

离子敏感型毛果芸香碱眼用原位凝胶的制备及其初步药效学考察

王军,郭咸希* (武汉大学人民医院药学部,武汉 430060)

摘要:目的 以海藻酸钠为胶凝剂,羟丙基甲基纤维素(HPMC)为增黏剂,制备硝酸毛果芸香碱(PN)眼用原位凝胶,以增强其疗效,减少给药次数。方法 通过对海藻酸钠与 HPMC 的配比研究,筛选出最佳的凝胶基质,制备 PN 原位凝胶;以 PN 滴眼剂及空白凝胶为对照,以家兔瞳孔直径为评定指标,进行初步药效学考察。结果 筛选出的最佳基质组成为:1% (w/v) 海藻酸钠,2% (w/v) HPMC(E50LV)。与 PN 滴眼液相比,PN 原位凝胶缩瞳作用明显延长,具有缓释效果。结论 以海藻酸钠与 HPMC 制备的原位凝胶 PN 制剂具有缓释、长效作用,值得进一步研发。

关键词:毛果芸香碱;原位凝胶;药效学

中图分类号:R944.15;R988.1;R945

文献标识码:A

文章编号:1007-7693(2008)04-0316-03

Study on the Preparation of Ion-sensitive in Situ Gel of Pilocarpine Nitrate and Its Preliminary Pharmacodynamics

WANG Jun, GUO Xian-xi (Department of Pharmacy, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the preparation of ion-sensitive in situ gel of pilocarpine nitrate (PN) using sodium alginate and HPMC as base to increase the effect and decrease the administration frequency. **METHODS** To prepare in situ gel of PN, the best composition of the gel base was chosen by screening of the ratios of sodium alginate and HPMC. The pupil diameters of rabbits were

作者简介:王军,男,硕士,副主任药师

* 通讯作者:郭咸希,男,博士,主管药师

Tel: 1321 2726750

E-mail: hustgxx@163.com

adopted as an assessment index to investigate its preliminary effects with pilocarpine eye-drops and blank in situ gel as control groups

RESULTS The best composition of the gel base was 1% (w/v) sodium alginate and 2% (w/v) HPMC. Compared with the eye-drops the in situ gels significantly prolonged the duration of miosis and had sustained effect

CONCLUSION Sodium alginate and HPMC with suitable ratio could be a promising in situ gel base with sustained and prolonged action. The in situ gel of PN was valuable to be further studied

KEY WORDS pilocarpine nitrate; in situ gel; pharmacodynamics

硝酸毛果芸香碱 (pilocarpine nitrate, PN) 作为一种治疗青光眼的药物已有百余年的历史,目前在临床上使用的主要剂型仍为水溶液。该剂型易被泪液稀释,并很快从泪道排出,从而使药物作用时间缩短,需频繁给药。为了延长其在眼部的滞留时间,前期研究曾在其滴眼液处方中添加增黏剂-壳聚糖,取得了较好的效果^[1]。本研究以离子敏感型材料海藻酸钠为胶凝剂,并用羟丙基甲基纤维素 (hydroxypropylmethylcellulose, HPMC) 为增黏剂,研制离子敏感型毛果芸香碱眼用原位凝胶,并对其药效学做初步考察。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪 (美国安捷伦科技有限公司, 1100 系列), pH S-25C pH 酸度计 (上海康仪仪器有限公司)。

PN 滴眼剂 (江苏省信诺医药对外贸易有限公司, 批号: 1017064), PN 对照品 (湖北省药品检验所, 批号: 20070211, 纯度: 99.36%), HPMC (E15LV, E50LV, 上海卡乐康包衣技术有限公司, 批号: 20061118), 海藻酸钠 (天津市远航化学有限公司, 批号 20061009), 乙腈 (色谱纯, 美国 Tedia), 其他试剂均为分析纯。

