

· 工艺与制剂 ·

5-氨基水杨酸结肠定位渗透泵微丸 在大鼠体内释药特性考察

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

[摘要] **目的:**考察基于渗透泵酶触发原理的 5-氨基水杨酸(5-ASA)结肠定位微丸的体内释药行为,评价其结肠定位释药特性。**方法:**将 5-ASA 结肠定位微丸(微丸组)与 5-ASA 羧甲基纤维素钠混悬溶液(对照组)分别给大鼠灌胃,于规定时间间隔从大鼠心脏取血,并取出胃、小肠、盲肠、结肠及其内容物,计算相对靶向释药指数(DDI 值);扫描电镜观察不同部位的微丸表面结构。**结果:**微丸组在胃、小肠、盲肠、结肠中的 DDI 值分别为 11.09,12.08,187.25,181.68。扫描电镜观察结肠内微丸有清晰可见的孔径。**结论:**5-ASA 结肠定位微丸具有良好的结肠定位释药性。

[关键词] 5-氨基水杨酸;微丸;结肠定位给药系统;渗透泵酶触发;体内药物释放

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)07-0001-06

[doi] 10.11653/zgsyfjxzz2013070001

Investigation of *in vivo* Release of 5-aminosalicylic Acid Colon-specific Osmotic Pump Pellets in Rats

YANG Zhi-xin*, XU Zhen, DU Su-mei, CHANG Shuang, YANG Bo
(College of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate *in vivo* release behaviour of 5-aminosalicylic acid (5-ASA) colon-specific pellets in rats, which based on osmotic pump enzyme trigger principle, and evaluate its colon localization release characteristics. **Method:** 5-ASA colon-specific pellets (the pellet group) with 5-ASA sodium carboxymethyl cellulose suspension (the control group) were given to rats by intragastric administration respectively, then got blood from rat heart in predetermined time intervals, and removed the stomach, small intestine, cecum, colon and their contents, relative targeted release index (DDI value) of them were calculated; Pellets' surface structure of different parts were observed by scanning electron microscope. **Result:** DDI value of the pellets group in the stomach, small intestine, cecum and colon were 11.09, 12.08, 187.25, 181.68, respectively. We could observe that pellets had clearly visible aperture in the colon by scanning electron microscope. **Conclusion:** 5-ASA colon-specific pellets had good drug release in colon-specific.

[Key words] 5-aminosalicylic acid; pellets; colon-specific drug delivery system; osmotic pump enzyme trigger; *in vivo* drug release

[收稿日期] 20121105(001)

[基金项目] 黑龙江省自然科学基金项目(D200627);黑龙江省教育厅骨干教师资助项目(1251G058);国家教育部春晖计划项目(Z2008-1-15016)

[通讯作者] *杨志欣,博士,副教授,从事新剂型研究与新药开发, Tel: 0451-87266893, E-mail: zhixin.y@163.com

理想的 5-氨基水杨酸(5-ASA)结肠定位给药系统应能阻止药物在胃和小肠中释放,并在药物进入结肠时引起突然发作^[1],因此,需要一个能感应结肠生理变化的触发因子。目前,研究者主要提出了药物前体、pH 依从性系统、时间依从性系统、微生物活化系统^[2-5]等结肠定向传递路径。目前已上市的 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。

果胶钙(CaP)可被结肠酶特异性降解且水溶性差,目前被广泛用作结肠定位系统的功能性辅料^[6-7]。在前期研究中,本课题组采用自制果胶钙为致孔剂,乙酸钠纤维素为半透衣膜,制备了 5-ASA 渗透泵酶触发结肠定位微丸,同时对其体外药物释放进行考察,发现该制剂具有结肠定位释药特性^[8]。当结肠靶向给药系统得到有效的体外溶出结果后,应进一步进行体内评价^[9-10],该过程大多采用测定模型药物的血药浓度绘制药-时曲线来间接评估药物在消化道内的释放;亦有采用多层螺旋 CT 扫描技术观察对制剂在人体消化道内的运转情况。本实验通过对比 5-ASA 混悬液和果胶钙为致孔剂的包衣微丸大鼠灌胃后,观察该制剂在体内血浆、胃、小肠、盲肠和结肠组织及其内容物中药物浓度经时变化规律,计算药物相对靶向释药指数(DDI);同时辅以扫描电镜观察微丸在大鼠胃、小肠、结肠内的形态变化。

