

油酸及单硝酸异山梨酯载入量对单油酸甘油酯液晶体系相图及体外释放的影响

张星一¹, 马迪², 郑亚真², 许梁³, 高缘^{2*}

(¹国家食品药品监督管理局药品审评中心,北京 100038; ²中国药科大学中药制剂教研室,南京 210009;

³中国药科大学药剂学教研室,南京 210009)

摘要 考察油酸(OA)及单硝酸异山梨酯(ISMN)载入量对单油酸甘油酯(GMO)液晶体系相图及药物释放的影响。制备GMO/H₂O, GMO/H₂O/ISMN和GMO/H₂O/OA 3种液晶体系的相图,考察了GMO的吸水行为及ISMN从GMO液晶载药体系的释药特性。结果表明,药物从GMO中的释放属于扩散释放,ISMN载入量的升高加快液晶体系的释药速率,而油酸载入量的增加使释药减慢。本研究为GMO液晶体系的载药及附加剂的使用提供了理论基础。

关键词 单油酸甘油酯;液晶;单硝酸异山梨酯;油酸;相图;体外释放

中图分类号 R913 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2016)05-0581-06

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20160513

引用本文 张星一, 马迪, 郑亚真, 等. 油酸及单硝酸异山梨酯载入量对单油酸甘油酯液晶体系相图及体外释放的影响[J]. 中国药科大学学报, 2016, 47(5):581-586.

Cite this article as: ZHANG Xingyi, MA Di, ZHENG Yazhen, et al. Effect of oleic acid and isosorbide mononitrate loading on the phase diagrams and *in vitro* release profiles of glyceryl monooleate liquid crystalline system[J]. *J China Pharm Univ*, 2016, 47(5):581-586.

Effect of oleic acid and isosorbide mononitrate loading on the phase diagrams and *in vitro* release profiles of glyceryl monooleate liquid crystalline system

ZHANG Xingyi¹, MA Di², ZHENG Yazhen², XU Liang³, GAO Yuan^{2*}

¹Center for Drug Evaluation, Chinese Food and Drug Administration, Beijing 100038;

²Department of Traditional Chinese Pharmaceutics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009;

³Department of Pharmaceutics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract The aim of the study was to investigate the effect of oleic acid (OA) and isosorbide mononitrate (ISMN) on the phase diagrams of glyceryl monooleate (GMO) liquid crystalline systems and release of ISMN from them. Liquid crystalline systems of GMO/H₂O, GMO/H₂O/ISMN and GMO/H₂O/OA were prepared and their phase diagrams were plotted. Investigation of water absorption of GMO and ISMN release profiles shown that the release mechanism of ISMN was diffusion-controlled. Increased drug loading accelerated the release rate. However, the increased loading of OA decreased ISMN release. The result could offer practical basis for drug loading and the selection of additives in GMO liquid crystalline system.

Key words glyceryl monooleate; liquid crystal; isosorbide mononitrate; oleic acid; phase diagrams; *in-vitro* release

This study was supported by the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. SBK2015021177); and the Priority Academic Program Development (PAPD) of Jiangsu Higher Education Institutions

液晶是一种长程有序、短程无序的分子聚合体,是介于固态和液态之间的热力学稳定的中间相态。根据形成的条件和组成,液晶可分为热致液晶(thermotropic liquid crystals)、溶致液晶(lyotropic liquid crystals)和聚合物液晶^[1-2]。本文主要针对单油酸甘油酯(glyceryl monooleate, GMO)形成的溶致液晶进行研究,它是两种或两种以上组分形成的液晶,其中一种是水或其他的极性溶剂。

GMO 是具有甘油基和油酸基的两亲性基团的类脂材料,在水溶液中能自发形成热力学稳定的脂质双分子层,这些脂质双分子层能够自发形成具有不同三维结构的液晶体系(例如层状液晶、立方状液晶、反相六角状液晶等)。这种形成的液晶三维体系具有特殊的内部结构,能够包封药物,起到缓释作用,并且还具有黏膜黏附、提高药物稳定性、提高生物利用度等优势^[2-4]。

