

星点设计法优化盐酸小檗碱树脂复合胃黏附给药系统的研究

陈飞¹, 张悦², 刘强¹, 庞茗之¹, 杨星钢¹, 潘卫三^{1*}

(1. 沈阳药科大学药学院, 辽宁沈阳 110016; 2. 第二军医大学药学院, 上海 200433)

摘要: 本文以离子交换树脂(IER)作为载体吸附盐酸小檗碱,通过包衣将其制成胃黏附微囊,并以胃黏附微囊的载药量,胃滞留时间和体外释药时间作为评价指标,对方剂进行优化。考察不同型号载体与不同浓度、温度和 pH 值的药物溶液对 IER 载药量的影响;以卡伯姆 934 与 IER 的比例(X_1)、丙烯酸树脂(Eudragit)与 IER 的比例(X_2)、Eudragit RL 与 Eudragit RS 的比例(X_3)为自变量,以制剂累计释放量 85% 的时间点(Y_1)、制剂在大鼠胃体外黏附滞留百分比(Y_2)为因变量,通过星点设计一效应面法优化胃黏附包衣处方。优化后载药工艺为在 37 °C、pH 5 左右条件下,用 IRP88 离子交换树脂对 1.0 mg·mL⁻¹ 盐酸小檗碱溶液载药;优化后的包衣液组成为 $X_1 = 0.75$ 、 $X_2 = 0.9$ 、 $X_3 = 0.6$,所得制剂单位质量载药量高,可在 300 min 左右达到累计释放总量的 85%,同时在所设计条件范围内胃黏附作用最强。

关键词: 离子交换树脂; 盐酸小檗碱; 星点设计一效应面法; 胃黏附微囊; 卡伯姆; 丙烯酸树脂

中图分类号: R943.4 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2008)09-0963-06

Optimization of a novel mucoadhesive drug deliver system with ion-exchange resin core loaded with berberine hydrochloride using central composite design methodology

CHEN Fei¹, ZHANG Yue², LIU Qiang¹, PANG Ming-zhi¹, YANG Xing-gang¹, PAN Wei-san^{1*}

(1. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China;

2. College of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: A novel mucoadhesive microcapsule with drug-resin complex core loaded with berberine hydrochloride (BH) was developed and optimized. Drug-ion exchange resin (IER) complex was prepared by static method which stirring IER in drug solution at certain conditions. The influences of different IERs, different temperature, pH values and concentrations of drug solution on the drug loading were investigated. IER complex was coated by emulsion-solvent evaporation method. The coating fluid formulation was optimized using central composite design-response surface methodology, where the ratio between Carbopol 934 and IER (X_1), the ratio between Eudragit and IER (X_2) and the ratio between Eudragit RL and RS (X_3) were taken as independent variables. Time of cumulative release 85% (Y_1) and percentage of gastric retention (Y_2) were taken as response variables. Drug loading achieved a high level and more drug available in the condition of IER (IRP 88), 37 °C, pH 5 and 1.0 mg·mL⁻¹ drug solution. When $X_1 = 0.75$, $X_2 = 0.9$, $X_3 = 0.6$, the time of cumulative release reached 85% at 300 min, the highest percentage of gastric retention in the range of this experiment were procured.

Key words: ion-exchange resin; berberine hydrochloride; central composite design — response surface methodology; mucoadhesive microcapsule; Carbopol; Eudragit

收稿日期: 2008-03-04.

* 通讯作者 Tel: 86-24-23986313, Fax: 86-24-23953241,
E-mail: ppwwss@163.com

黄连的主要有效成分小檗碱对多种革兰阳性和阴性细菌均有抑制作用。其抑菌机制尚未完全阐明,目前研究认为可能是小檗碱能抑制细菌糖代谢

中丙酮酸的氧化脱羧过程,且对细菌核酸合成有抑制作用,从而达到抑菌效果。已有文献^[1,2]报道黄连有较好的抑杀幽门螺旋杆菌的作用,其中小檗碱具有明确的体外抑杀幽门螺旋杆菌作用^[3]。

