

苦参碱离子敏感型原位凝胶的制备与评价

刘粤疆, 刘进鹏, 黎江华, 黄永亮, 薛冰心, 吴纯洁^{*} (成都中医药大学, 科技中试中心, 成都 611137)

摘要: 目的 制备苦参碱眼用原位凝胶, 建立其质量控制方法并进行相关评价。方法 以脱乙酰结冷胶和海藻酸钠为基质制备凝胶, 采用高效液相色谱法测定含量, 并进行稳定性试验, 离体角膜渗透实验以及对家兔实验性眼炎的治疗作用等试验。结果 该制剂的 pH 值为 7.5~8.0, 苦参碱在 10~60 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好($r=0.999\ 3$), 平均回收率为 98.7%, RSD 为 1.3%。本制剂能延长苦参碱的角膜接触时间, 并对辣椒酊刺激引起的兔眼部炎症反应有抑制作用。结论 该制剂制备工艺简便, 性质稳定, 质量可控。凝胶安全无刺激, 对家兔实验性眼炎有较好的治疗效果。

关键词: 原位凝胶; 苦参碱; 高效液相色谱法; 实验性眼炎

中图分类号: R943.3

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2010)04-0329-04

Preparation and Evaluation of Ion-activated In Situ Gels for Matrine

LIU Yuejiang, LIU Jinpeng, LI Jianghua, HUANG Yongliang, XUE Bingxin, WU Chunjie^{*} (Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To prepare the in situ gelling of matrine for ocular use, methods of quality monitoring and evaluating the preparation were established. **METHODS** HPLC was adopted to measure the contents of Gelrite alginate-based in situ gellings. As a complement, the results of stability studies, *in vitro* studies and the ability to inhibit ocular inflammation were obtained. **RESULTS** The pH values of formulations were 7.5–8.0, linear relationships for matrine between 10–60 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ were good($r=0.999\ 3$). The average recovery rate was 98.7%, RSD was 1.3%. The gels could prolong the contact time upon the cornea and markedly inhibit ophthalmic inflammation caused by the tincture of chili. **CONCLUSION** The preparation was stable, safe, anti-irritation and effective for the experimental ophthalmia, while using HPLC to control its quality was feasible.

KEY WORDS: in situ gels; matrine; HPLC; experimental ophthalmia

作者简介: 刘粤疆, 硕士生 Tel: (028)61801001
Tel: (028)61801001 E-mail: wcj-one@263.net

E-mail: liuyuejiang1@163.com

^{*}通信作者: 吴纯洁, 博士, 教授, 博导

眼用原位凝胶通常为低黏度的高分子溶液剂,它根据体内不同的生理环境(pH、温度、离子)发生相转化,体外以液体形式存在,滴入眼内立刻转为凝胶^[1]。离子敏感型原位凝胶是利用泪液中的多种离子与凝胶中的高分子作用,使溶液转为凝胶。国内外报道较多的常用辅料包括海藻酸钠和脱乙酰结冷胶^[2]。这种剂型解决了普通滴眼剂眼内滞留时间短、生物利用度不高等问题,具有很大的应用前景。

苦参碱(matrine)是从豆科植物苦豆子、苦参及山豆根中提取的一种生物碱。它具有抗肿瘤、抗炎、抗病毒、镇静镇痛和强心等作用^[3]。现代药理研究表明,苦参碱对细菌性角膜炎和病毒性角膜炎有明显的治疗作用,而无糖皮质激素的不良反应^[4]。根据此性质,结合凝胶给药系统的特点,笔者制备了苦参碱眼部原位凝胶,并对其进行了体内、外相关评价。

