

右旋酮洛芬氨丁三醇温敏水凝胶的释放度、稳定性及组织相容性研究

梅朝叶^{1,2,4}, 陈浩^{1,2}, 覃小丽^{1,2}, 李月婷^{1,2}, 郑林^{1,2}, 王爱民^{2,3}, 刘丽娜^{2,3*}

1. 贵州医科大学 贵州省药物制剂重点实验室, 贵州 贵阳 550004
2. 贵州医科大学 药学院, 贵州 贵阳 550004
3. 贵州医科大学 民族药与中药开发应用教育部工程研究中心, 贵州 贵阳 550004
4. 贵州医科大学药用植物功效与利用国家重点实验室, 贵州 贵阳 550004

摘要: **目的** 建立右旋酮洛芬氨丁三醇(DKPF)温敏水凝胶的含量测定方法, 考察其稳定性和组织相容性。**方法** 建立紫外分光光度法测定 DKPF 温敏水凝胶中 DKPF 含量, 并考察方法的专属性、线性关系、定量限、精密度、回收率; 应用建立的紫外分光光度法、恒温振荡法测定 DKPF 温敏水凝胶的释放度, 检测高湿、光照、低温条件下的 DKPF 温敏水凝胶稳定性。随机选取 80 只昆明小鼠, 分别 sc 0.2 mL DKPF 温敏水凝胶、空白水凝胶、DKPF 生理盐水溶液(DKPF 浓度同 DKPF 温敏水凝胶), 于给药后 1、3、6、9、12 d, 每组各取 5 只脱颈处死, 剖开注射部位皮肤观察水凝胶状态, 并取皮下组织样本 HE 染色后光镜下观察, 评价 DKPF 温敏水凝胶组织相容性。**结果** DKPF 在 260 nm 处有最大紫外吸收, DKPF 质量浓度在 1.70~25.56 $\mu\text{g/mL}$ 范围内呈良好的线性关系 ($r=0.999\ 9$), 方法学的日间、日内精密度, 加样回收率均良好; DKPF 温敏水凝胶主要以扩散为主, 释放度符合规定, 且工艺重现性好; 水凝胶在低温、湿度 75%条件下稳定性良好, 不耐光照, 需避光保存。sc 给予小鼠水凝胶后, 各组小鼠均成活, 且水凝胶在皮下逐渐减小直至消失; 病理切片结果提示, 温敏水凝胶引起轻微炎症反应, 随着时间延长逐渐消失, 组织相容性良好。**结论** 本研究所建立的紫外分光光度法方法准确率高, 重复性好, 可应用于 DKPF 温敏水凝胶中 DKPF 含量测定; DKPF 温敏水凝胶符合生物材料的安全标准。

关键词: 右旋酮洛芬氨丁三醇温敏水凝胶; 紫外分光光度法; 释放度; 稳定性; 组织相容性

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2018)04-0589-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.04.016

Study on quality standard and histocompatibility of dexketoprofen trometamol temperature sensitive hydrogels

MEI Chaoye^{1,2,4}, CHEN Hao^{1,2}, QIN Xiaoli^{1,2}, LI Yueting^{1,2}, ZHENG Lin^{1,2}, WANG Aimin^{2,3}, LIU Lina^{2,3}

1. Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China;
2. School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China;
3. Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and TCM (Ministry of Education), Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China;
4. State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004 China.

Abstract: Objective To establish a method for determining the content of dexketoprofen trometamol (DKPF) temperature sensitive hydrogels, and to study the stability and histocompatibility of it. **Methods** The content of DKPF temperature sensitive hydrogels was determined by ultraviolet spectrophotometry, and investigated the specificity, linearity, limit of quantification, precision and recovery rate. The release rate of DKPF thermosensitive hydrogel was determined by ultraviolet spectrophotometry and constant temperature oscillation method. The stability of DKPF thermosensitive hydrogel under high humidity, light and low temperature conditions was determined. Randomly selected 80 male Kunming mice were sc 0.2 mL DKPF temperature sensitive hydrogel, blank

收稿日期: 2017-11-01

基金项目: 贵州省科技计划项目(黔科合平台人才[2017]5601; [2016]5613/5677); 贵阳市科技计划项目(筑科合同[20141001]05号/筑科合同[2017]30-29号)

