

[制 剂]

鱼腥草挥发油 HPCD 包合物肠用温敏凝胶的制备

张壮丽¹, 赵晓丹^{2*}, 王纪芬², 赵志鸿¹, 张小俊¹, 王桂芳¹

(1. 河南省(郑州大学)医药科学研究院, 河南 郑州 450052; 2. 郑州大学药物研究院, 河南 郑州 450001)

摘要: 目的 制备鱼腥草挥发油羟丙基-β-环糊精(HPCD)包合物肠用温敏凝胶。方法 冷溶法制备凝胶,以泊洛沙姆407、泊洛沙姆188用量为影响因素,相变温度为评价指标,星点设计-效应面法优化处方。以甲基正壬酮为指标成分,无膜溶出法和透析袋法分别考察凝胶溶出率与体外释放率,再通过高温(40、60℃)、低温(4℃)、强光[(4 500±500)lx]、加速(3个月)试验评价其稳定性。结果 最佳条件为P407用量20.61%,P188用量3.03%,相变温度36.5℃。在30~150 min时,HPCD包合物凝胶累积溶出率高于挥发油凝胶,在150~210 min时趋于一致,但前者累积释放率(0~50 h)一直高于后者。所得凝胶在低温下稳定性良好;高温、强光、加速下其外观、性状(高温除外)、pH均较稳定,但甲基正壬酮含量明显降低。结论 鱼腥草挥发油HPCD包合物肠用温敏凝胶应在低温(4℃)下保存。

关键词: 鱼腥草挥发油; HPCD包合物; 肠用温敏凝胶; 甲基正壬酮; 星点设计-效应面法; 冷溶法

中图分类号: R944

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2018)05-1060-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.05.010

Preparation of thermosensitive intestinal gels of *Houttuynia cordata* volatile oils HPCD inclusion compound

ZHANG Zhuang-li¹, ZHAO Xiao-dan^{2*}, WANG Ji-fen², ZHAO Zhi-hong¹, ZHANG Xiao-jun¹, WANG Gui-fang¹

[1. Institute of Medical and Pharmaceutical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China; 2. College of Pharmaceutical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China]

ABSTRACT: AIM To prepare the thermosensitive intestinal gels of *Houttuynia cordata* Thunb volatile oils hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HPCD) inclusion compound. **METHODS** For the gels prepared by cold dissolving method, poloxamer 407 consumption and poloxamer 188 consumption were taken as influencing factors, together with phase transition temperature as an evaluation index, central composite design-response surface method was applied to optimizing the formulation. With 2-undecanone as an index component, the gels' dissolution rate and *in vitro* release rate were investigated by non-membrane dissolution method and dialysis bag method respectively, whose stability was then evaluated by high temperature (40, 60 °C), low temperature (4 °C), strong light [(4 500 ± 500) lx] and acceleration (three months) tests. **RESULTS** The optimal conditions were determined to be 20.61% for P407 consumption and 3.03% for P188 consumption, the phase transition temperature was 36.5 °C. Within the time range of 30 – 150 min, the HPCD inclusion compound gels exhibited higher accumulative dissolution rate than the volatile oils gels, which tended to be consistent in 150 – 210 min, but the former exhibited higher accumulative release rate (0 – 50 h) than the latter all the time. The obtained gels showed good stability at low temperature, whose appearance, characteristic (except for high temperature) and pH were stable at high temperature, strong light and acceleration with obviously decreased 2-undecanone content. **CONCLUSION** The

收稿日期: 2017-08-23

基金项目: 河南省高等学校重点科研项目资助计划(18A360005); 河南省医药科学研究院基本业务费科研项目(YYYJK201710)

作者简介: 张壮丽(1978—),女,博士,副研究员,从事新药研发。Tel: (0371) 6658204, E-mail: zzl7814@163.com

*通信作者: 赵晓丹(1991—),女,硕士生,从事新药研发。Tel: 18790293676, E-mail: 674660927@qq.com

thermosensitive intestinal gels of *Houttuynia cordata* Thunb volatile oils HPCD inclusion compound should be stored at low temperature (4 °C).

