

温敏型辛夷纳米凝胶的体内外释药规律研究

张 欣 吴 敏 阎秀菊 马 博

(上海交通大学医学院附属新华医院中医科, 上海, 200092)

摘要 目的:研究温敏型辛夷纳米凝胶在体内和体外的释药规律。方法:体内释药规律研究采用在体大鼠鼻腔灌洗法,体外释药规律研究采用 Franz 扩散池法,利用 HPLC 法进行测定。结果:体外释药实验表明温敏型辛夷纳米凝胶 12 h 累积释放率为 14%;采用动力学模型处理表明,温敏型辛夷纳米凝胶体内释药模式符合一级动力学过程,具有缓释效应。结论:温敏型辛夷纳米凝胶具备良好的缓释性能。

关键词 辛夷挥发油;纳米;温敏凝胶;体外释药;体内释药

Study on the Drug Release of Temperature-sensitive Nanogels of Magnolia in Vitro and in Vivo

Zhang Xin, Wu Min, Yan Xiuju, Ma Bo

(Department of Traditional Chinese Medicine, Xinhua Hospital affiliated to School of Medicine,
Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200092, China)

Abstract Objective: To study the drug release of temperature-sensitive nanogels of Magnolia in vitro and in vivo. **Methods:** We investigated the process of in vitro drug release of temperature-sensitive nanogel of Magnolia with Franz diffusion cell. The regulation of nasal absorption of temperature-sensitive nanogel of Magnolia was investigated by the rat in situ nasal deposit method. The method of HPLC was conducted. **Results:** The study on drug release in vitro showed that the cumulative release rate in 12 hours was 14%. The treatment of dynamic model showed that the absorption process of this preparation fitted the first-order dynamics process, with slow-release effect. **Conclusion:** Temperature-sensitive nanogels of Magnolia has satisfactory slow-release effect.

Key Words Magnolia volatile oil, Nano; Temperature-sensitive gel; In vitro release; In vivo release

中图分类号:R-332;R283.6 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2014.12.027

辛夷挥发油是辛夷的有效成分之一,具有良好的抗炎、抗过敏等作用,药理活性广泛^[1]。但由于其制剂粗糙,稳定性低,影响了辛夷的疗效发挥,限制了辛夷的临床应用^[2]。

前期研究^[3]采用纳米技术,已经制备出辛夷挥发油纳米脂质体,并证实其具有抗炎、抗过敏等作用,疗效优于辛夷挥发油,其纳米尺度效应可显著提升辛夷挥发油的药效。并在原有研究的基础上,创新性地采用冷冻干燥技术,将辛夷挥发油纳米脂质体制成冻干粉,以提高药物的稳定性,便于脂质体大量制备和长期保存。并且将温敏型高分子材料洛沙姆 407(F127)和泊洛沙姆 188(P188)引入鼻腔给药系统,制成温敏型复溶液,通过利用复溶液复溶辛夷纳米冻干粉,从而制备得辛夷纳米脂质体凝胶。该凝胶不仅具有一般鼻用制剂的优点,还可以明显延长药物在鼻腔的滞留时间,提高药物疗效。本实验旨在通过体内外不同的释药方法,研究温敏型辛夷纳米凝胶的释药模式,证实其缓释性能,为纳米中药的开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物 Wistar 大鼠,雄性,体重为 200~250 g。由新华医院实验动物中心提供,生产许可证号:

SCXK(沪)2002-0010;使用许可证号:SYXK(沪)2003-0031。适应性饲养 7 d。

1.2 试剂和仪器 温敏型辛夷纳米凝胶,自制;洛沙姆 407(P407/F127)/泊洛沙姆 188(P188):BASF 公司;Agilent Technologies 1200 系列高效液相色谱仪,美国安捷伦科技有限公司;Inertsil ODS-3 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm):Dikma 公司;半透膜(截留分子量 7000 μ),上海源聚生物科技有限公司;Franz 扩散池,上海黄河仪器仪表厂有限公司。

1.3 方法

1.3.1 体外释药模式的考察 本实验采用 Franz 扩散池法。在两池间固定半透膜(截留分子量为 7000 μ),温敏液约 1 mL,使其均匀分布在半透膜表面,放入 33℃ 烘箱中 5 min 使其形成凝胶。将扩散池放入 33℃ 水浴中,往接收池中加入已预热至 33℃ 的无水乙醇 5 mL 作为接收液,接收池中置一搅拌子以 300 r/min 的转速转动,分别于 5 min、10 min、20 min、30 min、1 h、2 h、4 h、6 h、8 h、10 h、12 h 分别取样 1 mL,而后迅速补加等量预热的无水乙醇。样品必要时适当稀释使浓度在标准曲线的范围内,采用 HPLC 法测定。

