技术与方法 文章编号:0253-3626(2009)12-1704-05

均匀设计法优选布洛芬缓释原位凝胶剂处方及释药性质的研究

王丽娟,朱照静,吴 青,马俐丽
(重庆医科大学药学院药剂教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:用均匀设计法筛选布洛芬缓释原位凝胶剂处方,考察不同处方的凝胶溶蚀和药物释放行为。方法:冷法制备原位凝胶,单因素考察布洛芬-羟丙基-β-环糊精包和物和辅料对胶凝温度($T_{sol-gel}$)的影响,均匀设计法优化 P407 和 P188 浓度,无膜溶出法考察凝胶溶蚀行为,高效液相色谱法对溶蚀液进行定量分析。结果:海藻酸钠随浓度的增大可使 $T_{sol-gel}$ 降低,优化后 P407/P188=19%/5%,凝胶溶蚀和药物累积释放与时间均呈零级动力学。结论:均匀设计法适合用于筛选 P407 和 P188 浓度,制得的原位凝胶具有缓释效果。

【关键词】均匀设计;泊洛沙姆;原位凝胶;海藻酸钠;无膜溶出
【中国图书分类法分类号】R944.5 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-06-27

Optimization of ibuprofen slowly-released in situ gel by uniform design and studies of release behavior

WANG Li-juan, et al
(*Department of Pharmaceutics, College of Pharmacy, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To optimize the formula of ibuprofen slowly-released in situ gels and investigate the corrosion of gels and the release of the ibuprofen from the gels. *Methods*: The in situ gels were prepared by cold method. The effects of IBU-HP-β-CyD and sodium alginate on gelatination temperature ($T_{sol-gel}$) were investigated. The concentration of P407 and P188 were optimized by uniform design and the corrosion behavior of gels was studied by membraneless model. The fluid of the corrosion was quantitatively analyzed by HPLC. *Results*: The $T_{sol-gel}$ was degraded with the increase of sodium alginate. The optimized concentration of P407/P188 was 19%/5%. The corrosion of gels and the release of the ibuprofen fitted zero-order kinetics. *Conclusion*: Uniform design is fit to optimize the concentration of P407 and P188. The gels meet the requirement of sustained-release preparation.

【Key words】Uniform design; Poloxamer; In situ gel; Sodium alginate; Membraneless model

温度敏感型原位凝胶是近年来出现的一种新型给药系统,具有室温或室温下呈液态,体温时形成凝胶的特点,其中以泊洛沙姆 407 为基质的原位凝胶研究最广泛。普通注射剂在给药后迅速达到有效血药浓度,不具备缓释特征,而泊洛沙姆凝胶能在注射部位形成"贮库"而缓慢释放,达到延长药物的滞留和释放时间,稳定血药浓度的目的。单纯使用泊洛沙姆 407 形成的凝胶强度和生物粘附性达不到应用要求,因此外加生物粘附性高分子材料—海藻酸钠来提高凝胶强度和粘附性。

布洛芬是临床应用比较广泛的首个烷基苯丙酸非甾体抗炎药,对于风湿性、类风湿性关节炎、各种中度疼痛及炎症、发热等疾病具有确切疗效。但布洛芬是水不溶性药物,在原位凝胶中溶解度很低,采用羟丙基-β-环糊精为包合材料制成的布洛芬-羟丙基-β-环糊精包合物能克服布洛芬原型药物溶解度低的缺点。

本文通过均匀设计法对注射用布洛芬-羟丙基-β-环糊精包合物缓释原位凝胶剂处方进行了优化,并对优化处方进行凝胶溶蚀行为和药物释放度的考察。

1 仪器与试药

电子天平(METTLEROLEDO AB204-E),高效液相色谱

作者介绍:王丽娟(1984-),女,硕士,
研究方向:药物新剂型和新技术。
通讯作者:朱照静,男,教授,E-mail:zhuzhaojing1962@163.com。

