

综述评论

软胶囊明胶囊壳老化机理浅析

王晨 杜茂波 李爱玲 刘淑芝 邱东*

中国科学院化学研究所, 北京 100080

1 概述

明胶因其外观光泽性、味道中性、简便的加工性,以及热可逆性而广泛地应用于软胶囊的外层囊壳材料。目前已经规模生产的中药软胶囊种类日渐增多,如藿香正气软胶囊等,这给中药的发展带来了光明的前景,也使得人们享受到了更多的方便。

然而随着软胶囊剂近年来在国内外的迅速发展,其在研制、生产,以及储存中存在的一些问题也越来越明显,其中尤为突出的是软胶囊囊壳材料崩解迟缓问题。软胶囊囊壳在高温、热^[1-2]、高湿度、紫外辐射、 γ -辐射^[3]和快速干燥^[4]等物理条件下或者遇到醛类、酮类、亚胺和碳化二亚胺^[5-12]等化学物质时都有可能发生交联老化而产生崩解迟缓现象,具体表现为胶囊壳内壁出现一层膜状物质,使得崩解时间延长,溶出速率下降甚至完全不溶。

这些问题对于明胶软胶囊的溶解性和崩解行为产生了实质上或者潜在的威胁,究其原因,则是明胶分子内或者分子间发生交联反应而使其产生的老化现象。为了能够从根本上来缓解或解决明胶软胶囊崩解迟缓问题,需要了解使得明胶老化的明胶分子的交联反应类型及机理。

本文简单总结了前人的研究工作,阐述了在明胶交联老化方面的最新研究进展,并对其机理进行了详细的描述,这对新型明胶胶囊抗

老化交联研究具有一定的指导意义。

2 明胶交联老化类型及机理

组成明胶的蛋白质中含有18种氨基酸,有文献^[7]指出,明胶分子的反应活性来源于明胶分子中具有三个官能团的氨基酸,特别是赖氨酸。史京京^[13]等通过改性后的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)法,测定明胶与甲醛交联反应及分子量分布的变化情况发现,从SLK酸性胶原中提取出来的纯 α_1 和 α_2 组分与甲醛反应时, α_1 组分在4h时交联程度已达到最大,而 α_2 组分则在24h时才达到最大值。经过分析发现 α_1 组分中赖氨酸含量是 α_2 组分中的1.5倍,说明了赖氨酸在明胶交联反应中的高活性。刘建平等^[14]以甲醛处理明胶胶片模拟不同交联程度考察了明胶平衡溶胀量(Seq)、蛋白质溶出量及氨基酸残基(主要是赖氨酸和精氨酸)含量之间的相关性,以及附加剂对明胶中氨基酸残基含量的影响并引起软胶囊崩解迟缓的可能机理,研究发现随甲醛浓度的增大,明胶的平衡溶胀量、蛋白质溶出量和氨基酸残基含量均明显下降。分别以Seq、D和Y对甲醛浓度线性回归,3个方程的 r 均大于0.99,D与Seq、D与Y和Y与Seq之间呈线性关系且相关性良好($r > 0.96$),说明了明胶中赖氨酸和精氨酸残基含量对交联程度的重要影响。在B型明胶中,1g明胶分子中就含有 33.0×10^{-5} mol

* e-mail: dqiu@iccas.ac.cn

赖氨酸的 ε -氨基官能团。羧基在明胶分子中远比氨基多,但交联时很少参与反应,但也有专家指出,在高温、高湿度条件下明胶的交联反应可由羧基和氨基的脱水反应造成^[1]。组氨酸残基中的氨基通常认为不像赖氨酸中 ε -氨基那样在明胶交联中起重要的作用,精氨酸中高碱性的胍基($pK_a \approx 12.48$)在中性pH值下质子化,只在高pH时参与反应,然而有甲醛存在时,在明胶硬化过程中精氨酸明显参与了反应^[7]。