作为液晶给药系统的主要载体,GMO 需要与不同物质组合使用,GMO/H₂O 系统中载入不同物质会影响液晶性质。此前本课题组证实了丹皮酚和泊洛沙姆对 GMO 液晶体系特征的改变^[5],但未考察其对释放行为的影响。本研究考察了单硝酸异山梨酯(isosorbide mononitrate, ISMN)和油酸(oleic acid, OA)的载入对 GMO 液晶体系相图及 ISMN 释放的影响。

1 材 料

1.1 药品与试剂

单油酸甘油酯(批号:4010380689,丹麦 Danisco 公司);单硝酸异山梨酯(ISMN,海新亚药业有限公司);油酸(OA,瑞士 Lipoid 公司);明胶胶囊(苏州胶囊有限公司);甲醇(色谱纯,德国 CNW 公司);其他试剂均为市售分析纯。

1.2 仪 器

ZRS-4 智能溶出试验仪(天津大学无线电厂);2010AHT 高效液相色谱仪(日本岛津公司);DMLM/PLink SC600 型显微镜(德国 Leica 公司)。

2 方 法

2.1 液晶体系相图绘制

分别制备 GMO/H₂O, GMO/H₂O/ISMN 和 GMO/H₂O/OA 3 种液晶体系,绘制液晶体系相图,考察体系中含水量、载药量及 OA 载入量对液晶特

性的影响。

2.1.1 GMO/H₂O 液晶体系^[5] 分别精密称取 GMO 0.5 g 置具塞离心管内,37 ℃水浴中熔融,加入适量蒸馏水配制成一定含水量的 GMO/H₂O 体系(含水质量分数分别为 2%、5%、7%、10%、13%、15%、17%、20%、22%、25%、28%、30%、35%、40%、45%、50%、60%),具塞密封,置 37 ℃恒温培养 72 h。每隔 12 h 取出观察 GMO/H₂O 液晶体系是否达到平衡。若外观无 GMO 与水相的明显界面,或体系已呈透明水晶状,则表示 GMO/H₂O 液晶体系已达平衡。

2.1.2 GMO/H₂O/ISMN 液晶体系 分别精密称取 GMO 0.5 g 置具塞离心管内,37 ℃水浴中熔融,加入一定量的 ISMN,制备成 ISMN 质量分数分别为 0%, 1%, 3%, 5%, 7% 的 GMO/ISMN 均匀混合物。再将该混合溶液依上述方法加水配制一系列含水量的 GMO/H₂O/ISMN 液晶体系,具塞密封,同法考察液晶平衡。

2.1.3 GMO/H₂O/OA 液晶体系 分别精密称取 GMO 0.5 g 置具塞离心管内,37 ℃水浴中熔融,加入一定量的 OA,制备成 OA 质量分数分别为 5%, 15%, 25%, 35% 的 GMO/OA 均匀混合物。再将该混合溶液依上述方法加水制成一系列含水量的 GMO/H₂O/OA 液晶体系,具塞密封,同法考察液晶平衡。

2.1.4 偏光显微镜观察和相图的研究 取上述达到液晶平衡的样品置热台偏光显微镜下,通过其偏光纹理来判断液晶类型,据此分别描绘上述 3 种液晶体系的一元或二元相图。

2.2 GMO 吸水行为的研究

2.2.1 样品制备

2.2.1.1 不含油酸的 GMO 样品的制备

精密称取 GMO 1.5 g,置 37 ℃水浴中熔融,趁熔融状态灌注于自制不锈钢圆柱体模具(直径 1 cm,高 0.8 cm)中,置室温自然冷凝成柱形样品,待用。

2.2.1.2 含油酸的 GMO 样品的制备

分别精密称取 GMO 1.5 g,置 37 ℃水浴中熔融,再分别加入不同量的 OA,混匀,得到 OA 质量分数分别为 0%, 2%, 4% 的 GMO/OA 均匀混合物,同上述操作制备 GMO/OA 冷凝柱形样品,待用。