仪（Aglient1100 系列），紫外分光光度计，恒温磁力搅拌器（郑州长城科工贸有限公司），超纯水机，布洛芬－羟丙基－β－环糊精包和物（IBU-HP-β-CyD，自制，平均载药量为 10.24%），泊洛沙姆 407（Pluronic® F127，P407，德国 BASF 公司），泊洛沙姆 188（Pluronic® F68，P188，德国 BASF 公司），海藻酸钠 NF200M（美国 FMC 公司），甲醇，乙腈（色谱纯），磷酸（分析纯），其余试剂为分析纯。

2 试验方法和结果

2.1 布洛芬缓释原位凝胶的制备方法

冷法[1]制备，具体过程为：将处方量 P407 和 P188 溶解于超纯水中（如果体系中含有其它高分子材料，则先将高分子材料溶解于超纯水中，待完全溶解后再加入 P407 和 P188），于 4℃冰箱冷藏 24 h，直至形成澄清溶液，温和搅拌条件下加入处方量的 IBU-HP-β-CyD 包合物，静置直至形成澄清溶液。

2.2 IBU-HP-β-CyD 包合物对原位凝胶 $T_{sol-gel}$ 的影响

按照 2.1 项下方法制备不同载药量（0、1、5、10 mg/ml）的原位凝胶，取凝胶 2 ml 至西林瓶，放入水浴中，缓慢升温，升温速率 0.2℃/0.5 min，每升高 0.2℃，迅速将西林瓶倾斜 90°，观察瓶中液体流动情况。不再流动时的温度视为胶凝温度。从表 1 可以看出 IBU-HP-β-CyD 在 10%（w/v）内对 $T_{sol-gel}$ 影响不大。

2.3 海藻酸钠对原位凝胶 $T_{sol-gel}$ 的影响

按照 2.1 项下方法制备海藻酸钠含量不同（0、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%）的原位凝胶，用 2.2 项下方法测定 $T_{sol-gel}$。从表 2 可以看出随着海藻酸钠浓度的升高，$T_{sol-gel}$ 呈下降趋势且这种趋势具有统计学意义（$F=27.25>F_{0.05}$，$P<0.05$）。从实验制备过程中看，当海藻酸钠浓度＞0.5%时，其自身粘度很大，影响原位凝胶低温时流动性好的特点。

2.4 均匀设计法优选处方[2]

泊洛沙姆 P407/P188 浓度和比例是影响原位凝胶性质最主要的因素，由于其水平数较多，一般的实验设计次数太多，本课题采用均匀设计表 $U6^{(4)}$ 安排实验，选取 P407 和 P188 各 6 个水平，实验安排见表 3。按 2.2 项下方法测定每个处方的 $T_{sol-gel}$，结果见表 4。

根据上表的数据，用 SPSS13.0 软件进行二次方程的拟合和统计学分析。拟和回归方程为：$y=a_0+a_1x_1+a_2x_2+a_3x_1^2+a_4x_2^2$，其中 y 是胶凝温度，$x_1$ 是 P407 浓度，x_2 是 P188 浓度，a_0~a_4 为参数。拟合结果见表 5，方差分析见表 6。

回归方程为 $y=173.66-1\ 241.07x_1+60.71x_2+2\ 462.285x_1^2+160.72x_2^2$（$r_2=0.974$）。由回归方程可以看出，随着 P407 浓度的增大，胶凝温度逐渐降低，随着 P188 浓度的增加，胶凝温度逐渐升高，且 P407 对胶凝温度的影响大于 P188。

表 1 IBU-HP-β-CyD 包合物对原位凝胶 $T_{sol-gel}$ 影响（$n=3$）

载药量(mg/g)	1	2	3	平均 $T_{sol-gel}$（℃，$\bar{x}\pm s$）
0	29.6	29.2	29.6	29.47 ± 0.23
10	29.4	29.2	29.2	29.27 ± 0.12
20	29.2	29.4	29.6	29.40 ± 0.20
50	28.8	29.0	29.4	29.07 ± 0.31
100	28.2	29.2	29.0	28.80 ± 0.53