1 材料

2996 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),S-3400N 型电子扫描显微镜(日本日立公司),756PC 型紫外分光光度计(上海光谱仪器有限公司),MP2000 型电子天平(上海第二天平仪器厂),DGX-9143B-1 型电热鼓风干燥箱(上海福玛实验设备有限公司),BY300A 型小型包衣机(上海黄海药检仪器有限公司)。

SD 大鼠 100 只,雌雄各半,体重(180±20)g,黑龙江中医药大学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(黑)2008004。

5-氨基水杨酸(5-ASA,上海金贸泰化工有限公司,药用级,纯度≥99%),微晶纤维素(MCC,上海金科贸易有限公司,药用级,含量 97.0%~102.0%),聚乙烯吡咯烷酮-K30(PVP-K30,上海蓝季科技发展有限公司,纯度≥99%),乙酸钠纤维素(CA,上海乙酸钠纤维素厂,分析纯),果胶钙(实验室自制),其他药物和试药均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 5-ASA 结肠定位微丸的制备

2.1.1 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, NaCl 按 12:3:8 比例混匀,喷入适量黏合剂(4% PVP-K30 溶液)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在 16~20 目的小丸,停止供粉和黏合剂,

将微丸置于包衣锅内继续滚转 45 min 使其滚实,于 60℃干燥 4 h,收集 16~20 目微丸,即得。

2.1.2 包衣微丸的制备

2.1.2.1 包衣液的配制 将自制果胶钙用粉碎机粉碎,过 400 目筛。用丙酮配制一定质量浓度的 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果胶钙,搅匀,即得。

2.1.2.2 包衣工艺 取一定量的素丸置于包衣锅中,预热 5 min,调节喷雾枪的物化压力,包衣温度 50℃,包衣液流速 1.5 mL·min⁻¹,包衣锅转速 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,于 40℃温度下干燥 5 h,取出过筛,即得(包衣过程中,包衣液要不断搅拌)。

$$\text{包衣增重} = (m_{\text{包衣后}} - m_{\text{包衣前}}) / m_{\text{包衣前}} \times 100\%$$

