

文章编号: (2003) 01-0021-07

天然蜂毒多肽口服结肠定位释药系统设计及其评价

陈大为¹, 刘 星¹, 邹艳霜¹, 张荣庆², 张汝华¹

(1. 沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016; 2. 清华大学生物系, 北京 100084)

摘要: **目的** 制备天然蜂毒多肽口服结肠定位释药系统并对其进行体内评价。**方法** 将天然蜂毒包封于脂质体内并均匀混悬于高浓度的海藻酸钠溶液中, 然后将其滴入含有凝固剂的氯化钙溶液中交联固化并干燥, 制成海藻酸钙凝胶小球。将凝胶小球中蜂毒多肽 0~8 h 内的释放量按 Weibull 分布进行拟合, 以包胶丸率及速度常数、相关系数为判定指标, 经正交设计 $L_9(3^3)$ 试验, 筛选出最佳处方。通过流化床包衣技术, 采用肠溶性材料 Eudragit S 100 水分散体包衣, 制备天然蜂毒多肽口服结肠定位释药系统。通过测定大鼠单剂量静脉注射及口服给药后的血药浓度, 对蜂毒多肽海藻酸钙凝胶小球包衣微丸体内过程进行科学评价。**结果** 凝胶小球中蜂毒多肽的释药动力学符合 Weibull 分布模型, 相关系数为 0.952 9。其在体内的绝对生物利用度为 79.88%, 而口服蜂毒冻干粉在体内的绝对生物利用度仅为 5.23%。**结论** 该结肠定位释药系统为多肽类药物的口服给药奠定了基础。

关键词: 药剂学; 蜂毒多肽; 脂质体; 海藻酸钙凝胶; 结肠定位释药; 体内外评价

中图分类号: R94

文献标识码: A

多肽和蛋白质类药物口服后在胃肠道易于发生酶解或酸解。同时, 此类药物又较难透过生物膜而吸收。结肠部位pH近中性, 条件温和、代谢酶少, 可减少这类药物的分解。作者采用磷脂与药物制成脂质体, 研制了蜂毒多肽口服结肠定位释药海藻酸钙凝胶包衣小球, 目的在于提高蜂毒多肽口服给药的生物利用度。

凝胶小球是一类用可胶凝的高分子材料制成的小球状口服制剂, 其直径可从纳米到毫米不等。直径在1 mm左右的小球属微丸制剂, 是一种剂量分散型剂型, 具有服用后可广泛、均匀地分布在胃肠道内, 使药物生物利用度提高并减少刺激性药物对胃肠道的刺激, 同时在胃肠道的转运过程不受食物输送节律及胃排空速度的影响, 药物吸收速度均匀而规则等优点。胶凝的高分子材料溶胀后具有一定的生物粘附性, 可粘附在肠道粘膜上, 服药后可定位释放, 同时能维持较长的作用时间。但海藻酸钙凝胶小球空间结构的多孔性易使水溶性药物泄漏, 包裹率较低。

作者尝试将天然蜂毒多肽包封于脂质体中, 采用滴制法制成海藻酸钙凝胶小球, 并以肠溶材料(pH>7.4条件下溶解)进行包衣, 以期达到结肠定位释药的设计目的。该方法制备条件温和, 药

收稿日期: 2002-11-20

作者简介: 陈大为 (1959-), 男 (汉族), 辽宁海城人, 教授, 博士生导师, 主要从事固体药物新剂型和多肽类药物口服给药的研究, Tel: (024)23843711-3687, E-mail: cdw2002yd@sina.com。

物包裹率高,而且双层包裹使药物受到双重保护,更有效地提高了药物在肠道的稳定性和吸收。

1 材料与仪器

1.1 材料

蜂毒原料(江苏连云港市蜂疗医院,本实验室精制);磷脂(北京清华紫光集团惠赠);海藻酸钠(北京市旭东化工厂);Eudragit S100(德国 Röh m 公司);氯化钙(分析纯,北京益利精细化学品有限公司);胆固醇(北京化学试剂公司);高活力辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG-HP、邻苯二胺、pH 7.4 磷酸盐缓冲液(美国 Sigma 公司);柠檬酸、硫酸(华美生物试剂公司);氯仿(分析纯,沈阳市试剂三厂);福林-酚试剂(沈阳药科大学生化教研室);透析袋(Pore size 10 Å, Nom. MWCO 3500, 美国 Fisher Scientific 公司)。

