

盐酸博安霉素注射用温度敏感原位凝胶的研究

丁维明, 李 眉, 李桂玲*, 许鸿章, 陈汝贤

(中国医学科学院、北京协和医学院医药生物技术研究所, 北京 100050)

摘要: 本文以泊洛沙姆 F127 为主要基质材料, 复合使用泊洛沙姆 F68 和高分子材料羟丙基甲基纤维素 K4M, 制备盐酸博安霉素注射用温度敏感原位凝胶。对凝胶的胶凝温度、流变学、质构特性、电镜结构和体外释放等性能进行了研究, 并考察了该制剂在大鼠体内的药代动力学。结果表明, 制备的盐酸博安霉素注射用温度敏感原位凝胶在常温下为流动的液体, 在人体温度下能够发生相转变, 成为具有一定胶凝强度的半固体, 方便注射给药, 胶凝后呈现三维网状空间结构, 药物的扩散和凝胶材料的溶蚀为控制药物释放的主要因素。该制剂具有明显的缓释作用, 在大鼠体内可以持续释放 48 h 以上。

关键词: 盐酸博安霉素; 温度敏感原位凝胶; 胶凝温度; 流变学; 质构特性; 药代动力学

中图分类号: R943.4

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 06-0727-06

Thermosensitive *in situ* gel of boanmycin hydrochloride for injection

DING Wei-ming, LI Mei, LI Gui-ling*, XU Hong-zhang, CHEN Ru-xian

(Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: Poloxamer F127, poloxamer F68 and hydroxypropyl methylcellulose K4M were used to prepare the thermosensitive *in situ* gel of boanmycin hydrochloride for injection. Its gelation temperature, rheological behavior, texture characteristics, scanning electron microscopy, *in vitro* and *in vivo* drug release were evaluated. These results showed that the formulation was a fluid solution at room temperature, which could become semisolid at the temperature of 37 °C, and the thermally induced sol-gel transition allowed to be injectable and *in situ* setting. The formulation was constructed into a tridimensional network at gelation temperature. The drug release was controlled by the diffusion of the drug and the erosion of the gelmatrix. The pharmacokinetics indicated that the drug could be released slowly for up to 48 hours after subcutaneous administration in rats.

Key words: boanmycin hydrochloride; thermosensitive *in situ* gel; gelation temperature; rheology; texture; pharmacokinetics

注射用原位凝胶制剂是近年来缓控释型注射剂领域的研究新热点^[1-4]。它是将药物和聚合物溶于适宜的溶剂中, 局部注射后聚合物在给药部位的生理条件下凝固而形成凝胶型半固体药物贮库。原位凝胶克服了微乳、脂质体、微球和胶束不稳定的缺点, 同

时, 独特的溶液-凝胶转变性质还赋予其制备工艺简单、给药方便、在用药部位滞留时间长和良好的控制释药性。

盐酸博安霉素 (boanmycin) 为中国医学科学院医药生物技术研究所首创开发的具有自主知识产权的新抗肿瘤抗生素, 属于博来霉素族中的一员。其盐酸盐原料药和注射用粉针剂已于 2004 年通过国家药品监督管理局审批, 获得国家一类新药证书和生产批文。盐酸博安霉素的抗癌谱比较广, 对颈部、鳞癌、肝癌、胃癌和结肠癌等多种癌症都有疗效, 对人体免

收稿日期: 2011-03-31.

基金项目: 国家“重大新药创制”综合性新药研究开发技术大平台资助项目 (2009ZX09301-003-8-2); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (IMBF200802).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-63150697, E-mail: liguilin1999@163.com

疫系统和骨骼造血系统无损害, 它的肺毒性明显低于博来霉素族中的其他同类产品^[5]。盐酸博安霉素半衰期短, 消除时间快。临床试验显示, 肌肉注射博安霉素后, 药物迅速进入组织, 5 min 即可测得血药浓度, 平均血药浓度在用药后 19 min 左右达高峰, 4 h 后降至为零^[6, 7]。

