凝胶的制备及其兔角膜滞留性考察[J]. 中国药师, 2011, 14(10):1427-1430.
- [17] Pandurangan D K, Bodagala P, Palanirajan V K, et al. Formulation and evaluation of voriconazole ophthalmic solid lipid nanoparticles *in situ* gel[J]. Int J Pharm Investig, 2016, 6(1):56-62.
- [18] HU C, FENG H, ZHU C. Preparation and characterization of rifampicin-PLGA microspheres/sodium alginate *in situ* gel combination delivery system[J]. Colloid Surface B, 2012, 95:162-169.
- [19] 陈恩, 陈钧, 曹师磊, 等. 柴胡鼻用 pH 敏感型原位凝胶的制备及退热效果评价[J]. 中国医药工业杂志, 2008, 39(9):666-670.
- [20] Hosny K M, Banjar Z M. The formulation of a nasal nanoemulsion zaleplon *in situ* gel for the treatment of insomnia[J]. Expert Opin Drug Deliv, 2013, 10(8):1033-1041.

[责任编辑 刘德文]