

- [6] Kwon, S H, Hwang B S, kim K H, *et al.* Method for preparing sophorae fructus extract containing isoflavone [P]. US, 7595080, 2009-09-29.
- [7] Smith R M. Extraction with superheated water [J]. *J Chromatogr A*, 2002, 975: 31-46.
- [8] Hartonen K, Inkala K, Kangas K, *et al.* Extraction of polychlorinated biphenyls with water under subcritical conditions [J]. *J Chromatogr A*, 1997, 785: 219-222.
- [9] Yamaguchi T. Structure of subcritical and supercritical hydrogen-bonded liquids and solutions [J]. *J Mol Liquids*, 1998, 78(122): 43-50.
- [10] De Castro M D L, Jimene C M M. Potential of water for continuous automaed sample leaching [J]. *Trends Anal Chem*, 1998, 17(7): 441-447.
- [11] 魏福华, 张永忠, 井乐刚, 等. 紫外分光光度法测定大豆中大豆异黄酮[J]. 理化检验: 化学分册, 2006, 42(6): 461-463.

硝酸毛果芸香碱眼用原位凝胶的制备和评价

朱 静^{1,2}, 姜 锋², 阎 卉², 王成港², 王春龙^{2*}

(1. 天津医科大学, 天津 300070; 2. 天津药物研究院, 天津 300193)

摘要:目的 以硝酸毛果芸香碱为模型药, 研究温度敏感型原位凝胶对药物眼部滞留和体外释放的影响。方法以泊洛沙姆 407、188 为凝胶剂, 以卡波姆 974P 为增黏剂, 制备眼用温敏型原位凝胶。考察原位凝胶的流变学性质; 采用改良 Franz 扩散池法研究凝胶的体外释药行为。结果 流变学测定结果显示原位凝胶在室温状态下为物理缠结的聚合物溶液, 在眼表温度下转变为次级键网状结构。泊洛沙姆 188、卡波姆 974P 的加入均可延缓药物的释放, 二者对凝胶的黏性模量 G' 的影响不同。原位凝胶在 4 h 内缓慢释放药物, 释放曲线符合 Higuchi 方程 ($r = 0.9923$)。结论 通过调节泊洛沙姆 407 和 188 的比例, 可得到具有适宜溶液-凝胶转变温度和良好释药特性的原位凝胶。流变学结果提示原位凝胶的眼部滞留能力强于普通滴眼液, 是一种具有研究前景的给药系统。

关键词: 硝酸毛果芸香碱; 眼用原位凝胶; 温敏型; 流变学; 溶液-凝胶转变温度; 体外释放

中图分类号: R286.02 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)05-0720-05

Preparation and evaluation of pilocarpine nitrate in situ gel for ophthalmic use

ZHU Jing, JIANG Feng, YAN Hui, WANG Cheng-gang, WANG Chun-long

(Tianjin Medical University, Tianjin, 300070; Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin, 300193)

Abstract: **Objective** To develop and characterize a series of Poloxamer- and Carbopol-based *in situ* gel for ophthalmic use as to enhance the ability of drug to retain in eyes and delay drug release. **Methods** The gel was prepared using Poloxamer 407/188 and Carbopol 974P as gelling agent and viscosity enhancer, respectively. Rheological characteristics were evaluated and behaviour of drug release *in vitro* was investigated by modified Franz diffusion cells. **Results** The rheological study indicated that the gel was physically entangled polymer solutions at 20 °C and then converted into a network structure with secondary bonds at 35 °C. The gel released the drug molecules slowly in 4 h. The best fit model was Higuchi matrix model ($r = 0.9923$). Formulations consisting of Poloxamer 188 and Carbopol 974P were proved to be able to decrease the drug release speed efficiently. The impact on elastic modulus G' of the gel caused by those two were different. **Conclusion** An *in situ* gel with suitable sol-gel transition temperature and satisfactory release pattern could be achieved by adjusting the ratio of Poloxamer 407 to Poloxamer 188. The developed formulations have the ability to prolong the ocular residence time, which suggests it may be a new drug delivery system with bright future.

