

蟾酥缓释注射液的制备及其局部麻醉作用研究

吴帅成, 宋 舟, 张 翠, 秦倩倩, 付本懂, 申海清, 韦旭斌*

吉林大学畜牧兽医学院, 吉林 长春 130062

摘 要: 目的 以泊洛沙姆 407 作为载体材料制备蟾酥缓释注射液, 并评价其在体内局部麻醉作用效果。方法 采用冷溶法制备蟾酥缓释注射液, 以胶凝温度为指标筛选蟾酥缓释注射液最佳处方, 采用豚鼠皮丘模型比较蟾酥缓释注射液和蟾酥溶液局部麻醉作用时间。结果 蟾酥缓释注射液的最佳处方是泊洛沙姆 407 15.5%、乙醇 10%、蟾酥提取物 0.5%, 胶凝温度在 33 ℃, 体内局部麻醉作用时间可达 6~7 h, 而蟾酥溶液麻醉作用时间仅为 2~3 h。结论 蟾酥缓释注射液是一种长效制剂。

关键词: 蟾酥缓释注射液; 泊洛沙姆 407; 局部麻醉; 冷溶法; 豚鼠皮丘模型; 缓释

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)05-0891-04

Preparation of sustained-release injection of *Venenum Bufonis* and its local anesthetic activity

WU Shuai-cheng, SONG Zhou, ZHANG Cui, QIN Qian-qian, FU Ben-dong, SHEN Hai-qing, WEI Xu-bin

College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China

Abstract: Objective To prepare the sustained-release injection of *Venenum Bufonis* using Poloxamer 407 as the carrier material and evaluate its local anesthetic activity *in vivo*. **Methods** The sustained-release injection of *Venenum Bufonis* was prepared through cold-dissolving and the optimal prescription was screened by determining gelation temperature. With the guinea-pig cutaneous wheal model, the local anesthetic time of the sustained-release injection was compared with the solution of *Venenum Bufonis*. **Results** The optimal prescription was composed of 15.5% Poloxamer 407, 10% alcohol, and 0.5% *Venenum Bufonis* extracts at the gelation temperature of 33 ℃. *In vivo* study, the local anesthetic effect of the sustained-release injection of *Venenum Dufonis* lasted for 6—7 h whereas the solution of *Venenum Bufonis* only lasted for 2—3 h. **Conclusion** The sustained-release injection of *Venenum Bufonis* is proved to be a prolonged action preparation.

Key words: sustained-release injection of *Venenum Bufonis*; Poloxamer 407; local anaesthesia; cold-dissolving method; guinea-pig cutaneous wheal model; sustained-release

蟾酥是蟾蜍科动物中华大蟾蜍 *Bufo bufo gargarizans* Cantor 或黑眶蟾蜍 *B. melanostictus* Schneider 的耳后腺及皮肤所分泌的白色浆液, 经收集加工而成的干燥品, 具有解毒消肿、止痛开窍之功效。药理学实验研究证明, 蟾酥具有局部麻醉、抗炎、抗肿瘤等多种药理作用^[1-2], 临床证实其对关节炎、癌症疼痛等疗效显著, 但因关节炎和癌症疼痛为慢性疼痛, 需要多次注射给药, 病人依从性差。为了提高治疗效果和病人顺从性, 有必要研究蟾酥提取物的长效缓释制剂。温度敏感原位凝胶是一种新型的药物传递系统, 在给药前为液态, 注射后可

填充于组织间隙, 并迅速变成半固体凝胶, 具有制备简单、使用方便和控制释药性能好等优点, 是目前药剂学领域的热点。其中泊洛沙姆 407 是一种非离子表面活性剂, 具有表面活性而无免疫原性, 低毒, 易代谢, 是抗生素、麻醉药、抗炎药、抗肿瘤和蛋白质大分子多肽类药物的理想控缓释载体, 也是目前研究最深入的制备温度敏感原位凝胶的高分子辅料^[3]。本研究采用泊洛沙姆 407 为载体制备蟾酥缓释注射液, 并采用豚鼠皮丘模型研究蟾酥缓释注射液作用效果, 为进一步开发蟾酥穴位缓释注射剂提供理论依据。

