论著

文章编号:1000-5404(2009)18-1786-04

布洛芬包合物凝胶体外释药行为及体内药代动力学研究

李欣宇[1],朱照静[2],车坷科[3],王丽娟[4],吴 青[4] (重庆医科大学:[1]附属第一医院药剂科,[4]药学院药学教研室,重庆 400016;[2]重庆医药高等专科学校药学系,重庆 400030;[3]重庆市第三人民医院药剂科,重庆 400014)

摘 要:目的 制备布洛芬(ibuprofen, IBU)包合物原位凝胶,并考察体外释药行为和体内药代动力学特点。**方法** 用冷冻干燥法制备布洛芬-羟丙基-β-环糊精包合物,以泊洛沙姆P407及P188为基质制备温度敏感型原位凝胶,无膜溶出法考察包合物原位凝胶体外释药情况,新西兰白兔肌注布洛芬溶液及包合物原位凝胶,高效液相色谱法(HPLC)测定血药浓度,3P97软件计算药代动力学参数。**结果** 制得的包合物平均载药量10.24%,体外凝胶溶蚀及药物释放均符合零级动力学,与布洛芬溶液相比,布洛芬包合物原位凝胶能明显使t_{max}推迟,C_{max}降低,$t_{1/2}$延长,药时曲线下面积(AUC)显著增加。**结论** 布洛芬包合物原位凝胶体内和体外均具有缓释效果,可作为一种优良的缓释注射剂,更好地发挥布洛芬解热镇痛抗炎作用,同时也为开发难溶性药物的温度敏感原位凝胶提供了借鉴。

关键词: 布洛芬;包合物原位凝胶;泊洛沙姆;无膜溶出法;药代动力学
中图法分类号: R944.9;R969.1;R971.1 **文献标识码:** A

In vitro release behavior and *in vivo* pharmacokinetics of ibuprofen inclusion complex *in situ* gel

LI Xin-yu[1], ZHU Zhao-jing[2], CHE Ke-ke[3], WANG Li-juan[4], WU Qing[4] ([1]Department of Pharmacy, First Affiliated Hospital, [4]Teaching Section of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing 400016; [2]Department. of Pharmacy, Chongqing Medical and Pharmaceutical College, Chongqing 400030; [3]Department of Pharmacy, Third People's Hospital of Chongqing, Chongqing 400014, China)

Abstract: Objective To prepare thermosensitive *in situ* gel of ibuprofen (IBU) inclusion complex with poloxamer and evaluate its release behavior *in vitro* and *in vivo*. **Methods** The IBU inclusion complexes were prepared by lyopyilization. The poloxamer 407 and 188 were added as a base for the preparation of gel. The release of inclusion complex gel was evaluated by membraneless models. The pharmacokinetics was evaluated after intramuscular injecting IBU solution or IBU inclusion complex gel to New Zealand white rabbits. The drug concentrations in the plasma were measured by HPLC. **Results** The loading amount of IBU was 10.24%. The corrosion of gel and the release of IBU correspond to zero-order kinetics. Compared with IBU solution, the t_{max} and $t_{1/2}$ were prolonged and C_{max} was degraded while AUC was enhanced obviously. **Conclusion** The IBU inclusion complex gel is used as a good injection with sustained-release which can improve the analgesia and anti-inflammatory effect of ibuprofen. And our study builds up the foundation for the use of water-insoluble drug in thermosensitive *in situ* gel.

Key words: ibuprofen; inclusion complex *in situ* gel; poloxamer; membraneless models; pharmacokinetic

布洛芬(ibuprofen, IBU)是临床应用比较广泛的首个烷基苯丙酸非甾体抗炎药,常用于治疗类风湿性关节炎,但胃肠道不良反应较大,且生物半衰期较短,需频繁服药来维持治疗浓度,加重了胃肠反应,甚至导致胃肠出血。因此,开发布洛芬非口服缓释制剂十分必要。温度敏感原位凝胶(thermosensitive in situ gel),又称在位凝胶,由于不需要有机溶剂或共聚反应试剂,因而毒性很低,成为近年来研究的热点。该给药系统在储藏条件下是自由流动的液体,进入人体后由于环境温度升高而迅速发生相转变,形成半固体凝胶状,其中以非离子表面活性剂泊洛沙姆407(poloxamer 407, P407)为基质的原位凝胶研究最为成熟[1]。