1.2 仪器

RE-52A 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);SHB 循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司);JY92-II 细胞超声波粉碎机(宁波新芝仪器公司);Amray-1000B 扫描电子显微镜(中国科学院科学仪器研究所);ALPHA 1-2 冷冻干燥机(德国 CHIST 公司);Model 550 ELISA 酶标仪(美国 BIORAD 公司);96 孔聚苯乙烯微孔酶标板(美国 Costar 公司);MH-1 型微量振荡器(江苏海门麒麟医药仪器厂);WGP-300 型隔水式电热恒温培养箱(上海安亭科学仪器厂);Cool Snap fx 数码相机(日本 Nikon 公司);ZDR-6B 药物溶出测定仪(上海黄海药检仪器厂)。

1.3 动物

SD 大鼠,雌性,190~210 g,由北京市实验动物中心提供,合格证号:医动字第 02-2057(北京医科大学动物部)。

2 方法与结果

2.1 口服结肠定位给药系统的制备

2.1.1 蜂毒脂质体的制备^[1]

用薄膜超声法制备磷脂(PC)单室脂质体。将磷脂和胆固醇(8:2)溶解于氯仿中,用旋转薄膜蒸发器除去氯仿,瓶壁形成均匀干膜,然后加入 10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl / 2 mmol·L⁻¹ EDTA 缓冲液(pH 7.4)快速混合器涡旋振荡,用超声波发生器超声 15 min 即得。用 pH 7.4 Tris (10 mmol·L⁻¹) / EDTA (5 mmol·L⁻¹) / NaCl (100 mmol·L⁻¹) 缓冲液配制 0.1 g·L⁻¹ 蜂毒溶液,按一定比例加入脂质体中,形成乳状蜂毒-磷脂复合物溶液,加入适量保护剂,4℃ 下放置过夜,备用。

2.1.2 包裹脂质体的海藻酸钙凝胶小球的制备^[2]

精密称取海藻酸钠适量,加入蒸馏水,放置 24 h 后使之完全溶解并稀释至一定浓度。将上述含药脂质体溶液与海藻酸钠溶液均匀混合后,用注射器(5号针头)将混合液缓慢挤出滴入一定量的 CaCl₂ (100 mmol·L⁻¹ NaCl/5% 固凝剂) 溶液中,交联一定时间后,形成的海藻酸钙凝胶小球固化,将小球抽滤,用蒸馏水洗 3 遍,冷冻干燥。

2.1.3 正交试验筛选制剂最优处方组成

在单因素试验考察的基础上，试验固定 $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 脂质体保护剂以及 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 固凝剂用量，对海藻酸钠、氯化钙、蜂毒脂质体浓度及用量按正交设计 $L_9(3^3)$ 表作3因素3水平试验筛选。按照“2.1.2”条方法制备凝胶小球，以凝胶小球中药物的包裹率和0~8 h释药曲线的Weibull分布相关系数为试验判定指标^[3]，考察和筛选海藻酸钙凝胶小球基本处方。

结果不同试验处方的药物包裹率和释药曲线的Weibull分布相关系数均有显著差异，选择药物包裹率及相关系数大的处方作为基本组成，其中有5号和9号处方，但高浓度的海藻酸钠溶液浓度很大（9号处方），滴制时比较困难，所以最终选择5号处方（包裹率为93.1%，相关系数为0.976 2）。处方5和9的基本组成见表1。

Table 1 Optimum formulation of calcium alginate gel beads

Component	Amount/g	Function
Na-alginate	2.5	Matrix material
Honey bee venom	0.04	Drug
PC	0.95	Liposome carrier
Chol	0.26	Liposome carrier
A	0.25	Protection agent
Calcium chloride	11.1	Gelling cation
NaCl	2.9	Homogeneous agent
M	25	Hardening agent

2.1.4 包衣海藻酸钙凝胶小球的制备^[4]

按正交试验筛选的最优的基本处方制备海藻酸钙凝胶小球样品10 g，加入流化室中进行流化床包衣，控制喷气压力为0.2 MPa，恒流泵转速为 $20 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ，出口温度 $(29 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$ ，用Eudragit S100水分散体进行包衣，使凝胶小球增重20%。

