

可注射参麦温度敏感型原位凝胶的制剂学评价

项佳音¹, 熊欣^{1,2}, 陈燕军^{1*}

(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 江西中医学院, 南昌 330004)

[摘要] 目的: 制备可注射用参麦温度敏感型原位凝胶制剂, 并考察其体外释放特性。方法: 采用冷溶法制备参麦温度敏感型原位凝胶制剂, HPLC 测定人参皂苷 Rb₁ 含量, 以透析法研究参麦温度敏感型原位凝胶的体外释放特性, 并利用药物释放模型方程拟合释放曲线。结果: 参麦温度敏感型原位凝胶的胶凝温度 34.92 ℃, 相应黏度 1 579.52 mPa·s, 胶凝时间 110.67 s。随温度升高, 该原位凝胶由牛顿流体转变为假塑性流体, 其体外释放行为符合一级动力学方程。结论: 参麦温度敏感型原位凝胶具有温敏特性及明显的缓释作用。

[关键词] 可注射温度敏感型原位凝胶; 参麦提取物; 胶凝温度; 流变学特性; 体外释放

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)13-0060-05

Pharmaceutical Evaluation of Injectable Shenmai Temperature-sensitive in Situ Gel

XU Jia-yin¹, XIONG Xin^{1,2}, CHEN Yan-jun^{1*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;
2. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare injectable Shenmai thermosensitive in situ gel and to investigate its *in vitro* release characteristics. **Method:** Shenmai thermosensitive in situ gel was prepared by cold dissolution method, the content of ginsenoside Rb₁ was determined by HPLC, *in vitro* release characteristics of Shenmai thermosensitive in situ gel was investigated by dialysis method, and release curve was fitted by drug release model equation. **Result:** Gelation temperature was 34.92 ℃, corresponding viscosity value was 1 579.52 mPa·s, gelation time was 110.67 s. This in situ gel showed a newtonian fluid at a low temperature while it might be a pseudoplastic fluid when the temperature reached a certain point, *in vitro* release of Shenmai thermosensitive in situ gel fitted first order kinetics equation. **Conclusion:** Shenmai thermosensitive in situ gel had temperature sensitivity and obviously sustained-release effect.

[Key words] injectable thermosensitive in situ gel; Shenmai extract; gelation temperature; rheological properties; *in vitro* release

温度敏感型原位凝胶是一类对环境温度刺激具有响应的高分子材料, 亦是一种新型的给药传递系统。该系统在低温低浓度条件下以液体形态存在, 当环境温度达到临界胶束温度 (CMT) 且温度敏感

型原位凝胶基质浓度达到临界胶束浓度 (CMC) 时, 迅速发生相突变, 在给药部位形成半固体凝胶态, 达到局部给药后药物在给药部位滞留时间延长的目的^[1]。植入剂是一类经手术切开植入或采用特制注射器导入皮下或其他靶向部位的给药系统。具有延长药物作用时间、避免首过效应、患者依从性强等特点。

参麦注射液处方源自李东垣《内外伤辨惑论》“生脉散”, 由红参、麦冬组成, 具益气固脱、养阴生津、生脉之功效, 用于治疗气阴两虚型之冠心病、病

[收稿日期] 20120327(009)

[第一作者] 项佳音, 硕士, 从事中药药剂研究, Tel: 010-84036059, E-mail: free_kind896@yahoo.com.cn

[通讯作者] * 陈燕军, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 从事中药新型给药系统研究, Tel: 010-84036059, E-mail: ivyeyj@163.com

毒性心肌炎等。人参皂苷是其有效成分之一,具有抗炎、加强机体器官抗应激能力、调节和促进机体免疫功能等作用^[2-5]。根据参麦注射液的药理作用及人参皂苷的水溶性好、刺激性小等特点,适合将其制备成温度敏感型原位凝胶。本文以实验室自制的温度敏感型原位凝胶为载体,参麦提取物为模型药,制成参麦温度敏感型原位凝胶,考察其胶凝温度、稳态黏度、体外释放等特性,并对其释药机制进行初步探讨,以期对骨关节炎患者的治疗及中药缓控释制剂的研究提供理论依据和参考。