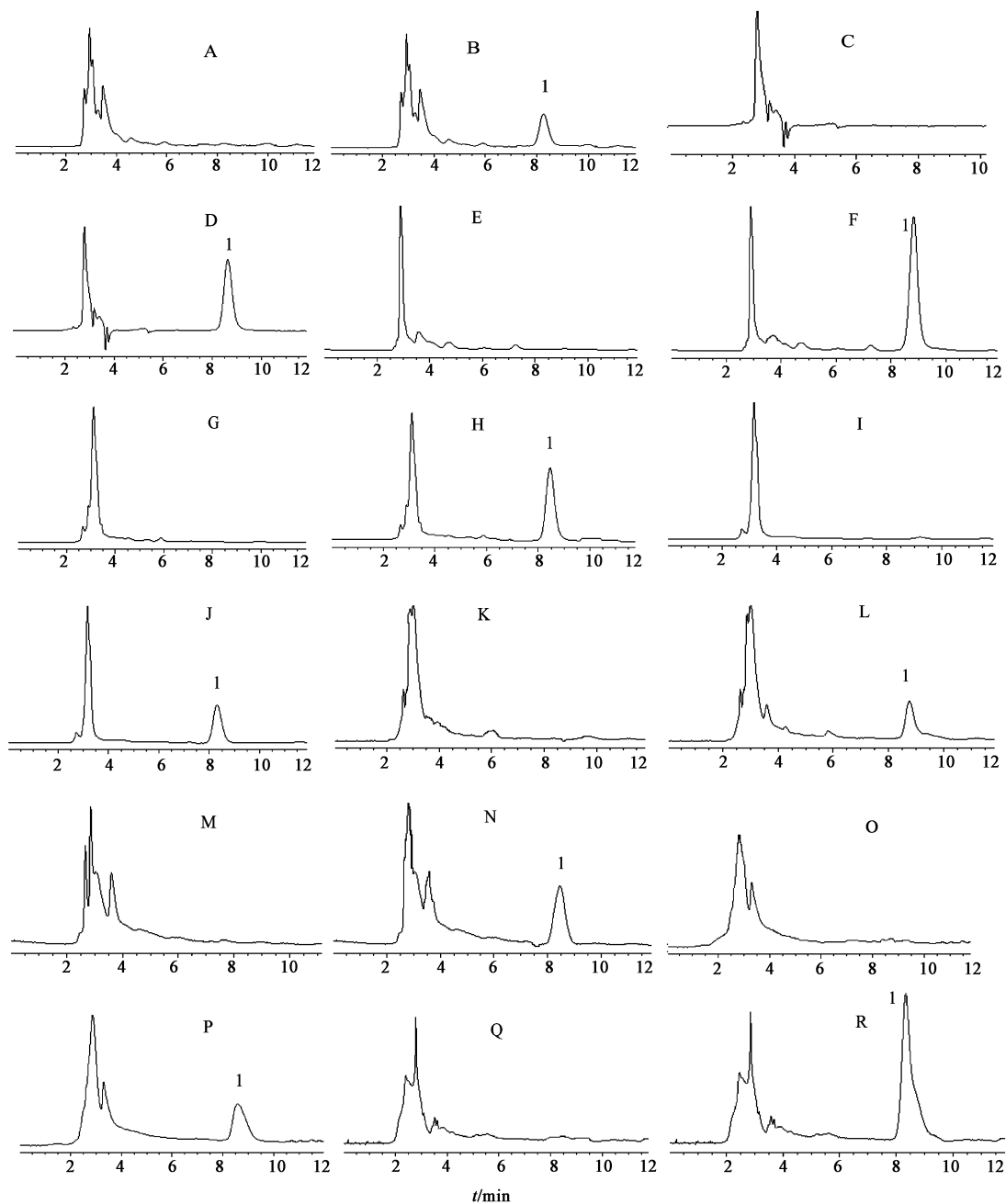
2.2 5-ASA 羧甲基纤维素混悬液的制备^[11] 称取羧甲基纤维素钠粉末 1.5 g,置于 90 mL 水中,搅拌使其溶解。称取 5-ASA 0.48 g,加至上述溶液中,充分搅拌,加水定容至 100 mL,即得。

2.3 5-ASA 含量测定

2.3.1 色谱条件 Diamonsil(R) 钻石 C₁₈ 反相色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相甲醇-0.01 mol·L⁻¹ KH₂PO₄ (pH 2.5, 34:66),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 254 nm,柱温 30℃,进样量 20 μL。

2.3.2 生物样品的处理及测定 取大鼠胃、小肠、盲肠、结肠组织(0.8 g)及各组织内容物(0.4 g),分别加入 2 倍量不同 pH 的磷酸盐缓冲液及 3 倍量 0.5% 冰乙酸溶液。各样品匀浆处理,离心得上清液;血样从心脏取出后离心得血浆。精密吸取样品 1.0 mL,置离心管中,加甲醇 3.0 mL,涡旋振荡 2 min,离心,精密吸取样品各上清液 3.0 mL 于 5 mL 离心管中。分别加酸酐 0.1 mL,涡旋 30 min,静置 20 min。于 50℃氮气吹干溶剂,加流动相 0.3 mL 溶解残渣,旋涡混合 5 min,离心,用 0.22 μm 有机滤膜滤过,取续滤液 20 μL,按照 2.3.1 项下色谱条件进样,记录峰面积。见图 1。

