

ization[J]. *Int J Pharm*, 2012, 438(1-2): 287-295.

[10] 沈 刚, 李娟娟, 程 玲, 等. 制备波棱瓜子总木脂素纳
米混悬剂[J]. 中成药, 2015, 37(10): 2153-2158.

[11] 罗开沛, 李小芳, 杨 露, 等. 水飞蓟素纳米混悬剂的制
备及体外溶出[J]. 中国医药工业杂志, 2016, 47(9):
1165-1170.

[12] Zhang H X, Wang J X, Zhang Z B, *et al*. Micronization of
atorvastatin calcium by antisolvent precipitation process[J]. *Int
J Pharm*, 2009, 374(1-2): 106-113.

[13] 梁旭霞, 刘 莉, 张文新, 等. 甘草黄酮-β-CD 包合物的制
备及增溶作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16
(7): 1-3.

[14] 陈丽华, 徐德生, 冯 怡, 等. 甘草总黄酮微丸溶出度的考
察[J]. 中国医院药学杂志, 2008, 28(20): 1758-1761.

[15] Hao J F, Gao Y, Zhao J, *et al*. Preparation and optimization
of resveratrol nanosuspensions by antisolvent precipitation using
Box-Behnken design [J]. *AAPS PharmSci Tech*, 2015, 16
(1): 118-128.

[16] 马妍妮, 王 涛, 张文萍, 等. 甘草黄酮纳米结晶的制备
与评价[J]. 中国医院药学杂志, 2016, 36(10): 795-798.

[17] Zhao Y X, Hua H Y, Chang M, *et al*. Preparation and cyto-
toxic activity of hydroxycamptothecin nanosuspensions[J]. *Int J
Pharm*, 2010, 392(1-2): 64-71.

[18] 袁慧玲, 易加明, 张彩云, 等. 纳米混悬剂的制备方法
及给药途径研究进展[J]. 中国新药杂志, 2014, 23(3):
297-301.

[19] 岳鹏飞, 万 晶, 胡鹏翼, 等. 中药固体化纳米混悬给药系
统的研究进展与思考[J]. 中草药, 2012, 43(4): 625-629.

[20] 罗开沛, 李小芳, 罗 佳, 等. 纳米混悬技术在中药制剂
中的应用及发展趋势[J]. 中草药, 2016, 47(6): 865-871.

[21] Zuo B Y, Sun Y H, Li H, *et al*. Preparation and *in vitro/in vi-
vo* evaluation of fenofibrate nanocrystals [J]. *Int J Pharm*,
2013, 455(1-2): 267-275.

甘草酸二铵二元脂质体温敏凝胶的制备及其体外释药行为

薛 晶, 高 苑, 王新蕾, 刘 芳, 郝保华*
(西北大学生命科学学院, 陕西 西安 710069)

摘要: **目的** 制备甘草酸二铵二元脂质体温敏凝胶, 并评价其体外释药行为。**方法** 冷溶法制备凝胶。以胶凝温度为评价指标, 泊洛沙姆 407 (P407)、泊洛沙姆 188 (P188)、白芨多糖用量为影响因素, 星点设计-效应面法优化处方。再采用 HPLC 和 Franz 立式扩散池法评价其体外释药行为。**结果** 最优处方为 P407 用量 18%, P188 用量 4%, 多糖用量 0.6%, 胶凝温度 (37.5 ± 0.3)℃。所得二元脂质体温敏凝胶在 48 h 内的累积释放率为 (65.52 ± 0.63)%, 与脂质体及温敏凝胶相比缓释作用更明显。**结论** 甘草酸二铵二元脂质体温敏凝胶可减缓药物在直肠内的释放速率, 并增加其滞留时间。

关键词: 甘草酸二铵; 二元脂质体; 温敏凝胶; 体外释药行为; 冷溶法; 星点设计-效应面法; HPLC; Franz 立式扩散池法

中图分类号: R944 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2017)11-2284-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.11.012

Preparation of thermo-sensitive diammonium glycyrrhizinate binary liposome gel and the *in vitro* drug-release behaviors

XUE Jing, GAO Yuan, WANG Xin-lei, LIU Fang, HAO Bao-hua*
(College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China)

ABSTRACT: **AIM** To prepare thermo-sensitive diammonium glycyrrhizinate binary liposome gel and to evaluate the *in vitro* drug-release behaviors. **METHODS** Cold dissolution method was adopted in the preparation of gel.

