

分类号: R94

单位代码: 10183

研究生学号: 2018344017

密 级: 公 开



吉 林 大 学

硕 士 学 位 论 文

(专业学位论文)

雌二醇成膜凝胶的制备及其药代动力学的初步研究
Preparation and pharmacokinetics study of Estradiol
film-forming Gel

作者姓名: 潘 悦

类 别: 工程硕士

领域(方向): 新型给药系统

指导教师: 谢晶 教授

培养单位: 生命科学学院

2021 年 5 月

雌二醇成膜凝胶的制备及其药代动力学研究
Preparation and pharmacokinetics study of Estradiol
film-forming Gel

作者姓名：潘悦

领域（方向）：新型给药系统

指导教师：谢晶 教授

类别：工程硕士

答辩日期：2021年5月26日

吉林大学硕士学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交学位论文，是本人在指导教师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名： 谢锐

日期：2021年5月26日

中文摘要

雌二醇是一种甾体激素药物，在临床中主要应用于缓解女性因更年期引起的不适、预防因缺血而引起的心血管疾病、防治骨质疏松症，另外对于治疗早期老年痴呆也有一定得功效。雌二醇对于治疗女性身体由于缺乏雌激素或雌激素大幅度的波动引发的一系列女性疾病（月经周期、孕期、更年期）具有较好的效果。目前，口服、注射这两种方法广泛应用于临床治疗，但由于药物吸收效果不佳以及给药方式不便等副作用的影响，使其应用的范围受到了局限。一种新型的外用制剂—成膜凝胶，不但可以使其对肠胃以及消化的副作用降低到最小，并且可以避免口服药物所引起的肝首过效应。外用涂抹在皮肤可快速成膜，简单便捷，并可能大幅度的提高药物利用度。因此，本研究的出发点是为了得到药效好且具有良好外观特征的成膜型凝胶，研究内容包括以下四部分：

1. 雌二醇体外质量分析方法建立

根据《中国药典》（2015）确定雌二醇的检测方法以雌二醇的质量标准为参考，利用 HPLC 法进行验证。实验表明，0.5~200.0 $\mu\text{g/mL}$ 范围内雌二醇有较好的线性关系；精密度 RSD 值为 1.31%；重复性 RSD 值为 0.09%；加样回收率为 99.20~104.70%。结果表明，此方法实验数据准确，可以良好的检测出雌二醇的含量。

2. 雌二醇成膜凝胶的制备

建立雌二醇成膜凝胶评分标准，确定凝胶制备的材料以及用量，选取三个对雌二醇成膜凝胶影响较大的因素，分别为卡波姆、雌二醇及乙醇的含量。用响应面法对雌二醇成膜凝胶的最优处方进行进一步的优化验证。得到雌二醇成膜凝胶制备的最优处方为：卡波姆的用量为 0.11%、聚乙烯吡咯烷酮为 0.25%、甘油为 0.10%、乙醇为 5.24%、月桂氮卓酮 0.40%、羟苯乙酯为 0.05%、雌二醇提取液为 0.02%，其余为去离子水 3.83%。

3. 雌二醇成膜凝胶质量标准研究

本研究对雌二醇成膜凝胶进行质量评价，结果表明，雌二醇成膜凝胶可快速成膜、粘度适中、70 s 左右可形成薄膜状覆盖在表面；pH 值在 5.92~6.40 之间，

粘度为 8.97~9.36 Pa·s, 粒度小于 180 μm 。通过稳定性试验得知, 在 60 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 雌二醇成膜凝胶不耐高温、在 4500 \pm 500 lx 条件下, 不耐强光, 在高湿条件下 (92.5%, 25 $^{\circ}\text{C}$), 无明显变化; 在 30 \pm 2 $^{\circ}\text{C}$ 、湿度为 60 \pm 5% 时雌二醇凝胶稳定性良好。

4. 雌二醇成膜凝胶药效评价

通过对雌二醇成膜凝胶的初步药代动力学的研究得知, 涂抹雌二醇成膜凝胶后, 10 h 之前血药浓度上升较快, 10 h 达到体内给药血药浓度最高值, 血药浓度在 24 h 后平稳, 缓慢的降低至正常水平。通过测量大鼠体内的血药浓度中雌二醇含量的结果显示, 大鼠用药 10 h 后雌二醇浓度的含量为 77.05%, 而对照组大鼠体内雌二醇的血药浓度仅为 23.95%, 具有较明显的差异。从血药浓度的趋势可以看出, 雌二醇成膜凝胶能够达到缓控释药, 体内的渗透并保持血药浓度平稳的特点。

综上所述, 本研究制备的雌二醇成膜凝胶具有良好的外观以及性状, 成膜时间短, 凝胶粘度适中且细腻, 能够缓控释药, 保持血药浓度平稳。

关键词:

雌二醇、成膜凝胶、质量标准、药代动力学

Abstract

Estradiol is a steroidal hormone drug. In clinical application, it is mainly used to relieve women's discomfort caused by menopause, prevent cardiovascular diseases caused by ischemia in advance, prevent and cure osteoporosis, and also has certain effect on the treatment of early senile dementia. Estradiol is used to treat the lack of estrogen in the female body or the large fluctuations in estrogen, which can lead to a number of female diseases that cause physical discomfort (menstrual cycle, pregnancy, menopause). At present, oral and injection methods are widely used in clinical treatment, but due to some side effects, the scope of their application is limited. A new type of topical preparation, film-forming gel, not only minimizes its gastrointestinal and digestive side effects, but also avoids the first-pass effect of oral drugs. Topical application on the skin can quickly film, simple and convenient, and may greatly improve the availability of drugs. Therefore, the starting point of this study is to obtain a film-forming gel with good efficacy and good appearance characteristics. The research content includes the following four parts:

1. Establishment of methodology for in vitro analysis of estradiol

According to the Chinese Pharmacopoeia (2015), the determination method of estradiol was based on the quality standard of estradiol, and the HPLC method was used for verification. The results showed that the linear relationship of estradiol in the range of 0.5~200.0 $\mu\text{g/mL}$ was good. $y = 118547x + 640474$ was the linear regression equation, $R^2 = 0.9995$. RSD of precision was 1.31%. The reproducibility RSD was 0.09%. 99.20~104.70% was the recoveries. The results showed that this method was accurate and could detect the content of estradiol well.

2. Preparation of estradiol film-forming gel.

The scoring standard of estradiol film-forming gel was established to determine the material and dosage of the gel. Three factors that had great influence on estradiol film-forming gel were selected, which were the content of carbopol, estradiol and ethanol. Then, response surface methodology was used to optimize the estradiol film-forming gel. Carbopol was 0.11%, PVP was 0.25%, glycerin was 0.10%, ethanol was 5.24%, laurazeptron was 0.40%, ethyl hydroxyethyl benzoate was 0.05%, estradiol extract was 0.02%, and the rest was deionized water 3.83% as the final prescription.

3. Study on quality standard of estradiol film-forming gel

This study evaluated the quality of estradiol film-forming gel. The results showed that the estradiol film-forming gel could form a thin film covering on the surface 70s or so, with rapid film-forming, moderate viscosity. The pH value is 5.92~6.40, the viscosity is 8.97~9.36 Pa·s, and the particle size is less than 180 μm. The stability test results show that at 60°C, estradiol film forming gel can not withstand high temperature, at 4500±500 lx, can not withstand strong light, 92.5%, 25°C at high humidity, no obvious change; The estradiol gel had good stability at 30±2°C and 60±5% humidity.

4. Efficacy evaluation of estradiol film-forming gel

According to the preliminary study on the pharmacokinetics of the estradiol film-forming gel, the blood drug concentration rose rapidly before 10 h after the application of the estradiol film-forming gel, reached the maximum value of the blood drug concentration in vivo at 10 h, and the blood drug concentration was stable and slowly reduced to the normal level after 24 h. The results of measuring the estradiol content in the blood of rats showed that the estradiol concentration in the rats was 77.05% after 10 h of administration, while the estradiol concentration in the blood of the control group was only 23.95%, showing a significant difference. It can be seen from the trend of blood drug concentration that estradiol film-forming gel can achieve the characteristics of slow and controlled drug release, penetration in vivo and stable blood drug concentration. In conclusion, the estradiol film-forming gel prepared in this study has good appearance and properties, short film-forming time, moderate gel viscosity and exquisite. Through the study of the pharmacodynamics of estradiol membrane gel, the drug can be released slowly and controlled, and the blood drug concentration can be kept stable.

Key words:

Estradiol、Film-forming Gel、Quality Standards、Pharmacokinetics

目 录

第 1 章 前言	1
1.1 雌二醇	1
1.1.1 雌二醇简介	1
1.1.2 雌二醇应用及研究现状	1
1.2 经皮给药系统	2
1.2.1 经皮给药系统简介	2
1.2.2 经皮给药系统吸收途径	3
1.2.3 经皮给药的体外评价	3
1.3 经皮给药系统研究现状	4
1.4 凝胶剂	5
1.4.1 亲水性凝胶	5
1.4.2 亲脂性凝胶	6
1.4.3 新型凝胶剂	6
1.5 研究意义及研究内容	7
第 2 章 雌二醇体外质量分析方法的建立	9
2.1 仪器与试剂	9
2.1.1 仪器	9
2.1.2 材料与试剂	9
2.2 实验方法	9
2.2.1 雌二醇溶液的制备	9
2.2.2 雌二醇含量测定方法的建立	10
2.2.3 方法学验证	10
2.2.4 雌二醇药典鉴定	11
2.3 结果与讨论	11

2.3.1 雌二醇含量测定方法的建立.....	11
2.4 本章小结.....	14
第3章 雌二醇成膜凝胶的制备及处方优化.....	15
3.1 材料与仪器.....	15
3.1.1 仪器.....	15
3.1.2 材料与试剂.....	15
3.1.3 实验动物.....	16
3.2 实验方法.....	16
3.2.1 雌二醇成膜凝胶处方初步筛选.....	16
3.2.2 离体鼠皮的制备.....	19
3.2.3 体外透皮实验.....	19
3.2.4 雌二醇成膜凝胶制备工艺探究.....	20
3.2.5 雌二醇成膜凝胶的优化处方.....	21
3.2.6 凝胶最终处方.....	21
3.3 结果与讨论.....	21
3.3.1 凝胶处方初步筛选.....	21
3.3.2 制备雌二醇成膜凝胶工艺探究.....	33
3.3.3 处方优化分析.....	33
3.3.4 雌二醇成膜凝胶最终处方.....	37
3.4 本章小结.....	38
第4章 雌二醇凝胶的体外释放和质量标准研究.....	39
4.1 仪器与试剂.....	39
4.1.1 仪器.....	39
4.1.2 试剂.....	40
4.2 方法.....	40
4.2.1 体外释放度测定.....	40
4.3 雌二醇成膜凝胶理化性质的探究.....	40

4.3.1	感官探究.....	40
4.3.2	成膜性探究.....	40
4.3.3	酸碱度探究.....	41
4.3.4	粒度探究.....	41
4.3.5	粘度探究.....	41
4.4	雌二醇成膜凝胶稳定性探究.....	41
4.4.1	高温试验.....	41
4.4.2	高湿试验.....	41
4.4.3	光照试验.....	41
4.4.4	加速试验.....	41
4.5	结果与讨论.....	42
4.5.1	体外释放度测定的方法学研究.....	42
4.5.2	雌二醇成膜凝胶理化性质的探究.....	43
4.5.3	雌二醇成膜凝胶稳定性结果.....	45
4.6	本章小结.....	47
第 5 章 雌二醇成膜凝胶的初步药代动力学研究		48
5.1	仪器与试剂.....	48
5.1.1	仪器.....	48
5.1.2	材料与试剂.....	48
5.1.3	实验动物.....	48
5.2	实验方法.....	49
5.2.1	标准品溶液的制备.....	49
5.2.2	雌二醇血药含量测定方法.....	49
5.2.3	大鼠血药浓度实验.....	49
5.2.4	统计分析.....	49
5.3	实验结果与讨论.....	50
5.3.1	标准曲线的绘制.....	50
5.3.2	血药浓度测定结果.....	50

5.3.3 大鼠体内雌二醇含量的药代动力学研究.....	52
5.4 实验结果与讨论.....	52
5.5 本章小结.....	52
第6章 结论与展望.....	54
6.1 结论.....	54
6.2 展望.....	55
参考文献.....	56
作者简介.....	63
致 谢.....	64

缩略词索引表

英文缩写	英文全称	中文全称
E ₂	Estradiol	雌二醇
E ₂ Gel	Estradiol film forming gel	雌二醇成膜凝胶
RA	Rheumatoid Arthritis	类风湿性关节炎
CHD	Coronary atherosclerotic Heart Disease	冠状动脉粥样硬化性心脏病
TDDS	Transdermal Drug Delivery System	经皮给药系统
TTS	Transdermal Therapeutic System	透皮治疗
CMC-Na	Sodium carboxymethyl cellulose	羧甲基纤维素钠
HPC	Hypromellose	羟丙甲纤维素
PVP	Polyvinyl pyrrolidone	聚乙烯吡咯烷酮
PVA	Polyvinyl alcohol	聚乙烯醇
PG	Propylene glycol	丙二醇
NMP	N-Methyl pyrrolidone	N-甲基吡咯烷酮
HPLC	High performance liquid chromatography	高效液相色谱仪

第1章 前言

1.1 雌二醇

1.1.1 雌二醇简介

雌二醇（Estradiol）^[1]属于甾体激素药物，包括 α 和 β 两种类型，其获得方式为猪的卵巢、婴儿胎盘、妊娠尿液等具有雌性激素的物质，难溶于水，略溶于乙醇，生物活性较强。雌二醇可以通过皮肤吸收作用于全身，可用于治疗因体内17- β 雌二醇缺乏而引起的疾病^[2]。雌二醇主要存在于卵巢内，直接作用于女性的靶器官，可以维持女性体内雌激素水平、保证女性第二性征、防止体内内分泌失衡。

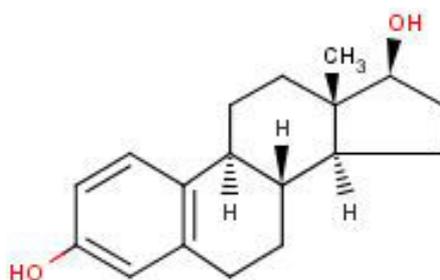


图 1.1 17- β 雌二醇的结构式
Figure 1.1 (17beta-Estradiol)

1.1.2 雌二醇应用及研究现状

雌二醇常见的给药方式包含口服、注射给药，因其具有肝受过效应，给药不便，难以吸收等特点，因此经皮给药成为了新型给药的亮点。国外现阶段研发的贴剂雌二醇药物治疗时间可达一周，贴剂药物需一定的载体承担，且给药地点固定，患者可能长时间贴用引起皮肤过敏红肿等现象。因此本实验研发出一款对人体皮肤任意部位进行正常涂抹给药、药物可快速吸收、使用方便便捷，无副作用的针对治疗女性体内雌激素缺乏的雌二醇药物。

雌二醇临床上有两种表现形式，这两种表现方式会产生相应的临床症状，一为含量增加，二为含量减少^[3]。相对应的临床症状如：女性在怀孕期间体内雌二醇含量增加，导致情绪异常波动、身体处于亚健康状态^[4, 5]；女性在更年期时体

内雌二醇含量较低,会产生失眠、盗汗、心悸等不良症状,所以临床上会对上述两种状况进行相应的调节治疗^[6-8]。

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)^[9]会受体内雌激素的高低而影响,是一种多关节炎症,破坏关节软骨,临床表现为关节损坏、肿痛以及组织异常增生,继而还会发生关节间隙之间变窄。目前,研究资料显示,很多大龄女性患有类风湿性关节炎,其原因是大龄女性停经后体内的雌激素含量大幅度减少;而在怀孕女性中,患有类风湿性关节炎的数量明显减少^[10, 11]。R Sapir 等研究表明,在类风湿性关节炎的发病过程中,性激素的含量对体内免疫系统起着一定的影响,从而说明类风湿性关节炎可能受体内雌激素的高低而控制^[12]。

冠状动脉粥样硬化性心脏病^[13]与体内雌激素的高低有关,是一种因血管变窄或发生堵塞从而导致的心脏病^[14]。目前,研究资料显示,男性与女性患者患病的规律有所不同,通过对比相同年龄范围的男性和女性患者,女性患者远多于男性,而在女性患者中,患者的发病率绝经后远高于绝经前。在大龄女患者中,通过体外给药或口服给与雌二醇的方式,使体内的雌激素保持正常水平,控制冠状动脉粥样硬化性心脏病的发展。由此可见,雌激素水平的高低与冠心病的发生存在一定的联系^[15]。

雌激素在人体中发挥着重要的作用,能合成多种物质如 DNA、RNA 以及蛋白质等^[16]。其中肝脏为主要的代谢部位,通过肝-肠循环再次吸收,吸收后转运到靶细胞,最终形成对的复合体与尿液一起排出体外。虽然雌二醇具有较广泛的应用,但存在肝首过效应^[17, 18],对肝内蛋白质的代谢有着一定的影响,口服时药效慢,生物利用度低。临床中雌二醇多见于口服和注射,但这两种方法药效较为缓慢,且患者依从性较差;阴道给药^[19, 20]也是常见的雌二醇给药方式,但操作不便且用药次数受限以及具有一些副作用,同时对子宫也会造成一定的影响^[21]。现阶段研究的经皮给药模式,因其方便快捷、人体吸收度高、使用后体内血药浓度波动小等因素受到了广大患者的欢迎。

