

滴通鼻炎喷涂凝胶剂体外释放度及大鼠鼻黏膜毒性研究

王婷, 王玉霞, 孙静莹, 王云, 吕敏, 夏满琼, 周霞, 万军^{*}(西南交通大学生命科学与工程学院, 成都 610031)

摘要: 目的 研究滴通鼻炎喷涂凝胶剂的体外药物释放规律及鼻黏膜毒性。方法 采用无膜溶出法进行体外释放度试验, 测定药物的累积溶蚀率和释放率, 对黄芩苷、盐酸麻黄碱释药行为拟合数学模型进行分析; 通过打喷嚏试验考察本品对大鼠的宏观刺激性, 并结合 HE 染色法观察本品鼻黏膜毒性。结果 溶出曲线表明累积溶蚀率与累积释放率有较强线性关系, 黄芩苷、盐酸麻黄碱体外释放符合一级动力学方程具缓释特征。本品对大鼠鼻腔有一定刺激性但停药可恢复; 气管、支气管和肺部, 均未出现红肿、充血等现象; HE 染色表明, 本品对大鼠鼻黏膜有轻微损伤, 停药 7 d 后, 除阳性组黏膜固有层可见腺管上皮细胞发生轻度空泡变性, 黏膜上皮细胞发生变性、坏死, 固有层充血、出血外, 其余各组均可恢复正常。结论 本品为溶蚀与扩散相结合的缓释制剂, 对鼻黏膜毒性较小, 停药可恢复, 安全性较高。

关键词: 滴通鼻炎喷涂凝胶剂; 体外释放度; 鼻黏膜毒性; 缓释制剂

中图分类号: R284.1; R285.5 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2020)18-2215-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.18.008

引用本文: 王婷, 王玉霞, 孙静莹, 等. 滴通鼻炎喷涂凝胶剂体外释放度及大鼠鼻黏膜毒性研究[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(18): 2215-2222.

Study on *in Vitro* Release and Nasal Mucosal Toxicity of Ditong Biyan Spray Gel

WANG Ting, WANG Yuxia, SUN Jingying, WANG Yun, LYU Min, XIA Manqiong, ZHOU Xia, WAN Jun^{*}
(College of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the release characteristics *in vitro* and nasal mucosal toxicity of Ditong Biyan Spray Gel. **METHODS** The cumulative dissolution rate and release rate of Ditong Biyan Spray Gel were determined by non-membrane dissolution method *in vitro* release test. And then the release behavior of baicalin and ephedrine hydrochloride were fitted with mathematical model. The macro-irritation and the nasal mucosal toxicity of Ditong Biyan Spray Gel were conducted by sneezing experiment and HE staining method. **RESULTS** There was a strong linear relationship between the cumulative dissolution rate and the cumulative release rate in the dissolution curve. Furthermore, the release of baicalin and ephedrine hydrochloride *in vitro* conforms to the first-order kinetic equation with sustained release characteristics. This preparation was irritating to the nasal cavity of rats, but it could recover after discontinuation of drug. No redness, congestion and other phenomena in trachea, bronchus and lungs. HE staining showed that this preparation had slight damage to the nasal mucosa of rats. After 7 days of withdrawal, there were slight vacuolar degeneration and necrosis of glandular epithelial cells in the propria mucosa of positive group, and the other groups could recover to normal. **CONCLUSION** Ditong Biyan Spray Gel is a sustained-release preparation combined with dissolution and diffusion. It is a safe preparation with low toxicity to nasal mucosa, and it can recovery after discontinuation.

KEYWORDS: Ditong Biyan Spray Gel; *in vitro* release test; nasal mucosal toxicity; sustained release preparation

滴通鼻炎喷涂凝胶剂由滴通鼻炎水改剂型而来, 原方收载于《卫生部颁药品标准》中药成方制剂第五册 WS3-B-1061-91, 由蒲公英、细辛、黄芩、麻黄、苍耳子、石菖蒲、白芷、辛夷等 8 味药组成, 有祛风清热, 宣肺通窍之效, 临床多用于伤风鼻塞、鼻窦(慢性鼻炎)、鼻渊(过敏性鼻炎)、鼻渊(鼻窦炎), 原剂型存在鼻腔滞留时间短, 患者给药次数多, 顺应性差等缺点^[1]。制成滴通鼻炎喷涂凝胶剂可延长药物在鼻腔内滞留时间, 减少给

药次数, 提高患者依从性。本研究通过对滴通鼻炎喷涂凝胶剂的体外释放度及大鼠鼻腔黏膜毒性进行研究, 探索该制剂的药物释放规律, 并初步评价其鼻腔用药的安全性, 以期丰富临床用药选择, 为相关制剂研发提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器和试剂

LC-600 高效液相色谱仪(P600 恒流泵、分析型动态混合器、7725i 手动进样阀、Edition 色谱工

作者简介: 王婷, 女, 硕士生 Tel: 15608808733 E-mail: 1635141322@qq.com ^{*}通信作者: 万军, 男, 博士, 副教授 Tel: (028)65909590 E-mail: wjun1013@126.com

作站软件 v2.0、KJ 330 柱温箱, 南京科捷分析仪器有限公司); SHZ-B 水浴恒温振荡器(上海跃进医疗器械有限公司); DK-98 电热恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司); 徕卡 2016 转轮式切片机(德国 Leica 公司); TSJ-a 型全自动封闭式组织脱水机(常州市中威电子仪器有限公司); BMJ-封型包埋机(常州郊区中威电子仪器厂); PHY-型病理组织漂烘仪(常州市中威电子仪器有限公司); BA400 Digital 数码三目摄像显微镜(麦克奥迪实业集团有限公司); Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件(美国 Media Cybernetics 公司)。