离子交换树脂(IER)是一种带有功能基团的网状不溶性惰性高分子材料,能与溶液中其他离子进行离子交换或吸附的高分子聚合物^[4,5]。口服药物树脂复合物后,其在胃肠道中与内源性离子发生离子交换反应,缓慢地释放药物,发挥疗效,可达到延长作用时间、稳定释药速度及提高生物利用度等目的。

将盐酸小檗碱制备成胃黏附制剂,可提高药物在胃内滞留时间,提高药物疗效及降低药物毒性。口服后黏附于胃壁上,不受胃排空速率的影响,可以起到胃部靶向作用,有利于治疗由幽门螺旋杆菌引起的胃溃疡。选择卡伯姆 934(Cp934)作为胃黏附材料可以更好地提高制剂的胃滞留能力。在胃酸性环境中有利于其未解离羧基与胃内黏蛋白间氢键的形成,最大限度发挥其生物黏附功能^[6]。

材料与方 法

仪器 FW100 型高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司);ZRC6-B 型药物溶出度测定仪(上海黄海药检仪器厂);UV-9100 紫外可见分光光度计(北京瑞利分析仪器公司)。

试剂 盐酸小檗碱(四川广汉市维康植化有限公司,批号 061021);离子交换树脂 Amberlite™ IRP69、IRP64、IRP88(美国 Rohm and Haas 公司);Eudragit RL100、RS100(德国 Rohm 公司);聚乙二醇 400(PEG 400)、聚乙二醇 4000(PEG 4000)(天津市博迪化工有限公司);乙醇、石油醚、液体石蜡、Span 80、氯化钠、十二烷基硫酸钠及丙酮等皆为分析纯。

动物 健康 SD 大鼠,雄性,体重 190~250 g。由沈阳药科大学实验动物房提供,许可证号:SCXK(辽)2003-0011。

药物-离子交换树脂复合物(drug-ion exchange resin complexes, DIRC)的制备 精密称取 IER 适量加入到一定浓度的药物溶液中,控制不同温度于一定转速下充分搅拌,并于设定的时间取样,用紫外分光光度法于 345 nm 处测定吸收度(A),分别按式(1)和式(2)计算树脂的交换药量(Q)及药物利用率(E),至药物浓度基本不变时,反应即达平衡。

$$Q = \frac{(C_0 - C_t)V}{W_R} \quad (1)$$

$$E = \frac{C_0 - C_t}{C_0} \quad (2)$$

其中,Q为t时刻单位质量树脂的交换药量(g·g⁻¹),C₀为盐酸小檗碱的初始药物质量浓度(g·L⁻¹),C_t为t时刻盐酸小檗碱的药物质量浓度(g·L⁻¹),V为盐酸小檗碱药物溶液体积(L),W_R为干态树脂质量(g)。

比较不同型号离子交换树脂载药能力 选用 IRP69 强酸 Na⁺型、IRP64 弱酸 H⁺型和 IRP88 弱酸 K⁺型阳离子交换树脂 200 mg 于 25 °C 条件下,在 1.0 mg·mL⁻¹盐酸小檗碱溶液 500 mL 中载药。以平衡交换药量 Q_B 与平衡药物利用率 E_B 为指标,筛选树脂。

比较不同温度对离子交换树脂载药量的影响 以 IRP88 弱酸 K⁺型阳离子交换树脂 200 mg 为载体,分别在 10、25、37 和 45 °C 条件下于 1.0 mg·mL⁻¹盐酸小檗碱溶液 500 mL 中载药。以平衡交换药量 Q_B 与交换平衡时间 t_B 为指标,筛选树脂最佳载药温度。

比较不同 pH 值条件下离子交换树脂载药能力 以 IRP88 弱酸 K⁺型阳离子交换树脂 200 mg 为载体,分别在 pH 2.07、pH 4.00、pH 6.00、pH 7.99 和 pH 10.66 条件下于 37 °C、1.0 mg·mL⁻¹盐酸小檗碱溶液 500 mL 中载药。以平衡交换药量 Q_B 为指标,筛选树脂最佳载药 pH 值。