1 材料

参麦温度敏感型原位凝胶(实验室自制),参麦提取物(实验室自制),人参皂苷 Rb₁ 对照品(批号 110754-200320,中国药品生物制品检定所),泊洛沙姆 407、泊洛沙姆 188(德国 BASF),其余试剂均为分析纯。

BSA224S-CW 型电子天平(赛多利斯科学仪器北京有限公司),B23-2 型恒温磁力搅拌器(上海司乐仪器有限公司),PHS-25 型数显 pH 计(上海虹益仪器有限公司),1200 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),DV-II 型可编程控制式粘度计(美国 BrookField 公司),TC-502 型恒温水浴箱(美国 BrookField 公司),NSKY-100C 型恒温培养振荡器(上海苏坤实业有限公司),透析袋(相对分子质量 7 000,北京拜耳迪生物技术有限公司),TGL-16G 型离心机(上海安亭科学仪器厂),MX-S 型可调式混匀仪(京君龙实验仪器北京有限公司)。

2 方法与结果

2.1 参麦提取物的制备^[6] 将本实验室自制红参提取液与麦冬提取液混合均匀,浓缩,真空干燥,称重,计算得率。结果表明参麦提取物得率 15.29%,即每克浸膏含生药量 6.54 g。

2.2 温度敏感型原位凝胶的制备^[7] 采用冷溶法配制含泊洛沙姆 407(P407)及泊洛沙姆 188(P188)的凝胶溶液。称取一定量 P407 及 P188,加入一定量注射用水,搅拌均匀,4 ℃ 冷藏过夜至充分溶胀分散均匀,即得。

2.3 人参皂苷 Rb₁ 的含量测定

2.3.1 色谱条件 Kromasil-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0~30 min,29%~33%A),检测波长 203 nm,柱温 30 ℃,流速 1.0 mL·min⁻¹,进样量 100 μL。

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取人参皂苷 Rb₁ 0.01 g,加 70% 甲醇定容至 10 mL 量瓶中,摇匀,

备用,得 1 g·L⁻¹ 的对照品储备液。

2.3.3 供试品溶液的制备 按处方比例制备含药温敏凝胶 1.00 g,加 70% 甲醇定容至 50 mL,混合均匀,超声 15 min,过 0.22 μm 微孔滤膜,即得。

2.3.4 线性范围的测定 精密移取人参皂苷 Rb₁ 储备液(质量浓度为 1 g·L⁻¹),分别配制成质量浓度为 0.10,0.25,0.50,1.00,2.00,3.00,10.00 mg·L⁻¹ 的对照品溶液。在上述色谱条件下测定,以人参皂苷 Rb₁ 含量为横坐标,人参皂苷 Rb₁ 峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。得回归方程为 $Y = 294.47X - 0.402$ ($r = 0.9998$)。人参皂苷 Rb₁ 在 0.01~1.00 μg 与峰面积线性关系良好。

2.3.5 样品测定 精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 100 μL,分别注入液相色谱仪,按上述色谱条件测定。

2.3.6 专属性考察 取自制不含药的空白样品,按 2.3.3 项下方法制备,按上述色谱条件测定。见图 1。

2.3.7 精密度考察 精密吸取同一对照品溶液,按上述色谱条件连续测定 6 次,结果人参皂苷 Rb₁ 的 RSD 0.26%,表明仪器性能稳定。

2.3.8 重复性考察 按供试品溶液制备方法,平行制备 6 份供试品溶液,每份溶液连续测定 2 次。结果 RSD 2.11%,说明该制备方法重复性良好。

2.3.9 稳定性考察 取同一供试品溶液,于 0,2,4,6,10,24 h 点测定,结果 RSD 1.54%,说明供试品在 24 h 内稳定。

2.3.10 加样回收率考察 分别称取 6 份含药温度敏感型原位凝胶 0.5 g,各加入 3.0 mg·L⁻¹ 的人参皂苷 Rb₁ 对照品溶液 1.0 mL,其他步骤按供试品溶液制备方法制备。结果测得样品的平均回收率为 109.42%,RSD 4.95%,说明该制备方法准确度高。

