

· 药剂与炮制 ·

## 麝丹眼用即型凝胶的家兔离体角膜渗透特性

王国华, 聂其霞, 臧琛, 张保献\*, 朱琼  
(中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

**[摘要]** 目的:研究麝丹眼用即型凝胶中麝香酮与丹酚酸 B 经家兔离体角膜的渗透特性,为该制剂的开发提供参考。方法:以含 1.0% 聚山梨酯-80 的生理盐水为释放介质,采用 Franz 扩散池法考察麝丹凝胶中麝香酮和丹酚酸 B 经家兔角膜的渗透性;以 2,4-二硝基苯肼为衍生剂,衍生温度 60 ℃,衍生时间 30 min,对麝丹眼用即型凝胶剂家兔离体角膜渗透的接受液进行衍生,采用高效液相色谱法进行梯度洗脱,同时测定接收液中麝香酮、丹酚酸 B 的含量;考察不同 pH 和麝香酮质量分数对麝丹眼用即型凝胶中麝香酮、丹酚酸 B 离体角膜渗透性的影响,绘制累积释药曲线,建立动力学模型,计算表观渗透系数和稳态流量。结果:麝香酮和丹酚酸 B 通过角膜的扩散行为均符合零级动力学特征,麝丹凝胶中麝香酮离体角膜渗透特性对 pH 不敏感,丹酚酸 B 随 pH 降低而渗透速率增大;丹酚酸 B 渗透性随麝香酮质量分数增加而渗透量增加,在麝香酮质量分数为 0.5% 时,麝香酮表观渗透系数  $1.530 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ , 稳态渗透速率  $7.651 \times 10^{-3} \mu\text{g} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ ;在此质量分数下,丹酚酸 B 的表观渗透系数  $1.218 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ , 稳态渗透速率  $6.558 \times 10^{-3} \mu\text{g} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ 。结论:麝香酮可促进麝丹眼用即型凝胶中丹酚酸 B 的角膜渗透,该凝胶中麝香酮最佳用量 0.5%。

**[关键词]** 麝香酮; 丹酚酸 B; 眼用即型凝胶; 离体角膜; 表观渗透系数; 稳态渗透速率; 麝香

**[中图分类号]** R283.6;R945;R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)20-0001-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015200001

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150826.1522.002.html>

**[网络出版时间]** 2015-08-26 15:22

### Isolated Corneal Penetration of Muscone and Salvianolic Acid B in Shedan *in situ* Forming Eye Gels

WANG Guo-hua, NIE Qi-xia, ZANG Chen, ZHANG Bao-xian\*, ZHU Qiong (Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** **Objective:** To provide a reference for development of Shedan *in situ* forming eye gels by investigating isolated corneal penetration of muscone and salvianolic acid B in this preparation. **Method:** Taking physiological saline containing 1% tween-80 as release medium, Franz vertical diffusion cell was adopted to investigate effect of pH and muscone concentration for rabbit cornea permeability of muscone and salvianolic acid B. Release medium was precolumn dedvated with 2, 4-dinitrophenylhydrazine under 60 ℃ for 30 min and was separated by HPLC. Cumulative release curves of muscone and salvianolic acid B were drawn, their kinetics models were established, apparent permeability coefficient and permeation rate of steady state were calculated. **Result:** Diffusion behavior of muscone and salvianolic acid B through cornea were in line with the zero-order kinetics. *In vitro* permeation of muscone was not sensitive to pH, while apparent permeability coefficient of salvianolic acid B increased with pH of Shedan gels decreased. Permeability of salvianolic acid B increased with the concentration of muscone increased. When the concentration of muscone reached 0.5%, apparent permeability coefficient and steady-state flow rate of muscone reached maximum, which were  $1.530 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$  and  $7.651 \times 10^{-3} \mu\text{g} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ , respectively; and those for salvianolic acid B were  $1.218 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$  and  $6.558 \times 10^{-3} \mu\text{g} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ , respectively. **Conclusion:** Muscone can promote corneal permeability of salvianolic acid B in Shedan *in situ* forming eye gels, and its optimum dosage is 0.5%.

