

# 普萘洛尔鼻用制剂的纤毛毒性

蒋新国\*, 张奇志, 张奕, 奚念朱

(上海医科大学药学院生物药剂学研究室, 上海 200032)

**摘要** 目的: 筛选一种合适的剂型以降低鼻用制剂的鼻纤毛毒性。方法: 以盐酸普萘洛尔为模型药物, 分别制备微球剂、复合乳剂和环糊精包合物。以在体蟾蜍上腭粘膜纤毛为动物模型, 评价上述鼻用制剂对盐酸普萘洛尔纤毛毒性的改善作用。结果: 微球剂能有效地降低盐酸普萘洛尔的纤毛毒性; 复合乳剂因包裹率较低, 而环糊精因与药物的结合常数较小, 使这 2 种制剂对纤毛毒性均无明显的改善作用。结论: 微球剂是降低药物鼻纤毛毒性的一种较为理想的剂型, 机理主要是它的缓释作用。

**关键词** 盐酸普萘洛尔; 微球; 复合乳剂; 环糊精包合物; 鼻腔给药; 鼻纤毛毒性

盐酸普萘洛尔 (propranolol hydrochloride, PRO) 为  $\beta$ -受体阻滞剂, 口服给药时有严重的肝脏首过作用, 绝对生物利用度仅 20% 左右。鼻腔给药能有效地避免肝脏首过作用, 绝对生物利用度可提高至近 100%<sup>[1,2]</sup>, 这曾引起广泛关注。但是, 继而发现 PRO 对鼻纤毛有严重的毒性作用, 因而阻碍了这项研究的进一步发展<sup>[3,4]</sup>。目前已发现不少药物有鼻纤毛毒性作用<sup>[5,6]</sup>, 但尚无有效的解决方法。因此, 寻求一种合适的剂型降低药物对鼻纤毛的毒性, 是鼻腔给药研究中一个有价值的研究方向。本文以 PRO 为模型药物, 将其制成微球剂、复合乳剂和环糊精包合物, 以求降低 PRO 的鼻纤毛毒性。

## 材 料 和 方 法

**药品和辅料** 盐酸普萘洛尔 (江苏金坛制药厂)。牛血清白蛋白 (上海实生细胞生物技术有限公司进口分装; 上海伯奥生物科技有限公司国产分装)。GO-32 (BASF 公司), W/O 型乳化剂; A-25 (BASF 公司), O/W 型乳化剂。 $\beta$ -环糊精 ( $\beta$ -CD) (Nihon Shokuhin Kako Co, Ltd.)。药用明胶 (浙江瑞安制药厂), 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP K 30) (上海化学试剂采购供应站进口分装), 蓖麻油 (上海前进试剂厂)。

**仪器和材料** 光学显微镜 (Olympus 光学有限公司), 6511 型电动搅拌机 (上海标本模型厂), 752 C 型紫外分光光度计 (上海第三分析仪器厂), 800 型离心沉淀器 (上海手术器械厂), 恒温振荡器 (上海慈航无线电元件厂)。透析袋, 直径 20 mm, 截留分子量 10 000。

**动物** 中华大蟾蜍, 体重 40~70 g, ♀ ♂ 皆有 (上海医科大学实验动物部提供)。

**PRO 微球的制备** 经均匀设计确定微球的最佳配方为: PRO 200 mg, 牛血清白蛋白 600 mg, 蓖麻油 100 ml。按配方量称取 PRO, 用  $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  HCl 4 ml 超声溶解。加入牛血清白蛋白, 溶胀并溶解后为水相。另取蓖麻油 100 ml, 缓慢滴加上述水相, 边加边搅拌。搅拌速度  $500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 搅拌时间 10 min, 制成初乳。将初乳滴加到预热至  $120^\circ\text{C}$  的蓖麻油中, 边加边搅拌, 搅拌速度  $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 温度  $120^\circ\text{C}$ , 热固化时间 60 min。冷却并离心后倾去油层, 用乙醚洗净残留的蓖麻油及表面药物, 离心后弃去乙醚, 氮气流吹净残留乙醚, 即得干燥粉状微球。