为了延长盐酸博安霉素的作用时间, 提高治疗效果, 在本研究中采用温度敏感型的非离子表面活性剂泊洛沙姆 F127 为主要基质材料, 配合使用一些其他高分子材料, 将盐酸博安霉素制备成注射用原位凝胶制剂。对该处方的胶凝温度、流变学、质构特性和体外释放等性能进行了研究, 并考察了该制剂在大鼠体内的药代动力学性质。

材料与方法

仪器 RCT basic 加热磁力搅拌器 (IKA, 德国); DV-II+数显黏度计, R/S+流变仪, CT3 质构分析仪 (Brookfield, 美国); S-4800 扫描电子显微镜 (Hitachi, 日本); ZRS-4 智能溶出试验仪 (天津大学无线电厂); UV-2450 紫外检测器 (岛津, 日本); 高效液相色谱仪 (LC Solution, 岛津, 日本)。

材料 泊洛沙姆 F127, 泊洛沙姆 F68 (BASF, 德国); 羟丙基甲基纤维素 K4M (卡乐康, 上海); 盐酸博安霉素 (中国医学科学院医药生物技术研究所)。

动物 SD 大鼠, 雄性, 体重 (220 ± 10) g, 由北京大学医学部动物部提供。

注射用温度敏感原位凝胶的制备 取盐酸博安霉素适量, 制备成浓度约为 1 mg·mL⁻¹ 的水溶液, 依次加入泊洛沙姆 F127, 泊洛沙姆 F68 和羟丙基甲基纤维素 K4M, 使其质量分数分别为 20%、1.2% 和 0.3%, 充分搅拌, 分散均匀, 将制备的溶液放入 4 °C 冰箱中溶胀 24 h, 得到透明均一的溶液。

胶凝温度的测定 采用转子法测定胶凝温度^[8]。磁性转子 (1.5 cm × 0.6 cm), 搅拌速率 100 r·min⁻¹, 样品从 20 °C 开始升温, 升温速度约 0.5 °C·min⁻¹, 磁性转子完全停止转动时的温度即为胶凝温度。

流变学性质考察 采用 Brookfield R/S+流变仪测定, 利用与流变仪接触的循环水浴控温。分别考察 25 °C 和 37 °C 恒温条件下剪切速率的变化对样品黏度的影响 (第 1 步, 2 min 剪切速率由 0 到 200 s⁻¹; 第 2 步, 2 min 剪切速率由 200 到 0 s⁻¹)。

再将样品从 25 °C 升温至 40 °C, 升温时间 20 min, 固定剪切速率 5 s⁻¹, 考察样品黏度随温度变化的曲线^[9]。

质构特性的考察 将样品放在 34 °C 恒温水浴中, 使其胶凝。稳定 30 min 后采用 CT3 质构分析仪测定其胶凝强度和黏附性能^[10]。测定条件如下: 探头模具为 TA5; 触发点负载 0.2 g; 预测试速度 2 mm·s⁻¹; 测试速度 0.5 mm·s⁻¹; 返回速度 0.5 mm·s⁻¹; 穿透距离 10 mm。

电镜扫描 采用扫描电子显微镜观察处方胶凝前后的空间结构^[11]。

体外释放度考察 为了更好的模拟药物的体内释放行为, 体外释放度采用了透析袋法和无膜释放法两种方法来进行考察^[12, 13]。

透析袋法 精密称取 5.0 mL 原位凝胶于自制的溶出小杯中, 底端采用透析袋封口, 进行体外释放实验。释放介质为 pH 7.2 磷酸盐缓冲液 (PBS) 100 mL, 循环水温控制在 (37.0 ± 0.1) °C, 转速为 100 r·min⁻¹, 分别于一定的时间取样 5 mL, 并及时补充等温度及等量的释放介质。取出的释放溶液经孔径 0.45 μm 滤膜过滤, 用 UV 法测定, 按以下公式计算累积释放百分率 (Q):

$$Q = (C_n \times 100 + \sum_{i=1}^{n-1} C_i \times 5) / A \times 100\%$$

C_n 为第 n 个取样点测得的药物浓度 (μg·mL⁻¹), C_i 为第 i 个取样点测得的药物浓度 (μg·mL⁻¹), A 为 5 mL 原位凝胶中的药物总量。