Key words: pilocarpine nitrate; ophthalmic *in situ* gel; thermosensitive; rheology, sol-gel transition temperature; *in vitro* release

收稿日期: 2009-11-03

作者简介: 朱 静, 女, 天津人, 硕士研究生, 主要从事眼部缓释给药系统的研究。

Tel: (022) 23006879 E-mail: catherine_zhu_@hotmail.com

*通讯作者 王春龙 Tel: (022) 23006880 E-mail: dds-wcl@vip.sina.com

眼部缓释给药系统是具有挑战性的研究方向, 药液在眼部滞留时间短导致生物利用度过低是其显著缺陷, 也是眼部给药系统设计亟待解决的问题^[1]。为了延长药物的眼部滞留时间, 眼膏、眼内植入剂、凝胶剂等相继应用^[2]。眼膏通常采用油性基质, 凝胶剂黏度较大, 白天使用常引起糊视和眨眼困难; 眼内植入剂需经由特殊途径置入眼底发挥作用, 顺应性较差。理想的眼部缓释给药系统应具备以下几个特点: (1) 给药方便; (2) 避免频繁给药; (3) 一定的缓释特性; (4) 适宜的机械强度以对抗眨眼造成的清除。原位凝胶在眼部缓释给药中已显示其优越性, 在储存条件下为自由流动的液体, 滴入结膜囊内能够响应生理条件如温度、pH 值、离子强度等发生溶液-凝胶转变, 吸收大量水分发生膨胀, 形成具有黏弹性的网状结构^[3]。泊洛沙姆是一类具有反向温度敏感特性的高分子材料, 其黏度随着温度的升高而升高。通过调整链段比例能够得到溶液-凝胶温度范围在 20~85 的亲水凝胶^[4]。本实验以目前临床上治疗青光眼的一线用药硝酸毛果芸香碱为模型药, 采用泊洛沙姆 407、188 为凝胶剂, 设计眼用温敏型原位凝胶, 研究其流变学性质及其对眼部滞留时间的意义, 并进一步研究其体外释药行为。

1 仪器与试剂

85-2 型恒温磁力搅拌器(江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司), Physica MCR 301 流变仪(采用椎板 CP50-1, 奥地利安东帕), TT-6 透皮吸收仪及扩散池(天津市正通科技有限公司), DC-106 低温恒温槽(上海舜宇恒平科学仪器有限公司), 透析袋(截留相对分子质量 3 500, 北京科百奥生物科技有限公司)。安捷伦 1200 液相色谱仪。

硝酸毛果芸香碱(天津大冢制药有限公司, 批号 1029118), 泊洛沙姆 407(BASF, 批号 WPED591C), 泊洛沙姆 188(BASF, 批号 WPIC630C), 卡波姆 974P(Noveon, 批号 CC42MAB100), 氯化钠(天津开发区海光化学制药厂), 甘露醇(Roquette), 甲醇(色谱纯, 天津市康科德科技有限公司)。

2 方法与结果

2.1 原位凝胶的制备

2.1.1 含药原位凝胶的制备: 称取处方量泊洛沙姆 407/188, 加入 80 mL pH 4.0 磷酸盐缓冲溶液, 在磁力搅拌下分散均匀, 置 4 冰箱中放置 12 h 得到澄清透明的溶液。在磁力搅拌下加入主药、渗透压调节剂、pH 值调节剂等, 加溶剂至 100 mL 即得。

2.1.2 空白原位凝胶(PN)的制备: 称取处方量泊

洛沙姆 407/188, 加入 80 mL pH 4.0 磷酸盐缓冲溶液, 在磁力搅拌下分散均匀, 置 4 放置 12 h 得到澄清透明的溶液。在磁力搅拌下加入渗透压调节剂、生物黏合剂、pH 值调节剂等, 加溶剂至 100 mL, 即得。