KEY WORDS: *Houttuynia cordata* Thunb volatile oils; HPCD inclusion compound; thermosensitive intestinal gels; 2-undecanone; central composite design-response surface method; cold dissolving method

鱼腥草为三白草科植物蕺菜 *Houttuynia cordata* Thunb. 的新鲜全草, 挥发油是其主要成分, 有抗肿瘤、抗菌、抗病毒、抗过敏等作用^[1], 本课题组前期研究表明, 它能诱导结直肠癌 SW480 细胞凋亡。为使其更好地发挥药效来治疗结直肠癌, 本实验将其制成包合物温敏凝胶, 通过直肠灌入方式给药, 可使药物直达病灶部位, 并在直肠和乙状结肠处维持较高的药物浓度, 从而发挥治疗作用^[2]。

温敏型原位凝胶是对温度变化特别敏感的药物, 在室温下是液体, 到达体内温度后迅速发生相转变, 形成半固体凝胶而缓慢释放^[3]。与口服制剂相比, 它可避免胃肠道消化和肝脏首过效应; 与注射液相比, 它还能提高病人的依从性。

泊洛沙姆 407 (P407) 和泊洛沙姆 188 (P188) 常作为温敏凝胶的基质。本实验通过冷溶法制备鱼腥草挥发油包合物温敏凝胶, 以 P407、P188 用量为影响因素, 相变温度为评价指标, 通过星点设计-效应面法优化制备工艺, 再采用 GC 法, 以甲基正壬酮为指标成分, 从外观、性状、pH、含有量、稳定性方面对其进行评价。

1 仪器与材料

气相色谱仪 (美国安捷伦公司); WD-2A 药物稳定性检查仪 (北京同德创业科技有限公司); SHZ-82 气浴恒温振荡器 (江苏金坛市中大仪器厂); AR1530 电子天平 (梅特勒-托利多仪器上海有限公司); EYELA 冷冻干燥机 (东京理化器械株式会社)。挥发油 (实验室自制); 羟丙基-β-环糊精 (HPCD, 西安德力生物化工有限公司); 甲基正壬酮对照品 (中国食品药品检定研究院); P407、P188 (德国 BASF 公司); 再生纤维素透析膜 (分子量 1 000, 美国 Solarbio 公司)。

2 方法与结果

2.1 挥发油提取 采用水蒸气蒸馏法^[4]。

2.2 凝胶制备 采用搅拌法制备 HPCD 包合物溶液, 石油醚萃取除去未包合的挥发油, 微孔滤膜过滤后冷冻干燥, 即得相应冻干粉^[5]。精密量取适量蒸馏水于圆底烧瓶中, 冰水浴下边搅拌边缓慢加入 P407 和 P188, 充分溶解后, 置于 4 °C 冰箱中过夜, 得到澄清透明的空白凝胶, 量取适量, 冰水浴

下边搅拌边缓慢加入冻干粉, 充分搅拌均匀, 即得。

2.3 相变温度测定 采用倾斜西林瓶法^[6]。将含有不同浓度 P407 和 P188 的空白凝胶和 HPCD 包合物凝胶分别置于西林瓶中, 水浴条件下将温度计插入凝胶溶液中, 以每分钟升高 0.5 °C 的速率缓慢升高温度, 每隔 10 s 倾斜西林瓶 60°, 以凝胶溶液不流动时的温度为相变温度。

2.4 星点设计-效应面法 通过单因素试验, 选择 P407 用量 (X₁) 和 P188 用量 (X₂) 作为影响因素, 相变温度作为评价指标 (Y)。因素水平见表 1。

表 1 因素水平

Tab. 1 Factors and levels

因素	水平				
	-1.414	-1	0	1	1.414
X ₁ P407/%	17	17.88	20	22.12	23
X ₂ P188/%	0	1.03	3.5	5.97	7

然后, 采用 Design-expert V8.0.6 软件设计 13 组试验, 并对各因素进行二次多项式回归分析, 结果见表 2, 方差分析见表 3, 响应面分析见图 1, 方程为 $Y = 130.61995 - 7.34562X_1 + 5.36751X_2 - 0.052381X_1X_2 + 0.10944X_1^2 - 0.24204X_2^2$ ($R^2 = 0.9940$)。

