

# 星点设计-效应面法优化 $\alpha$ -细辛脑纳米粒原位凝胶的 处方及其体外释放性能考察

臧巧真<sup>1</sup>, 唐涛<sup>1</sup>, 龙凯花<sup>2</sup>, 王春柳<sup>2</sup>, 李晔<sup>2\*</sup>

(1. 陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712046; 2. 陕西省中医药研究院, 西安 710003)

**[摘要]** 目的: 优选温敏型 $\alpha$ -细辛脑纳米粒原位凝胶的处方并考察其体外释放行为, 为脑靶向性制剂的研究提供参考。方法: 以泊洛沙姆407和泊洛沙姆188质量分数为自变量, 胶凝温度为因变量, 通过多元线性回归及二项式拟合建立因变量与各自变量之间的数学关系, 采用星点设计-效应面法优选 $\alpha$ -细辛脑纳米粒原位凝胶的处方。以人工模拟鼻液为释放介质考察该制剂的体外释放特性。结果:  $\alpha$ -细辛脑纳米粒原位凝胶的最佳处方组成为21.85%泊洛沙姆407和3.8%泊洛沙姆188; 胶凝温度 $(33.7 \pm 0.1)^\circ\text{C}$ , 72 h内 $\alpha$ -细辛脑的累积释放量70.42%。结论: 温敏型 $\alpha$ -细辛脑纳米粒鼻用原位凝胶具有较好的缓释作用, 优选的处方可为 $\alpha$ -细辛脑新型给药途径制剂的开发提供参考。

**[关键词]**  $\alpha$ -细辛脑; 纳米粒; 原位凝胶; 体外释放度; 泊洛沙姆

**[中图分类号]** R283.6; R284.1; R451; O648.17 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)13-0007-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016130007

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160512.1608.016.html>

**[网络出版时间]** 2016-05-12 16:08

## Optimization of Formulation of $\alpha$ -Asarone Nanoparticles *in situ* Gel and Investigation of Its Release Properties

ZANG Qiao-zhen<sup>1</sup>, TANG Tao<sup>1</sup>, LONG Kai-hua<sup>2</sup>, WANG Chun-liu<sup>2</sup>, LI Ye<sup>2\*</sup>

(1. Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China;

2. Shaanxi Academy of Traditional Chinese Medicine, Xi'an 710003, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize formulation of thermo-sensitive *in situ* nasal gel of  $\alpha$ -asarone nanoparticles and investigate its *in vitro* release behavior. **Method:** With amounts of poloxamer 407 and poloxamer 188 as independent variables, gelation temperature as an dependent variable, multilinear and quadratic models were used to estimate the relationship between dependent variable and independent variables and to select the formulation by central composite design-response surface methodology. Artificial simulated nasal fluid was applied as release medium to study *in vitro* release characteristics of  $\alpha$ -asarone nanoparticles *in situ* gel. **Result:** Optimal formulation was as follows: poloxamer 407 of 21.85% and poloxamer 188 of 3.8%, gelation temperature was  $(33.7 \pm 0.1)^\circ\text{C}$ . Within 72 hours, accumulative release of  $\alpha$ -asarone was 70.42%. **Conclusion:**  $\alpha$ -asarone nanoparticles *in situ* gel possesses a superior sustained-release effect, the optimum formulation provides a basis for development of new administration routes and dosage forms of  $\alpha$ -asarone.

**[Key words]**  $\alpha$ -asarone; nanoparticles; *in situ* gel; *in vitro* release; poloxamer

$\alpha$ -细辛脑又名 $\alpha$ -细辛醚, 是天南星科植物石菖蒲的主要活性成分之一<sup>[1]</sup>。其临床治疗癫痫的效

**[收稿日期]** 20150818(008)

**[基金项目]** 陕西省重点科技创新团队计划项目(2012KCT-18)

**[第一作者]** 臧巧真, 在读硕士, 从事中药新型给药系统研究, Tel:029-87251837, E-mail: zangqiaozhen@163.com

**[通讯作者]** \*李晔, 硕士, 研究员, 从事中药新型给药系统研究, Tel:029-87251837, E-mail: liyelsj@163.com

果良好,可作为防止癫痫的首选药物<sup>[2]</sup>。目前市售的  $\alpha$ -细辛脑剂型有片剂、胶囊、注射液。由于  $\alpha$ -细辛脑的脂溶性极强,口服生物利用度极低,片剂、胶囊剂的生物利用度分别仅为 5.56% 和 2.73%<sup>[3]</sup>。