明胶交联老化基本可分为两种类型:一种是明胶自发交联老化;另一种可称为应激诱导交联老化。自发交联老化是指明胶自身发生氧化交联反应或者与某些醛类等发生交联反应而引起的老化。应激交联老化则是指在某些应激条件,如高温、高湿度、减压,或者辐射存在的情况下,明胶分子内部的一些氨基、羧基等基团之间或者与其它外来基团之间发生交联反应而导致的明胶老化。这两种交联老化类型主要通过以下两种方式进行:其一是在明胶分子的同一条肽链上发生桥联(链内,分子内交联),其二是在两个相邻肽链的氨基酸残基间形成桥联(链间,分子间交联)。

2.1 赖氨酸-精氨酸和精氨酸-精氨酸交联

上文中已经提到,精氨酸中高碱性的胍基($pK_a \approx 12.48$)在中性pH值下质子化,只在高pH时参与反应,或者当甲醛存在时,精氨酸也会参与明胶的交联反应。甲醛作为交联剂,可以在两个相邻的多肽链或者同一链段中的两个氨基间形成亚甲醇,如图1所示^[15]。甲醛可以诱导明胶分子中赖氨酸中的 ε -NH₂和精氨酸中的胍基发生交联反应^[6,7,16-21],是因为这两种氨基酸都有较其它基团更长的、更高活性的侧链,可以伸出多肽链更远的地方,从而更容易发生分子内和分子间的反应。而且,亚胺基之间或者亚胺基与羟基之间等存在的氢键也能够使得形成的赖氨酸-精氨酸和精氨酸-精氨酸交联更加的稳定。以¹³C标记

的甲醛作为交联剂,通过¹³CNMR可以得到明显的信息,能够证明赖氨酸和精氨酸残基首先形成亚甲醇,然后相互反应形成赖氨酸-精氨酸和精氨酸-精氨酸交联。阎天堂等^[22]也通过¹³CNMR观察到赖氨酸-精氨酸交联以及精氨酸-精氨酸交联的存在,并推测交联存在的形式有可能为 $\text{Arg}=\text{N}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{Lys}$ 以及 $\text{Arg}=\text{N}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{Arg}$ 。但是,目前还没有实验证据能够证明甲醛可以引发赖氨酸-赖氨酸交联^[17-19]。在精氨酸-精氨酸交联和精氨酸-赖氨酸交联中,明胶交联速率的限制步骤有可能是精氨酸残基形成亚甲醇这一阶段,而且交联反应的速率能够受到湿度的很大的影响,当湿度为60%~70%时交联程度最高^[19]。

2.2 赖氨酸-赖氨酸交联

明胶同一分子链中或者相邻链段之间的赖氨酸-赖氨酸之间的交联反应不同于赖氨酸-精氨酸和精氨酸-精氨酸之间的交联,由于赖氨酸中高活性的 ε -NH₂残基,赖氨酸-赖氨酸之间的交联反应可能在多种不同的情况下发生。其交联的机理可能是赖氨酸残基 ε -NH₂自身在某些条件下发生自氧化脱氨基反应,形成醛基,然后醛基与醛基之间或者醛基与 ε -NH₂之间发生进一步的反应从而最后形成赖氨酸-赖氨酸交联;还有可能是赖氨酸的 ε -NH₂与一些醛类或者酮类发生反应而引发的交联^[7]。其中几种可能存在的交联机理如下:

(1)形成如在弹性蛋白纤维中发生的锁链(赖氨酸)素形式的交联。相邻的赖氨酸中的 ε -氨基发生氧化脱氨基反应,生成端醛基,而醛基可以和相邻赖氨酸的一个自由 ε -氨基发生反应,生成一个亚胺,经历一系列羟醛缩合反应,生成含有吡啶环的交联化合物。交联反应如图2所示。

