

氩氛激光对兔房水中噻吗洛尔动力学的影响

翁信源、蒋芝荣、吕光明、郭叔坚、张小虎 (人民解放军第254医院, 天津300141)

提要 本文提出一种 Tim 在兔房水中 HPLC 测定法。以甲醇沉淀房水中蛋白, 反相 C_8 柱, 移动相为甲醇: $HCl\ 0.15 + NaCl\ 15\ mmol/L$ 水溶液(70:30, pH 4.0), 内标为 Pro. 以此法分析氩氛激光对 Tim 在兔房水中动力学影响, 结果激光可增加 Tim 在房水中生物利用度, 有利于提高滴眼剂的疗效。

关键词 噻吗洛尔; 普萘洛尔; 氩氛激光; 眼房水; 药物动力学; 高压液相色谱法

噻吗洛尔(timolol, Tim)治疗青光眼疗效较好。氩氛激光用于治疗各种眼病, 对眼组织的照射能引起血液动力学的变化, 改善局部循环, 有助于渗出的吸收和炎症的消退。以上两种治疗方法并用将会产生何种效果, 国内外均未见报道。本文探讨激光照射对 Tim 在房水内的动力学的影响。实验对象为兔, 以氩氛激光治疗仪距 10 cm 照射兔眼, 兔房水中 Tim

1985年11月4日收稿 1987年5月21日接受

的含量测定采用液相色谱法,因文献中仅见用气相色谱法⁽¹⁾。血浆中 Tim 浓度分析法,一般用气相色谱或质谱法⁽²⁻⁴⁾,而液相色谱法仅报道用于药物制剂的分析^(5,6)。为此我们首先探索了兔房水中 Tim 的 HPLC 法,然后用优选出的色谱条件,测定兔房水中的 Tim 的含量作动力学的观察。

方法与结果

兔房水中 Tim 含量的 HPLC 测定法

1. 兔 灰色,♀♂不限,体重 2.45 ± 0.27 kg。

2. 仪器 岛津液相色谱仪(LC-4 A 型),uv 检测仪 SPD-2 AS,进样器 SIL-1 A,色谱柱恒温室 CTO-2 AS,数据记录处理仪 C-R 2A (X),不锈钢色谱柱 ZORBAX-C₈ 4.6 mm I. D. × 25 cm。

3. 试剂、内标与移动相 甲醇:AR,天津市化学试剂二厂。氯化钠:GR,天津市化学试剂一厂。盐酸普萘洛尔 Pro(内标):药用规格,天津力生制药厂实验室提供。移动相组成:甲醇:HCl 0.15 + NaCl 15 mmol/L 水溶液(70:30 pH 4.0)。噻吗洛尔滴眼液:天津中央制药厂生产,浓度为 0.25%。

4. 房水试样处理与分析条件 取兔房水 0.10 ml,加入甲醇 0.23 ml,振荡 10 min,以 $1000 \times g$ 离心 10 min 后,用微量注射器吸取上清液 10 μ l 注入液相色谱仪。移动相流速 1 ml/min,色谱柱 ZORBAX-C₈ 置于 40°C,检测波长 295 nm, AUFS 0.005,记录纸速 5 mm/min。色谱图见图 1(A)。

另取兔房水 0.10 ml,加入 0.23 ml 甲醇(内含 Tim 165 ng 和内标 Pro 0.33 μ g,最终浓度 Tim 0.5 μ g/ml, Pro 1.0 μ g/ml)振荡 10 min,以 $1000 \times g$ 离心 10 min 后,以微量注射器吸取上清液 10 μ l,注入液相色谱仪,以下操作条件同上。色谱图见图 1(B),Tim 的保留时间 $t_R = 3.67$ min, Pro 的 $t_R = 4.40$ min,比较两个色谱图,可见上述色谱条件可以满足