1.3.2 在体鼻腔吸收规律的考察

1) 实验动物模型及装置: 选择体重在 250 g 左右的健康雄性大鼠, 腹腔注射 2% 戊巴比妥钠 2.5 mL/kg。麻醉后切开颈部, 暴露气管和食管, 向气管中插入聚乙烯套管, 用相同直径的鼻腔套管由食管插向鼻腔后部, 将口、鼻腔相连的鼻腭进行封闭, 防止药液从口腔流出。用橡胶管与插入大鼠鼻腔后部的套管相连, 管子的另一端与清洗液(生理盐水)接触, 将盛有生理盐水的容器置于约 4℃ 的冷水浴中。本实验中采用单侧鼻腔给药的方式, 另一鼻孔用 502 胶封闭。给药后, 药物在鼻腔中滞留一定时间, 用电子蠕动泵使生理盐水从鼻孔中将药液冲出, 收集清洗液, 用 HPLC 法测定其中含药量。

2) 在体鼻腔清洗液用量的考察: 为了考察洗净鼻腔内残留药物需用的清洗液量, 向一侧鼻孔注入温敏溶液 20 μ L, 待形成凝胶后, 立刻由鼻腔套管以 2 mL/min 的流速灌注生理盐水。经多次试验表明, 至少需要 5 mL 的清洗液, 才可达到 93% 以上的回收率。所以鼻腔内残留药物需用的清洗液量为 5 mL 以上, 本实验选择清洗液体积为 6 mL。

3) 鼻腔清洗液的收集和测定: 单侧鼻腔给予温敏液 10 μ L, 待凝胶形成后, 用 6 mL 清洗液以 2 mL/min 流速冲洗大鼠鼻腔, 取滞留时间为 10 min、15 min、20 min、30 min、60 min、120 min 的清洗液, 补加生理盐水至 6 mL。采用 HPLC 法测定, 以外标法计算含量, 即为温敏凝胶的残余量, 吸收药量 = 给药量 - 残留药量。

1.3.3 高效液相色谱方法的建立

1) 色谱条件的选择: 用气相色谱 - 质谱法对辛夷挥发油化学成分进行分析, 共鉴定出 30 个成分, 占挥发油成分的 81% 以上, 主要包括桉油精、樟脑、 α -蒎烯等。本实验选用樟脑作为对照品, 建立 HPLC 法测定药物含量。

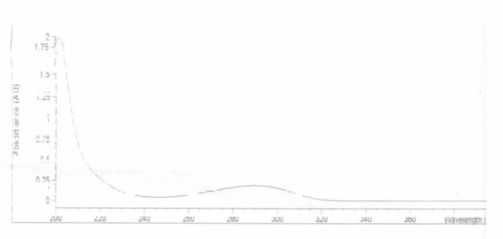


图 1 樟脑的紫外图谱

2) 检测波长的选择: 根据《中华人民共和国药典 2005 年版(二部)》, 紫外 - 可见分光光度法鉴别樟脑, 在 230 ~ 350 nm 的波长范围内测定吸光度, 在 289 nm 有最大吸收。配制浓度为 0.904 mg/mL 的樟脑溶液在 200 ~ 400 nm 波长范围内进行紫外扫描。结果见图 1。经多次扫描结果表明, 樟脑的最大吸收波长为

(202 $\pm$ 1) nm。虽然 202 nm 为末端吸收, 但灵敏度较高, 其吸光度约为 289 nm 的 8 倍左右, 所以波长选择 203 nm。色谱条件如下: 色谱柱: Inertsil ODS-3 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m), 流动相: 乙腈: 水 (80:20), 检测波长: 203 nm, 流速: 1.0 mL/min, 柱温: 室温, 进样量: 5 μ L。

在上述色谱条件下分别测定樟脑、鼻腔分泌物溶液及含有温敏型辛夷纳米凝胶的鼻腔分泌物溶液的色谱图, 见图 2 - 图 4。图 2 为樟脑溶液色谱图, 图 4 为含有温敏型辛夷纳米凝胶的鼻腔分泌物溶液的色谱图, 由图可见, 鼻腔分泌物对温敏型辛夷纳米凝胶的测定没有干扰。