2.2.2 吸水性测定 将柱形样品分别精密称重,各置于37℃的蒸馏水200mL中,定时将样品取出,小心用滤纸吸收样品表面的水分,称重,计算单位重量样品的吸水量。所得数据以一级动力学与二级动力学模型分别进行拟合^[6]:

$$\frac{d(W_\infty - W_t)}{dt} = -k(W_\infty - W_t) \quad (1)$$

$$\frac{d(W_\infty - W_t)}{dt} = -k(W_\infty - W_t)^2 \quad (2)$$

分别对(1)、(2)式进行积分:

$$\ln \frac{W_\infty}{W_\infty - W_t} = kt \quad (3)$$

$$\frac{t}{W_t} = \frac{1}{kW_\infty^2} + \frac{t}{W_\infty} \quad (4)$$

其中, W_t 为 t 时刻单位重量样品的吸水量, 即 $(W - W_0)/W_0$; W 为 t 时刻的样品重量; W_0 为样品的初始重量; W_∞ 为单位重量样品的平衡吸水量, 即饱和吸水量, 计算方法类似于 W_t , 但是公式中的 W 为达到平衡时的样品重量; k 表示吸水动力学常数, 反映单位重量样品的吸水速率。

在一级动力学模型中, 以 $\ln \frac{W_\infty}{W_\infty - W_t} = kt$ 对时间 t 作图, 拟合直线的斜率即为 k ; 在二级动力学模型中, 以 $\frac{t}{W_t}$ 对 $\frac{t}{W_\infty}$ 作图, 拟合直线的截距为 $\frac{1}{kW_\infty^2}$, 由此可计算求得 k 。

2.3 体外释放实验

2.3.1 样品制备

2.3.1.1 GMO/ISMN 样品

分别精密称取GMO 10 g 置37℃熔融, 分别加入一定量的ISMN, 37℃磁力搅拌溶解, 制备成ISMN质量分数分别为1%, 3%, 5%的GMO/ISMN均匀液体。精密称取各样品0.5 g 装入0号胶囊内, 垂直放置, 室温冷凝成形, 备用。

2.3.1.2 GMO/OA/ISMN 样品

分别精密称取GMO 10 g 置37℃熔融, 加入ISMN 0.3 g 和一定量的OA, 37℃磁力搅拌溶解, 制备成OA质量分数分别为0%, 5%, 10%, 20%的GMO/OA/ISMN均匀液体。精密称取各样品0.5 g 装入0号胶囊内, 垂直放置, 室温冷凝成形, 备用。

2.3.2 释放度试验方法 照释放度测定法(《中华人民共和国药典(2010年版)》二部附录XC第一法(转篮法))装置, 以37℃蒸馏水900mL为溶

出介质, 转速为100 r/min, 依法操作, 每隔1 h 分别从溶出杯中取出5 mL, 经0.22 μm微孔滤膜过滤, 续滤液作为供试品溶液, 并及时在溶出杯中补充等温蒸馏水5 mL。

供试品溶液中的ISMN浓度采用HPLC法测定。采用Thermo ODS C₁₈色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 甲醇-水(30:70)为流动相, 流速1.0 mL/min, 检测波长220 nm, 柱温30℃。在该色谱条件下, ISMN的保留时间约为4 min, 其质量浓度在0.52~80.1 μg/mL的范围内与峰面积线性关系良好, 回归方程为 $A = 2011.9c + 438.17$, 相关系数 $r = 0.9999$; 样品溶液室温放置24 h 检测峰面积无明显变化, RSD(%)为0.87, 溶液稳定性良好; 低、中、高3种剂量的平均回收率(%)分别为100.3, 100.1和99.59, RSD(%)分别为1.21, 0.89和1.05($n = 3$), 准确度好。

3 结果与讨论

3.1 GMO液晶体系相图绘制

GMO在水溶液中能自发形成反相胶束相(L₂)以及另外3种结构不同的液晶相, 这3种液晶相分别为层状液晶(L_a)、立方状液晶(C)、反相六角状液晶(H)^[5]。将制备所得的3种GMO液晶体系分别置热台偏光显微镜下, 控制热台温度为37℃, 观察各样品的偏光形态, 可清晰分辨。反相胶束相是油包水的体系, 无偏光现象, 所见即为黑色背景; 层状液晶有偏光现象, 偏光形态呈梅花状的马耳他十字; 立方状液晶无偏光现象, 但其黏度非常大, 且又呈现独特的外观, 故可以很容易地与同样没有偏光现象的反相胶束相区别开; 反相六角状液晶有偏光现象, 呈现片状的偏光形态^[5]。