第一作者: 梅朝叶(1992-), 女, 2015级研究生, 研究方向为中药药效物质基础及质量控制研究。E-mail: 812400380@qq.com

*通信作者: 刘丽娜, 女, 副教授, 研究方向为中药活性物质基础及药动学研究与药物新剂型、新技术研究。E-mail: mailofzl@126.com

hydrogel, DKPF saline solution (the concentration of DKPF with DKPF temperature sensitive hydrogel), after administration of 1, 3, 6, 9, and 12 d, each five rats were sacrificed, cut the skin injection site for hydrogel state observation, and the subcutaneous tissue samples were stained with HE and observed under light microscope to evaluate the histocompatibility of DKPF thermosensitive hydrogels. **Results** DKPF had the maximum ultraviolet absorption at 260 nm. The linear range of dexketoprofen trometamol was 1.70 - 25.56 $\mu\text{g/mL}$ ($r = 0.9999$). The precision of intra- and intra- day and the recovery rate of the method were all good. The dissolution of DKPF temperature sensitive hydrogels conformed the rules and it had a good process reproducibility. DKPF temperature sensitive hydrogels had a good stability in low temperature and 75% RH, but it had intolerance of light, should be stored in the dark. After giving hydrogel in mice, mice in all groups survived, and the hydrogel gradually decreased and disappeared. The results of pathological sections showed that the mild inflammatory reaction caused by thermosensitive hydrogel disappeared gradually with time, and the histocompatibility was good. **Conclusion** This study have established an accurate and repeatable method for dexketoprofen trometamol temperature sensitive hydrogels quality control and the hydrogels meet the safety standards of biological materials.

Key words: dexketoprofen trometamol temperature sensitive hydrogels; ultraviolet spectrophotometry; dissolution; stability; histocompatibility

右旋酮洛芬氨丁三醇 (Dexketoprofen Trometamol, DKPF), 是 2-芳基丙酸类非甾体抗炎药 (non-steroidal anti-inflammatory drug, NSAIDs) 酮洛芬的水溶性盐, 具有明显的解热、镇痛、抗炎作用^[1]。临床上用于缓解各类疼痛, 尤其是类风湿性关节炎、骨关节疼痛等^[2]。为改进现有市场上 DKPF 半衰期短、胃肠道不良反应大、给药频繁等缺点^[3-4], 实验室前期通过天然高分子材料壳聚糖 (chitosan, CS) 与 β -甘油磷酸钠 (β -sodium glycerophosphate, β -GP) 制备温敏水凝胶, 并研制成 DKPF 温敏水凝胶注射液, 其既能控制释药速度, 减少服药次数又能局部定位给药, 尤其是针对关节及疼痛部位给药^[5-7]。为有效控制 DKPF 温敏水凝胶的质量并探讨其作为注射用制剂的可行性^[8-9], 本研究建立紫外分光光度法对 DKPF 水凝胶的含量进行测定, 并对其释放度、稳定性及组织相容性进行研究, 建立 DKPF 温敏水凝胶的质量标准及组织相容性评价, 以期为其进一步研发、贮存提供一定的科学依据^[10]。

1 材料

1.1 主要仪器

S10-3 型恒温磁力搅拌器 (上海司乐仪器有限公司); UV-2401PC 紫外分光光度计 (日本岛津公司); CQ250A-TS 超声波清洗机 (上海跃进医用光学机械厂); PHS-3C 酸度计 (上海精密科学仪器有限公司); EL204 电子分析天平 (梅特勒-托利多仪器上海有限公司); THZ-82 恒温水浴振荡器 (镇江市科密仪表有限公司); WD-A 型药物稳定性检查仪 (天津药典标准仪器厂); Eppendorf 移液器 (艾本德中国有限公司)。

1.2 药物及主要试剂

DKPF 温敏水凝胶 (批号 20121201、20121202、20121203, 规格: DKPF 质量浓度为 2.5 mg/mL), 为贵州省药物制剂重点实验室自制^[3]; DKPF 原料药 (批号 20110301, 质量分数 99.8%), 购于武汉远成共创科技有限公司; CS (批号 20120117, 脱乙酰度 95%), 购于青岛海普生物技术有限公司; β -GP (批号 1141M077V), 购于美国 Sigma 公司; 甲醛 (批号 20130407, 质量分数 40%), 购于重庆江川化工有限公司; 苦味酸 (批号 20130315, 质量分数 99%), 购于成都化夏化学试剂有限公司; 生理盐水 (批号 T12041217), 购于四川科伦药业股份有限公司; 实验用水为超纯水。

