

甲氨蝶呤温敏凝胶的处方优化与体外释药特性研究

季可非^{1,2*}, 刘宏^{1#}, 郭敏^{1,2}, 熊康萍^{1,2}, 周萌萌^{1,2}, 郭偲^{1,2}(1.广州军区武汉总医院药剂科, 武汉 430070; 2.湖北中医药大学药学院, 武汉 430065)

中图分类号 R943;R927.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)22-3136-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.22.33

摘要 目的:优化甲氨蝶呤温敏凝胶的处方,并研究其体外释药特性。方法:以聚乳酸-羟基乙酸共聚物/聚乙二醇/聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA-PEG-PLGA)为基质,以甘露醇为黏度调节剂,制备甲氨蝶呤温敏凝胶。以胶凝温度与35℃偏差的绝对值为指标,以PLGA-PEG-PLGA、甲氨蝶呤及甘露醇的浓度为因素,通过正交试验优化其处方。采用透析袋法考察甲氨蝶呤温敏凝胶和甲氨蝶呤溶液的体外累积释放度。结果:最优处方为PLGA-PEG-PLGA浓度20%、甲氨蝶呤0.10%、甘露醇0.10%。所制备的3批甲氨蝶呤温敏凝胶的胶凝温度分别为35.1、35.0、35.0℃,平均载药率均达90%以上,12d的累积释放度达90%以上($r=3$),而甲氨蝶呤溶液240h时已基本释放完全。结论:成功制得具有缓释作用的甲氨蝶呤温敏凝胶,且工艺简单可行。

关键词 聚乳酸-羟基乙酸共聚物/聚乙二醇/聚乳酸-羟基乙酸共聚物;甲氨蝶呤;温敏凝胶;正交设计试验;体外释药

Formulation Optimization and *in vitro* Release Property Study of Methotrexate Thermosensitive Hydrogels

Ji Kefei^{1,2}, Liu Hong¹, Guo Min^{1,2}, Xiong Kangping^{1,2}, Zhou Mengmeng^{1,2}, Guo Si^{1,2}(1.Dept. of Pharmacy, Wuhan General Hospital of Guangzhou Military Command, Wuhan 430070, China; 2.College of Pharmacy, Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the formulation of Methotrexate thermosensitive hydrogels, and to study the *in vitro* release property of it. METHODS: Taking PLGA-PEG-PLGA as matrix and mannitol as viscosity modifiers, Methotrexate thermosensitive hydrogels were prepared. Using the absolute value of the deviation of gelation temperature between 35℃, its formulation was optimized by orthogonal test using the concentrations of PLGA-PEG-PLGA, methotrexate and mannitol as factors. The dialysis bag method was used to investigate accumulative release rate of Methotrexate thermosensitive hydrogels and methotrexate solution within 336 h *in vitro*. RESULTS: The optimal formulation was as PLGA-PEG-PLGA of 20%, methotrexate of 0.10% and mannitol of 0.10%; gelation temperature were 35.1, 35.0, 35.0℃. The average drug-loading rate was more than 90%. 12 d accumulative release rate was more than 90% ($r=3$). Methotrexate solution has been substantially completely released within 240 h. CONCLUSIONS: Methotrexate thermosensitive hydrogels with sustained-release are prepared successfully, and the preparation technology is simple and practical.

KEYWORDS PLGA-PEG-PLGA; Methotrexate; Thermosensitive hydrogel; Orthogonal test; *in vitro* release