2.2 包衣海藻酸钙凝胶小球释放度的体外评价

取3批包衣海藻酸钙凝胶小球，置透析袋中，用透析袋夹夹紧两端，置释放杯中，水浴温度恒定在 $(37 \pm 0.5) \text{ }^\circ\text{C}$ ；恒定浆转速 $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ，在模拟人体胃肠道 pH 变化条件下，用福林-酚法分别对脂质体及蜂毒多肽不同时间的释放度进行测定^[5]，释放介质最初为 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液（pH1.2）100 mL，转速为 $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ，2 h 后用 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 调节溶出介质的pH值为6.8，4 h 时调节pH为7.4。

结果包衣凝胶小球在 pH 1.2 盐酸溶液中药物的释放度均为0，当pH大于6.8时，蜂毒脂质体开始缓慢释放，并且具有良好的释放重现性。结果见图1。

2.3 包衣前后凝胶小球形态观察

按“2.1.4”条方法，在制备凝胶小球过程中观察小球的形态。按基本处方的用量滴制凝胶小球，凝胶小球交联完毕后，用水洗3遍，未经干燥、干燥后的凝胶小球用数码相机照相。结果见图2。

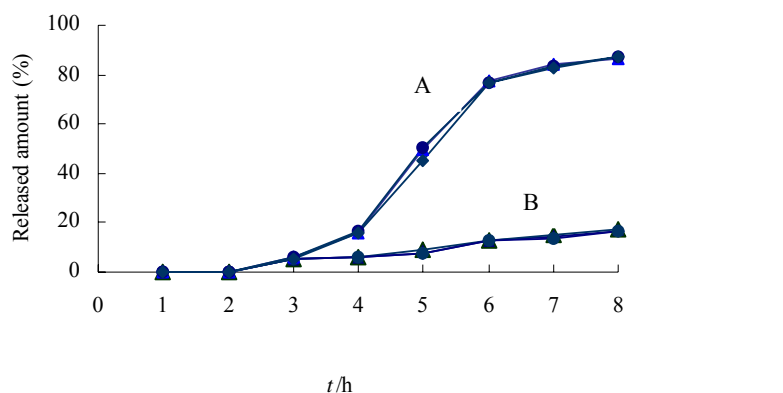
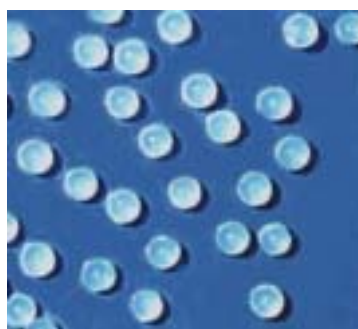


Fig. 1 The release profiles of (A) bee venom and (B) liposome from three batches of calcium alginate gel beads coated with Eudragit S 100 in the simulated gastrointestinal pH conditions ($n=3$, error bars are smaller than symbols)

干燥后及包衣后的凝胶小球用扫描电镜观察凝胶小球的表面形态，见图3。从照片中很清楚地看到滴制的未干燥的凝胶小球圆而透亮，大小均匀；干燥后的小球体积减小 1/3，表面发生皱缩，形态仍然是圆型。

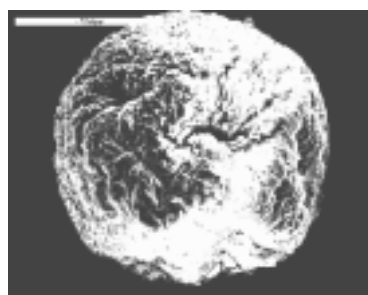


Gel beads before dried

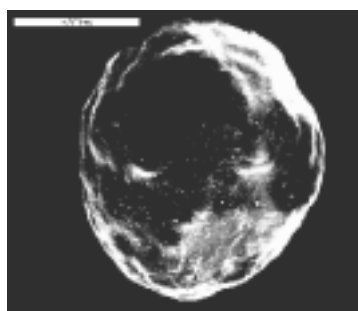


Dried gel beads

Fig. 2 Morphology of gel beads observed by Nikon digital camera (magnification, $\times 10$)



Dried gel bead (magnification, $\times 500$)



Coated gel bead (magnification, $\times 500$)

Fig. 3 Morphology of gel beads observed by ECI

2.4 蜂毒多肽口服结肠定位释药系统的体内评价

本试验采用酶联免疫吸附分析法 (ELISA) 测定蜂毒多肽在大鼠体内的血药浓度^[6], 方法的最低检测限为 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 在 $0.000 1 \sim 10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 质量浓度内对数线性关系良好, 标准曲线方程为 $\ln C = 7.501 1 \ln(\text{OD}/3) + 2.0121$, 相关系数为 $0.998 1$, 平均回收率为 100.7% , 相对标准差为 1.51% 。

