

和棕榈酸二油酸甘油酯等7种成分,总量占甘油三酯类90%以上<sup>[7]</sup>,平均分子量为870<sup>[8]</sup>,据此用相溶解度法测得薏苡仁油的包合比(摩尔)结果为1:1,由此得出:在包合过程中,薏苡仁油所含的甘油三酯类成分分别被 $\beta$ -CD包合,即薏苡仁油 $\beta$ -CD包合物是 $\beta$ -CD包合各类甘油三酯类成分的混合物。

均匀设计(Uniform Design)是在试验范围内试验点均匀散布、通过最少的试验获得最多的信息,非常适合于多因素多水平的试验和系统模型完全未知的情况。本研究利用这个特点,在最初包合条件未知的情况下,对包合工艺进行初筛,再利用正交试验表 $L_9(3^4)$ 优选包合工艺的最佳条件,缩小了实验范围,大大节省了研究时间,缩短了实验进程。

经过差示量热扫描法、X-射线衍射法、红外光谱法以及电镜扫描法的验证,结果说明与物理混合物比较,包合物形成了一种新的物相,但是有关薏苡仁油包合物在高温、高湿和光照情况下的稳定性以及

$\beta$ -CD对薏苡仁油的包合机理有待进一步的探讨。

#### 参考文献:

- [1] 林启寿. 中草药成分化学[M]. 北京: 科学出版社, 1977: 54-55.
- [2] 阎孝娣.  $\beta$ -环糊精的毒性与致突变性[J]. 中华卫生职业病杂志, 1995, 13(6): 323.
- [3] 马路, 刘剑刚, 史大卓, 等. 均匀设计在中医药研究中的应用[J]. 中国中西医结合杂志, 2005, 25(3): 278-281.
- [4] 董川, 李俊芬, 双少敏. 环糊精包合物的形成及光谱特征[J]. 光谱实验室, 2000, 17(3): 247.
- [5] Fernandes CM, Vieira MT, Veiga F. Physicochemical characterization and in vitro dissolution behavior of nifedipine-cyclodextrins inclusion compounds[J]. Eur J Pharm Sci, 2002, 15(1): 79.
- [6] 王亚娜, 孙俊梅, 余丽丽. 环糊精及衍生物/药物包合常数的测定方法及其应用[J]. 药学进展, 2004, 28(1): 23.
- [7] 向智敏, 祝明, 陈碧莲, 等. HPLC-MS分析薏苡仁油中的甘油三酯成分[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(18): 1436.
- [8] 李大鹏, 黄洁敏, 苏维埃, 等. 薏苡仁油脂的化学成分分析[J]. 中药新药与临床药理, 1999, 10(2): 99.

(编辑: 邓响潮)

## 离子敏感型熊胆眼用即型凝胶的制备及质量评价研究

王建成(山东省临沂市食品药品检验检测中心, 山东 临沂 276000)

**摘要:** **目的** 制备离子敏感型熊胆眼用即型凝胶, 并对其凝胶特性进行评价。**方法** 采用单因素实验法优选凝胶基质以及凝胶增强剂, 使用优选处方制备即型凝胶, 并对其质量(渗透压、黏度、体外释放以及眼部滞留能力)进行考察。**结果** 结冷胶(Gelrite)和羧甲基纤维素钠(CMC-Na)比例为0.6%:0.3%时制备凝胶效果较好; 所制备的熊胆凝胶制剂与熊胆滴眼液比较, 用药后黏度显著增加, 具有较好的缓释特性; 在用药部位停留时间较长, 眼部滞留能力显著增强。**结论** 制得的熊胆眼用即型凝胶具有良好成型性, 符合即型凝胶的要求。

**关键词:** 离子敏感型熊胆眼用即型凝胶; 结冷胶; 制备工艺; 质量评价

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2014)05-0628-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.05.027

### Preparation and Quality Evaluation of Ion-sensitive *Xiongdan* Ophthalmic In-situ Gel

WANG Jiancheng(Linyi Institute of Food and Drug Control, Linyi 276000 Shandong, China)

**Abstract: Objective** To prepare ion-sensitive *Xiongdan* ophthalmic in-situ gel, and to evaluate its quality.

**Methods** Using single factor experiment method, we optimized gel matrix and the preparation of the in-situ gel, and evaluated the quality of the in-situ gel by measuring the osmotic pressure, viscosity, in-vitro release, and eye retention capacity. **Results** When the ratio of Gelrite and sodium methocellulose (CMC-Na) was 0.6%:0.3%,

收稿日期: 2014-03-13

作者简介: 王建成, 男, 主管中药师, 研究方向: 中药新药研究及中药检测分析。Email: sdzy2010@yeah.net.

the gel preparation had good formability. Compared with the eye drops, the in-situ gel had increased viscosity and satisfactory delayed release, and had better eye retention capacity. **Conclusion** The prepared *Xiongdan* ophthalmic in-situ gel has good formability, and is in accordance with the requirement of the in-situ gel.