1.2 经皮给药系统

1.2.1 经皮给药系统简介

经皮给药系统（TDDS）是将药物通过皮肤传递给体内的一种新型给药方式^[22]，共经历了三个阶段，第一阶段只有低分子量或者小剂量的药物才可以应用，对药物的属性选择较高；第二阶段利用了增透技术（化学促进剂、离子导入），使亲水性等药物可以透过皮肤，大大减少了药物的专属性；第三阶段开发了TDDS的潜在能力，利用增透技术（超声、微针等）^[23]使大分子药物透过皮肤。现阶段的经皮给药方式用药简单安全，成为现代医学中一大重要的组成部分。然而，药物自身具有的性质以及皮肤对药物的屏障作用都使经皮给药受到了阻碍。近年来，化学法、物理法和药剂学法等可促进药物的经皮转运并取得了良好进展^[24]。其中物理方法包括：离子导入法，通过外加的电场作用，使离子型药物穿过皮肤，这种方式下药物的传输速度患者可以得到控制；电穿孔法，通过施加瞬时高压电脉冲电场，使药物透过经皮的量大大增加；超声导入法，通过超声波的使用直接将药物透过至皮肤另一侧，达到精确给药。化学法，添加化学促渗剂，从而改变药物的溶解度、与角质层脂质双分子层或蛋白质相互作用。药剂学法包括脂质体透皮^[25]和醇质体^[26]，两种方式都可使药物具有更强的膜透过性，此外促透联用等方法也常用于经皮给药治疗，大大提高了药物透皮的效率，为药物开发奠定了研究基础。

1.2.2 经皮给药系统吸收途径

皮肤作为人体最大的接受器官，同时也是最大的吸收器官，按照职能化分主要分为两部分：表皮和真皮层^[27,28]。表皮负责产生角质细胞，表皮之下真皮层为结缔组织，药物透过表皮被毛细血管吸收，随即进入体内循环^[29]。药物在体内进行吸收主要通过以下三种途径^[30]：1.透过角质层后在细胞间进行吸收；2.透过角质层后在细胞内进行吸收作用；3.通过皮肤的附属器官如毛囊、汗腺等进行吸收，在三种途径中第三种吸收方式吸收效率最快。

1.2.3 经皮给药的体外评价

为了评估药物的吸收速度和吸收效果，经皮给药体外评价^[31]是给药系统中一个较为重要的环节其具有节约成本节省时间的优点。体外释放^[32]和体外透皮^[33]两个实验方法是以皮肤作为主要区分手段。

1.2.3.1 体外释放

透析袋法和扩散池法是体外释放的主要方法。透析袋法的具体操作是将样品溶液放置透析袋中浸入到介质之中,这样大分子和小分子物质会像处于筛子中一样,小分子物质会被筛出透析袋扩散出去,而袋内则留下大分子物质。M Cui 等采用透析袋扩散法制备薯蓣皂苷元凝胶,并考察体外释放性能,以卡波姆为基质,以累积释放率为指标,探究出薯蓣皂苷元凝胶的最佳处方^[34]。肖金宝等人研究了银杏叶提取物温敏鼻凝胶的体外释放。采用透析袋法,以甲醇和盐酸为释放介质。结果表明,银杏叶温度敏感鼻凝胶在体外释放 6 h 后释放率可达 80%^[35]。扩散池法的实验原理是利用溶液的透过性不同从而达到区分分子大小的目的。梅莹等研究了不同制备方法对左旋罗金微乳液凝胶体外释放和透皮渗透的影响。方法采用改良 Franz 扩散池,并对四种生物碱的透皮率和 24h 累积透皮率进行研究^[36]。

1.2.3.2 体外透皮

透皮治疗(Transdermal Therapeutic System, TTS),可针对全身性治疗^[37]。透皮吸收过程中,主要的限制因子包括药物载体的种类、表皮的角质层等,对体内血药浓度有着重要的影响。

TTS 主要包括四类:骨架控释型、膜控释型、微小贮库溶解控释型、粘合剂中分散型,其中前两种较为常见。骨架控释型,将高分子辅料与药物混合制备的控释型骨架,其中羟丙基甲基纤维素为常见的骨架类型;膜控释型,在普通药物外加一层外壳,从而加大药物的释放速率。M Sha 等选择 2-n-壬基-1,3-二恶戊烷为丹参酮凝胶剂的促进剂,改良 Frans 装置,利用高效液相色谱法测定丹参酮 II A 的含量,研究结果发现 2-n-壬基 1,3-二恶戊烷是一种新型有效的渗透增强剂^[38]。杨建一等人分析甲氨蝶呤对小鼠体内多个组织器官 DNA 损伤作用,研究结果表明药物可快速通过皮肤达到药效的理想状态^[39]。YZ Wang 等人研究了不同促渗剂对乳联素凝胶体外皮肤通透性的影响,采用高效液相色谱法测定皮肤累积透皮率、透皮率和透皮滞后时间,对四种增强子的增强能力进行了研究^[40]。

1.3 经皮给药系统研究现状

在生物制药领域中,经皮给药的方式在近几十年中得到了迅速的发展^[41],由最初的透皮贴剂类药物到如今的凝胶型和喷雾型药物。目前研发的新剂型 TDDS

有雌二醇透皮喷雾、胰岛素微泵透皮控释贴剂等。许多学者对雌二醇新制剂展开了进一步研发^[42]，例如控释贴片、微球、霜剂、肌内注射剂等。而单方或者复方连续或长时间使用雌二醇，会使患者产生抗药性和肌肉萎缩等不良症状，所以当雌二醇没有十分理想的制剂。

现阶段我国研发新技术的开发力度小，产品内存在着质量差，缺乏较强的创新能力，研发设备的自动化程度低等缺陷，这些都限制了 TDDS 的发展。经皮给药领域经过几十年的发展，在生物制药方面有了一定的研究进展，剂型也从初期的透皮贴剂发展到凝胶剂、喷雾剂等多种不同剂型^[43]。

1.4 凝胶剂

凝胶剂(gels)是指药物和辅料结合形成的具有凝胶所属性质的制剂溶液。常见的凝胶剂状态包括：溶液状、混悬状和乳状液状。

凝胶基质可分为水基和油基两种。水性凝胶的一般基材是水、卡波姆和甘油，油基凝胶的一般基材是锌皂、铝皂、石蜡和聚乙烯^[44, 45]。凝胶剂可使患者自主方便用药、减少经皮给药所用时间，并且易涂抹、无刺激性、并可在全身发挥药效以及具有较强的生物相容性。因此，许多中外学者已经将目光放在凝胶剂上，并作为一种新型给药系统。李现等研究了人体生理环境中最有前途的三种智能水凝胶，即 pH 响应性、温度响应性和 pH /温度双重响应性。还讨论了它们的释放机制、靶向运输和药物的控制释放^[46]。

1.4.1 亲水性凝胶

亲水性凝胶的特性是因其中包含的亲水基团的高分子物质发挥作用^[47]，作为目前应用最为广泛的凝胶剂类型，其重要组成部分—基质有以下几类：

卡波姆，色浅、水白透明，涂膜性能好，耐光、耐热，及耐腐蚀等性极好，内含有高分子量的丙烯酸聚合物，具有不同的聚合度和分子量，被广泛的应用为凝胶基质^[48]。卡波姆溶液的制备方法一般加入 NaOH 或三乙醇胺来中和弱酸性，调节凝胶的 pH 值，吸水溶胀后，形成的卡波姆凝胶粘度适中且易于涂抹的水凝胶。曾雪芬等人发明了一种以卡酚为基础的灸眼凝胶，并研制了一种丙烯酸交联聚合物凝胶，用于预防灸眼过程中因失水而引起的眼干燥^[49]；贾献慧等以卡波姆为基质制备了马黄酞复方提取物凝胶，结果表明其具有良好的抗炎活性^[50]。

纤维素衍生物,是将纤维素进行化学改性后所得到的高分子的化合物,具有低成本、无毒性、可降解等优点,目前被广泛应用在临床治疗,医疗等行业。常见的纤维素衍生物包括羧甲基纤维素钠(CMC-Na)、羟丙基甲基纤维素(HPMC)、羟丙基纤维素(HPC)等。P Liu 等人采用低于凝胶剂量的辐照法制备了替代水凝胶的微辐射交联 CMC-Na,结果表明 CMC-Na 凝胶是不同于不溶于开水的真正凝胶^[51]。S Manna 等人通过改变聚合物和交联剂的浓度实现药物的靶向释放,制备载替诺福韦的明胶纳米颗粒,且 8 h 后的体外释药效果良好^[52]。T Imankulov 等人以 HEMA 和 9G 与 HPC 凝胶为原料,制备了新型聚合物凝胶剂量计,HPC 凝胶是通过辐射诱导交联技术获得的,应用于基质中^[53]。王勇等人研究了不同浓度氮酮对复方香黄巴布膏体外透皮吸收的影响,结果表明浓度为 3%时促渗效果最佳^[54]。

1.4.2 亲脂性凝胶

乳剂型凝胶大体分为水相剂、油相剂和表面活性剂三种,其具有容载药量大的能力且稳定性较好^[55-58]。C Fontes 等研究了以琼脂和 κ -卡拉胶为基础的乳状液凝胶的制备方法。证明了多糖基质、含油量和表面活性剂的存在对微纳米结构、流变性、力学性能和介电性能的影响。结果表明,该琼脂具有较高的稳定油滴的能力^[59]。DQ Lin 等研究了反电性大豆分离蛋白(SPI)稳定乳状液和海藻酸盐溶液的添加顺序对静电蛋白多糖吸引乳状液稳定性和结构的影响,以及内部凝胶形成乳状液凝胶的结构和流变特性。结果对于制备稳定的多层乳液和改变相反电荷分散体的加入顺序来构建乳液凝胶具有重要意义^[60]。

1.4.3 新型凝胶剂

1.4.3.1 脂质体凝胶

脂质体凝胶是通过微型囊泡体将药物包络在类脂质双分子层中,这么做的好处是使药物具有良好的靶向性直达病灶,并且其具有良好的稳定性可有效地降低药物的毒副作用^[61]。但脂质体凝胶也容易发生渗漏,所以通过将脂质体与凝胶基质相混合,不但可以提高透皮吸收率还可以提高药物的稳定性^[62]。M Sacha 等研究了双氯芬酸脂质体制剂的体外透皮吸收,探究不同浓度双氯芬酸二乙胺对双氯芬酸体外透皮吸收的影响,1%的脂质体凝胶和 1.16%乳胶的透皮吸收在 9 h 时效

果最为明显, 释放度最高^[63]; M RaniaHathout 等通过研究糊化核心脂质体, 用于开发新型马来酸替莫洛尔青光眼药物, 以马来酸替莫洛尔凝胶化核心脂质体, 解决了亲水性药物眼脂质体制剂的主要问题, 研发出一款安全有效的眼用药物^[64]; XM Wang 等研究制备了酮康唑脂凝胶并建立其质量控制方法, 测定了酮康唑脂质体的包封率和脂凝胶的质量。通过高效液相色谱方法。结果制备出乳胶白色脂质体凝胶, 平均包膜率为 65%, 酮康唑脂凝胶制备方法可行, 质量稳定, 测定方法准确可靠^[65]。

1.4.3.2 智能型水凝胶

智能水凝胶是一种 3D 网状交联高分子的亲水聚合物, 具有良好的塑形性、水溶性和高保水性, 难溶于水^[66]。智能水凝胶由于其智能, 高效, 安全和方便的药物控制和延长释放而成为研究前沿和热点。它在多种应用中发挥了重要作用, 例如药物输送系统, 组织工程, 光学^[67, 68]。J Hu 等人制备了一种智能氨基糖苷水凝胶, 可调凝胶的降解、随时将药物释放以及高抗菌活性的特征^[69]。陈晶晶等研制了一款治疗皮肤烧伤的水凝胶, 与普通水凝胶相比具有更高的细胞粘附性, 生物相容性, 使伤口快速愈合, 避免感染^[70]。智能型凝胶被广泛应用于生物领域以及医疗治疗等方面, 为医院领域开启了新纪元^[71]。

1.4.3.3 成膜凝胶

成膜凝胶的制备是通过将成膜材料和凝胶基质混合后加入药品原料^[72-74], 形成的成模型凝胶具有一定的药效, 同时可以通过涂抹在人体表皮的方式进行给药, 涂抹后可以迅速的在人体表皮形成一层透明膜, 使药物在涂抹处发挥的药效具有持续性, 成模型凝胶使用方便便捷、不污染衣物、不影响美观、适用于各种创面等优点。任天斌等将药物载体选用为壳聚糖和海藻酸钠, 并研发了双氯芬酸钠水凝胶, 具有镇痛效果同时对痛风治疗也颇有成效^[75]。

1.5 研究意义及研究内容

雌二醇是可以调节体内性激素含量的一类激素, 在治疗类风湿性关节炎、动脉粥样硬化和一些女性疾病方面有一定疗效, 但是雌二醇存在药效吸收较慢, 不易涂抹等问题。成膜凝胶具有可避免肝首过效应、快速成膜、透皮吸收率高、给药方式简便, 对于人体皮肤任意部位均可涂抹等明显优势。因此, 为了解决吸收

涂抹等问题，将雌二醇制成成膜凝胶可以更加方便的供患者使用，本文研究开发了一种具有良好药效，且外观性状良好，成膜时间短的复方成膜凝胶，即雌二醇成膜凝胶。

本文主要从以下四个几方面进行研究：

1. 建立体外分析方法，检测雌二醇的含量；
2. 制备雌二醇成膜凝胶并优化其处方；
3. 建立雌二醇成膜凝胶的质量标准；
4. 评价雌二醇成膜凝胶的药效。

第2章 雌二醇体外质量分析方法的建立

建立科学有效的分析测定方法,可以帮助实验有序进行,本章探究了雌二醇体外含量测定的条件以及方法,为后续制备成膜凝胶奠定基础。目前,通过高效液相色谱(HPLC)测定雌二醇的含量,为控制成膜凝胶内雌二醇含量提供基础。

2.1 仪器与试剂

2.1.1 仪器

仪器名称	型号	生产厂家
高效液相色谱仪	LC-20A	日本岛津公司
可调式微量移液器	Pipet-X	德国 Rainin 公司
超纯水系统	MilX-Q	美国 Millipore 公司
分析天平	BS224S	北京赛多利斯科学仪器有限公司
超声波清洗仪	K5-800	宁波科生设备有限公司
超声仪	QK-250E	昆山市超声仪器有限公司
pH 计	FE20K	瑞士梅特勒托利多公司
涡旋仪	XW-80A	上海医科大学仪器厂

2.1.2 材料与试剂

材料名称	生产厂家
雌二醇标准品	上海源叶生物科技有限公司
无水乙醇	国药集团化学试剂有限公司
乙腈	国药集团化学试剂有限公司
甲醇	美国 Fisher scientific 公司

2.2 实验方法

2.2.1 雌二醇溶液的制备

精确称取 1.0 mg 雌二醇，置于 5 mL EP 管中，加入 1.0 mL 甲醇溶液，涡旋至其完全溶解，得到浓度为 1000 $\mu\text{g/mL}$ 的雌二醇储备液。

2.2.2 雌二醇含量测定方法的建立

根据 2015 版《中国药典》，利用高效液相色谱法，测定雌二醇含量。

2.2.2.1 雌二醇测定色谱条件

如表 2.1 所示为 HPLC 测定雌二醇的条件。

表 2.1 雌二醇含量测定色谱条件

Table 2.1 HPLC conditions for determination of Estradiol

参数	条件
流动相	乙腈-水(55:45)
色谱柱	shim-pack vp-ods (4.6 \times 150 mm)
柱温 ($^{\circ}\text{C}$)	40
检测波长 (nm)	205
流速 (mL/min)	1.0
进样量 (μL)	10

2.2.3 方法学验证

2.2.3.1 标准曲线的绘制

取 0.25 g 雌二醇，加入 0.5 mL 甲醇溶液，制备 500 mg/mL 的雌二醇溶液。运用等比稀释的方法分别配置浓度为 500、200、100、50 和 25 $\mu\text{g/mL}$ 的雌二醇溶液。以浓度($\mu\text{g/mL}$)为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制雌二醇溶液浓度和峰面积的标准曲线，通过线性回归分析得到回归方程。

2.2.3.2 精密度

取 6 份 1.0 mL 浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 的雌二醇溶液，通过 HPLC 检测雌二醇的浓度以及 RSD 值。