健康雌性 SD 大鼠 40 只, 试验前适应性喂养 3 d。给药前禁食 12 h, 自由饮水。随机分为 4 组, 每组 10 只。A 组每只大鼠尾静脉注射蜂毒注射液 ($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、B 组每只大鼠口服蜂毒原料 ($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 给药后分别于 0、10、20、40、60、90、120、180、240、360 min, 眼眶取血 0.5 mL; C 组每只大鼠口服蜂毒结肠定位释药制剂 (相当于蜂毒 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), D 组每只大鼠口服蜂毒结肠定位释药制剂 (相当于蜂毒 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 分别于给药后 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、8.0、12.0、24.0 h, 从大鼠眼眶取血 0.5 mL。血样置 1.0 mL Ependoff 管中室温放置 1 h 后, $4 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 分离出血清。用“ELISA 法”测定, 求得大鼠体内各时间点蜂毒的血药浓度, 以给药时间为横坐标, 血中蜂毒的对数浓度为纵坐标绘制药-时曲线 (见图 4)。用梯形法求得药-时曲线下面积, 通过计算得口服结肠定位释药系统和蜂毒冻干粉 ($1.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 的绝对生物利用度分别为 79.88% 和 5.23% 。

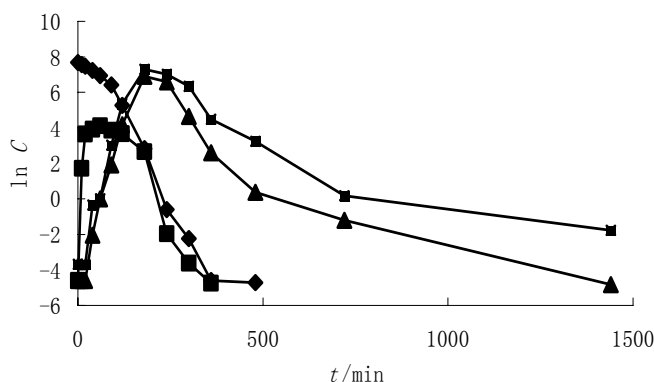


Fig. 4 Mean bee-venom plasma concentration-time profiles

◆- iv ($1.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$); ■- po raw powder ($1.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$);
▲- po gel beads ($1.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$); ●- po gel beads ($5.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)

3 讨论

a. 海藻酸是一种天然高分子多糖聚合物^[7, 8], 它的一个特征就是能与二价或多价阳离子发生胶凝^[9]。海藻酸带有高密度的负电荷, 易与带有大量正电荷的多肽相互聚集而发生沉淀。本试验利用磷脂为载体将蜂毒多肽制成脂质体, 不仅改变了表面电荷, 同时具备了脂质体的优点。脂质体乳状液能与海藻酸钠溶液均匀混合, 从而使药物能均匀分布。

b. 多肽类、蛋白质等大分子药物口服后在胃肠道上端易于发生酸解或酶解, 而结肠部位由于 pH 条件温和, 代谢酶少, 可提高这类药物的稳定性, 同时使多肽药物在体内滞留时间延长而

提高吸收效率。本试验通过 pH 控制结肠释放薄膜包衣, 利用海藻酸钠的生物可粘附性, 研制了包裹天然多肽蜂毒脂质体海藻酸钙凝胶的口服结肠定位系统, 以保护多肽药物免受胃酸及胃肠道酶的破坏, 在结肠部位多肽药物以脂质体形式释放并吸收, 提高多肽药物口服生物利用度。为多肽类药物口服剂型的研究提供了科学的依据。