甲氨蝶呤(Methotrexate, MTX)为广谱的抗代谢类抗肿瘤药,临床上也用于急性白血病、类风湿性关节炎(Rheumatoid arthritis, RA)等的治疗,并已作为RA治疗的首选药物之一^[1]。MTX早期用于治疗RA时多为口服给药,一方面抑制中性粒细胞发挥抗炎作用,另一方面抑制免疫系统的活性以进行免疫调节,两者产生协同作用最终使得关节滑膜组织胺含量减少而改善患者症状。然而,RA作为一种慢性免疫性疾病,需长期给药,很多患者因为MTX严重的副作用不得不停药。为解决此难题,自20世纪70年代起MTX开始被用于关节腔注射,旨在发挥较好的局部作用、迅速起效,但MTX从关节腔清除速度快,关节腔注射MTX注射液可认为是无效的^[2],且易渗漏而引起全身吸收。长期、频繁地注射给药也降低了患者的依从性,甚至造成关节感染。因此近年来,用于关节腔注射的MTX缓释体系逐渐受到人们的重视。

当前已有学者采用左旋聚乳酸(PLLA)^[3]、聚乳酸-聚羟基乙酸共聚物(PLGA)^[4]为载体制备关节腔注射用缓释微球,但

微球制剂往往存在严重的突释现象,且注射初期会产生急性炎症反应,炎症的产生是否与微球的粒径等因素有关尚不明确。

PLGA-聚乙二醇-PLGA(PLGA-PEG-PLGA)为一类能响应温度变化且对难溶药物具有增溶作用的两亲性嵌段共聚物^[5],即在低温下为可自由流动的液体,而达到相变温度时由于聚合物链中亲水段的氢键作用减弱,分子结构收缩而导致水分子被挤出,凝胶相变为半固体状。本研究选用PLGA-PEG-PLGA为载体,采用物理混合法,制备可供关节腔注射的MTX温敏凝胶,并研究了其体外释放特性。

1 材料

1.1 仪器

1200型高效液相色谱仪、1314B型可变波长紫外检测器(美国Agilent公司);AB204-N型电子天平(德国Sartorius公司)。

1.2 药品与试剂

MTX对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100138-201104,纯度:99.4%);注射用MTX(江苏恒瑞医药股份有限公司,批号:14070415,规格:每支0.1g);甘露醇、氯化钠(国药集团化学试剂有限公司,批号:20121211、20120416);PLGA-PEG-PLGA[济南岱罡生物技术有限公司,丙交酯(LA)-乙交酯(GA)比例:75:25];甲醇为色谱纯。

* 硕士研究生。研究方向:药物新制剂、新剂型和新技术。E-mail:393852596@qq.com

通信作者:主任药师,博士。研究方向:药物新制剂、新剂型和新技术。电话:027-68878601。E-mail:honguil@163.com

2 方法与结果

2.1 MTX温敏凝胶的制备

精密称取适量PLGA-PEG-PLGA于烧杯中,滴加蒸馏水至10 ml,于冰浴中磁力搅拌至完全溶胀,形成澄清且可自由流动的聚合物溶液。加入适量MTX、黏度调节剂甘露醇、等渗调节剂氯化钠0.09 g于上述溶液中,反复搅拌使溶解均匀后,置于4℃冰箱中过夜,待形成颜色均一的黄色澄清溶液后用0.45 μm微孔滤膜过滤^[6]。将制得的凝胶置于西林瓶中,采用⁶⁰Co辐射灭菌法(6 kGy)灭菌,即制得MTX温敏凝胶。

2.2 胶凝温度的测定

通过倒置试管法测定MTX温敏凝胶的胶凝温度^[7]。分别取不同质量浓度的MTX温敏凝胶3 ml于试管中,插入温度计,将试管置于水浴锅中,缓慢升温。每升高1℃后维持该温度5 min,倒置试管,若凝胶由流动状态变为不流动状态即为胶凝,记录此时的温度。平行测定3组,取平均值。

2.3 单因素试验优化处方

2.3.1 PLGA-PEG-PLGA对胶凝温度的影响 按“2.1”项下方法分别制备PLGA-PEG-PLGA浓度为18%、20%、25% (g/ml)的MTX温敏凝胶,分别照“2.2”项下方法测定其胶凝温度。结果显示,随着PLGA-PEG-PLGA浓度的增加,MTX温敏凝胶的胶凝温度呈下降趋势(36.1~33.3℃)。