**PRO 复合乳剂的制备** 经正交试验确定复合乳剂的最佳配方。W/O 初乳: 液状石蜡 40 ml, GO-32 10 g, 0.5% 明胶溶液 2.5 ml, 4% PRO 溶液 47.5 ml。复乳: W/O 初乳 50 ml, A-25 0.5 g, 1% PVP 溶液 1 ml, 0.5% NaCl 溶液 48.5 ml。采用两步乳化法制备复乳。按配方量称取 GO-32 和液状石蜡, 混匀后为油相。取明胶溶液和 PRO 溶液, 混匀后为内水相。将内水相慢慢滴加至油相中, 边加边搅拌。搅拌速度  $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 搅拌时间 30

收稿日期: 1998-08-18

基金项目: 国家自然科学基金课题 (39770883)

\* Tel: (021)64041900-2381, Fax: (021)64039987,

E-mail: zhqjiang@shmu.edu.cn

min, 得乳白色稠厚初乳。另取 PVP 溶液和 NaCl 溶液, 混匀后加入乳化剂 A-25 溶解, 为外水相。将初乳慢慢加至外水相中, 边加边搅拌。搅拌速度 1 000 r·min<sup>-1</sup>, 搅拌时间 10 min, 制得复合乳剂。

**PRO 环糊精包合物的制备** 经试验, 确定最佳配方为: PRO 0.4 g, β-CD 3.2 g, 蒸馏水 100 ml。按配方量称取 β-CD, 加至蒸馏水中搅拌溶解。再加入 PRO, 溶解后继续搅拌 4 h, 搅拌速度 1 000 r·min<sup>-1</sup>, 制成 PRO-β-CD 溶液。于上述溶液中加入等体积丙酮, 搅拌并使 PRO-β-CD 析出。沉淀用丙酮 5 ml 洗涤 3 次, 氮气流吹净残留丙酮, 即得环糊精包合物。

**PRO 制剂的鼻纤毛毒性评价** 以蟾蜍上腭粘膜纤毛为动物模型<sup>[5]</sup>, 评价 PRO 制剂的鼻纤毛毒性。将蟾蜍仰卧固定在蛙板上, 使口腔张开, 以止血钳牵拉。分别将各类制剂应用到蟾蜍上腭部位, 保留一定时间后用蒸馏水将药物冲洗干净。用眼科手术剪取下上腭粘膜, 生理盐水洗净后制成显微镜标本, 440 倍光学显微镜下观察纤毛运动情况。

**PRO 微球的体外溶出试验** 取透析袋, 精确装入含一定量 PRO 的微球, 加入生理盐水 1 ml 后将袋口封紧。另取具塞三角烧瓶, 内置生理盐水 25 ml, 预热至 37℃ 后将上述试验样品投入, 于振荡器中适度振摇。按适当时间间隔取样 3 ml, 补充等量生理盐水。用紫外分光光度法(290 nm)测定样品液中 PRO 浓度, 经校正后计算累积释药百分数, 用威布尔方程处理数据, 求算药物释放 50% 的时间 T<sub>50</sub>。此外, 空白微球释放试验证明, 微球材料对测定没有干扰。

## 结 果

### 1 PRO 制剂的主要物理参数

PRO 微球的载药量为 3.80%~4.14%, 粒径为 2.5~10 μm。PRO 复合乳剂的包裹率为 68.15%, 平均粒径 15 μm。

### 2 PRO 制剂的纤毛毒性

PRO 对鼻纤毛有严重的毒性作用, 但若制成一种合适的制剂, 就有可能降低它的毒性。为此我们制备了下列制剂并进行纤毛毒性评价: A. 空白微球; B. PRO 与空白微球的物理混合物, 含药量 4% (w/w); C. PRO 溶液剂, 含药量 1% (w/v); D. 进口牛血清白蛋白制备的 PRO 微球, 载药量 4.14%; E. 国产牛血清白蛋白制备的 PRO 微球, 载药量

