药 学 文章编号:0253-3626(2009)01-0326-03

医用生物蛋白胶携载更昔洛韦体外缓释研究

余 涛[1],钟 玲[1],曲 斐[1],脩 陶[2],尚京川[1,3]

(1. 重庆医科大学药学院药物分析教研室,重庆 400016;2. 重庆市第五人民医院药剂科,重庆 430062;
3. 重庆医科大学医药研究所,重庆 400016)

【摘 要】目的:建立 HPLC 测定体外类体环境中更昔洛韦浓度的方法,并考察医用生物蛋白胶携载更昔洛韦在体外的缓释作用。方法:用医用生物蛋白胶携载更昔洛韦,观察缓释情况并测定其释放率。HPLC 流动相为水:甲醇(2:98);流速:1 ml/min;检测波长:252 nm;柱温:30℃。结果:更昔洛韦在 5~350 μg/ml 范围内线性关系良好;日内和日间精密度 RSD 为 0.89%~2.35%,高、中、低 3 个浓度的回收率为 98.4%~100.8 %. 该方法灵敏度高,重复性好,可适用于在体外条件下更昔洛韦浓度的测定。结论:医用生物蛋白胶携载更昔洛韦在体外类体环境下缓释效果良好。

【关键词】医用生物蛋白胶;更昔洛韦;体外缓释;高效液相色谱法

【中国图书分类法分类号】R917 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-09-18

Experimental study on in-vitro sustain-release of medical biofibrin glue carrying Ganciclovir

YU Tao, et al

(*Department of Pharmaceutical Analysis, College of Pharmacy Science, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To establish an HPLC method for the determination of the concentration of ganciclovir in vitro, and to inspect sustain-release of medical biofibrin glue carrying Ganciclovir. *Methods*: The HPLC system consisted of water-methanol (98:2) as mobile phase with the flow rate of 1.0 ml/min, and the detection wavelength was 252 nm and the injection volumn was 20 μl. Column tempetature was 30℃. *Results*: The linear range of ganciclovir was 5~350 μg/ml (r=0.9996), displaying a good linear relationship. The within-day and between-days relative standard deviations(RSD) were 0.89%~2.35%. The methodological recovery ranged from 98.4 % to 100.8 %. The elaborated method was sensitive, precise and applicable for determining the concentration and release rate of ganciclovir in vitro. *Conclusion*: The sustain-release effect of medical biofibrin glue carrying ganciclovir in vitro is good.

【Key words】Medical biofibrin glue; Ganciclovir; Releasing in vitro; High performance liquid chromatography

巨细胞病毒性(Cytomegalovirus,CMV)视网膜炎是 HIV 病毒感染晚期严重威胁视力的并发症,在眼部术后也容易感染 CMV。更昔洛韦(Ganciclovir,GCV)是开环核苷类药物,具有光谱抗疱疹病毒活性。GCV 在体内可抑制疱疹病毒的复制,包括单纯疱疹病毒、水痘-带状疱疹病毒、EB 病毒和巨细胞病毒等,尤以对缺乏胸苷激酶的耐药毒株及巨细胞病毒的作用显著,是第一个治疗人体 CMV 感染的有效抗病毒药物。

目前 GCV 用于眼部 CMV 的治疗和术后预防 CMV 感染主要有静脉注射、口服和滴眼液局部使用三种给药途径。但前两者用药剂量大、时间长容易引起全身副作用,而 GCV 滴眼液局部使用又因泪液的稀释、鼻泪管排泄等因素的影响,眼部的生物利度较低,作用时间也极为短暂。应用载体携载药物术后局部给药,可在局部达到较高药物浓度、持续给药而不致有全身作用。若利用医用生物蛋白胶携载 GCV,可望取得局部缓释用药目的,可能成为眼部术后预防 CMV 感染的新方法。