图 2 樟脑色谱图

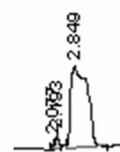


图 3 鼻腔分泌物色谱图



图 4 含药的鼻腔分泌物溶液的色谱图

3) 标准曲线的绘制: 精密称取樟脑对照品 9.04 mg 置于 10 mL 量瓶中, 加入无水乙醇溶解并稀释至刻度, 摇匀即得。精密吸取对照品溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.4 mL, 分别置于 2 mL 容量瓶中, 加无水乙

醇稀释至刻度,摇匀配成不同浓度的溶液。按照 HPLC 法进行测定,以樟脑峰面积为纵坐标,浓度为横坐标进行线性回归,绘制标准曲线,得回归方程 $y = 431.927x - 9.99$, $R^2 = 0.09998$ 。结果表明在浓度 $0.09 \sim 0.63$ mg/mL 范围内,峰面积与浓度具有较好的线性关系,结果见图 5。

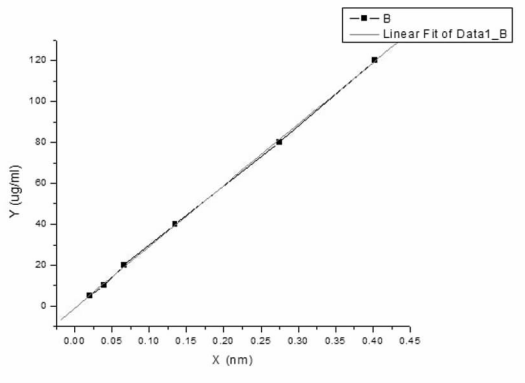


图5 樟脑的标准曲线

1.5 统计学方法 采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析,实验数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,多组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 温敏型辛夷纳米凝胶的体外释药考察 采用 Franz 扩散池法研究温敏型辛夷纳米凝胶的体外释放情况。计算累积释放量,见表 1。

表1 温敏型辛夷纳米凝胶体外释药结果 (mg/cm², n = 3)

时间	5 min	10 min	20 min	30 min	1 h	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h
累积释放量	1.32	1.62	1.83	2.1	2.37	2.73	3.0	3.3	3.6	3.9	4.2

由累积释放率对时间作图即可得体外释放曲线,进一步拟合找出释放规律。从试验结果来看,温敏型辛夷纳米凝胶释药模式具有分段性,前 30 min 符合 Higuchi 方程,以扩散过程为主,可能的原因是这段时间少量游离的辛夷油率先扩散到外面溶液中。30 min 后呈现零级释药模式,说明此时的凝胶可以连续稳态释药,辛夷油通过凝胶的控释作用释放,成为整个辛夷油释药的限速步骤。温敏型辛夷纳米凝胶 12 h 累积释放率为 14%。见图 6。

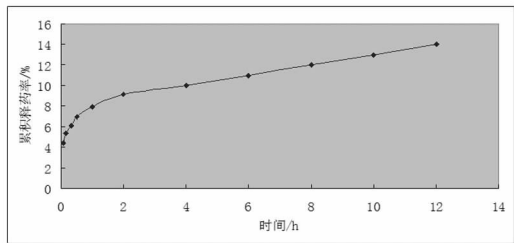


图6 温敏型辛夷纳米凝胶的释药曲线

将温敏型辛夷纳米凝胶在 4℃ 条件下密封储存,

平均分成 4 份,分别在不同时间考察其释药模式,结果发现避光、密封于 4 度冰箱条件下储存 1 周、2 周、1 个月的样品和新制备的样品相比释药模式无明显变化。见表 2。

表2 样品体外释药动力学参数

时间	Higuchi 模式 (0 ~ 30 min)		零级模式 (30 min 至 12 h)	
	k (% h ^{-1/2})	r	k (% h ⁻¹)	r
新制备	5.84	0.998	0.92	0.994
1 周	5.72	0.992	0.94	0.990
2 周	5.67	0.987	0.89	0.992
1 个月	5.61	0.989	0.88	0.988

2.2 在体鼻腔吸收规律研究 采用动力学模型处理,结果表明温敏型辛夷纳米凝胶的吸收符合一级动力学过程,表明其具有缓释效应。见表 3 和图 7。

表3 平均吸收药量 (μg, n = 3)