2.4 参麦温度敏感型原位凝胶性质考察

2.4.1 胶凝温度和胶凝时间的测定 取适量参麦温度敏感型原位凝胶,使其在常温(25 ℃)水浴下充分稳定,并在选定的升温区间内匀速升温,测定胶凝温度和胶凝时间。将黏度变化自突变至平衡所对应的时间定义为胶凝时间,将黏度突变时所对应的温度定义为胶凝温度,绘制黏度-温度曲线(图 2)。结果胶凝温度 34.92 ℃,相应黏度 1579.52 mPa·s,胶凝时间为 110.67 s。

2.4.2 流变学特性的考察 取适量参麦温度敏感型原位凝胶,分别于 25,27,29,31,33,35,37 ℃ 时进行黏度-剪切速率的测定,绘制凝胶溶液在不同温度

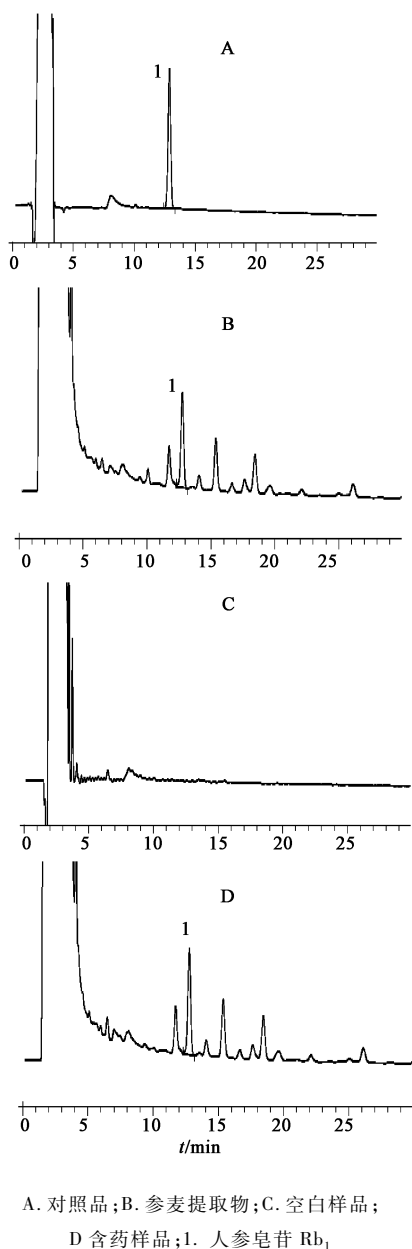


图 1 可注射用参麦温度敏感型原位凝胶 HPLC

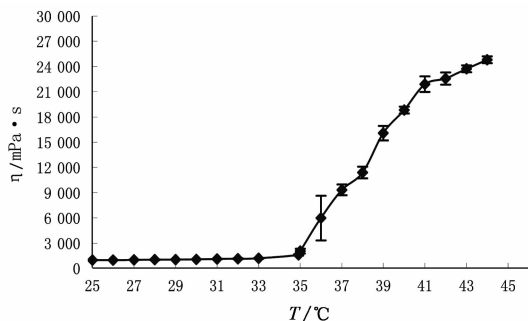


图 2 参麦温度敏感型原位凝胶黏度/温度变化曲线 ($n=3$)

时黏度随剪切速率的变化曲线(图 3)。

由图 3 结果可知,参麦温度敏感型原位凝胶在 25,27,29 °C 时,其黏度均不随剪切速率的变化而发

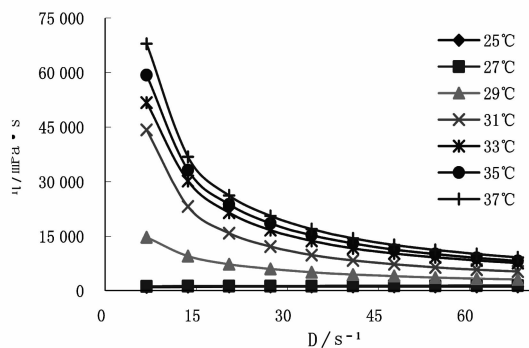


图 3 载药凝胶不同温度时的剪切速率-黏度曲线

生改变,说明在低温条件下($T < 30\text{ }^{\circ}\text{C}$)样品呈现出牛顿流体特征;在 31,33,35,37 °C 时,样品黏度随剪切速率的提高而呈下降趋势,说明在此温度范围内样品表现出假塑性流体特征,此时凝胶态已形成。这一特性有利于药物在关节腔注射过程中延长药物滞留时间。