1 材料与方法

1.1 仪器与试药

Agilent 1100 型高效液相色谱仪;水浴恒温振荡器(荣华 THZ-82A);BS210S 电子分析天平(精度 0.000 1 g,Sartorious

作者介绍:余 涛(1984-),男,硕士,研究方向:药物分析。

通讯作者:尚京川,男,副教授,E-mail:sjc20@126.com。

公司）；LD-50G-D 型超纯水处理器（重庆利迪实验仪器设备有限公司）。

GCV 对照品（纯度 99.5%，重庆青阳药业有限公司提供），GCV 原药（规格：0.25 g/瓶，批号：20060501，哈药集团生物工程有限公司）；医用生物蛋白胶（规格：1.5 ml/盒，批号：20060221，广州倍绣生物技术有限公司）；甲醇为色谱纯（江苏汉邦科技有限公司）。

1.2 医用生物蛋白胶的配制

按照说明书操作方法先将生物蛋白胶主体与催化剂分别用各自的溶解液溶解，取 2 只一次性注射器，一只专用抽取生物蛋白胶主体溶液，另一只专用于抽取催化剂溶液（分别卡入推液支架上，将两注射器锥头牢固地连接到连接针座上，再把喷嘴安装到连接针座的锥头上，检查无松动渗漏后），将生物胶注入准备好的玻片上，迅速用另一块玻片压在上面，将胶体压成均匀的薄片，待其凝固。凝胶薄片放于 25 ml 透明锥形瓶中，再加入生理盐水溶液 10 ml，将锥形瓶置入 37 ℃恒温振荡，观察上清液及胶体变化。

1.3 携载 GCV 生物蛋白胶的体外缓释

操作同 1.2 项，但催化剂中溶解入 GCV 8 mg（摇匀），两针筒内溶液相混合后形成凝胶薄片置入 25 ml 透明锥形瓶中，加入生理盐水 10 ml，将试管置入 37 ℃恒温振荡。分别于 12、24、36、48、60、72、84、96、108、120 h 各时间点取释放液 10 ml，重新加入生理盐水 10 ml，将试管重新置入 37 ℃恒温箱中。连续 15 d，取出的释放液置于 25 ml 量瓶中，用生理盐水定容至刻度，摇匀，过滤，取续滤液作为供试品溶液，按上述方法平行试验 6组。以 1.2 项下溶液为空白对照，以高效液相色谱法测定。

1.4 方法学考察

1.4.1 色谱条件 色谱柱：Agilent ZORBAX300SB-Cl8（5 μm，250×4.6 mm）；检测波长：252 nm；流动相：甲醇：水（2：98）；柱温：30 ℃；流速：1 ml/min；进样量：20 μl。

1.4.2 专属性试验 取 GCV 对照品溶液进样，按“1.4.1”项下方法进行色谱分离测定，得 GCV 对照品色谱峰。另分别取空白释放液、空白释放液 +GCV 对照品、GCV 供试品溶液，按“1.41”项下色谱条件进行色谱分离测定，记录色谱图。