1.3 实验动物

健康昆明小鼠, 雌雄兼用, 体质量 18~22 g, 由贵州医科大学实验动物中心提供, 实验动物生产许可证号 SCXK (黔) 2012-0001。动物购入实验室后, 雌雄分养, 由专人饲养和管理, 动物房定期打扫消毒。

2 方法

2.1 对照品溶液的配制

对照品溶液: 精密称取 21.30 mg 干燥至恒重的 DKPF 粉末置于 100 mL 量瓶中, 用 pH 7.40 的磷酸盐 (PBS) 缓冲液溶解、定容至刻度得对照品溶液。

空白溶液: 精密称取温敏水凝胶辅料 (CS、 β -GP 等组成) 5.11 mg, 加入 PBS 缓冲液 24 mL 超声使溶解, 0.80 μm 微孔滤膜过滤, 得空白溶液。

2.2 供试品溶液的配制

取 DKPF 水凝胶 40 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加入 pH 7.40 的 PBS 缓冲溶液, 振摇, 超声 10 min,

加缓冲液稀释至刻度, 摇匀; 0.80 μm 微孔滤膜过滤, 精密量取续滤液 1.00 mL, 置于 50.00 mL 量瓶中, 加缓冲液稀释至刻度, 作供试液。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性 取对照和空白溶液, 以 pH 7.40 的 PBS 缓冲液作空白溶剂, 紫外分光光度计于 190~400 nm 波长进行紫外扫描, 确定其最大吸收波长。

2.3.2 线性关系 按“2.1”项对照品溶液, 分别精密量取对照品溶液 3.00、2.50、2.00、1.50、1.00、0.50、0.20 mL 置于 25 mL 量瓶中, 以 pH 7.40 的 PBS 缓冲液为空白对照, 在 260 nm 处测定其吸光度 (A) 值, 以浓度 (C) 对吸光度 (A) 值作线性回归。

2.3.3 定量限 根据线性回归方程 $A=0.043\ 3C+0.008\ 4$, 计算其定量限。定量限: $\text{LOQ}=10\times\text{SD}/\text{B}$, 其中 SD 为空白样品响应值的标准偏差, 根据多次测得的空白样品响应值, 其 SD 为 0.005 2; B 为线性回归方程的斜率, B 值为 0.043 3。

2.3.4 精密度考察 取“2.3.2”项下高、中、低 (1.70、8.52、21.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 质量浓度的 DKPF 溶液, 在 260 nm 处测定 A 值, 24 h 内重复测 5 次, 计算其日内与日间精密度。

2.3.5 回收率试验 精密称取 DKPF 空白辅料, 配制成 DKPF 浓度分别为完全溶出时的 80%、100% 和 120% 的 DKPF 溶液, 用 0.8 μm 微孔滤膜过滤, 精密量取续滤液 1 mL 于 50 mL 量瓶中, 在 260 nm 处测定 A 值。

2.4 含量测定

取 DKPF 温敏水凝胶 3 批 (批号 20121201、20121202、20121203), 按“2.2”项下方法制备样品溶液, 以缓冲液为空白, 在 260 nm 处测定 A 值, 并根据标准曲线方程计算水凝胶中药物的含量。

2.5 释放度的测定^[11]

采用恒温振荡的方法测定释放度, 释放介质为 PBS (pH 7.40) 溶液, 温度 (37 \pm 0.5) $^{\circ}\text{C}$, 振摇速率 100 r/min。精密称取 3 批样品 DKPF 水凝胶 (批号 20121201、20121202、20121203) 100 mg, 将其分别置于 15 mL 塑料具塞离心管内, 于恒温振荡器中预热 5 min 后, 加入 10 mL PBS 缓冲液 (pH 7.40), 于 1、2、4、8、12、24 h 后每隔 24 h 取样 1 次, 取出试管内所有的释放液 (并迅速补加等量新鲜介质), 连续取样 12 d, 将所取释放液以 0.8 μm 的微孔滤膜过滤, 取 2 mL 续滤液以 PBS 缓冲液 (pH 7.4)

稀释 5 倍后, 在 260 nm 处用紫外分光光度法测定 A 值, 代入标准曲线, 并计算其累积释放度 (%)。根据测定结果, 绘制体外释药曲线^[3]。

2.6 DKPF 温敏水凝胶的初步稳定性考察

2.6.1 高湿试验 取同一批水凝胶 (批号 20121201) 124 mg, 于 25 $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 75% 条件下放置 10 d, 分别于第 0、5、10 天取样, 观察其性状, 并按“2.4”项下方法进行含量测定。