2.3.3 标准曲线的制备 精密吸取空白生物样品(大鼠胃、小肠、盲肠、结肠组织 0.8 g 及各组织内容物 0.4 g),分别加入不同量 5-ASA,配得含不同 5-ASA 质量浓度的生物样品,按 2.3.2 项下方法处理并进样,分别建立在胃肠道不同组织(胃、小肠、盲肠、结肠)、胃肠道不同内容物及血样的 9 条标准曲线。其回归方程及参数见表 1,各生物样品中,乙酰 5-ASA 的峰面积与其质量浓度均呈良好线性关系。



A. 空白血浆;B. 血浆;C. 空白胃组织;D. 胃组织;E. 空白肠组织;F. 肠组织;G. 空白盲肠组织;H. 盲肠组织;
I. 空白结肠组织;J. 结肠组织;K. 空白胃内容物;L. 胃内容物;M. 空白肠内容物;N. 肠内容物;
O. 空白盲肠内容物;P. 盲肠内容物;Q. 空白结肠内容物;R. 结肠内容物;1. 5-氨基水杨酸

图1 5-氨基水杨酸结肠定位渗透泵微丸 HPLC

2.3.4 方法的专属性 取4只大鼠的空白血浆、胃、小肠、盲肠、结肠及各组织内容物 2.3.2 项下方法进行处理,进行 HPLC 分析,获得空白色谱图;将 5-ASA 溶液加入空白样品中,依 2.3.2 项下操作,获得相应的色谱图,与空白生物样品的色谱图比较。结果见图 1,表明生物样品中内源性物质不干扰待测物的测定。

2.3.5 回收率和精密度试验 取血浆、空白组织及

内容物样品适量,分别加入不同质量浓度标准溶液,血浆、组织及内容物均分别配制成高、中、低(100, 25, 6.25 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)3个质量浓度样品,按 2.3.2 项下方法进行处理并测定,于1d内测定3次,连续测定3d,计算日内、日间精密度和方法回收率。结果日内、日间精密度均 $<1.5\%$,回收率80%~120%,符合生物样品分析要求。

2.4 体内释药特性考察及数据处理 取 SD 大鼠

表 1 不同生物样品中 5-ASA 含量测定的
标准曲线方程及参数

样品	线性范围	回归方程	r
血浆	1.25 ~ 250 mg·L ⁻¹	Y = 41 154X - 14 143	0.999 8
胃组织	2.5 ~ 250 μg·g ⁻¹	Y = 47 070X + 41 857	0.998 8
小肠组织	2.5 ~ 250 μg·g ⁻¹	Y = 44 346X + 109 957	0.998 6
盲肠组织	1.25 ~ 250 μg·g ⁻¹	Y = 60 636X - 23 059	0.999 4
结肠组织	2.5 ~ 250 μg·g ⁻¹	Y = 39 116X - 48 550	0.998 2
胃内容物	2.5 ~ 250 μg·g ⁻¹	Y = 50 111X + 103 586	0.998 9
小肠内容物	2.5 ~ 250 μg·g ⁻¹	Y = 60 215X - 45 939	0.999 3
盲肠内容物	2.5 ~ 250 μg·g ⁻¹	Y = 56 153X - 131 509	0.997 6
结肠内容物	2.5 ~ 250 μg·g ⁻¹	Y = 41 434X + 82 568	0.998 5