**[Key words]** muscone; salvianolic acid B; *in situ* forming eye gels; isolated cornea; apparent permeability coefficient; permeation rate of steady state; Moschus

**[收稿日期]** 20150409(010)

**[基金项目]** 国家药典委员会 2015 年版《中国药典》科研课题(1191)

**[第一作者]** 王国华, 硕士, 助理研究员, 从事中药眼部给药系统研究, Tel:010-84014127, E-mail:sdwgh.2002@163.com

**[通讯作者]** \* 张保献, 硕士, 研究员, 从事中药新剂型与新型给药系统研究, Tel:010-84014127, E-mail:zhangbaoxian925@163.com

麝丹眼用即型凝胶为自拟方,由麝香和丹参 2 味药材组成,两者均具有扩张动脉血管、活血化瘀的功效。麝香酮、丹酚酸 B 分别是这 2 味药的主要有效成分之一<sup>[1]</sup>,将两者配伍用于治疗视网膜静脉阻塞具有良好的开发前景。

角膜屏障、泪液的分泌及眨眼等眼部生理活动使普通滴眼液在结膜囊内滞留时间短,药物难透过角膜,致使药物眼内生物利用度很低,研究常采用增黏剂、促渗剂来改善药物与角膜的接触时间和角膜通透性,从而提高药物在眼部的生物利用度<sup>[2]</sup>。眼用即型凝胶是一种在体外为高分子溶液或亲水溶胶,在眼部生理条件下能迅速形成半固体凝胶剂,兼有滴眼液给药方便、剂量准确及角膜滞留时间长等优点<sup>[3]</sup>。麝香是传统眼用制剂的常见药物,《秘传眼科龙木论》记载“凡点眼之药多用脑麝开窍之品”<sup>[4]</sup>,提示麝香可能具有促进药物吸收的功效。本实验采用改良的扩散池法考察麝丹凝胶中麝香酮和丹酚酸 B 经家兔角膜的渗透性,为该制剂的开发、麝香与丹参配伍用于眼部给药提供参考。

## 1 材料

2690 型高效液相色谱仪(2487 型紫外检测器,美国 Waters 公司),TT-6 双杯型透皮吸收扩散仪(天津市正通科技有限公司),24 孔干式氮吹仪(北京北分天普仪器技术有限公司)。丹参总酚酸提取物(丹酚酸 B 质量分数 51.2%,自制),麝香酮、丹酚酸 B 对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110719-200512,11562-201102),泊洛沙姆 407 和泊洛沙姆 188(德国 BASF 公司),乙腈为色谱纯,水为高纯水,其他试剂均为分析纯。

日本大耳白兔,(2.0 ± 0.2) kg,普通级,购自北京昌扬西山养殖场,合格证号 SCXK(京)2011-0010。

## 2 方法与结果

**2.1 麝丹眼用即型凝胶的制备** 称取丹参总酚酸提取物 1.00 g,加入吉斐氏缓冲液 80 mL,加热使其溶解,置于冰箱中 4 °C 冷藏,取出过 5 μm 微孔滤膜,加入泊洛沙姆 407 18 g 和泊洛沙姆 188 5 g,4 °C 冷藏使溶解;另取相应质量麝香酮,加适量聚山梨酯-80 溶解,加至上述凝胶溶液中,搅拌均匀,加吉斐氏缓冲液至 100 mL,100 °C 流通蒸汽灭菌,即得。

### 2.2 角膜渗透试验<sup>[5]</sup>

**2.2.1 离体角膜的制备** 取日本大耳白兔,耳缘静脉注射空气致死,从双侧眼角处破开眼眶,突出眼球,剪断动眼肌及视神经丛,摘除眼球,冲去表面附

着的血块,置于 34 °C 的林格氏液中,清除巩膜表面的动眼肌及睑结膜等附属组织,由视神经丛向前剖开眼球,至距角膜边缘 2 mm 的巩膜处做横切,分离角膜。除去晶状体、玻璃体等眼球后部组织,用眼科镊子轻轻剥离虹膜、睫状体,得到带有 2 mm 巩膜环的角膜,用生理盐水淋洗 3 次备用。整个手术过程应极其小心,避免接触角膜表面造成损伤。