比较不同药物溶液浓度对离子交换树脂载药量的影响 以 IRP88 弱酸 K⁺型阳离子交换树脂 200 mg 为载体,分别在 0.2、0.5、1.0、1.5、2.0 和 2.5 mg·mL⁻¹条件下于 37 °C、pH 5.0 盐酸小檗碱溶液 500 mL 中载药。以平衡交换药量 Q_B 与平衡药物利用率 E_B 为指标,筛选最佳药液质量浓度。

DIRC 包衣 取 DIRC 适量加入到 20% (w/v) PEG 4000 水溶液中,室温下搅拌 30 min,干燥过筛得浸渍的 DIRC。以 Eudragit RL(ERL)、Eudragit RS(ERS)和 Cp934 为囊材,采用 W/O 型乳化溶剂挥发法,将浸渍处理后的 DIRC 混悬于无水乙醇囊材溶液中,以液体石蜡为连续相(外相)、无水乙醇囊材 DIRC 混悬液为分散相(内相)、Span 80 表面活性剂为乳化剂。制备工艺如下:分散相-连续相-Span 80 (30:4:3)在 30 °C 条件下固化,300 r·min⁻¹搅拌 8 h 后用布氏漏斗抽滤,收集微囊,石油醚洗涤,25 °C 真空干燥 24 h。将所得微囊过 180 目筛备用。

释放度实验 按照中国药典(2005年版二部释放度测定方法第一法)溶出度测定法第二法仪器装置进行测定。溶出介质选用含0.1% SDS的0.1 mol·L⁻¹ HCl溶液, 转速100 r·min⁻¹, 介质温度(37.0±0.5)℃。分别于设定时间点取样5 mL, 同时补充等体积同温释放介质, 过0.4 μm微孔滤膜后, 以释放介质为空白, 于345 nm处测定吸光度(A), 计算盐酸小檗碱累积释放度。

胃滞留百分比测定 采用离体动物生物黏附测定法^[7~9]。将禁食供水饲养24 h后的大鼠处死后取胃, 延胃大弯打开后平铺于载玻片上。将100粒不同处方微囊分别撒在大鼠胃黏膜表面, 置于饱和氯化钠溶液的密闭容器中, 保湿20 min。取出后将载玻片呈45°斜角放置。用pH 1.3生物等渗盐酸氯化钠溶液以22 mL·min⁻¹流速冲洗5 min后, 计数微囊在胃黏膜表面的粒数。所计数量为微囊的胃滞留百分比。

星点设计—效应面法^[10~12] 定义自变量Cp934与IER的比例为X₁、Eudragit与IER的比例为X₂、ERL与ERS的比例为X₃, 参考单因素试验确定自变量取值范围如下: 0 ≤ X₁ ≤ 0.8; 0.2 ≤ X₂ ≤ 1; 0 ≤ X₃ ≤ 1。定义因变量制剂累计释放量85%的时间点为Y₁; 制剂在大鼠胃体外黏附滞留百分比为Y₂。

根据星点设计原理确定因素水平如表1所示。试验设计如表2所示。

分别以Y₁、Y₂为评价指标, 利用SAS 8.0对各因素水平进行多元线性回归和二次三项式拟合。对二项式方程中的各项系数进行t检验, 删除P>0.2的项, 以达到简化模型的目的。比较拟合方程的回归系数r, 以方程回归系数r最大且F检验合格为原则确定拟合方程。根据最优方程用Oringin 7.0软件分别绘制各指标与其两个自变量的效应面与等高线。其中另一自变量取中间值。根据需要选取优化

Table 1 Independent variables and their correspondent values in coated and physical form

Independent variable	Level				
	-√3	-1	0	1	√3
X ₁	0	0.17	0.4	0.63	0.8
X ₂	0.2	0.37	0.6	0.83	1
X ₃	0	0.21	0.5	0.79	1

X₁: Carbopol 934/ion-exchange resin (IER); X₂: Eudragit/IER; X₃: Eudragit RL/Eudragit RS

Table 2 Experiment design table with experimentally determined values of different dependent variables