由于鼻腔与脑组织的生理联系,可使药物避开血脑屏障转运至脑,从而更好地发挥疗效<sup>[4]</sup>。纳米给药系统具有增溶难溶性药物、提高药物生物利用度的特点<sup>[5-6]</sup>,近年来受到越来越多的关注<sup>[7-9]</sup>。将纳米粒与温度敏感型凝胶材料结合制备载药纳米粒原位凝胶用于鼻腔给药,通过调节泊洛沙姆 407 和泊洛沙姆 188 的用量,使胶凝温度接近人体鼻腔温度(32~34℃)<sup>[10]</sup>,使其在室温时为溶液状态,给药后能迅速发生相变形成凝胶,延长药物在鼻黏膜滞留时间。本实验以泊洛沙姆 407 和泊洛沙姆 188 为基质制备  $\alpha$ -细辛脑纳米粒温度敏感型鼻用原位凝胶,通过星点设计-效应面法优化处方并考察其体外释放特性,为脑部疾病的治疗提供参考。

## 1 材料

1260 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),BP211D 型 1/10 万电子分析天平(德国赛多利斯天平有限公司),Synergy 型超纯水系统(美国 Millipore 公司),HJ-6 型多头磁力加热搅拌器(常州国华电器有限公司),TGL-18 型台式高速冷冻离心机(长沙英泰仪器有限公司),RC806D 型溶出试验仪(天大天发科技有限公司)。

透析袋(截留相对分子质量 8 kDa,国药集团化学试剂有限公司), $\alpha$ -细辛脑对照品(中国食品药品检定研究院,纯度 100%,批号 100298-201203), $\alpha$ -细辛脑原料药(湖北康宝泰精细化工有限公司,质量分数  $\geq 98.0\%$ ),泊洛沙姆 407(P407,美国 Sigma 公司),泊洛沙姆 188(P188,德国 BASF 公司),聚乙二醇单甲醚-(聚乳酸-羟基乙酸共聚物)(mPEG-PLGA)(50:50)(相对分子质量 20 kDa,山东济南岱罡生物技术有限公司),甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1  $\alpha$ -细辛脑纳米粒温敏型原位凝胶的制备** 采用纳米沉淀法制备  $\alpha$ -细辛脑纳米粒<sup>[11]</sup>。分别称取  $\alpha$ -细辛脑 68.10 mg 和 mPEG-PLGA 340.50 mg 溶于 30 mL 丙酮中,作为有机相,取 P188 0.06 g 溶于 30 mL 水中,作为水相。在匀速搅拌条件下,将有机相缓缓加至水相,经 40℃ 减压旋转蒸发除去丙酮,过 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜,得呈淡蓝色乳光的纳米粒胶束溶液。采用冷溶法制备纳米粒温敏型原位凝胶<sup>[12]</sup>。

将制备的  $\alpha$ -细辛脑纳米粒置于冰箱中,4℃ 冷藏 1 h,在磁力搅拌下缓慢加入 P407 和 P188,继续搅拌使其分散均匀,放入冰箱,4℃ 保存 >24 h,使泊洛沙姆充分溶胀,最终形成淡蓝色半透明的  $\alpha$ -细辛脑纳米粒温敏型原位凝胶溶液。

**2.2 胶凝温度的测定**<sup>[13]</sup> 取制备好的纳米粒凝胶溶液 2 mL 于西林瓶中,放入 20℃ 水浴锅中,西林瓶内液面低于水浴液面 1 cm,缓慢升温。每升高 0.1℃ 即倾斜西林瓶 45℃,观察液体流动情况,不再流动时的温度即为凝胶的相转变温度。

## 2.3 处方优化

**2.3.1 试验设计** 在单因素试验基础上,选取对凝胶胶凝温度影响较显著的 2 个因素,即 P407 和 P188 质量分数为自变量,二者取值分别为 18%~25%,0%~8%。根据星点设计原理,以胶凝温度为因变量,每个因素设 5 个水平,代码分别为  $\pm\alpha$ ,  $\pm 1$  和 0( $\alpha = 1.414$ ),试验安排及结果见表 1。

表 1  $\alpha$ -细辛脑纳米粒原位凝胶处方星点试验分析

Table 1 Central composite test analysis of formulation of  $\alpha$ -asarone nanoparticles *in situ* gel

No.	$X_1$ P407/%	$X_2$ P188/%	胶凝温度/℃
1	21.50	4.00	35.0
2	21.50	4.00	35.0
3	21.50	8.00	41.0
4	19.03	6.83	45.0
5	19.03	1.17	35.5
6	23.97	6.83	33.9
7	18.00	4.00	46.0
8	23.97	1.17	23.3
9	21.50	0	23.9
10	21.50	4.00	35.0
11	21.50	4.00	35.0
12	25.00	4.00	28.5
13	21.50	4.00	35.0