收稿日期: 2011-10-06

作者简介: 吴帅成 (1986—), 男, 山东聊城人, 硕士生, 从事中兽药新型制剂的研究。E-mail: wushuaicheng10@163.com

*通讯作者 韦旭斌 E-mail: weixub@163.com

网络出版时间: 2012-04-09 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20120409.0859.004.html>

1 仪器与材料

85—2 型恒温磁力搅拌器（上海司乐仪器厂），DL2120A 型超声波清洗器（上海之信仪器有限公司），BSA124S 型电子分析天平（德国 Sartorius 公司），LSC—218C 型陈列柜（中国星星集团有限公司）。

豚鼠，雄雌各半，250~300 g，购于吉林大学实验动物中心，许可证号 SCAK-（吉）2003-0001。

蟾酥提取物（自制，经 95%乙醇连续 3 次冷浸提取 48 h 后干燥制得，其主要成分为蟾毒灵 7.1%、华蟾酥毒基 9.13%、酯蟾毒配基 11.7%）；泊洛沙姆 407（批号 20100201）购于 BASF 公司；乙醇（批号 20100311）为 95%医用酒精，购于天津市八一制药厂；水为注射用水，购于吉林大学五星药厂；其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 蟾酥缓释注射液的制备

2.1.1 基质的筛选 泊洛沙姆 407 具有受热反向胶凝的性质，在较低温度时为澄清溶液，黏度小，具有良好的流动性，可方便注射；但升高到一定温度后，黏度可迅速增加，流动性迅速降低，很快转变成半固体透明凝胶，从而发挥缓释作用。因此确定以泊洛沙姆 407 为基质。

2.1.2 胶凝温度的测定 参照文献方法^[4]，在西林瓶中放入待测溶液和磁力搅拌子，插入温度计。将西林瓶放入冰水浴中，开启电磁搅拌器，使水浴温度持续缓慢升高。磁力搅拌子完全停止转动的温度即为胶凝温度，平行测定 3 次，取平均值。

2.1.3 处方设计

（1）助溶剂的选择：乙醇有助于蟾酥提取物的溶解，提高注射液澄明度，而乙醇体积分数超过 10% 时，肌肉注射有疼痛感。因此确定乙醇的体积分数为 10%，作为助溶剂。

（2）药物质量分数的确定：采用冷溶法^[5]，以注射用水为介质，加入泊洛沙姆 407 15%和乙醇 10%，加入不同量的蟾酥提取物，搅拌使其分散均匀，置于 4℃冰箱中保存直至完全溶解，经 0.22 μm 滤膜滤过除菌，从而得到药物质量分数分别为 0.1%、0.5%、1.0%的含药凝胶，放置于 4℃冰箱保存 7 d，观察凝胶性状，结果见表 1。1.0%含药凝胶在 4℃保存 7 d 后，凝胶中有药物析出，而 0.1%、0.5%含药凝胶未见药物析出，凝胶性状良好。此外，注射剂高载药量，有助于减少给药剂量，提高患者

表 1 药物质量分数对凝胶形状的影响

Table 1 Effect of drug contents on gel properties			
药物质量分数	色泽	澄明度	不溶性颗粒
0.1%	浅黄	澄清	未见
0.5%	淡黄	澄清	未见
1.0%	深黄	浑浊	可见

顺应性。因此确定药物质量分数为 0.5%。

（3）处方各成分对温度敏感凝胶温度的影响：采用冷溶法^[5]，以注射用水为介质，加入不同量的泊洛沙姆搅拌使其分散均匀，置于 4℃冰箱中保存直至完全溶解，经 0.22 μm 滤膜滤过除菌，从而得到不同质量浓度泊洛沙姆 407 的空白凝胶。在凝胶处方中，加入 10%乙醇，或再加入 0.5%药物后，即可得到含有 10%乙醇的空白凝胶或含药凝胶。按“2.1.2”项的方法，测定空白凝胶以及含有 10%乙醇的空白凝胶和含药凝胶的胶凝温度，结果见表 2。空白凝胶的胶凝温度随着泊洛沙姆 407 质量分数的升高，胶凝温度逐渐降低。处方中加入 10%乙醇后，胶凝温度明显升高，而再加入 0.5%药物后，胶凝温度有所降低，但对温度敏感凝胶的整体变化趋势不变。

表 2 处方各成分对温度敏感凝胶胶凝温度的影响 (n=3)

