

抗过敏性鼻炎甘辛喷雾剂的研究

陈文, 刘清华, 冯书晓, 江发寿 (新疆石河子大学药学院, 新疆 石河子 832002)

摘要:目的 研制复方甘草和辛夷(甘辛)鼻用抗过敏喷雾剂。方法 以甘草提取物甘草甜素和辛夷花提取液为主药制备成鼻用喷雾剂,建立 RP-HPLC 测定甘草酸含量,以 2,4-二异氰酸甲苯酯(TDI)介导的豚鼠超敏反应为模型,观察甘辛喷雾剂模型对过敏性鼻炎的疗效。结果 制剂制备工艺可行,质量稳定,RP-HPLC 对甘草酸铵含量测定结果可靠,重现性好;甘辛喷雾剂大小两个剂量组均在一定程度上使鼻黏膜上皮嗜酸性粒细胞、淋巴细胞、浆细胞和嗜中性粒细胞减少,腺体增生和分泌亢进得到有效的抑制。结论 甘辛喷雾剂可有效抑制超敏反应过程,保护鼻黏膜组织结构。

关键词:甘辛喷雾剂;豚鼠;超敏反应;鼻黏膜;病理切片

中图分类号:R283.7 文献标识码:A 文章编号:1007-7693(2006)02-0094-03

The research on anti-allergic rhinitis dose form of Ganxin spray

CHEN Wen, LIU Qing-hua, FENG Shu-xiao, JIANG Fa-shou (Pharmaceutical College of Shihezi University, Shihezi 832002, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To prepare the anti-allergic rhinitis dose form of compound Glycyrrhizin and Flos Magnoliae (Ganxin) nasal spray. **METHODS** The nasal spray was prepared by using the main drugs of the licorice extraction such as Glycyrrhizin and the Flos Magnoliae extraction. The method of RP-HPLC was established to determine the contents of glycyrrhizic acid. Models of guinea pig's allergic rhinitis mediated by toluene-2,4-di-isocyanate (TDI) were applied to observe the effects of this spray on the allergic rhinitis. **RESULTS** The technique of the preparation was feasible, and the quality was stable. the results of the contents of monoammonium glycyrrhizinate determined by RP-HPLC were reliable and repeatable. the Ganxin spray both in small and large doses, to some extent, reduced the number of eosinophilic granulocyte, neutrophilic granulocyte and lymphocyte, and effectively inhibited the gland hyperplasia and the hypersecretion. **CONCLUSION** Ganxin spray can successfully inhibit the process of the type I allergic reaction and protect the structure of nasal mucosa.

KEY WORDS: Ganxin spray; guinea pig; type I allergic reaction; nasal mucosa; pathological segment

过敏性鼻炎(allergic rhinitis)是一种反复发作性喷嚏、水样鼻涕、鼻塞为主要特征的慢性鼻黏膜炎症。在中医上,过敏性鼻炎属于中医鼻鼽的范畴,历代医家均认为本病与风寒入侵密切相关,而风寒入侵与卫外阳气不足有关。目前,国内外对本病尚无特异性治疗药物。辛夷具有收敛作用可保护鼻黏膜,并能促进黏膜分泌物的吸收,减轻炎症,乃至鼻腔通畅,辛夷花挥发油含量较高,主要为桉油精(cineole)、 α -蒎烯(α -pinene)等 α -松油醇(α -terpineol)等^[1-3]。甘草主要成分甘草甜素的抗过敏作用已为现代医学体内外实验所证实,但目前国内外尚无此药用于过敏性鼻炎治疗的公开报道。本研究在原有辛夷滴鼻液的基础上加入甘草甜素制成鼻用喷雾剂,并建立了含量测定标准。在复制豚鼠超敏鼻炎模型^[4]的基础上,对制剂进行了初步药效学的考察,现报道如下。

1 实验材料

1.1 受试动物和药物

选用健康无鼻炎的豚鼠 50 只,雌雄各半体重为 300 ~

350g(新疆维吾尔自治区流行病学研究所)。甘草甜素(新疆特丰制药厂)。辛夷(石河子大学第一附属医院,并有我院成玉怀副教授鉴定)。迪康-迪通鼻炎水为市售,成都迪康制药有限公司生产,批号:010301;2,4-二异氰酸甲苯酯(TDI),批号:951101,上海试剂一厂。

1.2 仪器

HP1100 型高效液相色谱仪(四元泵,紫外检测器,HP 化学工作站,美国惠普公司)。

2 甘辛喷雾剂的制备

称取辛夷花 500g,置于蒸馏容器中加入适量水浸渍,蒸馏并浓缩后得到辛夷液^[5],将制得的甘草甜素适量加入辛夷液中,加入防腐剂、等渗调节剂等制成浅黄色的澄明液体,装入定量喷瓶中即得。