(2)醛类诱导明胶交联。Clyde M. Ofner III等^[23]将硬胶囊和软胶囊放置在一起和将硬胶囊单独放置进行比较实验发现,硬胶囊和

软胶囊一起放置时,硬胶囊会发生一定程度的交联,并且 TNBS 检测 ϵ -氨基数量减少,然而其单独放置时则没有交联现象发生,说明软胶囊产生了挥发性的醛类使得硬胶囊发生了交联。所以明胶在生产、储存或者使用的时候都有可能存在醛类而引起交联反应。玉米淀粉在许多药物配方中作为赋型剂,其中有痕量

甲醛存在^[7],目前大量使用的 PEG400 等也有可能产生醛类,特别是中药制剂中的中药成分中也会含有少量的醛类。初始产物为一个羟甲基氨基,脱水后形成阳离子亚胺,亚胺与另一个羟甲基氨基酸残基反应,生成二亚甲基醚,经重排,在赖氨酸的两个 ϵ -氨基间形成亚甲基键。示意如图 3。

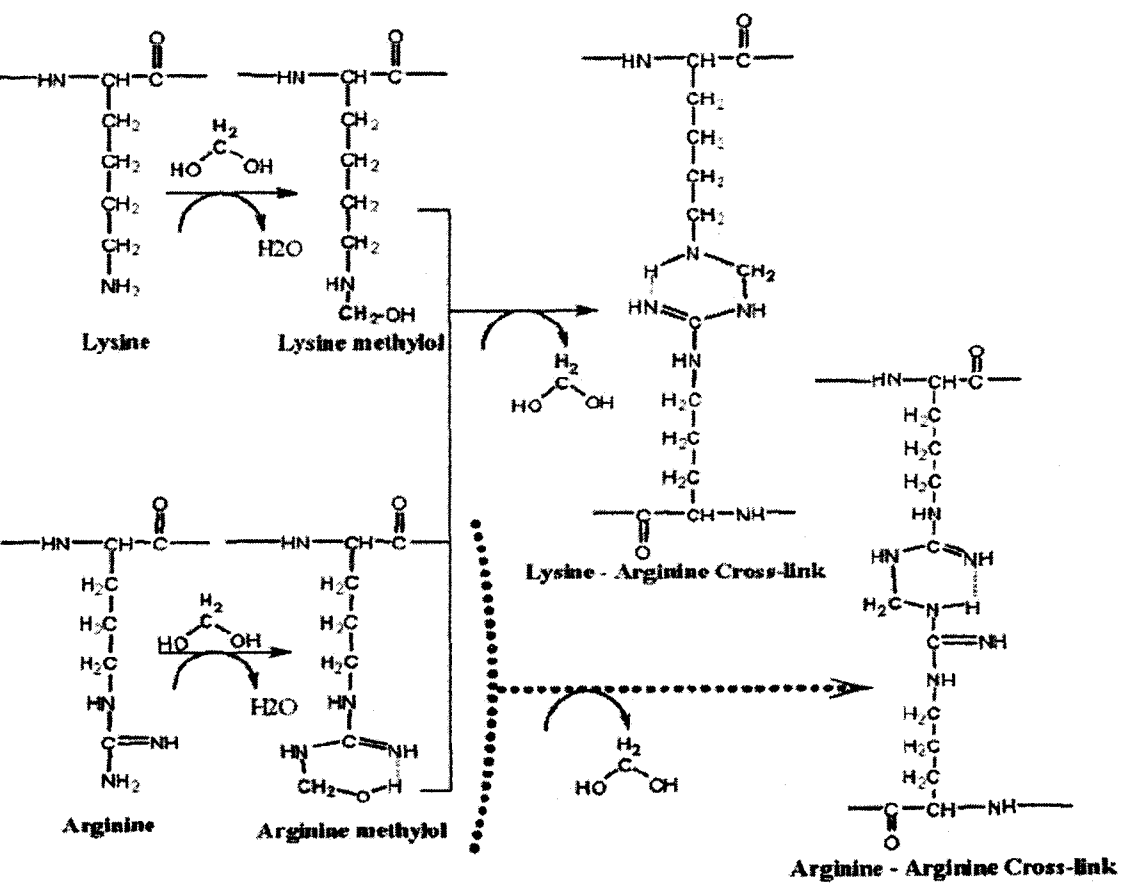


图 1 赖氨酸和精氨酸形成亚甲醇以及随之形成的明胶的交联的可能的机理

(3)与醛有关的另一种机理是赖氨酸的 ϵ -氨基和醛反应形成亚胺,随之形成氨缩醛,即缩醛胺的形式。反应的第一步生成伯醇胺,在酸性 pH 中,它是反应速率的限制步骤。而第二步在碱性 pH 中是反应速率的限制步骤。第三步形成亚胺,同时失水。第四步需要一个自由胺进攻阳离子亚胺,并生成胺缩醛。因为

第一步在酸性 pH 反应速率受限,而第二步在碱性 pH 反应速率受到限制,所以缩醛胺形成的最佳 pH 不可避免地接近 7;像缩醛形成一样,在低 pH 时缩醛胺形成是可逆的。胃中酸性环境结合酶的存在,可解释明胶胶囊交联对药物在体内释放速率影响很小的原因。虽然甲醛引发赖氨酸-赖氨酸交联还没有实验依