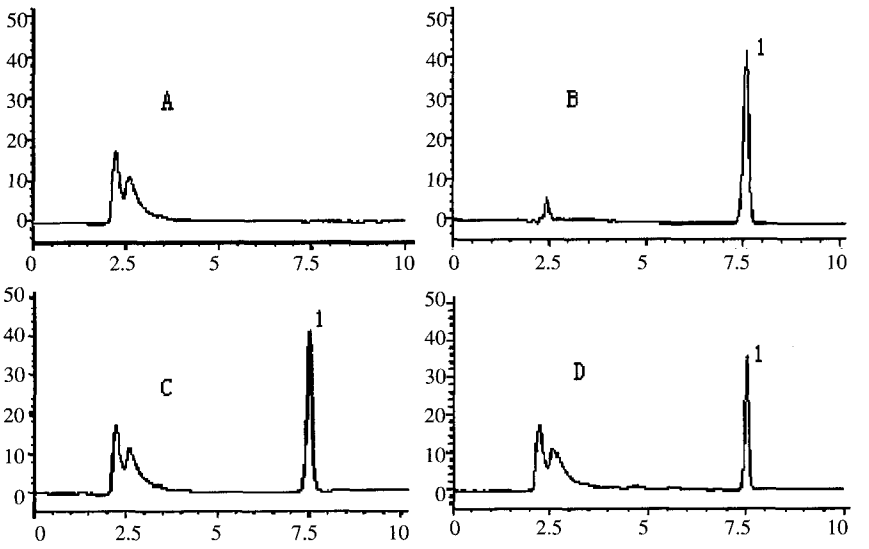
1.4.3 线性考察 精密称取 GCV 对照品 0.1 g，置 100 ml 量瓶中，用生理盐水溶解并稀释至刻度，摇匀，即得储备液。精密量取储备液 0.5、1.0、5.0、10.0、15.0、25.0、35.0 ml 分别置 100 ml 量瓶中，用生理盐水分别稀释至刻度，摇匀，精密量取 20 μl 注入色谱仪，按 1.4.1 项下条件测定。以 GCV 峰面积 A 为纵坐标，浓度 C（μg/ml）为横坐标，进行线性回归，得出回归方程。配制不同浓度 GCV 对照品溶液，按“1.4.1”项进样，记录色谱图，以 S/N≥3 作为最低检出限，测定 GCV 的最低检测限。

1.4.4 重复性试验 精密称取 GCV 同一批号 5 份，按供试品溶液制备方法制备 5 份平行供试品溶液，按样品测定项下方法测定，记录色谱图，考察方法重复性。

1.4.5 精密度和回收率试验 用空白释放液分别精密配制 20 μg/ml、100 μg/ml、300 μg/ml GCV 对照品溶液，精密量取 20 μl 注入色谱仪，每个浓度 1 d 内平行测定 5 次和 5 d 内间隔测定 5 次，记录峰面积A，将 A 代入标准曲线方程，测得 GCV 浓度（C），分别计算日内精密度、日间精密度和回收率。

1.5 体外释放率测定

精密量取供试品溶液，按 1.4.1 项下色谱条件测定，记录 GCV 峰面积，按 1.4.3 项下计算 12 h 释放液浓度 C，计算出 6 组释放液的平均浓度，根据累计释放率公式：累计释放率%=（$\sum \bar{C}V$）/M 计算出累积释放率。式中 $\bar{C}$ 为释放液的平均浓度（μg/ml），V 为释放液体积，M 为医用生物蛋白胶中 GCV 的总质量。作 GCV 累积释放率—时间曲线（n=6）。



A. 空白释放液；B. GCV 对照品；C. 空白释放液 + 对照品；D. 样品 1：GCV

图 1 GCV 的 HPLC 色谱图

2 结 果

2.1 方法专属性

本方法具有较好的特异性,GCV 的色谱峰形良好,保留时间约为 7.51 min,胶体内其它物质不干扰 GCV 的测定,见图 1。

2.2 线性范围

以 GCV 峰面积 A 对浓度 C 作线性回归,得出回归方程:A=3.628 9 C-0.432 4,r=0.9991。结果表明:GCV 浓度在 5~350 μg/ml 范围内线性关系良好。测得 GCV 的最低检测限为 2.8 ng。

2.3 精密度和回收率

日内精密度 RSD 分别为 1.05%、1.38%和 0.89%(n=5),日间精密度 RSD 分别为 2.13%、1.78% 和 2.35%(n=5)。高、中、低 3 浓度的回收率分别为 98.4%、99.2%和 100.8%,RSD 分别为 1.13%、0.95%和 1.29% (n=5)。

