

# 维生素 B<sub>12</sub>滴鼻剂的鼻粘膜纤毛毒性评价研究

杨建红, 张钧寿<sup>\*</sup>, 刘铁钢

(河北省药品检验所, 石家庄 050011; 中国药科大学药剂学教研室, 南京 210009)

**摘要** 目的: 研究维生素 B<sub>12</sub>滴鼻剂中维生素 B<sub>12</sub>原料及附加剂——4种鼻粘膜吸收促进剂、4种高分子材料、2种防腐剂及2种等渗剂对鼻粘膜纤毛运动的影响。方法: 在体蟾蜍上腭模型法。结果: 维生素 B<sub>12</sub>原料、1% PV P溶液、1% HPM C溶液、0.8% MC溶液、0.05% CP溶液、0.01% 新洁尔灭溶液、0.05% EDTA溶液、2.56% 甘油溶液、5.3% 甘露醇溶液、2%  $\beta$  环糊精混悬液对纤毛运动均无明显影响; 1.8% 氮酮混悬液、5% 吐温-80溶液、枸橼酸盐缓冲液对纤毛运动有一定影响。结论: 维生素 B<sub>12</sub>与适宜附加剂组合制成鼻腔给药制剂是可行的。

**关键词** 维生素 B<sub>12</sub>; 附加剂; 鼻腔给药; 纤毛毒性

中图分类号: R977.29 文献标识码: A 文章编号: 1000-5048(2002)02-0107-03

鼻腔给药系统对鼻腔纤毛毒性是影响鼻腔给药的重要因素,这种影响决定了病人对药物的接受程度和鼻腔给药的疗效<sup>[1]</sup>。鼻腔粘膜表面覆盖着一层柱状纤毛,正常情况下,纤毛协调一致地摆动,可清除进入鼻腔的异物及微生物,起到保护作用。鼻腔给药后,纤毛运动常会受到不同程度的影响,某些药物甚至可使纤毛运动不可逆的停止<sup>[2]</sup>。因此研究药物及附加剂对鼻粘膜纤毛的影响,是鼻腔给药制剂处方设计中一项重要的基础研究。文献<sup>[1,2]</sup>归纳和比较了药物及附加剂鼻粘膜纤毛毒性的评价方法及选用的动物模型,指出在体蟾蜍上腭模型法适用范围广、准确性高,为一种较理想的方法。

我们欲研制维生素 B<sub>12</sub>滴鼻剂以替代维生素 B<sub>12</sub>注射剂,用于恶性贫血的治疗,故对维生素 B<sub>12</sub>原料及附加剂——鼻粘膜吸收促进剂、增稠剂(高分子材料)、防腐剂、等渗剂等进行鼻粘膜纤毛毒性考察,为维生素 B<sub>12</sub>滴鼻剂的处方设计提供依据。

## 1 材料与仪器

### 1.1 实验药品

维生素 B<sub>12</sub>原料(石家庄制药集团威可达制药有限公司),卡波姆 CP(934p, The BFGoodrich CO.),甲基纤维素 MC(粘度大于3万,泰安瑞泰纤维素有限公司),羟丙基甲基纤维素 HPM C(药

用,天津市爱勒易医药材料科技有限公司),聚乙烯吡咯烷酮 PV P(药用,河南玉源化学工业有限公司焦作市开源制药厂), $\beta$  环糊精(华北地区特种化学试剂开发中心,化学纯),吐温-80(药用,天津市化学试剂三厂),氮酮(河北省井陉县虎头山化工厂),新洁尔灭(药用,河南省平顶山市朝阳制药厂),甘油(药用,河北省邯郸市化学试剂厂),甘露醇(药用,青岛胶南明月海藻工业有限责任公司),枸橼酸(药用,石家庄市永兴枸橼酸厂),枸橼酸钠(药用,天津石英钟厂霸州市化工分厂),EDTA(北京化学试剂公司,分析纯)

### 1.2 实验仪器

光学显微镜(Olympus)

### 1.3 实验动物

中华大蟾蜍(河北医科大学实验动物中心),体重30~35g,雌雄兼有。

## 2 方法与结果

### 2.1 受试药物的选择

受试药物的配制均采用生理盐水为溶剂

2.1.1 原料药 该滴鼻剂中维生素 B<sub>12</sub>的浓度拟定为5mg/ml,本试验中VB<sub>12</sub>的浓度与此相同

2.1.2 高分子材料(增稠剂) 文献报道<sup>[3]</sup>,加入纤维素多聚物可延长药物与鼻粘膜接触时间,从而

提高药物的疗效 维生素 B<sub>12</sub>的分子量为 1355.38 且为亲水性药物,为增加其吸收,应考虑加入高分子材料增加其粘度。因维生素 B<sub>12</sub>临床用药剂量较低,为保证用药的准确性,制成可定量掀压的喷雾剂。综合考虑溶液的流动性及每掀喷量的准确性,确立本品粘度范围 0.8~ 1.2 Pa·s 以此粘度为基准,选用 4种高分子材料 MC、HPMC、PVP、CP,经予试,确定各种高分子材料的浓度为: 0.8% MC, 1% HPMC, 1% PVP, 0.05% CP