90 只,随机分成 2 组(微丸组和对照组)。试验前禁食 12 h,不禁水。微丸组用乙醚麻醉后,经口插入聚乙烯管给大鼠口服 5-ASA 结肠定位微丸(给药剂量 5-ASA 40 mg·kg⁻¹,换算成微丸为 5~6 丸),再灌入水 1.5 mL,分别于给药后 3,5,7,9,11,13,15,17,19,25 h 取样,每个时间点取 5 只大鼠。取样前 10 min 腹腔注射 20% 乌拉坦(5 mL·kg⁻¹)。于给定的时间间隔从大鼠心脏取血 4 mL,置于含有肝素的取血管内,按 2.3.2 项下方法对血样进行处理。取血后的大鼠纵向剖开,分离得到内容物(将胃内容物、小肠内容物与结肠内容物中残留的微丸分别取出,用水冲洗干净,放入鼓风干燥箱中烘干,用于扫描电镜试验)称重,按 2.3.2 项下方法进行处理;将除去内容物后的胃、小肠、盲肠及结肠组织分别用磷酸盐缓冲液漂洗 2~3 次,每次 10 mL 左右,用滤纸吸干表面水分后,称重,按 2.3.2 项下方法进行处理。对照组大鼠用乙醚轻微麻醉后,灌胃 5-ASA 羧甲基纤维素钠混悬液(给药剂量与微丸组相同)。取样时间为 1,2,3,4,5,7,9,13,17 h,每个时间点取 5 只大鼠。其余处理及操作与微丸组相同。采用相对靶向释药指数^[2](DDI)对 5-ASA 微丸的结肠定位释药特性进行评价。

$$DDI = (AUC_1/AUC_2) / (AUC_3/AUC_4)$$

其中 AUC₁, AUC₃, AUC₂, AUC₄ 分别表示微丸组各组织及内容物和血浆中药物浓度-时间曲线下面积和对照组各组织及内容物和血浆中药物浓度-时间曲线下面积。AUC_{0-∞} 采用梯形法计算,其中消除速度常数 k 通过残数法求取;T_{max} 和 C_{max} 采实测值。采用 3P97 求算微丸组和对照组的体内药动学参数。见图 2~6。

由图 2 可知,对照组药-时曲线无时滞, T_{max} =

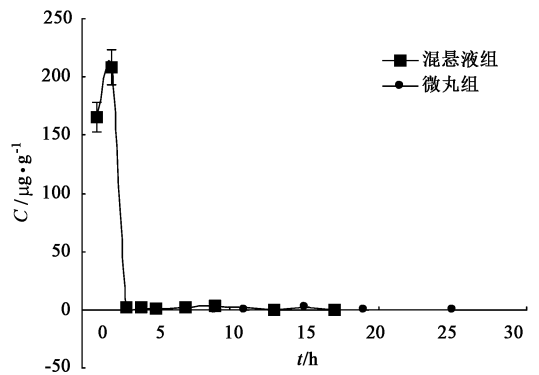


图 2 5-ASA 结肠定位微丸和混悬液大鼠灌胃给药后血浆药-时曲线($\bar{x} \pm s, n = 5$)

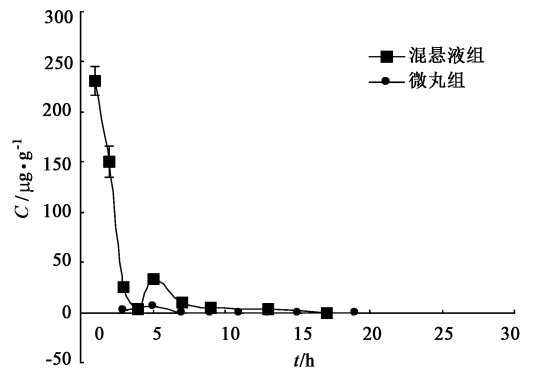


图 3 5-ASA 结肠定位微丸和混悬液大鼠灌胃给药的胃组织及内容物药-时曲线($\bar{x} \pm s, n = 5$)