健康成年家兔, 雌雄皆用, 体重 2.0~2.5 kg (武汉大学人民医院药学部动物中心)。

2 方法

2.1 处方及制备

通过预试验, 拟定供筛选的基质组成, 见表 1。将处方量的海藻酸钠及 HPMC 在搅拌下加入适量注射用水中, 另取羟苯乙酯 (0.03%) 溶于适量热水后加入, 再加 PN (1%), 氯化钠 (0.68%) 使其溶解, 加注射用水至足量搅匀, 于 100℃ 流通蒸气灭菌 30 min 无菌分装即得。

表 1 PN 眼用原位凝胶的基质组成

Tab 1 Compositions of different PN in situ gel base

处方号	海藻酸钠 用量 %	HPMC 种类	HPMC 用量 %	初黏度 /cPa·s	在位黏度 /cPa·s
F1	1	—	—	1.8	2.8
F2	2	—	—	2.6	4.0
F3	3	—	—	3.9	6.1
F4	4	—	—	4.6	7.2
F6	1	E15LV	8	2.8	4.4
F5	1	E15LV	6	2.2	3.4
F7	1	E15LV	12	3.6	5.6
F8	1	E50LV	1	3.2	5.0
F9	1	E50LV	2	4.6	7.4
F10	1	E50LV	3	5.8	9.1

2.2 PN 含量测定方法的确定

2.2.1 色谱条件^[2] 色谱柱: 美国 Agilent C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水 (10:90), 水相含 0.05% 磷酸, 用氢氧化钠调节 pH 3~4; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波

长: 214 nm; 进样量: 20 μL; 理论塔板数不低于 10 000。

2.2.2 线性关系考察 精密称取 105℃ 干燥至恒重的硝酸毛果芸香碱对照品适量, 用蒸馏水配成 32 μg·mL⁻¹ 标准储备液, 分别取 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL 储备液置 10 mL 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 得 0.64, 1.28, 1.92, 2.56, 3.20 μg·mL⁻¹ 系列浓度对照品液, 取 20 μL 进样, 以峰面积值 (Y) 对浓度 (C) 进行线性回归, 得回归方程 $Y = 19.06C - 0.55$, $r = 0.9999$, 表明硝酸毛果芸香碱在 0.64~3.2 μg·mL⁻¹ 浓度范围内与峰面积线性关系良好。同时配制与 1.92 μg·mL⁻¹ 硝酸毛果芸香碱溶液浓度比例相当的空白辅料溶液 (同时含海藻酸钠及 HPMC), 20 μL 进样, 结果表明辅料对含量测定无影响, 见图 1。

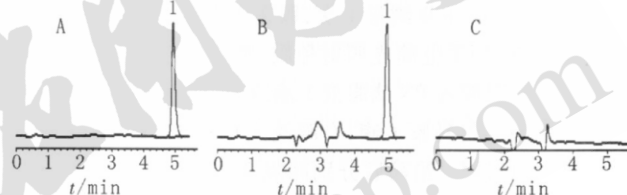


图 1 HPLC 色谱图

A-硝酸毛果芸香碱对照品; B-硝酸毛果芸香碱原位凝胶; C-空白辅料溶液; 1-毛果芸香碱峰

Fig 1 HPLC spectra of various samples

A- standard sample of PN; B- sample of PN in situ gel; C- sample of adjuncts; 1- PN

2.2.3 绝对回收率试验 分别取高、中、低 3 个浓度对照品溶液 (3.2, 2.0, 1.0 μg·mL⁻¹), 按处方量加入相当浓度的辅料溶液, 20 μL 进样, 测定峰面积值, 以同浓度对照品溶液进样所得峰面积比计算回收率, 结果高、中、低 3 个浓度的平均回收率分别为 (99.86 ± 0.16)%, (99.93 ± 0.22)%, (99.90 ± 0.32)%。