2.2 原位凝胶的流变学性质考察

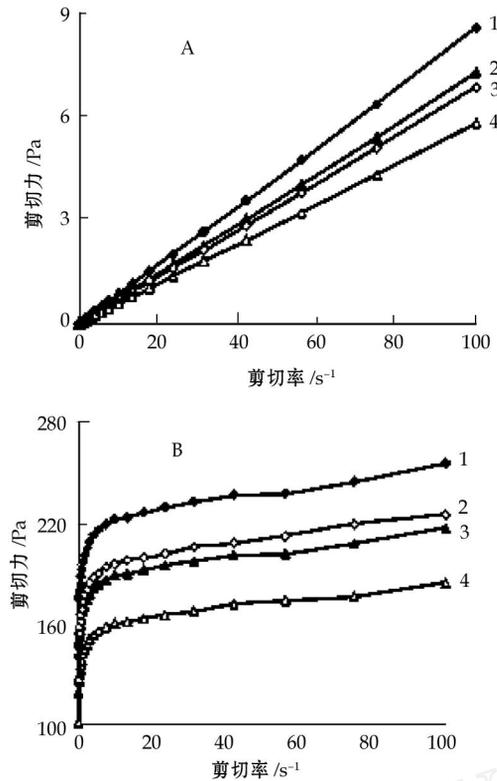
2.2.1 流变曲线的制备^[5]: 原位凝胶在 20、35 下剪切力随剪切率的变化曲线见图 1。泊洛沙姆原位凝胶在 20 下为典型的牛顿流体(Newtonian), 其流变曲线为经过原点的直线, 符合方程 $\tau = \eta \dot{\gamma}$; 在室温下具有良好的流动性, 便于配制定量, 利于给药。在结膜温度 35 下, 原位凝胶转变为宾汉姆流体(Bingham Plastic), 符合方程 $\tau = \tau_0 + \eta_p \dot{\gamma}$, 即具有屈服值的流体。这种流体要在剪切力增大到一定值时, 才会流动产生位移; 且随着剪切力的继续增大, 黏度会随之变小。初步表明这种流体能够在一定程度上对抗眼脸的剪切, 从而延长药物的眼部滞留时间; 并且不会在频繁的眨眼过程中对眼睛产生过大刺激^[6]。

2.2.2 应变扫描: 测定应变在 0.01%~100% 时, 原位凝胶的黏弹性模量变化曲线见图 2。应变扫描结果表明, 加入 1%(0.01 g/mL) 卡波姆 974P 后, 泊洛沙姆原位凝胶的线性区域加长, 说明其凝胶结构更加稳定。3 个处方能够承受的应变力分别为 0.1%、1.0%、1.0%, 为了保证凝胶的黏弹性结构在测定过程中不被破坏, 在震荡模式和剪切模式下测定体系的流变学性质时, 均将应变力设定在 1.0%。

2.2.3 震荡模式下的流变学性质: 震荡频率 0.5 Hz, 应变幅 1.0%, 升温速度 1 /min, 在 20~44

测定原位凝胶的黏弹性模量, 结果见图 3。动态黏弹性系数的数量级能够对样品结构提供定量信息^[7], 低温时, $G' < G''$, 体系为物理缠结的聚合物溶液; 温度上升到约 27 以后, $G' > G''$, 体系为次级键网状结构。这两种结构的主要区别体现在低频率范围, 物理交联经过一段时间会发生解缠, 而次级键力不随时间变化。表明原位凝胶在滴入结膜囊形成凝胶后具有更好的稳定性。通过温度扫描, 还可以得到原位凝胶的凝胶温度, 即 $G' = (G'_{sol} + G'_{gel})/2$ 时对应的温度^[8]。17%(0.17 g/mL) 泊洛沙姆 407 原位凝胶的溶液-凝胶转变温度在 26~27 。