2.2.3.3 重复性

取6份1.0 mL浓度为200 μg/mL的雌二醇溶液，通过HPLC检测，通过记录雌二醇溶液的峰面积，计算其浓度的相对标准偏差，考察其稳定性。

2.2.3.4 加样回收率

取同一批200 μg/mL雌二醇溶液，3个一组，首先通过HPLC测出雌二醇的含量，分别在原溶液中加入3种不同含量的标准品溶液（80%、100%和120%），0.45 μm滤膜滤过，再次进行HPLC检测，测定出雌二醇的含量，通过2.1计算公式得出加样回收率。

$$\text{回收率} = \frac{M3 - M1}{M2} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (2.1)$$

M1: 200 μg/mL 溶液中的雌二醇含量

M2: 加入标准品溶液的含量

M3: 测定后雌二醇含量

2.2.4 雌二醇药典鉴定

取2.0 mg雌二醇，加如2.0 mL硫酸溶解，接着加入2滴三氯化铁试剂，并用水进行稀释，观察溶液颜色的变化。

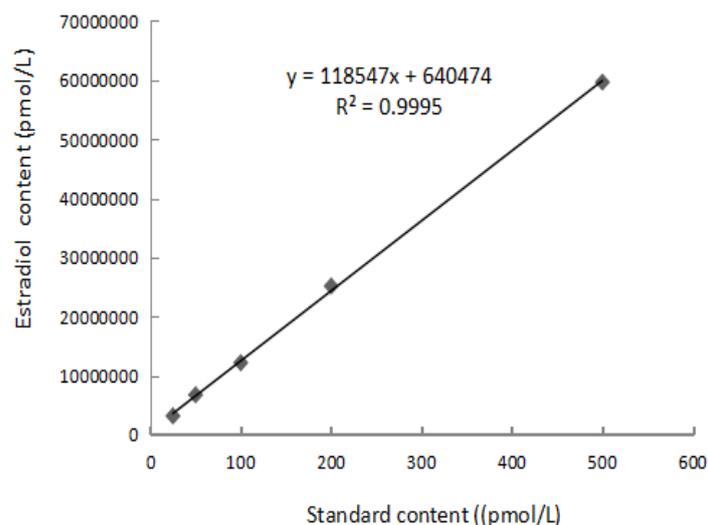
取200 μg/mL雌二醇溶液，通过紫外-可见分光光度法测定，观察最大波长的吸收峰。

2.3 结果与讨论

2.3.1 雌二醇含量测定方法的建立

2.3.1.1 标准曲线的绘制

图2.1所示的雌二醇标准曲线，0.5~600.0 μg/mL范围内具有良好的线性关系，线性回归方程为： $y = 118547x + 640474$ ， $R^2 = 0.9995$ ，可以准确的测量出雌二醇的含量。

图 2.1 雌二醇标准曲线 (0.5-600.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

(见原始记录 2018344017-PY-1 册-p3)

Figure 2.1 Standard curve of Estradiol (0.5-600.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

2.3.1.2 精密度

为了保证药物的安全性、精密性，并能准确控制药物含量，本实验对雌二醇精密度进行了考察。表 2.2 为雌二醇的精密度，实验结果显示，RSD=1.31%，小于 3%，说明此方法具有良好的精密度。

表 2.2 雌二醇精密度实验结果 (n=6) (见原始记录 2018344017-PY-1 册-p4)

Table 2.2 Precision results of Estradiol (n=6)

序号	浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	平均浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	RSD(%)
1	208.07		
2	201.24		
3	200.39	203.19	1.31
4	202.97		
5	203.17		
6	203.30		

2.3.1.3 重复性

雌二醇含量检测方法的重复性实验结果如表 2.3 所示，RSD 值为 0.09%。

表 2.3 雌二醇重复性实验 (n=6)

(见原始记录 2018344017-PY-1 册-p5)

Table 2.3 Stability results of Estradiol (n=6)

序号	浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	平均浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	RSD(%)
1	111.86		
2	111.82		
3	111.69	111.74	0.09
4	111.68		
5	112.16		
6	111.63		

2.3.1.4 加样回收率

表 2.4 为雌二醇加样回收率, 雌二醇加样回收率在 99.20~104.70%之间, RSD=1.62%, 此种方法可以准确测得雌二醇的含量。

表 2.4 雌二醇加样回收率实验 (n=3)

(见原始记录 2018344017-PY-1 册-p7)

Table 2.4 Recovery of Estradiol (n = 3)

实际浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	加样比例 (%)	检浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	回收率 (%)	平均回收 率 (%)	RSD (%)
201.85		362.81	100.60		
201.85	160.00	369.37	104.70		
201.85		363.13	100.80		
201.85		400.25	99.20		
201.85	200.00	404.65	101.40	100.90	1.62
201.85		401.65	99.90		
201.85		441.13	99.70		
201.85	240.00	446.17	101.80		
201.85		442.33	100.20		

2.3.1.5 雌二醇药典鉴定

雌二醇与硫酸混合，溶液呈现黄绿色；再加入三氯化铁后，溶液变为草绿色；用水进行稀释，溶液变为红色。通过紫外-可见分光光度法测定，图 2.2 为 190-300nm 的光谱吸收波长，在 280nm 处有最大吸收波长。表明可以参照 2015 年雌二醇药典进行鉴定与检测。

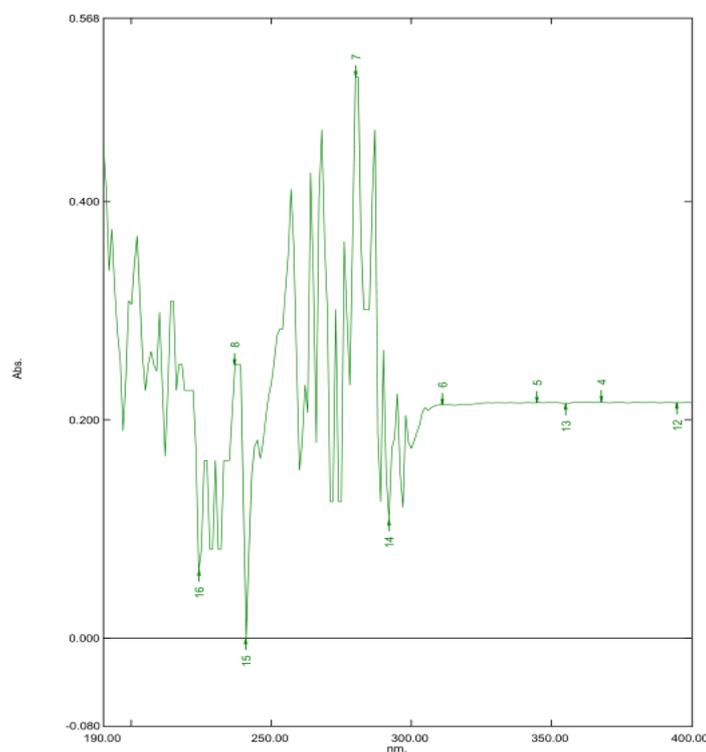


图 2.2 雌二醇光谱吸收波长（190-300 nm）

Figure 2.2 Spectral Absorption Wavelength of estradiol (190-300 nm)

2.4 本章小结

本章建立了雌二醇含量检测方法，并对雌二醇的含量进行了方法学的验证分析。在 0.5~600.0 $\mu\text{g/mL}$ 范围内，回归方程为 $y = 118547x + 640474$ ， $R^2 = 0.9995$ ，具有良好的线性关系；雌二醇溶液的专属性良好；精密度良好， $RSD=0.09\%$ ，加样回收率范围在 99.20~104.70%之间；根据溶液的颜色变化以及紫外-可见分光光度法测定雌二醇在 280nm 的波长处有最大吸收。表明此方法可以准确鉴别并测定雌二醇的含量。

第3章 雌二醇成膜凝胶的制备及处方优化

制剂研究关键部分是处方筛选及工艺探究，成膜凝胶的使用会加快吸收效率，快速成膜，因此对雌二醇成膜凝胶进行进一步研究。本章重点对辅料的种类和用量进行了探究，并通过计算机软件 Dx-8 对成膜凝胶进行响应面优化处方探究。

3.1 材料与仪器

3.1.1 仪器

仪器名称	型号	生产厂家
分析天平	BS224S	北京赛多利斯科学仪器有限公司
pH 计	FE20K	瑞士梅特勒托利多公司
透皮吸收仪	TT-18	天津正通科技有限公司
高效液相色谱	LC-20A	日本岛津公司
可调式微量移液器	Pipet-X	德国 Rainin 公司
分析天平	BS224S	北京赛多利斯科学仪器有限公司
涡旋混合仪	XW-80A	上海医科大学仪器厂

3.1.2 材料与试剂

仪器名称	生产厂家
雌二醇	上海源叶生物科技有限公司
卡波姆 934	广州康乔汉普药业有限公司
羧甲基纤维素钠	阿拉丁试剂有限公司
明胶	罗赛洛（大安）明胶有限公司
甘油	国药集团化学试剂有限公司
羟丙甲纤维素	安徽山河药用辅料股份有限公司
聚乙烯醇	阿拉丁试剂有限公司
聚乙烯吡咯烷酮	源叶生物有限公司

薄荷油	源叶生物有限公司
丙二醇	国药集团化学试剂有限公司
三乙醇胺	西陇化工股份有限公司
月桂氮卓酮	天津市光复精细化工研究院
无水乙醇	国药集团化学试剂有限公司

3.1.3 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠，体重 160-180 g。

3.2 实验方法

3.2.1 雌二醇成膜凝胶处方初步筛选

3.2.1.1 雌二醇成膜凝胶评价标准建立

以雌二醇成膜凝胶 (Estradiol Gel) 的各种特征粘稠度、外观形态、涂展性作为处方筛选的依据，三项指标满分为 30 分，单项满分为 10 分，具体评分细则如表 3.1。

表 3.1 雌二醇成膜凝胶处方筛选评分表

Table 3.1 Score sheet about Estradiol gel

指标	优 (8-10)	良 (5-7)	中 (2-4)	差 (0-1)
外观形态	外表平整，细腻光滑，有光泽无结块	外表平整，凝胶均匀具有细小颗粒	外表不平整，凝胶具有结块现象	外表液化或水状，凝胶有巨大结块
涂展性	质地细腻均匀易于涂抹	质地较为细腻涂抹性较好	质地较为粗糙涂抹性较差	质地粗糙有颗粒不易涂抹
粘稠度	适中	略稠或略稀	较稠或较稀	难成胶状

3.2.1.2 不同凝胶材料的溶胀性能探究

称取空培养皿的重量，记为 W_0 ，再放入 0.1 g 的凝胶基质和适量的水，在设定的 8 个时间点分别吸取多余水分 (5 min、15 min、30 min、1 h、2 h、4 h、8 h、12 h)，再次称量培养皿重量为 W_1 ，凝胶材料溶胀后干重 $W_s = W_1 - W_0$ 。再将凝胶

材料放入冻干机冻干得到的质量为 W_3 ，凝胶材料溶胀后湿重 $W_d = W_3 - W_0$ 。根据公式： $fQ = (W_s - W_d) / W_d$ ，即可得到不同材料的溶胀比(fQ)。

3.2.1.3 基质的种类探究

选取明胶、羧甲基纤维素钠以及卡波姆三种凝胶基质进行探究。

称取 0.2 g 的卡波姆、明胶、CMC-Na，加入 5.0 mL 去离子水，于室温状态下放置 12 h，让卡波姆与水充分混合溶胀，再加入 0.1 g 的三乙醇胺，使整个基质内的 pH=6-7，接着加入雌二醇 0.02 g 以及乙醇 3.0 mL，将体系总质量以加入去离子水的方式维持到 10.0 g，搅拌均匀。以表 3.1 同种方式进行评分探究。

3.2.1.4 基质的用量探究

分别在称 0、0.05、0.1、0.2、0.4 g 卡波姆在 50 mL 烧杯中，加入 5 mL 去离子水。于室温状态下放置 12 h，让卡波姆与水充分混合溶胀，再加入 0.1 g 的三乙醇胺，使整个基质内的 pH=6-7，接着加入雌二醇 0.02 g 以及乙醇 3.0 mL，将体系总质量以加入去离子水的方式维持到 10.0 g，搅拌均匀。以表 3.1 同种方式进行评分探究。

3.2.1.5 成膜剂的种类探究

选取羧甲基纤维素、羟丙甲纤维素、聚乙烯吡咯烷酮以及聚乙烯醇四种成膜剂进行初步筛选。

称取四份 0.1 g 卡波姆，加入 3.0 mL 去离子水，于室温状态下放置 12 h，让卡波姆与水充分混合溶胀，再加入 0.1 g 的三乙醇胺，使整个基质内的 pH=6-7。分别加入 0.2 g PVA、PVP、HPC、HPMC，去离子水 2.0 mL、雌二醇 0.02 g 以及乙醇 3.0 mL，将其全部混合均匀。将体系总质量以加入去离子水的方式维持到 10.0 g，搅拌均匀。取面积为 $2 \times 2 \text{ cm}^2$ 的 0.1 g 凝胶涂于手背皮肤，通过计算薄膜形成的时间，对凝胶的各项指标予以评分，满分 30 分。

3.2.1.6 成膜剂的用量探究

分别称取四份 0.1 g 卡波姆置于 50 mL 烧杯中，加入 3.0 mL 去离子水，于室温状态下放置 12 h，让卡波姆与水充分混合溶胀，再加入 0.1 g 三乙醇胺，使整个基质内的 pH=6-7。分别加入 0.15、0.20、0.25、0.30、0.35 g PVP，去离子水 2.0 mL、雌二醇 0.02 g 以及乙醇 3.0 mL，将其全部混合均匀。将体系总质量以加入

去离子水的方式维持到 10.0 g，搅拌均匀。计算薄膜形成的时间，对凝胶的各项指标予以评分，满分 30 分。

3.2.1.7 乙醇用量探究

以乙醇为促成膜剂有很多优点，但是过量的乙醇使用不但会伤害皮肤，还会对凝胶的性质产生影响。因此有必要对无水乙醇的用量进行探究。

分别在 50 mL 烧杯中称取四份 0.1 g 卡波姆，加入 3.0 mL 去离子水，于室温状态下放置 12 h，让卡波姆与水充分混合溶胀，再加入 0.1 g 的三乙醇胺，使整个基质内的 pH=6-7。三份烧杯中分别加入 PVP 0.25 g、去离子水 2.0 mL、雌二醇 0.02 g 以及乙醇 3.0 mL，将其全部混合均匀。再分别加入 1.5、2.0、2.5、3.0 mL 乙醇，将体系总质量以加入去离子水的方式维持到 10.0 g，搅拌均匀。计算薄膜形成的时间，对凝胶的各项指标予以评分，满分 30 分。

3.2.1.8 甘油用量的探究

甘油、丙二醇通常作为凝胶配置中较为常见的保湿剂，由于甘油具有较小的刺激性且保湿效果优于丙二醇，故将甘油作为最终保湿剂，并探究其用量。

分别在 50 mL 烧杯中称取三份 0.1 g 卡波姆，加入 3.0 mL 去离子水，于室温状态下放置 12 h，让卡波姆与水充分混合溶胀，再加入 0.1 g 的三乙醇胺，使整个基质内的 pH=6-7。三份烧杯中分别加入 PVP 0.25 g、去离子水 2 mL、雌二醇 0.02 g 以及乙醇 5.5 mL，将其全部混合均匀。最后加入 0.5 g、1.0 g、1.5 g 甘油，补足去离子水至凝胶体系为 10.0 g，搅拌均匀。计算薄膜形成的时间，对凝胶的各项指标予以评分，满分 30 分。

3.2.1.9 促渗剂种类及用量探究

选取 N-甲基吡咯烷酮、薄荷油丙二醇、油酸、月桂氮卓酮四种促渗剂进行筛选，探究其对凝胶剂外观性状的影响，对含量为 2%、4% 和 6% 促渗剂效果进行探究。

分别在 50 mL 烧杯中称取四份 0.1 g 卡波姆，加入 3.0 mL 去离子水，于室温状态下放置 12 h，让卡波姆与水充分混合溶胀，再加入 0.1 g 的三乙醇胺，使整个基质内的 pH=6-7。每份分别加入 0.25 g PVP、2.0 mL 去离子水、0.02 g 雌二醇和 5.5 mL 乙醇，最后加入 0.2 g 不同种类的促渗剂，将体系总质量以加入去离

子水的方式维持到 10g, 搅拌均匀, 并计算薄膜形成的时间, 对凝胶的各项指标予以评分, 满分 30 分。

3.2.1.10 防腐剂的选择

水溶性的凝胶易产生霉变现象, 成膜凝胶的稳定性会受到一定的影响, 防腐剂的使用可以确保雌二醇成膜凝胶的质量, 羟苯乙酯与雌二醇成膜凝胶的酸碱度相符, 可以使凝胶保持一定的活性。因此, 探究加入 0.05% 的防腐剂时成膜凝胶的特性。