布洛芬属于难溶性药物,而P407形成的凝胶属于亲水性凝胶,布洛芬在P407中无法溶解,达不到有效的载药量。常用的增溶方法为添加有机溶剂[2](如丙

作者简介:李欣宇,女,四川省遂宁市人,硕士研究生,药师,主要从事药物新剂型与新技术方面的研究。电话:(023)89012069,E-mail:xingyu510@163.com
通信作者:朱照静,E-mail:zhuzhaojing1962@163.com
收稿日期:2008-12-23;修回日期:2009-03-02

二醇,甲醇等),但有机溶剂的加入使凝胶的毒性增大。因此本研究采用羟丙基-β-环糊精包合技术提高布洛芬的溶解度。单用 P407 形成的凝胶缺乏一定硬度,本研究采用生物粘附材料海藻酸钠增强凝胶机械强度,最终制备出具有缓释效果的注射用布洛芬包合物温度敏感型原位凝胶。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　仪器　　X-射线衍射仪(Philips X'Pert,PW3040,重庆同泰粉体研究所),原子力显微镜(AFM · IPC-208B,重庆大学),Aglient1100 系列高效液相色谱仪,冷冻干燥机(LGJ25,军事医学科学院实验仪器厂),分析天平(METTLEROLEDO AB204-E),氮气吹干仪(BF2000 型,上海率纳科贸有限公司),超纯水机(Milli-Q Biocel A-10),高压蒸气灭菌锅(MLS3750,日本三洋)。

1.1.2　药品与试剂　　泊洛沙姆 407(pluronic®F127,P407,药用级,BASF 公司),泊洛沙姆 188(pluronic®F68,P188,药用级,BASF 公司),海藻酸钠(NF200M,药用级,FMC 公司),布洛芬(西南合成制药厂,批号 20070924),羟丙基-β-环糊精(HP-β-CyD,西安德立生物化工有限公司,注射级,平均相对分子质量 1 540,平均取代度 5.2),甲醇、乙腈(色谱纯),其余试剂均为分析纯。

1.1.3　实验动物　　6 只健康新西兰大白兔,体质量(2.25 ± 0.15)kg,购自重庆医科大学实验动物中心。

1.2　方法

1.2.1　IBU-HP-β-CyD 包合物原位凝胶的制备

1.2.1.1　IBU-HP-β-CyD 包合物的制备及鉴别　　制备方法:称取 IBU 0.43 g,无水乙醇 5 ml 溶解,称取 HP-β-CyD 3.0 g,蒸馏水 6.0 ml 溶解,40 ℃恒温,缓慢滴加布洛芬乙醇溶液,600 r/min 搅拌 4 h,0.45 μm 微孔滤膜过滤,滤液冷冻干燥(24 h 程序升温,起始温度 -35 ℃,结束温度 15 ℃),研磨,过 80 目筛。

鉴别:①X-射线衍射法。测定条件为 Cu-K α 辐射、管压 40 kV、管流 40 mA、2θ 角扫描范围 10° ~35°。②AFM 法。测定条件为钨丝探针(力常数0.06 N/m),扫描范围 10.5 nm × 10.5 nm,轻敲模式下成像,G3DR 软件处理数据。

1.2.1.2　IBU 包合物原位凝胶的制备　　参照文献[3]冷法制备:分别将不同质量浓度的海藻酸钠 0%、0.2%、0.3%、0.5%溶解于超纯水中,待完全溶解后与质量浓度 0.05% $CaCl_2$ 温和交联,再加入 P407 和 P188,质量浓度分别为 19% 和 6%,于 4 ℃冰箱冷藏 24 h,直至形成澄清溶液,温和搅拌下加入 1.2.1.1 中制得的 IBU-HP-β-CyD 包合物,质量体积浓度为 5%,静置,直至形成澄清溶液。根据海藻酸钠浓度从低到高分别制得 IBU 包合物原位凝胶的溶液 A、B、C、D。将溶液放入试管后在 37 ℃恒温水浴中放置 5 min,溶液转变为凝胶。

1.2.1.3　灭菌　　将 IBU 包合物原位凝胶装入西林瓶中,轧盖密封后 120 ℃热压灭菌 20 min[4]。

1.2.2　包合物原位凝胶体外溶蚀和药物释放度考察

1.2.2.1　HPLC 分析方法的建立　　色谱条件:Diamonsil 钻石 C_{18} 色谱柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μm),流动相:乙腈/0.1% 磷酸水溶液 =60/40,流速为 1.2 ml/min,进样量:10 μl,检测波长为 220 nm。