2.6.2 光照试验 取同一批水凝胶 (批号 20121201) 124 mg, 于室温, 照度为 (4 500 \pm 500) Lx 的光照箱内放置 10 d, 分别于第 0、5、10 天取样, 观察其性状, 并按“2.4”项下方法进行含量测定。

2.6.3 低温试验 基于本制剂材料的特殊性, 进行了低温试验, 将 3 批样品 (批号 20121201、20121202、20121203), 密封, 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内, 放置 6 个月, 于 0、1、2、3、6 个月取样, 观察其性状, 并按“2.4”项下方法进行含量测定。

2.7 DKPF 温敏水凝胶的组织相容性研究

2.7.1 注射部位观察 随机选取 80 只适应性喂养 1 周后的小鼠, 分别 sc 0.2 mL DKPF 温敏水凝胶、空白水凝胶、DKPF 生理盐水溶液 (DKPF 浓度同 DKPF 温敏水凝胶), 用苦味酸将注射部位标记。于给药后 1、3、6、9、12 d, 每组各取 5 只脱颈处死, 剖开注射部位皮肤, 观察水凝胶的状态并拍照。

2.7.2 组织切片观察 取“2.7.1”项下小鼠皮下组织样本将其固定、脱水、石蜡包埋、切片后进行 HE 染色, 组织切片光镜下观察。

3 结果

3.1 方法学考察

3.1.1 专属性试验 结果显示, DKPF 在 260 nm 处有最大吸收, 且各辅料均在此条件下无干扰。

3.1.2 线性关系试验 DKPF 的回归方程式为 $A=0.043\ 3C+0.008\ 4$, $r=0.999\ 9$ ($n=7$), 表明本品在 1.70~25.56 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 线性关系良好。

3.1.3 定量限试验 通过计算, 定量限为 1.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 定量限结果表明标准曲线的最低浓度符合检测规定。

3.1.4 精密度考察 DKPF 高、中、低浓度的日内精密度 RSD 分别为 1.61%、0.89%、0.37% ($n=5$), 日间精密度 RSD 分别为 1.76%、1.24%、0.44% ($n=5$), 表示该方法精密度良好。

3.1.5 回收率实验 DKPF 回收率分别为 (100.6 \pm 0.04)%、(100.2 \pm 0.46)% 和 (99.8 \pm 0.89)% ($n=5$),

说明该方法的回收率较好。

3.2 不同批次 DKPF 温敏水凝胶的含量

DKPF 温敏水凝胶的规格为 0.25%，3 批样品的测定含量分别为标示规格的 98.57%、99.03% 和 99.84% ($n=3$)，RSD 为 0.65%。利用 SPSS 18.0 统计软件对 3 批样品的标示量进行方差分析，结果表明 3 批水凝胶的含药量无显著性差异，各批次间差异较小，工艺重现性较好。

3.3 释放度测定结果

测定结果如图 1 所示，对本品 0~288 h 的释药行为进行拟合，方程为 $\ln F=0.5063 \ln t+3.2317$ ， $r=0.9988$ ，表明 DKPF 温敏水凝胶的释药特性用 Ritger-Peppas 方程拟合较好，并且释放指数 $n=0.5063$ ，说明该制剂的释药机制为非 Fick 扩散即扩散和溶蚀的协同作用，主要以扩散为主^[1]。且 3 批样品的体外释药曲线完全重合，说明工艺重现性好。