3.2.2 离体鼠皮的制备

雌性 SD 大鼠, 取腹部皮肤, 去除皮下多于的组织和脂肪。由吉林大学实验动物福利伦理委员会同意, 动物实验伦理福利审查编号: SY202009012

3.2.3 体外透皮实验

实验前按要求制备加入和不加入促渗剂的雌二醇成膜凝胶, 制备接收液 (聚乙二醇、生理盐水)。

取适当大小鼠皮置于透皮扩散装置上, 使鼠皮的真皮层向下。透皮吸收仪搅拌 $V=300 \text{ r/min}$, 水浴锅 $T=37\pm 1^\circ\text{C}$, 在离体的鼠皮上涂抹 0.2 g 的雌二醇成膜凝胶, 凝胶成膜后, 加入 5.0 mL 的接收液, 排空气泡, 使转速和温度保持不变, 在设定的时间点(0、1、2、4、6、8、10、12 h)取出 1.0 mL 接收液, 立即加入相同体积的接收液, 保证取样口内液体体积相同。将上述 7 组接受液分别用 $0.45 \mu\text{m}$ 膜过滤, 采用高效液相色谱法测定其雌二醇含量, 并计算累积透光率 $Q(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2})$ 。如公式 3.1 所示, 以时间为横坐标, Q 为纵坐标, 绘制 t - Q 曲线 (t : 时间, Q : 单位面积内累积透过量)。

$$Q_n = \frac{C_n V + \sum_{i=1}^{n-1} C_i V_i}{A} \dots\dots\dots (3.1)$$

3.1 公式中, Q_n 表示单位面积累积药物经皮肤透过量 ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$), C_n 代表的浓度雌二醇在第 n 个采样时间 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), V 代表接受解决方案的总体积 (mL), V_i 代表每个采样时间的体积 (mL), C_i 代表的浓度雌二醇在第 n 个采样时间 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), A 代表透皮扩散面积 (cm^2)

3.2.4 雌二醇成膜凝胶制备工艺探究

在雌二醇成膜凝胶辅料的探究过程中，成膜凝胶的质量生产与主药和辅料加入的顺序不同有关。因此，对成膜凝胶的外观形态、涂展性、粘稠度、成膜时间及凝胶粒度等制备工艺探究，进行综合性评分，其中重点探究以下两种工艺：

工艺（a）先调配出空白的凝胶基质，再加入雌二醇和防腐剂，得到雌二醇成膜凝胶，工艺（b）是将主药与辅料全部混合后，再进行室温溶胀，得到雌二醇成膜凝胶。

具体工艺流程如图 3.1 所示。

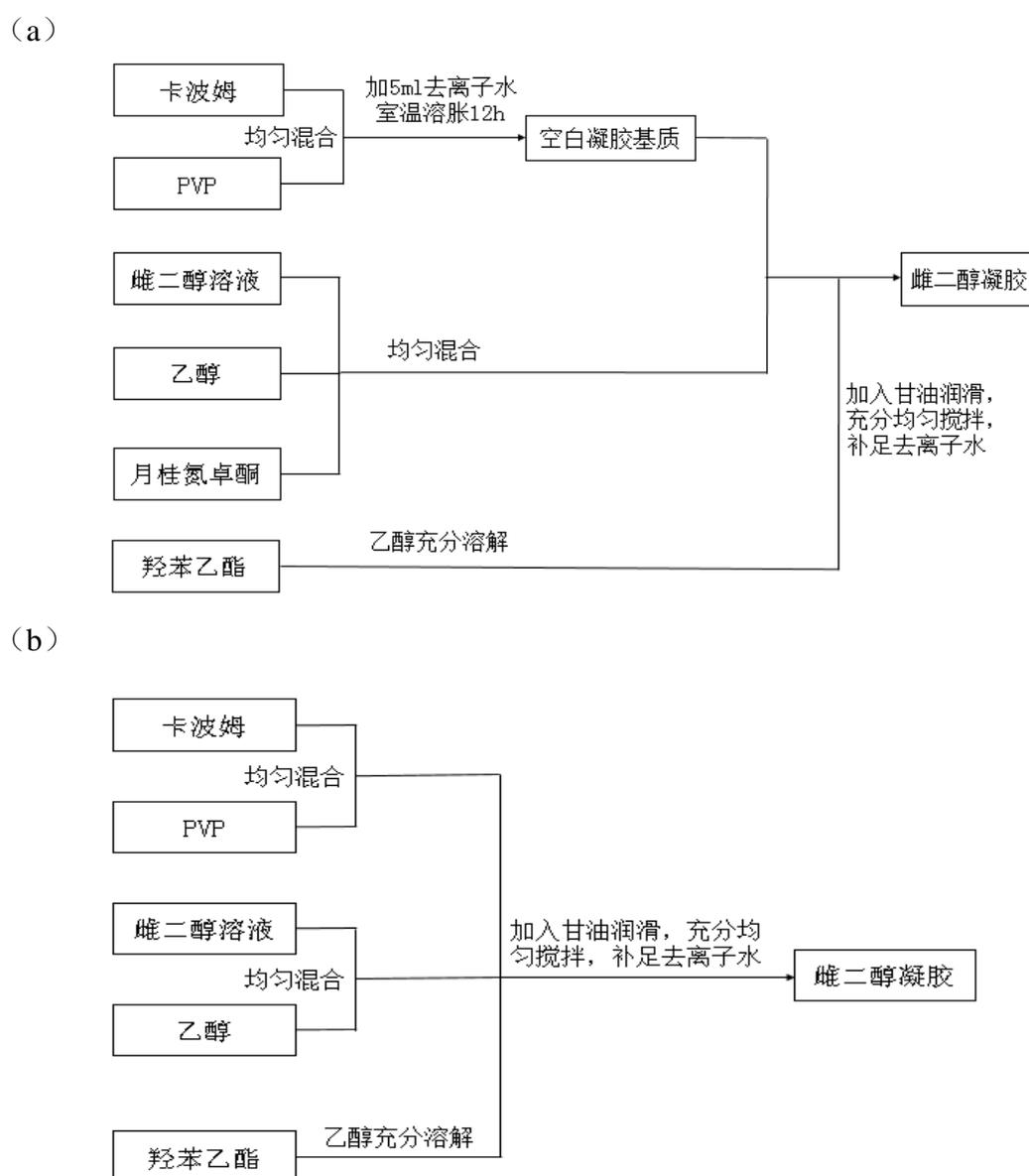


图 3.1 雌二醇成膜凝胶制备工艺流程图

Figure 3.1 Flow chart of preparation process of Estradiol film-forming gel

3.2.5 雌二醇成膜凝胶的优化处方

选取三个主要因素进行响应面探究：卡波姆 1.0~4.0%、PVP 0.15~3.0%、丙二醇和月桂氮卓酮，加入 1.0 g 甘油、0.02 g 雌二醇、5.5 mL 无水乙醇、5.0 mg 羟苯乙酯，按照“3.2.4”项下工艺 a 制备凝胶，对雌二醇成膜凝胶各项性能进行：累计透过量，占比 40%，满分 40 分；外表特性评分，占比 30%，满分 30 分；成膜时间，占比 30%，满分 30 分。综合评分（Y）满分为 100 分，具体评分方式为：

$$Y=A+ B+ C \dots\dots\dots (3.2)$$

- A（40/最大单位累计透过量*单位累计透过量）
- B（外观评分）
- C（最小成膜时间*30/成膜时间）

通过 Dx- 8 软件对雌二醇成膜凝胶进行响应面分析。

3.2.6 凝胶最终处方

综合评分可以确定各种辅料含量的选择（卡波姆、PVP、月桂氮卓酮），加入防腐剂，最后得出雌二醇成膜凝胶的配方。

3.3 结果与讨论

3.3.1 凝胶处方初步筛选

3.3.1.1 建立雌二醇成膜凝胶评价标准

通过凝胶的各种特性进行筛选（外观形态、涂展性、粘稠度、成膜时间），评分规则见表 3.1。

3.3.1.2 不同凝胶材料的溶胀性能探究

卡波姆、HPMC 和 CMC-Na 均能溶于水，且溶胀性良好，其中 12 小时凝胶材料的溶胀比卡波姆>CMC-Na>HPMC。

表 3.2 HPMC 溶胀性

(见原始记录 2018344017-PY-1 册-p12)

Table 3.2 HPMC swelling property

溶胀时间(min)	Ws(g)	Wd(g)	fQ(%)
5	1.959	0.073	25.84
15	2.211	0.082	25.96
30	2.453	0.079	30.05
60	2.533	0.075	32.77
120	2.673	0.069	37.74
240	2.487	0.062	39.11
480	2.196	0.048	44.75
720	2.544	0.055	45.21

HPMC 的溶胀速度随着时间增长有小幅度的升高趋势, 120 min 后趋于水平。HPMC 溶胀过程中上下层出现分层, 上层较为透明, 下层浑浊。

表 3.3 CMC-Na 溶胀性

(见原始记录 2018344017-PY-1 册-p12)

Table 3.3 CMC-Na swelling property

溶胀时间(min)	Ws(g)	Wd(g)	fQ(%)
5	2.187	0.079	26.68
15	2.173	0.075	27.97
30	2.178	0.080	26.23
60	2.247	0.070	31.10
120	2.336	0.053	43.08
240	2.219	0.048	45.21
480	2.017	0.043	46.09
720	2.264	0.048	46.17

CMC-Na 和 HPMC 的溶胀速度相似, 720 min 后吸水性能趋于稳定, fQ 分别能达到 45.21% 和 46.17%。

表 3.4 卡波姆溶胀性

(见原始记录 2018344017-PY-1 册-p13)

Table 3.4 Carbomer swelling property

溶胀时间(min)	Ws(g)	Wd(g)	fQ(%)
5	1.980	0.083	22.86
15	2.218	0.074	29.29
30	2.196	0.056	38.21
60	3.176	0.066	47.12
120	2.965	0.035	83.46
240	3.229	0.028	114.32
480	3.419	0.016	212.69
720	3.408	0.015	220.12

由表 3.4 可知, 60-120 min 过程中卡波姆的溶胀性能显著增加, 720 min 时可达到 220.12% 并趋于稳定。根据他们不同时间的溶胀比来判断, HPMC 和 CMC-Na 增长稳定, 卡波姆有明显增减, 所以选择卡波姆作为凝胶基质。通过重复性试验确定卡波姆在水中溶胀的稳定性, 如图 3.1 所示。

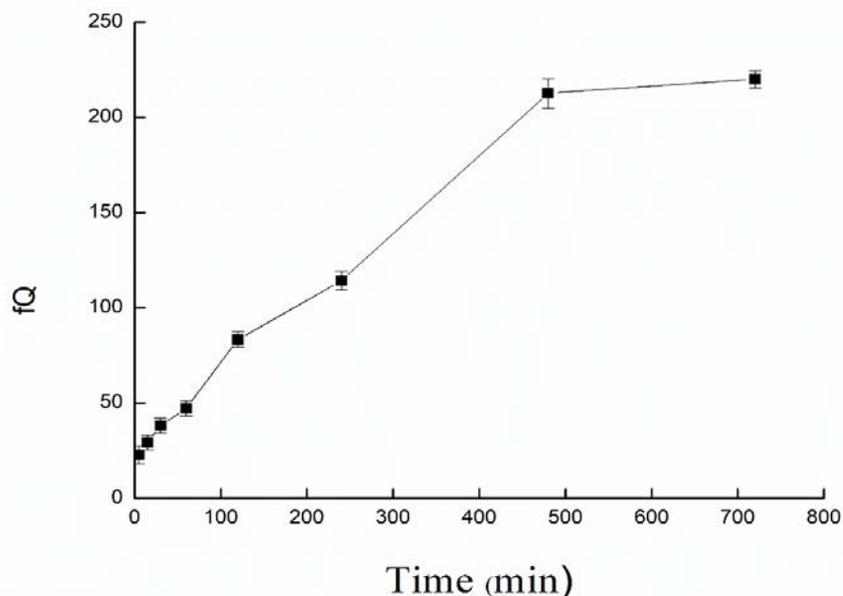


图 3.1 卡波姆在水中溶胀性

(见原始记录 2018344017-PY-1 册.-p13)

Fig. 3.1 Swelling property of carbomer in water

重复性实验过程中卡波姆的溶胀性能稳定。综上所述,水为溶剂时,卡波姆、HPMC 和 CMC-Na 三种凝胶材料均可行,但根据它们的不同溶胀比,卡波姆的溶胀性略好。

3.3.1.3 基质种类探究

对卡波姆、羧甲基纤维素钠、明胶进行考察,其具体评分结果如表 3.5。

表 3.5 基质种类探究评分表

Table 3.5 Matrix species investigation and evaluation table

基质名称	外观性状	涂展性	粘稠度	制剂总分
卡波姆	10	8	10	28
明胶	1	3	3	7
羧甲基纤维素钠	4	2	8	14

在常温和加热状态下,明胶粘度不够;羧甲基纤维素钠加入雌二醇溶液后,凝胶由透明变为浑浊;卡波姆经三乙醇胺调节 pH 后,形成高粘度的透明基质,加入雌二醇溶液后,凝胶各项指标均为最优状态。因此,最终选用卡波姆作为凝胶基质,并对合适用量进一步探究。

3.3.1.4 基质用量探究

卡波姆含量会影响凝胶的粘稠度,评分结果见表 3.6。

表 3.6 基质用量探究评分表

(见原始记录 2018344017-PY-1 册-p16)

Table 3.6 Matrix dosage evaluation table

基质	外观性状	涂展性	粘稠度	感官总分
0%卡波姆	2	2	4	8
0.5%卡波姆	8	5	6	19
1.0%卡波姆	10	10	8	28
2.0%卡波姆	5	8	8	21
4.0%卡波姆	4	5	4	13

在基质用量探究中,与单纯水基质比较,加入卡波姆后凝胶的外观性状、涂展性和粘稠度有显著提高。当基质含量达到 1.0%时,凝胶光滑呈无色透明状,容易涂抹,且上下无分层。随着用量的增加,卡波姆含量达到 4%时,凝胶浑浊,涂抹及延展性受到影响。因此,凝胶确定卡波姆用量为 1.0%。

3.3.1.5 成膜剂种类探究

对加入 HPC、PVA、PVP、HPMC 时凝胶的性状和成膜时间进行测评,评分结果见表 3.7。

表 3.7 成膜剂种类探究评分表

(见原始记录 2018344017-PY-1 册-p18)

Table 3.7 Film forming agent type investigation and evaluation table

成膜剂	外观性状	涂展性	粘稠度	感官总分	成膜时间 (s)
--	6	6	6	18	230
HPC	5	8	8	21	127
PVA	6	8	10	23	190
PVP	10	8	10	28	105
HPMC	2	4	4	10	128

与无成膜剂组相比较,HPMC 做为成膜剂各项指标均有所下降,凝胶出现结块,浑浊现象。HPC、PVA、PVP 三种成膜剂外观性能无明显区别,但 PVP 组具有更短的成膜时间,因此选用 PVP 作为凝胶的成膜剂。

3.3.1.6 成膜剂用量探究

PVP 的用量会影响成膜凝胶的指标以及成膜时间等,因此对其进行探究,评分结果见表 3.8。

随着 PVP 含量的增加,成膜时间先减少后增加。成膜剂含量在 1.5~2.5%之间,外观性状、涂展性以及粘稠度各项指标无显著差异。当含量超过 3%,成膜时间开始增加,凝胶的粘稠度也受到影响。综上所述,PVP 含量在 2.5% 时,成膜时间达到最低值,因此确定成膜剂用量为 2.5%。

表 3.8 成膜剂用量探究评分表

(见原始记录 2018344017-PY-1 册-p20)

Table 3.8 Film forming agent dosage investigation and evaluation table

成膜剂	外观性状	涂展性	粘稠度	感官总分	成膜时间 (s)
1.5% PVP	10	8	8	26	158
2.0% PVP	10	8	8	26	126
2.5% PVP	10	8	10	28	104
3.0% PVP	8	5	4	18	204
3.5% PVP	6	2	2	10	—

3.3.1.7 雌二醇用量探究

探究雌二醇用量, 评分结果见表 3.9, 雌二醇用量的不同, 影响到凝胶剂的粘稠度, 感官总分以及成膜时间。

表 3.9 雌二醇用量探究评分表

(见原始记录 2018344017-PY-1 册-p22)

Table 3.9 Film forming agent dosage investigation and evaluation table

雌二醇(g)	外观性状	涂展性	粘稠度	感官总分	成膜时间 (s)
0.01	4	2	8	14	105
0.02	10	8	10	28	87
0.03	8	8	8	24	131
0.04	8	5	6	19	169
0.05	6	5	6	17	—

随着雌二醇含量的增加, 外观性状、涂展性以及粘稠度都有显著影响。乙醇的用量同时随着雌二醇含量的增加而增加。加入 0.01 g 雌二醇时, 凝胶出现颗粒状且难以涂抹。增大雌二醇的用量, 成膜时间先减少后增加。当用量达到 0.05 g 时, 凝胶难以成膜。综上所述, 雌二醇含量在 0.02 g 时, 成膜时间达到最低值。

3.3.1.8 乙醇用量探究

探究乙醇用量, 评分结果见表 3.10。

表 3.10 乙醇用量探究评分表

(见原始记录 2018344017-PY-1 册.-p24)

Table 3.10 Ethanol usage evaluation table

乙醇用量 (%)	外观性状	涂展性	粘稠度	感官评分	成膜时间 (s)
4.5	6	8	8	22	102
5.0	10	8	10	28	96
5.5	10	10	10	30	74
6.0	4	5	2	11	124
10.0	2	2	1	5	—