2.3.2 氯化钠对胶凝温度的影响 为使MTX温敏凝胶更适宜关节腔注射给药,本研究在凝胶中加入等渗调节剂氯化钠。当其他各组分含量不变时,使氯化钠浓度由0增加至0.9% (g/ml),考察MTX温敏凝胶胶凝温度的变化。结果显示,随着氯化钠浓度的增加,胶凝温度略有降低,但下降程度不具有显著差异($P>0.05$,数据略)。故选择常用的0.9%的氯化钠作为等渗调节剂。

2.3.3 甘露醇对胶凝温度的影响^[8] 按“2.1”项下方法分别制备甘露醇浓度由0增加至0.50% (g/ml)的MTX温敏凝胶,分别测定其胶凝温度。结果显示,随着甘露醇浓度的增加,胶凝温度有所上升(33.3~37.0℃)。

2.4 正交设计试验优化处方

本试验参考临床中MTX用于关节腔注射的常用治疗剂量^[9],选取了高、中、低3个浓度(0.30%、0.20%、0.10%),以考察MTX浓度对胶凝温度的影响。另外,根据单因素试验结果,以0.9%的氯化钠为等渗调节剂,以PLGA-PEG-PLGA(A,%)、MTX(B,%)和甘露醇(C,%)的用量为考察因素,为满足MTX温敏凝胶在关节腔注射后可在关节腔内迅速形成原位凝胶,选取胶凝温度稍低于人体体温(37℃)的35℃(预试验表明,35℃下凝胶胶凝时间较短,同时在注射过程中不会发生胶凝)为最优温度,以测得的胶凝温度与35℃的偏差(| $T-35$ |)为指标,偏差越小越好。每个因素选取3个水平,按 $L_9(3^3)$ 正交表进行试验^[10]。因素与水平见表1,正交设计试验结果见表2,方差分析结果见表3。

表1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

水平	因素		
	A(PLGA-PEG-PLGA), %	B(MTX), %	C(甘露醇), %
1	18	0.10	0.10
2	20	0.20	0.20
3	25	0.30	0.40

表2 正交试验设计与结果

Tab 2 Design and results of orthogonal test

序号	A, %	B, %	C, %	$T-35$, °C
1	18	10	5	1.2
2	18	20	10	2.0
3	18	30	20	2.5
4	20	10	10	0
5	20	20	20	0.5
6	20	30	5	0.2
7	25	10	20	1.0
8	25	20	5	0.0
9	25	30	10	0.5
K_1	1.6	0.7	0.5	
K_2	0.2	0.8	0.8	
K_3	0.5	0.7	1.0	
R	1.4	0.1	0.5	

表3 方差分析结果

Tab 3 Results of variance analysis

变异来源	离均差平方和	自由度	均方	F	P
A	4.81	2	2.4	27.39	<0.05
B	0.18	2	0.09	1	>0.05
C	1.14	2	0.57	6.47	>0.05
D(误差)	0.18	2	0.09		

注: $F_{0.05}(2,2)=19.00$

Note: $F_{0.05}(2,2)=19.00$

由表2可知,各因素对胶凝温度的影响顺序为A>C>B。由表3可知,因素A即聚合物浓度对胶凝温度有显著影响($P<0.05$)。综合考虑,最优处方为A₂B₁C₁,即PLGA-PEG-PLGA为20%,MTX为0.10%,甘露醇为0.10%。按最优处方制备3批样品,测定其胶凝温度分别为35.1、35.0、35.0℃。

2.5 体外释药特性考察

2.5.1 释放条件的选择 根据关节腔内环境及组成,在37℃恒温空气振荡浴中进行MTX温敏凝胶的体外释放试验;由于MTX在纯水中溶解性较差,而在磷酸盐缓冲液(PBS, pH为7.4)中可充分溶解,且溶解度满足漏槽条件,所以释放介质选为PBS(pH 7.4);转速为75 r/min。