2.2.4 相对回收率试验 精密称取已知含量的 PN 凝胶 10 mg 置 100 mL 量瓶中, 分别加入对照品适量, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 分别进样检测, 用测得值比上样品已知含量与对照品加入量之和, 计算相对回收率, 结果平均回收率为 100.2%, RSD 为 0.5%。

2.2.5 精密度试验 取“2.2.3”项下中间浓度的溶液在同一天内连续测定 5 次, RSD 为 0.08%; 连续测定 3 d RSD 为 0.29%。

2.2.6 稳定性试验 将“2.2.3”项下中间浓度的溶液放置于 -20℃ 培养箱保存, 分别于 0.5, 10 d 取出测定, 分别为 1.988, 1.992, 1.999 μg·mL⁻¹, 浓度的波动经统计学处理无统计学意义, 由此可见样品放置于 -20℃ 保存 10 d 内稳定。

2.3 体外释放度考察

参照中国药典 2005 版二部释放度测定法 (附录 XD 第三法), 将网碟改成相应大小的圆盘。称取各处方的 PN 凝胶 1.0 g, 置于圆盘中 (有效释药面积为 5.72 cm^2 , 厚度为 2 mm), 以赛璐芬膜为半透膜, 释药面向上, 将圆盘放入 1000 mL 的溶出杯中, 保持释药面向上, 以 500 mL 模拟泪液 ($\text{NaCl } 6.7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{NaHCO}_3 \text{ } 2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O } 0.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 为溶剂, 温度为 $(37 \pm 0.5)^\circ\text{C}$, 转速为 $75 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。在 $0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 \text{ h}$ 分别取样, 每次 10 mL , 经 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤, 同时补充 10 mL 的同温新鲜介质。精密吸取续滤液 1 mL 置 50 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 取 1 mL 置 25 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 取 1 mL 至 10 mL 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 取 $20 \mu\text{L}$ 进样, 峰面积值代入回归方程计算其中 PN 含量, 计算累积释药率 $Q\%$ 。

2.4 初步药效学考察

2.4.1 动物分组 将 9 只家兔随机分为 PN 滴眼液阳性对照组 (A) 经体外释药筛选出的最佳 PN 凝胶试验组 (B)、空白凝胶阴性对照组 (C), 每组 3 只, 分别固定于兔箱内, 使兔处于恒定的光线和安静的环境中。

2.4.2 给药方法 用瞳孔测量尺测量两侧兔眼的瞳孔直径, 间隔 10 min 重复测量 1 次, 取 2 次平均值为兔眼瞳孔直径的基础值 (用手电筒照射兔眼, 瞳孔对光反射均存在)。各组家兔左眼滴入 PN 滴眼液 1 滴或未胶凝的 PN 凝胶 1 滴或未胶凝的空白凝胶 1 滴, 右眼滴入 0.9% 氯化钠注射液 1 滴作为空白对照。给药后分别间隔 $0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 \text{ h}$ 测量瞳孔直径。

2.5 刺激性试验

选健康成年家兔 4 只, 每只兔左眼滴入硝酸毛果芸香碱壳聚糖滴眼液 2 滴, 右眼滴入生理盐水 2 滴, 按《眼用制剂刺激性实验》标准^[3] 观察评分。结果表明, 本品无刺激性, 眼用安全。

3 结果

3.1 体外释放度的考察

3.1.1 海藻酸钠的用量对药物体外释放度的影响

PN 的释药速度随着海藻酸钠用量的增加而减慢, 由于海藻酸钠用量较高时对眼组织有一定的刺激作用, 故将其用量固定为 1% , 以 HPMC 为增黏剂来增加基质黏度, 控制药物的释放速度。见图 2。