表 2 试验设计及结果

Tab. 2 Design and results of tests

编号	代码值		实际值		Y/°C
	X ₁	X ₂	X ₁ /%	X ₂ /%	
1	0	1.414	20.00	7.00	46.5
2	-1	-1	17.88	1.03	39.1
3	0	0	20.00	3.50	40.3
4	0	-1.414	20.00	0.00	26.5
5	0	0	20.00	3.50	39.3
6	0	0	20.00	3.50	40.1
7	1	1	22.12	5.97	38.0
8	0	0	20.00	3.50	39.1
9	-1	1	17.88	5.97	51.5
10	1.414	0	23.00	3.50	30.7
11	1	-1	22.12	1.03	26.7
12	0	0	20.00	3.50	39.4
13	-1.414	0	17.00	3.50	50.2

由此可知, P407、P188 用量对相变温度均有

表3 方差分析
Tab. 3 Analysis of variance

来源	离均差平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	714.19	5	142.84	230.62	<0.000 1
A	357.48	1	357.48	577.17	<0.000 1
B	337.80	1	337.80	545.39	<0.000 1
AB	0.30	1	0.30	0.49	0.507 2
A ²	1.69	1	1.69	2.72	0.142 8
B ²	15.29	1	15.29	24.69	0.001 6
残差	4.34	7	0.62		
失拟项系数	3.22	3	1.07	3.87	0.112 2
纯误差	1.11	4	0.28		
总变异	718.53	12			

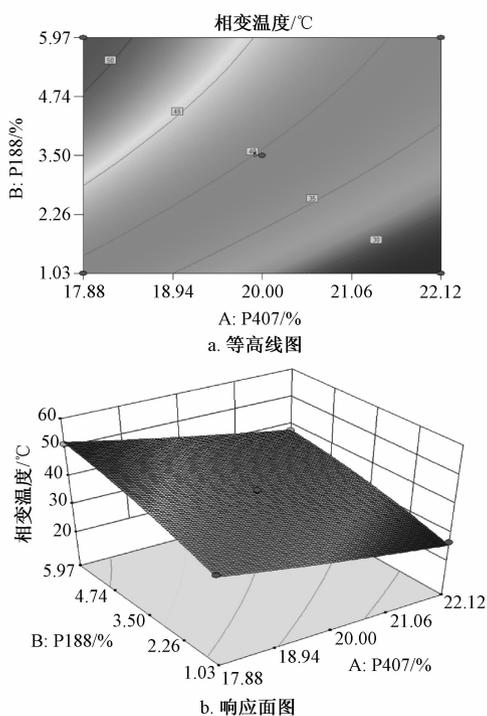


图1 各因素响应面图

Fig. 1 Response surface plots for various factors

显著影响 ($P < 0.000 1$); 校正决定系数 R_{Adj} 为 0.989 7, 表明模型能反映 98.97% 的响应值变化, 即表明建模成功。最优条件为 P407 用量 20.61%, P188 用量 3.03%, 相变温度 36.5 °C, 此时凝胶 pH 为 6.93, 符合肠道 pH 要求。

2.5 甲基正壬酮含有量测定 甲基正壬酮是挥发油中含有量较高、性质相对稳定的成分, 故将其作为指标成分。根据其含有量, 本实验暂确定凝胶中药物含有量为 86.72 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.5.1 GC 条件 HP-5MS 石英毛细管色谱柱; 载气氮气, 尾吹气氮气; 进样口、氢火焰离子化检测器温度 280 °C; H_2 体积流量 40 mL/min; 空气体积流量 450 mL/min; 柱体积流量 1 mL/min; 进样

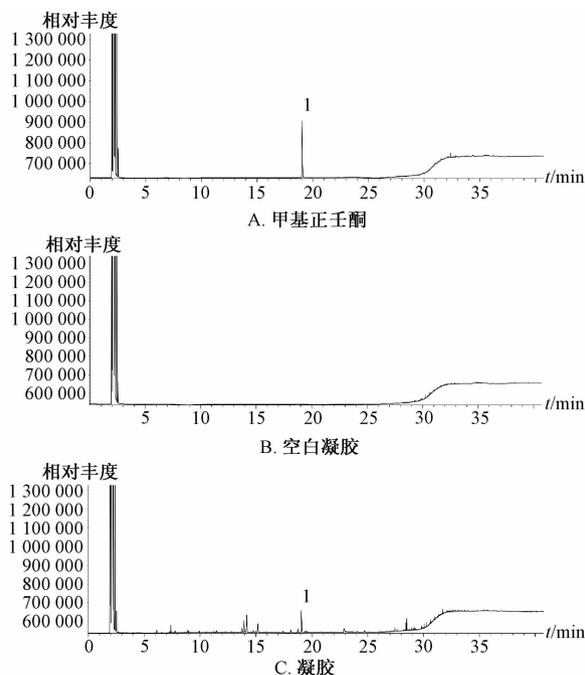
量 1 μL ; 分流比 20 : 1; 程序升温 (70 °C 保持 5 min, 5 °C/min 升至 100 °C, 2 °C/min 升至 123 °C 并保持 3 min, 30 °C/min 升至 280 °C 并保持 10 min^[7])。