3 甘辛喷雾剂的质量检查

3.1 性状和 pH 值

甘草酸为透明浅黄色液体,pH 值为 5.7。

3.2 微生物学检查

基金项目:新疆兵团医药专项基金 NO. NKB02SDXNK30XY

作者简介:陈文(1967-),男,硕士,副教授,从事药物新制剂的研究与开发。Tel:13179930326

按“药品卫生”检验进行微生物检查,符合有关规定。

3.3 稳定性试验

按照新药审批技术指南进行加速稳定性试验,喷雾剂物理、化学及生物学稳定性均符合要求。

3.4 含量测定^[6]

3.4.1 色谱条件 Zorbax ODS C₁₈柱,流动相:甲醇-0.2mol/L醋酸铵-冰醋酸(67:33:1),检测波长250nm,理论塔板数按甘草酸单铵峰计算不低于2000。

3.4.2 标准曲线的绘制 精密称取甘草酸单铵对照品50mg,置50mL量瓶中,加入配好的流动相定容,作为对照品贮备液。精密吸取上述对照品储备液制成浓度分别为 0.4×10^{-5} , 1×10^{-5} , 2×10^{-5} , 3×10^{-5} , 4×10^{-5} , 5×10^{-5} g/mL的甘草酸单铵标准溶液,分别以20 μ L满环进样量注入液相色谱仪进行测定,以甘草酸单铵色谱峰面积对进样浓度进行直线回归,得回归方程: $y = 96.008x - 10.666$, $r = 0.9999$ ($n = 6$),进样量在0.2~1.0 μ g内直线方程线性关系良好。

3.4.3 回收率和精密度实验 精确吸取已测得甘草酸单铵含量的同一批(20020911)样品,分别加入适量的甘草酸单铵对照品溶液(3种不同梯度,各3份),测定含量并计算回收率,平均加样回收率为 $100.67\% \pm 4.44\%$ ($n = 9$),同一批号(20020911)样品分别进样5份测定并计算含量,结果表明重现性良好,RSD为1.08%。

3.4.4 含量测定 三批样品中甘草酸的含量分别为3.66%(批号20020723)、3.44%(20020911)、3.50%(20021221)。

4 药理实验

4.1 大鼠鼻黏膜急性毒性实验

甘辛喷雾剂对大鼠一日三次鼻腔给药,日给药量相当于临床推荐日用量的140倍。连续给药6d,处死大鼠取鼻中隔下段黏膜,常规切片HE染色,光镜观察受试组和阴性对照组鼻黏膜的形态变化。结果表明受试组和阴性对照组黏膜形态结构均无明显变化,观察结果两组间无明显差异。说明甘辛气雾剂对大鼠鼻黏膜无明显急性毒性作用。

甘辛喷雾剂对大鼠一日三次鼻腔给药,日给药量相当于临床推荐日用量的140倍。连续给药6d,处死大鼠取鼻中隔下段黏膜,戊二醛固定,制作电镜超薄切片,透射电镜观察受试组和阴性对照组鼻黏膜的细胞超微形态结构变化。结果受试组和阴性对照组黏膜形态结构均无明显变化,观察结果两组间无明显差异。说明甘辛气雾剂对大鼠鼻黏膜上皮细胞无明显急性毒性作用。

4.2 药效学实验

4.2.1 豚鼠鼻超敏反应实验模型的建立 按参考文献^[4]的方法,选用健康豚鼠,将10%TDI橄榄油溶液10 μ L,用加样器滴入豚鼠双侧前鼻孔(每侧5 μ L,每日一次),诱导豚鼠鼻超敏反应模型。

4.2.2 给药方法 实验分别进行。

实验一:选用健康豚鼠30只,雌雄各半体重为300~350g,诱导造成豚鼠鼻超敏反应模型。随机分为2组,每组15只,其中1组为空白对照组,除隔日给TDI外,还给橄榄油

每日两次,每次5 μ L;另1组为甘辛喷雾剂给药组,鼻孔内每日给药两次,每次每侧给予甘辛喷雾剂7 μ L;2组连续给药8d后,给药组分别给甘辛喷雾剂、空白对照组给橄榄油,30min后,再分别给TDI,每侧5 μ L,30min后,按400mg/kg戊巴比妥钠麻醉,剥去上腭骨部皮肤,沿右侧鼻中隔外侧前庭壁剪断,向上翻开暴露鼻中隔及双侧鼻腔。取上、中及鼻中隔前段黏膜,固定于10%中性福尔马林溶液中,1周后石蜡包埋,HE染色。光镜检查^[7-8]。