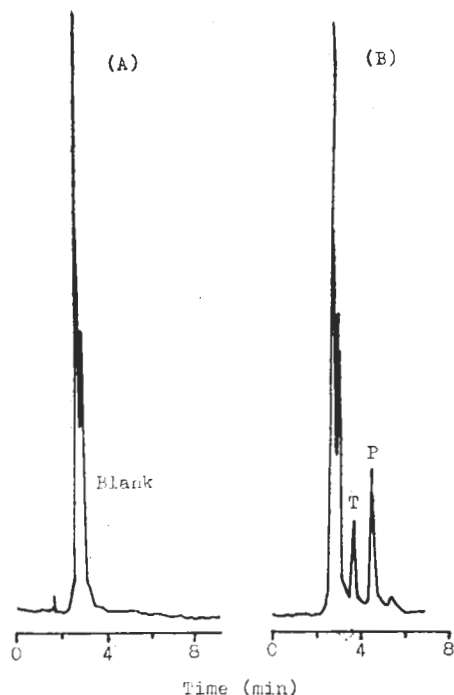


Fig 1. Chromatograms of (A) blank humor and (B) a humor containing timolol (T) and propranolol (P).

分析要求。

5. 标准曲线制作,变异性和方法的敏感度

5.1 Tim 贮备液的配制 称取马来酸噻吗洛尔 17.94 mg,置 50 ml 容量瓶中,用甲醇溶解并加至足量,混匀即得。

5.2 Pro 贮备液的配制 称取 Pro 17.94 mg 置 50 ml 容量瓶中,用甲醇溶解,并加至足量,混匀即得。

5.3 Tim 标准曲线的制作 取 6 个 10 ml 容量瓶,依次精密加入适量的 Tim 贮备液和 Pro 贮备液,然后用甲醇注入各容量瓶至刻度,混匀。各容量瓶含 Tim 依次为 0.07175, 0.1435, 0.7175, 1.435, 7.175, 71.75 μ g/ml, 含内标 Pro 前 2 管为 71.75 ng/ml, 第 3 - 5 管为 1.435 μ g/ml, 第 6 管为 71.75 μ g/ml。

另取 6 个 2 ml 带塞沉淀管中,分别精密吸取兔房水 0.1 ml,然后依法加入上述各标准稀释液 0.23 ml,振荡混匀 10 min,此时混合

液的甲醇与水比值为 70:30, Tim 浓度($\mu\text{g/ml}$)依次为 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 50.0. 内标 Pro 浓度($\mu\text{g/ml}$)前 2 管为 0.05, 第 3 - 5 管为 1.00, 第 6 管为 50.0(计算时均换算为 $1\mu\text{g/ml}$), 然后离心分离后, 用微量注射器吸取上清液 $10\mu\text{l}$, 注入液相色谱仪进行分析. 结果以峰高进行计算. Tim 与 Pro 的浓度比与测得的峰高比列表 1. 回归方程为 $y = 0.221 + 1.01x$, $r = 0.9999$, 检出限度为 $0.05\mu\text{g/ml}$. 经测定日间变异性, 浓度比为 0.5 时的变异系数 $CV = 2.36\%$, 浓度比为 1.0 时的变异系数 $CV = 1.21\%$.

Tab 1. Concentration ratios versus peak height ratios of timolol and propranolol in ocular humor of rabbits.

Concn ratio (x)	Peak height ratio (y)	
	$\bar{y} \pm \text{SD}$	CV%
0.05	0.0738 ± 0.0021	2.82
0.10	0.0966 ± 0.0030	3.06
0.50	0.604 ± 0.006	1.00
1.00	1.188 ± 0.007	0.59
5.00	5.94 ± 0.06	0.93
50.0	50.8 ± 1.2	2.36

6. 回收率试验 按标准液配制法配制含已知浓度的 Tim 和内标 Pro 的甲醇液, 依法测定, 得回收率见表 2. 加入 Tim 浓度在 $0.5 - 5\mu\text{g/ml}$ 间, 回收率在 $96.1 - 101.4\%$ 间基本上可符合分析要求.

Tab 2. Recovery of timolol in ocular humor of rabbits.

Timolol ($\mu\text{g/ml}$)		Recovery %	CV %
Added	Found($\bar{x} \pm \text{SD}$)		
0.5	0.507 ± 0.004	101.3	0.7
1.0	1.014 ± 0.018	101.4	1.8
5.0	4.806 ± 0.016	96.1	0.3

7. 房水样品测定 向兔眼框内滴入 Tim 滴眼液 3 滴后, 在规定时间内用生理盐水冲洗眼结膜, 然后抽取房水, 用刻度吸管量取房水, 每 0.1ml 加入含内标 Pro $1.435\mu\text{g/ml}$ 甲醇液 0.23ml (混合均匀后 Pro 浓度为 $1\mu\text{g/ml}$), 振

荡 10 min, 以 $1000 \times g$ 离心 10 min, 用微量注射器向液相色谱仪注入 $10\mu\text{l}$, 与制备标准曲线相同的条件进行分析, 结果见表 3. Tim 测定浓度在 $0.3 - 2.5\mu\text{g/ml}$ 之间, 变异系数 CV 在 $1.16 - 3.83\%$ 间, 精密度可符合要求.