2.4 重复性

测定结果 RSD 为 0.91%,表明本方法测定医用生物蛋白胶释放液中 GCV 重复性良好。

2.5 体外释放结果

实验结果表明:医用生物蛋白胶携栽 GCV 在生理盐水中可持续释放 5 d 以上,GCV 在前 24 h 释放最多,到 72 h 释放仍较明显,说明医用生物蛋白胶携栽 GCV 在体外环境的缓释效果良好,凝胶薄片在 72 h 开始明显溶解,到 15 d 仍未完全溶解(见图 2)。通过观察,携栽 GCV 的医用生物蛋白胶与空白对照组并无不同。

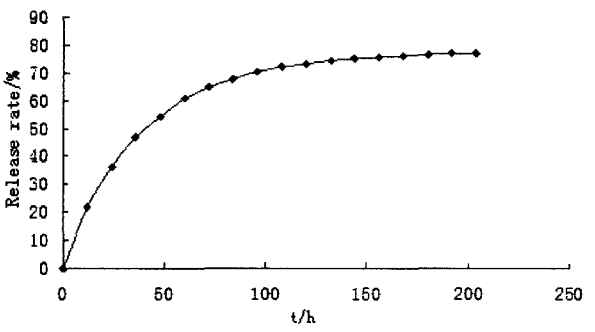


图 2 医用生物蛋白胶携载更昔洛韦体外累计释放率

3 讨 论

医用生物蛋白胶有携载药物的能力,并于一定条件下能缓慢释放。生物蛋白胶是由生物组织中提取的多种可凝性蛋白(凝血酶、纤维蛋白原、凝血因子Ⅷ和钙离子等)组成,其作用机制是利用血液中参与凝血的有关成分,模拟人体自身凝血反应最后阶段,形成具有稳定三维结构的纤维蛋白多聚体,外形呈乳白色凝胶状,形成的凝胶结构类似海绵状贮药库,囊壁间类似于半透膜,药物依其浓度梯度不断从囊壁中释出,从而延缓了药物被吸收的速度,其三维网状结构也为承载药物提供了较大的表面积,使药物按一定速率恒定释放,延长了药物的局部停留和释放时间。

本试验根据参考文献[6]采用生理盐水作为释放环境,与眼睛房水和泪液环境较为接近。在配制携载 GCV 生物蛋白胶向催化剂中加入 GCV 时一定要摇匀,使 GCV 充分溶解后再与主体液混合成凝胶,否则凝胶中的 GCV 不能有规律的释放或者难以释放。把凝胶先做成薄片再放入释放环境中,能让凝胶能与释放环境充分接触,更有利于 GCV 的释放;而且薄片形状与手术创面更加吻合。实验表明,GCV 在生物蛋白胶内性质稳定,在体外环境缓释效果又好,如果将医用生物蛋白胶携载 GCV 用于眼睛手术创面,既能减少创面渗出、促进创面愈合,又能有效预防 CMV 感染。

参 考 文 献

[1] 殷香保,王 捷,伍 衡,等.丝裂霉素纤维蛋白胶凝胶化疗的缓释特性[J]. 中山大学学报. 2004,25(6).542-545.

[2] 高小坤. RP—HPLC 法测定更昔洛韦粉针剂含量及有关物质[J]. 药学进展,2005,29(11):520-522.

[3] 梁翠荣,徐志洲,董 蓬. HPLC 测定更昔洛韦中相关物质的含量[J]. 中国药科大学学报,2004,35(2):135- 137.

[4] 贺青卿,范西红,孙成春,等. 医用生物蛋白胶携载氟脲嘧啶脱氧核苷体外缓释作用[J]. 中国医院药学杂志,2004,24(9):522-523.

[5] 王 帅,曹 斌,张守平. 局部应用生物蛋白胶和加替沙星对手及前臂屈肌腱粘连及感染的预防[J]. 青岛医药卫生,2007,39 (2):82-83.

[6] 白 波,韩大庆,吴景明. 生物蛋白胶甲氨蝶呤缓释药粒在兔的体外和体内实验[J]. 广州医学院学报,2005,33(6):15-17.

(责任编辑:冉明会)