线性范围和精密度:配制 10、20、40、80、120 μg/ml 的 IBU 标准溶液,用高效液相色谱分析,绘制标准曲线。

1.2.2.2　无膜溶出法[5]考察凝胶溶蚀行为及药物释放行为

分别把 2 ml A、B、C、D 4 个处方的样品放入试管(W_0)中,迅速称量(W_1),37 ℃保存 0.5 h,轻轻加入 PBS 7.4 缓冲液 2 ml,保持凝胶表面不破损,放入 37 ℃恒温水浴振荡器 5 min 后,形成凝胶。开始振荡,速度 50 r/min,分别于 6、12、24、36、48、60 h 倾倒出上层溶液,立即擦干试管外壁,称量(W_t),补充 2 ml 缓冲液,继续恒温振荡,反复直到凝胶完全溶蚀,凝胶累积溶蚀率(%) = (W_1 - W_t)/(W_1 - W_0)。溶蚀液适当稀释后进行含量测定,计算药物累积释放度。

1.2.3　新西兰白兔肌注药代动力学研究

1.2.3.1　HPLC 分析方法的建立　　色谱条件:Diamonsil 钻石 C_{18} 柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μm),流动相:甲醇/0.05 mol/L 磷酸二氢钾水溶液 =70/30,流速为 1.0 ml/min,进样量:10 μl,柱温:30 ℃,检测波长:225 nm。

血浆样品的预处理及测定:取 0.3 ml 血浆于离心管中,加 20 μl 50 μg/ml 双氯芬酸钠内标溶液,涡旋 30 s,加入 0.6 ml 甲醇,涡旋振荡 2 min,15 000 r/min 离心 10 min,取上清液氮气吹干,100 μl 流动相复溶。

方法专属性:按上述色谱条件和血浆处理方法,测定空白血浆、加有 IBU 和内标的空白血浆和肌注 1 h 后的色谱图。

标准曲线和最低检测线:取空白血浆 0.3 ml,精密加入 20 μl 内标液及不同量的 IBU 储备液,使血浆样品 IBU 浓度分别为 1、2、3、5、10、20、30 μg/ml,随后按"血浆样品的预处理测定"方法操作,以样品峰面积与内标峰的比值 y(As/Ai)对血浆中样品的浓度(x)作线性回归。

精密度和回收率:精密量取不同浓度的 IBU 储备液,配制成高、中、低(3、10、30 μg/ml)3 个不同浓度的血浆样本各 5 份,按"血浆样品的预处理测定"方法操作,考察精密度和回收率。

1.2.3.2　体内药代动力学实验　　6 只新西兰大白兔,按随机数字表法分为 2 组,一组肌注 1 ml 0.5% IBU 水溶液,另一组肌注 1 ml 的 IBU 包合物原位凝胶(C 处方)。分别于 5、15、30、45 min、1、1.5、2、3、4、5、6、8、10 h 耳缘静脉取血 1 ml,低速离心机分离血浆(4 000 r/min,10 min)。分离后血浆按照 1.2.3.1 "血浆样品的预处理及测定"的要求操作,求得各个时间点的(As/Ai),计算各点的血药浓度。

采用 3P97 药代动力学软件对实验主数据进行各种药代动力学模型拟合。再分别用相对应的模型计算各组分数据的药代动力学参数及其标准偏差。

2　结果

2.1　IBU-HP-β-CyD 包合物原位凝胶的制备结果

制得的包合物平均载药量为 10.24%,溶解度(25 ℃)为 45.06×10^3 mg/L,是未包合前 804.6 倍。

X 射线衍射结果:IBU 在 2θ 角 12.19°、16.54°、17.62°、19.44°、20.11°、22.28°、24.55°有特征衍射峰;HP-β-CyD 无晶体结构,没有晶体的衍射峰,IBU 和 HP-β-CyD 物理混合物(物质的量比 1∶1)在 IBU 的 2θ 角的相应位置上出现特征衍射峰,但其强度明显降低。IBU-HP-β-CyD 在 IBU 的 2θ 角的相应位置上没有出现特征衍射峰,表明 IBU 已被包合。

