DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.09.048

技术方法

文章编号:1000-5404(2002)09-1104-02

用正交试验法研制替硝唑固体分散物

Preparation of tinidazole solid dispersion by orthogonal test

柏干荣,胡友梅 (第三军医大学:[1]附属大坪医院野战外科研究所第二研究室,重庆 400042;[2]基础医学部药理学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 确定替硝唑固体分散物的最佳配方。方法 根据正交试验法,制备不同处方的替硝唑固体分散物,并以溶出度为指标进行考察。结果 最佳处方为替硝唑-聚乙二醇6 000 1∶9。结论 替硝唑与聚乙二醇6 000为1∶9的处方合理,可明显增加替硝唑的溶出度。

替硝唑(Tinidazole,TNZ)是一新的硝基咪唑类衍生物。具有独特的抗厌氧菌及抗厌氧病原虫的作用,已广泛用于临床[1]。但TNZ水溶性差,使得其制备过程中的剂型选择较为局限,影响局部吸收,生物利用度不高。本实验试用固体分散技术制备替硝唑-聚乙二醇(Ployethylene,PEG)固体分散物,以增加溶出度,提高生物利用度。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试药 TNZ原料(湖北广济药业股份有限公司,批号970302);TNZ对照品(湖北医药工业研究所,批号970313);PEG4000(天津天泰精细化学品有限公司,批号940219);PEG6000(广泛南方化玻公司,批号970104);PEG10000(日本进口,上海化学试剂公司分装厂,批号890620);其它试剂均为分析纯。

1.1.2 仪器 Du-650紫外分光光度计(美国Beckman);ZRS-4智能溶出试验仪(天津大学无线电厂)。

1.2 方法

1.2.1 正交试验设计 经预试验及总结文献[2~4]资料,确定考察二个因素:分子量、比例、分别用A、B表示,每个因素取三个水平,根据正交表$L_9(3)^4$及表头设计安排,每次9个试验,重复6次。

1.2.2 TNZ-PEG固体分散物的制备 按重量比(TNZ-PEG=1∶3,1∶6,1∶9)精密称取TNZ和PEG4000,PEG6000,PEG10000分别过60目筛于蒸发皿中,置水浴上加热熔融,不断搅拌,使受热均匀,水浴温度缓缓上升,待两组分完全熔融,其熔融状态色泽一致时,倾入预冷的不锈钢板上,摊成薄片,迅速放入-25℃冰箱中冷却固化后,于盛有硅胶的干燥器内放置24 h,粉碎过筛,放干燥器内备用。

1.2.3 紫外吸收光谱图的绘制 分别精取TNZ与PEG 6000 0.0025 g于50 ml容量瓶中,加蒸馏水至刻度,摇匀。以蒸馏水为空白,分别在200~400 nm波长范围内扫描,结果表明TNZ在317 nm波长处有最大吸收峰,而PEG 6000在此波长处无吸收,不干扰TNZ的紫外测定,故选用317 nm为本试验的含量测定波长。

1.2.4 标准曲线的建立 精密称取经105℃干燥至恒重的TNZ 0.002 5 g,置50 ml量瓶中,加蒸馏水至刻度,摇匀。取该液适量稀释成含2.5、5、10、15、25 μg的溶液,以蒸馏水为空白,分别在317 nm波长处测定吸光度(A)。以吸光度A对浓度线性回归,得回归方程:$A=0.0369C-0.003$,$r=0.9999$。试验证明TNZ溶液浓度在2.5~25 μg/ml范围与吸收度的线性关系良好,符合Beer-Lambert定律。

1.2.5 稳定性试验 取上述TNZ溶液适量,分别于配制后立即与放置1、2、4、8、12、24 h在317 nm波长处测定吸光度(A),结果表明,本品在24 h内其吸光度基本不变。