1 仪器与材料

岛津 LC-2010A 液相色谱仪, SPD-M10Avp 检测器, 岛津 Classs-VP 色谱工作站; PHS-25 型酸度计(上海雷磁仪器厂); BP211D 型十万分之一电子分析天平(德国 Sartorius 公司); TGL-16G 高速离心机; 旋转筒式黏度计(上海精密仪器有限公司)。苦参碱原料药(西安天则生物科技有限公司, 批号: 20090314, 纯度: 98%); 苦参碱对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 110805-200507, 纯度: 98%); 海藻酸钠(ISP 公司, 批号: 340861); 脱乙酰结冷胶(Gelrite[®], 卡乐康公司)。甲醇为色谱纯, 水为重蒸水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 处方

苦参碱 1 g, 脱乙酰结冷胶 0.2 g, 海藻酸钠 0.6 g, 甘露醇 5 g, 对羟基苯甲酸乙酯 0.01 g, 稀盐酸适量, 水加至 100 mL, 即得苦参碱凝胶, 标示量为每 100 mL 中含 1 g 苦参碱。

2.2 制备方法

取脱乙酰结冷胶和海藻酸钠, 加入适量水溶胀 24 h 作为凝胶基质。将苦参碱用适量水溶解, 与甘露醇、对羟基苯甲酸乙酯分别加入凝胶基质中, 搅匀, 用稀盐酸调 pH 7.5~8.0, 加水至处方量, 搅拌均匀即得。

2.3 质量检查

性状: 本品为淡黄色, 均匀, 细腻, 半透明状凝胶。鉴别: 测定样品 pH 值为 7.5~8.0。在含量测定项下记录的色谱图中, 供试品中苦参碱的保留时间应与对照品峰的保留时间一致。

2.4 黏度测定

取凝胶 100 mL, 用黏度计测量其初始黏度为 $(142.51 \pm 3.55) \text{cp}$ ($n=5$); 按凝胶-模拟泪液(25:7)混合后, 样品黏度迅速增加到 $(253 \pm 4.30) \text{cp}$, 说明该基质与泪液中钠、钾、钙等离子接触后能迅速胶凝, 从而使黏度增加。

2.5 含量测定方法建立

2.5.1 色谱条件 色谱柱: Diamonsil C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水-三乙胺(85:15:0.05); 检测波长: 220 nm; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 柱温: 30 ℃; 进样量: 20 μL。在上述色谱条件下, 对照品、空白凝胶基质、苦参碱凝胶样品的色谱图见图 1。

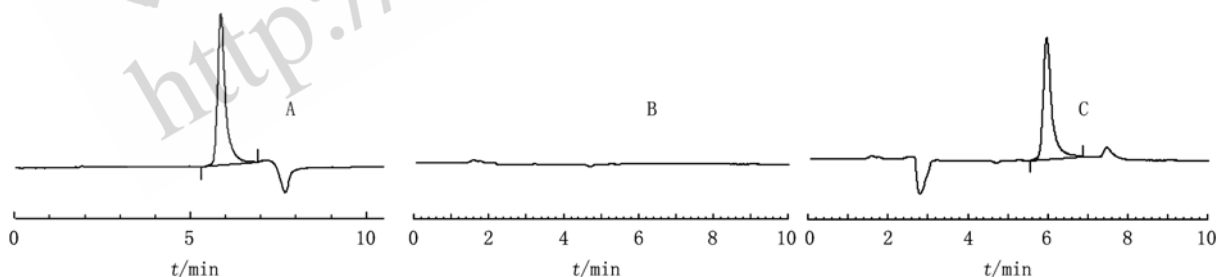


图 1 高效液相色谱图

A-苦参碱对照品; B-空白基质; C-苦参碱凝胶样品

Fig 1 HPLC chromatograms

A-standard sample of matrine; B-blank matrix; C-sample of matrine in situ gel

2.5.2 标准曲线的绘制 精密称取苦参碱对照品 5 mg, 加甲醇定容至 50 mL, 分别精密量取 1, 2, 3, 4, 5, 6 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 加水稀释定容至刻度, 摇匀, 各取 20 μ L 进样, 记录色谱。以峰面积(A)对其浓度(C)进行线性回归, 得回归方程: $A=1.01\times 10^7 C-4\ 533.3$, $r=0.999\ 3$ 。结果显示, 苦参碱浓度在 10~60 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好。