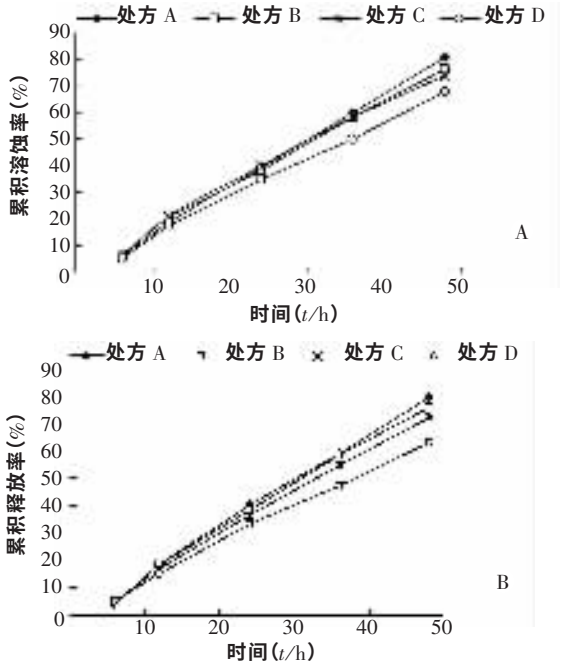
AFM 结果：HP-β-CyD 的外环直径为 1.53 nm，与 HP-β-CyD 中空圆筒外径（1.54 ± 0.04）nm 一致；布洛芬分子中的苯环直径为 0.62 nm，与 CyD 中空圆筒内径 0.60 ~ 0.65 nm匹配；苯环及其疏水端在 HP-β-CyD 的空穴内，其亲水端则位于空穴外，形成一分子 HP-β-CyD 包合一分子 IBU 的包合物。

最终制备出不同浓度海藻酸钠的 IBU 包合物原位凝胶的溶液（处方 A、B、C、D）。

2.2 包合物原位凝胶体外溶蚀和药物释放度考察

2.2.1 HPLC 方法结果 布洛芬的保留时间为 8.4 min，主峰与杂质峰分离度良好。结果显示，在 10 ~ 120 μg/ml 范围内线性关系良好，回归方程为：$y = 17.582x + 11.19$（$r^2 = 0.999\ 9$）。取 10、40、80 μg/ml 标准溶液重复进样 6 次，日内和日间变异分别为 0.53% 和 0.89%。

2.2.2 无膜溶出法实验结果 溶蚀率结果表明，IBU-HP-β-CyD 包合物原位凝胶的溶蚀行为符合零级动力学方程（A ~ D 处方的相关系数 r^2 分别为 0.999 5、0.996 6、0.990 4、0.996 3），海藻酸钠不改变凝胶零级溶蚀规律，但随海藻酸钠浓度增加，溶蚀速率减慢，48 h 时 A ~ D 处方的累积溶蚀率分别为 80.50%、76.12%、73.62%、67.94%（图 1A）。由释药率结果可知，布洛芬从 IBU-HP-β-CyD 包合物原位凝胶中的释放也符合零级动力学方程（A ~ D 处方的 r^2 分别为 0.996 4、0.995 8、0.997 8、0.997 0），海藻酸钠不改变药物零级释放的规律，随着海藻酸钠浓度的增加，释药速率减慢，48 h 时 A ~ D 处方的药物累积释放度分别为 79.83%、75.94%、72.27%、63.32%（图 1B）。

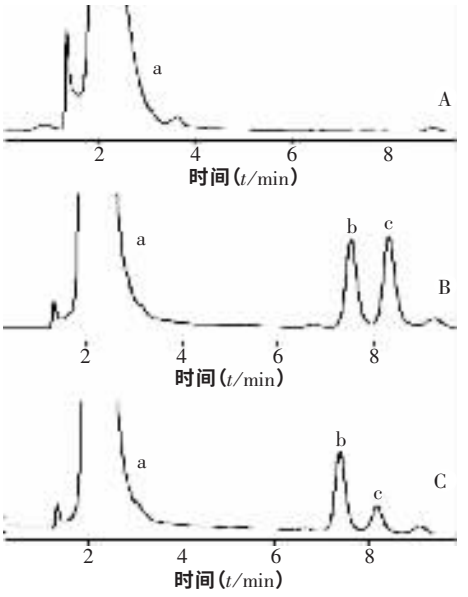


A：累积溶蚀率；B：累积释放率；处方 A：IBU-HP-β-CyD/P407/P188 =5%/19%/6%；处方 B：IBU-HP-β-CyD/P407/P188/海藻酸钠 = 5%/19%/6%/0.2%；处方 C：IBU-HP-β-CyD/P407/P188/海藻酸钠 = 5%/19%/6%/0.3%；处方 D：IBU-HP-β-CyD/P407/P188/海藻酸钠 =5%/19%/6%/0.5%