Tab 3. Timolol ($\mu\text{g/ml}$) in humor of rabbits after ocular instillation.

Sample No	Concn($\bar{x} \pm \text{SD}$)	CV%
3	0.332 ± 0.010	3.08
8	0.84 ± 0.03	3.83
5	1.27 ± 0.02	1.60
20	2.516 ± 0.029	1.16

兔房水中用液相色谱法测定 Tim 的含量尚未见到报道, 本文提出用甲醇沉淀房水中蛋白, 以 C_8 柱作固定相, 甲醇:HCl $0.15 + \text{NaCl}$ 15mmol/L 水溶液(70:30, pH 4.0)作移动相, Pro 作内标, Tim 浓度在 $0.05 - 50\mu\text{g/ml}$ 间有良好线性关系, 检出限度为 $0.05\mu\text{g/ml}$.

移动相的表观 pH 值必须在 $4.0 - 4.2$ 间, pH 值偏高与偏低时, Tim 与 Pro 的吸收峰在短时间内不出现或峰形不好, Tim 可能仅出现一个马来酸的吸收峰.

移动相的甲醇比下降可使 Tim 与 Pro 的吸收峰分离更远些, 而且保留时间都将后推. 移动相中甲醇与水之比值与房水用甲醇沉淀后之醇水比值应相同, 否则就会出现一些负峰, 影响分离测定.

氩氦激光对家兔房水中 Tim 动力学的影响

1. 方法 试剂和步骤均同前, 氩氦激光治疗仪为北京朝阳光学仪器厂生产, 鹤立式, 输出功率 1mW , 激光照射距离 10cm .

兔 48 只, 匀分为 6 组. 双眼各滴入 3 滴 Tim 眼液, 一眼以氩氦激光照射 5 min, 另一眼不予照射作为对照. 在滴入眼液后于 5, 10, 15, 20, 40, 60, 90 和 120 min 时用 1ml 注射器抽取房水, 每只眼仅抽取一次. 房水样品置于 -2 至 $-4\text{ }^\circ\text{C}$ 保存, 即日或次日依法测定

其 Tim 的含量。

药-时曲线下面积(AUC)在实验时间内用梯形法计算。120 min 至 ∞ 之间用 C_n/K 计算。曲线后段以时间-浓度对数作图作线性回归,求得消除速率常数 K 值和 $t_{1/2}$ 。峰浓度 (C_{max}) 和达峰时间 (t_p) 由药-时曲线中获得。动力学参数的统计处理用配对 t 检验法。

2. 结果 从氩氦激光组和对 照组的房水样品中测得 Tim 浓度可各得 6 条 药-时曲线, 并计算药物动力学参数, 将 6 组的平均值列

Tab 4. Pharmacokinetic parameters calculated after application of 3 drops of 0.25% timolol ophthalmic solution to rabbit eyes, radiated by HeNe laser for 5 min. $n=6$, $\bar{x}\pm SD$, * $p<0.05$

Parameter	Control group	Laser group
$K(h^{-1})$	0.019 ± 0.006	0.027 ± 0.009
$K_d(h^{-1})$	0.12 ± 0.04	$0.07\pm 0.05^*$
$C_{max}(\mu g/ml)$	4.6 ± 2.2	7.1 ± 2.8
$t_p(min)$	17.5 ± 2.7	23 ± 8
$t_{1/2}(min)$	39 ± 12	29 ± 15
AUC^{0-120} ($\mu g\cdot min/ml$)	217 ± 58	$318\pm 101^*$
$AUC^{0-\infty}$ ($\mu g\cdot min/ml$)	257 ± 70	$353\pm 112^*$