2.5.2 溶液制备

2.5.2.1 对照品溶液 精密称取甲基正壬酮对照品 0.1 mg 于 25 mL 量瓶中, 正己烷定容至刻度, 摇匀, 即得, 临用前稀释至系列质量浓度。

2.5.2.2 供试品溶液 精密量取凝胶 1 mL 于锥形瓶中, 分别加入 5、3 mL 正己烷超声萃取 2 次, 正己烷层定容至 10 mL 量瓶中, 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 即得。

2.5.3 专属性考察 GC 色谱图见图 2, 发现在相同条件下, 甲基正壬酮的出峰时间为 19.03 min, 而空白凝胶在该处无色谱峰, 表明该方法专属性良好。



1. 甲基正壬酮
1. 2-undecanone

图2 甲基正壬酮 GC 色谱图

Fig. 2 GC chromatograms of 2-undecanone

2.5.4 精密度试验 取对照品母液, 正己烷稀释成低、中、高 3 种质量浓度, 在“2.5.1”项色谱条件下进样测定, 测得日内精密度 RSD 分别为 2.53%、2.43%、1.83%, 日间精密度 RSD 分别为 2.48%、1.37%、1.54%, 表明仪器精密度良好。

2.5.5 稳定性试验 配制 3 种质量浓度的对照品

溶液,于0、4.5、8.5、11.5、22.5 h在“2.5.1”项色谱条件下进样测定,测得RSD分别为2.29%、2.32%、1.61%,表明溶液在22.5 h内稳定性良好。

2.5.6 重复性试验 按最优处方制备凝胶,取5份,每份1 mL,按“2.5.2.2”项下方法制备供试品溶液,在“2.5.1”项色谱条件下进样测定,测得RSD分别为4.26%、3.61%、3.14%,表明该方法重复性良好。

2.5.7 线性关系考察 取甲基正壬酮母液,正己烷稀释成4.49、9.61、24.99、49.98、149.93、449.79 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 对照品溶液,在“2.5.1”项色谱条件下进样测定。以质量浓度为横坐标(X),吸光度为纵坐标(A)进行线性回归,得回归方程为 $A = 76\ 406X - 265\ 178$ ($R^2 = 0.999\ 9$),在4.49 ~ 449.79 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内线性关系良好。

2.5.8 加样回收率试验 精密量取相当于处方量80%、100%、120%的对照品溶液,加入到挥发油含有量已知的凝胶溶液中,在“2.5.1”项色谱条件下进样测定,测得平均加样回收率分别为98.50%、97.46%、97.10%,RSD分别为2.75%、0.83%、2.35%。

2.6 制剂学评价 按优化处方制备40 g冻干粉、3批凝胶(各25 mL,批号分别为20170301、20170302、20170303)。同时,制备1批与处方量相同的未经HPCD包合的挥发油凝胶30 mL,备用。

2.6.1 外观性状 所得凝胶均为澄清透明的液态物质。

2.6.2 相变温度、pH、甲基正壬酮含有量测定 3批凝胶相变温度、pH、甲基正壬酮含有量分别为(36.6 ± 0.58)、(36.6 ± 0.10)、(36.5 ± 0.58) $^{\circ}\text{C}$; 6.9 ± 0.15 、 6.9 ± 0.45 、 7.0 ± 0.38 ; (86.7 ± 0.44)、(86.9 ± 0.36)、(86.9 ± 0.35) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.6.3 溶出率测定 采用无膜溶出法^[8-10]。精密量取HPCD包合物凝胶(批号20170301)、挥发油凝胶各3 mL置于已称重的西林瓶中,放入36.5 $^{\circ}\text{C}$ 气浴恒温振荡器中预热5 min,当凝胶转变为半固体时,加入2 mL已预热的人工肠液,恒温振荡(100 r/min),每隔30 min取出,立即倒掉人工肠液并迅速称定西林瓶质量,再将其放入气浴恒温振荡器中预热5 min,同时补充人工肠液2 mL,重复上述操作,分别称定30、60、90、120、150、180、210 min时西林瓶质量,相邻时间点之间的西