2.4.3 黏度复原性试验 测定参麦温度敏感型原位凝胶经多次升温后其黏度随温度变化的曲线^[8]。将该载药凝胶样品溶液进行 1 次黏度-温度曲线测定后,置于 4 °C 内至完全溶胶化,再次测定其黏度-温度曲线。重复以上步骤得多次升温黏度-温度曲线($n=3$,图 4)。

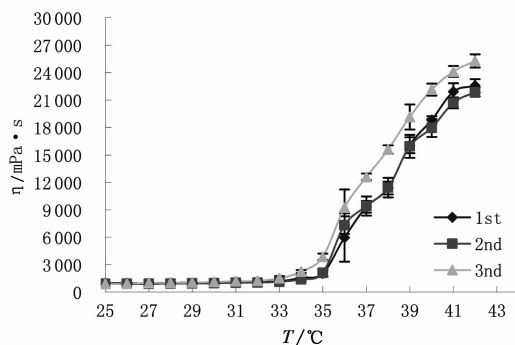


图 4 载药凝胶多次升温后黏度-温度变化曲线($\bar{x} \pm s$)

由图 4 可知,多次升温后载药凝胶的黏度恢复性良好,推测当给以样品充分的平衡时间后,经反复升温对其性质影响不大。

2.4.4 稳定性试验 将 3 批次实验室自制参麦温度敏感型原位凝胶,密封,于室温、干燥、阴暗处储存。分别于 0,1,2,3 月取出样品,对其稳定性进行考察。测定样品含量,将样品溶液分别于 25,37 °C 条件下放置 15 min,离心($2\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$),观察是否分层等不稳定现象。结果显示,参麦温度敏感型原位凝胶在 25 °C (相对湿度 75%) 条件下,1~3 月相对含量分别为 95.46%,94.89%,89.83%。即呈下降趋势,在 3 月时含量减少较多。该载药凝胶溶

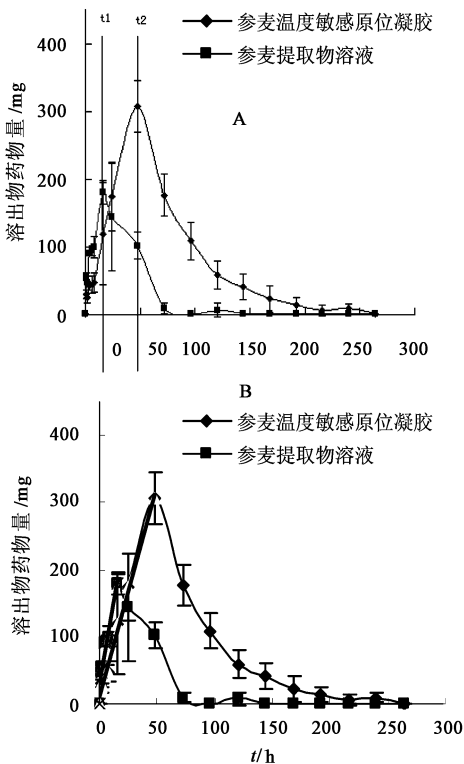
液在 25,37 °C 条件下经离心未发生分层现象,说明该制剂在此条件初步稳定。

2.5 参麦温度敏感原位释药特性的考察

2.5.1 累积释放曲线的比较 采用透析法对释放度进行测定。分别取自制参麦温度敏感型原位凝胶及参麦提取物溶液各 1.0 g 置于透析袋中,两端封口,放置于盛有磷酸缓冲溶液(PBS,pH 7.4)25 mL 的具塞三角瓶中,密塞,置于(37 ± 0.5) °C 水浴中,以 50 r·min⁻¹ 速度搅拌,分别于 0,1,2,4,6,8,16,24,48,72,96,120,144,168,192,216,240,264 h 取出全部释放介质,同时补充相同温度相同体积新鲜接收液,过 0.22 μm 微孔滤膜,HPLC 测定人参皂苷 Rb₁ 含量。按照下列公式计算不同时间点的累积释放率(Q_n),比较参麦温度敏感型原位凝胶与参麦提取物溶液的体外释放特性。结果见图 5,6。

$$Q_n = \frac{C_n \times [V_2 - (n-1)V_1] + (C_{n-1} + \dots + C_2 + C_1) \times V_1}{L} \times 100\%$$