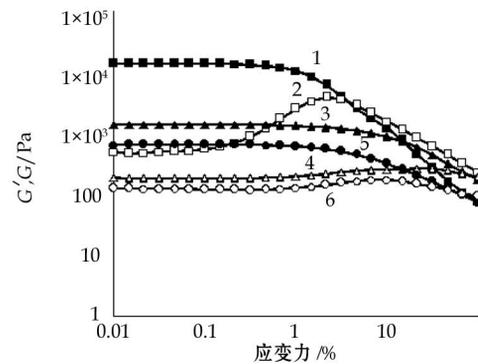
2.2.4 剪切模式下的流变学性质: 在 35 下测定剪切率在 0~20 Hz 变化时, 原位凝胶的黏弹性模量结果见图 4。在 0~20 Hz 测定 G' 弹性模量(储能模量)和 G'' 黏性模量(耗能模量)。G 可以用来评价原



1-17 % Poloxamer 407 2-17 % Poloxamer 407 + 10 % Poloxamer 188 3-17 % Poloxamer 407 + PN 4-17 % Poloxamer 407 + 10 % Poloxamer 188 + PN

图 1 泊洛沙姆 407/188 原位凝胶在 20 (A) 和 35 (B) 的流变曲线

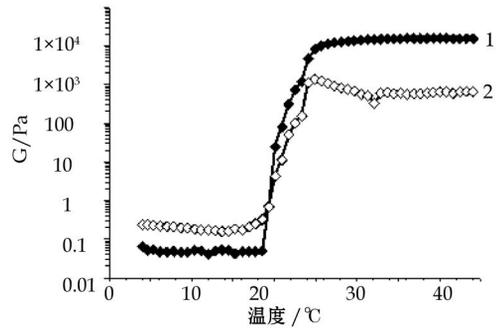
Fig 1 Flow curves of Poloxamer 407/188 solutions under 20 (A) and 35 (B)



1-17 % Poloxamer 407 - G 2-17 % Poloxamer 407 - G
3-17 % Poloxamer 407 + 1 % Carbopol 974P - G
4-17 % Poloxamer 407 + 1 % Carbopol 974P - G
5-17 % Poloxamer 407 + 1 % Carbopol 974P + PN - G
6-17 % Poloxamer 407 + 1 % Carbopol 974P + PN - G

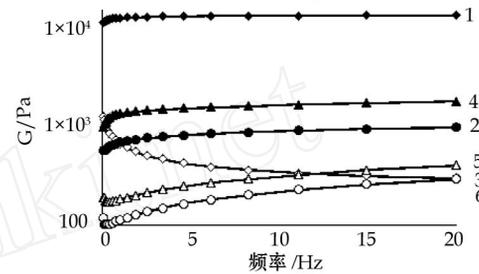
图 2 泊洛沙姆 407/188 原位凝胶的应变扫描曲线
Fig 2 Strain scanning sweep of Poloxamer 407/188 in situ gel

位凝胶在眼内的保留行为; G' 可以用来评价原位凝胶由于眨眼而被排出的行为^[9]; 各组均表现为



1-17 % Poloxamer 407 - G 2-17 % Poloxamer 407 - G
图 3 17% (0.17 mg/mL) 泊洛沙姆 407 原位凝胶的温度扫描曲线

Fig 3 Temperature scanning of 17% (0.17 mg/mL) Poloxamer 407 in situ gel



1-17 % Poloxamer 407 - G 2-17 % Poloxamer 407 - G
3-17 % Poloxamer 407 + 1 % Carbopol 974P - G
4-17 % Poloxamer 407 + 1 % Carbopol 974P - G
5-17 % Poloxamer 407 + 1 % Carbopol 974P + PN - G
6-17 % Poloxamer 407 + 1 % Carbopol 974P + PN - G

图 4 泊洛沙姆 407/188 原位凝胶的频率扫描曲线
Fig 4 Frequency scanning of Poloxamer 407/188 in situ gel

$G' > G''$, 说明其弹性固体性质强于液体性质, 具备较好的眼部滞留能力。17% (0.17 g/mL) 泊洛沙姆 407 的 G'' 在低频率区, 随着频率增大而下降, 表明其随着眨眼频率的加快较易损失; 卡波姆 974P 的加入改善了这种情况, 使 G'' 随频率增大稍有增加, 从而改善原位凝胶的眼部保留。