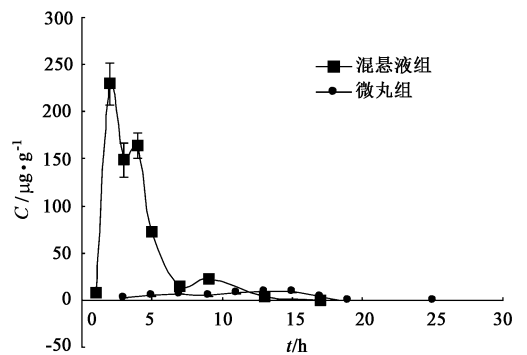


图 4 5-ASA 结肠定位微丸和混悬液大鼠灌胃给药的
小肠组织及内容物的药-时曲线($\bar{x} \pm s, n = 5$)

2 h, C_{max} = (207.86 ± 15.06) mg·L⁻¹, AUC_{0-∞} = 453.01 mg·h⁻¹·L⁻¹;微丸组药时曲线存在 1 h 时滞,且检测到的点较少, T_{max} 延后至 15 h, C_{max} = (2.20 ± 0.29) mg·L⁻¹, AUC_{0-∞} 为 4.39 mg·h·L⁻¹ (为对照组的 0.01 倍)。

由图 3 可知,对照组药时曲线无时滞, T_{max} = 1 h, C_{max} = (230.94 ± 13.97) μg·g⁻¹, AUC_{0-∞} = 706.45 μg·h·g⁻¹;微丸组药时曲线存在 1~2 h 时

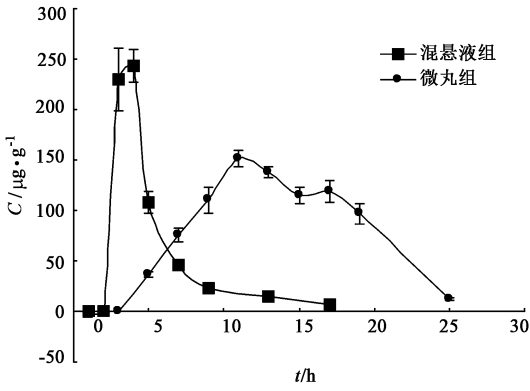


图5 5-ASA 结肠定位微丸和混悬液大鼠灌胃给药的盲肠组织及内容物药-时曲线($\bar{x} \pm s, n = 5$)

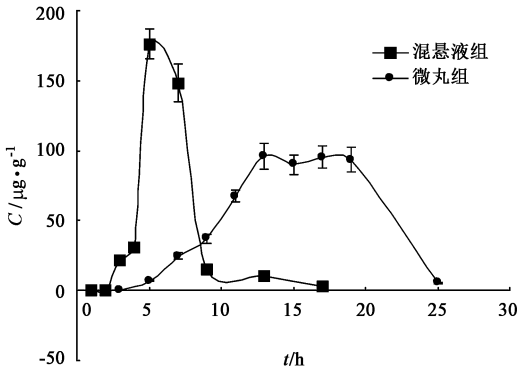


图6 5-ASA 结肠定位微丸和混悬液大鼠灌胃给药的结肠组织及内容物药-时曲线($\bar{x} \pm s, n = 5$)

滞,药物在胃中呈现双峰变化,这可能与其肝肠代谢有关,且未检测到的点较多, T_{max} 延后至5 h, $C_{max} = (6.35 \pm 0.17) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,低于对照组($P < 0.01$), $AUC_{0 \rightarrow \infty} = 82.15 \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{g}^{-1}$ (为对照组的0.12倍)。

由图4可知,对照组药时曲线无时滞, $T_{max} = 2 \text{ h}$, $C_{max} = (229.41 \pm 21.72) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, $AUC_{0 \rightarrow \infty} = 774.27 \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{g}^{-1}$;微丸组药时曲线存在1 h时滞,药物在小肠中呈现多峰,且检测到的点较小, T_{max} 延后至15 h, $C_{max} = (8.70 \pm 0.72) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,低于对照组($P > 0.05$), $AUC_{0 \rightarrow \infty} = 90.654 \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{g}^{-1}$ (为对照组的0.12倍)。