Table 2 Effects of each composition in prescription on gelation temperature of thermosensitive gel (n=3)	
凝胶种类	胶凝温度 / °C
泊洛沙姆 407 15%	35.7±0.4
16%	28.4±0.2
17%	21.5±0.3
乙醇 10%+泊洛沙姆 407 15%	37.2±0.2
16%	29.4±0.3
17%	22.7±0.2
药物 0.5%+乙醇 10%+泊洛沙姆 407 15%	36.6±0.3
16%	29.2±0.4
17%	22.8±0.3

（4）泊洛沙姆 407 质量分数的确定：采用冷溶法^[5]，以注射用水为介质，加入 10%乙醇和 0.5%蟾酥提取物，分别加入不同质量分数的泊洛沙姆 407，搅拌使其分散均匀，置于 4℃冰箱中保存直至完全溶解，经 0.22 μm 滤膜滤过除菌，从而得到不同质量浓度泊洛沙姆 407 的含药凝胶，测定其胶凝温度。结果表明，蟾酥缓释注射液的胶凝温度具有泊洛沙

姆 407 质量浓度依赖性, 随着泊洛沙姆 407 质量浓度增加, 胶凝温度下降。泊洛沙姆 407 质量分数为 15%、16%、17%、18%, 在 37 °C 条件下能形成凝胶。适宜的胶凝温度对于温度敏感制剂的应用具有很重要的意义。调节胶凝温度要从使用方便和载体胶凝能力综合考虑。一方面温敏凝胶制剂在体外必须具有良好的流动性, 可以方便注射; 另一方面温度敏感凝胶要在体温作用下可以迅速形成凝胶, 胶凝温度一定要低于体温, 但是若胶凝温度过低, 则注射不便, 另外低温对组织会产生刺激, 造成顺应性不佳。鉴于人体正常温度在 36~37 °C, 理想的胶凝温度在 33 °C 左右, 因此蟾酥缓释注射液的泊洛沙姆 407 质量分数在 15%~16%, 见表 3。

表 3 泊洛沙姆 407 质量分数对胶凝温度的影响

Table 3 Effect of Poloxamer 407 contents on gelation temperature

泊洛沙姆 407 质量分数 / %	泊洛沙姆 407 胶凝温度 / °C	泊洛沙姆 407 质量分数 / %	泊洛沙姆 407 胶凝温度 / °C
15%	36.8±0.3	17%	27.0±0.3
16%	29.1±0.4	18%	22.6±0.2

(5) 蟾酥缓释注射液处方的优化: 以注射用水为介质, 加入乙醇和蟾酥提取物, 分别加入不同质量分数泊洛沙姆 407, 搅拌使其分散均匀, 置于 4 °C 冰箱中保存直至完全溶解, 从而得到泊洛沙姆 407 质量浓度分别为 15.00%、15.25%、15.50%、15.75%、16.00%, 10%乙醇, 0.5%药物的含药凝胶液, 测定其胶凝温度, 结果见表 4。泊洛沙姆 407 质量分数在 15.5%时, 胶凝温度为 33 °C。因此蟾酥缓释注射液的最佳处方确定为 15.5%泊洛沙姆 407、10%乙醇、0.5%蟾酥提取物。

表 4 蟾酥缓释注射液处方的优化

Table 4 Prescription optimization of sustained-release injection of *Venenum Bufonis*

泊洛沙姆 407 质量分数 / %	泊洛沙姆 407 胶凝温度 / °C	泊洛沙姆 407 质量分数 / %	泊洛沙姆 407 胶凝温度 / °C
15.00%	36.7±0.3	15.75%	30.6±0.3
15.25%	34.5±0.4	16.00%	29.1±0.2
15.50%	33.1±0.3		

2.2 体内局部麻醉作用研究

取体质量 250~300 g 的健康豚鼠 10 只, 雄雌各半。在每只豚鼠背部选择两个皮丘点, 分别注射蟾酥缓释注射液和蟾酥溶液 (为 0.5%蟾酥提取物、10%乙醇、10%泊洛沙姆 407 的溶液) 0.1 mL, 标