2.3 硝酸毛果芸香碱的 HPLC 法测定

2.3.1 色谱条件与系统适用性^[10]: 采用 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 以 [醋酸钠 2.94 g 与稀醋酸 38.4 mL 加水溶解成 600 mL pH (4.50 ± 0.05)]-甲醇 (90/10) 为流动相; 检测波长: 230 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 进样量 20 μL。理论塔板数按硝酸毛果芸香碱峰计算不低于 1 000。结果见图 5。样品峰与辅料峰和硝酸盐峰均分离良好, 对硝酸毛果芸香碱的测定无干扰。

2.3.2 标准曲线的制定: 取硝酸毛果芸香碱约 25 mg, 精密称定, 置于 50 mL 量瓶中, 加入流动相使之

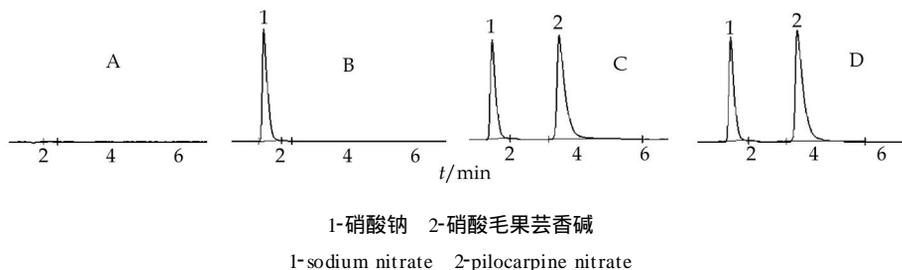


图 5 空白原位凝胶(A)、硝酸钠(B)、硝酸毛果芸香碱原料(C)和硝酸毛果芸香碱原位凝胶(D) HPLC 色谱图

Fig 5 HPLC Chromatograms of blank in situ gel (A), sodium nitrate (B), pilocarpine nitrate raw material (C), and pilocarpine nitrate gel in situ gel (D)

溶解、定容、摇匀,作为对照贮备液。分别精密吸取适量对照贮备液,配制成质量浓度为 2.03、4.07、6.10、8.14、10.17、20.34、50.86 μg/mL 硝酸毛果芸香碱溶液,进样 20 μL,记录色谱图,以峰面积对质量浓度进行线性回归,建立标准曲线方程 $Y = 2505.6 X - 1021.5 (r = 0.9997)$ 。

2.3.3 精密度试验:取硝酸毛果芸香碱对照贮备液重复进样 6 次,以硝酸毛果芸香碱峰面积计算,其 RSD 为 0.97%。

2.3.4 重现性试验:取同一批的硝酸毛果芸香碱原位凝胶 6 份制备供试品溶液,分别取续滤液 20 μL 注入液相色谱仪,记录峰面积,分别计算硝酸毛果芸香碱的质量分数,其 RSD 为 1.17%。

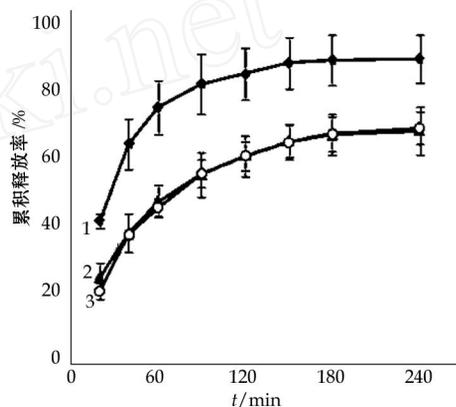
2.3.5 回收率试验:取空白原位凝胶 9 份,每份 5.0 g,精密称定,置于 25 mL 量瓶中。精密称定硝酸毛果芸香碱 40.0、50.0、60.0 mg 各 3 份,分别加入其中,加入流动相使之溶解、定容、摇匀。用 0.45 μm 滤膜滤过,取续滤液 20 μL 注入液相色谱仪,记录峰面积。计算得硝酸毛果芸香碱的平均回收率为 101.0%,RSD 为 1.01%。