由图5可知,对照组药时曲线无时滞, $T_{max} = 4 \text{ h}$, $C_{max} = (243.02 \pm 16.28) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, $AUC_{0 \rightarrow \infty} = 880.20 \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{g}^{-1}$;微丸组药时曲线存在5 h时滞, T_{max} 延后至11 h, $C_{max} = (151.22 \pm 8.62) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,低于对照组($P > 0.1$), $AUC_{0 \rightarrow \infty} = 1597.17 \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{g}^{-1}$ (为对照组的1.81倍)。

由图6可知,对照组药时曲线无时滞, $T_{max} =$

5 h, $C_{max} = (176.24 \pm 10.93) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, $AUC_{0 \rightarrow \infty} = 696.67 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$;微丸组药时曲线存在3 h时滞, T_{max} 延后至13 h, $C_{max} = (96.26 \pm 9.33) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, $AUC_{0 \rightarrow \infty} = 1226.57 \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{g}^{-1}$ (为对照组的1.76倍)。

由以上结果可知,与对照组相比,微丸组的胃、小肠、盲肠和结肠组织的DDI值分别为11.99,12.08,187.25,181.68。表明药物对盲、结肠组织及其内容物的定位释药特性好,5-ASA结肠定位微丸具有良好的结肠定位释药的特性。

用扫描电镜观察从大鼠体内取出的微丸结构变化,同时将体内累积释药数据与释药模型拟合,从而推测药物的体内释药机制。分别对大鼠胃内、小肠内、结肠内取出的3种微丸进行电镜扫描观察,见图7~9。

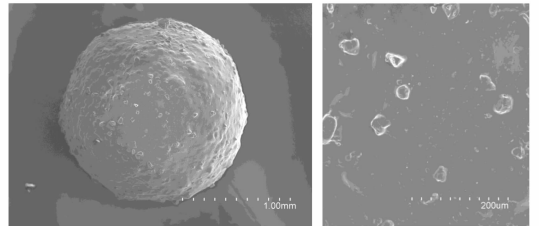


图7 5-ASA 结肠定位微丸在大鼠胃内取出的微丸表面效果(左 $\times 50$,右 $\times 200$)

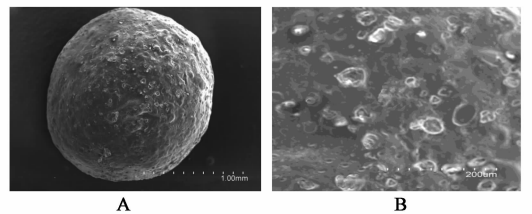


图8 5-ASA 结肠定位微丸在大鼠小肠内取出的微丸表面效果(左 $\times 50$,右 $\times 200$)

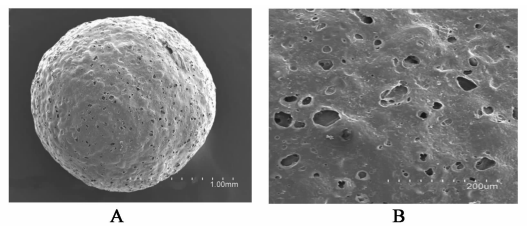


图9 5-ASA 结肠定位微丸在大鼠结肠内取出的微丸表面效果(左 $\times 50$,右 $\times 200$)

由图7,8可知,从大鼠胃、小肠中取出的包衣微丸表面圆整、光泽、致密,无可见的孔径,推测包衣微丸顺利通过上消化道,其原因可能为CA为水不溶

性包衣材料,而果胶钙的降解需特异性降解酶,上消化道缺少可降解果胶的菌群所释放的酶。因此,衣膜保持完好,无可见的孔隙及裂缝。由图 9 可知,当包衣微丸进入大鼠结肠后,衣膜表面出现很多清晰可见的较深入的孔径,推测此结果应为衣膜中的果胶钙被结肠中的菌群特异性降解所致。