图 1 布洛芬包合物原位凝胶体外溶蚀和药物释放度实验结果

2.3 药代动力学实验结果

2.3.1 HPLC 方法结果 内标保留时间为 7.4 min，药物保留时间为 8.5 min，峰形较好，分离度 > 1.5，血浆中杂质不干扰测定。方法专属性实验结果见图 2。



A：空白血浆；B：外加内标和 IBU 的空白血浆；C：肌注包合物原位凝胶 1 h 后样品；a：血浆杂质峰；b：内标；c：IBU

图 2 空白血浆、加有 IBU 和内标的空白血浆和肌注 1 h 后的 HPLC 图谱

标准曲线方程为 $y = 0.076\ 1x + 0.031\ 1$，$r = 0.999\ 1$，线性范围：1 ~ 30 μg · ml^{-1}。在本系统条件下，最低检测线为 0.5 μg · ml^{-1}。日内、日间变异均小于 10%（3 个浓度的日内变异分别为 5.30%、2.24%、1.83%，日间变异分别为 9.17%、4.85%、5.01%），高、中、低 3 个浓度的提取回收率分别为 76.85%、89.46%、87.42%。表明本系统条件符合生物样品测定的要求。

2.3.2 药代动力学结果 药-时曲线见图 3。图 3 表明，IBU 水溶液组血药浓度迅速下降，而 IBU 包合物凝胶组血药浓度先达到 C_{max} 再逐渐降低。3P97 软件计算结果显示，IBU-HP-β-CyD 包合物原位凝胶组符合 Two-compartment Model with 1st Order absorption 模型，权重系数 $1/C^2$（$r^2 = 0.988$，最优拟合度为 0.31）。IBU 水溶液组符合 One-compartment Model with 1st Order absorption 模型，权重系数 1（$r^2 = 0.999\ 2$，最优拟合度为 0.22）。各组分数据结果见表 1。

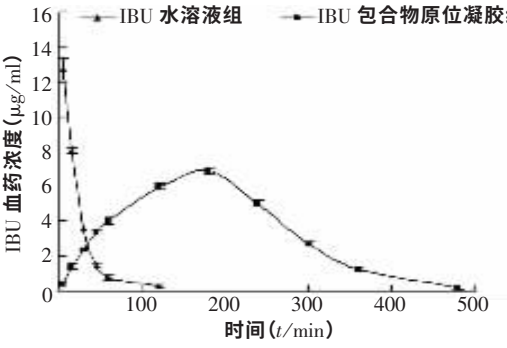


图 3 肌注 IBU 水溶液和 IBU-HP-β-CyD 包合物凝胶后的药-时曲线分析结果

表 1　肌注新西兰白兔后 IBU 水溶液和 IBU-HP-β-CyD 包合物凝胶的药代动力学参数（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

组别	C_{max}（μg·ml^{-1}）	t_{peak}（min）	$t_{1/2}$（min）	AUC_{0-t}（μg·min·ml^{-1}）	$AUC_{0-\infty}$（μg·min·ml^{-1}）	MRT（min）
IBU 水溶液组	13.75 ± 1.20	3.85 ± 0.86	0.97 ± 0.30	309.11 ± 12.18	319.08 ± 16.71	27.70 ± 3.22
IBU 包合物原位凝胶组	5.81 ± 0.65	101.77 ± 2.59	39.28 ± 4.72	1 619.13 ± 36.51	1 635.81 ± 48.29	187.49 ± 5.60

由表 1 可知,与 IBU 水溶液组相比,原位凝胶组 $t_{1/2}$ 延长,C_{max} 降低,MRT 延长,$AUC_{0-\infty}$ 增加,表明布洛芬包合物原位凝胶制剂达到了延迟药物释放,提高生物利用度的目的。以 $AUC_{0-\infty}$ 计算,包合物原位凝胶组是溶液组的 5.13 倍。

3　讨论

P407 凝胶是水性凝胶,在体内水性生理环境下逐渐溶蚀而缓慢释放药物。布洛芬 25 ℃时溶解度只有 56 mg/L,无法溶解于凝胶中。采用甲醇、丙二醇等做潜溶剂的方法会显著影响凝胶性质且毒性增大,因此采用安全方便的方法提高布洛芬溶解度至关重要。羟丙基-β-环糊精是一种新型的包合材料,具有水溶性极好、局部刺激性和溶血性低等优点,是注射剂的良好载体。通过羟丙基-β-环糊精的包合,布洛芬溶解度显著提高。