实验二:选用健康豚鼠50只,雌雄各半体重为300~350g,随机分为5组,每组10只,其中1组为健康动物组;另4组通过TDI诱导为超敏鼻炎模型动物组。(1)甘辛喷雾剂小剂量组,鼻孔内每日两次,每次每侧给予甘辛喷雾剂5 μ L;(2)甘辛喷雾剂大剂量组,鼻孔内每日两次,每次每侧给予甘辛喷雾剂10 μ L;(3)阳性对照组、迪通鼻炎水组,鼻孔内每日两次,每次每侧给予滴鼻剂10 μ L;(4)空白对照组,除隔日给TDI外,还给橄榄油每日两次,每次5 μ L;(5)健康动物对照组;不用致敏药,每日2次,每次每侧鼻内给橄榄油5 μ L。各组连续给药8d后,(高剂量组、低剂量组)分别给甘辛喷雾剂、(阳性对照组)给迪通鼻炎水、橄榄油(空白对照组、健康动物对照组)30min后,再分别给TDI(高剂量组、低剂量组、空白对照组、阳性对照组),每侧5 μ L,30min后,按400mg/kg戊巴比妥钠麻醉,剥去上腭骨部皮肤,沿右侧鼻中隔外侧前庭壁剪断,向上翻开暴露鼻中隔及双侧鼻腔。取上、中及鼻中隔前段黏膜,固定于10%中性福尔马林溶液中,1周后石蜡包埋,HE染色。任选10个高倍视野,光镜检查。

4.2.3 观察内容及方法

实验一:按照“可见观察指标(阳性)”和“未见观察指标(阴性)”运用 χ^2 检验,确切概率法进行统计学处理。

实验二:观察指标计算方法如下。

各种炎性细胞的浸润程度:“-”未见所要观察的细胞;“+”少数散落的细胞;“+++”占上皮的2/3以上。

上皮的化生程度:“+”小灶状或全部黏膜上皮的1/3以下;“+++”占全部上皮的2/3以上。

黏膜固有层的腺体增生程度:“+”腺体占黏膜固有层的1/3以下;“+++”占黏膜固有层的2/3以上。

4.2.4 结果 在光镜下观察鼻黏膜组织细胞的变化,甘辛喷雾剂及不同用药组的鼻黏膜呈现了不同的组织形态、结构变化,本实验观察了黏膜上皮及固有层的嗜酸性粒细胞、嗜中性细胞、淋巴细胞、浆细胞、腺体、上皮鳞状化生程度,结果见表1和表2。

由实验一结果观察可见,空白对照组黏膜上皮完整无脱落伴鳞状上皮化生,上皮下可见大量嗜酸及慢性炎症细胞浸润,腺体明显增生。给药组黏膜上皮完整无脱落伴适度鳞状上皮化生,上皮下有部分动物(4只)少量嗜酸性细胞及慢性炎症细胞浸润,少量动物(2只)有腺体增生现象,但是与空白组相比显著减轻。

由实验二结果观察可见,健康动物对照豚鼠鼻黏膜上皮部分完整,无糜烂,上皮下可见少量嗜酸性细胞,嗜中性细

表 1 甘辛喷雾剂对甲苯-2,4-二异氰酸酯诱导的超敏鼻炎模型豚鼠细胞及组织的影响(实验一)**Tab 1** Effects of the Ganxin spray on the cell and tissue of the TDI induced models of guinea pig's allergic rhinitis

组别	动物数	嗜酸性细胞		嗜中性细胞		淋巴浆细胞		腺体		上皮化生程度	
		阴性	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	轻度	中重度
给药组	14	9	4	8	6	12	2	12	2	5	8
空白对照组	13	0	13	6	7	1	12	1	12	3	10
χ^2 检验		$P < 0.01$				$P < 0.01$		$P < 0.01$			

注:表中缺失动物为实验中死亡造成

Note: The missing guinea pigs in the table died during experiment

表 2 甘辛喷雾剂对甲苯-2,4-二异氰酸酯诱导的超敏鼻炎模型豚鼠细胞及组织的影响(实验二)**Tab 2** Effects of the Ganxin spray on the cell and tissue of the TDI induced models of guinea pig's allergic rhinitis

组别	动物数	嗜酸性细胞			嗜中性细胞			淋巴浆细胞			腺体		上皮化生程度		
		+	++	+++	+	++	+++	+	++	+++	+	++	+++	轻度	中重度
健康动物对照组	9	3	0		1	0		5	0		4	1		5	4
空白对照组	7	0	7		4	0		0	7		6	1		2	5
大剂量组	5	1	1		3	0		1	0		1	0		2	3
小剂量组	6	1	1		3	0		1	0		1	0		3	3
阳性对照组	5	1	1		3	0		1	0		1	0		2	3