2.5.2 检测波长的选择 按“2.1”项下方法制备空白聚合物凝胶,将MTX与空白聚合物凝胶分别溶解于释放介质中,超声5 min,0.45 μm微孔滤膜过滤,取滤液在180~400 nm波长范围内进行扫描。结果显示,MTX在303 nm波长处有最大吸收,且辅料对其吸收无影响,故检测波长确定为303 nm。

2.5.3 方法学考察 采用高效液相色谱法测定MTX的含量。色谱柱为依利特C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-磷酸二氢钠(10 mmol/L)(25:75),流速为1.0 ml/min,检测波长为303 nm,进样量为20 μl,柱温为40℃^[5]。按相关方法学考察,结果显示,MTX峰面积(A)对其质量浓度(c)进行回归分析的标准曲线为 $A=845\ 680c+122\ 337$ ($r=0.999\ 8$, $n=5$),线性范围为0.25~160 μg/ml;100、60、40 μg/ml MTX标准溶液的回收率分别为(99.85±0.58)%、(99.62±0.44)%、(99.85±0.28)%,日内RSD分别为0.68%、0.82%、0.56%,日间RSD分别为0.88%、0.96%、1.12%;在转速75 r/min的37℃恒温空气振荡浴中放置14 d,MTX的含量无明显变化,符合方法学要求。

2.5.4 累积释放度考察 取按“2.4”项下筛选的最优处方制备的MTX温敏凝胶和MTX溶液(PBS, pH 7.4)各1 ml,置于经预

处理过的透析袋内,放入洁净的试管中,置于37℃恒温空气振荡浴中,待其完全胶凝后加入30 ml释放介质。控制温度在(37±1)℃,转速为75 r/min,分别于0.5、1、2、4、8、12、24、48、72、96、120、144、168、192、216、240、264、288、312、336 h取出2 ml释放液并补充等量新鲜介质,轻轻摇匀。将取出的释放液用流动相稀释,并经0.45 μm微孔滤膜过滤后按“2.5.3”项下色谱条件进样测定MTX含量,计算累积释放度,绘制释放曲线。MTX温敏凝胶和MTX溶液的释放曲线见图1。

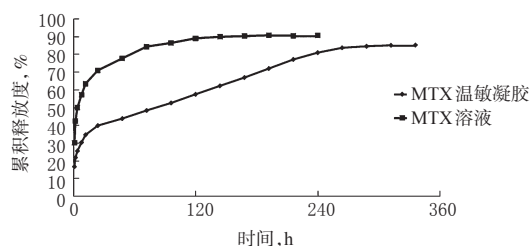


图1 MTX温敏凝胶和MTX溶液的释放曲线

Fig 1 Release curve of MTX thermosensitive hydrogel and MTX solution

图1结果表明,最优处方的MTX温敏凝胶可持续释放药物12 d(288 h)左右,且释放度可达90%以上。

2.6 载药量的测定

按最优处方制备3批样品,精密量取1 ml,置于100 ml量瓶中,用PBS(pH 7.4)稀释,超声至完全溶解。取适量用0.45 μm微孔滤膜过滤,取续滤液进样测定MTX含量,计算载药量[载药量(%)=MTX含量/凝胶总质量×100%]。结果显示,3批MTX温敏凝胶的载药量分别为(91.59±0.54)%、(91.83±0.35)%、(92.37±0.63)%。

3 讨论

本文采用PLGA-PEG-PLGA为凝胶基质制备的温敏凝胶在室温及低于室温时为可自由流动的液体,而注射进入关节腔后可因环境温度的升高而在注射部位发生相变形成半固体的凝胶状,使药物储库在关节腔得以缓慢释放药物。且该PLGA-PEG-PLGA共聚物为医用材料,在体内降解后产生乳酸、羟基乙酸和PEG,其中酸性产物二氧化碳和水通过体内代谢吸收,而PEG则经肾脏排泄^[11],生物相容性良好。