单纯 P407 原位凝胶强度不高,粘附力差,易被体液溶蚀,局部滞留时间短。目前文献报道多采用生物粘附性材料如羟丙甲基纤维素[2]、聚卡波非[6]、卡波姆[3]等提高凝胶强度。海藻酸钠是一种天然亲水性多糖,毒性低,生物相容性好,能与二价阳离子形成三维立体网状结构提高凝胶强度,其本身具有一定粘性,可延长凝胶在注射部位的滞留时间,减少凝胶溶蚀,延缓药物释放。注射用原位凝胶制剂的灭菌方法不能改变药物性质及凝胶本身特性。实验采用流通蒸汽灭菌法,灭菌前样品被密封于西林瓶中,以保证灭菌的有效性和均一性。灭菌后测定了其胶凝温度,无明显改变。

IBU-HP-β-CyD 包合物原位凝胶的溶蚀行为符合零级动力学方程,海藻酸钠不改变凝胶零级溶蚀规律,但随海藻酸钠浓度增加,溶蚀速率减慢。泊洛沙姆凝胶的溶蚀是水分子进入凝胶内部结构引起的,内部结构越紧密,水分子越难进入,其溶蚀速率也就越慢,海藻酸钠浓度的增加导致凝胶内部结构紧密性增强,从而减慢凝胶的溶蚀。布洛芬从原位凝胶中的释放也符合零级动力学方程,海藻酸钠不改变药物零级释放的规律,随着海藻酸钠浓度的增加,释药速率减慢。药物的累积释放度随着凝胶累积溶蚀率的增加而增加,二者之间具有线性关系,表明布洛芬的释放受凝胶溶蚀的控制。

无膜溶出法(membraneless models)是研究原位凝胶溶蚀行为最常用的方法,其优点在于能模拟凝胶在体内水性环境下逐渐溶蚀的过程且操作简单。预实验比较了无膜溶出法和透析袋法[7]在考察药物释放行为上的不同:对累积释放率 Q 和时间进行 Higuchi 方程拟合,得到方程为 $y=0.226\ 9x-0.063\ 4$,$r^2=0.994\ 6$,表明药物释放行为符合 Higuchi 方程。这提示原位凝胶体外溶蚀及药物释放动力学与选择的方法密切相关。

包合物原位凝胶的生物利用度显著提高的原因在于:①布洛芬在水溶液中溶解度有限,而其 HP-β-CyD 包合物在水溶液溶解度很高;②凝胶注射后于注射部位蓄积,形成药物“贮库”,随体液而缓慢溶蚀释放 IBU,进一步发挥缓释作用;③海藻酸钠增强了凝胶的机械强度,使凝胶被体液溶蚀的速率减慢。

IBU-HP-β-CyD 包合物原位凝胶克服了口服布洛芬制剂带来的胃肠道不良反应,缓释效果显著,是一种极具潜力的注射用缓释制剂。

参考文献:

[1] Dumortier G, Grossiord J L, Agnely F, *et al*. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics[J]. Pharm Res, 2006, 23(12): 2709 - 2728.

[2] Koffi A A, Agnely F, Ponchel G, *et al*. Modulation of the rheological and mucoadhesive properties of thermosensitive poloxamer-based hydrogels intended for the rectal administration of quinine[J]. Eur J Pharm Sci, 2006, 27(4): 328 - 335.

[3] Qi H, Chen W, Huang C, *et al*. Development of a poloxamer analogs/carbopol-based in situ gelling and mucoadhesive ophthalmic delivery system for puerarin[J]. Int J Pharm, 2007, 337(1-2): 178 - 187.

[4] Dimitrova E, Bogdanova S, Mitcheva M, *et al*. Development of model aqueous ophthalmic solution of indomethacin[J]. Drug Dev Ind Pharm, 2000, 26(12): 1297 - 1301.

[5] 吴　青, 朱照静, 李欣宇, 等. 地塞米松磷酸钠温度敏感原位凝胶的体外释药特性[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(22): 2142 - 2145.

[6] Tirnaksiz F, Robinson J R. Rheological, mucoadhesive and release properties of pluronic F-127 gel and pluronic F-127/polycarbophil mixed gel systems[J]. Pharmazie, 2005, 60(7): 518 - 523.

[7] Erem B, Yasemin C, Murat S, *et al*. Thermosensitive mucoadhesive gel formulation loaded with 5-Fu: cyclodextrin complex for HPV-induced cervical cancer[J]. J Incl Phenom Macrocycl Chem, 2007, 57(1 - 4): 363 - 370.

（编辑　栾　嘉）