3 讨论

考虑到药物本身被组织吸收较少,主要残留在组织及相应内容物中,为便于计算和研究药物在体内释放规律,本实验采用同一组织及内容物的含药量相加得到的总量作为参考值进行评估和计算。

5-ASA 结肠定位微丸和混悬液灌胃给药后,2 种制剂在大鼠胃肠道的药物释放及吸收情况有所不同,与对照组相比,微丸组在每一种组织里的药-时曲线变化均出现 3~5 h 时滞, T_{max} 延后, C_{max} 稍低,原因可能有以下几种:①微丸表面果胶钙包衣膜在胃、肠道潮湿环境中具有一定黏附性,容易黏附在胃肠道内而造成时滞;②微丸在体内分布相对比较分散,不能同时转运而造成时滞;③与大鼠本身的个体差异,胃排空时间不同也有很重要的关系。但微丸的释药是在进入盲肠、结肠后才开始,所以时滞与转运时间的缓慢对于这种药物的释药部位和结果并无太大影响。这也是酶触发渗透型结肠定位系统优于其他释药系统的一个方面。

微丸组结肠组织中药物质量浓度开始低于对照组,之后则高于对照组, T_{max} 延后, $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ ($1\ 226.57\ \mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{g}^{-1}$) 高于对照组 ($696.67\ \mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{g}^{-1}$),与对照组相比,微丸组对胃、小肠组织即内容物的 DDI 值均非常小 (11.09, 12.08),而对结肠组织及内容物的 DDI 值则为 181.68。这些结果说明 5-ASA 结肠定位微丸在胃、肠道上段的药物释放量较少,微丸转运至结肠部位后,在结肠特异性菌群的降解作用下,大量持续、匀速的释放,在一段时间内保持一个相对稳定浓度,表明 5-ASA 结肠定位微丸具有较好的结肠定位释药特性。

制剂采用果胶钙作为致孔剂,因此对其进行质量控制很重要。本研究采用亚甲兰吸附试验确定果胶是否完全钙化,进一步采用透析法除去游离钙,研究中采用络合滴定法测定果胶钙中的含钙率为 $(7.8 \pm 1.9)\%$ 。

[参考文献]

- [1] 杨志欣,杜素美. 5-氨基水杨酸制剂研究现状及展望 [J]. 安徽医药, 2010, 14(2): 125.
- [2] Rubinstein A, David R. Approaches and opportunities in colon-specific drug delivery [J]. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 1995, 12(2/3): 101.
- [3] 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.
- [4] Friend D R. Colon-specific drug delivery [J]. Adv Drug Deliv Rev, 1981(7): 149.
- [5] Basit A W. Oral colon-specific drug delivery using amylose-based film coatings [J]. Pharm Tech Europe, 2000, 12(2): 30.
- [6] 魏秀莉. 果胶/钙在体交联结肠定位释药系统的研究 [D]. 上海: 复旦大学, 2006.
- [7] 熊小兵, 张均寿, 张岚, 等. 原子吸收光谱法和络合滴定法测定果胶钙的含钙率 [J]. 中国药科大学学报, 2001, 32(5): 367.
- [8] 杨志欣, 常爽, 谢丽, 等. 酶控渗透泵型结肠定位微丸的制备及体外释放度考察 [J]. 中国现代应用药学, 2011, 28(5): 451.
- [9] 刘德文, 王锦玉, 刘晓谦, 等. 结肠靶向给药系统的研究现状及展望 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(10): 199.
- [10] 谢兴亮, 杨明, 韩丽, 等. pH 敏感双层型苦参结肠靶向微丸的体内外释药性能评价 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(10): 7.
- [11] 李国峰. 菌群触发型结肠定位给药制剂释药与吸收研究 [D]. 广州: 第一军医大学, 2004.

[责任编辑 仝燕]