有研究表明,难溶性药物如吡哆美辛^[12]在PLGA-PEG-PLGA中的溶解度与水中的溶解度相比有明显增加。这是由于该共聚物在水溶液中将形成以亲水链为外壳、疏水链为内核的球状胶束,将疏水性药物包裹在内,提高了疏水性药物在共聚物溶液中的溶解度。MTX在水中几乎不溶,溶解度<1 mg/ml(19℃),而在稀酸、稀碱溶液中易溶,笔者采用PLGA-PEG-PLGA作为凝胶载体,使制剂中MTX含量达到1 mg/ml。预试验表明制得的聚合物溶液pH为5.2,符合注射剂的质量要求,且可对MTX实现良好的增溶作用,制得的MTX温敏凝胶载药量可达90%以上;同时避免了有机溶剂的使用,降低了该剂型的毒副作用。

由于PLGA-PEG-PLGA的胶凝温度为35℃左右,常用的注射剂灭菌方法如热压灭菌法会使该载体材料变性,故本研

究选用⁶⁰Co辐射灭菌法灭菌。该法可在常温下进行,且穿透力强,灭菌前后制剂的胶凝温度、载药量及体外释放度均无显著性差异,为该制剂的生产及临床应用奠定了基础。

参考文献

- [1] Song X, Liang F, Liu N, *et al.* Construction and characterization of a novel DNA vaccine that is potent antigen-specific tolerizing therapy for experimental arthritis by increasing CD4⁺CD25⁺Treg cells and inducing Th1 to Th2 shift in both cells and cytokines[J]. *Vaccine*, 2009, 27(5): 690.
- [2] Wigginton S, Chu BC, Weisman MH, *et al.* Methotrexate pharmacokinetics after intraarticular injection in patients with rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 1980, 23(1):119.
- [3] Liang LS, Jackson J, Min W, *et al.* Methotrexate loaded poly(L-lactic acid) microspheres for intra-articular delivery of methotrexate to the joint[J]. *J Pharm Sci*, 2004, 93(4):943.
- [4] 莫丽都尔,陈汉,李学敏,等.关节腔注射用MTX缓释微球的制备及体内外释药研究[J].中国新药杂志,2007,16(15):1187.
- [5] 魏亚超,刘皈阳.温敏水凝胶在药物缓控释技术中的应用[J].中国新药杂志,2011,20(9):791.
- [6] 王浩,盛玉山,刘影.紫杉醇脂质体PLGA-PEG-PLGA水凝胶的制备与酶解释药[J].辽宁医学院学报,2013,34(2):68.
- [7] Liu CB, Gong CY, Pan YF, *et al.* Synthesis and characterization of a thermosensitive hydrogel based on biodegradable amphiphilic PCL-Pluronic(L35)-PCL block copolymers[J]. *Colloids Surfaces A*, 2007, 302(1/2/3):430.
- [8] 高萌,田舸,赵薇,等.瘤内注射用醋酸奥曲肽温敏凝胶的处方筛选[J].中国药房,2011,22(41):3886.
- [9] 马健.甲氨蝶呤治疗类风湿性关节炎60例的观察和护理[J].中国误诊学杂志,2010,10(32):8036.
- [10] 梁浩明,龙晓英,卢彬.黄芩苷外用温敏凝胶的处方设计及优化[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(24):34.
- [11] Yu L, Zhang Z, Zhang H, *et al.* Biodegradability and biocompatibility of thermoreversible hydrogels formed from mixing a sol and a precipitate of block copolymers in water[J]. *Biomacromolecules*, 2010, 11(8):2169.
- [12] Qiao MX, Chen DW, Ma XC, *et al.* Injectable biodegradable temperature-responsive PLGA-PEG-PLGA copolymers: synthesis and effect of copolymer composition on the drug release from the copolymer-based hydrogels[J]. *Int J Pharm*, 2005, 294(1/2):103.

(收稿日期:2015-08-20 修回日期:2015-10-12)

(编辑:邹丽娟)