据,但是目前还不能够否认其理论上存在的可 能性。示意如图4。

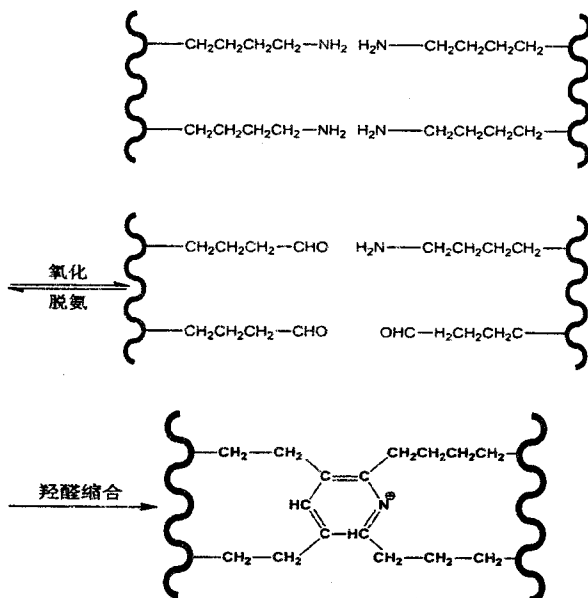


图2

R = alkyl

R' = $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{lys}$

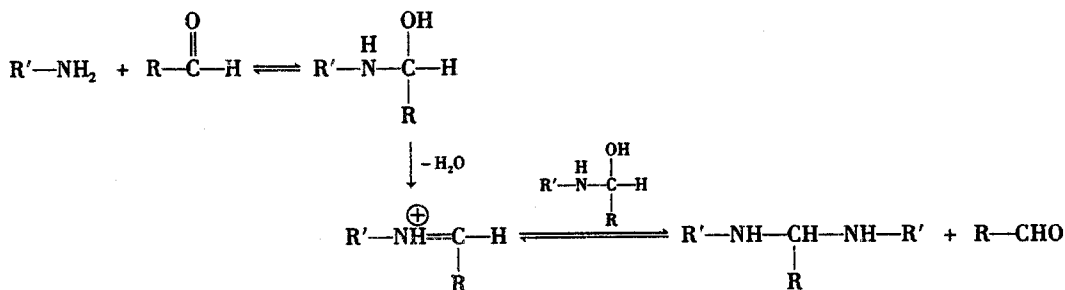


图3

R' = $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{lys}$

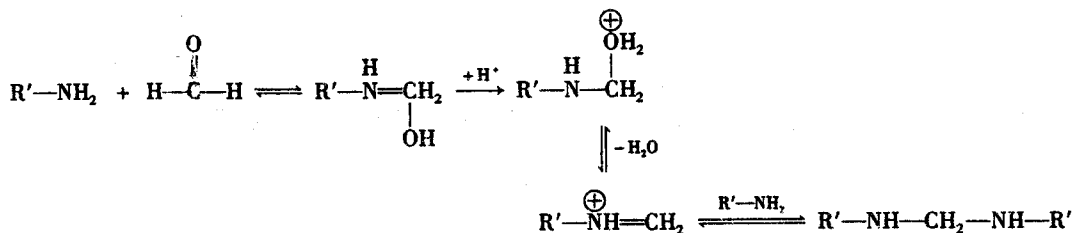
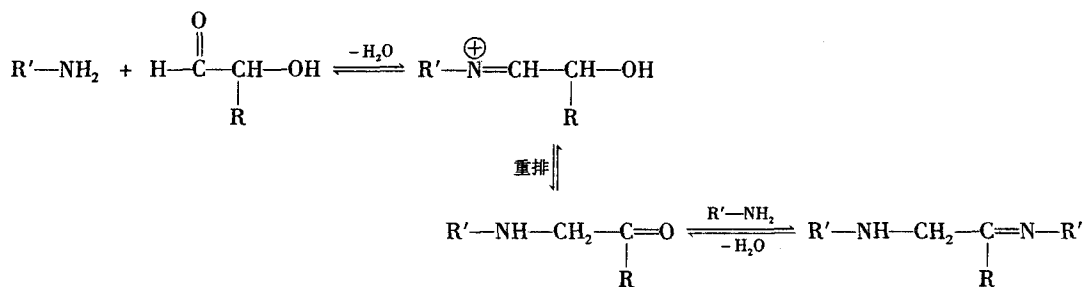


图4

(4) 葡萄糖或其它醛式糖时常在药剂中 存在,可提供明胶交联的另一种可能性. 这些 糖类的醛基官能团与自由 ε -氨基反应生成 亚胺中间物,通过 Amadori 重排,生成酮式糖, 形成的葡萄糖胺(酮糖)通过其羧基官能团与另 一胺自由反应生成交联明胶,如图5所示。

R = alkyl

$$R' = -CH_2CH_2CH_2CH_2-$$


