

# cremophor RH40 及 labrafil M 1944 CS 的鼻黏膜毒性考察

孟亚飞<sup>1</sup>, 张伟玲<sup>1</sup>, 李彤彤<sup>2</sup>, 王亚静<sup>1\*</sup>, 郑银<sup>1</sup>, 张曦<sup>2</sup>

(1. 天津中医药大学现代中药发现与制剂技术教育部工程研究中心, 天津 300193;  
2. 天津市中央药业有限公司, 天津 300400)

**[摘要]** 目的:考察乙醇-油酸聚乙二醇甘油酯(labrafil M 1944 CS)和聚氧乙烯氢化蓖麻油 40(cremophor RH40)的鼻黏膜毒性,探讨其在鼻腔给药系统中应用的可行性。方法:以山梨糖醇酐油酸酯(span-80)和聚山梨酯-80(tween-80)为参比,采用在体蟾蜍上腭模型,光学显微镜下观察纤毛持续运动时间,考察 cremophor RH40 和 labrafil M 1944 CS 的纤毛毒性作用;运用家兔红细胞溶血试验,考察 cremophor RH40 和 labrafil M 1944 CS 对细胞膜完整性的影响。结果:体积分数为 1% 时,4 种表面活性剂对纤毛运动的影响顺序为 cremophor RH40 < labrafil M 1944 CS < tween-80 < span-80; cremophor RH40 的细胞膜毒性最小, tween-80 和 span-80 次之,而 labrafil M 1944 CS 的影响最大; cremophor RH40 对细胞膜完整性无影响用量为 tween-80 和 span-80 的 15 倍。结论:在一定体积分数下 cremophor RH40 的鼻黏膜毒性作用较小,可应用于鼻腔给药制剂的研制。

**[关键词]** 鼻腔给药系统; 鼻黏膜毒性; 乙醇-油酸聚乙二醇甘油酯; 聚氧乙烯氢化蓖麻油 40

**[中图分类号]** R283.6; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)20-0020-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfx.2014200020

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140829.1412.008.html>

**[网络出版时间]** 2014-08-29 14:12

## Evaluation of Nasal Mucosa Toxicity of Cremophor RH40 and Labrafil M 1944 CS

MENG Ya-fei<sup>1</sup>, ZHANG Wei-ling<sup>1</sup>, LI Tong-tong<sup>2</sup>, WANG Ya-jing<sup>1\*</sup>, ZHENG Yin<sup>1</sup>, ZHANG Xi<sup>2</sup>

(1. Engineering Research Center of Modern Chinese Medicine Discovery and Preparation Technique, Ministry of Education, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China;

**[收稿日期]** 20140222(006)

**[基金项目]** 国家“重大新药创制”科技重大专项(2012ZX09304007);天津市科技特派员项目(201306)

**[第一作者]** 孟亚飞,在读硕士,从事药物制剂设计及新药开发研究, Tel:13821319069, E-mail:myf916@sina.com

**[通讯作者]** \*王亚静,副研究员,从事药物制剂设计及新药开发研究, Tel:022-59596169, E-mail:yajing022@163.com

采用凝胶过滤法测定脂质体的包封率,该法操作简单、快捷、药物分离效果较好。

### [参考文献]

- [1] 高正航,李卫东. 长春花生物碱类药物研究概述[J]. 贵州农业科学, 2005, 33(6):94.
- [2] Meyer O, Kirpotin D, Hong K, et al. Cationic liposomes coated with polyethylene glycol as carriers for oligonucleotides[J]. Int J Pharm, 1998, 273(25):15621.
- [3] Sorgi F L, Leaf H. Large scale production of DC-CHol cationic liposomes by microfluidization[J]. Int J Pharm, 1996, 144(2):131.
- [4] 谭静净,程岚,李学涛. 中心组合设计-效应面法优化长

春碱亲水基修饰阳离子脂质体的处方[J]. 中草药, 2012, 43(9):1742.

- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 二部[S]. 北京:化学工业出版社, 2005;附录 181.
- [6] 李海刚,王东凯. 注射用克拉霉素脂质体的制备及其包封率的测定[J]. 中国抗生素杂志, 2006, 31(10):635.
- [7] 鲁会侠,冯锁民. 紫杉醇脂质体药物包封率的测定[J]. 中国新药杂志, 2007, 16(10):778.
- [8] 闫颖,齐荣荣. 以叶酸受体为靶向的阳离子脂质体的制备与性质考察[J]. 药学学报, 2008, 43(11):1134.

[责任编辑 刘德文]

2. Tianjin Central Pharmaceutical Co. Ltd, Tianjin 300400, China)

**[Abstract]** **Objective:** Nasal mucosa toxicity of cremophor RH40 and labrafil M 1944 CS were investigated, in order to explore feasibility of their application in nasal drug delivery system. **Method:** Compared with span-80 and tween-80, safety of surfactant was evaluated by testing cilia movement of *in situ* toad palate model and hemolysis test of erythrocyte membrane in rabbits. **Result:** When concentrations of these four kinds of surfactants were 1%, their effect on cilia movement was in order of cremophor RH40 < labrafil M 1944 CS < tween-80 < span-80. By survey of toxic effects on cell membranes, cremophor RH40 had little cell membrane toxicity, tween-80 and span-80 had moderate cell membrane toxicity, but labrafil M 1944 CS had serious cell membrane toxicity. Dosage of cremophor RH40 that had no effect on integrity of cell membrane was 15 times the amount of tween-80 and span-80. **Conclusion:** Cremophor RH40 has little toxic effect on nasal mucosa under a certain range of concentration that can be applied in nasal drug delivery system.

**[Key words]** nasal drug delivery system; toxicity of nasal mucosa; labrafil M 1944 CS; cremophor RH40

鼻腔给药系统是药物与鼻黏膜表面接触,通过该处上皮细胞进入循环系统发挥药效的一类制剂,具有吸收迅速、起效快、避免首过效应及实现脑靶向等优点。鼻腔作为一个重要的功能性器官,对外来物质的刺激十分敏感,有些药物或辅料会对鼻黏膜组织产生毒性作用,影响纤毛正常清除作用及黏液的分泌,甚至引起黏膜形态的改变,严重影响鼻腔的正常生理功能,因此,鼻用辅料的开发及其鼻黏膜毒性评价成为了鼻腔给药制剂研究中重要任务之一。

聚氧乙烯氢化蓖麻油 40 和乙醇-油酸聚乙二醇甘油酯为新型表面活性剂,在非鼻给药制剂研究中乳化、增溶及药物促渗等方面具备优越性能<sup>[1-3]</sup>。本实验采用在体蟾蜍上腭模型及家兔血细胞溶血试验考察这两种新型表面活性剂的鼻黏膜纤毛和黏膜组织毒性,并与现行鼻用制剂中常用的非离子表面活性剂聚山梨酯-80 和山梨糖醇酐油酸酯进行比较,探讨二者在鼻腔给药系统研究中应用的可行性,为鼻腔给药系统的辅料选择提供更多参考。

## 1 材料

CH30 型光学显微镜(日本 Olympus 公司),SPY-2 型渗透压测定仪(天津市天大天发科技有限公司),UV-2800H 型紫外分光光度计(上海尤尼柯有限公司)。

聚山梨酯-80(tween-80,天津市化学试剂批发公司),山梨糖醇酐油酸酯(span-80,天津光复精细化工研究所),乙醇-油酸聚乙二醇甘油酯(labrafil M 1944 CS)、聚氧乙烯氢化蓖麻油 40(cremophor RH40)购自德国 BASF 公司,去氧胆酸钠(上海蓝季科技发展有限公司),水为蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