2.4 体外释放性能的考察

2.4.1 释放介质的制备^[11]:原位凝胶在滴入结膜囊后至经过角膜或结膜途径被吸收前,会随着眼睑的剪切与泪液充分混合。为了更好地模拟原位凝胶在用药物部位的释药行为,本实验采用人工泪液为体外释放介质。其组成为氯化钠 6.8 g,碳酸氢钠 2.2 g,二水合氯化钙 0.084 g,氯化钾 1.4 g,加去离子水至 1 L。

2.4.2 体外释放试验:采用改良的 Franz 扩散池(TT-6 透皮吸收仪),将剪开的单层透析袋(截留相对分子质量:3 500)放置在供给池和接受池之间,用夹子将供给池和接受池夹紧固定。接受池中注入新配人工泪液,使透析袋内表面完全浸润在其中,二者之间没有气泡。温度控制在结膜温度,即(35.0 ± 0.1),转速 500 r/min。在每个供给池上方垂直滴入 25~30 μL 药液后,计时开始。分别在给药后

20、40、60、90、120、150、180、240 min 取样。取样时沿侧管倾倒入全部 5 mL 接收液,同时补以等体积(35.0 ± 0.1)的人工泪液,确保透析袋内表面浸润在接收液中。样品经 0.45 μm 滤膜滤过后,采用外标法测定质量浓度,计算累积释放率,绘制累积释放率-时间曲线,见图 6。



1-17% Poloxamer 407 + PN 2-17% Poloxamer 407 + 10% Poloxamer 188 + PN 3-17% Poloxamer 407 + 1% Carbopol 974P + PN

图 6 硝酸毛果芸香碱原位凝胶的体外释药曲线
Fig 6 In vitro release curve of pilocarpine nitrate in situ gel

用零级方程、一级方程、Higuchi 方程、Ritger-Peppas 方程对释放曲线进行拟合,结果见表 1。

可见 10% (0.1 g/mL) 泊洛沙姆 188 和 1% (0.01 g/mL) 卡波姆 974P 的加入,都延缓了处方 1 的体外释放。且处方 2、3 的体外释药曲线基本一致。采用改良 Franz 扩散池考察硝酸毛果芸香碱从原位凝胶中的释放,由于单层半透膜对释放没有限制(半透膜截留相对分子质量 3 500 >> 硝酸毛果芸香碱的相对分子质量 271.27),实际上测得的是药物从原位凝胶向接收液的扩散行为。得到的释放曲线具备良好的缓释特性,60、120、180 min 的累积释放率分别为(45.4 ± 4.5)%、(58.2 ± 5.7)%、(64.0 ± 5.7)%。处方 2、3 释放符合 Higuchi 方程。药物的

释放分为两个阶段:首先,凝胶液接触半透膜和释放介质,此时溶液-凝胶转换尚未发生完全,凝胶液的结构为物理缠结的高分子溶液,故其最外层的药物的释放以溶解为主。经过一定时间,原位凝胶完成

溶液-凝胶转变,形成稳定的次级键网状结构,药物的释放变为通过凝胶水性孔道的被动扩散。泊洛沙姆 188 和卡波姆 974P 的加入,使凝胶网状结构的弯曲程度增大、孔隙率增大,从而延缓了药物的释放。

表 1 硝酸毛果芸香碱原位凝胶的体外释放拟合结果

Table 1 Correlaton coefficients of pilocarpine nitrate in situ forming gel

| 编号 | 处 方 | 零级方程 | 一级方程 | Higuchi | Ritger-Peppas |
|----|------------------------------------|---------|---------|---------|---------------|
| 1 | 17%泊洛沙姆 407 + 空白(PN) | 0.894 9 | 0.811 2 | 0.893 0 | 0.930 6 |
| 2 | 17%泊洛沙姆 407 + 10%泊洛沙姆 188 + 空白(PN) | 0.933 9 | 0.898 8 | 0.992 3 | 0.975 2 |
| 3 | 17%泊洛沙姆 407 + 1%卡波姆 974P + 空白(PN) | 0.936 5 | 0.895 8 | 0.992 4 | 0.965 8 |