林瓶质量差即为凝胶溶出量,溶出曲线见图3。由图可知,在30~150 min时,HPCD包合物凝胶累积溶出率高于挥发油凝胶;在150~210 min时,两者趋于一致。

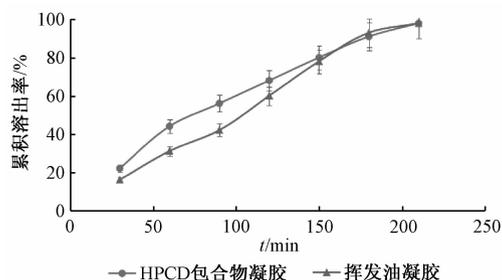


图3 凝胶累积溶出曲线

Fig. 3 Accumulative dissolution curves for gels

2.6.4 释放率测定 采用透析袋法^[11]。精密量取“2.6.3”项下2种凝胶各10 mL置于2个透析袋内,两端扎紧使其不渗漏,放入空离心管中,在气浴恒温振荡器中预热5 min使其成为半固体凝胶。取2支新的50 mL离心管,装入30 mL预热的人工肠液,将透析袋放入离心管中,置于36.5 $^{\circ}\text{C}$ 气浴恒温振荡器中(100 r/min),于0.5、1、2、4、6、8、12、24、36、48 h各取样3 mL,同时补充3 mL预热肠液。将2支离心管中的3 mL介质分别加入5、3 mL正己烷萃取2次,合并正己烷层,定容至10 mL量瓶中,过滤后检测甲基正壬酮含有量,释放曲线见图4。由图可知,HPCD包合物凝胶累积释放率(0~50 h)一直高于挥发油凝胶。

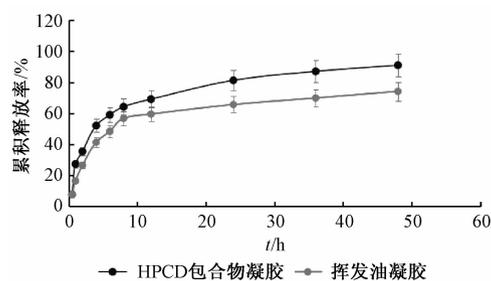


图4 凝胶累积释放曲线

Fig. 4 Accumulative release curves for gels

2.7 凝胶稳定性考察 制备3批凝胶,每批50 mL,批号分别为20170323、20170324、20170325,测得同一批制剂(批号为20170323)中甲基正壬酮含有量分别为86.72、87.34、86.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$,pH均为6.93,外观均为澄清透明液态。

2.7.1 高温试验 取适量凝胶置于密封西林瓶中,避光下放入60、40 $^{\circ}\text{C}$ 药物稳定性检查仪中10 d,在第0、5、10天取样分析。结果,随着时间延长

其外观和 pH 未发生明显改变, 性状由液态转变为半固体凝胶, 但甲基正壬酮含有量明显降低, 60 °C 时分别为 86.72、74.74、58.97 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 40 °C 时分别为 86.72、74.03、67.11 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.7.2 低温试验 取适量凝胶置于密封西林瓶中, 放入 4 °C 药物稳定性检查仪中 10 d, 在第 0、5、10 天取样分析。结果, 随着时间延长其外观、性状、pH 均未发生明显改变, 甲基正壬酮含有量基本稳定, 分别为 86.72、85.79、83.53 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.7.3 强光试验 取适量凝胶置于密封西林瓶中, 放入 (4 500 \pm 500) lx 药物稳定性检查仪中 10 d, 在第 0、5、10 天取样分析。结果, 随着时间延长其外观、性状、pH 均未发生明显改变, 但甲基正壬酮含有量明显降低, 分别为 86.72、76.92、61.80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.7.4 加速试验 取 3 批凝胶置于密封西林瓶中, 放入温度 (30 \pm 2) °C、相对湿度 (75 \pm 1)% 药物稳定性检查仪中 10 d, 在第 0、1、2、3 个月末取样分析。结果, 随着时间延长其外观、性状、pH 均未发生明显改变, 但甲基正壬酮含有量明显降低, 分别为 86.94、72.29、42.23、37.45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.7.5 均一性考察 取批号 20170323、20170324 的凝胶置于 1.5 mL 离心管中, 4 000 r/min 离心 30 min, 观察是否有分层变色现象, 结果见图 5, 可知其在室温下为液体, 而在 36.5 °C 下倾斜时不流动, 转变成半固体凝胶。