**2.3.2 模型拟合** 采用 Design-Expert 8.06 软件分别对因变量与各自变量的关系进行多元线性回归和二项式方程拟合,得多元线性方程  $Y = 79.126 - 2.427X_1 + 1.957X_2$  ( $r = 0.9528, P < 0.0001$ ),二项式方程  $Y = 156.849 - 9.736X_1 + 2.494X_2 + 0.039X_1X_2 + 0.166X_1^2 - 0.173X_2^2$  ( $r = 0.9952, P < 0.0001$ ),说明采用二项式方程拟合的效果较好。对二项式方程拟合模型进行方差分析,结果见表 2。

**2.3.3 效应面优化与预测** 应用 Design-Expert 8.06 软件绘制各自变量对响应值的三维效应面和二维等高线,见图 1。结果显示当 P188 质量分数不变,P407 质量分数增大时, $\alpha$ -细辛脑纳米粒凝胶溶

表 2 回归模型的方差分析

Table 2 Variance analysis of regression model

方差来源	SS	f	MS	F	P
模型	557.46	5	111.49	288.25	< 0.000 1
$X_1$	288.59	1	288.59	746.11	< 0.000 1
$X_2$	245.12	1	245.12	633.74	< 0.000 1
$X_1X_2$	0.30	1	0.30	0.78	0.405 9
$X_1^2$	7.22	1	7.22	18.67	0.003 5
$X_2^2$	13.27	1	13.27	34.31	0.000 6

液的胶凝温度呈下降趋势;当 P407 质量分数不变, P188 质量分数增大时,胶凝温度先升高后趋于平稳,与单因素试验一致。确定胶凝温度在 32 ~ 34 °C,得处方 1 ( $X_1 = 19.22\%$ ,  $X_2 = 0.50\%$ ), 处方 2 ( $X_1 = 20.14\%$ ,  $X_2 = 1.68\%$ ), 处方 3 ( $X_1 = 21.03\%$ ,  $X_2 = 2.22\%$ ), 处方 4 ( $X_1 = 21.85\%$ ,  $X_2 = 3.80\%$ ) 和处方 5 ( $X_1 = 22.36\%$ ,  $X_2 = 3.62\%$ )。

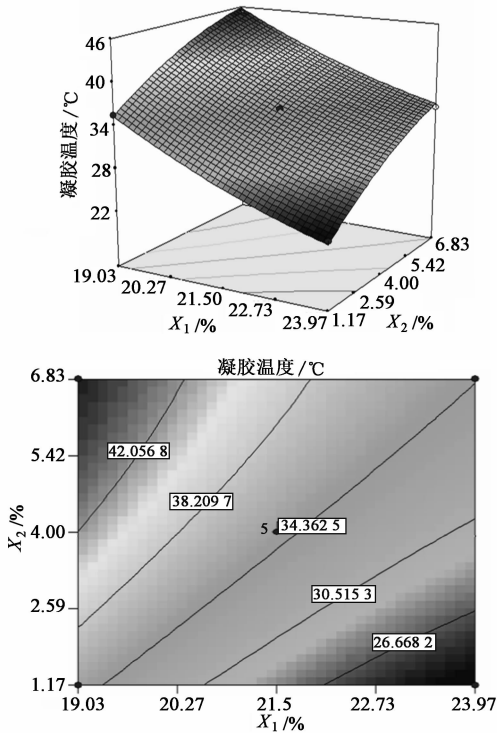


图 1 P407 和 P188 质量分数对  $\alpha$ -细辛脑纳米粒原位凝胶胶凝温度的响应曲面与等高线

Fig. 1 Response surface and contour of effects of amounts of P407 and P188 on gelation temperature of  $\alpha$ -asarone nanoparticles *in situ* gel

2.4 工艺验证 按上述的 5 个处方制备  $\alpha$ -细辛脑纳米粒原位凝胶,平行 3 份,测定胶凝温度,与模型预测值比较,见表 3。结果发现各处方的实测值与预测值差异较小,偏差均 < 5.0%,表明建立的模型预测性较好。其中处方 4 的实测值与预测值偏差最小,故选择处方 4 进行后续研究。

表 3  $\alpha$ -细辛脑纳米粒原位凝胶处方的验证试验 ( $n = 3$ )

Table 3 Verification test of formulation of  $\alpha$ -asarone nanoparticles *in situ* gel ( $n = 3$ )