图1显示了ISMN的载入对体系的影响。横坐标表示体系中水含量(%), 纵坐标表示各体系中ISMN的比例(%). 结果表明随着水含量的增大, GMO/H₂O/ISMN液晶体系依次由反相胶束相(L₂)向层状液晶(L_a)、立方状液晶(C)相态进行过渡。值得注意的是, 随着体系中ISMN的含量的增大, 层状液晶(L_a)区域所占的范围不断变大。

图2显示了OA的加入对GMO/H₂O液晶体系的影响。横坐标表示水含量(%), 纵坐标表示油酸在体系中的比例(%). 与ISMN对GMO/H₂O液晶体系所引起的相变不同, GMO/H₂O体系中加

入仅占该体系比例 5% 的 OA, 即可使该体系的层状液晶相态 (L_α) 完全消失, 转变为反相六角状液晶 (H_π)。随着含水量的继续增加, 体系的最终状态是反相六角状液晶与多余水相稳定共存。随着 OA 在体系中所占比例的增加, 反相六角状液晶在相图中液晶区域内所占的范围并未增大, 但是,

GMO/H₂O/OA 液晶体系所能容纳的水分含量减少了, 即 OA 的加入使 GMO 的吸水能力下降了。继续增加体系中 OA 的量, 当 OA 的量达到体系的 35% 时, 偏光现象完全消失, 体系呈可以自由流动的油状, 说明 35% 的 OA 已破坏了 GMO/H₂O 体系的液晶结构, 该体系已不属于液晶态。

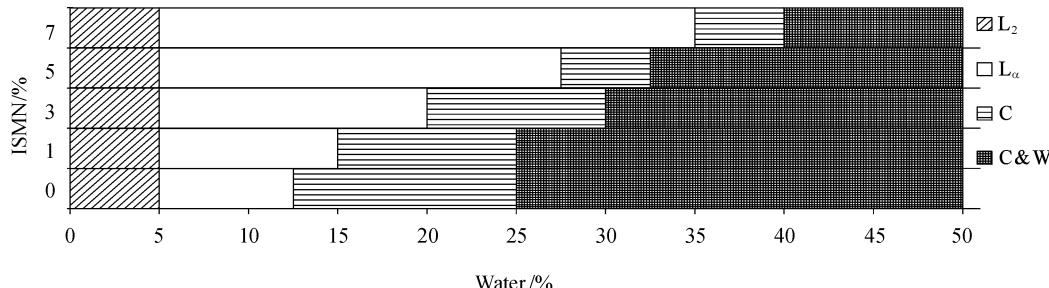


Figure 1 Phase diagram of glyceryl monooleate (GMO)/H₂O/isosorbide mononitrate (ISMN) liquid crystalline system

L_2 : reverse micelle phase; L_α : lamellar liquid crystal; C: cubic liquid crystal; W: water