中华大蟾蜍,体重 30 ~ 50 g,雌雄兼有,由北京

蟾业研究中心提供;新西兰家兔,雄性,体重 2.5 kg,由北京沙河通利试验动物养殖厂提供,合格证号 SCXK(京)2010-0004。

## 2 方法与结果

**2.1 供试液的制备** 用生理盐水配制不同浓度的 tween-80, span-80, labrafil M 1944 CS, cremophor RH40 溶液,分别用移液枪吸取 30  $\mu\text{L}$  注入渗透压测定仪测定管中,测定各辅料不同浓度下的渗透压,确定其等渗浓度,以各辅料的等渗溶液为供试液进行鼻黏膜毒性考察。正常血浆渗透压约 280 ~ 320  $\text{mOsmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,与此渗透压近似相等的溶液为等渗溶液。不同体积分数的 4 种表面活性剂渗透压测定结果见表 1,除 0.5% 溶液低渗外,其余各溶液渗透压均与等渗范围接近,故选取 1%, 3%, 6% 共 3 种体积分数的 tween-80, span-80, labrafil M 1944 CS, cremophor RH40 生理盐水溶液作为供试液。

表 1 不同体积分数表面活性剂溶液的渗透压测定

体积分数 /%	渗透压/ $\text{mOsmol}\cdot\text{kg}^{-1}$			
	tween-80	span-80	labrafil M 1944 CS	cremophor RH40
0.5	270	264	255	265
1	284	280	283	306
3	289	297	284	295
6	337	289	292	318

**2.2 纤毛毒性考察**<sup>[4-5]</sup> 将蟾蜍仰卧固定,于上腭黏膜处分别滴加生理盐水,1% 去氧胆酸钠(阳性对照),1% tween-80,1% span-80,1% labrafil M 1944 CS,1% cremophor RH40 供试液各 0.5 mL,使药液完全浸没上腭,接触 30 min 后用生理盐水洗净药物,

分离蟾蜍两眼间的黏膜,面积 3 mm × 3 mm,用生理盐水洗净,黏膜面向上,平铺于载玻片上,于黏膜表面滴加生理盐水 0.2 mL,盖上盖玻片,于 10 × 40 倍光学显微镜下观察纤毛运动情况并记录 1 min 内纤毛摆动频率。随后置于加有少量水的色谱缸中,密闭,使水蒸气近饱和状态,环境温度保持在 20 ~ 25 ℃。每隔适当时间取出,显微镜观察,观察完毕即刻放回色谱缸中,直至纤毛停止运动。记录从开始给药到纤毛完全停止运动所需时间,按公式  $(1 - t_{\text{给药组}}/t_{\text{生理盐水组}}) \times 100\%$  计算相对抑制率,相对抑制率越低,药物的纤毛毒性越小,蟾蜍上腭黏膜纤毛运动持续时间及其相对抑制率见表 2。结果显示 1% 去氧胆酸钠在 30 min 内使纤毛脱落,运动停止。4 种辅料均对纤毛运动存在不同程度的影响,相对抑制率排序为 cremophor RH40 < labrafil M 1944 CS < tween-80 < span-80,其中 labrafil M 1944 CS 与 tween-80 相近,而 cremophor RH40 影响最小,表明其在纤毛毒性方面优于 span-80 和 tween-80。

表 2 不同表面活性剂对纤毛运动的影响

组别	持续时间 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )/min	相对抑制率 /%
生理盐水	722.7 ± 37.4	0
1% 去氧胆酸钠	0	100
1% tween-80	552.3 ± 58.5 <sup>1)</sup>	23.6
1% span-80	484.0 ± 52.4 <sup>2)</sup>	33.0
1% cremophor RH40	626.3 ± 36.8 <sup>1)</sup>	13.3
1% labrafil M 1944 CS	565.3 ± 46.5 <sup>1)</sup>	22.2