2.1.3 鼻粘膜吸收促进剂 维生素 B<sub>12</sub>分子量大于 1000,需加入吸收促进剂 参考文献<sup>[4]</sup>选择四种吸收促进剂: 2% β-环糊精, 5% 吐温-80, 1.8% 氮酮及枸橼酸盐缓冲液 (pH为 5.0)

2.1.4 防腐剂 根据文献<sup>[1]</sup>,选用 0.01% 新洁尔灭及 0.05% EDTA

2.1.5 等渗剂 文献<sup>[1]</sup>报道以氯化钠为等渗剂吸收很好,但观察到表皮细胞的萎缩,故选用甘油及甘露醇。用量根据冰点下降法计算,分别为 2.56% 甘油, 5.3% 甘露醇。

2.2 纤毛毒性考察方法

采用在体蟾蜍上腭模型法 具体操作如下: 将蟾蜍仰卧固定,使口腔张开并固定,于上腭粘膜处滴加受试药液 0.5 ml,使完全浸没上腭,接触 30 min后用生理盐水洗净药物,用手术剪分离上腭粘膜,约 3 mm× 3 mm大小,立即用生理盐水洗净血块及杂物,粘膜面向上平铺于载玻片上,于粘膜表面滴加生理盐水,盖上盖玻片,于 40× 10倍的光学显微镜下观察粘膜纤毛的运动情况,随后将载玻片搁置于加有少量蒸馏水饱和的层析缸中,密闭,环境温度为 20~ 25℃,此后每隔一定时间取出标本,置显微镜下观察,如纤毛继续运动则放回层析缸中,直至纤毛运动停止,记录从给药后至纤毛运动停止所持续的时间。另取蟾蜍如上操作,滴加生理盐水 0.5 ml作为对照。以给药组的纤毛持续运动时间除以生理盐水对照组的纤毛持续运动时间,得到纤毛持续运动时间的相对百分率。百分率越高,表示药物对纤毛运动的影响越小,也就是对纤毛毒性越小。

2.3 试验结果

取下粘膜后立即观察,结果显示: 生理盐水组纤毛清晰完整,纤毛运动活跃;给予吐温-80 氮酮、枸橼酸盐缓冲液后,纤毛较清晰,但摆动的纤毛数

量少于生理盐水组;其余各受试物给药后纤毛较清晰,纤毛运动较活跃,摆动的纤毛数量也较多。各受试药物标本随着放置时间的延长,纤毛摆动速度逐渐减弱,摆动的纤毛数量逐渐减少。

维生素 B<sub>12</sub>原料及各种附加剂对蟾蜍上腭纤毛运动的影响结果见表 1 由表 1可见, 0.5% 维生素 B<sub>12</sub>溶液对蟾蜍上腭纤毛运动相对抑制百分率为 95.0%,对纤毛运动基本无影响,可评价为无纤毛毒性的药物。四种高分子材料: 1% PVP溶液、1% HPMC溶液、0.8% MC溶液、0.05% CP溶液;两种防腐剂: 0.01% 新洁尔灭溶液、0.05% EDTA溶液;两种等渗剂: 2.56% 甘油溶液、5.3% 甘露醇溶液等对蟾蜍上腭纤毛运动基本无影响。纤毛运动相对抑制百分率均在 90% 以上。四种鼻粘膜吸收促进剂对蟾蜍上腭纤毛运动的影响差异较大。2% β-环糊精混悬液对纤毛运动几乎无影响,而 5% 吐温-80溶液、1.8% 氮酮混悬液、枸橼酸盐缓冲液对纤毛运动有一定的影响,相对抑制百分率在 70%~ 80% 之间。根据以上纤毛毒性考察结果并结合制剂处方需求,将维生素 B<sub>12</sub>与 1% HPMC 甘油、枸橼酸盐缓冲液、新洁尔灭组合制成模拟鼻腔给药制剂,并测定其纤毛毒性,结果见表 1 上述结果表明: 维生素 B<sub>12</sub>与适宜的附加剂组合制成鼻腔给药制剂是可行的。

Tab 1. Effect of VB<sub>12</sub> and excipients on ciliary movement( $\bar{x} \pm s$ , n = 6)