2.5.3 仪器精密度试验 精密量取苦参碱对照品溶液 1 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 用水定容, 摇匀, 连续进样 6 次, 结果 RSD 为 0.93%。

2.5.4 稳定性试验 精密量取苦参碱对照品溶液 1 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 用水定容, 摇匀, 室温放置于 0, 1, 3, 6, 9, 12 h 后进样 6 次, 峰面积 RSD 为 1.2%。表明溶液在 12 h 内稳定。

2.5.5 重复性试验 精密称取同一批苦参碱凝胶样品 5 份(0.1 g·份⁻¹), 加水溶解, 摇匀, 并定容至 10 mL 量瓶中。取样品溶液 1 mL 离心 5 min, 用上清液 20 μ L 进样, 记录峰面积, 结果 RSD=0.91%。

2.5.6 加样回收率试验 精密称取已知含量的同一批样品 0.5 g, 分别精密加入高、中、低 3 种浓度的苦参碱储备液各 3 份, 加水适量溶解, 并转移至 100 mL 量瓶中, 定容, 摇匀, 离心 5 min, 吸取上清液, 取加入的高、中、低 3 种浓度的苦参碱储备液各 20 μ L 连续进样 3 次($n=9$), 记录峰面积, 测定含量, 计算苦参碱的平均回收率为 98.7%, RSD 为 1.3%。

2.5.7 样品含量测定 精密称取 3 批苦参碱凝胶样品各 3 份(0.1 g·份⁻¹), 加水溶解并定容至 10 mL 量瓶中, 摇匀, 取 1 mL 稀释后样品溶液离心 5 min, 吸取上清液 20 μ L 连续进样 3 次, 记录峰面积, 计算样品含量, 3 批样品标示百分含量分别为 99.1%, 98.5%, 98.9%。

2.6 稳定性试验

2.6.1 离心实验 取 3 批样品各 5 g, 装入离心管中, 以 3 000 r·min⁻¹ 离心 30 min, 凝胶无分层现象。

2.6.2 耐热耐寒实验 取 3 批样品各 5 g, 装入玻璃试管中, 密封, 分别置于 60 $^{\circ}\text{C}$ 干燥箱恒温 24 h 和 -15 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱 24 h, 凝胶无分层现象。

2.7 离体角膜渗透实验^[5]

选用健康新西兰兔 6 只(成都中医药大学实验动物中心提供, 实验动物合格证号: SCXK(川)

2008-11), 随机分成 2 组, 耳缘静脉注射空气致死, 立即用眼科剪和镊子小心分离出带有 2 mm 巩膜环的角膜, 除去虹膜、睫状体等多余组织, 用水冲洗, 保存在新配制的谷胱甘肽碳酸氢钠林格试液(GBR)中^[6]。

采用 Vilia-Chien 渗透扩散装置, 采用星形磁力搅拌子, 使表皮层面向供给池。接受池加入 4 mL GBR, 供给池分别加入 4 mL 的 1%苦参碱凝胶和用 STF(模拟泪液^[7])配制的 1%苦参碱溶液。扩散池外用浴 34 $^{\circ}\text{C}$ 保温。分别在实验开始后 0, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360 min 用微量移液器从接受池取样 200 μ L, 同时补充相同体积的空白释放介质。样品离心后, 取上清液进行含量测定。药物的累积释放量计算公式如下:

$$Q=V_0(C_n+\frac{V}{V_0}\sum_{i=1}^{n-1}C_i)=V_0C_n+V\sum_{i=1}^{n-1}C_i$$

Q : 时间 t 的累积释放量; C_n : t 时间的浓度测量值; V_0 : 接受池中溶液体积; V : 取样体积; C_i : t 时间以前浓度的测量值。

结果见图 2。结果表明, 相比于普通溶液, 苦参碱原位凝胶具有良好的缓释效果。

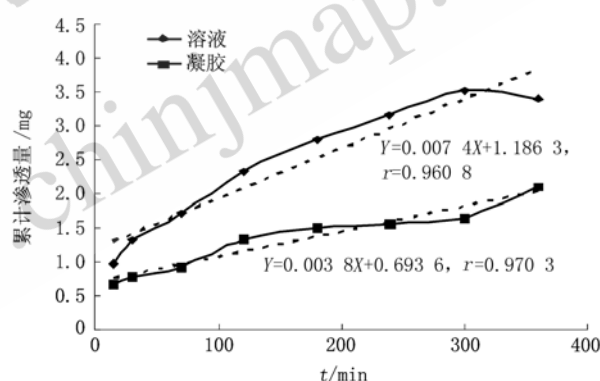


图 2 苦参碱凝胶和溶液离体角膜渗透曲线

Fig 2 Corneal penetration curves of gels and STF for matrine

2.8 泪液消除动力学实验^[8]

取健康新西兰兔 6 只, 随机分成 2 组, 每组 6 只眼。用移液器移取 40 μ L 含 1%苦参碱的凝胶或 STF 液滴入兔眼结膜囊内, 被动闭合 10 s。在预定的时间点(15, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360, 420, 480 min), 采用 Schirmer 泪液试纸技术取样, 将吸附了泪液的试纸条在氮气流下吹干, 放入离心管, 分别加入 1 mL 甲醇, 密封, 浸泡 2 h, 离心, 用 HPLC 测定药物含量。用梯形面积法计算不同样

品的浓度-时间曲线下面积($AUC_{0-480\text{ min}}$)。结果发现,凝胶在眼部的 $AUC_{0-480\text{ min}}$ 比 STF 液高 3.45 倍,说明苦参碱凝胶能延长药物与角膜的接触时间,达到增加疗效的作用。

2.9 眼刺激性试验^[9]

取健康新西兰兔 5 只,体重(2.0 ± 0.5)kg,每只的右眼滴加 40 μL 苦参碱凝胶,左眼滴加生理盐水作为对照,用药后观察,家兔无躁动,眼部无充血、红肿、流泪、羞明、分泌物增多等现象。连续用药 10 d 后将兔处死,取眼部组织作病理切片检查,未发现任何病理变化。

2.10 苦参碱对 5%辣椒酊所致眼部炎症的治疗作用研究^[10]

取健康新西兰兔 24 只,随机分为 4 组:1%苦参碱滴眼液组,1%苦参碱凝胶组,地塞米松磷酸钠滴眼液组,生理盐水组,每组 6 只眼。实验时将兔子固定在兔箱内,每只眼先滴加 5.0%辣椒酊 2 滴,被动闭合 10 s,30 min 后给药。单眼每次滴加药液或生理盐水 40 μL 后,每隔 2 h 再给药 1 次,共 6 次,以后每 4 h 滴 1 次,共 3 次,自第 2 天起,每天给药 3 次。给药同时用裂隙灯观察。眼部炎症反应程度按文献报道方法进行评分^[11],连续观察 3 d。计算不同时间各组实验眼总分值。结果见图 3。

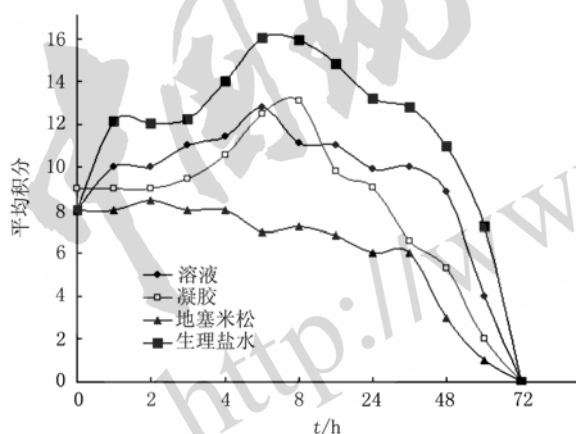


图 3 苦参碱对辣椒酊刺激炎症的治疗作用

Fig 3 Therapeutic action of matrine for inflammation caused by the tincture of chili