式中 Q_n 为第 n 点的累积释放率;C_n 为各时间点取样浓度;L 为载药凝胶药物释放总量;V₁ 为各时间点固定取样体积;V₂ 为释放介质体积。



A. 达峰时间;B. 释药速率
图 5 溶出液药物含量-时间曲线($\bar{x} \pm s$)

由图 5 可知,参麦提取物溶出液药物含量达峰时间为 t₁(16 h),释药曲线在 0~16 h 其斜率(释药

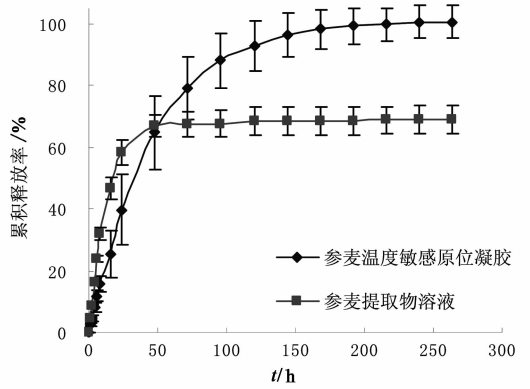


图 6 参麦温度敏感型原位凝胶与参麦提取物体外释放曲线($\bar{x} \pm s$)

速率)为 9.66;参麦温度敏感原位凝胶溶出液药物含量达峰时间为 t₂(48 h),释药曲线在 0~48 h 其斜率为 6.26。因此缓释制剂较普通制剂释药缓慢。

由图 9 可知,参麦温度敏感原位凝胶释药平稳,2 h 累积释放率 4.63%,24 h 内累积释放率 39.65%,48 h 累积释放率 64.78%,168 h 累积释放率 98.19%。参麦提取物溶液体外释放 2 h 累积释放率 8.63%,24 h 累积释放率 58.51%,48 h 累积释放率 66.83%,且 48 h 以后累积释放率在 70% 左右。结果说明缓释制剂的释药时间较普通制剂长,在 0~48 h 内缓释制剂的累计释放率较普通制剂低,48 h 后缓释制剂随时间延长能够达到完全释放,呈现限速释药过程;普通制剂在 2 h 时累积释放率接近 10%,在 48~264 h 其累积释放率均为 70% 左右,呈现不完全释放现象,说明药物释放的累积释放率未能达到 10% 且低于定量限以下。原因可能是温度敏感基质的加入,使其与参麦提取物中的成分发生空间结构的改变,呈现限速释放的现象。综上所述,在规定的释放介质中,参麦温敏凝胶与相应参麦提取物水溶液比较,能缓慢地且按时间变化非恒速释放药物,可减少给药频率。参麦温度敏感原位凝胶较参麦提取物溶液表现出明显的缓释特征且能达到完全释放。

2.5.2 体外释放数据拟合及原位凝胶释药机制的初步探讨 根据上述释放度测定结果,以零级动力学方程、一级动力学方程、Weibull 方程、Higuchi 方程、Niebergull 方程和 Hixson-Crowell 方程分别对含药温敏凝胶及原料药的体外释放进行曲线拟合,并通过 Ritger-Pappas 方程计算释放参数 n 以判断释药机理,当 0.45 < n < 0.89 时,药物释放为异常扩散,即药物释放为扩散和溶蚀的协同作用;当 n > 0.89 时,药物释放机制为非 Fick 扩散,即骨架溶蚀;当

$n < 0.45$ 时, 药物释放机制为 Fick 扩散, 即溶剂的扩散。求出曲线方程, 以相关系数 (r) 判断其拟合程度, 其中 Q 为累积释放率, 结果见表 1。