c. 经过对处方中各组成单因素考察试验, 以表面形态、粒子大小、包胶囊率及释放度为指标, 初步确定了影响凝胶小球的因素及其用量范围。在此基础上进行了处方组成优化的正交设计试验。以包胶囊率和不同时间释放度符合Weibull分布相关系数为判定指标, 对正交设计试验各处方进行测定, 以包胶囊率、相关系数越大越好。根据正交设计试验结果的方差分析, 不同处方组成的凝胶小球包胶囊率和相关系数有显著差异, 最终优化出最佳处方组成。通过对流化床包衣工艺的优化, 采用肠溶性材料Eudragit S 100水分散体包衣, 制备了天然蜂毒多肽口服结肠定位释药系统, 并对该系统进行模拟生理pH条件下体外验证试验, 结果在pH 1.2的人工胃液中2 h内均没有蜂毒多肽及其脂质体释放; 在pH>6.8时药物开始缓慢释放; 在pH>7.4后药物释放加快, 药物释放呈S型, 而在这个试验过程中, 从脂质体中游离的药物很少, 说明蜂毒多肽的释放以稳定的脂质体形式释放。对口服制剂中蜂毒释药数据进行数学拟合, 结果蜂毒体外释药动力学特征符合Weibull分布模型, 相关系数为0.952 9, 较好的达到了预期在结肠释药的设计。包裹脂质体的包衣凝胶小球的研制未见国内外研究报道。

d. 多肽类药物由于与体内内源性物质结构相似, 致使体内血药浓度的检测十分困难。本试验采用ELISA方法测定了蜂毒注射液单剂量静脉注射、蜂毒原料及蜂毒海藻酸钙凝胶小球包衣微丸单剂量口服给药后大鼠的血药浓度, 实验结果表明, 蜂毒血药浓度的分析方法能够灵敏的检测出体内的原形药物, 可以用于制剂质量的体内评价, 达到预期的实验目的。未见有关蜂毒制剂体内药物动力学研究报道。

参考文献:

- [1] 陆彬. 药物新剂型与新技术[M]. 北京:人民卫生出版社, 1998.
- [2] Velings NM, Messtagh MM. Physico-chemical properties of alginate gel beads[J]. *Polymer Gels Networks*, 1995, 3: 311-330.
- [3] 奚念朱. 药剂学[M] 第3版. 北京:人民卫生出版社, 1996.
- [4] 宋洪涛, 张汝华, 郭涛, 等. 复方中药麝香保心pH依赖型梯度释药微丸的研究[J]. 沈阳药科大学博士学位论文. 2000, 105-124.
- [5] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术[M]. 第2版. 北京: 高等教育出版社, 1982.
- [6] 巴德年. 基础免疫学实验方法与技术[M]. 北京: 北京医科大学/中国协和医科大学联合出版社, 1998.
- [7] Haug A, Larsen B. Quantitative determination of the uronic acid composition of alginates[J]. *Acta Chem Scand*, 1962, 16: 1908-1918.
- [8] Haug A, Larsen B, Smidsrd O. Studies on the sequence of uronic acid residue in alginic acid[J]. *Acta Chem Scand*,

1967, 21: 691-704.

[9] Thom D, Grant G T, Morris E R, *et al.* Characterization of cation binding and gelation of polyuronates by circular dichroism[J]. *Carbohydr Res*, 1982, 100: 29-42.

Design and evaluation of bee venom oral colon delivery system

CHEN Da-wei¹, LIU Xing¹, ZOU Yan-shuang¹, ZHANG Rong-qing², ZHANG Ru-hua¹

(1. *School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China*; 2. *Department of Biology, Tsinghua University, Beijing 100084, China*)

Abstract: **Objective** To prepare oral colon delivery system of bee venom and evaluate pharmacokinetics by ELISA. **Methods** Alginate gel beads (approximately 1 mm in diameter) were prepared by dripping concentrated sodium alginate solution containing bee venom liposome into concentrated calcium chloride solution including a hardening agent and followed by frozen drying. The release rates of total venom peptides from the gel beads were determined over an 8 h time period and the release model was simulated according to the Weibull's distribution equation. The formulation was optimized on the basis of orthogonal design by the criterion of the encapsulation efficiency, the release rate constants and the linear correlation coefficients. Gel beads coated with Eudragit S 100 were dried over fluidized bed under optimal conditions and formulated into an oral colon delivery system (OCDS). The pharmacokinetics of OCDS are determined in rats by determining the plasma concentration of bee venom by ELISA. **Results** The dissolution data of the bee venom from OCDS were nicely fitted to Weibull equation with a correlation coefficient of 0.952 9. Absolute bioavailability of bee venom after oral administration of a single dose of OCDS and bee venom powder are 79.88% and 5.23%, respectively. **Conclusions** The colon delivery system will pave the basis for the oral absorption of polypeptides drugs.

Key words: Pharmaceutics; bee venom polypeptide; liposome; calcium alginate gel beads; colon delivery system; evaluation *in vitro* and *in vivo*