处方	P407 /%	P188 /%	预测值 /°C	实测值 /°C	偏差 /%
1	19.22	0.50	32.7	33.8 ± 0.1	-3.36
2	20.14	1.68	33.2	32.5 ± 0.2	2.11
3	21.03	2.22	32.2	33.6 ± 0.1	-4.35
4	21.85	3.80	33.8	33.7 ± 0.1	0.30
5	22.36	3.62	32.3	33.7 ± 0.3	-4.33

注:偏差 = (预测值 - 实测值) / 预测值 × 100%。

## 2.5 体外释放性能考察

2.5.1 色谱条件 ZORBAX Extend-C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-水 (70:30), 检测波长 257 nm, 柱温 35 °C, 流速 1.0 mL · min<sup>-1</sup>, 进样量 10 μL。

2.5.2 标准曲线绘制 准确称取  $\alpha$ -细辛脑对照品 4.36 mg 置于 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容,得 436.00 mg · L<sup>-1</sup> 储备液。以透析介质为溶剂,配制质量浓度分别为 0.44, 1.09, 4.36, 21.8, 109.00, 218.00 mg · L<sup>-1</sup> 的  $\alpha$ -细辛脑对照品溶液,按 2.5.1 项下色谱条件测定,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程  $Y = 41.505X - 8.358$  ( $r = 0.9999$ ), 线性范围 0.44 ~ 218.00 mg · L<sup>-1</sup>。

2.5.3 精密度考察 精密吸取高、中、低质量浓度的  $\alpha$ -细辛脑对照品溶液适量,按 2.5.1 项下色谱条件连续 6 次进样,计算峰面积的 RSD 分别为 0.3%, 0.6% 和 0.1%,表明仪器精密度良好。

2.5.4 回收率测定 取适量空白凝胶,分别精密加入高、中、低质量浓度 (218.00, 109.00, 21.80 mg · L<sup>-1</sup>) 的  $\alpha$ -细辛脑对照品溶液 1 mL,用相应介质稀释并混匀,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,按 2.5.1 项下色谱条件测定,计算回收率分别为 99.64%, 99.60%, 101.04%, RSD 依次为 1.6%, 2.1%, 1.0%。

2.5.5 人工鼻液的配制<sup>[14]</sup> 精密称取磷酸二氢钾 13.6 g,溶于适量水中,搅拌使溶解,加水至 1 L,摇匀,加入 0.1 mol · L<sup>-1</sup> 氢氧化钠溶液调 pH 6.8。

2.5.6 体外药物释放 分别精密量取  $\alpha$ -细辛脑原料药溶液、纳米粒和纳米粒原位凝胶各 5 mL,置于透析袋中,将透析袋置于 500 mL 水浴温度 (33 ± 0.5) °C 的人工鼻液中,磁力搅拌转速 100 r · min<sup>-1</sup>,每隔一定时间点取样 2 mL,并补充等量同温度介质。按 2.5.1 项下条件测定,计算累积释放度,见图 2。结果显示与原料药相比,纳米粒及纳米粒原位凝胶的体外释放均较缓慢,均具有明显的缓释效果;而

纳米粒原位凝胶的释放与纳米粒相比得到了较为显著的延长,24 h 内纳米粒和纳米粒原位凝胶的累积释放量分别为 68.77% 和 45.71%。

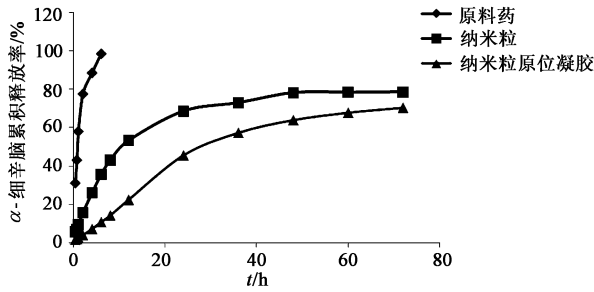


图 2  $\alpha$ -细辛脑原料药和不同剂型的体外释放曲线  
Fig. 2 *In vitro* release curves of  $\alpha$ -asarone and its different preparations

### 3 讨论

鼻腔给药系统是一种新型给药系统,由于鼻腔独特的生理解剖学特点,经鼻给药后药物可绕过血脑屏障靶向转运入脑<sup>[15-16]</sup>。因此研制  $\alpha$ -细辛脑鼻用制剂有望提高药物在脑部的浓度,从而更好地发挥疗效。 $\alpha$ -细辛脑是脂溶性极强的化合物,难溶于水,在水中溶解度仅  $0.09 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ <sup>[17]</sup>,将其制备成纳米粒后,药物的平均质量浓度  $(2.27 \pm 0.05) \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,显著增加了药物质量浓度。但鼻腔给药的局限性使得给药后药物很快会被黏膜纤毛清除系统清除,药物与鼻黏膜接触时间过短,在某种程度上会影响鼻腔给药的有效性。