1.2.6 回收率试验 精密称取TNZ 0.0125 g,置250 ml量瓶中。另将PEG6000熔融制成松脆固体,粉碎,过60目筛。按1∶9(TNZ∶PEG6000)的处方量加入量瓶中,用蒸馏水溶解并至刻度,摇匀。再分别取稀释液制成不同浓度的TNZ,在317 nm波长处测定其吸光度(A)并计算回收率。

1.2.7 TNZ固体分散体的含量测定 取TNZ∶PEG6000 1∶9固体分散体5批,分别精确称取0.020 0 g,于100 ml量瓶中,加蒸馏水至刻度,摇匀。精取2 ml于25 ml容量瓶中,加蒸馏水至刻度,在317 nm波长处测其吸光度。

1.2.8 TNZ固体分散物的溶出度测定 精密称取经研细过60目筛的TNZ固体分散物适量(相当于TNZ 0.2 g),按中国药典1995年版(二部附录66)转篮法,转速为100 r/min,以水为介质(1 000 ml),水浴温度(37±0.5)℃。如法装置,取样品于转篮内(转篮底垫微孔滤膜),下降转篮,待样品与介质接触时立即记时,于30 min用带滤头吸管定时取样5 ml(同时补入5 ml等温蒸馏水),过滤,精取滤液2 ml于25 ml容量瓶中,加水至刻度,摇匀。在317 nm波长处测定各样品的吸光度(A),按标准曲线回归方程计算浓度(C),再求出累积溶出百分率(%)。

2 结果

2.1 溶出度测定结果

从TNZ-PEG固体分散物溶出度测定结果可看出:以相同分子量的PEG制备的TNZ固体分散物其溶出度与主药、PEG二者不同比例的关系分别按以下顺序排列:PEG4000 1∶3<1∶9<1∶6,PEG6000及PEG10000均为1∶3<1∶6<1∶9;以相同比例组成的固体分散物溶出度与不同分子量的PEG的关系按以下顺序排列:1∶1 PEG10000<PEG6000<PEG4000,1∶6 PEG6000<PEG4000<PEG10000,1∶9 PEG4000<PEG10000<PEG6000。

作者简介:柏干荣(1958-),女,江苏省赣余县人,硕士,副主任药师,主要从事药物制剂方面的研究,发表论文25篇。电话:68752990

收稿日期:2001-01-23;修回日期:2001-10-15

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.2 正交试验的方差分析

将各因素的各水平对溶出度用 SPLM 软件进行处理表明：相同分子量的 PEG 构成的不同比例的固体分散物比较，PEG4000 的比例 1∶3 与 1∶6，1∶9 差异非常显著（$P<0.01$），而 1∶9 与 1∶6 差异无显著意义（$P>0.5$）；PEG6000 的比例 1∶3 与 1∶6，1∶9 有非常显著性差异（$P<0.01$），1∶6 与 1∶9 差异亦有非常显著意义（$P<0.01$）；PEG10000 的比例 1∶3 与 1∶6、1∶9 差异非常有显著意义（$P<0.01$），1∶6 与 1∶9 差异有非常显著意义（$P<0.01$）。不同分子量的 PEG 构成的相同比例的固体分散物比较，比例为 1∶3 的 PEG4000 与 PEG6000、PEG10000 差异有非常显著意义（$P<0.01$），而 PEG6000 与 PEG10000 差异无显著意义（$P>0.05$）；比例 1∶6 与 1∶9 的 PEG4000 与 PEG6000、PEG10000 三者之间差异有非常显著意义（$P<0.01$）。

3 讨论

实验结果表明，TNZ 固体分散物的溶出度不是随着 PEG 分子量增加而增加；而主要与所成溶液粘度密切相关，溶出度随 TNZ 与 PEG 组成的比例不同而不同，且溶出度随载体用量增加而增加。这与载体的用量及由此所致药物所处的状态不同有直接关系，药物与载体形成固体分散物后，药物以较均匀的细微晶体形式分散在载体中，而且由于载体的亲水性，当该分散物与水接触时，载体便溶解，药物以细微晶体状态分散于水中，加快药物溶出。