多聚甲醛(国药集团化学试剂有限公司, 批号: 20180112); 二甲苯(天津致远化学试剂有限公司, 批号: 20180110); 中性树胶(国药集团化学试剂有限公司, 批号: 20171009); 苏木素染液(BA-4097, 珠海贝索生物技术有限公司); 伊红染液(BA-4099, 珠海贝索生物技术有限公司); 生理盐水(四川科伦药业股份有限公司, 批号: L118041911); 甲醇色谱纯(成都金山化学试剂有限公司), 其余试剂均为分析纯。

黄芩苷对照品(成都曼斯特生物科技有限公司, 批号: MUST-16111113; 纯度: 98.59%); 盐酸麻黄碱对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 171241-201508; 纯度: 99.8%); 咖啡酸对照品(成都曼斯特生物科技有限公司, 批号: MUST-17032010; 纯度: 99.48%); 滴通鼻炎水(成都迪康药业有限公司, 批号: 170603); 脱氧胆酸钠(BIOSHARP, 相对分子质量: 414.56); 自制低、中、高剂量滴通鼻炎喷涂凝胶剂。

1.2 动物

SD 大鼠, 70 只, SPF 级, 180~220 g, ♀♂各半, 成都达硕实验动物有限公司, 许可证号: SCXK(川)2015-030。

2 方法

2.1 样品制备

取蒲公英 120 g、细辛 5 g、黄芩 60 g、麻黄 50 g、苍耳子 50 g、石菖蒲 60 g、白芷 25 g、辛夷 25 g 共 8 味药, 细辛、麻黄、苍耳子、石菖蒲、白芷、辛夷水蒸气蒸馏。收集馏出液约 200 mL, 药渣与黄芩、蒲公英加水煎煮 2 次, 每次 1.5 h, 合并煎液, 滤过, 浓缩滤液至稠膏状, 加 4 倍量乙醇搅匀, 静置过夜。取上清液并回收乙醇, 加入白芷等蒸馏液, 混匀备用^[2]。加入 200 g 泊洛沙

姆 407(P407)、30 g 泊洛沙姆 188(Poloxamer188, P188)、50 mL 甘油、2 g 苯甲酸钠, 调节 pH 至 6.1, 加水至 1 000 mL, 分装, 即得。

2.2 黄芩苷含量测定方法的建立

2.2.1 色谱条件 Globasil™ ODS-AP C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱; 流动相: 0.1%磷酸-甲醇(50 : 50), 等度洗脱; 进样量: 10 μL; 流速: 1 mL·min⁻¹; 柱温: 35 °C; 检测波长: 280 nm。

2.2.2 溶液配制 称取黄芩苷对照品 20.0 mg, 置 25 mL 量瓶, 甲醇定容, 再取 4 mL 置 50 mL 量瓶, 甲醇定容制得黄芩苷对照品溶液(65.28 μg·mL⁻¹); 取按“2.1”项下所得样品 5.0 mL 至 50 mL 量瓶, 加入 30 mL 甲醇, 超声(400 Hz)处理 5 min, 冷却定容, 得供试品溶液; 参照“2.1”项制备不含黄芩的阴性样品并取 5.0 mL, 按供试品溶液制备法制备阴性样品溶液; 参照“2.1”项制备不含任何药材的空白样品, 取 5.0 mL 按供试品溶液制备法制备空白对照品溶液。

2.2.3 方法学考察 包括专属性、线性关系考察, 精密度、稳定性、重复性、加样回收试验等。

2.2.4 样品含量测定 取按“2.1”项制备供试品溶液 3 批, 每批 2 份, 参照“2.2.1”测定 3 批样品中黄芩苷含量。

2.3 盐酸麻黄碱含量测定方法的建立

2.3.1 色谱条件 Alltima™ C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.1%磷酸-甲醇(5 : 95), 等度洗脱; 进样量: 10 μL; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 柱温: 35 °C; 检测波长: 210 nm。

2.3.2 溶液的配制 参照“2.2.2”项配制盐酸麻黄碱对照品溶液(42.2 μg·mL⁻¹)、供试品溶液、阴性样品溶液(不含盐酸麻黄碱)及空白对照品溶液。

2.3.3 方法学考察 参照“2.2.3”项进行盐酸麻黄碱含量测定方法学考察。

2.3.4 样品含量测定 取按“2.1”项制备供试品溶液 3 批, 每批 2 份, 参照“2.3.1”测定 3 批样品中盐酸麻黄碱含量。

2.4 体外释放度的测定

2.4.1 鼻腔模拟液制备 参照文献^[3], 分别量取 118 mmol NaCl、4.74 mmol KCl、2.45 mmol CaCl₂、1.19 mmol KH₂PO₄、1.19 mmol MgSO₄、12.5 mmol NaCO₃加入适量纯水配制制成 1.0 L 鼻腔模拟液备用。

2.4.2 体外释放度的测定 参照文献^[4], 取样品 5 mL(质量为 G)置 15 mL 离心管于 33~34 °C 恒温

水浴锅中形成凝胶。称定凝胶与离心管总重 G_0 ，加入 5 mL 鼻腔模拟液。将离心管置于恒温振荡仪 (33~34 °C) 以 $100\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 频率振荡，分别于 0.5, 1, 2, 3, 6, 9, 12 h 时倾出离心管全部液体，称定离心管重 G_n 。再向离心管中加入 5 mL 鼻腔模拟液。凝胶与离心管总重 G_0 与液体倒出后离心管重 G_n 间的差值为 2 个时间点间的溶蚀量，据此计算累积溶蚀率 X ， $X=(G_0-G_n)/G\times 100\%$ 。倾出液置 10 mL 量瓶，甲醇定容，HPLC 测定黄芩苷、盐酸麻黄碱含量，计算药物累积释放率 Q 。