无膜释放法 取制剂 10 mL, 置于预先已称重的平底带塞玻璃管中, 将该玻璃管置于 37 °C 的控温摇床中预热 10 min, 使溶液完全胶凝, 加入 37 °C 的 PBS (pH 7.2) 5 mL 作为释放介质, 在 50 r·min⁻¹ 的转速下震荡, 每隔一段时间, 倾出全部释放介质, 将玻璃管外壁擦干净, 称重并记录, 然后重新放入控温摇床中, 补充 37 °C 的释放介质 5 mL, 如此反复操作, 直至实验结束, 相邻时间点的样品重量差异即为此期间凝胶溶蚀量。在考察凝胶溶蚀的同时测定药物释放度。将每次溶蚀实验得到的释放液全部转移至 25 mL 量瓶中, 用 pH 7.2 的 PBS 稀释至刻度, 在 292 nm 处测定吸收度值, 计算药物浓度, 并计算累积释放百分率。

药代动力学研究 ① HPLC 色谱条件: 色谱柱: ODS C₁₈, (5 μm, 4.6 mm × 250 mm, Agilent, USA); 流动相: 以己烷磺酸钠溶液 (取己烷磺酸钠 7.53 g 与乙二胺四醋酸二钠 3.72 g, 加冰醋酸 4.50 mL, 使溶解并稀释至 1 L, 用氨溶液调节 pH 值至 4.30) 为流动相 (A); 以甲醇-乙腈 (7 : 3) 为流动相 (B), A : B =

60:40; 流速: $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 检测波长: 254 nm; 进样体积: $20\text{ }\mu\text{L}$; 柱温: 室温。② 血浆样品处理: 精密吸取血浆样品 $150\text{ }\mu\text{L}$, 加 20% (w/v) 三氯乙酸溶液 $150\text{ }\mu\text{L}$, 涡旋混合 3 min, $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min。③ 方法学考察结果符合生物样品分析规范的有关要求: 方法专属性良好, 空白血浆对盐酸博安霉素主峰无干扰; 盐酸博安霉素在 $0.26\sim 15.6\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内浓度与峰面积呈线性关系 ($Y=4\,391.3C-699.98$, $r=0.999\,3$); 日内精密度 RSD 为 3.1%, 日间精密度 RSD 为 4.6%; 回收率为 106.7%; ④ 实验动物采用 SD 雄性大鼠^[9]。将大鼠随机分为两组, 实验前禁食 12 h, 自由饮水, 分别皮下注射博安霉素注射液和盐酸博安霉素注射用温度敏感原位凝胶 0.5 mL (含盐酸博安霉素 5 mg)。分别于给药后 0.15、0.5、1.0、2、4、6、8、12、24、36、48 和 72 h 从大鼠眼眶后静脉丛取血 0.5 mL 至肝素化具塞玻璃试管中, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下冷冻备用。⑤ 数据处理: 用 DAS 药代动力学软件计算相应的药代动力学参数。

结果与讨论

1 胶凝温度考察

温度敏感型原位凝胶的特点是在室温下为自由流动液体, 体温条件下转变为半固体凝胶, 因此胶凝温度的考察是处方研究的最主要的指标之一。胶凝温度的测定方法, 文献^[8]报道多采用转子法。缓慢的升温速率、均匀的热传导是保证测定结果准确、精密的重要因素。因此, 所有测定均在恒定的升温速率、相同的玻璃容器并保持转子转速、形状及大小一致的条件下进行。

除特殊情况外, 人体正常生理温度在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右, 为确保在人体温度下胶凝, 本文将处方胶凝温度设定在 $(35\pm 2)\text{ }^{\circ}\text{C}$ 内。经考察, 制备的样品胶凝温度为 $(34.9\pm 0.4)\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($n=3$)。

2 流变学特征

处方在 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下黏度随着剪切速率的变化曲线见图 1 和图 2。由图可见, 处方在 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 黏度随着剪切速率的增加而略有增大, 具有切稠作用, 为胀流型流体, 而在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 黏度随着剪切速率的增加而减小, 具有切稀作用, 为假塑型流体。在两种温度下都具有非触变性, 在剪切停止后会完全恢复。一般认为温敏型原位凝胶的胶凝行为是胶束形成并相互作用的结果, 处方在 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 与 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 具有不同的流变学性质, 可能是因为在环境温度低于相转变温度