表 2 海藻酸钠对原位凝胶 $T_{sol-gel}$ 影响（$n=3$）

海藻酸钠浓度(g/ml)	$T_{sol-gel}$（℃）	RSD%
0	23.6	1.47%
0.10%	23.2	0.86%
0.20%	23.1	0.50%
0.30%	23.2	0.00%
0.40%	22.5	0.51%
0.50%	22.0	0.91%

表 3 $U6^{(4)}$ 均匀设计因素水平表（D=0.187 5）[3]

处方序号	P407 浓度(w/w)	P188 浓度(w/w)
JA	18%	4%
JB	19%	10%
JC	20%	2%
JD	21%	8%
JE	22%	0%
JF	23%	6%

2.5 回归方程的验证

为了验证得到的回归方程是否具有准确的预测性，选取20%/3%、21%/8%、23%/10% 3 个处方，比较回归方程计算的 $T_{sol-gel}$ 与 2.1 项下方法实际测得的 $T_{sol-gel}$ 是否吻合（表 7）。

结果表明，回归方程计算的 $T_{sol-gel}$ 与 2.1.1 项下方法实际测得的 $T_{sol-gel}$ 接近，回归方程能准确地预测凝胶的 $T_{sol-gel}$。

2.6 P407/P188 浓度的选择

为了更直观地看出 P407/P188 影响 $T_{sol-gel}$ 的变化规律，根据均匀设计实验结果，采用 Origin75 软件绘制 P407 浓度、P188 浓度和 $T_{sol-gel}$ 之间的三维立体图（图 1）及其等高线图（图 2），在图中寻找 $T_{sol-gel}$ 在 30℃左右的 P407/P188 浓度，并根据回归方程计算其准确 $T_{sol-gel}$，为确定处方做依据。

由图 1、2 可以看出，18%/2%、19%/5%、20%/8%3 个浓度的胶凝温度比较合适，均在 30℃左右，经回归方程计算，3 个处方的胶凝温度分别为 31.3℃、30.3℃、29.8℃。泊洛沙姆浓度越低，其溶蚀行为越快，而浓度越高，其低温下可注射不好，因此选择较为适中的浓度 19%/5%作为最佳处方。

2.7 凝胶溶蚀和药物释放度考察

2.7.1 色谱条件 Diamonsil 钻石 C18 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 222 nm。布洛芬的保留时间为 8.4 min，主峰与杂质峰分离度良好。

2.7.2 线性范围和精密度 精密称取 IBU 50 mg 于 50 ml 容量瓶中，用无水乙醇溶解，配制成 1 mg/ml 的 IBU 储备液。分别取储备液 0.1、0.2、0.4、0.8、1.2 ml 至 10 ml 容量瓶中，PBS 7.4 缓冲盐稀释至刻度，记录色谱图。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，日内和日间峰面积的 RSD 分别为 3.22%、0.77%、0.61%和 3.65%、0.89%、0.76%，符合方法学要求。

2.7.3 无膜溶出法考察不同浓度海藻酸钠原位凝胶溶蚀及药物释放行为 把 2 g 样品放入试管（W0）中，迅速称重（W1），37℃保存 0.5 h，待溶液完全形成凝胶后，轻轻加入 PBS7.4 缓冲液 2 ml，保持凝胶表面不破损，放入 37℃ ± 0.5℃ 恒温水浴振荡器中，振荡速度为 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，称重（Wt），补充 2 ml 缓冲液，继续恒温振荡，反复直到凝胶完全溶蚀，按照公式 1 计算凝胶累积溶蚀百分率 Q'（%），溶蚀液至于 65℃烘箱内烘干，5 ml PBS7.4 复溶，经 0.45 μm 微孔滤膜过滤，直接或适当稀释后进高效液相色谱进行含量测定，并按照公式 2 计算药物累积释放百分率 Q（%）。以溶蚀或释药时间为横坐标，Q'或 Q 为纵坐标绘制释放曲线图，结果见图 3、4。