2.4.3 释药行为分析 以零级释药模型、一级释药模型、Higuchi 平面扩散模型和 Ritger-Peppas 模型对黄芩苷、盐酸麻黄碱进行释药行为模拟合分析^[5]。

2.5 大鼠鼻黏膜毒性初步评价

2.5.1 滴通鼻炎喷涂凝胶剂给药剂量 原滴通鼻炎水用量为“1 次 2~3 滴，1 日 3~4 次”，按每滴体积约 0.05 mL，则给药剂量为每次 0.1~0.15 mL。据大鼠与成人体表面积比确定给药体积为每次 20 μL ^[6]，每日 1 次。低、中、高给药浓度分别为原剂型的 1, 2, 3 倍。

2.5.2 动物分组 70 只 SD 大鼠随机分为空白组，阳性组，赋形剂组，原剂型组，低、中、高剂量药物组，共 7 组，每组 10 只。

2.5.3 方法 参照文献^[5-6]，分别向空白组、阳性组、赋形剂组、原剂型组和低、中、高剂量药物组大鼠两侧鼻腔各注入 20 μL 生理盐水、1%脱氧胆酸钠、空白基质溶液、滴通鼻炎水、低中高剂量滴通鼻炎喷涂凝胶剂，给药后轻压鼻翼使药物与鼻腔充分接触，给药后 30 min 内记录大鼠行为学变化，连续给药 21 d。末次给药 24 h 后，空白组全部断颈处死，其余 6 组同法各处死 6 只，分离观察气管、支气管、肺形态学变化。HE 染色法观察鼻黏膜损伤程度^[7-8]，分离大鼠鼻黏膜组织于 4%甲醛固定液固定 24 h，脱水，包埋，切片，石蜡切片脱蜡至水，苏木素染色 10 min，伊红染色 2 min，二甲苯透明，中性树胶封固，镜检，观察鼻黏膜损伤程度。各组未处死的 4 只大鼠停止给药，常规饲养 7 d 后断颈处死，观察鼻黏膜恢复程度。

3 结果

3.1 黄芩苷含量测定

3.1.1 专属性试验 精密吸取黄芩苷对照品、供试品、阴性样品、空白对照品溶液各 10 μL 按

“2.2.1”项下方法测定，黄芩苷保留时间约为 11.5 min，发现阴性样品溶液、空白对照溶液在黄芩苷相应出峰时间无吸收峰，对测定无干扰。结果见图 1。

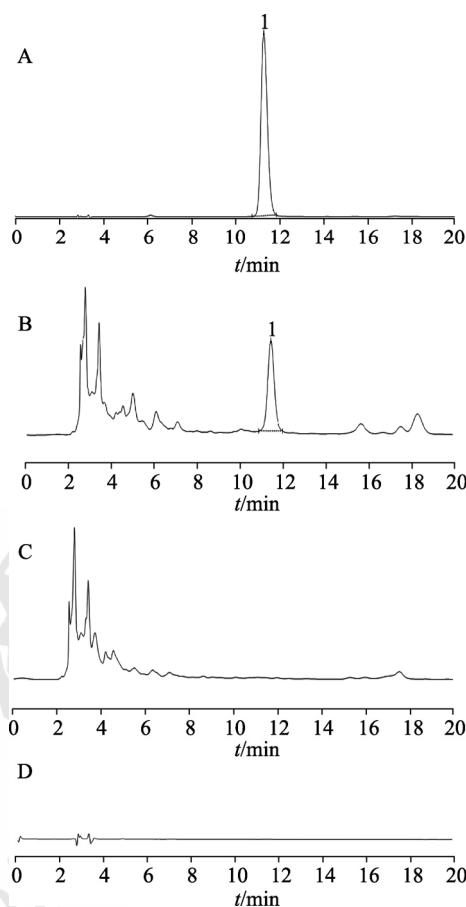


图 1 黄芩苷 HPLC 色谱图

A-对照品溶液；B-供试品溶液；C-阴性样品溶液；D-空白对照品溶液；1-黄芩苷。

Fig. 1 HPLC chromatogram of baicalin

A-reference solution; B-sample solution; C-negative sample solution; D-blank reference solution; 1-baicalin.

3.1.2 线性关系考察 分别精密吸取黄芩苷对照品溶液($65.28\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 1, 2, 4, 8, 16 μL 进样，按“2.2.1”项下方法测定峰面积。以黄芩苷进样量为横坐标(X)，峰面积为纵坐标(Y)绘制标准曲线。回归方程： $Y=3\ 175.1\ X+7.762\ 5$ ， $r=1$ ，黄芩苷进样量在 0.065 28~1.044 48 μg 内与峰面积呈良好线性关系。

3.1.3 仪器精密度试验 精密吸取黄芩苷对照品溶液($65.28\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)，按“2.2.1”项下方法测定峰面积，连续 6 次，RSD 值为 1.48%，表明仪器精密度良好。

3.1.4 稳定性试验 精密吸取供试品溶液，按

“2.2.1”项下方法分别于 0, 2, 4, 8, 16 h 测定峰面积, RSD 值为 1.36%, 表明黄芩苷在 16 h 内测定结果稳定。

3.1.5 重复性试验 精密量取供试品溶液 5.0 mL, 共 6 份, 按“2.2.1”项下方法测定, 黄芩苷平均含量为 $0.199 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, RSD 值为 1.52%, 表明该法重复性良好。