3.80%。F. 空白复合乳剂; G. PRO 复合乳剂, 含药量 1%; H. 样品 G 经透析处理后所得; I. β-CD; J. PRO-β-CD 包合物。除空白制剂外, 上述制剂的试验药量均为 2 mg, 纤毛毒性结果见表 1。

**Tab 1 Ciliotoxicity of propranolol preparations for intranasal administration (n = 4)**

Preparation	Contact time of preparations with ciliary / min	Situation of ciliary movement after drug administration
A	240	Ciliary movement was active
B	30	Ciliary movement basically stopped
B	240	Ciliary movement completely stopped
C	5	Ciliary movement completely stopped
D	240	The movement of 60% ciliary was active
E	240	The movement of 70% ciliary was active
F	240	Ciliary movement was active
G	30	Ciliary movement basically stopped
H	30	The movement of 80% ciliary was active
I	240	Ciliary movement was active
J	30	Ciliary movement basically stopped

Preparations: A. Albumin microspheres (AM). B. Physical mixtures of PRO and AM, drug content 4% (w/w). C. PRO solution, drug content 1% (w/v). D. PRO microspheres prepared with imported bovine serum albumin (BSA), drug loading 4.14%. E. PRO microspheres prepared with domestic BSA, drug loading 3.80%. F. Blank multiple-emulsions. G. PRO multiple-emulsions, drug loading 1% (w/v). H. PRO multiple-emulsions disposed by dialysis. I. β-cyclodextrin (β-CD). J. PRO β-CD inclusions.

由表 1 结果可看出, 空白微球、复合乳剂基质以及 β-CD 对纤毛运动均无毒性作用。1% PRO 溶液剂的纤毛毒性最大, 5 min 内已使纤毛运动完全停止。PRO 与空白微球的物理混合物仍有很大毒性, 因为它是以固体粉末形式给药, 药物有一个溶解过程, 因此使毒性作用滞后, 但是在 20~30 min 内已使纤毛运动基本停止, 并且用药 4 h 后也不能恢复。将 PRO 制成微球以后, 纤毛毒性显著下降, 持续给药 4 h 后, 仅有少量纤毛停止运动, 而 60%~80% 的纤毛仍保持在正常的运动状态。因此, 微球制剂能解决 PRO 的鼻纤毛毒性问题。本文制备的复合乳剂及 β-CD 包合物仍不能有效地降低 PRO 的纤毛毒性。

### 3 PRO 微球的体外释药速度与纤毛毒性的关系

在微球剂处方工艺筛选时发现, 并非所有微球剂都能有效地降低 PRO 的纤毛毒性, 不同的处方工艺, 它们的纤毛毒性也不同。究其原因主要与微球中药物的释放速度有关, 为此, 本文制备了下列制剂

并进行体外释药试验:a. 1% PRO 溶液剂; b. 进口牛血清白蛋白微球, 按上述处方工艺制备, 载药量 4.14%; c. 国产牛血清白蛋白微球, 按上述处方工艺制备, 载药量 3.80%; d. 进口牛血清白蛋白微球, 改变处方工艺: 蓖麻油—水为 40:1, PRO—白蛋白为 1:1.7, 热固化时间为 20 min, 载药量为 7.74%; e. 其它条件与 d 相同, 但热固化时间为 60 min, 载药量为 9.05%。上述制剂的体外释药曲线见图 1。