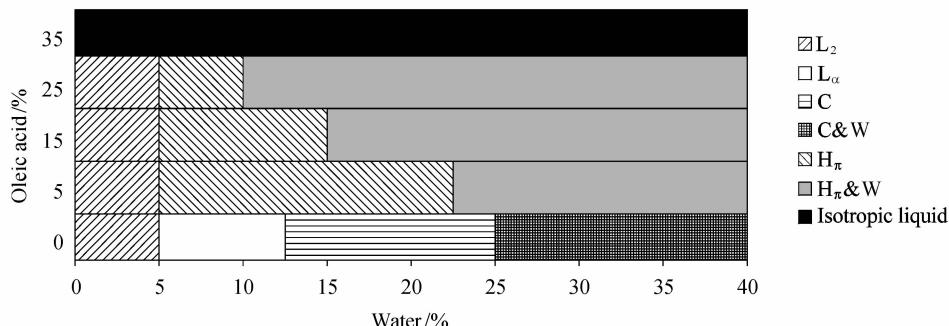


Figure 2 Phase diagram of GMO/H₂O/OA liquid crystalline system

OA: oleic acid; H_π : reversed hexagonal liquid crystal

上述两种性质不同的添加剂(水溶性的单硝酸异山梨酯和脂溶性的油酸)对 GMO/H₂O 液晶体系相图的影响说明, 水溶性 ISMN 的加入可使 GMO/H₂O 液晶体系的立方状液晶相转变为层状液晶相, 脂溶性 OA 的加入可以使 GMO/H₂O 液晶体系的层状液晶相转变为反相六角状液晶相。加入不同的添加剂可导致液晶相行为发生改变, 这一现象可由堆积参数理论进行解释^[5,7]。当 GMO/H₂O 液晶体系中加入第 3 种物质时, 该物质因其极性大小而在液晶体系中选择是否接近液晶体系中 GMO 长链的亲水基团, 从而改变了 GMO 分子的体积、亲水基团的有效面积等, 进而改变了堆积参数, 最终使液晶相态发生改变。

3.2 GMO 吸水行为的研究

含不同比例油酸的 GMO 的吸水动力学测定结果如图 3 所示。结果表明各组样品接触水后均

迅速吸水, 吸水速率和饱和吸水量随着 GMO 体系中油酸量的增加而下降。对各组样品在 0.5, 12, 48 h 的吸水量进行 SNK-q (Student-Newman-Keuls test) 检验, 结果显示各组样品在各时间点的吸水量均有极显著性差异 ($P < 0.01$), 表明油酸的加入显著延缓和抑制 GMO 的吸水速度和程度。

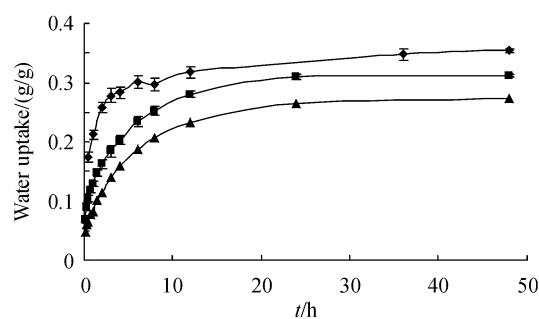


Figure 3 Swelling profiles of GMO systems in excess distilled water ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

对各样品的吸水行为分别按照一级动力学和二级动力学模型进行拟合,拟合结果及吸水速率常数见表1。结果说明无油酸体系的吸水行为符合二级动力学模型($R^2 = 0.9989$),而含2%及4%油酸体系的吸水行为符合一级动力学模型。随着OA含量的加入,体系的吸水速率常数(k)显著下降,这是由于油酸的加入使体系亲水性下降所致,但在2%~4%范围内,OA的量对k无显著性影响。

Table 1 Fitting results of swelling kinetics

Parameter	First-order model			Second-order model		
	0% OA	2% OA	4% OA	0% OA	2% OA	4% OA
R^2	0.8541	0.9924	0.9949	0.9989	0.9853	0.9750
k	0.1358	0.1690	0.1533	5.1268	2.7482	2.1986

3.3 体外释放试验

3.3.1 ISMN载药量对GMO/ISMN体系释放行为的影响 图4表示ISMN载药量对GMO/ISMN体系释放特性的显著影响,ISMN从GMO/ISMN体系中的释放度随着ISMN载入量的增加而增大。这一现象可由图1所示相图得到解释。ISMN量的增加使相图中层状液晶区范围增大,即GMO体系液晶态在吸水过程中更长时间地处于黏度较低的层状液晶态,并且ISMN的量越大,层状液晶区域的范围也越大,处于层状液晶态的时间也越长。层状液晶的黏度低,对药物的阻滞能力远弱于立方状液晶,因此ISMN的加入及载量的增加促进GMO/ISMN体系的释放。