记皮丘大小。用自制的测试针按左、中、右、上、中、下顺序刺激 6 次皮丘范围内皮肤, 两下针刺时间间隔 3~5 s, 皮肤出现收缩反应为阳性, 记录注药后 10、20、30、60、120、180、240、300、360、420、480 min 的阳性反应次数, 当 6 下针刺中有 3 次产生反应, 可得出麻醉时间^[6-7]。记录每种药物 10 个皮丘在各时间点的阳性反应次数, 将其作为纵坐标, 以时间为横坐标, 绘制效应-时间曲线, 结果见图 1。蟾酥缓释注射液组和蟾酥注射液组均在 10 min 内起效, 蟾酥溶液对照组局部麻醉持续时间 2~3 h, 而蟾酥缓释注射液组局部麻醉持续时间可达 6~7 h, 作用时间明显高于蟾酥溶液对照组。

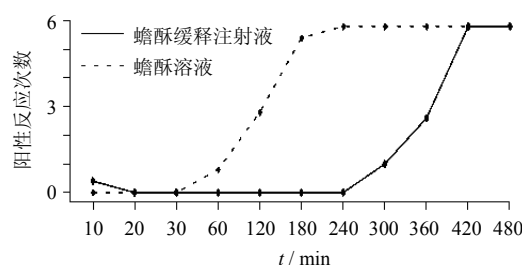


图 1 蟾酥缓释注射液和蟾酥溶液局部麻醉作用效应-时间曲线 (n=10)

Fig. 1 Effect-time curves of local anesthetic effects by sustained-release injection of *Venenum Bufonis* and solution of *Venenum Bufonis* (n=10)

3 讨论

本实验研究筛选了蟾酥缓释注射液最佳处方, 其中制剂组成分泊洛沙姆 407 是一种非离子表面活性剂, 具有载药量大、毒性低、易代谢、生物相容性好的特点, 已广泛应用于药学的各个领域。泊洛沙姆 407 是由聚氧乙烯与聚丙烯以 7:3 的比例构成的 ABA 嵌合聚合物, 其水溶液具有特殊的反向热胶凝作用, 即低温时为液体, 在体温下可以成为半固体凝胶, 是目前研究最深入的制备温度敏感原位凝胶的高分子辅料。温度敏感型原位凝胶是一种新型制剂, 目前尚无一套规范的检测指标和方法。根据其自身的特点、物理化学性质和文献报道的情况, 目前常用制剂评价指标有胶凝温度、凝胶强度、生物黏附力、流变学性质、体外释放度等^[8-9], 本实验采用胶凝温度为主要评价指标来筛选蟾酥缓释注射液的最佳处方。本研究中发现, 蟾酥缓释注射液的胶凝温度与泊洛沙姆 407 的质量分数存在依赖性, 随着泊洛沙姆 407 质量分数越高, 蟾酥缓释注射液胶凝温度越低, 这与 Kojarunchitt、Ricci 等^[10-11]

的研究报道相一致。本实验最终确定了蟾酥缓释注射液的最佳处方为 15.5%泊洛沙姆 407、10%乙醇、0.5%蟾酥提取物,胶凝温度在 33 ℃左右,在室温下具有良好的流动性,黏度小,可以方便注射;在 37 ℃以上可迅速形成半固体凝胶,发挥缓释作用。

蟾酥缓释注射液是注射式温度敏感凝胶制剂,观察蟾酥的局部麻醉起效时间及作用时间,需要选择合适的研究模型。蟾酥缓释注射液的主要有效成分为蟾毒灵、华蟾酥毒基、酯蟾毒配基等,现代药理学证明蟾毒灵、华蟾酥毒基、酯蟾毒配基都具有局部麻醉的作用^[1, 12]。蟾酥缓释注射液作为局部麻醉药,能在用药局部可逆性的阻断感觉神经冲动发生与传递,引起局部组织痛觉消失,其作用局限给药部位并随药物从给药部位扩散而迅速消失。热板法、甩尾、压尾、足趾刺激等躯体镇痛模型^[7, 13]常用于筛选镇痛药,或要求药物口服、腹腔注射或在刺激部位外用给药,不符合注射式温度敏感凝胶制剂给药特点,或不适用于研究局部麻醉药在给药部位的镇痛作用效果的研究,或不能用于进行时效分析,因此本实验不能采用热板法、甩尾法等躯体镇痛模型来研究蟾酥缓释注射液的局部麻醉起效时间和作用时间。豚鼠皮丘法,在豚鼠背部皮内注射给药形成皮丘,用针头按左、中、右、上、中、下顺序刺激 6 次皮丘范围内皮肤,以皮肤点出现收缩为痛感指标,考察药物作用效果,可进行时效分析,是研究局部麻醉药的经典方法^[7, 13],同时也符合注射式温度敏感凝胶制剂给药特点。