**Keywords:** Ion-sensitive *Xiongdan* ophthalmic in-situgel; Gelrite; Preparation technology; Quality evaluation

眼用即型凝胶是一种新型的凝胶剂,该剂型用药前以溶液形式存在,给药后可立即在眼部发生相变,形成化学交联的半固体制剂<sup>[1]</sup>。该剂型可延长药物在眼部的作用时间、增加生物利用度,成为眼用制剂研究的热点。熊胆眼用即型凝胶是以熊胆粉为主药的新型眼用制剂<sup>[2]</sup>,具有清热解毒、去翳明目之功效,本实验对离子敏感型熊胆眼用即型凝胶的处方和制备工艺进行了研究,并进行了初步的质量评价。

## 1 材料与试药

**1.1 仪器** KDW 型控温电热套, 鄞城华鲁电热仪器有限公司; KQ-250E 型超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; AL204 电子天平, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; NDJ-5S 型数字旋转黏度计, 上海地学仪器研究所; SMC-30 型渗透压仪, 天津天河医疗仪器有限公司。

**1.2 试药** 羟丙甲纤维素(E10M), 美国卡乐康公司; 结冷胶(Gelrite), 美国 Kelco 公司; 透明质酸钠(CMC), 济南博士伦福瑞达制药有限公司; 羧甲基纤维素钠(CMC-Na), 美国 Aqualon 公司; 卡波姆-934NF(Carbopol-934NF), 美国 NOVEON 公司; 甲基纤维素, 分析纯, 天津市科密欧化学试剂开发中心; 羟苯乙酯, 天津市科密欧化学试剂开发中心; 硼砂、硼酸, 中国医药集团上海化学试剂厂; 其余试剂均为分析纯。

熊胆粉购自四川省中药材公司鹿场, 经山东中医药大学药学院周凤琴教授鉴定符合《中华人民共和国卫生部药品标准》WS3-09(B-09)-96(Z)熊胆粉项下的各项规定。

## 2 方法与结果

**2.1 人工泪液的配制**<sup>[3]</sup> 精密称取氯化钠 6.700 g、碳酸氢钠 2.000 g、二水合氯化钙 0.080 g 置 1000 mL 量瓶中, 加水使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

### 2.2 结冷胶<sup>[4]</sup>离子敏感型眼用即型凝胶基质的优选

**2.2.1 单用结冷胶基质成型性研究**<sup>[5]</sup> 取结冷胶适量, 加水以热溶法制成不同浓度的溶液, 分别考察上述基

质在 25 ℃及 34 ℃人工泪液中的状态。实验结果表明, 当结冷胶浓度为 0.4%~0.7% 时, 基本符合即型凝胶的要求, 但该浓度下形成的凝胶强度较弱, 为了提高结冷胶在眼部的滞留能力, 需要在结冷胶中加入凝胶增强剂, 以使其更好的成型。

**2.2.2 Gelrite 和 E10M 混合基质成型性研究** 取 E10M 适量, 加水制备成浓度为 1.0% 的溶液, 备用; 另取结冷胶适量, 以热溶法制备成 1% 的溶液, 冷至室温, 备用; 将上述 2 种溶液按不同的比例混合, 分别考察其在 25 ℃及 34 ℃人工泪液中的状态。结果表明: E10M 能够提高结冷胶形成凝胶的强度, 但其混合物在室温条件下的黏度也相应增加, 不符合眼用即型凝胶制剂成型性的要求, 因此, E10M 不适合作为 Gelrite 的增稠剂。

**2.2.3 Gelrite 和 MC 混合基质成型性研究** 称取 MC 适量, 加水制成浓度为 6% 的溶液, 冷藏过夜, 备用; 另取结冷胶适量, 以热溶法制备成 1% 的溶液, 冷至室温, 备用; 将上述两种溶液按不同的比例混合, 分别考察其在 25 ℃及 34 ℃人工泪液中的状态。结果表明, MC 能提高相同浓度的 Gelrite 的凝胶强度, 但是不能降低 Gelrite 的用量, 且其凝胶为微浑浊的状态, MC 不适合作为 Gelrite 的增稠剂。