**2.2.2 角膜渗透试验** 在接收池中加入含 1% 聚山梨酯-80 的生理盐水,使液面与接收池上缘平齐并稍有突出,将离体角膜小心覆盖在液面上,固定供给池于角膜上,角膜上皮面向供给池(内径 0.9 cm)。在角膜上滴入麝丹凝胶 0.1 mL 后,将渗透装置置于恒温磁力搅拌器中,温度(34.5 ± 0.5) °C。供给池与接收池开口用膜封严,防止蒸发。给药后分别在 60,90,120,150,180,240 min 取样 2.5 mL,同时补加等温度含 1% 聚山梨酯-80 的生理盐水 2.5 mL。

### 2.3 麝香酮和丹酚酸 B 的含量测定

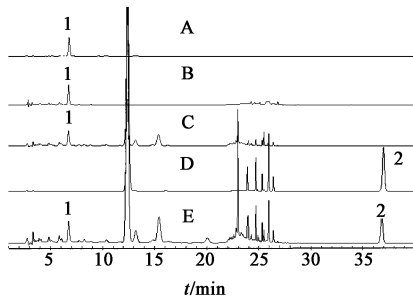
**2.3.1 色谱条件** Kromasil-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),流动相乙腈(A)-1.5% 甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0 ~ 10 min,25% A;10 ~ 15 min,25% ~ 95% A;15 ~ 40 min,95% A;40 ~ 45 min,95% ~ 25% A),检测波长 360 nm,流速 1 mL · min<sup>-1</sup>,柱温 35 °C。

**2.3.2 标准曲线的制备** 分别精密称取丹酚酸 B 和麝香酮 7.48,5.02 mg,置于同一 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,制成质量浓度分别为 0.748,0.502 g · L<sup>-1</sup> 的混合对照品溶液。精密量取该混合对照品溶液 0.1,0.2,0.4,0.8,1.0 mL,分别置于 100 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,得系列对照品溶液。按 2.3.1 项下色谱条件测定,以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,得麝香酮、丹酚酸 B 回归方程分别为  $Y = 4.588 \times 10^4 X + 523$  ( $R^2 = 0.9999$ ), $Y = 2.638 \times 10^3 X - 29.97$  ( $R^2 = 0.9999$ ),线性范围分别为 0.502 ~ 5.02,0.748 ~ 7.48 mg · L<sup>-1</sup>。

**2.3.3 供试品溶液的制备** 取 2.2.2 项下角膜渗透接收液至 10 mL 量瓶中,加入乙醇 7 mL,加入 2,4-二硝基苯肼盐酸试液 0.25 mL<sup>[6]</sup>,加乙醇稀释至刻度,摇匀,在 60 °C 水浴中衍生 30 min,用氮吹仪吹干,加适量乙醇溶解并转移至 2 mL 量瓶中,摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

**2.3.4 专属性试验** 按 2.1 项下方法分别制备缺麝香、缺丹参的空白凝胶,按 2.2.2 项下方法分别制备缺麝香和缺丹参的空白溶液。按 2.3.1 项下条件

进样,记录色谱图,见图 1。结果显示麝丹凝胶中麝香酮、丹酚酸 B 和其他组分达到了基线分离,峰形对称,且空白凝胶无干扰,专属性好。



A. 对照品; B. 丹参总酚酸提取物; C. 缺麝香凝胶; D. 缺丹参凝胶(麝香酮对照品); E. 供试品; 1. 丹酚酸 B; 2. 麝香酮(麝香酮衍生物)

图 1 麝丹眼用即型凝胶 HPLC

Fig. 1 HPLC of Shedan *in situ* forming eye gels

**2.3.5 精密度考察** 取同一对照品溶液,分别在 24 h 内按 2.3.1 项下条件连续测定 6 次,计算麝香酮、丹酚酸 B 峰面积的日内精密度 RSD 分别为 0.8%、0.5%;连续测定 6 d,每天 1 次,计算麝香酮、丹酚酸 B 峰面积的日间精密度 RSD 依次为 1.6%、2.2%。表明仪器精密度良好。