Formulation No.	X ₁	X ₂	X ₃	Time of cumulative release 85%/min	Percentage of gastric retention/%
1	0.17	0.37	0.211	210	33
2	0.17	0.37	0.789	168	34
3	0.17	0.83	0.211	288	38
4	0.17	0.83	0.789	246	38
5	0.63	0.37	0.211	216	63
6	0.63	0.37	0.789	180	62
7	0.63	0.83	0.211	288	69
8	0.63	0.83	0.789	252	71
9	0.4	0.6	0	318	64
10	0.4	0.6	1	216	62
11	0.4	0.2	0.5	156	58
12	0.4	1	0.5	342	66
13	0	0.6	0.5	240	15
14	0.8	0.6	0.5	288	80
15	0.4	0.6	0.5	270	60
16	0.4	0.6	0.5	273	57
17	0.4	0.6	0.5	266	53
18	0.4	0.6	0.5	271	62
19	0.4	0.6	0.5	270	59
20	0.4	0.6	0.5	273	61

区域, 并在优化区域内选择代表性的处方进行验证, 计算偏差。

$$\text{偏差} = (\text{预测值} - \text{实际值}) / \text{预测值} \times 100\%$$

结果

1 不同条件对离子交换树脂载药量的影响

不同型号离子交换树脂载药能力的比较结果见表3。3种型号树脂对比可知, 在相同的条件下IRP88具有最高的载药能力。

Table 3 Amount of the drug loaded (Q_B) and drug availability (E_B) of different ion-exchange resin (IRPs)

Parameter	IRP69	IRP64	IRP88
Q _B /g·g ⁻¹	0.17	0.24	1.57
E _B	0.067	0.092	0.59

不同温度对离子交换树脂载药量的影响结果见表4。温度的变化对树脂载药能力几乎没有影响, 但影响树脂的载药平衡速度。温度越高则载药速度越快, 这既符合离子交换热力学原理, 也符合药物在树脂内部传递动力学原理。但温度过高易引起药物降解, 因此选用37℃。

Table 4 Amount of the drug loaded (Q_B) and balance time (t_B) of exchange at different temperatures

Parameter	10 °C	25 °C	37 °C	45 °C
$Q_B/\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	1.42	1.57	1.58	1.61
t_B/min	40	40	30	10

不同 pH 值条件下的载体载药能力见图 1。由图 1 可知 pH 值对离子交换树脂与药物结合有明显影响, 在试验设计范围内可推出 pH 5.0 左右时树脂载药量最大。经验证, 在 pH 为 5.0 时交换药量 (Q) 为 1.59。药物与离子交换树脂都达到最大解离状态, 结合能力最强。在相同条件下树脂载药量最大。

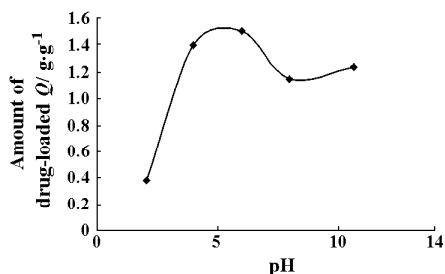


Figure 1 Influence of different pH values on the amount of the drug loaded

不同药物溶液浓度对载体载药的影响结果见图 2。由图 2 可知, 当药量未达到饱和和交换量时, 随着盐酸小檗碱浓度的增加, 树脂平衡交换量迅速升高, 但当浓度增加到某一值时, 即药量达到饱和和交换量时, 树脂平衡交换量增加幅度非常小, 但药物利用率却明显降低。通常认为能获得满意的离子交换量的同时又有较高的药物利用率为制备药物树脂的关键, 故实际操作中应选用达饱和和交换量的最低药物浓度, 以求获得较高的载药量和药物利用率, 减少药物损失。因此选用 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 质量浓度作为最佳载药浓度。