注:与生理盐水组相比<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。

### 2.3 细胞膜毒性考察

**2.3.1 溶血试验**<sup>[6-7]</sup> 取成年兔 1 只,耳缘静脉取血约 10 mL,置于肝素钠润洗过的锥形瓶中,用竹签搅拌去除纤维蛋白,加入 10 倍量生理盐水,摇匀,3 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 15 min,除去上清液,沉淀的红血球用生理盐水反复洗涤 2 ~ 3 次,直到上清液不显红色为止,将所得的红细胞制成 2% 生理盐水混悬液。1 ~ 7 号为试验组,8 号为阴性对照,9 号为阳性对照,每管各加入 2% 红细胞生理盐水混悬液 2.5 mL,1 ~ 5 号依次加入 1% 表面活性剂 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mL,6 号加入 3% 表面活性剂 0.5 mL,7 号加入 6% 表面活性剂 0.5 mL,1 ~ 8 号加生理盐水至 5 mL,9 号加水至 5 mL,将各管轻轻摇匀,37 ℃ 水浴保温 1 h。若样品溶液不产生溶血反应,说明其对鼻黏膜的细胞膜基本无毒性作用;反之,若产生溶血反

应,则说明样品溶液有一定的细胞膜毒性,同浓度下溶血现象越明显,膜破坏作用就越大。结果显示阳性对照组产生溶血现象,生理盐水组无溶血现象,4 种表面活性剂的溶血反应结果见表 3。tween-80, span-80 组仅在体积分数 1% 且用量低于 0.2 mL 时不产生溶血;labrafil M 1944 CS 组全部发生溶血;cremophor RH40 组除体积分数 6% 时出现部分溶血外,其余条件下均未产生溶血,对细胞膜完整性无影响,用量为 tween-80 和 span-80 的 15 倍。

表 3 表面活性剂溶血反应 ( $n=3$ )

种类	加入量/mL						
	1% 表面活性剂					3% 表面	6% 表面
	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	活性剂	活性剂
tween-80	-	±	±	±	±	±	±
span-80	-	±	±	±	±	+	+
labrafil M 1944 CS	±	+	+	+	+	+	+
cremophor RH40	-	-	-	-	-	-	±

注:“-”表示不溶血,红细胞全部下沉,上层液体无色澄清;“±”表示部分溶血,溶液澄清红色或棕色,试管底有少量红细胞残留;“+”表示全溶血,溶液澄清红色,试管底无细胞残留。

**2.3.2 细胞膜毒性的剂量依赖性考察** 采用紫外分光光度法测定溶血度<sup>[8]</sup>。量取新鲜水 2.5 mL,加入 2% 红细胞混悬液 2.5 mL,轻轻摇匀,37 ℃ 水浴保温 1 h,取出,3 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 5 min,取上清液于 400 ~ 600 nm 扫描,结果发现血红素最大吸收波长为 575 nm。取 2.3.1 项下各试验组、阴性及阳性对照组溶液,同法处理吸取上清液,于 575 nm 处测定各管溶液的吸光度 ( $A$ )。根据公式  $[(A_{\text{样}} - A_{\text{阴}})/(A_{\text{阳}} - A_{\text{阴}})] \times 100\%$  计算溶血度,以溶血度为纵坐标,表面活性剂(体积分数)用量为横坐标,绘制溶血度-表面活性剂用量曲线,见图 1。结果表明 labrafil M 1944 CS 的溶血度大于 tween-80, span-80,显现了较大的细胞膜毒性;而 cremophor RH40 在不同体积分数及用量下的溶血度均明显低于 tween-80 和 span-80,表明其细胞膜毒性较小。

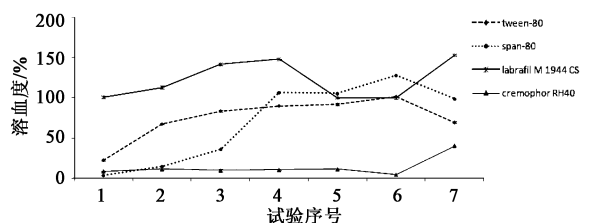


图 1 不同表面活性剂的溶血度-用量曲线 ( $n=3$ )