**2.3.6 稳定性试验** 取同一角膜渗透接收液,分别在 2, 4, 6, 8, 10, 24 h 按 2.3.1 项下条件测定,计算麝香酮和丹酚酸 B 含量的 RSD 分别为 1.7%、2.7%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

**2.4 麝香酮与丹酚酸 B 的表观渗透系数、稳态流量与渗透曲线** 按 2.2 项下方法进行离体角膜渗透试验,按 2.3 项下方法测定接收液中麝香酮和丹酚酸 B 的含量,计算麝香酮、丹酚酸 B 的表观渗透系数( $P_{app}$ )和稳态渗透速率( $J_{ss}$ )<sup>[7]</sup>,绘制累积渗透量-时间曲线。

$$Q_n = V_n C_n + V \sum_{i=1}^{n-1} C_i$$

$$P_{app} = \frac{\Delta Q}{\Delta t \cdot C_0 \cdot A \cdot 60}; J_{ss} = C_0 \cdot P_{app}$$

式中  $Q$  为单位面积累积透过量,  $C_n$  为  $t$  时间药物的质量浓度,  $C_i$  为  $t$  时间前的质量浓度,  $V_0$  为接受池中溶液体积,  $V$  为取样体积,  $C_0$  为供给池初始药物质量浓度,  $A$  为有效透过面积,  $\Delta Q/\Delta t$  为累积透过量-时间曲线稳态部分的斜率。

**2.5 不同 pH 麝丹凝胶对角膜水化值的影响**<sup>[7]</sup>

取 2.2.1 项下离体角膜,去除巩膜环,称定质量,记为  $W_b$ ,分别置于 pH 为 4.66, 5.90, 6.62, 7.23, 7.81, 8.47 的吉斐氏缓冲液中,放置 6 h 后取出,60 °C 干燥 12 h 后称重,记为  $W_a$ ,按  $H = (W_b - W_a)/W_b$

计算角膜水化值( $H$ )分别为  $(84.8 \pm 2.32)\%$ ,  $(81.2 \pm 0.81)\%$ ,  $(79.5 \pm 1.37)\%$ ,  $(78.4 \pm 1.84)\%$ ,  $(80.9 \pm 2.01)\%$ ,  $(81.7 \pm 2.48)\%$ 。

**2.6 不同 pH 对麝香酮、丹酚酸 B 离体角膜渗透的影响** 分别用 pH 为 4.66, 5.90, 6.62, 7.23, 7.81, 8.47 的吉斐氏缓冲液按 2.1 项下方法制备麝丹凝胶,按 2.2.2 项下方法进行角膜渗透试验,按 2.3 项下方法测定,绘制累积释放量-时间曲线,见图 2, 3。结果显示经过一段短暂的时滞,麝香酮和丹酚酸 B 以恒定的速率透过离体角膜,达稳态后,累积药物透过量与时间呈良好的线性关系( $R^2 > 0.98$ ),表明麝香酮和丹酚酸 B 通过角膜的扩散行为符合零级动力学特征;麝丹凝胶中麝香酮离体角膜渗透特性对 pH 不敏感,丹酚酸 B 随 pH 降低而渗透速率增大。

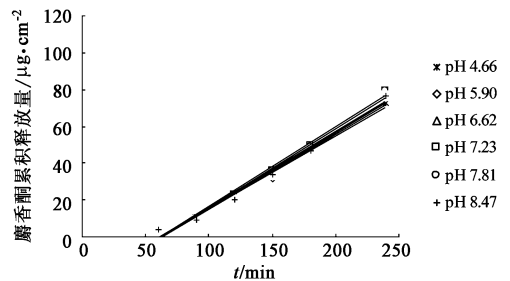


图 2 不同 pH 条件对麝丹凝胶中麝香酮经离体角膜渗透的影响

Fig. 2 Permeation of muscone in Shedan gels through isolated cornea with different pH treatment