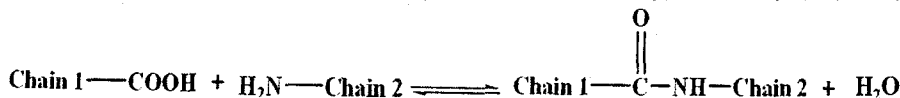
5

2.3 应激诱导交联

在一些所谓的应激条件,如高温、高湿度、减压或者光存在的条件下,明胶分子内部的一些氨基、羧基或者其它基团也有可能提供使得明胶发生自身交联的可能性。如上面所述,氨基可以发生自氧化脱氨基反应而生成醛基,而醛基则可以促使明胶发生交联。将明胶放置于高温条件下(105℃,减压条件),则可以使

得明胶变得只能溶胀而不能溶解,这种现象也被认为是明胶内部发生了自交联反应。

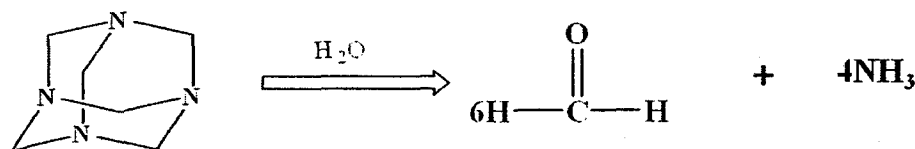
然而不同于上面所述的各种明胶老化交联的各种可能的机理,高温条件促使明胶发生交联而老化的机理则有可能是由于明胶中一条分子链中的羧基和相邻的另一条分子链中的或者同一条链段中的氨基发生了缩合反应脱水造成的^[1],反应示意如方程式(1):



明胶在减压条件下比在常压下溶解率降低,交联程度更高。根据上面方程式(1)所示,氨基和羧基的脱水缩合反应,当反应生成的水被除去(通过高温处理或者减压处理)时,平衡向正方向移动,这种分子内部或者分子间的缩合反应可以诱导交联反应的进一步发生,最后形成三维的空间网络,从而使其溶解率降低^[1,24]。