3.1.6 加样回收率试验 精密量取按“2.1”项下方法制备样品 6 份各 2.5 mL, 置 50 mL 量瓶, 编号 1~6, 分别加入 7.6 mL 黄芩苷对照品溶液 ($65.28 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 按“2.2.2”项下供试品溶液制备方法制备, 按“2.2.1”项下方法测定。1~6 号供试品回收率分别为 98.76%, 101.04%, 101.73%, 101.07%, 98.76%, 102.36%, 平均回收率为 100.62%, 回收率在 95%~105%, RSD 值为 2.06%, 测量结果与真实值较接近。

3.1.7 样品含量测定 按“2.2.4”项下方法测定 3 批样品, 黄芩苷含量分别为 0.190, 0.188, $0.195 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 所测样品中黄芩苷含量平均值为 $0.191 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

3.2 盐酸麻黄碱含量测定

3.2.1 专属性试验 精密吸取盐酸麻黄碱对照品、供试品、阴性样品、空白对照溶液各 10 μL 按“2.3.1”项下方法测定, 盐酸麻黄碱保留时间约为 16.7 min, 发现空白溶液、阴性溶液在盐酸麻黄碱相应出峰时间无吸收峰, 对测定无干扰。结果见图 2。

3.2.2 线性关系考察 分别精密吸取盐酸麻黄碱对照品溶液 ($42.2 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 1, 2, 4, 8, 16 μL , 按“2.3.1”项下方法测定峰面积, 以盐酸麻黄碱进样量为横坐标(X), 峰面积为纵坐标(Y)绘制标准曲线, 回归方程为 $Y=1\ 605.1X+1.262\ 5$, $r=0.999\ 9$, 盐酸麻黄碱进样量在 0.042 2~0.675 2 μg 内与峰面积呈良好线性关系。

3.2.3 仪器精密度试验 精密吸取盐酸麻黄碱对照品溶液 ($42.2 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 按“2.3.1”项下方法测定峰面积, 连续 6 次, RSD 值为 1.37%, 表明仪器精密度良好。

3.2.4 稳定性试验 精密吸取供试品溶液分别于 0, 2, 4, 8, 16 h 后按“2.3.1”项下方法测定峰面积, RSD 值为 1.85%, 表明盐酸麻黄碱在 16 h 内测定结果稳定。

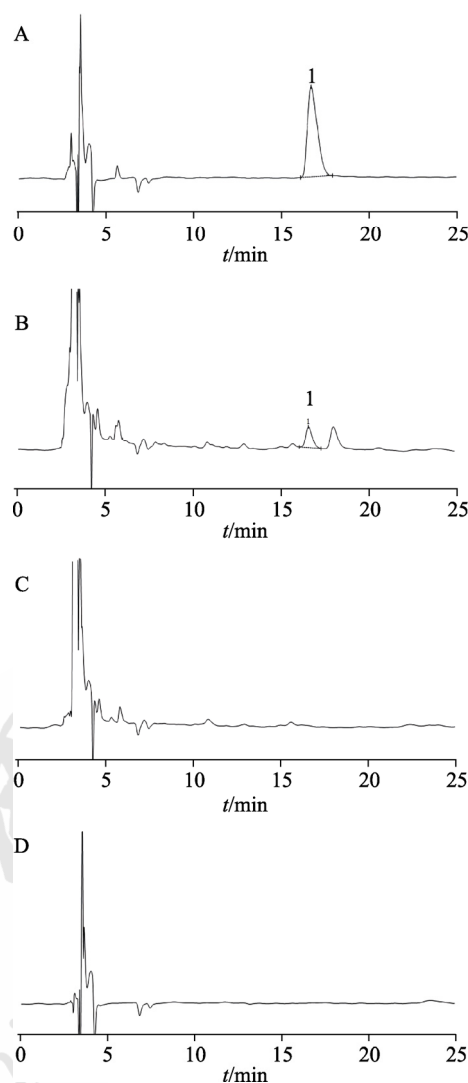


图 2 盐酸麻黄碱 HPLC 色谱图

A-对照品溶液; B-供试品溶液; C-阴性样品溶液; D-空白对照品溶液; 1-盐酸麻黄碱。

Fig. 2 HPLC chromatogram of ephedrine hydrochloride

A-reference solution; B-sample solution; C-negative sample solution; D-blank reference solution; 1-ephedrine hydrochloride.

3.2.5 重复性试验 精密吸取供试品溶液 5.0 mL, 共 6 份, 按“2.3.1”项下方法测定, 盐酸麻黄碱平均含量为 $0.113 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, RSD 值为 2.04%, 表明该法重复性良好。

3.2.6 加样回收率试验 取精密量取按“2.1”项下方法制备样品 6 份各 2.5 mL, 置 50 mL 量瓶, 编号 1~6, 加入 6.6 mL 盐酸麻黄碱对照品溶液 ($42.2 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 按“2.2.2”项下供试品溶液制备方法制备, 按“2.3.1”项下方法测定。1~6 号供试品回收率分别为 96.37%, 95.82%, 102.09%, 96.67%, 96.32%, 97.66%, 平均回收率为 97.49%, RSD 值为 2.73%, 回收率在 95%~105%, 测量结

果与真实值较接近。

3.2.7 样品含量测定 按“2.3.4”项下方法测定 3 批样品, 盐酸麻黄碱含量分别为 0.114, 0.108, 0.120 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 所测样品中盐酸麻黄碱含量平均值为 0.114 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

3.3 药物累积溶蚀率和释放率

本品累积溶蚀率在 12 h 内 $>80\%$, 骨架溶蚀率高, 结果见图 3。12 h 内黄芩苷、盐酸麻黄碱二者累积释放率均 $>80\%$, 药物释放完全, 结果见图 4。本品的累积溶蚀率与累积释放率间线性关系良好, 结果见图 5。综上, 本品释药机制与骨架溶蚀有关且具缓释效果^[9]。