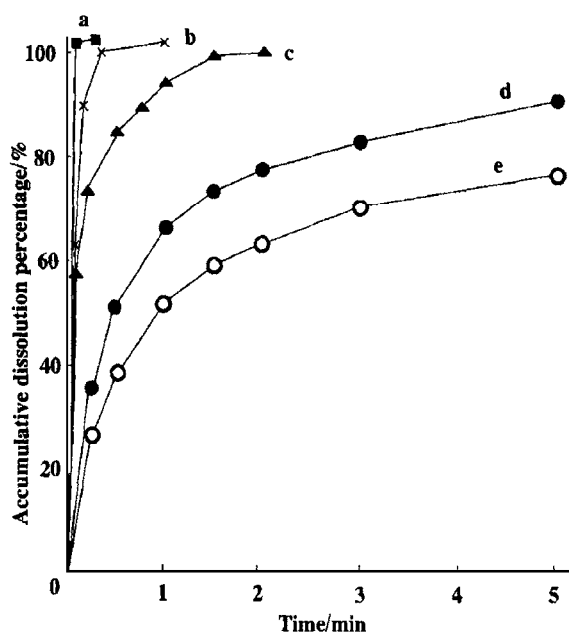


Fig 1 *In vitro* dissolution curves of propranolol microspheres. Preparations: a. 1% PRO solution; b. PRO microspheres (imported BSA), prepared by an emulsification technique using castor oil and water 25:1, PRO and BSA 1:3, stabilized at 120°C for 60 min with drug loading 4.14%; c. PRO microspheres (domestic BSA), all the conditions were the same as b, drug loading 3.80%; d. PRO microspheres (imported BSA), prepared by an emulsification technique, using castor oil and water 40:1, PRO and BSA 1:1.7, stabilized at 120°C for 20 min with drug loading 7.74%; e. PRO microspheres (imported BSA), stabilized at 120°C for 60 min with drug loading 9.05%, other conditions were the same as d.

释药数据分别用威布尔方程、零级方程、单指数方程、双指数方程和 Higuchi 方程拟合, 结果表明, 威布尔方程对上述数据均有较好的拟合优度, 因此统一用威布尔方程求算药物释放 50% 的时间  $T_{50}$ 。  $T_{50}$  与纤毛毒性的关系见表 2。

由表 2 可以看出, 制剂的体外释药速度越快, 其对纤毛的毒性作用也越大。

Tab 2 Relationship between *in vitro* dissolution half-life ( $T_{50}$ ) of propranolol microspheres and its ciliotoxicity ( $n = 4$ )

Preparation	$T_{50}/\text{min}$	Situation of ciliary movement after drug administration
a	< 1	Ciliary movement completely stopped after drug administration for 5 min
b	33.17	The movement of 60% ciliary was active after drug administration for 4 h
c	60.58	The movement of 70% ciliary was active after drug administration for 4 h
d	1.39	Ciliary movement completely stopped after drug administration for 1 h
e	3.18	Ciliary movement completely stopped after drug administration for 1 h

Preparations: a~e of Fig 1.

## 讨 论

PRO 对纤毛的毒性作用与其浓度有关, 浓度越高, 毒性作用越大, 当浓度低于 0.1% 时, 纤毛毒性很微弱, 且呈可逆性<sup>[3]</sup>。基于这一特点, 本研究将 PRO 制成微球剂。由于微球剂有缓释作用, 药物可缓慢持续地被释放, 同时, 药物又能不断地被粘膜吸收, 使粘膜局部游离的药物浓度很低。所以, 制备良好的微球剂可大大减轻 PRO 的纤毛毒性, 持续用药 4 h 后, 大部分纤毛仍保持正常的运动状态。另据报道<sup>[7]</sup>, PRO 制成微球剂后, 其鼻腔给药的生物利用度仍显著高于口服给药。

复合乳剂也有缓慢的释药作用, 但因本文制备的复乳包裹率太低 (68.15%), 因此, 外水相中的药物浓度仍在 0.6% 左右, 故纤毛毒性严重, 持续用药 30 min 后, 纤毛运动已完全停止。但用透析法除去外水相中 PRO 以后, 纤毛毒性有明显降低。说明将 PRO 包裹在复乳的内水相后可消除它的纤毛毒性, 复合乳剂降低纤毛毒性的关键是提高包裹率。如包裹率达到 90% 以上时, 外水相中的药物浓度低于 0.2%, 纤毛毒性很微弱。而制备良好的复合乳剂能达到这一要求<sup>[8]</sup>, 因此, 通过改进制备工艺, 复合乳剂也有可能解决 PRO 的纤毛毒性问题。

环糊精已被用来降低脂溶性粘膜吸收促进剂的纤毛毒性<sup>[9,10]</sup>, 它的前提是主客分子间应有较大的结合常数。由于 PRO 与环糊精的结合常数较小, 因此, 游离的药物浓度仍很高, 包含物的纤毛毒性仍很严重。本文在这方面仅作了初步的探索。