3 讨论

本实验以硝酸毛果芸香碱为模型药物,对温度敏感型原位凝胶的流变学性质和体外释药特性进行了研究。17% (0.17 g/mL) 泊洛沙姆 407 原位凝胶在室温状态下 $G' < G''$, 体系为物理缠结的聚合物溶液;在 26~27℃ 发生溶液-凝胶转变,在眼表温度下转变为更加稳定的次级键网状结构, $G' > G''$ 。为了模拟原位凝胶在眼睑剪切力作用下的滞留情况,在 35℃ 下测定剪切率在 0~20 Hz 变化时,原位凝胶的黏弹性模量。结果各组均表现为 $G' > G''$, 说明其弹性固体性质强于液体性质,具备较好的眼部滞留能力。因此,流变学性质考察不仅可以提供样品的黏度数据,还可以从液、固两态的性质出发,得到样品的物态和结构信息,从而预测原位凝胶的眼部保留能力。

含有 17% (0.17 g/mL) 泊洛沙姆 407 和 10% (0.10 g/mL) 泊洛沙姆 188 或 1% (0.01 g/mL) 卡波姆 974P 的硝酸毛果芸香碱原位凝胶,在 4 h 内缓慢释放主药,体外释药行为符合 Higuchi 方程, $r = 0.992 3$, 说明药物的释放为骨架型扩散,进一步证明了原位凝胶网状结构的存在。

硝酸毛果芸香碱原位凝胶在室温下为自由流动的液体,流变曲线符合牛顿流体,利于配制、储存和给药。眼表温度下转变为宾汉姆流体(Bingham plastic),具有一定屈服值,能够在一定程度上对抗眼睑的频繁剪切。然而仅在体外进行评价是不够的,眼部特殊的生理环境仍对原位凝胶的缓释作用提出挑战,原位凝胶能否在泪液的冲刷、眨眼的剪切等排异反应下达到足够的眼部保留时间,是原位凝

胶发挥缓释作用的先决条件。因此进一步对眼部滞留时间和程度进行在体评价,建立原位凝胶流变学与眼部滞留能力的相关关系,是这一给药系统后续研究的重点。

参考文献:

- [1] Deepta G, Henry F E. Ocular drug delivery [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2006, 3(2):275-287.
- [2] 许海玉,张铁军,赵平,等. 中药缓控释剂研究现状及研发思路[J]. *药物评价研究*, 2010, 33(1):27-32.
- [3] SivaNaga S A, Yashveer S, Dayuan G, et al. Design and evaluation of novel fast forming pilocarpine-loaded ocular hydrogels for sustained pharmacological response [J]. *J Contr Rel*, 2009, 137:152-159.
- [4] Dirk S. Thermo- and pH-responsive polymers in drug delivery [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2006, 58:1655-1670.
- [5] Katarina E, Johan C, Kaisa H. Rheological evaluation and ocular contact time of some carbomer gels for ophthalmic use [J]. *Int J Pharm*, 1996, 137:233-241.
- [6] Nanjawade B K, Manvi F V, Manjapp A S. In situ-forming gels for sustained ophthalmic drug delivery [J]. *J Contr Rel*, 2007, 112:119-134.
- [7] Jens C, Annick L. Optimisation of carbomer viscous eye drop: an in vitro experimental design approach using rheological techniques [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2002, 54:41-50.
- [8] Katarina E, Johan C, Roger P. Rheological evaluation of poloxamer as a in situ gel for ophthalmic use [J]. *Eur J Pharm Sci*, 1998, 6:105-112.
- [9] Gang W, Hui X, Ping T D, et al. Thermosetting gels with modulated gelation temperature for ophthalmic use: the rheological and gamma scintigraphic studies [J]. *J Contr Res*, 2002, 83:65-7.
- [10] 中国药典[S]. 二部. 2005.
- [11] Hagerstrom H, Paulsson M, Edsman K. Evaluation of mucoadhesion for two polyelectrolyte gels in stimulated physiological conditions using a rheological method [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2000, 9(3):301-309.