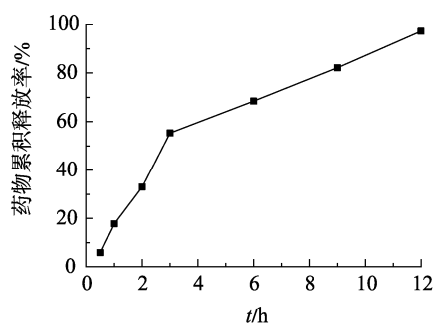


图 3 滴通鼻炎喷涂凝胶剂累积溶蚀率曲线($n=3$)
Fig. 3 Cumulative corrosion rate curve of Ditong Biyan Spray Gel($n=3$)

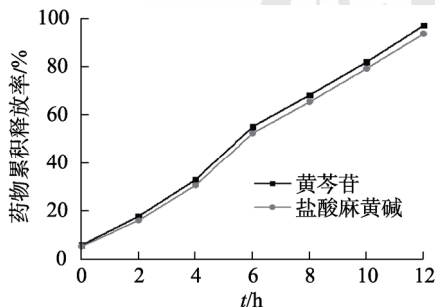


图 4 滴通鼻炎喷涂凝胶剂累积释放率曲线($n=3$)
Fig. 4 Cumulative release rate curve of Ditong Biyan Spray Gel($n=3$)

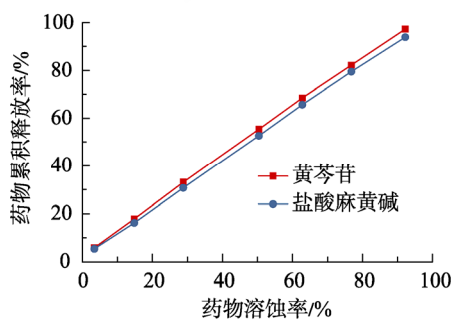


图 5 累积溶蚀率-累积释放率曲线图($n=3$)
Fig. 5 Cumulative dissolution rate-release rate curve($n=3$)

3.4 释药行为分析

据 Ritger-Peppas 动力学方程, n 为释放参数, 黄芩苷、盐酸麻黄碱释放指数分别为 0.595 7, 0.610 1, 介于 0.5~1, 表示释药机制为扩散与骨架溶蚀协同作用^[10]。比较拟合曲线优度 R^2 可知, 黄芩苷、盐酸麻黄碱体外释放符合一级动力学方程, 说明本品具有缓释特征。综上, 本品释药以溶蚀为主, 扩散为辅, 具缓释特性, 可避免突释现象, 结果见表 1~2, 图 6~7。

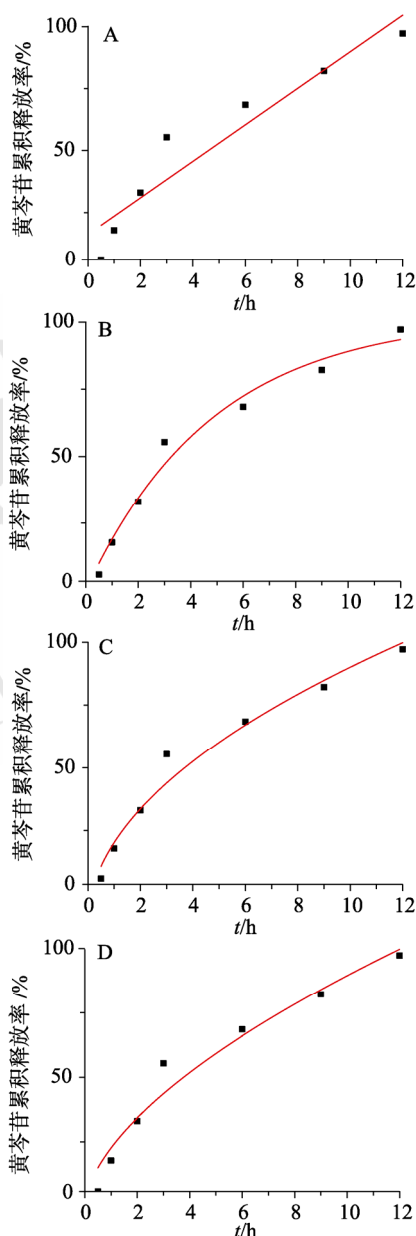


图 6 黄芩苷累积释放率拟合曲线($n=3$)
A—零级动力学; B—一级动力学; C—Higuchi 动力学; D—Ritger-Peppas 动力学。
Fig. 6 Fitting curve of cumulative release rate of baicalin($n=3$)
A—Zero-order kinetics; B—First-order kinetics; C—Higuchi kinetics; D—Ritger-Peppas kinetics.

表 1 黄芩苷释药模型结果

Tab. 1 Release model result of baicalin

黄芩苷释药模型	模型方程	方程	R^2
零级动力学	$Q=at+b$	$Q=7.371\ 9t+16.146\ 1$	0.887\ 85
一级动力学	$Q=a[1-e^{(-bx)}]$	$Q=102.098\ 3[1-e^{(-0.206\ 03x)}]$	0.976\ 57
Higuchi 动力学	$Q=at^{1/2}-b$	$Q=32.322\ 9t^{1/2}-12.144$	0.969\ 06
Ritger-Peppas 动力学	$Q=at^n$	$Q=22.677\ 3t^{0.595\ 7}$	0.954\ 51