本研究采用豚鼠皮丘法,在每只豚鼠背部相近位置选择两个皮丘点,分别注射蟾酥缓释注射液和蟾酥溶液 0.1 mL,以皮丘点针刺反应为指标,对比其局部麻醉作用效果,一方面可以在同一只动物研究两种制剂局麻作用时间,另一方面可以考察药物在注射位置的滞留时间。结果可知,蟾酥缓释注射液组与蟾酥溶液组对比,局部麻醉维持时间明显延长,表明蟾酥缓释注射液释药缓慢,药物可在注射部位长期滞留,这与 Barichello 等^[14]、Liu 等^[15]的研究报道相符。体内实验研究证明蟾酥缓释注射液是一种长效缓释制剂,药物可以在注射部位长期滞留,可用于局部-穴位给药,然而其注入穴位的疗效和机制以及药物代谢规律需要进一步研究。

参考文献

[1] 赵 强, 孟凡静, 刘安西. 蟾酥的研究进展 [J]. 中草

药, 2004, 35(10): 4-7.

- [2] 于垂亮, 侯惠民. 蟾酥抗肿瘤有效成分的活性追踪分离及急性毒性研究 [J]. 中草药, 2011, 42(2): 307-311.
- [3] Ricci E J, Lunardi L O, Nanclores D M A, *et al.* Sustained release of lidocaine from Poloxamer 407 gels [J]. *Int J Pharm*, 2005, 288(2): 235-244.
- [4] Choi H G, Jung J H, Ryu J M, *et al.* Development of *in situ*-gelling and mucoadhesive acetaminophen liquid suppository [J]. *Int J Pharm*, 1998, 165(1): 33-44.
- [5] Matthew J E, Nazario Y L, Roberts S C, *et al.* Effect of mammalian cell culture medium on the gelation properties of Pluronic® F127 [J]. *Biomaterials*, 2002, 23(23): 4615-4619.
- [6] Mowat J J, Mok M J, Macleod B A, *et al.* Liposomal bupivacaine. Extended duration nerve blockade using large unilamellar vesicles that exhibit a proton gradient [J]. *Anesthesiology*, 1996, 85(3): 635-643.
- [7] Vogel H G, Vogel W H 主编. 杜冠华译. 药理学实验指南 [M]. 北京: 科学技术出版社, 2001.
- [8] 王丽娟, 朱照静. 泊洛沙姆 407 温度敏感型原位凝胶的研究进展 [J]. 中国药杂志, 2009, 44(4): 245-248.
- [9] Bruschi M L, Jones D S, Panzeri H, *et al.* Semisolid systems containing propolis for the treatment of periodontal disease: *in vitro* release kinetics, syringeability, rheological, textural, and mucoadhesive properties [J]. *J Pharm Sci*, 2007, 96(8): 2074-2089.
- [10] Kojarunchitt T, Hook S, Rizwan S, *et al.* Development and characterisation of modified Poloxamer 407 thermo-responsive depot systems containing cubosomes [J]. *Int J Pharm*, 2011, 408(1/2): 20-26.
- [11] Ricci E J, Bentley M V L B, Farah M, *et al.* Rheological characterization of Poloxamer 407 lidocaine hydrochloride gels [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2002, 17(3): 161-167.
- [12] 程国华. 蟾酥质量研究及其药理临床应用进展 [J]. 中草药, 2001, 32(2): 184-186.
- [13] 徐淑云, 卞如濂, 陈 修. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001.
- [14] Barichello J M, Morishita M, Takayama K, *et al.* Absorption of insulin from Pluronic F-127 gels following subcutaneous administration in rats [J]. *Int J Pharm*, 1999, 184(2): 189-198.
- [15] Liu Y, Lu W L, Wang J C, *et al.* Controlled delivery of recombinant hirudin based on thermosensitive Pluronic® F127 hydrogel for subcutaneous administration: *In vitro* and *in vivo* characterization [J]. *J Controlled Release*, 2007, 117(3): 387-395.