温度敏感型原位凝胶,在室温下呈液体形式存在,给药后能在用药部位立即发生胶凝现象,从而延长药物的滞留时间<sup>[18]</sup>。本文制备了  $\alpha$ -细辛脑纳米粒原位凝胶,结合了纳米粒与原位凝胶的优点,在增加药物溶解度的同时,在鼻腔温度下能够发生相变形成凝胶,黏附在鼻黏膜表面,延长滞留时间,并减少药物的流失,增加药物的吸收,以期增加其脑靶向性。体外释药试验结果表明  $\alpha$ -细辛脑纳米粒原位凝胶缓释效果良好,可进一步延长药物的作用时间,后续实验将对其进行体内药代动力学研究,以验证其脑靶向性。

#### [参考文献]

[1] 杨云,冯卫生. 中药化学成分提取分离手册[M]. 北京:中国中医药出版社,2001:119.  
[2] 张蓓,王东凯,宋扬,等. 细辛脑脂质体的制备及封装率的测定[J]. 中国中药杂志,2007,32(1):67-68.  
[3] 杨正鸿,吴闯.  $\alpha$ -细辛脑在人体的生物利用度研究[J]. 中国医院药学杂志,1997,17(4):165-167.  
[4] Costantino H R, Illum L, Brandt G, et al. Intranasal

delivery: physicochemical and therapeutic aspects [J]. Int J Pharm, 2007, 337(1/2): 1-24.

[5] Li J, Feng L, Fan L, et al. Targeting the brain with PEG-PLGA nanoparticles modified with phage-displayed peptides [J]. Biomaterials, 2011, 32(21): 4943-4950.  
[6] Ragelle H, Riva R, Vandermeulen G, et al. Chitosan nanoparticles for siRNA delivery: optimizing formulation to increase stability and efficiency [J]. J Control Release, 2014, 176: 54-63.  
[7] Cooper D L, Hariforoosh S. Design and optimization of PLGA based diclofenac loaded nanoparticles [J]. PLoS One, 2014, 9(1): e87326.  
[8] Zhu H, Chen H, Zeng X, et al. Co-delivery of chemotherapeutic drugs with vitamin E TPGS by porous PLGA nanoparticles for enhanced chemotherapy against multi-drug resistance [J]. Biomaterials, 2014, 35(7): 2391-2400.  
[9] Ghasemian E, Vatanara A, Rouini M R, et al. Preparation, characterization and optimization of sildenafil citrate loaded PLGA nanoparticles by statistical factorial design [J]. Daru, 2013, doi: 10.1186/2008-2231-21-68.  
[10] 许润春,林彦君,吴品江. 中心复合设计-效应面法优化黄芩苷磷脂复合物鼻用原位凝胶的制备工艺[J]. 中草药, 2012, 43(6): 1092-1096.  
[11] Simsek S, Kurum B, Ulubayram K, et al. Brain targeting of Atorvastatin loaded amphiphilic PLGA-b-PEG nanoparticles [J]. J Microencapsul, 2013, 30(1): 10-20.  
[12] 魏刚. 体温敏感眼用凝胶的研究[D]. 沈阳:沈阳药科大学, 2002.  
[13] 姜杰,贾运涛,田睿,等. 眼用小檗碱白蛋白纳米粒温敏原位凝胶的制备及性质研究[J]. 中草药, 2013, 44(3): 277-281.  
[14] Washington N, Steele R J, Jackson S J, et al. Determination of baseline human nasal pH and the effect of intranasally administered buffers [J]. Int J Pharm, 2000, 198(2): 139-146.  
[15] Yu H, Kim K. Direct nose-to-brain transfer of a growth hormone releasing neuropeptide, hexarelin after intranasal administration to rabbits [J]. Int J Pharm, 2009, 378(1/2): 73-79.  
[16] 鞠凤,潘林梅,郭立玮,等. 经鼻给药  $\alpha$ -细辛脑 mPEG-PLA 微粒的制备与体外释放研究[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(24): 4847-4852.  
[17] 周晖.  $\alpha$ -细辛脑巴布剂的研究[D]. 沈阳:沈阳药科大学, 2004.  
[18] 陈两绵,王锦玉,仝燕,等. 黏膜给药原位凝胶的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(8): 76-80.

[责任编辑 刘德文]