表 2 盐酸麻黄碱释药模型结果

Tab. 2 Release model result of ephedrine hydrochloride

盐酸麻黄碱释药模型	模型方程	方程	R^2
零级动力学	$Q=at+b$	$Q=7.201\ 4t+14.659$	0.893\ 66
一级动力学	$Q=a[1-e^{(-bx)}]$	$Q=100.311\ 0[1-e^{(-0.195\ 03x)}]$	0.977\ 48
Higuchi 动力学	$Q=at^{1/2}-b$	$Q=31.526\ 7t^{1/2}-12.881$	0.971\ 67
Ritger-Peppas 动力学	$Q=at^n$	$Q=21.154\ 7t^{0.610\ 1}$	0.956\ 02

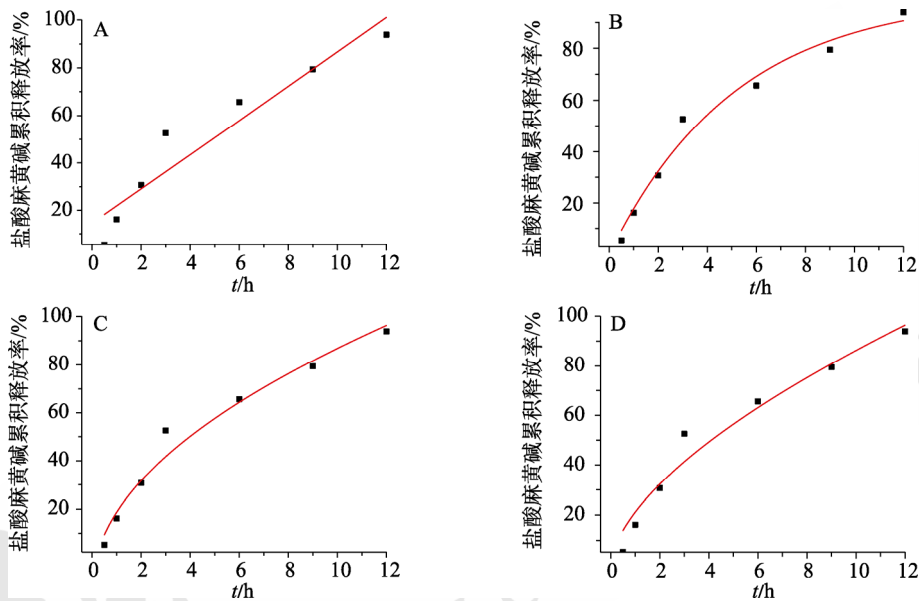


图 7 盐酸麻黄碱累积释放率拟合曲线($n=3$)

A—零级动力学; B—一级动力学; C—Higuchi 动力学; D—Ritger-Peppas 动力学。

Fig. 7 Fitting curve of cumulative release rate of ephedrine hydrochloride($n=3$)

A—Zero-order kinetics; B—First-order kinetics; C—Higuchi kinetics; D—Ritger-Peppas kinetics.

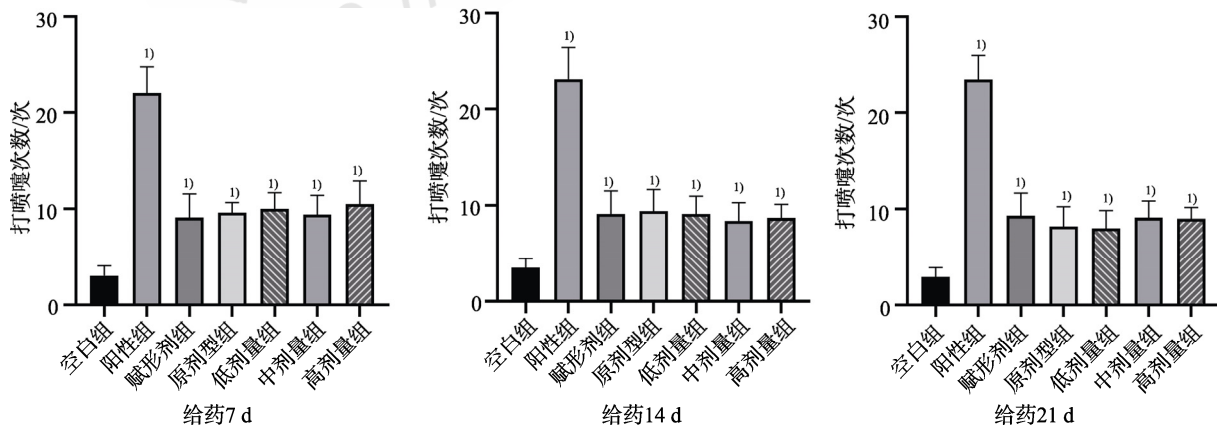


图 8 宏观刺激性考察结果

与空白组比较, $^{1)}P<0.05$ 。

Fig. 8 Macro-stimulation results

Compared with the blank group, $^{1)}P<0.05$.

3.5 大鼠鼻腔宏观刺激性考察

打喷嚏与挠鼻为过敏性鼻炎主要症状^[1]。给药 30 min 内, 阳性组出现频繁挠鼻、打喷嚏现象, 其余组仅有打喷嚏现象, 因此本实验选择喷嚏次数作为大鼠鼻腔宏观刺激性指标, 分别考察给药 7, 14, 21 d 后各组大鼠打喷嚏次数, 结果见图 8。与空白组相比, 其余各组打喷嚏次数有显著性差异($P<0.05$), 除空白组和阳性组, 其余各组间无明显差异, 说明本品与原剂型对鼻腔刺激性基本一致。

3.6 大鼠气管、支气管黏膜、肺部毒性考察

给药期间, 大鼠均未出现中毒、死亡现象;

其生理状态、行为活动与适应性喂养时无异；处死后分离观察可知各组大鼠气管、支气管、肺部均未出现红肿、充血等现象，结果见图 9。

3.7 大鼠鼻黏膜损伤考察

大鼠鼻黏膜 HE 染色结果见图 10，对染色结果进行分析可得表 3，由表 3 可知，除阳性组鼻黏膜损伤严重，其余各组均未见明显病变，鼻黏膜形态结构正常，纤毛形态完整。