时, 体系中胶束浓度相对较低, 增加剪切力可使胶束之间相互碰撞聚集增强, 因而黏度增大。随着温度的升高, 达到相转变温度时, 胶束浓度达到临界体积分数, 胶束之间紧密堆积并缠结, 增加剪切速率可以破坏聚集胶束之间的结构, 摩擦力减小, 从而使黏度下降。

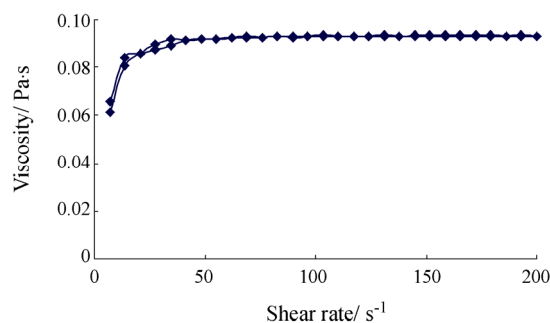


Figure 1 Viscosity-shear rate profiles of the formulations ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$)

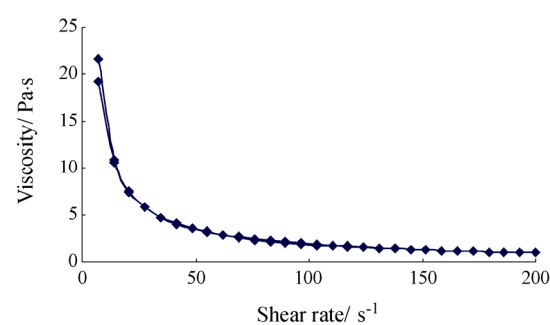


Figure 2 Viscosity-shear rate profiles of the formulations ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$)

处方由 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 升温至 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, 其温度-黏度曲线见图 3。由图可见, 处方黏度随温度变化的曲线呈现 S 形。在 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下, 处方黏度较小, 呈现出液态特性, 黏度随着温度的升高缓慢增大。随着温度的继续升高, 在某一个临界温度黏度开始急剧增大, 出现突跃, 而流动性显著下降, 发生溶液-凝胶相转变过程, 转化成凝胶后黏度明显提高, 显示固态特征。之后, 黏度继续小幅度增大, 并逐渐趋于平稳。

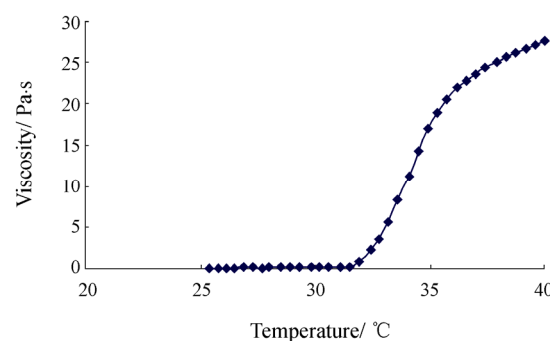


Figure 3 Viscosity-temperature of the formulation

3 质构特性

处方的质构特性考察结果见图 4 和表 1。测定参数定义如下: 硬度: 第 1 个压缩循环的正峰峰值; 凝胶强度: 压缩总正峰面积; 黏性: 压缩的负峰面积, 代表探头从样品中离开时的难易程度; 黏滞力: 第 1 次压缩负峰的峰值。

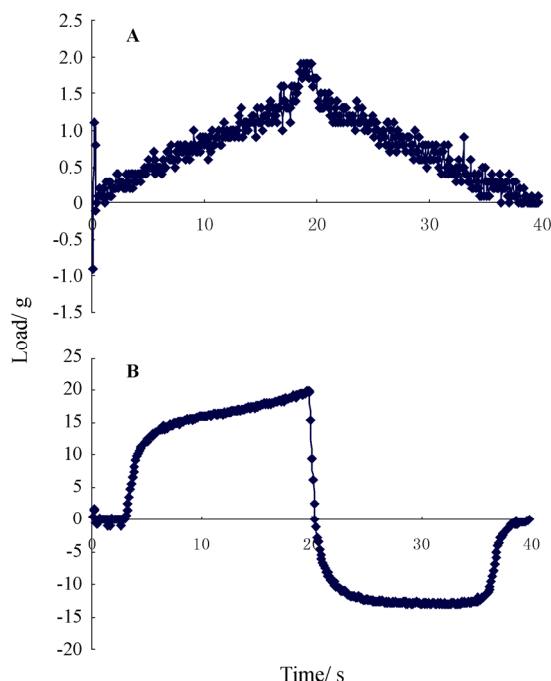


Figure 4 The texture behavior curve of the formulation at 25 °C (A) and 37 °C (B)