$$Q'(\%)=(W1-Wt)/(W1-W0) \quad \text{公式 1}$$

$$Q(\%)=(A-11.19)/17.582\times n/1\,000/x \quad \text{公式 2}$$

A：样品的峰面积；n：样品稀释倍数；x：样品中药物的含量。

3 讨 论

以泊洛沙姆 P407 和 P188 为基质的原位凝胶属于亲水性凝胶，在体内水性生理环境下逐渐溶蚀而缓慢释放药物，而布洛芬是疏水性药物（25℃时溶解度为 56 mg/L），无法溶解于凝胶中。现有的文献采用加甲醇[4]，丙二醇等[5]方法，但有机溶剂的加入显著影响凝胶性质且毒性增大。羟丙基-β-环糊精（Hydroxypropyl-β-cyclodextrin，HP-β-CyD）是一种新型的包合材料，具有水溶性极好，毒性小等特点，

表 4 $U6^{(4)}$均匀设计结果（n=6）

处方序号	1	2	3	$T_{sol-gel}$（℃，$\bar{x}\pm s$）
JA	33.4	33.4	33.4	33.40 ± 0.00
JB	33.6	34.2	34.0	33.93 ± 0.22
JC	23.8	24.2	24.2	24.07 ± 0.18
JD	29.0	28.6	28.8	28.80 ± 0.13
JE	20.8	20.2	20.4	20.47 ± 0.22
JF	22.4	21.6	22.6	22.20 ± 0.40

表 5 参数估计表

参数	估计值	标准误差	95% 置信区间	
			下限值	上限值
a_0	173.664	164.935	-1 922.029	2 269.358
a_1	-1 241.071	1 611.244	-21 713.869	1 9231.727
a_2	60.714	101.418	-1 227.929	1 349.358
a_3	2 464.285	3 927.917	-47 444.633	52 373.203
a_4	160.715	981.980	-12 316.523	12 637.952

表 6 方差分析表

方差来源	平方和	自由度	均方差
回归	4 583.79	5	916.76
残差	4.32	1	4.32
未修正总误差平方和	4 588.11	6	
修正总误差平方和	165.38	5	

R^2 =1- 残差平方和/修正总误差平方和 = 0.974

表 7 回归方程的验证

处方(P407/P188)	回归方程计算的 $T_{sol-gel}$	实际测得的 $T_{sol-gel}$
20%/3%	25.9℃	25.4℃
21%/8%	27.5℃	27.2℃
23%/10%	26.1℃	25.6℃