收稿日期: 2016-12-21
作者简介: 薛 晶 (1991—), 女, 硕士研究生, 从事中药新型给药系统及新制剂研究。Tel: 15339159360, E-mail: xj136055396@163.com
* 通信作者: 郝保华 (1956—), 男, 教授, 从事中药新型给药系统及新制剂研究。E-mail: haobaohua@126.com

2284

With gel transition temperature as an evaluation index, amounts of Poloxamer 407 (P407), Poloxamer 188 (P188) and polysaccharides from *Bletillae Rhizoma* as influencing factors, central composite design-response surface method was applied to optimizing the formulation. Then the *in vitro* drug-release behaviors were evaluated by HPLC and Franz vertical diffusion cell method. **RESULTS** The optimal formulation was determined to be 18% for P407 amount, 4% for P188 amount, and 0.6% for polysaccharides' amount, the gel transition temperature was $(37.5 \pm 0.3)^\circ\text{C}$. The accumulative release rate of obtained thermo-sensitive binary liposome gel was $(65.52 \pm 0.63)\%$ within 48 h, which showed more obvious sustained-release effect as compared with liposome and thermo-sensitive gel. **CONCLUSION** Thermo-sensitive diammonium glycyrrhizinate binary liposome gel can reduce drug-release rate and increase its retention time in the rectum.

KEY WORDS: diammonium glycyrrhizinate; binary liposome; thermo-sensitive gel; *in vitro* drug-release behaviors; cold dissolution method; central composite design-response surface method; HPLC; Franz vertical diffusion cell method

溃疡性结肠炎是一种炎症性肠病^[1-2], 主要为直、结肠黏膜层的炎症疾病, 临床症状为腹泻、腹痛和黏液脓血便, 与结肠癌的发病有关, 严重威胁到患者的生命健康。目前, 国内外关于直肠给药的常见剂型^[3]主要有栓剂、灌肠液、泡沫剂、凝胶剂等, 但由于人体体位及直肠内部环境的影响, 常规剂型直肠给药时存在药物滞留时间短、保留吸收困难、生物利用度低、有异物感、顺应性差等不足。

温敏型凝胶^[4]作为新型生物黏膜给药载体, 用于直肠给药时具有起效快、不良反应小、生物利用度高、缓控释性能和组织相容性良好等多种优势。脂质体^[5]是由磷脂及胆固醇构成、具双分子层结构的小囊泡, 具有无毒、缓释、低刺激等特点。甘草酸二铵是甘草主要活性成分, 具有非特异性抗炎、抗过敏及免疫调节作用^[6], 能明显改善溃疡性结肠炎大鼠的炎症^[7]。本实验将甘草酸二铵作为模型药物, 以脂质体为载体进行包裹, 再与温敏凝胶结合, 制备成新型二元脂质体温敏凝胶复合制剂, 用于直肠黏膜给药以治疗溃疡性结肠炎。该复合制剂能有效结合 2 种剂型的优点, 既克服了液体制剂局部给药流动性大、直肠滞留时间短的不足, 同时可改善患者顺应性, 增强药物缓释作用, 提高生物利用度。

白芨多糖^[8-10]具有抗溃疡、止血、消肿生肌作用, 同时作为一种成熟的天然增稠剂, 有着优良的生物黏附性、局部滞留性、自身降解性, 加入温敏凝胶中时, 既可与甘草酸二铵起到协同作用, 又可加强对肠黏膜的黏附作用, 延长药物滞留时间, 达到“一物两用”的目的。因此, 本实验将甘草酸二铵制备成二元脂质体温敏凝胶, 并考察其体外释

药行为, 以期为该新型制剂的研发提供实验依据。

1 仪器与材料

LC-20AT 高效液相色谱仪 (日本岛津公司); YP-5001 电子精密天平 (上海良平仪器仪表有限公司); MD34 透析袋 (截留相对分子质量 14 000, 美国联合碳化合物公司); Zen3600 激光粒度分布仪 (英国 Malvern 公司); RE-52AA 旋转蒸发仪 (上海亚荣生化仪器厂); HH-S 恒温水浴锅 (江苏省金坛市恒丰仪器厂); NDJ-7 旋转黏度计; JEM-400 透射电镜仪 (日本电子株式会社)。