2 星点设计—效应面法对包衣处方优化

最终拟合方程如下:

$$Y_1 = 53.68 + 147.77X_1 + 477.20X_2 - 143.13X_1^2 - 236.88X_2^2 - 82.06X_3^2 \quad (3)$$

$$(r^2 = 0.89, P = 0.0004)$$

$$Y_2 = 14.72 + 131.04X_1 - 93.07X_1^2 + 26.93X_1X_2$$

$$(r^2 = 0.94, P = 0.0001)$$

采用 Oringin 7.0 统计软件绘制以上拟合方程的效应面和等高线, 结果如图 3。

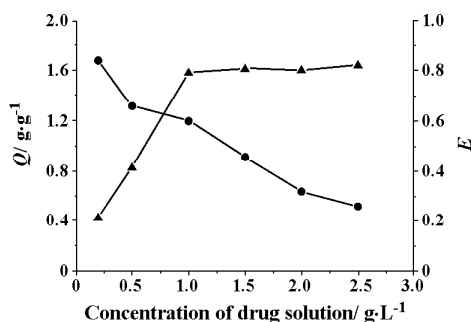


Figure 2 Influence of different concentrations of drug solution to the amount of the drug loaded and drug availability separately. ▲ Amount of the drug-loaded (Q); ● Drug availability (E)

根据剂型设计需要, 希望获得在 300 min 时累计释放量达到总释放量 85%, 并在胃中滞留能力最强的包衣处方。由图 3 可知, X_2 (Eudragit/IER) 对释药速度影响最大, 随着 X_2 增大药物释放速度变慢; X_1 (Cp934/IER) 对胃内滞留影响最大, 随着 X_1 增大制剂在胃中黏附能力增强; X_3 (ERL/ERS) 对释药速度有影响, 但对提高胃黏附能力则没有影响, 随着 X_3 变大, 释药速度变快, 到达累计释放量 85% 的时间提前。

根据图 3 和剂型设计, 预测影响胃滞留时间的最佳范围: X_1 (Cp934/IER) 为 0.7 ~ 0.8; X_2 (Eudragit/IER) 为 0.8 ~ 1.0。取 X_1 、 X_2 预测范围中间值代入式(3), Y_1 值取 300, 计算 X_3 取值。得到 $X_3 = 0.6$ 时制剂累计释放 85% 时间为 300 min。

3 处方优化验证

按优化处方: $X_1 = 0.75$; $X_2 = 0.9$; $X_3 = 0.6$ 包衣, 考察预测值与实测值偏差(表 5)。可见两指标的偏差均小于 5%, 建立的数学模型具有良好的预测效果。

Table 5 Comparison of forecasted and true values ($n = 3$)

Parameter	Forecasted value	True value	Variance/%
Y_1/min	300	310	-3.3 ± 0.38
Y_2	0.80	0.77	3.8 ± 1.39