Table 1 Gel behaviour parameters at different temperatures

Temperature /°C	Hardness /g	Gel strength /g×s	Adhesivene /g×s	Adhesive force/g
25	1.90	29.13	—	—
37	19.8	265.9	196.5	13.1

处方在 25 °C 的质构曲线与 37 °C 截然不同, 无负峰区域, 亦不存在黏性和黏滞力, 在 37 °C 处方的硬度、强度、黏性和黏滞力显著高于 25 °C, 进一步说明了处方的温敏特性, 即在室温条件下能呈现出流动的液体状态, 方便注射给药, 又在体温条件下转变为半固体状的凝胶, 从而阻滞药物的释放。温度敏感型原位凝胶在不同温度下的质构特性直接关系到其应用性和治疗效果, 如果在室温下硬度、强度和黏性等参数值过高, 则给药困难, 在生理条件下各参数值过低, 达不到理想的胶凝强度, 其缓释性能就会受到很大影响。

4 电镜扫描特征

处方胶凝前后的扫描电子显微镜照片见图 5。由

图中可见, 处方胶凝前为层片状结构, 无孔洞。胶凝后呈明显的三维网状结构, 这种具有高度亲水性的三维网络结构, 可将药物束缚于其中或其间隙中, 控制药物的释放, 并起到对药物的稳定作用。



Figure 5 Scanning electron microscopy (SEM) image of the formulation at 25 °C (A) and 37 °C (B)

5 释放度考察

采用透析袋释放法时, 扩散是药物释放的主要因素, 药物的原位凝胶制剂与药物水溶液相比, 具有明显的缓释作用, 可能是因为泊洛沙姆胶凝化后, 形成了特殊的网状结构, 从而大大延缓了药物通过水性通道扩散的速度 (图 6)。采用无膜释放法时, 凝胶溶蚀是控制药物释放的主要因素, 溶蚀是水分子由凝胶表面逐渐进入内部使其溶解的过程, 内部结构越紧密, 水分子越难进入, 从而延长释放时间, 药物的累积释放量随凝胶的累积溶蚀量增加而增加, 二者呈现出良好的线性关系, 显示零级动力学特征 (图 7)。结合两种方法分析, 溶蚀与扩散是原位凝胶中药物释放的两种主要机制。当凝胶材料的溶蚀速度较快时, 溶蚀为药物释放的主导机制, 当凝胶材料溶蚀速度成为限速步骤时, 药物自凝胶材料中的扩散则为药物释放的主要因素。

6 大鼠体内药代动力学

处方的血药浓度随时间的变化曲线见图 8, 主要药动学参数见表 2。由图 8 可见, 盐酸博安霉素普通注射液皮下注射后很快发生消除, 6 h 后的血药浓度

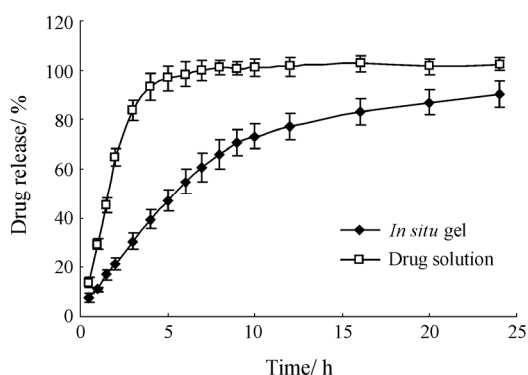


Figure 6 Evaluation of *in vitro* release of the drug from *in situ* gel by semipermeable membrane model ($n = 6$)