乙醇用量为 4.5% 时, 凝胶平整光滑, 但呈现不透明乳白色, 说明含量不足以将雌二醇溶解。当增加乙醇用量至 5-5.5% 时, 雌二醇溶解完全, 凝胶各项指标良好, 成膜时间逐渐缩短; 当达到 5.5% 时, 成膜时间最短达到 74 s。而当乙醇用量为 10% 时, 凝胶难以成形, 且粘度大大降低。最后确定最适宜的乙醇用量为 5.5%, 促成膜效果较好。

3.3.1.9 甘油用量的探究

为了使皮肤在涂抹凝胶时更舒适, 需要在凝胶中加入适量甘油, 表 3.11 为凝胶中润滑剂甘油的用量探究。

表 3.11 甘油用量探究评分表

(见原始记录 2018344017-PY-1 册-p26)

Table 3.11 Glycerine dosage evaluation table

甘油用量 (%)	外观性状	涂展性	粘稠度	感官总分	成膜时间 (s)
5.0	10	10	8	28	104
10.0	10	10	8	28	86
15.0	10	6	6	22	126

如表 3.11 所示, 当甘油的剂量为 5%、10% 时各项指标无显著差异, 但随着润滑剂含量的增加, 成膜时间减少。当甘油剂量为 15% 时, 形成薄膜所需时间长, 容易被擦拭, 但粘稠度会有影响。综上所述, 甘油用量确定为 10%。

3.3.1.10 促渗剂种类及用量探究

为了探究加入不同种类促渗剂对凝胶相容性的影响,评分结果如表 3.12,由表可见,加入油酸和薄荷油时凝胶各项指标、感官总分相对较差,而加入其它三种促渗剂指标评分无明显变化,因此考察加入量为 2% 时三种促渗剂的促渗效果。

表 3.12 促渗剂种类探究评分表
(见原始记录 2018344017-PY-1 册.-p27)

Table 3.12 Permeability enhancer type investigation and evaluation table

促渗剂名称	外观性状	涂展性	粘稠度	感官总分
丙二醇	10	8	7	25
油酸	4	6	4	14
月桂氮卓酮	8	10	8	26
N-甲基吡咯烷酮	8	8	8	24
薄荷油	2	2	0	4

图 3.2 表示的加入不同量促渗剂月桂氮卓酮时雌二醇的体外透皮曲线,0~10 h 时 Q_n 释放速度快速增加,10~12 h Q_n 释放速度缓慢,12~24 h Q_n 释放速度趋于平衡。4 组加入促渗剂后释放速度均高于对照组,24 h 内月桂氮卓酮含量为 1%、2%、4%、6% 范围中,4% 的促渗剂累积透皮量达到最高值。

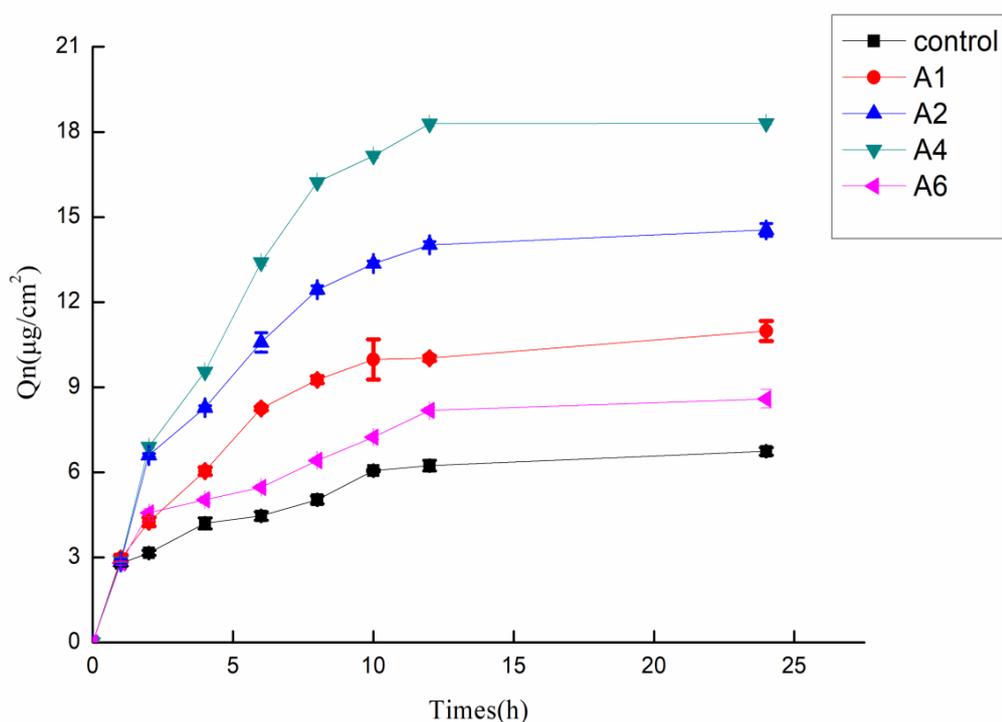


图 3.2 加入不同比例月桂氮卓酮时雌二醇的体外透皮曲线 (n=3)
(见原始记录 2018344017-PY-1 册-p28)

Figure 3.2 In vitro transdermal curve of Estradiol with different proportion of laurazepron (n=3)

(A1:1%月桂氮卓酮, A2:2%月桂氮卓酮, A4:4%月桂氮卓酮, A6:6%月桂氮卓酮)

如图 3.3 所示加入不同比例的丙二醇时雌二醇体外透皮曲线, 4 组加入促渗剂后释放速度均高于对照组, 0~12h Qn 释放速度快速增加, 12~24 h Qn 释放速度趋于平衡。24 h 内 4%的丙二醇促渗剂累积透皮量达到最高值。

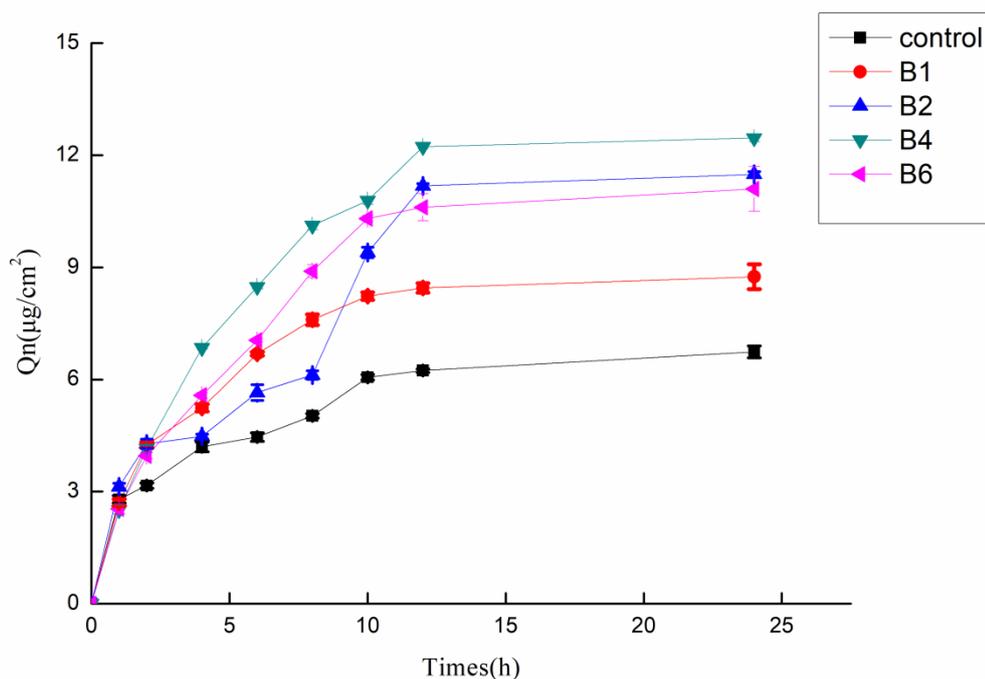


图 3.3 加入不同比例丙二醇时雌二醇的体外透皮曲线 (n=3)
(见原始记录 2018344017-PY-1 册-p29)

Figure 3.3 In vitro transdermal curve of Estradiol with different proportion of propylene glycol (n=3)

(B1:1%丙二醇, B2:2%丙二醇, B4:4%丙二醇, B6:6%丙二醇)

如图 3.4 所示加入不同比例的 N-甲基吡咯烷酮时雌二醇体外透皮曲线, 4 组加入促渗剂后释放速度均高于对照组, 促渗剂含量的增加对凝胶的外观性能有着重要影响, 导致主药释放缓慢, 24h 内 4% 的 N-甲基吡咯烷酮促渗剂累积透皮量达到最高值。

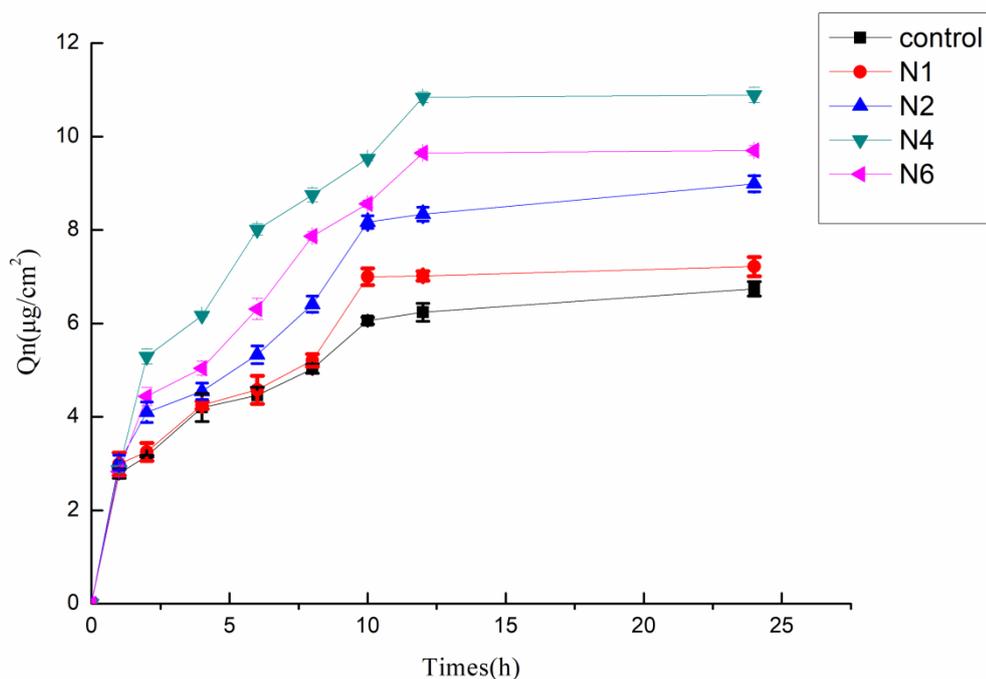


图 3.4 加入不同比例 N-甲基吡咯烷酮时雌二醇的体外透皮曲线 (n=3)

(见原始记录 2018344017-PY-1 册-p29)

Figure 3.4 In vitro transdermal curve of Estradiol with different proportion of N-methylpyrrolidone (n=3)

(N1:1% 丙二醇, N2:2% 丙二醇, N4:4% 丙二醇, N6:6% 丙二醇)

表 3.13 所示 24 h 内累积透过量及累积透过率结果, 加入促渗剂后释放速度均高于对照组, 随着丙二醇的增加透过量呈现一直增大的趋势, 月桂氮卓酮和 N-甲基吡咯烷酮的促渗效果先增大后减小, 当用量达到时累积透过量达到 $18.31 \pm 0.25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, 累积透过率达到 $75.31 \pm 2.13\%$, 因此选用 4% 的月桂氮卓酮作为促渗剂。

表 3.13 不同促渗剂条件下的单位面积累积透过量 (n=3)

(见原始记录 2018344017-PY-1 册-p30)

Table 3.13 Cumulative permeability per unit area under different skin penetration enhancers (n=3)

促渗剂种类及含量	24 h 单位面积累积透过量 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	24 h 累积透过率 (%)
无促渗剂	6.74±0.14	26.96±1.56
1%丙二醇	8.75±0.78	35.00±3.12
2%丙二醇	11.49±0.34	45.96±1.36
4%丙二醇	12.46±0.33	49.84±1.32
6%丙二醇	11.1±0.56	44.40±2.24
1%月桂氮卓酮	10.98±0.22	43.92±0.88
2%月桂氮卓酮	14.55±0.28	58.20±1.12
4%月桂氮卓酮	18.31±0.23	73.24±1.92
6%月桂氮卓酮	8.59±0.67	34.36±2.68
1%N-甲基吡咯烷酮	7.22±0.02	28.88±1.08
2%N-甲基吡咯烷酮	8.99±0.06	35.96±2.24
4%N-甲基吡咯烷酮	10.89±0.49	43.56±1.96
6%N-甲基吡咯烷酮	9.70±0.77	38.80±3.08

3.3.1.11 防腐剂的选择

如表 3.14 所示,把含量为 0.05%的羟苯乙酯作为防腐剂,探究雌二醇成膜凝胶的各项指标得分。

表 3.14 防腐剂探究评分表

Table 3.14 Preservative inspection rating table

防腐剂用量	外观性状	涂展性	粘稠度	感官总分	成膜时间 (s)
0.05%羟苯乙酯	8	8	8	24	76

3.3.2 制备雌二醇成膜凝胶工艺探究

表 3.15 所示的雌二醇成膜凝胶制备工艺的评分表,凝胶剂的粒度标准为

180 μm 以内, a, b 两种方式均符合要求, 但 b 方式后载药法制得的凝胶各项指标略差于 a 方式。因此根据评分要求, 将 a 方式做为凝胶的最终制备选择。

表 3.15 制备工艺探究评分表

Table 3.15 Preparation process evaluation table

制备方式	外观性状	涂展性	粘稠度	感官总分	粒度 (μm)
a	8	8	8	24	<180
b	6	8	6	20	<180

3.3.3 处方优化分析

3.3.3.1 响应面设计及结果

表 3.16 为响应面法对雌二醇成膜凝胶最优处方的设计。

表 3.16 雌二醇凝胶 BBD 实验设计表

Table 3.16 Experimental design table of Estradiol gel BBD

Factor	Levels		
	Low (-1)	Medium (0)	High (+1)
卡波姆	0.05%	0.10%	0.15%
雌二醇	0.01%	0.02%	0.03%
乙醇	5.00%	5.50%	6.00%

如表 3.17 所示, 按照响应面设计的 17 个处方进行雌二醇成膜凝胶的制备, 对凝胶的各项指标进行综合评分。

表 3.17 雌二醇凝胶响应面设计结果表

(见原始记录 2018344017-PY-1 册-p35)

Table 3.17 Estradiol gel response surface design results table

处方	卡波姆	雌二醇	乙醇	成膜时间评分	外观评分	综合评分
1	-1	-1	0	18.5	16	34.5
2	1	1	0	16.9	18	34.9
3	-1	1	0	25.1	20	45.1
4	0	0	0	27.5	25	52.5
5	0	1	-1	26.7	20	46.7
6	0	0	0	27.1	25	52.1
7	1	-1	0	22.4	18	40.4
8	0	0	0	29.2	23	52.2
9	-1	0	-1	23.6	16	39.6
10	1	0	-1	29.3	20	49.3
11	-1	0	1	21.3	16	37.3
12	1	0	1	17.8	15	33.8
13	0	0	0	28.8	24	52.8
14	0	-1	1	16.9	20	36.9
15	0	-1	-1	24.3	22	46.3
16	0	1	1	20.3	23	43.3
17	0	0	0	28.1	25	53.5

3.3.3.2 响应面法模型拟合结果分析

表 3.18 为成膜凝胶的方差分析结果, 通过 Dx-8 进行分析, 三种因素对凝胶的成膜时间 (Y) 均有显著影响性, $P < 0.05$ 时, 显著程度越高, F 为失拟项。F=18.16, $P < 0.0001$ 回归效果明显; F=33.60, $P=0.0086 (<0.05)$, 失拟项相对于纯误差不显著, 不存在不匹配因子。决定系数 $R^2=97.74\%$, 校正决定系数 $R^2_{Adj}=94.83\%$, 其中 B 项 $P=0.0362$ 、C 项 $P=0.0003$ 、AB 项 $P=0.0017$ 、AC 项 $p=0.0048$, 均小于 0.05, 且对成膜时间有显著的影响。A 项 $P=0.6921$ 、BC 项 $P=0.1078$, 均大于 0.05, 说明 A、B 项与 C 项无明显作用, A 项与 B 项和 C 项作用相对明显。因此, 这三种因素可以分析预测雌二醇成膜凝胶的成膜时间。拟合方程为:

$$Y=52.62+0.24A+1.49B-3.83C-4.03AB-3.30AC+1.50BC-8.60A^2-5.30B^2-4.02C^2$$

表 3.18 雌二醇凝胶响应面方差分析
(见原始记录 2018344017-PY-1 册.-p34)