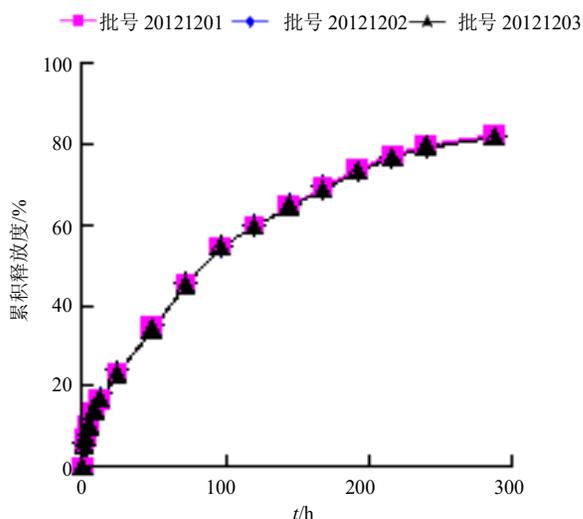


图 1 3 批水凝胶体外的释放曲线

Fig. 1 Cumulative release profiles of three batches hydrogels

3.4 DKPF 温敏水凝胶的初步稳定性考察结果

3.4.1 高湿试验 结果表明，在相对湿度 75% 条件下放置 0、5、10 d，水凝胶性状均为均匀透明，3 批样品的测定含量分别为标示规格的 98.38%、97.45%、97.14%，说明药物外观和含量均没有显著变化，表明水凝胶在高湿条件下稳定性良好。

3.4.2 光照试验 在光照箱内放置 0、5、10 d，DKPF 温敏水凝胶性状分别为均匀透明；颜色稍变黄、呈半固体状态；黄色变深，呈半固体状态。3 批样品

的测定含量分别为标示规格的 97.22%、97.72%、98.38%。表明其含量几乎无变化，但外观性状发生改变，说明其不耐光照，需避光保存。

3.4.3 低温试验 水凝胶性状均为均匀透明，4℃ 冰箱内放置 6 个月 3 批样品的测定含量分别为标示规格的 97.76%、98.12%、98.95%，其含量性状几乎无变化，说明其稳定性良好。

3.5 DKPF 温敏水凝胶的组织相容性研究结果

3.5.1 注射部位观察 sc 给予小鼠水凝胶后，各组小鼠均成活，且水凝胶在皮下逐渐减小直至消失，说明 DKPF 温敏水凝胶对小鼠无明显毒性。

3.5.2 组织切片观察 DKPF 生理盐水溶液注射后 1 d，有较轻的炎症反应，并随着时间逐渐减少，直至 12 d 时基本消失；空白水凝胶注射后 1 d，炎症反应较轻，从第 3 天开始炎症反应基本消失；DKPF 水凝胶注射后 1 d，有一定炎症反应产生，并逐渐减弱，直至 12 d 时，已基本看不到炎症细胞；水凝胶的炎症反应的剧烈程度为：DKPF 水凝胶 > DKPF 生理盐水溶液 > 空白水凝胶。结果表明，温敏水凝胶具有很好的组织相容性，符合生物材料的安全标准。结果见图 2。

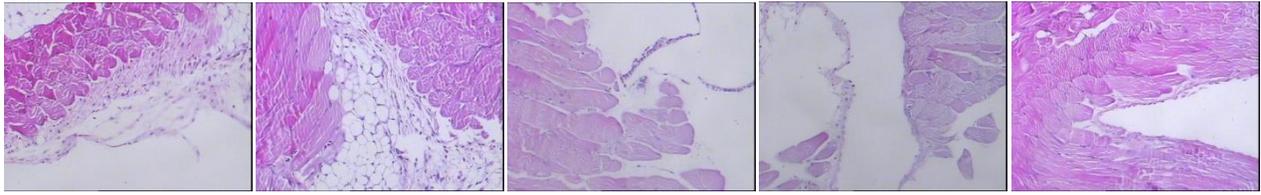
4 讨论

使用紫外分光光度法进行 DKPF 的含量测定，DKPF 在 260 nm 波长处有很好的紫外吸收，在此波长条件下辅料对其无任何的干扰，该分析方法准确率高，精密度好，能够很好的满足含量测定方法的要求。不同的释药体系遵循着不同的释药机制，通过对 DKPF 水凝胶的释药行为进行模型拟合，发现其符合 Ritger-Peppas 方程，为扩散和溶蚀的协同作用机制。本研究采用无膜扩散模型，可以较好的模拟体液直接和水凝胶接触的体内情况。

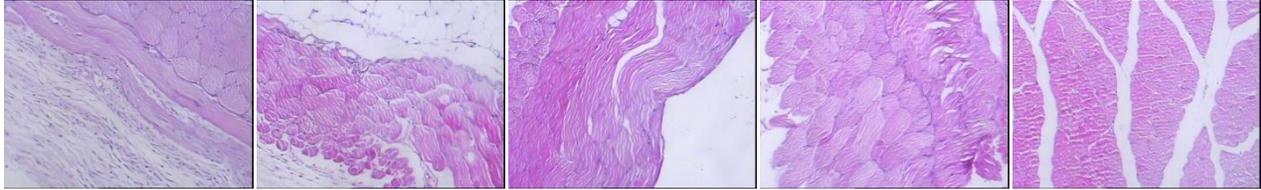
通过对 DKPF 水凝胶的稳定性考察发现，该制剂在光照的情况下，虽然其含量并没有很显著的变化，但是形态发生了很大的变化，无法再作为注射剂使用，所以此剂型不能在光照下储存。在相对湿度 75% 条件下，含量及性状没有显著变化，低温冷藏 6 个月情况下，水凝胶的含量及性状都几乎没有变化，因此本品应避光保存于低温处。