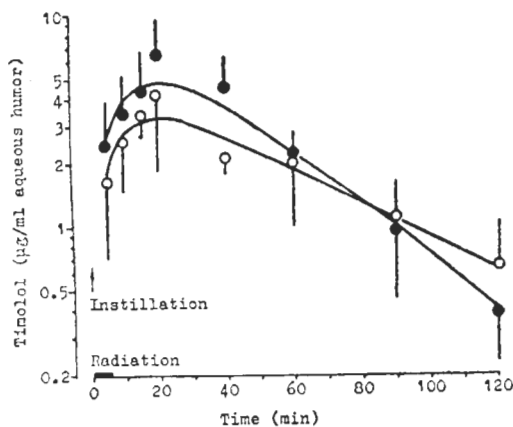


Fig 2. Timolol concentration in humor after instillation of 3 drops of 0.25% timolol to 6 rabbits. One eye in each rabbit was control (\circ); the other eye was radiated by He-Ne laser for 5 min (\bullet). $\bar{x}\pm SD$

表 4, 将每个时间点的 6 个数据的平均值作药-时曲线, 见图 2。

讨 论

比较激光组与对照组的药物动力学参数, 对照组的吸收速率常数比激光组的大, 但达峰时间, 峰浓度, 消除速率常数, 消除半衰期在两组间无显著性差异。从消除看两组区别不大, 从平均值看激光组的消除速率常数 K 大于对照组, 消除半衰期略小于对照组, 这与氩氦激光改善局部循环, 促使药物吸收入血是一致的。在 AUC^{0-120} 和 $AUC^{0-\infty}$ 上则激光组均高于对照组, 也即药物通过角膜透入房水中的量激光组大于对照组, 氩氦激光短时照射提高了药物的生物利用度, 这有利于提高滴眼剂的治疗效果。

综上所述, 适量的氩氦激光照射可有利于眼病的药物治疗。

参 考 文 献

- Schmitt C, Lotti VJ, Le Douarec JC. Penetration of five beta-adrenergic antagonist into the rabbits eye after ocular instillation. *Albirecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol* 1981; 217 : 167
- Fourtillan JB, Lefebvre MA, Girault J, Courtois Ph. Mass fragmentographic determination of timolol in human plasma and urine. *J Pharm Sci* 1981; 70 : 573
- Vermeij P, Sherbini-Schepers MEI, Van Zwieten PA. The disposition of timolol in man. *J Pharm Pharmacol* 1978; 30 : 53
- Tocco DJ, De Luna FA, Duncan AEW. Electroncapture GLC determination of timolol in human plasma and urine. *J Pharm Sci* 1975; 64 : 1879
- Arendt RM, Greenblatt DJ. Liquid chromatographic retention of β -adrenoceptor antagonists: an index of lipid solubility. *J Pharm Pharmacol* 1984; 36 : 400
- Patel BR, Kirschbaum JJ, Poet RB. High-pressure liquid chromatography of nadolol and other β -adrenergic blocking drugs. *J Pharm Sci* 1981; 70 : 336

Influence of He-Ne laser on pharmacokinetics of timolol in ocular humor of rabbits

WENG Xin-Yuan, JIANG Zhi-Rong, LÜ Guang-Ming, GUO Shu-Jian, ZHANG Xiao-Hu
(PLA 254th hospital, Tianjin 300141)

ABSTRACT A reverse-phase high-performance liquid chromatography for the determination of timolol concentration in humor of rabbits was developed. The humor samples were deproteinized with methanol containing propranolol for internal standard on reverse-phase column ZORBAX-C₈ at 40°C, using methanol: HCl 0.15 + NaCl 15 mmol/L in water (70:30, pH 4.0) as the mobile phase with variable wavelength uv detector at 295 nm. The assay method showed good peak height ratio, concentration linearity, precision and accuracy over the range of 0.05-50 µg/ml. The limit of detection was 0.05 µg/ml.

The influence of He-Ne laser on pharmacokinetics of timolol in humor of rabbits indicated that AUC⁰⁻¹²⁰ and AUC^{0-∞} of laser group were greater than those in the control group ($p < 0.05$). However, there were no significant differences between the elimination rate constant K , $t_{1/2}$, the peak concentration and the time of peak concentration of the 2 groups. Our data suggest that the option He-Ne laser radiance causes a higher bioavailability.

KEY WORDS timolol; propranolol; He-Ne laser; aqueous humor; pharmacokinetics; high pressure liquid chromatography