载体 PEG 不干扰主药的测定，本操作简便，结果准确，故可确定为 TNZ 的含量测定方法。

关键词：正交试验法；替硝唑；聚乙二醇；固体分散物；配方
中图法分类号：R944.24　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 陈见南. 替硝唑及其前景[J]. 中国医药情报，1996，2(3)：179.
[2] 殷恭宽. 物理药学[M]. 北京：北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社，1993. 184－192.
[3] 罗明生，高天惠. 药剂辅料大全[M]. 成都：四川科学技术出版社，1993. 97－99.
[4] 奚念朱. 药剂学[M]. 北京：人民卫生出版社，1995. 268.
[5] 中国药典. 1995 版二部. 附录 66.

（编辑　陈聪连）

文章编号：1000-5404(2002)09-1105-02

技术方法

培养大鼠下丘脑神经元生长规律及免疫细胞化学研究

Immunocytochemical study on neurons in cultures of rat hypothalamus

张云东，朱佩芳，王正国，周继红，许民辉，邹咏文，黄显凯，粟永萍　（第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第四研究室、脑外科，重庆 400042）

提　要：目的　探讨体外培养胎鼠下丘脑 CRH 神经元的形态、生长变化规律及 CRH 的表达变化。方法　取 17 d 胎鼠下丘脑分散培养下丘脑神经元，镜下连续观察神经元胞体直径、突起长度、数目等变化规律，应用免疫组织化学染色方法观察 CRH 神经元的生长变化规律。结果　培养下丘脑 CRH 神经元 3～6 d 生长速度最快；7～10 d 神经元细胞数量、胞体直径、突起长度和 CRH 染色强度均达高峰；12 d 以后部分神经元出现退形性改变。结论　培养下丘脑 CRH 神经元 7～10 d 迅速生长趋于成熟，是神经元机能测试的最佳时期。

在生理或应激条件下，下丘脑分泌的促肾上腺皮质激素释放激素（CRH）在调节机体内分泌、生理机能、神经化学和行为反应中起着关键的作用。CRH 广泛分布于中枢神经系统，但在急性应激反应过程中，CRH 却主要表达于下丘脑室旁核和视上核。已报道培养的胎鼠下丘脑可表达 CRH，但有关下丘脑 CRH 神经元体外培养及其生长变化的定量研究不多。本研究应用免疫细胞化学技术和图象分析，观察胎鼠下丘脑分散培养中的 CRH 神经元的形态特点和生长规律，为进一步深入研究奠定基础。

基金项目：国家重点基础研究发展规划资助项目（"973"项目）（G1999054201）
作者简介：张云东（1968－），男，山东省阳谷县人，博士，主治医师，讲师，主要从事神经应激方面的研究，现在北京天坛医院神经外科，北京 100050，发表论文 5 篇。电话：(023)68757243
收稿日期：2002-03-19；修回日期：2002-06-15

1 材料和方法

1.1 胎鼠下丘脑神经元的分散培养

实验参照 Wilkinson 等[1]的方法。选孕 17 d Wistar 胎鼠（第三军医大学大坪医院野战外科研究所动物室提供），在解剖显微镜下除去脑膜及血凝块，分离下丘脑（视交叉-乳头体为前后界，左右下丘脑沟为侧界，深约 1.5 mm），经 D-Hanks 液冲洗后仔细剪碎脑组织成约 1 mm×1 mm×1 mm 的小块。组织块中加入 0.125％胰蛋白酶（Sigma）溶液（D-Hanks 液配制，pH 7.4），37 ℃下消化 30 min，再以吸管吹打直至分散为单细胞悬液。每一下丘脑可约分离出 1.2×10^6 个细胞，加入 DMEM/Ham's F12（Sigma）培养液（含 10％的胎牛血清），最终制成密度为 5×10^5 的细胞悬液，接种于生长面上有多聚赖氨酸的盖玻片上，置于 30 mm 培养板中，培养板置 37 ℃、5％ CO_2 培养箱孵育，每 3 d 更换 1 次培养液。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net