从以明胶作为胶囊壳层材料的软胶囊如二甲苯氧庚酸软胶囊等在高湿度条件下储存时可发现,明胶软胶囊在这种应激条件下有可能发生构象的变化或者交联反应,并发现这种

交联反应使得明胶软胶囊在溶解过程中形成一层可溶胀的、橡胶态的但不能溶解的膜, 这层不溶于水的明胶膜会成为囊内药物释放的阻力。研究还发现, 湿度在明胶交联过程中扮演的是一种间接催化剂的角色, 能够间接促进交联反应的中间产物亚胺的形成, 以进行下一步的交联反应。如作为药物赋形剂的玉米淀粉, 其中含有稳定剂环六亚甲基四胺, 而环六亚甲基四胺则可以在湿润条件下分解为氨和甲醛^[7] (如图 6), 而甲醛则可以诱导明胶分子交联。



(环六亚甲基四胺)

图 6

Clyde M. Ofner III^[23]等在实验中将普通的、未交联的明胶在 37℃、81% RH 条件下放置 21 周,并未发现明胶发生自交联反应,但是将湿度和高温或者加入色素等其它应激条件一起作用于明胶的时候,明胶会发生不同程度的交联,这可能是由于高湿度能够与其它应激条件起到协同作用。

一些胶囊剂中不可避免的会使用色素,而早在 1973 年某些色素就被发现可以和明胶作用而降低明胶的溶解率。这些色素通过非共价键的形式如离子键、氢键或者范德华力与明胶中的氨基或者羧基发生相互作用以使得明胶的溶解性下降^[25]。Gautam 和 Schott^[26]认为这些相互作用使得明胶的离子化和亲水性都降低,Murthy KS 等^[27]在实验中将一剂不溶于水的药物填入囊壳内,囊壳内含有色素 FD&C Red No. 3,将其放置于 30℃、80% RH 条件下,并照射荧光,60 分钟后只有 20% 的药物溶解。而当在室温、35% RH 条件下,并去掉荧光照射时,溶解率降低的现象就会减小,说明了湿度和光照对色素效应的促进作用。而有些色素如 FD&C Blue No. 1 则只在高湿度和荧光下才会使得明胶老化^[28]。

当然紫外照射也会使得明胶产生交联老化,而且与色素和高湿度条件的协同作用更好,其交联机理则被归结于紫外照射可以产生自由基从而引发后续交联效应,然而这种交联效应中参与的残基、组成、数量和交联度目前都还不是很清楚。

3 研究中存在的问题和发展趋势

通过上述对明胶的自发交联老化和应激诱导交联老化的类型和机理的研究发现,明胶老化过程中仍然存在着需要进一步研究和改进的地方。

目前不同的醛类和明胶直接的交联反应机理尚不清楚或完善,如戊二醛对明胶的交联反应同时存在着两种不同的机理:Molin 提出的 Schiff Base 机制以及 Richards 提出的 Mi-

chael 机理,甚至可能包含 12 种不同反应的 4 种交联反应类型^[23]。而甲醛引发的明胶的交联目前通过核磁证实的有精氨酸-精氨酸交联和赖氨酸-精氨酸交联,却没有发现甲醛引发的赖氨酸与赖氨酸之间形成的交联。所以有必要对不同醛类与明胶之间的交联机理进行进一步的研究。

对于国内发展日益迅速的明胶软胶囊中药制剂来说,研究明胶与囊壳中的增塑剂和稳定剂以及明胶和中药中各种成分之间的可能的交联反应可以作为中药软胶囊制剂研究的很好切入点。

另外,各种不同的加工,储存条件对明胶交联老化的诱导和促进作用也是明胶交联老化研究中不可忽视的一面。

总之,只有对各种不同的明胶交联老化反应的类型和机理以及各种可能存在的引发和加速明胶交联老化的因素进行全面系统研究,才可以对明胶或者明胶存在的环境尽可能的修饰和改善,从而从根本上解决明胶交联老化的问题。