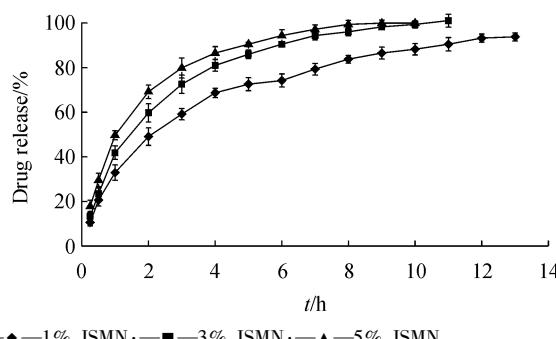
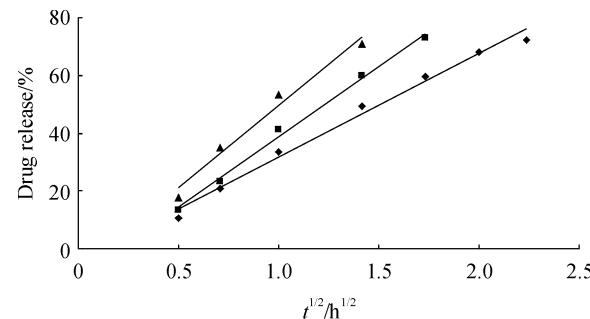


Figure 4 Effect of ISMN percentage on the release profiles of GMO/ISMN systems ($\bar{x} \pm s, n=3$)

在释放百分数小于70%的时间范围内,将累积释放百分数(%)对 $t^{1/2}$ 作图(图5),结果含ISMN分别为1%,3%,5%的GMO/ISMN体系的拟合相关系数(R^2)分别为0.9769,0.9951,0.9887,表明释放过程较好地符合Higuchi模型,体系释药机

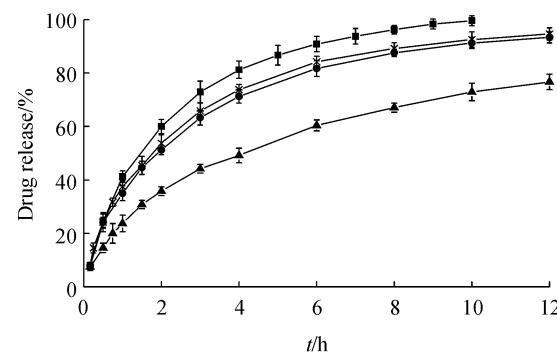
制为扩散释放^[8]。



◆1% ISMN; ■3% ISMN; ▲5% ISMN

Figure 5 Fitting with Higuchi model of release data

3.3.2 OA含量对GMO/OA/ISMN体系释放行为的影响 图6表示各组样品中ISMN量为3%时,OA含量对GMO/OA/ISMN体系释药行为的影响。结果表明释放度随着OA比例的增加而下降。释放结束后,将所有含OA的样品置热台偏光显微镜下于37℃进行观察,结果显示偏光形态均呈片状,说明释放结束后样品呈反相六角状液晶态,这与图2相图所示结果一致。由相图图2可知,含OA的GMO体系进入溶出介质后,不经过层状液晶相(L_α)而直接形成反相六角状液晶(H_π)。反相六角状液晶的黏度显著大于层状液晶,因此OA的加入可产生明显的阻滞药物释放的效果。



—■—0% OA; —×—5% OA; —●—10% OA; —▲—20% OA

Figure 6 Effect of OA percentage on the release profiles ISMN from GMO/OA/ISMN systems ($\bar{x} \pm s, n=3$)

ISMN从GMO体系中的释放受到多种因素的影响,包括体系含水量、添加剂等,同时添加剂OA也会影响GMO的吸水能力。上文表明含OA的GMO体系在溶出介质中直接形成反相六角状液晶(H_π),含水量继续增加时体系的最终状态是反相六角状液晶与多余水相稳定共存。而在不存在OA的情况下, H_π 是不存在的,这表明加入OA而