甘草酸二铵原料药 (含有量 > 98%, 陕西富捷科技有限公司, 批号 20160311); 甘草酸二铵对照品 (含有量 > 98%, 深圳振强生物技术有限公司, 批号 150418); 泊洛沙姆 407、泊洛沙姆 188 (德国 BASF 公司)。白芨多糖 (自制); 大豆卵磷脂 (天津市博迪化工有限公司); 胆固醇、甲醇、乙腈均为色谱纯。

2 方法与结果

2.1 脂质体制备

2.1.1 制备方法 采用逆向蒸发法^[11]。称取胆固醇 50 mg、大豆卵磷脂 200 mg 于茄形瓶中, 加无水乙醇振摇溶解, 另将甘草酸二铵溶于磷酸盐溶液 (pH 7.4) 中 (3 mg/mL), 与上述乙醇溶液混合, 超声乳化, 形成稳定的 W/O 乳剂, 于 35 °C、-0.05 MPa 条件下蒸发挥去乙醇, 待呈胶态时注入一定量 PBS 缓冲液, 水合 30 min, 过膜, 即得。

2.1.2 形态、粒径及 Zeta 电位分布 吸取少量脂质体稀释液滴于载玻片上, 磷钨酸负染后滴于铜网上, 挥干, 透射电子显微镜观察, 发现其外观结构呈球形或类球形 (图 1)。另取稀释液样品测定其粒径, 测得平均值为 231.9 nm, PDI 为 0.237,

Zeta电位为-48.2 mV。

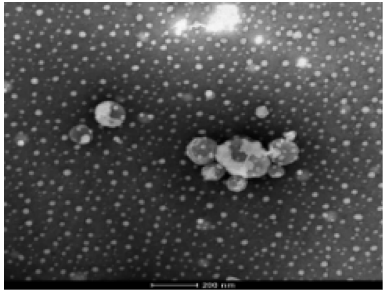


图 1 脂质体电镜图

Fig. 1 Electron microscope image for liposome

2.1.3 包封率 吸取脂质体 2 mL，置于 10 mL 量瓶中，甲醇破乳，静置，上清液过膜，记录峰面积，条件为 C₁₈-W 色谱柱（150 mm × 4.6 mm，5 μm）；流动相乙腈-磷酸盐缓冲液（38：62）；体积流量 0.5 mL/min；检测波长 252 nm；柱温 30 ℃；进样量 20 μL，计算甘草酸二铵含量（C_总）。另取适量新制脂质体于离心管中，8 000 r/min 离心 25 min，上清液过膜后进样，记录峰面积，测定游离甘草酸二铵含量（C_游），计算包封率，公式为包封率 = [(C_总 - C_游) / C_总] × 100%，测得平均值（n = 3）为（63.25 ± 1.05）%。

2.2 空白温敏凝胶制备

2.2.1 胶凝温度测定 采用倒转法^[12]。测定时往同体积西林瓶中加入同体积凝胶溶液，置于水面高于凝胶液面的恒温水浴锅中连续升温，升温速率 0.2 ℃/min，随着温度升高黏度增大，直至倒置后溶液凝结，该温度即为胶凝温度。

2.2.2 Box-Behnken 响应面法优化 根据预试验结果，以 P407 用量（A）、P188 用量（B）、白芨多糖用量（C）为影响因素，胶凝温度（Y）为评价指标进行处方优选，因素水平见表 1，试验设计和结果见表 2。

表 1 因素水平			
Tab. 1 Factors and levels			
水平	因素		
	A P407/%	B P188/%	C 白芨多糖/%
-1	17	2	0.2
0	18	4	0.4
1	19	6	0.6

以 Design-Expert 8.0.6 软件对表 1 数据进行多元回归拟合分析，得方程为 $Y = 37.52 - 3.86A + 1.27B + 0.100C + 0.18AB + AC + 0.025BC - 0.99A^2 - 0.86B^2 - 0.94C^2$ ($R^2 = 0.998\ 1$, $P < 0.000\ 1$)，方差分析见表 3。由表可知，该模型 $P < 0.000\ 1$ ，表