时间	10 min	15 min	20 min	30 min	60 min	120 min
吸收药量	0.7	1.4	2.2	2.8	3.7	4.4

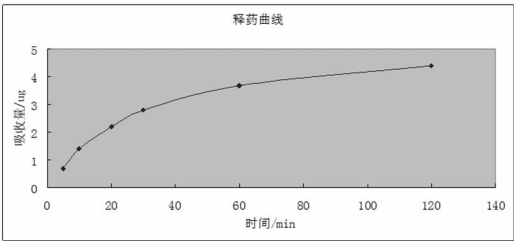


图7 温敏型辛夷纳米凝胶鼻腔吸收曲线

3 讨论

变应性鼻炎 (Allergic Rhinitis, AR) 是由免疫球蛋白 (IgE) 介导通过释放组织胺或其他化学活性物质诱发的鼻黏膜 I 型变态反应^[4]。目前缺少有效的治疗药物,特别是儿童变应性鼻炎患者,西医治疗的一线药物是鼻用糖皮质激素和抗组胺药物,虽然鼻用激素在治疗 AR 中的疗效确切,但并不能治愈 AR,而且停药后有反跳现象,特别是长期让患儿使用其累积的不良反应用不可忽视^[5]。中医药治疗变应性鼻炎具有疗效显著、不良反应较少的特点。辛夷是治疗变应性鼻炎的常用药物,具有祛风通窍的作用,其有效成分为挥发油,具有广泛的抗过敏药理活性^[6]。

纳米脂质体是以磷脂为主要材料制成的具有生物膜结构的双分子囊^[7],是一种新型的鼻腔给药载体。前期研究已经成功制备出辛夷挥发油纳米脂质体,既保持了辛夷的药理活性,又具备普通挥发油制剂没有的优势^[8]。辛夷纳米脂质体生物相容性好,脂质双分子层与生物膜有较大的相似性与组织相容性,易于被组织吸收,可减少对鼻黏膜的毒性和刺激^[9];其次,纳米脂质体保护药物不被鼻腔黏液中的酶降解,并且持

续释放包封药物,达到长效缓释的作用^[10]。

但是液态脂质体的贮存稳定性较差。在贮存过程中极易发生团聚、融合及药物渗漏^[11],且主要膜材磷脂易氧化、水解,难以满足药物制剂稳定性的要求,同时由于温度、光线等影响产生乳析、凝聚、融合、粒径变大等现象,这些变化都对脂质体的应用产生负面的效应,使应用受到了很大限制。为此,必须采用适当的方法来处理液态脂质体来提高其贮存稳定性。

低温冷冻干燥技术^[12]是提高蛋白、药物等生物活性物质和聚合物药物等体系贮存稳定性的有效手段。制成的冻干脂质体可显著降低磷脂和药物的水解和氧化速度,同时,冻干保护剂也保持了脂质体膜结构的完整性,克服脂质体聚集、融合及药物渗漏等不稳定因素^[13],显著提高贮存稳定性。目前,该法已成为改善脂质体制剂长期稳定性的方法之一。

临床治疗中亦发现,常用的滴鼻液由于鼻纤毛的清除功能,药物在鼻黏膜上停留时间短,仅有 15 ~ 30 min^[14]。因此在一定程度上影响了药物的吸收和疗效,且鼻腔容积较小,给药剂量有一定限制^[15]。凝胶剂用于鼻腔给药,具有一定的缓释作用,能使药物缓慢持续地被释放,增加了药物与鼻黏膜的接触时间^[16]。但是由于凝胶剂型质地黏稠,不易使凝胶药物进入鼻腔^[17]。如能将药物的易于给药性和凝胶剂的缓释性相结合,将会大大提升药物的生物利用度。因此我们创新性地制备温敏型辛夷纳米凝胶,通过温敏凝胶的控缓释系统,进一步提高辛夷挥发油的生物利用度。

本实验中通过体外释药实验研究温敏型辛夷纳米凝胶的控缓释性。研究结果显示 12 h 累积释药率为 14%,表明该温敏制剂具有明显的控缓释作用。采用大鼠在体鼻腔滞留法考察温敏型辛夷纳米凝胶的鼻腔吸收规律,结果显示符合一级动力学方程,表明该制剂具有缓释效应。

挥发油类中药占中药类的 35% 左右^[18],但因其易挥发、不稳定、刺激性大等缺点限制了临床的应用。我们应用现代纳米技术制备纳米中药,使其便于应用、贮存、运输,并且经过研究证明纳米尺度效应可显著提高

药物疗效。但是,纳米技术既是现在临床研究的热点也是难点,我们虽然已经取得了一定的成果,但本课题缺少临床药效学和毒理研究,应在后续研究中进一步展开,以便于应用临床。