在 DKPF 水凝胶组织相容性研究中，水凝胶注入体内后随着时间延长逐渐消失，不会沉积在给药部位，也不会影响小鼠的正常生理状态，说明水凝胶具有较好的可降解性。在此基础上，开展了病理

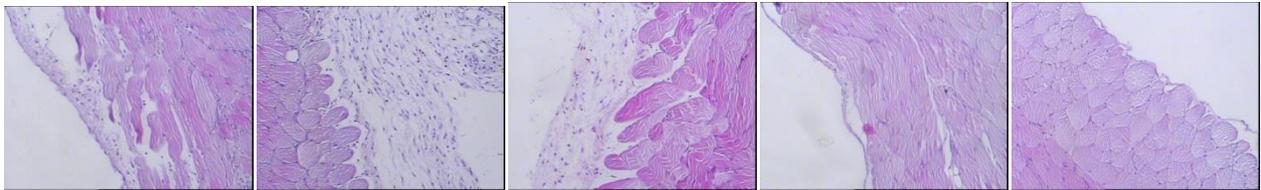
DKPF 生理盐水溶液



空白水凝胶



DKPF 水凝胶



给药后 1 d

给药后 3 d

给药后 6 d

给药后 9 d

给药后 12 d

图 2 DKPF 水凝胶注射在不同时间的组织切片图 (HE, ×40)

Fig. 2 Tissue slices after injection of DKPF hydrogels A in different time (HE, ×40)

学实验,更为客观的评价水凝胶制剂的组织相容性,病理切片结果提示,温敏水凝胶引起轻微炎症反应,随着时间延长逐渐消失,组织相容性良好。

DKPF 温敏水凝胶释放度符合规定,且工艺重现性好,在低温、湿度 75 %条件下稳定性良好,不耐光照,需避光保存。组织相容性良好,符合生物材料的安全标准。

参考文献

- [1] Barbanoj M J, Antonijuan R M, Gich I. Clinical pharmacokinetics of dexketoprofen [J]. *Clin Pharmacokinet*, 2001, 40(4): 245-262.
- [2] 梅之南,裴小平,蔡鸿声,等. 右旋酮洛芬的药动学和药效学性质 [J]. *中国新药杂志*, 1998, 7(5): 339-341.
- [3] 刘丽君,张洁,唐丽,等. 局部注射用右旋酮洛芬氨丁三醇温敏凝胶的制备及其体外释药的考察 [J]. *中国医院药学杂志*, 2013, 33(22): 1835-1839.
- [4] 张洁,石凌云,郑林,等. 右旋酮洛芬氨丁三醇速释缓释双层片的研制及其体外释放特性 [J]. *中国医院药学杂志*, 2013, 33(9): 680-684.
- [5] Galaev I Y, Mattiasson B. "Smart" polymers and what they could do in biotechnology and medicine [J]. *Trends Biotechnol*, 1999, 17(8): 335-340.
- [6] He C, Kim S W, Lee D S. In situ gelling stimuli-sensitive block copolymer hydrogels for drug delivery [J]. *J Control Release*, 2008, 127(3): 189-207.
- [7] Hatefi A, Amsden B. Biodegradable injectable in situ forming drug delivery systems [J]. *J Control Release*, 2002, 80(1/3): 9-28.
- [8] 王晔. 壳聚糖水溶性衍生物及其温敏水凝胶细胞活性、相容性评价 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2007.
- [9] 吴广升. 可注射型壳聚糖温敏凝胶生物学性能的初步研究 [D]. 西安: 第四军医大学, 2009.
- [10] 王欣美,王玫博,吴赵云,等. 大活络丸的质量标准研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(14): 145-149.
- [11] 王晔. 温敏性水凝胶在给药系统中的应用 [D]. 杭州: 浙江大学, 2006.