Drug	T	P
Physiological saline	697.8± 23.8	
Vitamin B <sub>12</sub> solution(5%)	663.7± 13.1	95.1
PVP solution(1%)	656.2± 24.8	94.0
Hypermellose solution(1%)	684.0± 44.7	98.0
Methylcellulose solution(0.8%)	653.5± 36.8	93.7
Carbopol solution(0.05%)	630.0± 22.8	90.3
β-cyclodextrin suspension(2%)	692.7± 40.7	99.3
Tween 80 solution(5%)	502.7± 26.3	72.0
Laurocapram suspension(1.8%)	524.2± 36.7	75.1
Citrate buffer solution(pH 5.0)	497.8± 21.9	71.3
Benzalkonium Bromide(0.01%)	640.0± 24.1	91.7
EDTA(0.05%)	656.2± 16.8	94.1
Glycerol(2.56%)	691.8± 18.7	99.1
Mannitol(5.3%)	638.2± 18.1	91.5
Nasal preparation of VB <sub>12</sub>	641.5± 18.5	92.0

T Lasting time of ciliary movement after drug administration(min)

P The relative percentage of the lasting time of ciliary movement with physiological saline(%)

### 3 讨 论

蟾蜍体重大小、给药量的多少、所取粘膜的位置及标本制作时间是影响在体蟾蜍上腭模型法测定结果准确性及重复性的主要因素。预试验中,采用体重不同(30~50 g)的蟾蜍考察同一受试药物,测得体重较大动物的纤毛持续运动时间是体重较小动物的60%~70%;给药2 ml测得纤毛持续运动时间是给药0.5 ml的60%~80%;粘膜位置的不同,纤毛持续运动的时间有差异;粘膜取下后,用生理盐水清洗杂物及血块所用时间的不同,结果也有差异。为保证试验结果的准确性、可重复性,本试验采用体重为30~35 g的蟾蜍,给药量0.5 ml,所取粘膜为蟾蜍两眼中间的部位(该部位可完全被药物浸没),标本大小约3 mm×3 mm

试验中发现,受试药物浓度不同,纤毛毒性有差异,如1.6% MC溶液纤毛持续运动时间约为0.8% MC的65%。故对组方中附加剂筛选时,应尽量选用较低浓度

### 参 考 文 献

- [1] 陆 彬(Lu B)主编. 药物新剂型与新技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998. 451.
- [2] 蒋新国(Jiang XG), 崔景斌(Cui JB), 方晓玲(Fang XL)等. 药物的鼻粘膜纤毛毒性及评价方法[J]. 药学报(*Acta Pharm Sin*), 1995, 30(11): 848-853.
- [3] Piskunov S, Hskunov G, Razinkov S, *et al*. The prolongation of drug action in the treatment of diseases of the nose and paranasal sinuses[J]. *Rhinology*, 1993, 31(1): 33-35.
- [4] 毛世瑞(Mao SR), 杨宏图(Yang HT), 毕殿洲(Bi DZ). 提高药物鼻粘膜吸收的途径[J]. 中国中药杂志(*China J Chin Mater Med*), 1998, 33(11): 641-643.

## Study on the Ciliotoxicity of Nasal Mucous of VB<sub>12</sub> Drops

YANG Jian-Hong, ZHANG Jun-Shou<sup>1</sup>, LIU Tie-Gang

HeBei Institute for Drug Control, Shijiazhuang 050011; Department of Pharmaceutics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

**ABSTRACT** **AIM** The purpose is to study the effect of ciliotoxicity for VB<sub>12</sub>, 4 nasal absorption promoters, 4 high molecular materials, and 2 antiseptics, and 2 osmotic reagents. **METHODS** Ciliary movement was evaluated with in situ toad palate model. 0.5 ml of test drug solution was applied to the upper palate of toad for 30 min, and rinsed with physiological saline. The palate was dissected out and the mucocilia were examined with an optical microscope and the lasting time of ciliary movement was recorded. **RESULTS** 0.5% Vitamin B<sub>12</sub>, 1% PVP solution, 1% hypromellose solution, 0.8% methylcellulose solution, 0.05% carbopol solution, 2%  $\beta$ -cyclodextrin suspension, 0.01% benzalkonium bromide, 0.05% EDTA, 2.56% glycerol, and 5.2% mannitol have not obviously effected on ciliary movement; while 1.8% laurocapram suspension, and citrate buffer solution (pH 5.0), 5% polysorbate solution have some effect on ciliary movement. **CONCLUSION** VB<sub>12</sub> and suitable excipients for intranasal administration were available.

**KEY WORDS** VB<sub>12</sub>; Excipients; Intranasal administration; Ciliotoxicity of nasal mucous