4 结论

综上所述,由明胶作为胶囊囊壳主体材料的胶囊崩解迟缓问题的根本原因在于明胶自身的交联反应而导致的明胶老化现象。而明胶的交联反应和明胶分子中多肽链中的带有活性官能团的氨基酸息息相关,特别是活性较其它氨基酸更高的赖氨酸和精氨酸。赖氨酸上的 ϵ -氨基和精氨酸上的胍基基团都在明胶分子的交联反应中起着主要作用。在多数情况下,明胶的交联反应是由各种醛类诱导的赖氨酸上的 ϵ -氨基和精氨酸上的胍基基团相互之间的共价键结合而形成,其中也存在着明胶自身的 ϵ -氨基发生自氧化而生成醛基从而进一步与其它残基进行交联反应的情况。当然同时也可能有其它的交联反应类型存在,比如在高温条件下,明胶分子中可能发生分子内或者分子间的氨基与羧基的脱水反应而引

起的交联现象。除此之外,一些其它的外在条件如色素也可能通过非共价键的形式与明胶中的氨基或者羧基作用使明胶分子发生交联老化。总之,明胶的交联老化过程非常复杂,其中有很多地方也需要进一步研究和完善,所以在深入探索明胶交联老化的机理的同时,在实际应用中也应该综合考虑使用条件以采用适当的防老化措施。

参 考 文 献

- 1 Yannas IV, Tobolsky AV. *Nature* 1967 (215):509
- 2 Welz MM, Ofner CM. *J Pharm Sci* 1992 (81):85
- 3 Bessho M, Kojima T, Okuda S, Hara M. *Bull Chem Soc Jpn* 2007(80):979
- 4 Reich VG. *Pharm Ind* 1995(57):63
- 5 Sheehan JC, Hlavka JJ. *J Am Chem Soc* 1957(79):4528
- 6 Davis P, Tabor BE. *J Polymer Sci Part A General Papers* 1963(1):799
- 7 Digenis GA, Gold TB, Shah VP. *J Pharm Sci* 1994(83):915
- 8 Tomihata K, Ikada Y. *Tissue Eng* 1996(2):307
- 9 Bottom CB, Clark M, Carstensen JT. *J Pharm Sci* 1997(86):1057
- 10 Gold TB, Buice RG, Lodder RA, Digenis GA. *Pharm Dev Technol* 1998(3):209
- 11 Fan H, Dash AK. *Int J Pharm* 2001(213):103
- 12 Liang HC, Chang WH, Liang HF, Lee MH, Sung HW. *J Appl Polymer Sci* 2004(91):4017
- 13 史京京,王颖,王智慧,陈丽娟,彭必先. *明胶科学与技术* 2001(21):23
- 14 刘建平,马旭,翁凌骧. *Chinese Journal of Pharmaceuticals* 2005,36(2):81
- 15 Rampurna Prasad Gullapalli. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2010(99):4107
- 16 Fraenkel - Conrat H, Cooper M, Olcott HS. *J Am Chem Soc* 1945(67):950
- 17 Taylor SK, Davidson F, Ovenall DW. *Photogr Sci Eng* 1978(22):134
- 18 Albert K, Peters B, Bayer E, Treiber U, Zwilling M. *Z Naturforsch* 1986(41):351
- 19 Albert K, Bayer E, Worsching A, Vogele H. *Z Naturforsch* 1991(46):385
- 20 Gold TB, Smith SL, Digenis GA. *Pharm Dev Technol* 1996(1):21
- 21 Ofner CM, Zhang Y, Jobeck VC, Bowman BJ. *J Pharm Sci* 2001(90):79
- 22 阎天堂,刘孝恒. *感光材料* 1994(5):25
- 23 Clyde M, Ofner III, Yu - e Zhang, Valerie C. Jobeck, Bill J. Bowman. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2000(90):79
- 24 Yannas, I. V. *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. C* 1972(7):49
- 25 Cooper Jr. JW, Ansel HC, Cadwallader DE. *J Pharm Sci* 1973(62):1156
- 26 Gautam J, Schott H. *J Pharm Sci* 1994(83):922
- 27 Murthy KS, Enders NA, Fawzi MB. *Pharm Technol* 1989,13(3):72
- 28 Murthy KS, Reisch Jr. RG, Fawzi MB. *Pharm Technol* 1989,13(6):53