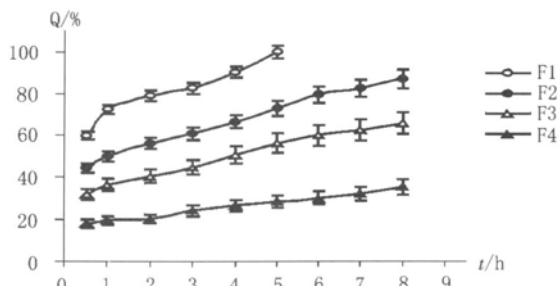


图 2 不同用量的海藻酸钠制得的 PN 凝胶体外释放速度

Fig 2 Release rates *in vitro* of various PN in situ gels with different content of sodium alginate

3.1.2 HPMC 种类及用量对药物体外释放度的影响

在实验用量范围内, E15LV 的用量对 PN 释放速度影响无显著性, 突释效应均不符合中国药典 2005 版的规定 (0.5 h 累积释药需小于 40%), 而 PN 的释放速度随着 E50LV 用量的增加而减慢, 其中 F9 的释放速度较为理想, 符合处方设计要求。见图 3。

3.2 药效学研究结果

由各组家兔不同时间瞳孔直径变化结果可知: 3 组兔眼滴药前瞳孔直径左、右眼无明显差异 ($P > 0.05$); 滴药后 0.25 h , A 组缩瞳作用达本组最大 (与 B 组比较, $P < 0.01$), 滴药后 0.5 h 瞳孔开始散大, 滴药 4 h 后两眼的瞳孔直径无明显差异 ($P > 0.05$); B 组滴眼后 0.5 h 瞳孔最小 (与 A 组比较, $P < 0.01$), 1 h 后瞳孔开始散大, 至 5 h 时两眼的瞳孔直径差异仍有显著性 (与 A 组比较, $P < 0.05$), 6 h 后两眼的瞳

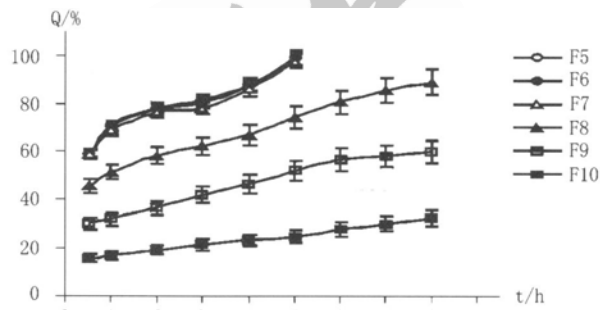


图 3 不同 HPMC 种类及用量制得的 PN 凝胶体外释放速度

Fig 3 Release rates *in vitro* of various PN in situ gels with different HPMC kind and content

孔直径无明显差异 ($P > 0.05$); C 组在观察的 6 h 内两眼的瞳孔直径一直无明显差异 ($P > 0.05$)。上述结果表明 PN 凝胶比 PN 滴眼液的作用时间明显延长 ($P < 0.05$)。

4 讨论

本研究以海藻酸钠为胶黏剂, HPMC 为增黏剂, 通过两者的合适配比, 研制了 PN 眼用原位凝胶。本品滴用前, 呈流动性良好的溶液状, 便于使用; 滴用后, 海藻酸钠可与泪液中的钙离子等多价阳离子发生交联反应, 形成网状结构, 黏度增大而胶凝, 与 HPMC 共同阻止 PN 的释放, 达到缓释、长效的目的, 值得进一步研发。

REFERENCES

- [1] ZHANG L L, HE W, HUANG B. Study on the preparation of pilocarpine nitrate and chitosan eye-drops and its preliminary effect [J]. Chin Pharm (中国药师), 2006, 9(12): 1117 - 1119
- [2] JIANG F, JIANG H. Determination of concentration of Pilocarpine Nitrate by HPLC [J]. Chongqing Industrial High Training School Acta (重庆工业高等专科学校学报), 2000, 15(3): 66 - 68
- [3] ZHANG Y P. Pharmacological experiments (药理学实验) [M]. 2nd ed. Beijing: People Sanitation Press, 1996: 223

收稿日期: 2007-03-29