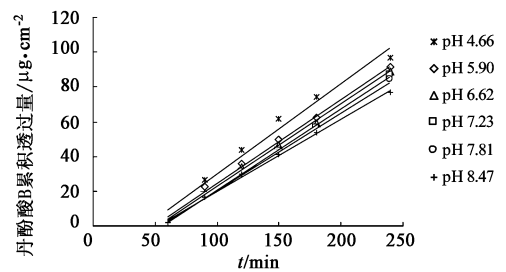


图 3 不同 pH 条件对麝丹凝胶中丹酚酸 B 经离体角膜渗透的影响

Fig. 3 Permeation of salicylic acid B in Shedan gels through isolated cornea with different pH treatment

**2.7 麝香酮浓度对离体角膜渗透的影响** 分别称取丹参总酚酸、麝香酮适量,按 2.1 项下方法制备麝丹凝胶剂(每份含 0.50% 丹酚酸 B,麝香酮质量分数分别为 0.25%、0.50%、0.75%、1.00%)。按 2.2.2 项下方法进行离体角膜渗透试验,按 2.3 项下方法测定,计算麝香酮和丹酚酸 B 的累积渗透量,绘制累积释放量-时间曲线,见图 4, 5。结果显示丹酚酸 B 渗透性随麝香酮质量分数增加而渗透量增加。当麝香酮质量分数 0.5% 时,麝香酮的  $P_{app}$

最大 ( $1.530 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ ),  $J_{ss} 7.651 \times 10^{-3} \mu\text{g} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ ; 在此质量分数下, 丹酚酸 B 的  $P_{app} 1.218 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ ,  $J_{ss} 6.558 \times 10^{-3} \mu\text{g} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ 。

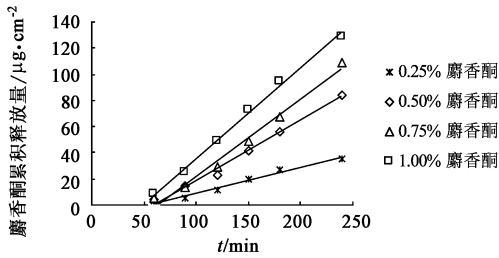


图 4 不同质量分数麝香酮对麝丹凝胶中麝香酮离体角膜渗透影响  
Fig. 4 Permeation of muscone in Shedan gels through isolated cornea with different concentration of muscone

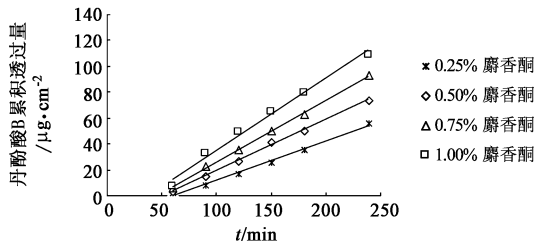


图 5 不同质量分数麝香酮对麝丹凝胶中丹酚酸 B 离体角膜渗透影响  
Fig. 5 Permeation of salvianolic acid B in Shedan gels through isolated cornea with different concentration of muscone

### 3 讨论

文献报道角膜保存在谷胱甘肽-碳酸氢钠林格氏液<sup>[7]</sup>中 6 h 内生理活性无变化。在既往的药物家兔离体角膜渗透试验中, 多用谷胱甘肽-碳酸氢钠林格氏液作为接收液, 本文曾用含谷胱甘肽的林格氏液作为接收液, 但检测不到麝香酮, 选择合适的接收液是研究难点。角膜水化值是体外评价物质对该组织刺激性的重要指标<sup>[8]</sup>, 正常角膜的水化值 76% ~ 80%, >83% 的水化值即可判定角膜受到一定程度的损伤。实验过程中发现, 角膜在含 1% 聚山梨酯-80 的生理盐水中, 6 h 内外观没有变化, 角膜水化值 <83%, 而麝香酮和丹酚酸 B 在该接收液中有适宜的溶解度, 能满足扩散实验的漏槽条件, 故采用含 1% 聚山梨酯-80 的生理盐水作为接收液。