结果表明,在给药后 0.5 h,苦参碱凝胶和苦参碱滴眼液对辣椒酊引起的家兔闭眼、流泪、结膜充血、水肿以及大量分泌物等强烈刺激症状均有抑制作用,并与生理盐水组有显著性差异($P<0.05$),疗效持续达 48 h。给药间隔时间延长后,苦参碱凝胶

对以上刺激症状的抑制作用明显强于苦参碱滴眼液($P<0.05$),说明该凝胶具有较好的缓释作用。

3 讨论

本处方联合使用脱乙酰结冷胶和海藻酸钠作为凝胶基质,当与泪液中的阳离子接触后其黏度能迅速增加。相比于它们单独使用,两者合用后不仅降低了总基质使用量,而且显著提高了凝胶性能。苦参碱离子敏感型原位凝胶安全,无刺激性,能提高苦参碱在眼部的生物利用度,并对非感染性炎症模型的进一步恶化有明显抑制作用。采用高效液相色谱法控制其质量,简便快捷,测量结果准确,重复性好。通过深入研究,苦参碱原位凝胶有望在眼科临床发挥更好的作用。

REFERENCES

- [1] LI J B, WEI R L, CAI J P. Research of ophthalmic drug delivery system [J]. J Clin Ophthalmol (临床眼科杂志), 2007, 15(4): 379-382.
- [2] NING L L. Characteristic of ocular in situ gels and problems in the process of development [J]. Chin New Drugs J (中国新药杂志), 2007, 16(13): 988-989.
- [3] FENG X, TANG H M, SHEN L X. Pharmacological research of matrine [J]. Chin J pharmacoepidemiol (药物流行病学杂志), 2005, 14(6): 331-333.
- [4] GUO Q, XU W G, LIU Z Q. Pharmacodynamics of matrine on herpes simplex keratitis [J]. Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报), 2007, 23(4): 531-534.
- [5] LIU L P, LI Y M, YANG L. Preparation of liposomal sparfloxacin lactate and its corneal penetration and antibacterial activity *in vitro* [J]. Acta Acad Med Sin (中国医学科学院学报), 2008, 30(5): 589-594.
- [6] SONG C J, LIU X D, CAO G L, et al. Effects of permeation enhancers on the corneal permeability of puerarin *in vitro* [J]. J Shenyang Pharm Univ (沈阳药科大学学报), 2007, 24(3): 142-144.
- [7] EDSMAN K, CARLFORS J, PETERSSON R. Rheological evaluation of poloxamer as an in situ gel for ophthalmic use [J]. Eur J Pharm Sci, 1998, 6(2): 105-112.
- [8] SUN H Y, DING W P, TANG X. Pharmacokinetics of topical application in situ gels of ribavirin in rabbit eyes [J]. Chin J Pharm (中国药理学杂志), 2005, 3(1): 13-17.
- [9] DRAIZE J H, WOODARD G, CALVERY H O. Methods for the study of irritation and toxicity of substances [J]. J Pharmacol Exp Ther, 1944, 82: 377-390.
- [10] ZHANG M Q, PAN W N, ZHU Y Q. Pharmacodynamics research of rabbits ophthalmia for matrine drops [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol (中药新药与临床药理), 2003, 14(2): 109-111.
- [11] SU B D, WU R T Y, LI C S. Stimulating test of traditional Mongolian drug gegen eye drop on rabbit eyes [J]. Acta Acad Med Nei Mongol (内蒙古医学院学报), 2007, 29(3): 194-197.

收稿日期: 2009-10-13