**2.2.4 Gelrite 和 Carbopol-934NF 混合基质成型性研究** 取 Carbopol 934NF 适量, 加水制成浓度为 1% 的溶液, 备用; 另取 Gelrite 适量, 以热溶法制备成 1% 的溶液, 冷至室温, 备用; 将上述 2 种溶液按不同的比例混合, 分别考察其在 25 ℃及 34 ℃人工泪液中的状态。结果表明, Carbopol-934NF 与 Gelrite 混合应用虽然能够增加 Gelrite 凝胶的强度, 但是该混合基质在 25 ℃条件下和 34 ℃加入人工泪液均不澄清, 卡波姆也不适合作为 Gelrite 的增稠剂。

**2.2.5 Gelrite 和 CMC-Na 混合基质成型性研究** 称取 CMC-Na 适量, 加水制成浓度为 1% 的溶液, 备用; 另取 Gelrite 适量, 以热溶法制备成 1% 的溶液, 冷至室温, 备用; 将上述 2 种溶液按表 1 中的比例混合, 分别考察其在 25 ℃及 34 ℃人工泪液中的状态。

表 1 Gelrite 和 CMC-Na 混合基质用量筛选结果表

Table 1 Screening results of Gelrite and CMC-Na mixed medium dosage

编号	Gelrite/%	CMCNa/%	25℃状态	34℃人工泪液状态
1	0.4	0.1	液态	液态
2	0.4	0.3	液态	液态
3	0.5	0.1	液态	弱凝胶态
4	0.5	0.3	液态	弱凝胶态
5	0.6	0.1	液态	弱凝胶态
6	0.6	0.3	液态	凝胶态
7	0.7	0.1	液态	凝胶态
8	0.7	0.3	液态	凝胶态

结果表明, CMC-Na 与 Gelrite 混合应用可以显著增加 Gelrite 凝胶的强度, 凝胶澄清透明, 符合即型凝胶的要求, 可以作为本制剂的基质应用。Gelrite 和 CMC-Na 在浓度为 0.6% : 0.3% 和 0.7% : 0.1% 时均符合凝胶成型要求, 从降低生产成本的角度选择其最佳浓度比为 0.6% : 0.3%。

2.3 熊胆眼用即型凝胶成型工艺

2.3.1 熊胆粉的提取 取熊胆粉 5.0 g, 加注射用水 100 mL, 加热煮沸 10 min 使溶解, 放冷, 加乙醇使含醇量达 75%, 静置 24 h, 滤过, 滤液回收乙醇, 所得水液备用。

2.3.2 熊胆眼用凝胶成型工艺 取注射用水 100 mL, 均匀撒入 CMC-Na 3.0 g, 冷藏过夜, 搅拌均匀; 另取注射用水 800 mL, 按照原处方比例加入硼酸 12.0 g、硼砂 0.6 g, 搅拌使溶解, 再加入尼泊金乙酯 0.8 g、结冷胶 6.0 g, 加热煮沸使溶解, 冷却至 80℃, 加入熊胆粉提取液, 边加边搅拌, 待冷却至室温后加注射用水至 1000 g, 即得。

2.4 熊胆眼用即型凝胶评价

2.4.1 渗透压的测定及等渗调节<sup>[6]</sup> 等渗条件下相当于氯化钠溶液的浓度为 0.9%, 渗透压为 300 mosmol, 按照确定的工艺条件制备了 3 批熊胆眼用即型凝胶各 100 mL, 分别测定其渗透压, 结果见表 2。

表 2 熊胆眼用即型凝胶渗透压测定结果( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 2 Osmometry results of Xiongdan ophthalmic in-situgel

编号	渗透压 /mosmol
样品 1	348
样品 2	344
样品 3	341

眼用制剂渗透压可以调节在 233 ~ 500 mosmol 的范围, 在实际生产中, 为了更好地控制制剂的质量, 我们控制产品的渗透压范围为: 300 ~ 400 mosmol。

2.4.2 凝胶黏度的测定 参考《中国药典》二部附录 VI G 第二法, NDJ-1、NDJ-4 旋转黏度计(上海精密科学仪器有限公司天平仪器厂), 2 号转子, L/0.6 挡位对制剂样品的黏度进行了室温(25℃)和人工泪液(34℃)条件下的测定。结果表明, 在 25℃ 条件下测得制剂黏度在 20 ~ 30 mPa·s<sup>-1</sup>, 在 34℃ 人工泪液中测得黏度在 200 ~ 220 mPa·s<sup>-1</sup>。