3.8 大鼠鼻黏膜恢复程度考察

停药 7 d 后，阳性组黏膜腺管上皮细胞发生轻度空泡变性，黏膜上皮细胞发生变性、坏死，固

有层充血、出血，恢复不佳，可能与大鼠鼻黏膜损伤严重，超出自我修复能力有关，其余各组均可恢复正常，见图 11。本品无明显鼻黏膜损伤现象，停药即可恢复，对鼻纤毛无影响。综上，本品局部应用毒性较小，安全性较高，值得深入研发。

4 讨论

4.1 剂型选择依据

原位凝胶又称即型凝胶，是一种对环境敏感的新型给药载体，其给药前为液体，在用药部位因局部环境(温度、pH、离子等)改变而形成固体或半固体状态。原位凝胶可分为温度敏感性、离子

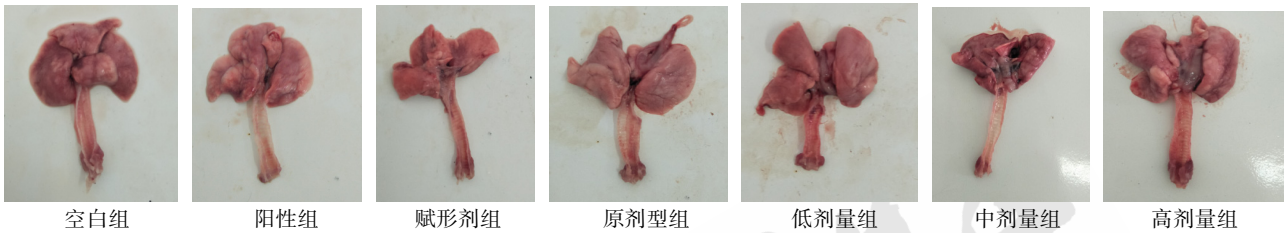


图 9 大鼠气管、支气管、肺部毒性考察结果
Fig. 9 Toxicity of trachea, bronchus and lung in rats

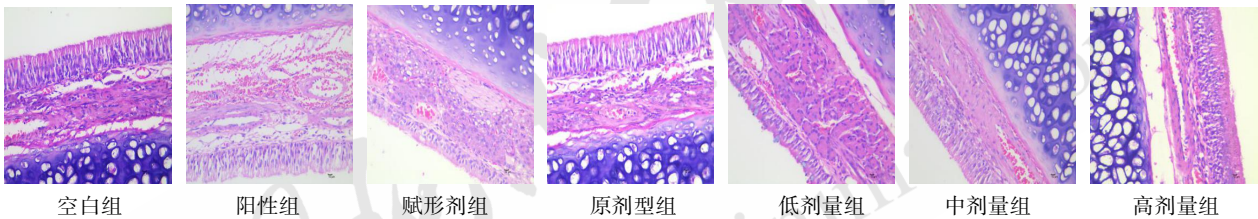


图 10 大鼠鼻黏膜 HE 染色图(400×)
Fig. 10 HE staining of rat nasal mucosa(400×)

表 3 大鼠 HE 染色结果分析

Tab. 3 Analysis of HE staining results in rats

组别	鼻黏膜形态	细胞	纤毛形态	特殊现象
空白组	正常	排列较规律	完整	无
阳性组	发生不同程度变性	黏膜下大量炎细胞浸润，少量细胞坏死；黏膜上皮细胞发生轻度增生、变厚	损伤	黏膜下层弥漫性出血，腺管上皮细胞发生轻空泡变性和脂肪变性
原剂型组	正常	排列较规律，部分区域少量炎性细胞浸润	完整	无
赋形剂组	正常	部分区域少量炎细胞浸润	完整	无
低剂量组	正常	排列较规律	完整	无
中剂量组	正常	排列较规律，部分区域有炎性细胞出现	完整	无
高剂量组	正常	排列较规律，伴有炎性细胞浸润	完整	黏膜下层轻微充血

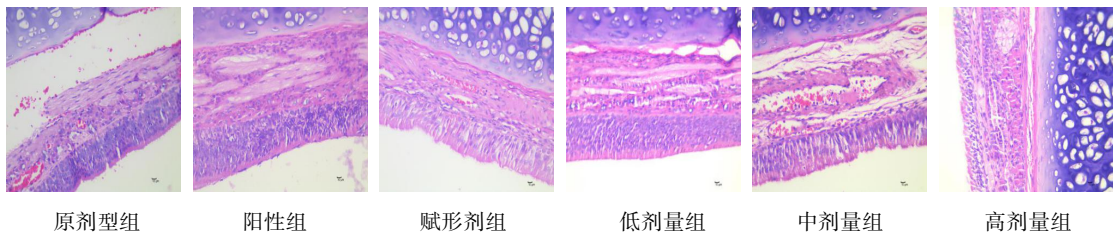


图 11 停药 7 d 大鼠鼻黏膜 HE 染色图(400×)
Fig. 11 HE staining of rat nasal mucosa 7 days after discontinuation of administration(400×)