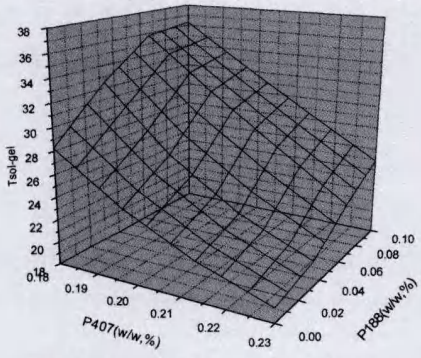


图 1 P407/P188/$T_{sol-gel}$ 关系的三维立体图

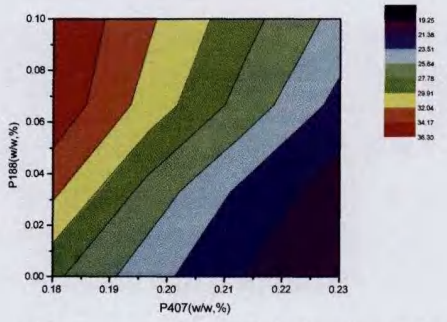


图 2 P407/P188/$T_{sol-gel}$ 关系的等高线图

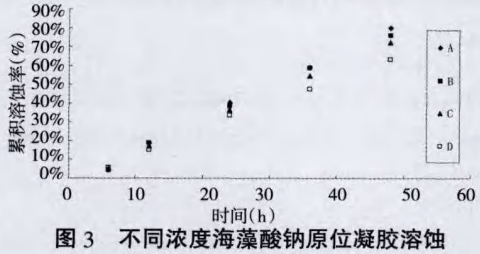


图 3 不同浓度海藻酸钠原位凝胶溶蚀时间-累积溶蚀百分率图

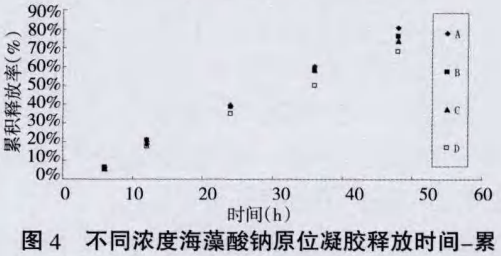


图 4 不同浓度海藻酸钠原位凝胶释放时间-累积释药百分率图

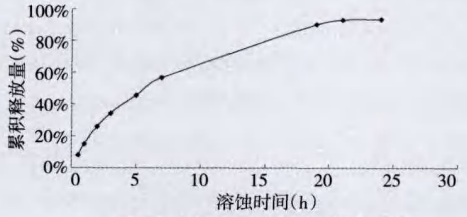


图 5 透析袋法考察药物释放

有文献报道其肾毒性很低，通过对布洛芬的包合，其水中溶解显著提高，不借助于其他有机溶剂就能达到有效载药量。采用包合的另外原因是溶解度过小的药物溶出行为不理想，达不到有效血药浓度，经过包合后，药物溶出速度加快，生物利用度提高。HP-β-CyD 包合药物的方法为制备水溶性差药物的原位凝胶制剂提供了参考。

均匀设计(Uniform design)是将数论与多元统计相结合，在正交设计的基础上提出来的一种试验次数少、成本低且不失一般性的试验设计方法。其特点是只考虑试验点在试验范围内“均匀分散”，忽略“整齐可比”。均匀设计要求安排的试验次数为因素所取水平数，因此可以适当增加因素所取的水平数，而不必担心由此导致的像正交设计那样试验次数呈平方增加。对 P407 和 P188 各取 6 个水平进行试验，如果按正交设计至少需要 36 次试验，而均匀设计只需 6 次，因此均匀设计比较适合用于筛选 P407 和 P188 浓度。通过均匀设计，以 P407 和 P188 浓度对 $T_{sol-gel}$ 进行非线性拟和，回归方程的 r^2 为 0.999，说明回归方程可以用于 $T_{sol-gel}$ 的预测，验证试验同时显示预测值与实测值误差很小。

P407 的原位凝胶本身存在一些缺点[6]，如易被体液溶蚀，局部滞留时间短；凝胶强度不高；对粘膜粘附力差，易发生流动，难以在局部形成较高浓度等，因而限制了其广泛应用。生物粘附性材料如海藻酸钠[7]可提高凝胶的生物粘附力和凝胶强度，其具体机理尚未明确，可能是由于温度升高，海藻酸钠上的本来水合化的甲氧取代基发生失水，导致聚合物之间作用力增强，产生较强的生物粘附力。通过不同浓度海藻酸钠对胶凝温度的考察可以看出随着海藻酸钠浓度增大，$T_{sol-gel}$ 逐渐降低，证明海藻酸钠的存在对泊洛沙姆分子间作用力确实有一定影响。