2.4.3 眼部滞留能力试验 取实验制备的熊胆眼用即型凝胶和市售熊胆眼药水, 分别加入 2% 的荧光素钠, 混匀。选择健康无眼疾家兔 10 只, 随机分为 2 组, 用移液枪向 1 组 5 只家兔左眼内分别精密加入 50 μL 凝胶溶液, 向另 1 组 5 只家兔左眼内滴入含荧光素钠的眼药水 50 μL 后, 使家兔眼睛被动闭合 8 ~ 10 s, 然后每隔一定时间用裂隙灯在 365 nm 波长下观察眼角膜表面连续荧光层强弱, 角膜表面连续荧光层消失的时间即为眼部滞留时间, 结果见表 3。

表 3 熊胆眼用即型凝胶眼部滞留能力实验结果( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 Eye retention results of Xiongdan ophthalmic in-situgel

样品	n	给药体积 /μL	滞留时间 /min
熊胆眼用即型凝胶	5	50	41.2 ± 3.1
熊胆眼药水	5	50	11.6 ± 2.1

结果表明, 眼药水药物流失较快, 平均 11.6 min 后已无明显荧光, 而凝胶剂在角膜上的停留时间明显延长, 可以达到 41.2 min, 说明眼用即型凝胶能更好地保证药物停留足够时间, 提高生物利用度。

2.4.4 体外释放试验<sup>[7]</sup> 见表 4。将熊胆眼用即型凝胶样品 5 g 加入到圆柱形容器中, 保持制剂液面的平整, 然后将该圆柱形容器置于 34.5℃ 的空气浴振荡器中加热, 时间控制在 30 min, 再加入 2 mL 已经提前预热(34.5℃ 条件下)的人工泪液作为药物释放的介质, 将其置于一定频率下恒温振荡, 时间为 20 min, 立即将释放介质全部倒出, 并将容器的内外表面用滤纸吸干, 迅速称定质量并记录, 然后重新放入振荡器内平衡 15 min, 补充人工泪液, 并继续振荡 20 min, 实验控制的药物释放面积为 3.8 cm<sup>2</sup>。

表 4 熊胆眼用即型凝胶溶蚀及释药结果

Table 4 Erosion and drug release results of Xiongdan ophthalmic in-situgel

t/min	0	20	40	60	80	100	120	140	160
溶蚀量 /g	0	1.12	1.71	2.42	3.1	3.73	4.45	5.2	5.2
含量测定 /mg	0	1.21	2.32	3.35	4.23	5.15	5.83	6.35	6.35

结果表明, 基质溶蚀和成分释放均在约 140 min 达到最大, 与 140 min 以熊胆眼用凝胶中牛磺熊去氧胆酸的释放曲线经典模型拟合, 其结果更符合零级释放, 释放曲线公式为:  $Y=0.0458X+0.35$ ,  $R^2=0.9867$ 。

### 3 讨论

**3.1** 当结冷胶遇到  $Na^+$ 、 $K^+$ 、 $Ca^{2+}$  时, 结构中的葡萄糖醛酸被中和, 即发生阳离子介导的凝聚, 产生溶液-凝胶相变, 其凝胶能力受阳离子类型、浓度及其自身浓度的影响, 二价阳离子比一价阳离子促进结冷胶凝胶的能力强, 其中  $Ca^{2+}$  比  $Mg^{2+}$  有效, 二价阳离子使结冷胶形成热不可逆性凝胶, 一价阳离子使结冷胶形成热可逆性凝胶。在阳离子存在时, 在 pH4.0 ~ 8.0 时结冷胶形成的凝胶的强度, 几乎不随 pH 变化。

**3.2** 结冷胶为眼用即型凝胶最常用的基质之一, 研究发现<sup>[4]</sup>, 单用结冷胶作为眼用即型凝胶的基质成型性较差, 而羧甲基纤维素钠中的钠盐可参与结冷胶的相转变过程。因此, 优选以羧甲基纤维钠作为凝胶成型辅料可显著增加结冷胶凝胶的强度。