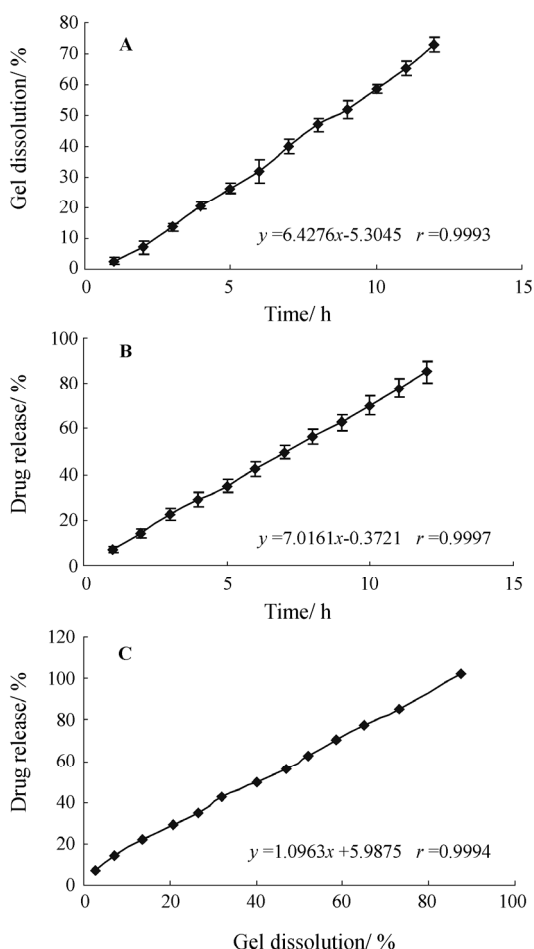


Figure 7 Evaluation of *in vitro* release of the drug from *in situ* gel by non-membrane model ($n = 6$). A: Cumulative gel dissolution versus time; B: Cumulative drug release from *in situ* gel versus time; C: Correlation between drug release and gel dissolution

降低到检测限以下, 说明药物的消除半衰期非常短, 这与相关文献的报道结果相符^[6, 7]。盐酸博安霉素温度敏感原位凝胶组与普通注射液组相比, 药物释放时间延长至 48 h, AUC 增大, 生物利用度提高, 推测原位凝胶制剂经皮下注射后很快凝胶化形成具有三

维网络的空间结构, 大大降低了药物扩散的速度, 形成缓慢释放的药物贮库, 药物不断释放进入血液而持续发挥疗效, 引起生物利用度的提高。原位凝胶组与普通注射液组达峰浓度基本一致, 达峰时间虽有所延长, 但并不明显, 说明有突释效应, 推测原位凝胶皮下注射后, 由溶液转变成半固体胶凝状需要一定的时间, 在此阶段部分药物快速释放而被吸收入血。

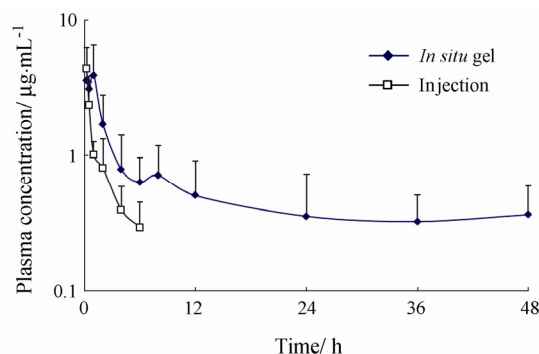


Figure 8 Mean concentration-time curves of different formulations in plasma after subcutaneous administration in rats ($n = 5$)

Table 2 Main pharmacokinetics parameters of different formulations in rats ($n = 5$)

Parameter	<i>In situ</i> gel	Injection
$t_{\max}$ /h	0.45 ± 0.13	0.25 ± 0
$C_{\max}$ / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	4.47 ± 1.08	4.35 ± 1.67
AUC / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}$	25.5 ± 5.12	4.36 ± 1.39
F /%	585	100