表 2 试验设计与结果				
Tab. 2 Design and results of tests				
试验号	A P407/%	B P188/%	C 白芨多糖/%	Y 胶凝温度/℃
1	19	6	0.6	33.5
2	17	4	0.4	39.2
3	18	4	0.6	37.5
4	18	2	0.4	34.5
5	19	4	0.8	32.4
6	18	4	0.6	37.7
7	18	6	0.4	37.6
8	18	2	0.8	34.7
9	19	2	0.6	30.5
10	18	4	0.6	37.6
11	18	4	0.6	37.5
12	19	4	0.4	32.2
13	18	6	0.8	37.8
14	17	6	0.6	40.5
15	17	4	0.8	39.4
16	18	4	0.6	37.3
17	17	2	0.6	38.2

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	129.73	9	14.41	402.8	<0.000 1
A	34.32	1	34.32	959.05	<0.000 1
B	5.51	1	5.51	153.98	<0.000 1
C	1.68	1	1.68	47.02	0.000 2
AB	0.12	1	0.12	3.42	0.106 7
AC	0	1	0	0	1
BC	0.025	1	0.025	0.13	0.725
A ²	5.07	1	5.07	141.72	<0.000 1
B ²	2.35	1	2.35	65.74	<0.000 1
C ²	1.63	1	1.63	45.59	0.000 3
残差	0.25	7	0.036	—	—
失拟项	0.16	3	0.054	2.46	0.202 2
纯误差	0.088	4	0.022	—	—
总差	129.98	16	—	—	—

明有显著性；相关系数 $R^2 = 0.998\ 1$ ，表明该模型预测值与测定值的相关性良好，可用于描述实验结果；失拟项 $P = 0.202\ 2 > 0.05$ ，不具有显著性，表明方程拟合度良好。

采用 Design-Expert V. 8.0.6 软件绘制效应面图（图 2），得到最佳提取工艺条件为 P407 用量 18%，P188 用量 4%，白芨多糖用量 0.6%，胶凝温度（37.5 ± 0.5）℃。

2.2.3 验证试验 按最佳处方制备 3 批空白温敏凝胶，测得平均胶凝温度为（37.5 ± 0.3）℃，表明该模型预测性良好，优化处方可靠。

2.3 二元脂质体温敏凝胶制备

2.3.1 制备方法^[13] 按处方量取 18% P407、4% P188、0.6% 白芨多糖，缓慢加入一定量脂质体溶

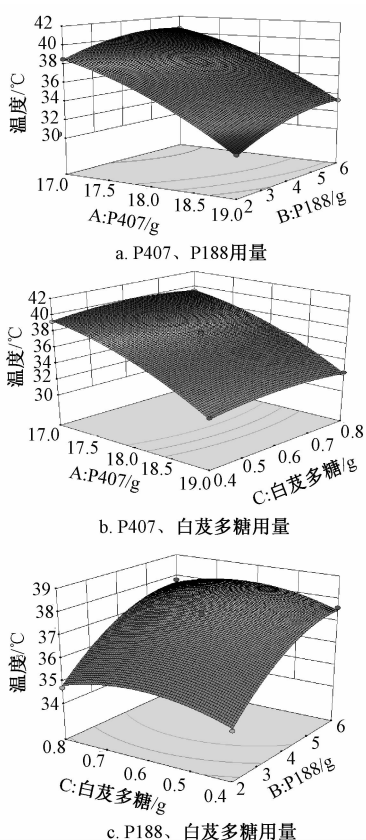


图2 各因素响应面图

Fig. 2 Response surface plots for various factors

液中,混匀后冷藏于冰箱中,低温(4℃)放置,溶胀24 h,即得。同法不加白芨多糖,制得普通脂质体温敏凝胶。

2.3.2 脂质体对胶凝温度的影响 通过逆向蒸发法制备3批脂质体,按处方量称取P407、P188及白芨多糖,均匀分散于脂质体中,4℃下低温溶胀24 h。测得未加脂质体时温敏凝胶的平均胶凝温度为 $(38.1 \pm 0.2)^\circ\text{C}$,加入后为 $(37.5 \pm 0.5)^\circ\text{C}$,RSD 1.12%。表明加入脂质体后对温敏凝胶胶凝温度的影响不大。

2.3.3 白芨多糖对胶凝温度及黏度的影响 取二元、普通脂质体温敏凝胶适量,加入测试器中测定黏度,测得前者温度和黏度分别为 $(37.3 \pm 0.2)^\circ\text{C}$ 、 $(5.04 \pm 0.3) \text{ Pa} \cdot \text{s}$,后者分别为 $(37.7 \pm 0.3)^\circ\text{C}$ 、 $(2.40 \pm 0.5) \text{ Pa} \cdot \text{s}$ 。由此可知,加入白芨多糖时胶凝温度略有降低,但影响不大,但黏度明显增加。