注:表中缺失动物为实验中死亡造成,“+”:细胞数量少于原有的1/3;“+++”:细胞数量不少于原有的2/3

Note: The missing guinea pigs in the table died during experiment

胞及少许其他炎症细胞,但淋巴细胞较多,黏膜固有层腺体增生,小血管扩张。而空白对照组黏膜上皮完整无脱落伴鳞状上皮化生,上皮下可见大量嗜酸及慢性炎症细胞浸润,腺体明显增生。甘辛喷雾剂小剂量组黏膜上皮完整无脱落伴适度鳞状上皮化生,上皮下少量嗜酸性细胞及慢性炎症细胞浸润,有腺体增生现象,但是与模型空白组相比显著减轻。甘辛喷雾剂大剂量组黏膜上皮较为完整,黏膜内可见少量嗜中性及嗜酸性细胞浸润,散在中性粒细胞,其程度与小剂量组无明显区别,腺体增生较轻。通鼻炎水组与模型空白组比较,黏膜上皮鳞状化生较重,偶尔见轻度糜烂,上皮下可见嗜酸性粒细胞多量、嗜中性细胞浸润,腺体轻度增生,与模型组比较,差异不明显。

5 讨论

变态反应型鼻炎属于 IgE 介导的 I 型变态反应,除特异的免疫机制外,还有神经,内分泌及炎症反应的参与,而用 TDI 为致敏物的动物鼻超敏反应模型反应出具有抗原性和非特异性刺激的双重特点,基本符合变应性的特征。据此,本实验建立了豚鼠鼻超敏反应的动物实验模型对甘辛喷雾剂进行鼻黏膜组织学结构和反应的观察。表 1 实验结果显示,TDI 致敏的鼻黏膜上皮嗜酸性粒细胞、淋巴细胞和浆细胞大量浸润,腺体明显增生,鼻黏膜组胺明显增加,表明了 I 型变态反应的参与。TDI 可致鼻黏膜炎症损伤和非特异性刺激,如果致敏剂量过大还可以引起呼吸道和肺的剧烈反应,使动物肺出血死亡,这一现象在实验一和实验二中都得到了证明。

依照中医理论,甘草具有抗炎解毒、益气补中等功效。辛夷则性温,有散风寒,通鼻窍等功能,且有收缩鼻黏膜血管和抗菌作用。从实验结果来看,表 1 表明甘辛喷雾剂给药组在使鼻黏膜上皮嗜酸性粒细胞、淋巴细胞、浆细胞,腺体增生上与空白对照组具有显著性差异($P < 0.01$)。表 2 结果可见

甘辛喷雾剂大小两个剂量与空白对照组相比,均在一定程度上使鼻黏膜上皮嗜酸性粒细胞、淋巴细胞、浆细胞和嗜中性粒细胞减少,腺体增生和分泌亢进得到有效的抑制,即抑制了 I 型变态反应的过程,与阳性对照药物和健康对照组结果基本相同。说明甘辛喷雾剂对过敏性鼻炎有积极的治疗意义。由于样本数偏少,未进行统计学处理。就作用机制而言,甘辛喷雾剂扶正祛邪,温阳固表治疗本病的可能途径有两个方面,一方面调整机体免疫状态,降低了机体对过敏原的易感性,收缩血管,控制炎症渗出和浸润,抑制肥大细胞脱颗粒;另一方面改善和修复细胞的结构和形态,恢复其生理功能,促进细胞新生,加强黏膜屏障,减少变态反应的发生。

参考文献

- [1] 洪文,陈必军. 中医药治疗过敏性鼻炎近况[J]. 山东中医杂志,1998,17(6):286.
- [2] 柳献云,夏锦平. 中药治疗过敏性鼻炎用药规律探讨[J]. 山西中医,1999,15(3):45.
- [3] 韩双红. 两种辛夷药理作用比较[J]. 中药材,1990,13(9):33.
- [4] 赵秀杰,董震,杨占泉,等. 鼻超敏反应实验模型的建立[J]. 中华耳鼻咽喉科杂志,1993,28(1):17.
- [5] 王荣,迟彦春,金银河. 甘草复方制剂中甘草酸含量的 HPLC 测定研究[J]. 中国药学杂志,1996,31(9):548.
- [6] 杨基森. 中药制剂设计学[M]. 贵州:贵州科技出版社,1992:42.
- [7] 王本祥. 现代中药药理学[M]. 天津:天津科学技术出版社出版,1999:1183-1189.
- [8] 钱颜方,孙海英,李炳文,等. 克鼻敏对豚鼠超敏鼻炎模型电镜光镜的病理观察[J]. 北京中医药大学学报,1999,23(6):36.

收稿日期:2004-09-29