参考文献

- [1] 管政,马小卓,吕圭源,等. 辛夷挥发油对变应性鼻炎大鼠 IL-12、IFN- γ 及组胺的影响[J]. 中药药理与临床,2011,27(2):70-72.
- [2] 李小莉,张永忠. 辛夷挥发油的抗过敏实验研究[J]. 中国医院药学杂志,2002,22(9):520-521.
- [3] 吴敏,马博,马碧涛,等. 辛夷挥发油纳米脂质体的制备及体外释放的研究[J]. 中医导报,2010,16(12):79-83.
- [4] 张星煜,张丕华,黄春龙. 变应性鼻炎与细胞因子免疫研究综述探讨[J]. 吉林医学,2014,35(3):594-595.
- [5] 田翠玲,万学梅,李瑛,等. 类固醇激素在变应性鼻炎中的局部应用现状[J]. 西部医学,2008,20(2):409-410.
- [6] 王永慧,叶方,张秀华. 辛夷药理作用和临床应用研究进展[J]. 中国医药导报,2012,9(16):12-14.
- [7] 胡鹏翼,郑琴,陈慧,等. 槐定碱纳米脂质体在大鼠体内药代动力学及组织分布研究[J]. 中国新药杂志,2012,21(22):2661-2666.
- [8] 吴敏,刘娟,张欣. 辛夷挥发油纳米脂质体的制备工艺研究[J]. 中西医结合学报,2007,5(3):314-319.
- [9] 路薇薇,吴敏,奚政君,等. 辛夷挥发油纳米脂质体的毒性研究[J]. 上海交通大学学报:医学版,2007,27(6):689-694.
- [10] 徐勇军,马波,代云波,等. 流感疫苗脂质体干粉黏膜免疫研究[J]. 苏州大学学报:医学版,2012,32(4):499-503.
- [11] CHARNVANICH D, VARDHANABHUTI N, KULVANICH P. Effect of cholesterol on the properties of spray-dried lysozyme-loaded liposomal powders [J]. AAPS Pharm SciTech,2010,11(2):832-842.
- [12] 王健,李明轩. 冷冻干燥对提高脂质体稳定性的研究概况[J]. 中国医药工业杂志,2005,36(9):576-579.
- [13] 林虎,渠晨曦,俞毅杰,等. 冬凌草甲素长循环冻干脂质体的制备及大鼠体内药动学研究[J]. 浙江大学学报:医学版,2013,42(6):638-843.
- [14] Behl CR, PimPlaskar HK, Sileno AP, et al. Effects of Physiochemical Properties and other Factors On systemic nasal drug delivery [J]. Adv Drug Del Rev,1998,29(1-2):89-116.
- [15] 魏刚,徐晖,郑俊民. 原位凝胶的形成机制及在药物控制释放领域的应用[J]. 中国药理学杂志,2004,38(8):564-568.
- [16] 崔海珍,刘福强,王艳萍,等. 银杏叶鼻用原位凝胶的制备及体外吸收研究[J]. 药学实践杂志,2010,28(2):118-121.
- [17] 李洪斌,王艳萍,刘福强,等. 银杏叶提取物温度敏感型鼻用原位凝胶的研究[J]. 解放军药学报,2013,29(6):515-519.
- [18] 施峰,赵继会,郭腾,等. 中药挥发油纳米给药系统的研究进展[J]. 中国药房,2013,24(15):1429-1431.

(2014-03-17 收稿 责任编辑:曹柏)

(上接第 1661 页)

- [8] 段永红. 1696 张门诊中成药处方点评与分析[J]. 中国医院用药评价与分析,2014,14(2):166-168.
- [9] 魏悦. 天津市儿童医院门、急诊门诊要处方分析[J]. 儿童药学杂志,2014,20(1):43-45.
- [10] 阮贤妹,裴道孙. 福州市第一医院 2011 年儿科门诊中成药使用分析[J]. 儿科药学杂志,2013,19(4):39-40.
- [11] 张伶俐,李幼平,梁毅,等. 全球住院儿童超说明书用药现状的系统评价[J]. 中国循证医学,2012,12(2):176-187.

- [12] 杨冬梅,蒋磊,张雪芹. 药品说明书中特殊人群用药标准情况统计分析[J]. 中国药房,2010,21(17):1630-1632.
- [13] 徐丽丽,张立斌,吴文飞,等. 基于超说明书用药潜在安全隐患的思考及管理对策[J]. 药学服务于研究,2013,13(5):347-349.
- [14] 张伶俐,李幼平,曾力楠,等. 15 国超说明书用药政策的询证评价[J]. 中国循证医学杂志,2012,12(4):426-435.
- [15] 黄瑾. 超说明书用药的理论研究[J]. 中国医学伦理学,2011,24(1):6-8.

(2014-07-01 收稿 责任编辑:洪志强)