### 3 讨论

鼻黏膜毒性评价方法主要包括鼻腔黏膜纤毛运动能力考察、鼻腔黏膜形态考察、细胞膜完整性溶血试验及生化评价等<sup>[9]</sup>。采用这些方法评价辅料的鼻黏膜毒性时,各项结果相一致<sup>[10-12]</sup>。本文从考察辅料的鼻纤毛毒性和黏膜组织毒性角度出发,通过测定纤毛持续运动时间和溶血试验来评价辅料的鼻黏膜毒性,其中在体蟾蜍上腭纤毛运动模型为测定纤毛持续运动时间的经典动物模型,该法弥补了体外法的诸多缺点,试验结果更为准确、直观<sup>[13]</sup>;辅料对细胞膜的破坏作用是使鼻黏膜组织受损的原因之一,故选择溶血试验考察辅料对生物膜的作用来评价其鼻黏膜组织毒性作用。为排除渗透压对溶血试验结果的影响,试验中首先对不同浓度的4种辅料渗透压进行测定,以各辅料的等渗溶液进行细胞膜毒性考察。

cremophor RH40 和 labrafil M 1944 CS 均属于非离子表面活性剂,主要作为促渗剂、增溶剂、乳化剂等广泛应用于制剂工艺中,本文通过对这两种辅料的鼻黏膜毒性进行研究,试验结果较为一致,cremophor RH40 的鼻黏膜刺激作用小于 labrafil M 1944 CS, tween-80 和 span-80, 可用于鼻用制剂的制备,应用前景良好。

#### [参考文献]

- [1] 高鹏,涂家生. 聚氧乙烯蓖麻油及其安全性研究进展[J]. 药物与临床研究,2010,18(1):59.
- [2] 陈立江,刘洋,李丽,等. 赤芍总苷自微乳化给药系统的研究[J]. 中草药,2012,43(6):1082.
- [3] 杜利红. 微乳对不同药物增溶及透皮吸收的影响[D]. 天津:天津大学,2010.
- [4] 李楠,叶英杰,杨明,等. 鼻用黄芩苷磷脂复合物原位

凝胶对鼻黏膜的毒性研究[J]. 华西药学杂志,2011,26(5):469.

- [5] 李铭,毕殿洲. 尼莫地平鼻用冻干脂质体的小鼠药理学及纤毛毒性[J]. 中国医药工业杂志,2006,37(9):614.
- [6] Zhang Y, Jiang X G, Yao J. Lowering of sodium deoxycholate-induced nasal ciliotoxicity with cyclodextrins [J]. Acta Pharmacol Sin, 2001, 22(11):1045.
- [7] 张彤,徐莲英,蔡贞贞. 2种实验模型评价5种中药提取物的鼻黏膜毒性[J]. 中国新药与临床杂志,2005,24(9):716.
- [8] 陈新梅,朱家璧,孙卫东,等. 吸收促进剂对人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 鼻腔吸收的促进作用及鼻腔毒性[J]. 药学学报,2006,41(2):149.
- [9] 张奕,蒋新国. 鼻腔给药系统的鼻黏膜毒性及解决途径[J]. 中国医药工业杂志,2001,32(7):323.
- [10] Martin E, Verhoef J C, Romeijn S G, et al. Effects of absorption enhancers on rat nasal epithelium *in vivo*: release of marker compounds in the nasal cavity [J]. Pharm Res,1995,12(8):1151.
- [11] Martin E, Verhoef J C, Romeijn S G, et al. Acute histopathological effects of benzalkonium chloride and absorption enhancers on rat nasal epithelium *in vivo* [J]. Int J Pharm,1996,141(1):151.
- [12] Gill I J, Illum L, Farraj N, et al. Cyclodextrins as protection agents against enhancer damage in nasal delivery systems I: Assessment of effect by measurement of erythrocyte hemolysis [J]. Eur J Pharm Sci, 1994, 1(5):229.
- [13] 蒋新国,崔景斌,方晓玲,等. 药物的鼻黏膜纤毛毒性及评价方法[J]. 药学学报,1995,30(11):848.

[责任编辑 刘德文]