蟾蜍上腭粘膜纤毛是评价药物对鼻纤毛毒性的

一种常用方法。通常,药物与纤毛的接触时间掌握在 15~45 min<sup>[11]</sup>,原因是一般剂型在鼻腔中的滞留时间只有 15~30 min。由于微球剂等生物粘附性,鼻腔中的滞留时间可延长至 3~4 h,因此,本文在评价纤毛毒性时,制剂与药物的接触时间定为 4 h。

### 参 考 文 献

- Hussain AA, Hirai S, Bawarshi R. Nasal absorption of propranolol in rats. *J Pharm Sci*, 1979, **68**:1196
- Hussain AA, Hirai S, Bawarshi R. Nasal absorption of propranolol from different dosage forms by rats and dogs. *J Pharm Sci*, 1980, **69**:1411
- Donk HJM, Merkus FWHM. Decreases in ciliary beat frequency due to intranasal administration of propranolol. *J Pharm Sci*, 1982, **71**:595
- Duchateau GSMJE, Zuidema J, Hermens WAJJ, *et al.* *In vitro* ciliotoxicity of propranolol isomers. *Int J Pharm*, 1986, **31**:275
- 蒋新国,崔景斌,方晓玲,等.药物的鼻粘膜纤毛毒性及评价方法. *药理学报*, 1995, **30**:848
- Longenecker JP, Moses AC, Flier JS, *et al.* Effects of sodium taurodihydrofusidate on nasal absorption of insulin in sheep. *J Pharm Sci*, 1987, **76**:351
- Vyas SP, Bhatnagar S, Gogoi PJ, *et al.* Preparation and characterization of HSA-propranolol microspheres for nasal administration. *Int J Pharm*, 1991, **69**:5
- 奚念朱主编. *药剂学*. 第 3 版. 北京:人民卫生出版社, 1994. 114~115
- De Ponti R, Martini A, Crivellente M, *et al.* Lowering of toxicity using cyclodextrins in combination with nasal enhancers *in vitro* and *in vivo* studies. *Minutes Int Symp Cyclodextrins. The 6th International Symposium of Cyclodextrins*. Paris: Allan RH, 1992. 514~521
- Gill IJ, Illum L, Farraj N, *et al.* Cyclodextrins as protection agents against enhancer damage in nasal delivery system. *Eur J Pharm Sci*, 1994, **1**:229
- Schipper NGM, Verhoef J, Romeijn SG, *et al.* Absorption enhancers in nasal insulin delivery and their influence on nasal ciliary functioning. *J Controlled Release*, 1992, **21**:173

## CILIOTOXICITY OF PROPRANOLOL PREPARATIONS FOR INTRANASAL ADMINISTRATION

Jiang Xinguo (Jiang XG), Zhang Qizhi (Zhang QZ), Zhang Yi (Zhang Y) and Xi Nianzhu (Xi NZ)

(Division of Biopharmaceutics, School of Pharmacy, Shanghai Medical University, Shanghai 200032)

**ABSTRACT AIM:** To screen a suitable dosage form for reducing ciliotoxicity of intranasal preparations. **METHODS:** Propranolol hydrochloride (PRO) was selected as a model drug and microspheres, multiple-emulsions and cyclodextrin inclusions for intranasal administration were prepared. The effect of the above preparations on ciliary movement was evaluated with *in situ* toad palate model. **RESULTS:** The microspheres were shown to be able to reduce the ciliotoxicity of PRO, but multiple-emulsions and cyclodextrin inclusions in this research were found to be inefficient because the embedding rate of the multiple-emulsions was low and the binding constant between PRO and cyclodextrin was small. **CONCLUSION:** The microspheres are an ideal dosage form for reducing ciliotoxicity and the involved mechanism is the sustained release effect of the microspheres.

**KEY WORDS** propranolol hydrochloride; microspheres; multiple-emulsions; cyclodextrin inclusions; intranasal administration; ciliotoxicity