Table 3.18 Estradiol gel response surface analysis of variance

来源	平方和	自由度	均方和	F	P
模型	800.74	9	88.97	33.60	<0.0001
A	0.45	1	0.45	0.17	0.6921
B	17.70	1	17.70	6.68	0.0362
C	117.05	1	117.05	44.20	0.0003
AB	64.8	1	64.8	24.47	0.0017
AC	43.56	1	43.56	16.45	0.0048
BC	9.00	1	9.00	3.40	0.1078
A ²	311.23	1	311.23	117.54	<0.0001
B ²	118.16	1	118.16	44.62	0.0003
C ²	68.13	1	68.13	25.73	0.0014
Residual	18.54	7	2.65		
Lack of Fit	17.27	3	5.76	18.16	0.0086
Pure Error	1.27	4	0.32		
Cor Total	819.28	16			
确定系数	R-Squared	0.9774	调整系数	Adj R-squared	0.9483

通过响应曲面分析三种因素的相互作用,利用单因素法,进行多元回归拟合得到卡波姆=0.11%,雌二醇=0.02%,乙醇=5.24%。计算出响应值以及 3D 形式的得到的等高线,将因素与响应值之间的影响作用更加直接的表达出来。如图 3.8、图 3.9、图 3.10 所示,各变量相互拟合的三维曲面图及等高线图。根据响应面结果可知,两因素之间互相为马鞍形,预测得到的最大值为 53.63,因此制备雌二醇成膜凝胶的最佳处方为卡波姆=0.11%,雌二醇=0.02%,乙醇=5.24%。

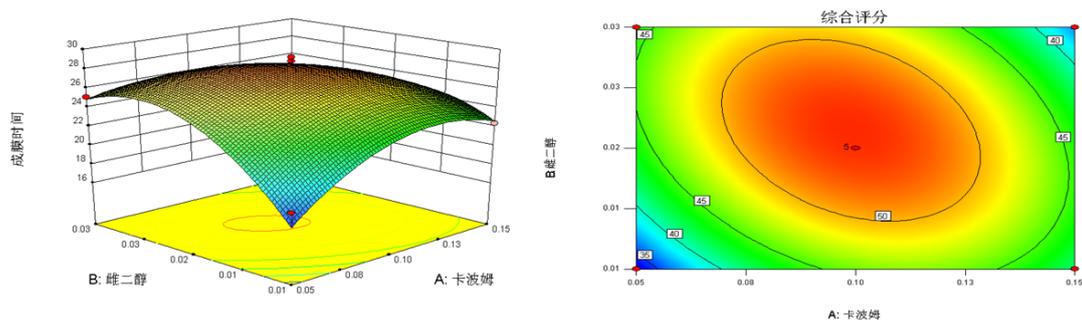


图3.8 雌二醇与卡波姆交互作用对凝胶剂综合评分的影响

(见原始记录2018344017-PY-1册.-p36)

Figure 3.8 Effect of interaction between Estradiol and carbomer on synthetic score of gel agent

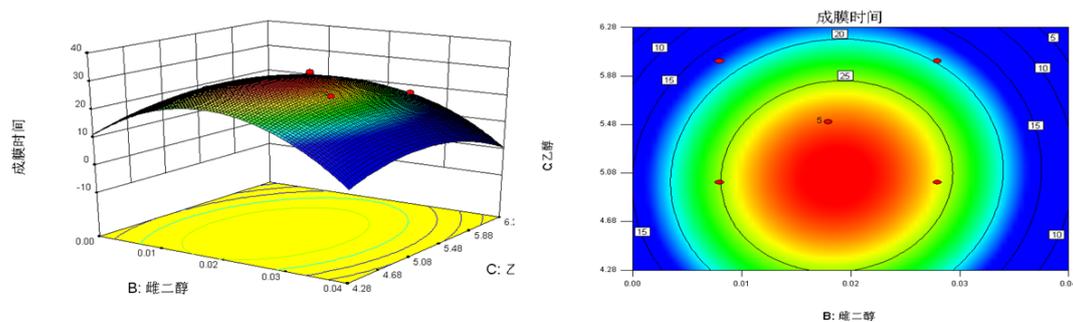


图3.9 乙醇与卡波姆交互作用对凝胶剂综合评分的影响

(见原始记录2018344017-PY-1册-p36)

Figure 3.9 Effect of interaction between ethanol and carbomer on synthetic score of gelling agent

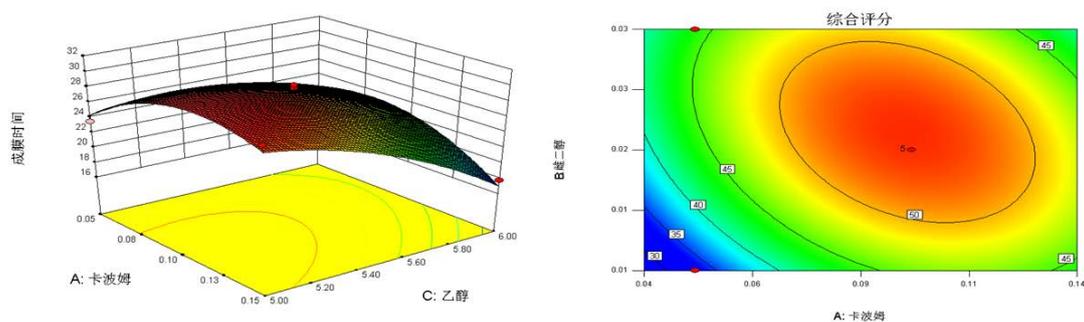


图3.10 乙醇与雌二醇交互作用对凝胶剂综合评分的影响
(见原始记录2018344017-PY-1册.-p37)

Figure 3.10 Effect of interaction between ethanol and Estradiol on comprehensive score of gelling agent

3.3.3.3 雌二醇凝胶处方验证

最优处方结果为：卡波姆=0.11%，雌二醇=0.02%，乙醇=5.24%，如表 3.19 所示三批凝胶 RSD=0.66%，平均综合评分为 53.1，相对误差为 1.12%，且凝胶的各项指标良好。

表 3.19 最优处方验证结果

Table 3.19 Validation results of optimal prescription

序号	成膜时间 (s)	外观评分	综合评分
1	28.5	25	53.5
2	27.8	25	52.8
3	28.1	25	53.1

3.3.4 雌二醇成膜凝胶最终处方

根据单因素法初步筛选处方以及响应面法进行处方优化，最终得出雌二醇成膜凝胶的最终处方，见表 3.20。

表 3.20 雌二醇成膜凝胶最终处方

Table 3.20 Final formulation of Estradiol film-forming gel

种类	含量 (%)	作用
卡波姆	0.11	凝胶基质
PVP	0.25	成膜剂
甘油	0.10	保湿剂
月桂氮卓酮	0.40	促渗剂
乙醇	5.24	溶剂、促成膜剂
雌二醇	0.02	主药
去离子水	3.88	溶剂

3.4 本章小结

1、本章建立了雌二醇成膜凝胶评分准则，利用控制单因素变量法，对制备凝胶材料进行了筛选，其中包括凝胶基质、成膜剂、促渗剂、主药、润滑剂、防腐剂种类以及用量的选择，最终确定出三个对成膜时间影响较大的三个因素：卡波姆、雌二醇、乙醇的用量。

2、本章探究了雌二醇成膜凝胶采用前后载药两种方式进行制备，通过各项指标评分、成膜时间以及粒度等，最终采取后载药法，确保凝胶的外观形态等保持最优状态。

3、本章运用响应面法，预测的模型 P 值 < 0.0001 ， $R^2=97.74\%$ ，且拟合度良好，显著性高，可对雌二醇成膜凝胶最优处方进行预测。由回归方程得到的最优处方为 卡波姆 = 0.11%，雌二醇 = 0.02%，乙醇 = 5.24%，凝胶评分预测值为 53.6。根据 $Dx-8$ 分析得出最佳处方，制备雌二醇凝胶的综合评分为 53.1， $RSD=0.66\%$ ，两者相差误差较小，较为准确。

第4章 雌二醇凝胶的体外释放和质量标准研究

为了确定雌二醇在体外释放的含量多少,首先需要测定方法进行筛选,并参考 2015 药典对雌二醇成膜凝胶的制备标准和雌二醇成膜凝胶的各方面特性进行探究。

4.1 仪器与试剂

4.1.1 仪器

仪器名称	型号	生产厂家
分析天平	BS224S	北京赛多利斯科学仪器有限公司
粘度计	SNB-1	上海精密科学仪器有限公司
超声波清洗仪	K5-800	宁波科生设备有限公司
稳定性箱	LSF-2000	日本理化器械株式会社
高效液相色谱	LC-20A	日本岛津公司
pH 计	FE20K	瑞士梅特勒托利多公司
高速冷冻离心机	Centrifuge 5810R	德国 Eppendorf 公司
高效液相色谱仪	LC-20A	日本岛津公司
电子天平	AB204-N	常州国华电器有限公司
磁力搅拌器	S25-2 型	梅特勒-托利多仪器有限公司
透析袋	8000-14000	江苏科特有限公司

4.1.2 试剂

材料名称	生产厂家
雌二醇标准品	批号：100182-201205，中国食品药品检定研究院
乙醇	分析纯，国药集团化学试剂有限公司
甘油	湖南尔康制药股份有限公司
甲醇	色谱纯，天津市科密欧化学试剂有限公司
羟丙甲基- β -环糊精	HP- β -CD，安徽山河辅料股份有限公司
聚乙二醇 400	PEG 400，国药集团化学试剂有限公司
卡波姆	阿拉丁试剂有限公司
聚乙烯吡咯烷酮	源叶生物有限公司
甘油	国药集团化学试剂有限公司
乙醇	国药集团化学试剂有限公司
羟苯乙酯	上海山浦化工有限公司
薄荷油	源叶生物有限公司

4.2 方法

4.2.1 体外释放度测定

4.2.1.1 介质选择

设置九个实验对照组，每个实验组中加入雌二醇 0.05 g 置于棕色玻璃瓶中并分别加入 10 mL PBS 介质中，保持温度恒定振荡 24 h，并分别取出各个样本过滤膜 0.45 μm ，接着用 HPLC 方法进行测定雌二醇的含量。

4.3 雌二醇成膜凝胶理化性质的探究

4.3.1 感官探究

理想状态下的雌二醇成膜凝胶的观感效果应是粘度适宜，具有一定透明度且凝胶细腻无颗粒感。

4.3.2 成膜性探究

为了测试雌二醇成膜凝胶的成膜时间，设置了相应的测试：从各样品中取

0.2g 样本涂抹于手背表层，涂抹面积应保持一致 2 cm×2 cm，随后计时，待成膜后记录成膜时间。

4.3.3 酸碱度探究

每个样品取 1.0g 样品，加入去离子水 10ml 超声处理。10 min 后，用 pH 计测量 pH 值。

4.3.4 粒度探究

《中国药典》中规定凝胶颗粒标准应小于 180 μm ，故从各样品中取 0.2g 均匀涂抹于载玻片上进行颗粒度测定。

4.3.5 粘度探究

25℃ 温度下取 10 g 雌二醇成膜凝胶，使用 SNB-1 型数字式粘度计，用三号转子分别将凝胶在 12.0RPM 转速下检测，三次测定后计算平均值。

4.4 雌二醇成膜凝胶稳定性探究

4.4.1 高温试验

取出三组雌二醇成膜凝胶，60℃ 环境下，将内含有雌二醇凝胶的棕色西林瓶开口放置 6 天，分别在当天、第 3 天和第 6 天进行取样，对样品的观感进行评估并且检测样品中雌二醇的含量。

4.4.2 高湿试验

取出三组雌二醇成膜凝胶，25℃ 条件下，将雌二醇凝胶放置在 92.5% 的饱和 KNO_3 溶液环境中 6 天，分别在当天、第 3 天和第 6 天进行取样，对样品的观感进行评估并且检测样品中雌二醇的含量。

4.4.3 光照试验

取出三组雌二醇成膜凝胶，4500±500 lx 照度下，置于开口棕色西林瓶中放置 6 天，在放置当天、第 3 天和第 6 天分别取样，对样品的观感进行评估并且检测样品中雌二醇的含量。

4.4.4 加速试验

取出三组雌二醇成膜凝胶，在 $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度为 $60\pm 5\%$ 条件下，放置一个月，分别在放置当天、第 15 天和第 30 天进行取样，对样品的观感进行评估并且检测样品中雌二醇的含量。

4.5 结果与讨论

4.5.1 体外释放度测定的方法学研究

4.5.1.1 释放介质的选择

如表 4.1 所示，雌二醇在不同种类、不同含量的介质中的溶解度不同，其中将雌二醇加入 PBS 缓冲液时溶解度最低。

表 4.1 雌二醇在不同介质中的溶解度测定结果 (n=3)

(见原始记录 2018344017-PY-1 册.-p41)

Table 4.1 Determination results of the solubility of Estradiol in different media (n=3)

溶液	浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
PBS	5.30
0.5% SDS-PBS	73.04
1.0% SDS-PBS	140.94
0.5% HP- β -CD-PBS	88.16
1.0% HP- β -CD -PBS	161.96
2.5% 吐温 80-PBS	83.89
5.0% 吐温 80-PBS	167.52
2.5% PEG-400-PBS	1.98
5.0% PEG-400-PBS	2.41

雌二醇是典型的疏水性药物，在缓冲液中无法溶解完全，无法释放到体外。SDS 和 HP- β -CD 的 PBS 缓冲液在 0.5% 的溶液浓度下可以满足释放条件，但浓度为 0.5% 的 HP- β -CD 缓冲液会造成透析袋吸水膨胀，造成药物释放的不准确性。吐温 80 过于粘稠，影响药效。PEG-400 有轻微的促进效果，但试剂粘稠，不选择。故选择 1.0% SDS 缓冲液作为释放介质效果会最好。

4.5.2 雌二醇成膜凝胶理化性质的探究

4.5.2.1 凝胶外观探究

雌二醇成膜凝胶的形状图如图 4.1 所示，从图中可以看出，凝胶的颜色呈白色透明状且粘度适中，有一定的延展性。



图 4.1 雌二醇成膜凝胶外观性状
(见原始记录 2018344017-PY-1 册.-p43)

Figure 4.1 Appearance of Estradiol gel

4.5.2.2 凝胶成膜性探究

雌二醇成膜凝胶的成膜性如图 4.3 所示，图 A 为均匀涂抹时，图 B 为涂抹 40 s 后，图 C 为涂抹 80 s 后，80 s 后凝胶已基本成膜。



图 4.3 雌二醇成膜凝胶成膜性 (见原始记录 2018344017-PY-1 册-p43)

Figure4.3 Formability of Estradiol gel

雌二醇成膜凝胶成膜时间结果如表 4.2 所示，成膜时间在 72-79 s 且三批次的凝胶成膜时间稳定。

表 4.2 雌二醇成膜凝胶成膜时间探究表 (n=3)

(见原始记录 2018344017-PY-1 册-p44)

Table 4.2 Film formation time about Estradiol gel (n=3)

批次	成膜时间 (s)	RSD (%)
1	75	1.57
2	79	2.40
3	72	1.83

4.5.2.3 酸碱度探究

由表 4.3 可知，雌二醇成膜凝胶酸碱度为 5.92~6.40，与皮肤 pH 相接近，刺激性较小。

表 4.3 雌二醇成膜凝胶酸碱度探究表 (n=3)

(见原始记录 2018344017-PY-1 册-p45)

Table 4.3 pH of Estradiol gel (n=3)

批次	酸碱度
1	5.92
2	6.34
3	6.38

4.5.2.4 粒度探究

如表 4.4 所示，三组凝胶的粒度均小于 180 μm ，符合凝胶剂的相关规定。

表 4.4 雌二醇成膜凝胶粒度探究表 (n=3)

(见原始记录 2018344017-PY-1 册-p46)

Table 4.4 Size of Estradiol gel (n=3)

批次	粒度 (μm)
1	<180
2	<180
3	<180

4.5.2.5 粘度探究

对三组凝胶的粘度进行测量结果如表 4.4 所示,雌二醇成膜凝胶的粘度适宜,符合凝胶粘度要求,范围在 8.97~9.36 Pa·s 之间。

表 4.5 雌二醇成膜凝胶粘度探究表 (n=3)

(见原始记录 2018344017-PY-1 册-p47)

Table 4.5 Viscosity about Estradiol gel (n=3)

批次	粘度 (Pa·s)	RSD (%)
1	8.97	1.54
2	9.36	1.12
3	9.15	1.46

4.5.3 雌二醇成膜凝胶稳定性结果

4.5.3.1 影响因素

4.5.3.1.1 高温试验

由表 4.6 可知,将开口的西林瓶放置在 60℃ 高温条件,凝胶会发生失水现象,粘度整体性下降,外观形态受到影响,且雌二醇含量随着失水现象的产生会受到轻微影响,但酸碱度保持不变。结果表明,雌二醇成膜凝胶不耐高温。

表 4.6 雌二醇成膜凝胶高温试验结果 (n=3)

(见原始记录 2018344017-PY-1 册-p48)

Table 4.6 High temperature test result of Estradiol Gel (n=3)