**3.3** 本制剂中的熊胆含有一定量的胆酸类成分, 本研

究发现加入熊胆粉提取物后该制剂仍具有良好的成型性, 可能的原因在于熊胆粉剂量较小, 而其中的阳离子含量也较低, 并未对制剂的成型产生影响。

### 参考文献:

- [1] 孙海燕, 杜兴, 沙红玉. 原位凝胶在滴眼剂中的研究进展[J]. 中国药业, 2005, 14(8): 90-91.
- [2] 师家瑞. 复方熊胆眼药水的研制和临床试用[J]. 临床眼科杂志, 1995, 3(2): 97.
- [3] Hagerstrom H, Paulsson M, Edsman K. Evaluation of mucoadhesion for two polyelectrolyte gels in simulated physiological conditions using a rheological method[J]. Eur J Pharm Sci, 2000, 9(3): 301-309.
- [4] 李海军, 彦震, 朱希强. Gelrite 的研究进展[J]. 食品与药品, 2005, 7(12A): 3-8.
- [5] Balasubramanian J, Kant S, Pandit JK. In vitro and in vivo evaluation of the Gel rite gellan gum-based ocular delivery system for indomethacin [J]. Acta Pharm, 2003, 53(4): 251-261.
- [6] 毕殿州. 药剂学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 119-122.
- [7] 王志钢, 臧琛, 李慧, 等. 丹葛明目即型凝胶的定量测定及体外释放研究[J]. 中成药, 2012, 34(4): 682-685.

(编辑: 邓响潮)

(上接第 551 页) 研究得最早、最成熟的自杀基因疗法, 我们通过建立 tk 基因表达的荧光蛋白示踪系统, 将绿色荧光蛋白和红色荧光蛋白分别作为  $tk^+$  细胞与  $tk^-$  细胞的报告分子, 成功构建了自杀基因旁杀伤效应的检测模型, 可达到对旁杀伤效应的直观观测。此外, 该模型建立后还可与流式细胞术等技术结合, 更可对旁杀伤效应的大小进行精确检测, 为自杀基因旁杀伤效应增效药物的筛选及其机理研究奠定基础。

### 参考文献:

- [1] Bonini C, Bondanza A, Perna SK, et al. The suicide gene therapy challenge: how to improve a successful gene therapy approach[J]. Mol Ther, 2007, 15(7): 1248-1252.
- [2] Portsmouth A, Hlavaty J, Renner M. Suicide genes for cancer therapy [J]. Molecular Aspects of Medicine, 2007, 28(1): 4-41.
- [3] Duarte S, Carle G, Faneca H, et al. Suicide gene therapy in cancer: Where do we stand now?[J]. Cancer Letters, 2012, 324: 160-170.
- [4] 王一涛. 中药抗肿瘤现代研究技术与进展[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012, 10: 76-147.
- [5] 梁健. 肿瘤治疗与进展[M]. 北京: 人民军医出版社, 2013, 3: 139-155.
- [6] Sangro I B, Mazzolini G, Ruiz I M, et al. A phase I clinical trial of thymidine kinase-based gene therapy in advanced hepatocellular

- carcinoma[J]. Cancer Gene Therapy, 2010, 17: 837-843.
- [7] Neschadim A, Wang J, Lavie A, et al. Bystander killing of malignant cells via the delivery of engineered thymidine-active deoxycytidine kinase for suicide gene therapy of cancer [J]. Cancer Gene Therapy, 2012, 19: 320-327.
- [8] Yin X, Yu B, Tang Z, et al. Bifidobacterium infantis-mediated HSV-TK/GCV suicide gene therapy induces both extrinsic and intrinsic apoptosis in a rat model of bladder cancer[J]. Cancer Gene Therapy, 2013, 20: 77-81.
- [9] 杜标炎, 袁静, 谭宇蕙, 等. 六味地黄丸对自杀基因系统治疗黑色素瘤的增效作用[J]. 广州中医药大学学报, 2006, 23(5): 397-402.
- [10] 杜标炎, 张小贺, 谭宇蕙, 等. 六味地黄丸含药血清调控黑色素瘤 B16 细胞株缝隙连接蛋白表达的作用[J]. 广州中医药大学学报, 2009, 26(2): 152-156, 200.
- [11] 张余琴, 林晓琳, 贾俊双, 等. 红色荧光蛋白和荧光素酶双报告基因转基因小鼠的建立[J]. 中国癌症杂志, 2012, 22(5): 321-328.
- [12] Martin PE, Blundell G, Ahmad S, et al. Multiple pathways in the trafficking and assembly of connexin 26, 32 and 43 into gap junction intercellular communication channels[J]. Cancer Science, 2001, 114: 3845-3855.
- [13] 汪茂荣, 张馨, 刘延庆. 荧光蛋白活体成像系统在肿瘤研究中的应用[J]. 临床肿瘤学杂志, 2011, 16(2): 174-178.
- [14] 尹涛, 秦巧平, 张上隆, 等. 利用 GFP/RFP 双荧光指示载体鉴定特异性启动子功能[J]. 生物工程学报, 2008, 24(12): 2106-2110.

(编辑: 修春)