4 DIRC 与微囊释放行为对比

由图 4 可知包衣后制剂的释放时间有明显的延长, 完全释放由原来的 2 h 延长到 5 h 左右。

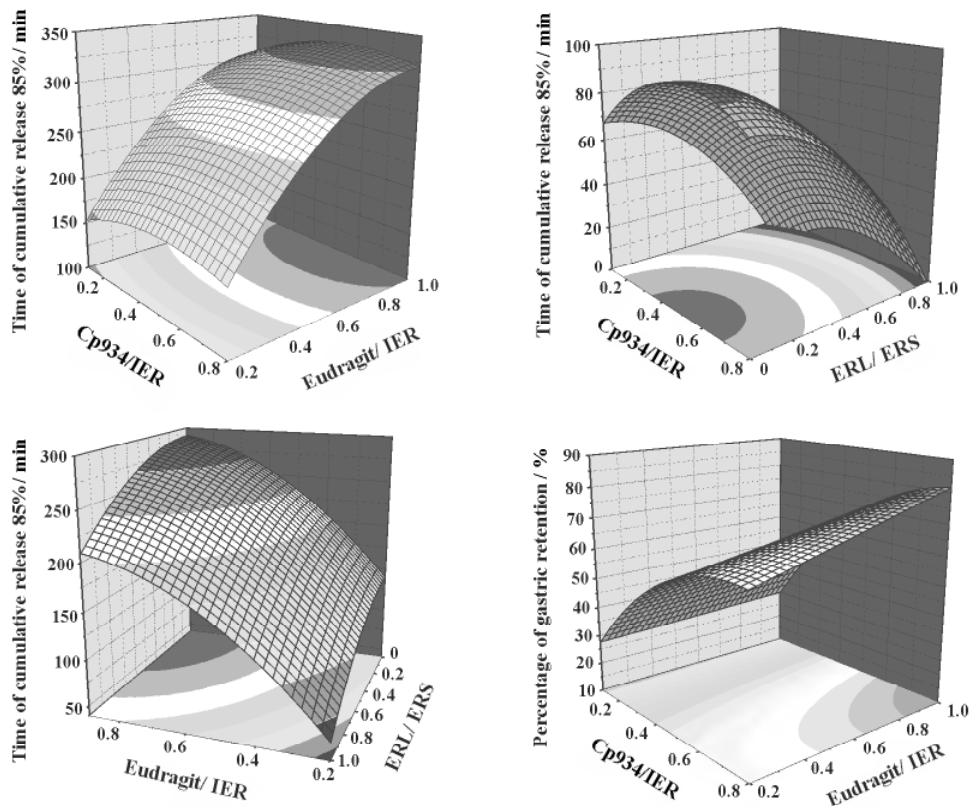


Figure 3 Response surfaces and contour plots of the time of cumulative release 85% (Y_1) and percentage of gastric retention (Y_2) with two factors. Cp934: Carbopol 934; IER: Ion-exchange resin; ERL: Eudragit RL; ERS: Eudragit RS

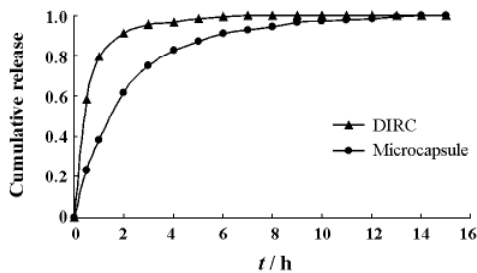


Figure 4 The dissolution release profile of drug-ion exchange resin complexes (DIRC) and microcapsule

讨论

盐酸小檗碱是强酸弱碱盐。离子交换树脂可看成盐:IRP69 强酸 Na^+ 型为强酸强碱盐、IRP64 弱酸 H^+ 型为弱酸、IRP88 弱酸 K^+ 型为弱酸强碱盐。小檗碱与 IRP69 形成强酸弱碱型复合物,解离能力较强,不稳定,因此载药能力不强;与 IRP64 形成弱酸弱碱型复合物和强酸,解离能力弱,但副产物为酸,

降低溶液 pH 值,从而影响了药物的溶解度,因而载药量也不高;与 IRP88 形成弱酸弱碱型复合物,解离能力弱,载药量高。

通常在离子交换树脂表面进行的离子交换反应很快达到平衡,过程速率主要是由离子在液固两相间的传质过程所决定,药物从溶液中扩散到树脂内部是一个非稳态过程,升高温度既有利于药物传递,也有利于化学反应更快平衡。但温度过高将影响药物的稳定性。

依据定量处理离子交换平衡的唐南平衡理论,参与交换的离子在浓度差推动下进行交换,当反应进行到一定程度时,可交换离子在两相建立了平衡状态。当树脂质量一定时,高浓度所产生的高浓度差可以推动药物离子进入孔道并与活性基团接触,加大离子间交换作用的推动力,所以在交换达平衡点时可获得较高的离子交换量,但同时药物利用率往往比较低,即平衡交换量与药物利用率是一对矛盾体。

胃黏附制剂的胃滞留时间与胃黏膜有直接关系。人体的胃黏膜细胞代谢周期差别很大,与营养和健康状态直接相关,但由于进食和胃蠕动作用促进胃黏膜脱落,所以胃黏附制剂在胃内滞留时间有限。本实验的设计是为了杀灭和抑制胃幽门螺旋杆菌以治疗胃溃疡病症。为达到此治疗目的,需要保证盐酸小檗碱在胃表面的有效浓度。因此本制剂设计释放时间 5 h 释放完全,提高药物的生物利用度。根据《口服缓控释制剂指导原则》,选取该制剂释放 85% 的时间点作为释放药物完全的标志。