时间 (天)	性状	酸碱度	含量 (%)
0	白色透明凝胶,粘度适中	6.12	99.89
3	白色透明凝胶,粘度较小	6.15	98.81
6	白色透明凝胶,粘度很小	6.15	95.72

4.5.3.1.2 高湿试验

结果如表 4.7 所示,三组取样凝胶在恒湿密闭环境中性状、酸碱度、含量均几乎无变化,说明其稳定性良好。

表 4.7 雌二醇成膜凝胶高湿试验结果 (n=3)

(见原始记录 2018344017-PY-1 册-p49)

Table 4.7 High humidity test result of Estradiol Gel (n=3)

时间 (天)	性状	酸碱度	含量 (%)
0	白色透明凝胶, 粘度适中	5.98	99.83
3	白色透明凝胶, 粘度适中	6.03	99.81
6	白色透明凝胶, 粘度适中	6.07	99.77

4.5.3.1.3 光照试验

结果如表 4.8 所示,样本凝胶在强光照条件下粘度减小、酸碱度随着光照时间的增长而增大、含量大幅度减小,说明其在强光照条件下稳定性较差。

表 4.8 雌二醇成膜凝胶光照试验结果 (n=3)

(见原始记录 2018344017-PY-1 册-p50)

Table 4.8 Strong light test result of Estradiol Gel (n=3)

时间 (天)	性状	酸碱度	含量 (%)
0	白色透明凝胶, 粘度适中	6.07	99.98
3	白色透明凝胶, 粘度很小	8.38	42.12
6	白色透明凝胶, 粘度很小	11.91	13.95

4.5.3.1.4 加速试验

对雌二醇成膜凝胶进行三个月加速试验结果如表 4.9 所示,雌二醇成膜凝胶在 $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度为 $60\pm 5\%$ 条件下性状、酸碱度、含量均几乎无明显变化,说明其稳定性良好。

表 4.9 雌二醇成膜凝胶加速试验结果 (见原始记录 2018344017-PY-1 册-p51)

Table 4.9 Accelerated test result of Estradiol Gel

时间 (天)	性状	酸碱度	含量 (%)
0	白色透明凝胶, 粘度适中	5.97	100.03%
15	白色透明凝胶, 粘度适中	5.99	100.02%
30	白色透明凝胶, 粘度适中	5.99	99.98%

4.6 本章小结

1. 本章研究了雌二醇的释放机制，雌二醇在 SDS、吐温 80、HP- β -CD 释放介质中溶解度均有所提高，释放介质效果最好的是浓度为 1.0% 的 SDS 缓冲溶液，释放出雌二醇含量达到 140.94 ($\mu\text{g/ml}$)。

2、本章探究了雌二醇成膜凝胶的理化性质，经证明凝胶的外观形态良好，质地均匀透明，且可以快速成膜被人体吸收利用，pH 值在 5.92~6.40，粘度为 8.97~9.36 Pa·s。

3、本章探究了稳定性对雌二醇成膜凝胶的影响，60 $^{\circ}\text{C}$ 条件下雌二醇成膜凝胶不耐高温、4500 \pm 500 lx 条件下不耐强光，92.5%，25 $^{\circ}\text{C}$ 的高湿条件下无明显变化；30 \pm 2 $^{\circ}\text{C}$ 、湿度 60 \pm 5% 条件下的加速试验稳定性良好。

第5章 雌二醇成膜凝胶的初步药代动力学研究

由第4章雌二醇成膜凝胶质量探究结果可知，其均匀细腻，涂展性良好且可快速成膜，可用于皮肤给药，本章进一步对雌二醇成膜凝胶的初步药代动力学进行研究。

5.1 仪器与试剂

5.1.1 仪器

仪器名称	型号	生产厂家
超声波清洗仪	K5-800	宁波科生仪器
分析天平	BS224S	北京赛多利斯科学仪器有限公司
酶标仪	Bio Tek SYNERGY4	美国伯腾仪器有限公司
高速离心机	Centrifuge	德国 Eppendorf 公司
涡旋混合仪	5810RXW-80A	上海医科大学仪器厂
恒温水浴锅	DK-S24	上海精宏实验设备有限公司
超净工作台	SwtJ-1c	苏州安泰有限公司

5.1.2 材料与试剂

材料名称	生产厂家
生理盐水	国药集团化学试剂有限公司
乙醇	Chondrex 公司
肝素	江苏科特生物科技有限公司
毛细血管	英国葛兰素史克公司
Elisa 试剂盒 (E2)	江苏科特生物科技有限公司

5.1.3 实验动物

SPF 级雌性 SD 大鼠，体重 160-180 g，IVC 系统，25℃，40~60%湿度下自由饮水及进食，从辽宁长生生物技术股份有限公司购入。

5.2 实验方法

5.2.1 标准品溶液的制备

为了配制出 5 号标准品溶液浓度为 200 pmol/L, 取 400 pmol/L 的原倍标准品 150 μL , 再加入标准品稀释液 150 μL ; 为了配制 4 号标准品溶液浓度为 100 pmol/L, 取 150 μL 的 5 号标准品溶液, 再加入标准品稀释液 150 μL ; 为了配制出 3 号标准品溶液浓度为 50 pmol/L, 取 150 μL 的 4 号标准品溶液, 再加入标准品稀释液 150 μL ; 为了配制出 2 号标准品溶液浓度为 25 pmol/L, 取 150 μL 的 3 号标准品溶液, 再加入标准品稀释液 150 μL ; 1 号溶液配制为 12.5 pmol/L, 取 2 号溶液 150 μL , 加入标准稀释液 150 μL 。

5.2.2 雌二醇血药含量测定方法

如 2.2.2 雌二醇测定色谱条件所示绘制标准曲线所示, 利用酶标仪将标准物的浓度作为横坐标, 吸光度值作为纵坐标, 于 450 nm 波长下根据纵坐标计算出横坐标的数值, 再乘以 50 倍的稀释倍数, 为实际样品的浓度。

5.2.3 大鼠血药浓度实验

取 6 只体重为 160-180 g 的 SD 雌性大鼠, 将大鼠分为两组, 每组随机分 3 只, 分为 V1 组和 V2 组, V1 组涂抹雌二醇凝胶, V2 组给涂抹凝胶但不给药。然后在大鼠的背部进行脱毛处理, 面积为 $2 \times 2 \text{cm}^2$, 分别将制备好的凝胶 0.2 g 涂抹于大鼠的背部。在设定的实验时间点眼眶取血 (1 h、2 h、4 h、6 h、8 h、12 h、24 h、48 h、72 h) 取出的九组 0.5 mL 的眼眶血快速放置到 EP 试管中, 试管应提前肝素化, 接着用离心机 3000 r/min, 离心 10 min, 将血浆与血清分离, 所得到的血清留下使用 Elisa 试剂盒进行相关雌二醇的测定。

5.2.4 统计分析

通过 DAS2.0 软件对所得数据统计分析, 当 P 值小于 0.05 时, 代表数据差异性显著; P 值小于 0.01 时, 代表数据性差异极为显著。

5.3 实验结果与讨论

5.3.1 标准曲线的绘制

按照 5.2.1 项条件, 绘制对照品—雌二醇浓度线性曲线, 12.5~200.0 pmol/L 的范围内的标准曲线见图 5.1 所示, 具有良好的线性关系 $R^2 = 0.9997$, 回归方程为: $y = 0.0134x - 0.0103$, 具体的方法学方法如 2.2.2 所示。

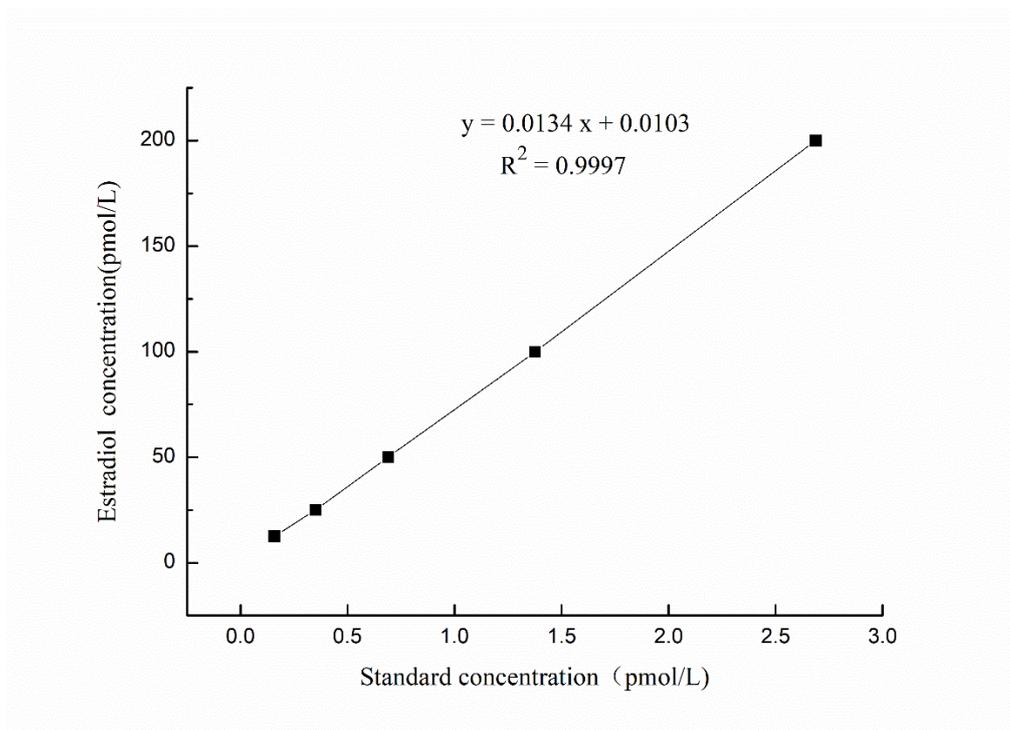


图 5.1 HPLC 测定雌二醇标准品浓度(n=3)

(见原始记录 2018344017-PY-1 册-p53)

Figure 5.1 Estradiol concentration of standard determination of estradiol by HPLC (n=3).

5.3.2 血药浓度测定结果

动物实验方案处理后, 表 5.1 为大鼠涂抹雌二醇后的血药浓度, 图 5.2 为大鼠体内的血药浓度随时间变化的曲线图。

表 5.1 大鼠体内雌二醇的血药浓度(n=3)

(见原始记录 2018344017-PY-1 册.-p55)

Table 5.1 Blood concentration of Estradiol in rats(n=3)

时间 (h)	给药组		对照组	
	浓度(pmol/L)	RSD (%)	浓度 (pmol/L)	RSD (%)
1	26.35	0.97	18.95	2.53
2	30.10	1.55	22.65	1.56
4	39.15	2.18	21.35	3.75
6	49.90	2.52	21.55	1.87
8	67.10	1.75	24.05	1.81
10	77.05	1.41	23.95	1.98
12	46.25	1.87	21.45	1.27
24	36.20	1.57	23.85	0.67
48	24.40	0.56	19.45	0.83
72	19.80	0.85	16.70	2.72

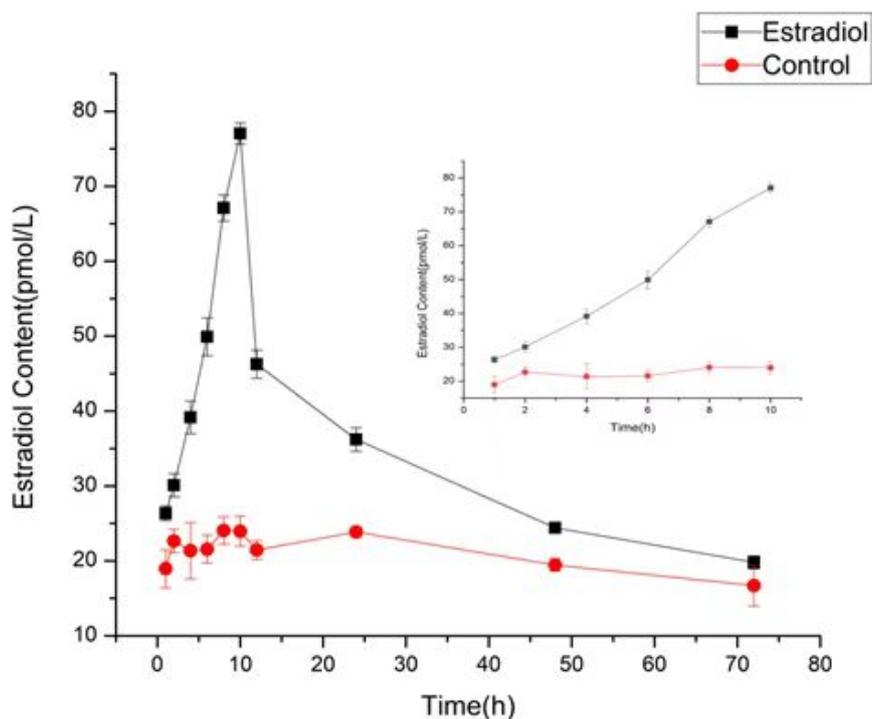


图 5.2 大鼠体内雌二醇的浓度变化 (见原始记录 2018344017-PY-1 册.-p65)

Figure 5.2 Changes of Estradiol concentration

0~72 h 内 SD 大鼠给药组的血药浓度呈现先升高后下降的趋势, 10 h 时药效最高峰, 雌二醇的血药浓度达到 77.05 pmol/L, 随后大幅度下降。48 h 给药组与对照组的雌二醇血药浓度相接近, 对照组中雌二醇的血药浓度一直保持稳定趋势变化。

5.3.3 大鼠体内雌二醇含量的药代动力学研究

表 5.2 大鼠体内雌二醇含量药代参数 (n=3)

(见原始记录 2018344017-PY-1 册-p56)

Table 5.2 Pharmacokinetic parameters of Estradiol content in rats (n=3)

参数	单位	Mean±SD
AUC(0-t)	pg/L*h	830.83±6.96
t _{1/2}	H	13.48±4.19
T _{max}	H	10.00±2.21
K _a	1/h	0.33±0.13
C _{max}	pg/L	56.44±1.24
R ²		0.82±0.01

表 5.2 为大鼠给药后的血药浓度的药代参数。通过 DAS 软件得出, 药物在大鼠体内的具有良好的吸收、代谢规律, 并得出血药浓度随时间变化曲线。大鼠体内雌二醇含量的药代动力学参数良好,

5.4 实验结果与讨论

通过对雌二醇凝胶的初步药代动力学研究, 结果显示, 涂抹雌二醇凝胶后, 10 h 前大鼠体内雌二醇血药浓度较快升高, 10 h 达到体内给药血药浓度最高值, 而雌二醇的血药浓度在 24 h 后平稳, 缓慢的减低至正常水平。通过测定雌二醇含量的药代动力学参数, t_{1/2} 值为 13.48±4.19, 说明药物的释放时间可以维持在一天左右。

5.5 本章小结

本章对雌二醇成膜凝胶的药代动力学进行初步的研究, 通过涂抹雌二醇凝胶, 进行眼眶取血, 得出给药组与对照组, 得出雌二醇含量的血药浓度与时间变化的

曲线图，并计算出有关大鼠血药浓度的药代动力学参数。从血药浓度的趋势可以看出，本实验自制的雌二醇凝胶能够达到缓控释药，体内的渗透并保持血药浓度平稳的特点，可以延长药物的释放时间。

第6章 结论与展望

雌二醇可以缓解并治疗女性体内因雌激素水平降低引起的各种疾病，临床上常见的给药方式包括口服以及注射等。为使药效达到最佳，研究了一种成膜凝胶，不仅可以加大透皮吸收效率还可以使凝胶快速成膜，用药简单便捷。因此本实验研究了雌二醇成膜凝胶的制备用于治疗因雌激素缺乏导致的女性疾病。

6.1 结论

本文首先建立了雌二醇的体外分析方法，通过三因素三水平的响应面法确定了最佳处方并对凝胶的质量标准以及药效学方面进行了探究，结果如下：

1. 建立雌二醇的分析方法

0.5~200.0 $\mu\text{g/mL}$ 范围内雌二醇具有良好的线性关系，回归方程为 $y = 118547x + 640474$ ， $R^2 = 0.9995$ ；精密度和重复性良好；加样回收率范围在 99.20~104.70% 之间，此方法可以用于测定雌二醇成膜凝胶的含量。

2. 制备雌二醇成膜凝胶

首先，筛选出三个对凝胶影响较大的因素，通过响应面法确定出凝胶的最优处方，当 $P < 0.0001$ 时说明优化处方效果显著，分析得到 $R^2 = 97.74\%$ ，处方最终确定为卡波姆=0.11%，雌二醇=0.02%，乙醇=5.24%，制剂综合评分最大值为 53.63。

3. 制定与雌二醇成膜凝胶有关的质量标准

通过上述处方制定出的雌二醇成膜凝胶外观性状良好，粒度均小于 180 μm ，成膜时间较短，粘度为 8.97~9.36 Pa·s， $\text{pH} = 5.92 \sim 6.40$ 。凝胶在高温状态下易液化、光照条件下 pH 以及所含有的雌二醇含量均大幅度下降；高湿以及加速条件下，凝胶的各项性能指标均良好，故雌二醇凝胶耐高湿且具有较好的稳定性。