2.4 甘草酸二铵含量测定

2.4.1 色谱条件 同“2.1.3”项。

2.4.2 专属性试验 精密量取二元脂质体温敏凝胶1.0 mL,注入20 mL量瓶中,甲醇超声溶解,

定容至刻度,即得供试品溶液,同法制备空白对照溶液。精密量取对照品、供试品、空白对照溶液各20 μL进样测定,发现在该条件下甘草酸二铵基线分离良好,峰形稳定,辅料无干扰。

2.4.3 线性关系考察 取甘草酸二铵对照品,流动相溶解并定容至刻度,制得2 000 μg/mL贮备液,精密吸取0.1、0.25、0.5、1.5、2.5、5.0 mL,置于10 mL量瓶中,定容,取20 μL注入色谱仪测定。以峰面积为纵坐标(Y),甘草酸二铵质量浓度为横坐标(X)进行线性回归,得回归方程为 $Y = 8\,419.1X - 8\,298$ ($R^2 = 0.999\,8$),在20~1 000 μg/mL范围内线性关系良好。

2.4.4 重复性试验 按“2.4.2”项下方法平行制备3份供试品溶液,测得甘草酸二铵含量RSD为2.05%,表明该方法重复性良好。

2.4.5 稳定性试验 取20、300、1 000 μg/mL供试品溶液,于0、2、4、8、12 h测定,测得含量RSD分别1.85%、1.75%、1.27%,表明该溶液在12 h内稳定性良好。

2.4.6 加样回收率试验 制备空白对照溶液,取不同量对照品溶液加入量瓶中,甲醇稀释至质量浓度为20、300、1 000 μg/mL,各3份,在“2.1.3”项色谱条件下测定,测得平均加样回收率为95.0%~100%,RSD均小于2.1%。

2.5 体外释药行为考察 采用Franz立式扩散池法^[14-15]。以磷酸盐缓冲液(pH=7.4)为释放介质,制得2 mg/mL甘草酸二铵水溶液、脂质体、温敏凝胶、二元脂质体温敏凝胶各2 mL,加入扩散池给药池中,使其均匀分布于半透膜(截留分子量14 000)表面(有效扩散面积为3.14 cm²),于37.5℃水浴下放置,使温敏凝胶充分胶凝,在37℃、200 r/min条件下于0.5、1、2、4、8、12、24、48 h从扩散池吸取0.5 mL释放介质,同时补加等量37℃新鲜介质,过0.22 μm微孔滤膜,取20 μL注入色谱仪,在“2.1.3”项色谱条件下测定含量,结果见图3。

由图可知,水溶液中药物在4 h内的累积释放率即达96.85%,表明半透膜对其基本无吸附作用;二元脂质体温敏凝胶中药物在24、48 h的累积释放率分别为 $(59.17 \pm 0.23)\%$ 、 $(65.52 \pm 0.63)\%$,而脂质体和温敏凝胶中分别为 $(72.13 \pm 0.55)\%$ 、 $(80.53 \pm 0.15)\%$ 和 $(70.63 \pm 0.34)\%$ 、 $(76.27 \pm 0.42)\%$,即从24~48 h开始累积释放变化速率已经很低,表明二元脂质体温敏凝胶较其他

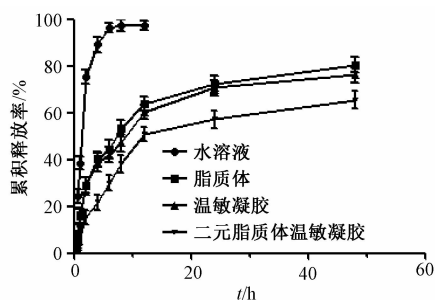


图 3 甘草酸二铵体外累积释放曲线

Fig. 3 *In vitro* accumulative release curves for diammonium glycyrrhizinate

2 种制剂有更好的缓释行为。此外,脂质体具有明显的突释现象,前 4 h 的累积释放率达 40.17%,这与存在 36.75% 的游离药物有关(包封率为 63.25%);温敏凝胶也存在一定突释现象,可能是在溶胶-凝胶相转变过程中药物快速释放所致;二元脂质体温敏凝胶无突释现象,这是因为药物包裹于脂质体内,从而克服了凝胶的突释效应。综上所述,二元脂质体温敏凝胶比其他 3 种制剂具有更好的缓释效应。