敏感型、pH 敏感型凝胶剂。温敏型凝胶基质包括聚 *N*-异丙基烯酰胺类聚合物、天然聚合物、聚乙二醇类嵌段共聚物、聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物等。前 3 类基质存在生理毒性, 临床使用受限。聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物中泊洛沙姆亲水性高, 吸水溶蚀速度快, 形成凝胶质地软, 毒性低、配伍性好、生物相容性高。目前最常用的是泊洛沙姆 407(P407)及其类似物泊洛沙姆 188(P188), P407 形成的凝胶具浓度依赖, 其相转变温度随浓度升高而减小。P188 结构中亲水性聚氧乙烯片段比例高, 二者结合使用, 可得到适宜的温敏型凝胶制剂^[12]。滴通鼻炎水存在鼻腔滞留时间短, 贮藏稳定性差, 给药次数多, 患者顺应性差等缺点, 鉴于此课题组拟开展其剂型改革研究。选择 P407 与 P188 为凝胶基质, 加相应辅料制得温敏型凝胶剂, 在常温状态为液体, 进入鼻腔(33~34 °C)后迅速形成凝胶附着于鼻黏膜, 可延长药物滞留时间, 减少给药次数, 提高顺应性。

目前常用的鼻腔制剂主要为滴鼻剂、喷雾剂等, 其在给药时容易流出, 患者顺应性低, 因此凝胶剂研究具有一定优势。

4.2 体外释放度测定指标选择

中药制剂成分复杂, 释放度研究通常选择处方中与功能主治相关的成分, 测定其体外释药模式作为整个制剂的释药规律^[13]。方中黄芩清热燥湿, 泻火解毒, 黄芩苷提高淋巴母细胞转化率发挥抗炎作用; 麻黄宣肺通窍, 盐酸麻黄碱收缩血管, 减少鼻黏膜充血, 均与所治疗病症有关, 因此选择二者作为评价指标。结果显示本品以骨架溶蚀为主, 扩散为辅的方式从凝胶中释药, 进入鼻黏液中, 具有缓释特征^[14]。

4.3 大鼠宏观刺激性及鼻黏膜毒性考察

通过文献及预实验可知给药后大鼠出现头部晃动、眨眼、发出喷嚏声等可作为打喷嚏现象的评价指标, 大鼠挠鼻、眼、唇等可作为挠鼻的判断方法。本实验中大鼠挠鼻次数较少, 不便观察计数, 因此以喷嚏次数作为药物宏观刺激性考察指标, 但具主观性, 需进一步考察^[15]。

鼻用制剂易造成鼻黏膜、纤毛损伤, 从而影响鼻腔正常生理功能。因此对制剂鼻黏膜毒性考察尤为重要。鼻腔给药毒性评价包括鼻黏膜形态学评价、纤毛毒性评价、红细胞溶血试验等, 而大鼠鼻黏膜形态与人体接近, 常用于制剂的急慢性鼻黏膜

毒性研究^[16], 据此选择 HE 染色法考察本品对大鼠鼻黏膜的影响。实验发现, 本品通过鼻腔给药具有一定刺激性, 但停药后可恢复, 未对大鼠造成明显的鼻黏膜损伤, 在后期实验中将对本品长期应用是否存在毒性及黏膜损伤进行考察。

REFERENCES

- [1] 程敏, 叶小弟, 缪云萍, 等. 滴通鼻炎水收缩血管作用的实验研究[J]. 中国中医药科技, 2012, 19(5): 404-405.
- [2] 中国药典. 四部[S]. 2015.
- [3] 陈文文. 苍夷滴鼻生物黏附凝胶药学部分研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2007.
- [4] 任晓维. 糠酸莫米松鼻用即型凝胶喷雾剂的研制[D]. 上海: 复旦大学, 2008.
- [5] MIAO J C, YANG T Y, CHEN Z. Assessment on mucosa-toxicity of *Salvia miltiorrhiza* nasal spray [J]. J Guiyang Med Coll(贵阳医学院学报), 2013, 38(4): 375-378.
- [6] SHI S L, ZHANG H Q, ZHANG X D, et al. Nasal toxicity of breviscapine nasal spray in rats [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2009, 18(17): 1658-1663.
- [7] LI A H. A modified Hematoxylin and Eosin staining method [J]. China Mod Med(中国当代医药), 2009, 16(10): 54, 73.
- [8] LIN Y J, WU P J, SU Z T, et al. Studies on ciliary toxicity and mucomembranous stimulation of baicalin and its phospholipide complex [J]. J Sichuan Contin Edu Coll Med Sci(四川省卫生管理干部学院学报), 2008, 27(4): 241-244.
- [9] CAI Z, HOU S X, SONG X R, et al. Study on drug release of gastrodin ion-activated nasal *in situ* gel *in vitro* [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2008, 33(7): 760-762.
- [10] 李晨曦. 用于鼻腔给药的载酮咯酸氨丁三醇温敏即型凝胶的制备与评价[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2014.
- [11] 万美霞, 张开莲. 离子敏感型鼻用原位凝胶质量评价研究进展[J]. 泸州医学院学报, 2013, 36(2): 195-197.
- [12] YANG F J, CHENG L Y, WEI G. Application of *in situ* formed poloxamer gel for mucous membrane administration [J]. World Clin Drugs(世界临床药物), 2014, 35(7): 417-421, 434.
- [13] TALKAR S, DHOBLE S, MAJMDAR A, et al. Transmucosal nanoparticles: Toxicological overview [J]. Adv Exp Med Biol, 2018, 1048(1): 37-57.
- [14] FAN H M, CONG Z X, GU F G. Preparation and *in vitro* properties of thermosensitive *in situ* nasal gel of donepezil hydrochloride [J]. Cent South Pharm(中南药学), 2018, 16(9): 1194-1199.
- [15] 王玉霞, 张润, 李梦景, 等. 复方丹参鼻用温敏凝胶成型工艺研究[J]. 时珍国医国药, 2018, 29(2): 344-346.
- [16] CHU K D, LI H, ZHENG J, et al. Preparation of nasal thermosensible gels of Chinese medicine Xingbi and release behavior *in vitro* [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2010, 35(21): 2822-2825.

收稿日期: 2019-09-05

(本文责编: 沈倩)