表 1 参麦温度敏感型原位凝胶体外释放方程拟合

模型	拟合方程	r
Zero order	$Q = 0.722 1t + 10.668 2$	0.955 5
First order	$\ln(1 - Q) = -0.022 6t + 4.624 8$	0.999 6
Weibull	$\ln[1/(1 - Q)] = 0.596 4\ln t - 5.318 0$	0.872 1
Higuchi	$Q = 9.255 8t^{1/2} - 6.812 3$	0.990 9
Ritger - Pappas	$\ln Q = 0.748 5\ln t + 1.092 6$	0.994 1
Niebergull	$(1 - Q)^{1/2} = -0.059 3t + 9.601 1$	0.987 0
Hixson - Crowell	$(1 - Q)^{1/3} = -0.022 3t + 4.549 9$	0.994 4

由表 1 结果可知, 一级方程拟合的 r 最大, 说明该方程能够很好地描述参麦温度敏感型原位凝胶中人参皂苷 Rb_1 的体外释放特征, 即释药特点是按时间变化先多后少的非恒速释药, 符合缓释系统的要求。Ritger-Pappas 方程扩散指数 $n = 0.748 5$, 说明药物释放机制为扩散和骨架溶蚀(药物溶出)的协同作用, 由此可见, 当人参皂苷 Rb_1 在 37 ℃ 形成具有一定强度的凝胶, 故在溶出的过程中伴随着骨架溶蚀。

3 讨论

人参皂苷 Rb_1 在温度敏感原位凝胶高分子聚合物体系中, 其释放形式为扩散和骨架溶蚀的协同作用, 可能与温度敏感型基质的性质、原料的性质、制备工艺有关。

温度敏感型原位凝胶作为智能化载体材料, 在用于局部注射给药时, 较参麦注射液更具在给药部位形成半固体凝胶态的药物储库、给药定位性强、可提高药物的局部血药浓度等特点, 其次具有温敏特性, 使用方便, 并且短时间内达到相转变以减少患者用药痛苦。但单独使用 1 种温敏型载体材料时, 其不具备理想的胶凝特性, 同时可能带来因提高浓度

而引发的安全性问题。本研究采用 2 种温度敏感型原位凝胶载体相混合的方法以改善制剂的胶凝特性, 从而符合临床使用要求。

体外评价不能完全代表温度敏感型原位凝胶在体内的过程, 在使用温敏材料制备缓释制剂时, 药物释放速率主要与温敏材料的浓度、凝胶与关节腔体液的接触面积、体液的分泌量及关节活动所产生的剪切作用有关^[1]。因此, 关于对载药温度敏感型原位凝胶在人体关节腔内的释放速率的控制, 有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] 李欣宇, 肖磊, 朱照静. 地塞米松磷酸钠温度敏感原位凝胶释药与溶蚀行为的影响因素考察[J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30(2): 142.
- [2] 郭伟文, 夏雄智, 邓崇礼. 参麦注射液关节腔注射对兔骨关节炎细胞因子影响的实验研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2010, 18(7): 11.
- [3] 潘海乐, 曲波, 王耶. 参麦注射液对内关节模型动物关节液中白细胞介素-1 水平的影响[J]. 中华风湿病学杂志, 2000, 4(2): 106.
- [4] 夏雄智, 许学猛, 黄海英. 参麦针注射配合小针刀治疗膝骨性关节炎的临床观察[J]. 国际医药卫生导报, 2008, 14(2): 24.
- [5] 温振杰, 陈亮. 参麦注射液关节腔注射治疗膝骨性关节炎疗效观察[J]. 陕西中医, 2010, 31(8): 992.
- [6] 中华人民共和国卫生部药品标准 WS3-B-3428-98[S]. 参麦注射液: 170.
- [7] 陈燕军, 李璐, 刘华凤, 等. 注射用肿节风提取物温度敏感原位凝胶制备及体外释药评析[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(20): 2586.
- [8] 胡杰, 陈大为, 全东琴. 泊洛沙姆 407 水溶液的流变学性质[J]. 药学报 2011, 46(2): 227.

[责任编辑 全燕]