无膜溶出法[8]是研究原位凝胶溶蚀行为最常用方法，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。预实验也采用透析袋法[9]考察药物释放行为，具体方法为：将含有 2 g 样品的透析袋放入带盖玻璃容器中，溶出介质为 200 ml PBS 7.4 缓冲液，水浴温度保持 37℃±0.5℃，磁力搅拌速度为 50 r/min，在不同的时间间隔，迅速收集 5 ml 溶出液，并以相同体积的溶出介质补充，收集的样品进 HPLC 分析，按照公式 2 计算累积释放百分率 Q(%)。图 5 为处方 IBU-HP-β-CyD/P407/P188/海藻酸钠=5%/19%/5%/0.3%用透析袋法测得的释放曲线，对累积释放率和时间进行 Higuchi 方程拟和，得到方程为 $y=0.226\,9x-0.063\,4$，$r^2=0.994\,6$。方法不同得到的释放行为不一致，提示应该根据具体的给药途径选择不同的考察方法。

从图 3 可以看出，加海藻酸钠与不加海藻酸钠的泊洛沙姆凝胶的溶蚀行为均符合零级释放动力学（A、B、C、D 4 个处方的相关系数 r 分别为 0.999 5、0.996 6、0.990 4、0.996 3），即凝胶溶蚀重量与时间呈线性相关。海藻酸钠的加入不改变原位凝胶零级溶蚀的规律，但随海藻酸钠浓度的增加，溶蚀速率减慢（48 h A、B、C、D 4 个处方的累积溶蚀率分别为 80.50%、76.12%、73.62%、67.94%）。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，海藻酸钠是一种天然的亲水性多糖，能与二价阳离子形成三维立体网状结构提高凝胶强度，其本身有的一定粘性可延长凝胶在注射部位的滞留时间，从而延缓药物释放。随着海藻酸钠浓度的增加，泊洛沙姆凝胶内部结构更加紧密，从而进一步减慢溶蚀。

图 4 表明了 IBU-HP-β-CyD 包合物原位凝胶的释药行为也符合零级动力学方程，海藻酸钠的加入不改变药物零级释放的规律（A、B、C、D 4 个处方的相关系数 r 分别为 0.996 4、0.995 8、0.997 8、0.997 0），但随着海藻酸钠浓度的增加，释药速率减慢（48 h A、B、C、D 4 个处方的药物累积释放度分别为 79.83%，75.94%，72.27%，63.32%）。这表明释药速度是由凝胶溶蚀决定的。药物的累积释放度随着凝胶累积溶蚀率的增加而增加，说明二者之间具有相关性。

4 结 论

与其他实验设计方法相比，均匀设计法在 P407 和 P188 浓度筛选过程中实验次更少，体外溶蚀及释放实验表明凝胶的溶蚀符合零级释放动力学，体外具有一定缓释效果。

参 考 文 献

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

[2] 郭东星，仇丽霞，张满栋.均匀设计方法及其应用[J].数理医药学杂志，2005，18(1)：69-71.

[3] 方开泰. 均匀设计与均匀设计表[M]. 北京：科学出版社，1994.69.

[4] 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.

[5] 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]. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2006, 27(4): 328-335.

[6] Gariepy E R, Leroux J C. In situ-forming hydrogels-review of temperature-sensitive system[J]. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2004, 58(2): 409-426.

[7] Liu Z D, Li J W, Nie S F, et al. Study of an alginate/HPMC-based in situ gelling ophthalmic delivery system for gatifloxacin [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2006, 315(1-2): 12-17.

[8] Liu Y, Lu W L. Controlled delivery of recombinant hirudin based on thermo-sensitive Pluronic F127 hydrogel for subcuntaneous administration: In vitro and in vivo characterization[J] Journal of Controlled Release, 2007, 117(3): 387-395.

[9] Bilensoy E, Crpanl1 Y, Sen M, et al. Thermosensitive mucoadhesive gel formulation loaded with 5-Fu: cyclodextrin complex for HPV-induced cervical cancer [J]. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 2007, 57(1-4): 363-370.

（责任编辑：冉明会）