4. 雌二醇成膜凝胶药效学药代动力学探究

为了初步探究雌二醇成膜凝胶的药代动力学，取实验用的健康雌性 SD 大鼠眼眶取血，分离出血清，收集上清液后使用 ELISA 试剂盒进行相关雌二醇的测定。从血药浓度的趋势可以看出，雌二醇成膜凝胶能够达到缓控释药，体内的渗透并保持血药浓度平稳的特点，基本可以实现药物的缓释释放作用。

6.2 展望

本文研究了一种可快速成膜且药效良好的成膜凝胶——雌二醇成膜凝胶，是一种有潜力的外用补充雌激素的制剂。在接下来的研究中，需要加深对凝胶的机理的探究；在高温以及光照条件下凝胶的指标较差，如何减少雌二醇的含量损失有待进一步研究，更好的延长雌二醇成膜凝胶的有效期也为临床实验奠定基础。

参考文献

- [1] Joung,C.H.,C.Yoo-Sam,K.H.Jik. Signal pathway of 17beta-estradiol-induced MUC5B expression in human airway epithelial cells[J]. American Journal of Respiratory Cell & Molecular Biology, 2009, (2): 168-178.
- [2] Masamura, S., S.J. Santner, D. Heitjan, et al. Estrogen deprivation causes estradiol hypersensitivity in human breast cancer cells[J]. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 1995, (10): 2918-2925.
- [3] Pfaff, D. and M. Keiner. Atlas of estradiol-concentrating cells in the central nervous system of the female rat[J]. Journal of Comparative Neurology, 1973, (2): 121-157.
- [4] Barkley, M.S., I.I. Geschwind, and G.E. Bradford. The gestational pattern of Estradiol, testosterone and progesterone secretion in selected strains of mice[J]. Biology of Reproduction, 1979, (4): 733-738.
- [5] Shaikh, Abubakar A. Estrone and Estradiol Levels in the Ovarian Venous Blood from Rats During the Estrous Cycle and Pregnancy[J]. Biol Reproduc, 1971, (3):297-307.
- [6] Zhou, L.P. and X. Lin. Experimental study on influence xuzao gengping prescription in sex hormones of female rats climacteric hypertension[J]. Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2011.
- [7] Ferenczy A , Gelfand M M . Endometrial histology and bleeding patterns in post-menopausal women taking sequential, combined estradiol and dydrogesterone[J]. Maturitas, 1997, (3):219-226.
- [8] Coleman, P.M. Depression during the female climacteric period[J]. Journal of Advanced Nursing, 2010, (10): 1540-1546.
- [9] Firestein and S. Gary. Evolving concepts of rheumatoid arthritis[J]. Nature, 2003, (6937): 356-361.
- [10] 刘德芳, 郭明阳, 刘太华. 女性类风湿关节炎患者性激素变化及与炎症指标关系的研究[J]. 华西医学, 2011, (03): 28-30.
- [11] 祝静、晏波、蒋瑶、王东生、邢艳. 女性类风湿关节炎患者 miR-146a,miR-23b 的表达及雌激素对其的影响[J]. 川北医学院学报, 2020, (04): 95-99.

- [12] Sapir-Koren, R. and G. Livshits. Postmenopausal osteoporosis in rheumatoid arthritis: The estrogen deficiency-immune mechanisms link[J]. *Bone*, 2017, (103): 102-115.
- [13] 刘少玲, 孙树源, 李薇. 行为干预对冠状动脉粥样硬化性心脏病住院患者行为的影响[J]. *中国实用护理杂志*, 2006, (027): 11-12.
- [14] 吴聪聪, 李开军, 吴伟东. 绝经后女性冠心病患者雌激素水平与血型、血脂相关研究[J]. *浙江中西医结合杂志*, 2018, (003): 210-212.
- [15] Stampfer M J , Willett W C , Colditz G A , et al. A prospective study of postmenopausal estrogen therapy and coronary heart disease.[J]. *N Engl J Med*, 1985, (17):1044-1049.
- [16] Hulley, S., D. Grady, and T. Bush. Randomized trial of Estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women[J]. *Southern Medical Journal*, 1998, (7) : 605-13.
- [17] Tephly, T.R., E. Hasegawa, and J. Baron. Effect of drugs on heme synthesis in the liver[J]. *Metabolism Clinical & Experimental*, 1971, (2): 200-214.
- [18] 李能, 肝肠首过效应对齐墩果酸生物利用度的影响研究[D]. 广州中医药大学, 2012.
- [19] Neves, J.D. and M.F. Bahia. Gels as vaginal drug delivery systems[J]. *Int J Pharm*, 2006, (1-2): 1-14.
- [20] J.d.N.a.b., R.N.A. C, A.M.A. C, et al. Polymer-based nanocarriers for vaginal drug delivery[J]. *Advanced drug delivery reviews*, 2015, (92): 53-70.
- [21] Nahoul K , Dehennin L , Jondet M , et al. Profiles of plasma estrogens, progesterone and their metabolites after oral or vaginal administration of estradiol or progesterone[J]. *Maturitas*, 1993, (3):185-202.
- [22] Wokovich, A.M., S. Prodduturi, W.H. Doub, et al. Transdermal drug delivery system (TDDS) adhesion as a critical safety, efficacy and quality attribute[J]. *European Journal of Pharmaceutics & Biopharmaceutics*, 2006, (1): 1-8.
- [23] Bariya, S.H., M.C. Gohel, T.A. Mehta, et al. Microneedles: an emerging transdermal drug delivery system[J]. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2012, (1) : 11-29.
- [24] 华晓东, 任变文. 经皮给药系统的研究进展[J]. *现代药物与临床*, 2009, (5):282-285.

- [25] Schier, H. and J.A. Bouwstra. Liposomes and niosomes as topical drug carriers-dermal and transdermal drug delivery[J]. *Journal of Controlled Release*, 1994, (1): 1-15.
- [26] Nidhi, N., J. Sunil, S. Ranjit, et al. Transdermal applications of ethosomes – a detailed review[J]. *Journal of Liposome Research*, 2019, (2): 103-113.
- [27] Tuckermann, J. P. The DNA Binding-Independent Function of the Glucocorticoid Receptor Mediates Repression of Ap-1–Dependent Genes in Skin[J]. *The Journal of Cell Biology*, 1999, (7):1365-1370.
- [28] 陆洪光, 董丹, 马月红. 人去表皮真皮细胞活性及组织结构特征[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, (011): 2076-2080.
- [29] 张丽庆, 王斌, 唐金星. 微凝胶体系循环流动成胶特征研究[J]. *石油地质与工程*, 2005, (001): 41-42.
- [30] Supe, S. and P. Takudage. Methods for evaluating penetration of drug into the skin: A review[J]. *Skin Research and Technology*, 2020.doi:10.1111/srt.12968.
- [31] Hinz, R.S., C. Hodson, C.R. Lorence, et al. In vitro percutaneous penetration: Evaluation of the utility of hairless mouse skin[J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 1989, (1): 87-91.
- [32] Rosemary, S., N.G. Brown, D.L. Allen, et al. The environmental estrogen bisphenol A stimulates prolactin release in vitro and in vivo[J]. *Endocrinology*, 1997, (5): 1780-1786.
- [33] F Dreher, Walde P , Walther P , et al. Interaction of a lecithin microemulsion gel with human stratum corneum and its effect on transdermal transport[J]. *Journal of Controlled Release*, 1997, (2):131-140.
- [34] Cui, M., Y. Liu, H.U. Qimeng, et al. Study on preparation and in vitro release property of diosmin gel[J]. *China Pharmacy*, 2019, (20): 2778-2782.
- [35] 肖金宝, 李洪斌, 刘福强. 银杏叶提取物温度敏感型鼻用原位凝胶体外释放研究[J]. *中成药*, 2013, (01): 46-49.
- [36] 梅莹, 冯伟红, 刘淑芝. 不同微乳配方对药物经皮渗透的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, (010): 1-4.
- [37] Sloan P A , Moulin D E , Hays H . A clinical evaluation of transdermal therapeutic system fentanyl for the treatment of cancer pain[J]. *Journal of Pain & Symptom Management*, 1998, (2):102-111.

- [38] Sha, M., L.F. Yin, X.U. Wei, et al. [Effects of 2-n-nonyl-1,3-dioxolane as an enhancer on transdermal absorption of Salvia miltiorrhiza gel][J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2007, (6): 487-489.
- [39] 杨建一.分析甲氨蝶呤对小鼠体内多个组织器官 DNA 损伤作用[J]. 癌变.畸变:突变, 2005, (5):298-301.
- [40] Wang, Y.Z., T.C. Ren, and Y.Q. Xiao. Effects of different penetration enhancers on percutaneous absorption of lappaconitine gel in vitro[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2005, (9): 665-668.
- [41] Prausnitz M R , Bose V G , Langer R , et al. Electroporation of mammalian skin: a mechanism to enhance transdermal drug delivery.[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1993, (22):10504-10508.
- [42] Wada, S.Y. Studies on the Derivatives of Steroidal Hormones. II: A New Preparation of Estradiol-17 β [J]. Yakugaku zasshi journal of the Pharmaceutical Society of Japan, 1959, (5): 696-697.
- [43] Ough, Y.D. Transdermal patch and treatment for pain and discomfort[J]. 2006.
- [44] Minami, Sugihara, and S. Oono. Reconstruction of cornea in three-dimensional collagen gel matrix culture[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal, 1991, (7): 142-146.
- [45] 杨柳, 王爱武, 刘帅. 凝胶剂研究概况及临床应用[J]. 辽宁中医药大学学报, 2014, (7): 147-150.
- [46] Li Lixian; He Yongpeng. Progress on Preparation of pH/Temperature-Sensitive Intelligent Hydrogels and Applications in Target Transport and Controlled Release of Drugs[J]. International Journal of Polymer Science, 2021.doi: 10.1155/2021/1340538.
- [47] Savina I N , Galaev I Y , Bo M . Ion-exchange macroporous hydrophilic gel monolith with grafted polymer brushes[J]. Journal of Molecular Recognition, 2010, (4):313-321.
- [48] Rossi, F., G. Perale, and M. Masi. Biological buffered saline solution as solvent in agar-carbomer hydrogel synthesis[J]. Chemical Papers, 2010, (5): 573-578.
- [49] 曾雪芬, 包永兰, 池丽娜,等. 综合性护理干预在创伤性骨折术后发热患者中应用的临床效果分析[J]. 中国初级卫生保健, (7):88-89.
- [50] 贾献慧, 王海凌, 辛义周. 马黄酊复方提取物凝胶的制备与抗炎活性[J]. 山东中医杂志, 2019, (08): 73-76.

- [51] Liu, P., J. Peng, J. Li, et al. Radiation crosslinking of CMC-Na at low dose and its application as substitute for hydrogel[J]. *Radiation Physics & Chemistry*, 2005, (5): 635-638.
- [52] Manna, S., U.S. Lakshmi, M. Racharla, et al. Bioadhesive HPMC Gel Containing Gelatin Nanoparticles for Intravaginal Delivery of Tenofovir[J]. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2016, (8): 22-29.
- [53] Hiroki, A. and M. Taguchi. Evaluation of three dimensional dose distributions by using polymer gel dosimeters based on HPC gel sheets[J]. *Japanese Journal of Medical Physics*, 2017, (3): 186-189.
- [54] 王勇, 贾晓斌, 李霞. 复方香黄巴布膏体外透皮吸收研究[J]. *中成药*, 2006, (009): 1254-1256.
- [55] Bonifaz A , A Saúl. Comparative study between terbinafine 1% emulsion-gel versus ketoconazole 2% cream in tinea cruris and tinea corporis.[J]. *European Journal of Dermatology Ejd*, 2000, (2):107-9.
- [56] Shahin, M., S.A. Hady, M. Hammad, et al. Novel jojoba Oil-Based Emulsion gel formulations for clotrimazole delivery[J]. *Aaps Pharmscitech*, 2011, (1): 239-247.
- [57] Jee M C , Naskar M K , Siladitya B . Role of organic solvents and surface-active agents in the sol-emulsion-gel synthesis of spherical alumina powders[J]. *Journal of Materials Research*, 2000, (1):176-185.
- [58] Jiang, H.F. and G.H. Wang. Preparation of Multiple Emulsion Type Gel for Paeonol[J]. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 2001, (3): 173-175.
- [59] Fontes-Candia, C., P. Lopez-Sanchez, A. Strm, et al. Maximizing the oil content in polysaccharide-based emulsion gels for the development of tissue mimicking phantoms[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2020, (4): 117-496.
- [60] Lin, D., A.L. Kelly, and S. Miao. The role of mixing sequence in structuring O/W emulsions and emulsion gels produced by electrostatic protein-polysaccharide interactions between soy protein isolate-coated droplets and alginate molecules[J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 113: 106537.
- [61] Biraju D Patel, D.V.P., Jayant R Chavda, Nilesh K Patel. LIPOGEL: A novel topical liposomal drug delivery system [J]. *Inventi Impact Ndds*, 2012, (2): 383-391.

- [62] Lee S , Lee J , Choi Y W . Skin permeation enhancement of ascorbyl palmitate by liposomal hydrogel (lipogel) formulation and electrical assistance.[J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2007, (2):393-396.
- [63] Sacha, M., L. Faucon, E. Hamon, et al. Ex vivo transdermal absorption of a liposome formulation of diclofenac[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 111: 785-790.
- [64] Hathout, R.M., H.A. Gad, S.M. Abdel-Hafez, et al. Gelatinized core liposomes: A new Trojan horse for the development of a novel timolol maleate glaucoma medication[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2019, 556: 192-199.
- [65] Wang, X.M., X.J. Zhang, R. Wei, et al. The preparation of ketoconazole lipogel[J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2005.
- [66] Yu, S., Z. Ulberg, and O. Korotych. Multipurpose smart hydrogel systems[J]. Adv Colloid Interface, 2011, (1-2): 247-262.
- [67] Luchini, A., L. Liotta, E. Petricoin, et al. Smart hydrogel particles for biomarker harvesting[J]. Nano Lett, 2008 ,(1): 350-61.
- [68] Kabir, M.H., T. Hazama, Y. Watanabe, et al. Smart hydrogel with shape memory for biomedical applications[J]. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 2014, (6): 3134–3138.
- [69] Hu, J., Y. Quan, Y. Lai, et al. A smart aminoglycoside hydrogel with tunable gel degradation, on-demand drug release, and high antibacterial activity[J]. Journal of Controlled Release, 2017, 247: 145–152.
- [70] 陈晶晶, 冯高科, 陈玺宇. 智能型水凝胶用于皮肤烧伤治疗的研究进展[J]. 医学综述, 2019, (06): 137-141.
- [71] Naunton, M., A.F. Al Hadithy, J.R. Brouwers, et al. Estradiol gel: review of the pharmacology, pharmacokinetics, efficacy, and safety in menopausal women[J]. Menopause, 2006, (3): 517-527.
- [72] A, Xiang Li , et al. Preparation and characterization of sustained-release rotigotine film-forming gel[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2014, (1–2): 273-279.
- [73] 雷艳雄, 尹月玲, 王佳媚,等. 聚乙烯醇基涂膜材料纳米 SiO₂ 改性对其成膜包装效能特性的影响[J]. 食品科学, (06):232-237.
- [74] Kim, J.Y., J.H. Jun, S.J. Kim, et al. Wound healing efficacy of a chitosan-based film-forming gel containing tyrothricin in various rat wound models[J]. Archives of Pharmacal Research, 2015, (2): 229-238.

- [75] 潘晓鹃, 沈立, 阮佳,等. 几种水溶液型涂膜剂成膜材料的性质研究及筛选[J]. 中国医院药学杂志, 2009, (012):973-976.

致 谢

时光如梭，转眼间三年的研究生求学生活即将结束，站在毕业的门槛上，回首往昔，奋斗和辛劳成为丝丝回忆，甜美与欢笑都已尘埃落定。至此毕业论文完成之际，我谨向所有关心和帮助过我的人表达最诚挚的感谢与最美好的祝福。

首先，感谢我的导师谢晶教授在相关理论知识方面给予的帮助和启发；感谢滕乐生教授，是他严谨的科研态度以及在课题的每个阶段给予的指导和意见让我顺利的完成论文的编写；感谢滕利荣老师、孟庆繁老师、逯家辉老师、王贞佐老师以及吉林大学国家级生物实验教学示范中心的所有老师对我实验中的帮助和生活上的关照。往日，你们在我心中播下知识的种子，今天才有我在科研中结出的果实。在此一并向各位老师表达我最衷心的感谢。

感谢杨春苗师姐、冯英泉师兄、赵雅蓉师姐、郑晓龙同学、刘洛彤同学、孟凡超同学以及实验室的所有师兄师姐师弟师妹，三年来我们朝夕相处、互帮互助衷心感谢你们对我的关心和帮助

特别感谢我的家人，他们是最坚强的后盾，一直以来的支持、鼓励和理解使我不断前行。

感谢研究生三年之间经历的所有事遇到的所有人，这将是我最宝贵的财富。