ERS 和 ERL 在水中不溶,但能溶胀,在包衣中形成孔道。ERL 的孔道直径为 1~5 μm , ERS 为 0.1~0.6 μm 。包衣内侧的药物通过这些孔道释放。调节这两种材料的配比和包覆量可调整释药速率。ERS 在水中形成的孔径小于 ERL,因此 ERL 的渗透性比 ERS 强。在总量不变的情况下增加 ERL 比例会增加药物释放速度,反之亦然。通过调整 Eudragit 用量和控制 ERS 与 ERL 的比例可以很好的控制制剂的释放速度。同时本实验重视丙烯酸树脂与卡伯姆在结构上的相似性。在以乙醇为溶剂条件下,丙烯酸树脂与卡伯姆彼此分散非常均匀,为包衣均匀性,为释放稳定性方面提供了良好的支持。

在星点设计—效应面法中影响释放速度有 3 个因素,并且达到累计释放总量 85% 的时间点并非极值型因变量,不能通过效应面趋势推出。因为各自变量与因变量之间符合已经拟合出的方程,在条件适宜时通过方程计算自变量更准确。

药物与树脂间为化学吸附,依靠离子键结合。根据药物树脂复合物释放曲线可见离子交换树脂载药后可防止药物突释现象发生,使用药物更安全。同时药物树脂复合物本身具备缓慢释放药物的能力,因选择制备工艺和释放条件不同,其释放药物的速率发生改变。在本实验中未包衣前的药物树脂复合物 2 h 释药达到累计释放总量的 85%,并且释药平稳,呈现出良好药物载体特性。

References

- [1] Wang XL, Jiao WL, Lu ZS, et al. Preliminary screening of Chinese herbal medicine in inhibiting *Helicobacter pylori* [J]. Chin J Integr Tradit Chin West Med (中国中西医结合杂志), 1994, 14:534-536.
- [2] Kyoumi N, Shinsuke S, Taizo H. Effects of crude drugs and berberine hydrochloride on the activities of fungi [J]. J Prosthet Dent, 1990, 64:691-694.
- [3] Wu J, Wang KQ, Li CB, et al. Bacteriostasis *in vitro* of coptis and berberine hydrochloride against *Helicobacter pylori* [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med (中药药理与临床), 2006, 22:37-38.
- [4] Li ZH, Ping QN, Liu GJ. Recent advances in drug sustained release technology using ion-exchange resin [J]. Ion Exchange Adsorp (离子交换与吸附), 1997, 13:613-619.
- [5] Vikas A, Raghupathi K, Sanjay C. Ion-exchange resins: carrying drug delivery forward [J]. Drug Discov Today, 2001, 17:905-914.
- [6] Nakanishi T, Kaiho F, Hayashi M. Improvement of drug release rate from Carbopol 934P formulation [J]. Chem Pharm Bull, 1998, 46:171-173.
- [7] Lu WY, Pan J, Liu M. The bioadhesive property of aciclovir microspheres on animals gastric mucin and its *in vitro* effect of sustained drug release [J]. Chin Pharm J (中国药学杂志), 2000, 35:313-317.
- [8] Tur KM, Ching HS. Evaluation of possible mechanism (s) of bioadhesion [J]. Int J Pharm, 1998, 160:61-74.
- [9] Govender S, Pillay V, Chetty DJ, et al. Optimisation and characterisation of bioadhesive controlled release tetracycline microspheres [J]. Int J Pharm, 2005, 306:24-40.
- [10] Zhang JY, Gan Y, Gan L, et al. Optimization and evaluation of a new antischistosomal drug QH917 self-microemulsifying drug delivery system [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2007, 42:434-439.
- [11] Gan LC, Hou SX, Bi YQ, et al. Optimized preparation of tanshinones II A-loaded nanoparticles by central composite design and response surface method [J]. Chin Pharm J (中国药学杂志), 2007, 142:758-761.
- [12] He EJ, Feng JF, Pan JZ, et al. Optimized preparation of silymarin-loaded solid lipid nanoparticles by central composite design and response surface method [J]. Chin J Pharm (中国医药工业杂志), 2005, 36:18-21.