药物的理化性质, 如脂溶性、离子化程度均影响角膜透过程和角膜透过率, 弱酸性或弱碱性药物的透过性取决于它们在滴眼液、最终在泪液中离解型和非离解型药物的动态平衡, 非解离型药物一般比离解型药物易透过脂质膜<sup>[9]</sup>。麝丹眼用即型凝胶的家兔角膜离体渗透试验显示, 随着 pH 降低, 丹

酚酸 B 的角膜透过性增加, 这与丹酚酸 B 在低 pH 下的解离度减小, 油水分布系数增大, 即脂溶性增强有关。李珊珊<sup>[10]</sup>测定了不同 pH 下丹酚酸 B 的油水分布系数, 丹酚酸 B 的油水分配系数随着 pH 的增大而减小, 在 pH 5.0 左右降到最低, 之后减幅平缓, 考虑到眼部对 pH 的耐受性为 pH 4.8 ~ 8.5<sup>[11]</sup>, 因此宜选择 pH 5 ~ 7。

开窍药能透过或开放血脑屏障, 促使其他药物通过血脑屏障, 有“引药”之意<sup>[12]</sup>, 《本草经疏》记载麝香“其香芳烈, 为通关利窍之上药”。中医传统眼科用药多含麝香、冰片等开窍药, 已有文献报道冰片可促进药物的眼部吸收<sup>[13]</sup>, 麝香酮促进药物的眼部吸收鲜有报道, 麝丹眼用即型凝胶的家兔角膜离体渗透试验结果显示, 麝香酮可促进丹酚酸 B 经家兔角膜的渗透性, 为麝香酮与丹参配伍用于眼部给药提供依据。

### [参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 70-71, 361-362.
- [2] 吴纯洁. 葛根素眼用新型给药系统的研究[D]. 成都: 四川大学, 2005.
- [3] 李素霞, 曹德英, 王刚. 眼用即型凝胶的研究进展[J]. 中国医院药学杂志, 2008, 28(3): 228-230.
- [4] 接传红, 高健生. 秘传眼科龙木论[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 10.
- [5] 梁丽娜, 唐由之, 周尚昆, 等. 双秦眼用凝胶对家兔眼部刺激性及抗单疱病毒性角膜炎作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(22): 236-239.
- [6] 柯雪红, 蒙治康, 莫镇涛, 等. 醒神喷鼻液质量标准研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(15): 76-79.
- [7] Rojanesekul Y, Robinson J R. Transport mechanisms of the cornea: Characterization of barrier permselectivity[J]. Int J Pharm, 1989, 55(2/3): 237-246.
- [8] Safrtone M F, Chetoni P, Cerbai R, et al. Evaluation of ocular permeation enhancers; In vitro effects on corneal transport of four  $\beta$ -blockers, and in vitro/in vivo toxic activity[J]. Int J Pharm, 1996, 142(1): 103-113.
- [9] 陆彬. 药物新剂型与新技术[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 599.
- [10] 李珊珊. 丹酚酸 B 角膜透过性及眼用新型给药系统的实验研究[D]. 昆明: 云南中医学院, 2012.
- [11] 侯惠民, 王浩, 张光杰. 药用辅料应用技术[M]. 2 版. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 383.
- [12] 刘岩, 姚洪武, 杨伟峰, 等. 开窍药对血脑屏障影响的实验研究进展[J]. 辽宁中医杂志, 2009, 36(4): 659-661.
- [13] 王灿. 冰片对中医眼科外用药促渗作用的研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2002, 8(6): 46-54.

[责任编辑 刘德文]