导致的液晶相态变化是影响药物释放的主导因素,添加剂引起的 GMO 吸水量变化可能处于很次要的地位。

另外, GMO 在水中能自发形成脂质双分子层,进而自发形成具有水性通道和脂性层的三维液晶结构,药物由 GMO 液晶体系中释放到溶出介质中的过程如下^[9]:(1)对于处于水性通道中的药物而言,药物通过水性通道直接扩散进入溶出介质;(2)对于处于脂性层中的药物而言,由于脂性双分子层内与溶出介质是不相通的,故药物需要先渗透通过脂性双分子层才能释放进入水性通道,再由水性通道扩散入溶出介质。

由 GMO 液晶体系的这种释放特征可知,脂性层中的药物分布越多,则该液晶体系释药越慢。OA 的加入从如下两方面机制增加 ISMN 在脂性层中的分布量:(1)由含 OA 的 GMO/OA 体系吸水行为的研究可知,OA 的加入能使得 GMO 体系的饱和吸水量降低,且体系中 OA 的量越大,其饱和吸水量越小。饱和吸水量减小将导致液晶内部水性通道量的减少,分布于水性通道中的 ISMN 比例降低,换言之即增加了分布于脂性层中的 ISMN 的量;(2)由 GMO 形成脂质双分子的性质可以推断,加入体系中的亲脂性 OA 应与 GMO 分子的脂性基团结合,使 GMO 分子脂性基团体积增大,从而增大了亲脂层中能容纳 ISMN 的量。

4 结 论

本研究考察了 ISMN 和 OA 的加入对 GMO 液晶体系相图的影响。二者具有明显的差异,ISMN 能使 GMO/H₂O 液晶体系由立方状液晶转化为层状液晶,而 OA 的加入能使层状液晶转化为反相六角状液晶。此外 OA 不但能使 GMO 体系的吸水行

为从二级动力学转变为一级动力学,而且使 ISMN 在 GMO 液晶体系内更多地分布于脂性层中,从而降低 GMO 液晶体系释药速率。本研究表明可以通过控制药物载入量和 OA 载入量来有目的地控制液晶体系,从而达到利用不同特征的液晶来控制药物释放等目的。

参 考 文 献

- [1] Tian XH, Jiang Q, Xie MG. Research advancement of structures and application of lyotropic liquid crystals [J]. *Chem Res Appl* (化学研究与应用), 2002, 14(2): 119-122.
- [2] Ma K, Wu LH, Zhang MY, et al. Advances in research on cubic and hexagonal liquid crystals as drug delivery system [J]. *Prog Pharm Sci* (药学进展), 2012, 36(1): 14-21.
- [3] Boyd BJ, Khoo SM, Whittaker DV, et al. A lipid-based liquid crystalline matrix that provides sustained release and enhanced oral bioavailability for a model poorly water soluble drug in rats [J]. *Int J Pharm*, 2007, 340(1/2): 52-60.
- [4] Nielsen LS, Schubert L, Hansen J. Bioadhesive drug delivery systems. I. Characterisation of mucoadhesive properties of systems based on glyceryl monooleate and glyceryl monolinoleate [J]. *Eur J Pharm Sci*, 1998, 6(3): 231-239.
- [5] Li C, Gao Y, Zhang JJ, et al. Effect of poloxamer F127 and paenol on gmo-based liquid crystal transformation [J]. *Acta Chem Sin* (化学学报), 2011, 69(13): 1503-1508.
- [6] Chang CM, Bodmeier R. Swelling of and drug release from monoglyceride-based drug delivery systems [J]. *J Pharm Sci*, 1997, 86(6): 747-752.
- [7] Engstrom S, Engstrom L. Phase behavior of the lidocaine-monolein-water system [J]. *Int J Pharm*, 1992, 79(2/3): 113-122.
- [8] Lara MG, Bentley MV, Collett JH. *In vitro* drug release mechanism and drug loading studies of cubic phase gels [J]. *Int J Pharm*, 2005, 293(1/2): 241-250.
- [9] Geraghty PB, Attwood D, Collett JH, et al. The *in vitro* release of some antimuscarinic drugs from monolein/water lyotropic liquid crystalline gels [J]. *Pharm Res*, 1996, 13(8): 1265-1271.