作者: [王晨](#), [杜茂波](#), [李爱玲](#), [刘淑芝](#), [邱东](#)
作者单位: [中国科学院化学研究所, 北京, 100080](#)
刊名: [明胶科学与技术](#)
英文刊名:
年, 卷(期): 2012(1)

参考文献 (28条)

1. [Yannas IV](#), [Tobolsky AV](#) [查看详情](#) 1967(215)
2. [Welz MM](#), [Ofner CM](#) [查看详情](#) 1992(81)
3. [Bessho M](#), [Kojima T](#), [Okuda S](#), [Hara M](#) [查看详情](#) 2007(80)
4. [Reich VG](#) [查看详情](#) 1995(57)
5. [Sheehan JC](#), [Hlavka JJ](#) [查看详情](#) 1957(79)
6. [Davis P](#), [Tabor BE](#) [查看详情](#) 1963(01)
7. [Digenis GA](#), [Gold TB](#), [Shah VP](#) [查看详情](#) 1994(83)
8. [Tomihata K](#), [Ikada Y](#) [查看详情](#) 1996(02)
9. [Bottom CB](#), [Clark M](#), [Carstensen JT](#) [查看详情](#) 1997(86)
10. [Gold TB](#), [Buice RG](#), [Lodder RA](#), [Digenis GA](#) [查看详情](#) 1998(03)
11. [Fan H](#), [Dash AK](#) [查看详情](#) 2001(213)
12. [Liang HC](#), [Chang WH](#), [Liang HF](#), [Lee MH](#), [Sung HW](#) [查看详情](#) 2004(91)
13. [史京京](#), [王颖](#), [王智慧](#), [陈丽娟](#), [彭必先](#) [查看详情](#) 2001(21)
14. [刘建平](#), [马旭](#), [翁凌骧](#) [查看详情](#) 2005(02)
15. [Rampurna Prasad Gullapalli](#) [查看详情](#) 2010(99)
16. [Fraenkel - Conrat H](#), [Cooper M](#), [Olcott HS](#) [查看详情](#) 1945(67)
17. [Taylor SK](#), [Davidson F](#), [Ovenall DW](#) [查看详情](#) 1978(22)
18. [Albert K](#), [Peters B](#), [Bayer E](#), [Treiber U](#), [Zwilling M](#) [查看详情](#) 1986(41)
19. [Albert K](#), [Bayer E](#), [Worsching A](#), [Vogele H](#) [查看详情](#) 1991(46)
20. [Gold TB](#), [Smith SL](#), [Digenis GA](#) [查看详情](#) 1996(01)
21. [Ofner CM](#), [Zhang Y](#), [Jobeck VC](#), [Bowman BJ](#) [查看详情](#) 2001(90)
22. [阎天堂](#), [刘孝恒](#) [查看详情](#) 1994(05)
23. [Clyde M](#), [Ofner III](#), [Yu - e Zhang](#), [Valerie C](#), [Jobeck](#), [Bill J](#), [Bowman](#) [查看详情](#) 2000(90)
24. [Yannas, I. V](#) [查看详情](#) 1972(07)
25. [Cooper Jr. JW](#), [Ansel HC](#), [Cadwallader DE](#) [查看详情](#) 1973(62)
26. [Gautam J](#), [Schott H](#) [查看详情](#) 1994(83)
27. [Murthy KS](#), [Enders NA](#), [Fawzi MB](#) [查看详情](#) 1989(03)
28. [Murthy KS](#), [Reiseh Jr. RG](#), [Fawzi MB](#) [查看详情](#) 1989(06)

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_mjkxyjj201201001.aspx