结论

以泊洛沙姆 F127 为基质的温敏原位凝胶具有较强的浓度依赖性, 浓度较低时升温不出现胶凝现象。当 F127 达到一定浓度时才开始出现胶凝现象, 并随着浓度的增大, 胶凝温度逐渐下降^[10]。通常采用较高的 F127 浓度来制备原位凝胶以确保其对温度变化敏感, 但其浓度高, 胶凝温度就低, 给原位凝胶的制备、储存和使用带来问题和困难。因此, 处方中需加入其他辅料以获得适宜的胶凝温度, 同时还可以达到调节胶凝强度、增加黏附性和改善药物释放度等目的。在保持一定浓度 F127 的基础上, 加入了泊洛沙姆 F68 和羟丙基甲基纤维素 K4M, 并进行合理配比, 以期达到适宜的胶凝温度和胶凝强度。

各项考察结果显示, 制备的盐酸博安霉素温度敏感原位凝胶, 在室温条件下黏度较低, 流动性好, 呈液体状态, 可以方便注射给药。在人体体温条件下

能自动转变为半固体凝胶,且具有一定的胶凝强度和硬度。药物的扩散和凝胶材料的溶蚀为控制药物释放的主要因素。大鼠皮下注射后药物可以持续释放48 h以上,具有明显的缓释作用。该原位凝胶给药系统具有一定的临床应用前景和应用价值,但也存在一些局限性,如目前尚没有统一规范的质量评价标准,其次在注射后,特别是胶凝形成期间药物释放的情况以及凝胶在注射部位的形状,还有待于进一步研究。

References

- [1] Li XY, Zhu ZJ, Cheng AY. Characteristics of poloxamer thermosensitive *in situ* gel of dexamethasone sodium phosphate [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2008, 43: 208-213.
- [2] Ricci EJ, Lunardi LO, Nanclares DMA, et al. Sustained release of lidocaine from Poloxamer 407 gels [J]. Int J Pharm, 2005, 288: 235-244.
- [3] Chung HJ, Lee YH, Park TG. Thermo-sensitive and biodegradable hydrogels based on stereocomplexed Pluronic multi-block copolymers for controlled protein delivery [J]. J Control Release, 2008, 127: 22-30.
- [4] Deng LJ, Li GL, Li M, et al. Recent advancement on injectable *in situ* gels [J]. Chin J Antibiot (中国抗生素杂志), 2009, 34: 513-519, 540.
- [5] Liu XJ, Li Y, Zhen YS. Inhibitory effect of boanmycin on the growth of colon carcinoma 26 and hepatic metastasis in mice [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2001, 36: 14-18.
- [6] Ma JL, Feng FY, Zhou LQ, et al. Pharmacokinetics study and clinical evaluation on boanmycin [J]. China Pharm (中国药房), 2005, 16: 1314-1316.
- [7] Ma JL, Tang ZQ, Zhou LQ, et al. Clinical pharmacokinetic study on boanmycin [J]. Chin J New Drugs (中国新药杂志), 1995, 4: 42-44.
- [8] Yong CS, Choi JS, Quan QZ, et al. Effect of sodium chloride on the gelation temperature, gel strength and bioadhesive force of poloxamer gels containing diclofenac sodium [J]. Int J Pharm, 2001, 226:195-205.
- [9] Li GL, Li M. Preparation and evaluation of ophthalmic thermosensitive *in situ* gels of penciclovir [J]. J Chin Pharm Sci, 2007, 16: 90-95.
- [10] Deng LJ, Li GL, Ding WM, et al. Preparation and quality control of thermosensitive *in situ* gel of penciclovir for ophthalmic use [J]. Chin J Antibiot (中国抗生素杂志), 2010, 35: 457-461.
- [11] Tang Y, Du Y, Li Y, et al. A thermosensitive chitosan/poly (vinyl alcohol) hydrogel containing hydroxyapatite for protein delivery [J]. J Biomed Mater Res A, 2009, 91: 953-963.
- [12] Liu Y, Lu WL, Wang JC, et al. Controlled delivery of recombinant hirudin based on thermo-sensitive Pluronic F127 hydrogel for subcutaneous administration: *in vitro* and *in vivo* characterization [J]. J Control Release, 2007, 117: 387-395.
- [13] Patois E, Osorio-da Cruz S, Tille JC, et al. Novel thermosensitive chitosan hydrogels: *in vivo* evaluation [J]. J Biomed Mater Res A, 2009, 91: 324-330.