3 讨论

本实验所制备的二元脂质体温敏凝胶是一种具有较强黏膜黏附效果和反向温度响应行为的智能剂型,经直肠给药后,由低温时低黏度流体在体温下迅速转变为半固态,黏度增加,能与肠粘膜充分接触,用于直肠给药时无毒性、无异物感,可用于关节腔注射^[16]。

白芨多糖^[9]是从白芨中提取的水溶性大分子黏性多糖,其水溶液为黏稠的凝胶液,因此具有良好的生物黏附性,对人体极为安全,广泛应用于药用辅料、化妆品等领域,故本实验以天然生物黏附剂白芨多糖为温敏凝胶增黏剂。同时,该成分具有抗溃疡、抗炎、止血等药理作用,可与甘草酸二铵协同治疗溃疡性结肠炎,体现了中药复方用药的特色。

然后,通过星点设计-效应面法对温敏凝胶基质进行优选,考察了 P407、P188、白芨多糖用量对凝胶相变温度的影响,确定了最佳处方,体外释放结果可知,甘草酸二铵二元脂质体温敏凝胶可延

长药物在给药部位的停留时间,药效发挥充分,患者易接受,并且安全性高。考虑到正常人排便情况,该制剂用于直肠给药时的释放率有待进一步提高,今后将继续进行相关实验研究。

参考文献:

- [1] 王铭慧,李玉华,曹晓焕,等. 溃疡性结肠炎的研究进展[J]. 中国中医药现代远程教育, 2011, 9(24): 170-175.
- [2] Zhang Y Z, Li Y Y. Inflammatory bowel disease: pathogenesis[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(1): 91-99.
- [3] 程运扬. 直肠给药制剂的应用进展[J]. 中国医院药学杂志, 2013, 33(23): 1969-1971.
- [4] 曹宁宁, 姜 菲, 刘金鹏. 脂质体的制备方法及其研究进展[J]. 天津理工学院学报, 2003, 19(1): 30-35.
- [5] 王晶超, 付正英. 温度敏感型原位凝胶直肠给药研究进展[J]. 河南中医, 2014, 34(8): 1640-1642.
- [6] 张明发, 沈雅琴. 甘草及其活性成分抗炎与抗炎机制的研究进展[J]. 现代药物与临床, 2011, 26(4): 261-268.
- [7] 霍丽娟, 郭海荣. 甘草酸二铵对溃疡性结肠炎大鼠的治疗作用[J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(4): 399-404.
- [8] 赵文昌, 宋丽军, 许健煌. 天然高分子白芨多糖在药物制备中的应用[J]. 今日药学, 2010, 20(3): 2-3.
- [9] 崔向磊. 白芨多糖的结肠生物可降解性与抗溃疡性结肠炎活性研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2012.
- [10] 程媛媛. 新型胃粘附材料—白芨多糖的制备及膜粘附性体内外评价[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2008.
- [11] Bochot A, Fattal E. Liposomes for intravitreal drug delivery: a state of the art[J]. *J Control Release*, 2012, 161(2): 628-634.
- [12] 吴艳丽, 张朵朵, 危红华, 等. 眼用葛根素柔性脂质体温敏凝胶剂的制备及其性质考察[J]. 中成药, 2014, 36(7): 1418-1423.
- [13] Timaksiz F, Timaksiz F, Robinson J R. Rheological, muco-adhesive and release properties of Pluronic F-127 gel and Pluronic F-127/polycarbophil mixed gel systems[J]. *Pharmazie*, 2005, 60(7): 518-523.
- [14] 高 萌, 徐 红, 鲍 旭, 等. RP-HPLC 法测定姜黄素温敏凝胶的含量及体外释放度[J]. 中国药房, 2012, 23(11): 979-982.
- [15] 张朵朵, 吴艳丽, 危红华, 等. 荆芥油-苦参素阴道用脂质体温敏凝胶的制备及其性质考察[J]. 中草药, 2014, 45(7): 929-934.
- [16] 黄晓君. 关节腔注射用青藤碱-PLGA 微球—温敏凝胶的制备及评价[D]. 广州: 广东药学院, 2015.