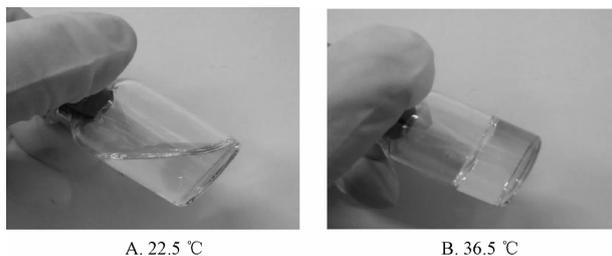


图 5 凝胶均一性考察结果

Fig. 5 Results of homogeneity investigation for gels

3 讨论

星点设计-效应面法与正交试验相比, 具有试验次数少、准确度高的优点, 近年来相关研究较多, 故本实验采用该方法优化鱼腥草挥发油 HPCD 包合物肠用温敏凝胶制备工艺。同时, 在凝胶制备

过程中称量药物、量取蒸馏水、搅拌、温度测定都由同一个人来完成, 以尽可能减少不必要的误差。

本实验发现, 鱼腥草挥发油经包合制成凝胶后, 其主要成分并未发生改变。在测定凝胶溶出率和释放率时, 选择人工肠液作为释放介质, 可更好地模拟人体肠道环境。稳定性试验结果表明, 凝胶对光照和高温特别敏感, 故应在低温下避光保存。

由于鱼腥草注射液曾有不良反应发生的报道^[12], 故急需改变作用方式, 使其挥发油显示应有的药用价值。本实验将其包合后制成凝胶, 可为相关研究开辟新思路, 具有重要的意义。

参考文献:

[1] 张壮丽, 赵宁, 赵志鸿, 等. 鱼腥草挥发油抗淋巴瘤细胞谱效关系[J]. 郑州大学学报(医学版), 2015, 50(3): 378-381.

[2] 朱金凤, 陈建荣. 中药直肠给药研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(3): 768-771.

[3] 赵健铤, 刘衡, 李贵轲, 等. 常见温度敏感型原位凝胶研究及应用进展[J]. 广州化工, 2013, 41(24): 9-11.

[4] 张壮丽, 赵宁, 赵志鸿, 等. 鱼腥草挥发油提取工艺优化[J]. 中国医药科学, 2015, 5(1): 82-85.

[5] 张壮丽, 王亚飞, 荣晓哲, 等. 鱼腥草挥发油羟丙基- β 环糊精包合物的制备[J]. 中成药, 2017, 39(5): 926-933.

[6] 彭艺飞, 黄华, 王慧, 等. 星点设计-效应面法优化制备酒石酸溴莫尼定眼用温度敏感型原位凝胶[J]. 中国药房, 2014, 25(45): 4279-4281.

[7] 张壮丽, 赵宁, 王亚飞, 等. 鱼腥草挥发油纳米结构脂质载体的制备与评价[J]. 中成药, 2016, 38(3): 546-555.

[8] 袁洁, 王慧娟, 郭东贵, 等. 盐酸倍他洛尔离子/温度敏感型眼用原位凝胶的制备与评价[J]. 中国医院药学杂志, 2013, 33(14): 1137-1141.

[9] 肖金宝, 李洪斌, 刘福强, 等. 银杏叶提取物温度敏感型鼻用原位凝胶体外释放研究[J]. 中成药, 2013, 35(1): 46-49.

[10] 娄杰, 徐才兵, 田睿, 等. 眼用和厚朴酚包合物温敏原位凝胶的制备及性质研究[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(21): 2340-2343.

[11] 张红, 贾小莉, 匡长春, 等. 柚皮苷固体脂质纳米粒包封率及体外释放度测定[J]. 中国药师, 2010, 13(3): 318-320.

[12] 谭志高, 巢志茂, 隋宇, 等. Tween-80 对鱼腥草注射液及鱼腥草挥发油的影响[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(2): 175-179.