

• 药剂与工艺 •

星点设计-效应面法优化芷芎散温敏凝胶的处方及其鼻黏膜渗透特性研究

卢浩扬, 林媛媛, 车俊秀, 曾维东, 陈 宝, 吴传斌, 徐月红*

中山大学药学院, 广东 广州 510006

摘要: 目的 制备并优化芷芎散鼻用温敏凝胶的处方, 并考察其体外释放机制和鼻黏膜渗透特性。方法 利用星点设计-效应面法优化泊洛沙姆温敏凝胶基质处方, 然后经 Franz 扩散池法考察欧前胡素、阿魏酸的体外释放机制及其离体家兔鼻黏膜渗透特性。结果 最优处方为泊洛沙姆 407 (P407) 20%、泊洛沙姆 188 (P188) 6.5%, 欧前胡素接近零级释放模型, 阿魏酸接近 Higuchi 模型, 处方对欧前胡素和阿魏酸的透过鼻黏膜均具有促进作用。结论 优化所得的处方为芷芎散新给药途径制剂的开发提供基础。

关键词: 白芷; 川芎; 泊洛沙姆; 温敏凝胶; 体外释放; 鼻黏膜渗透性

中图分类号: R283.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2014)13-1845-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.13.007

Optimization for formulation of Zhi Xiong San thermo-sensitive gel by central composite design-response surface method and study on characterization of its nasal mucosal permeability

LU Hao-yang, LIN Yuan-yuan, CHE Jun-xiu, ZENG Wei-dong, CHEN Bao, WU Chuan-bin, XU Yue-hong

School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective To prepare and optimize the formulation of intranasal thermo-sensitive gel of Zhi Xiong San and to evaluate its *in vitro* release mechanism and nasal mucosa permeability. **Methods** The formulations of poloxamer thermo-sensitive gel were optimized by a central composite design-response surface method and its *in vitro* release mechanism and nasal mucosa permeability were evaluated by Franz diffusion chambers. **Results** The optimal formulation was Poloxamer 407 (P407) 20% and Poloxamer 188 (P188) 6.5%. Imperatorin was released from the thermo-sensitive gels approximately with a zero-order mechanism, while ferulic acid with a Higuchi model. The formulation demonstrated the enhancement of nasal mucosa permeability. **Conclusion** The optimal formulation provides a basis for the development of new administration routes and dosage forms of Zhi Xiong San.

Key words: *Angelicae Dahuricae Radix*; *Chuanxiong Rhizoma*; Poloxamer; thermo-sensitive gel; *in vitro* release; nasal mucosal permeability

偏头痛是由多种因素引起的单侧或双侧搏动性头痛, 常伴随恶心、呕吐、畏光、畏声等症状, 是严重影响患者生活质量的原发性头痛之一^[1]。芷芎散为中医经典《普济方》(明)卷四十六中所收载的主治头风(偏头痛)的方剂, 由白芷 *Angelicae Dahuricae Radix*、川芎 *Chuanxiong Rhizoma* 药对等

份组成^[2], 其疗效确切, 组方简单, 中医临床上已被广泛用于偏头痛的预防和治疗, 目前给药方式仍局限于口服给药。近年来, 通过鼻腔给药的脑靶向药物传递已成为国内外研究的热点。由于鼻腔与脑组织的生理联系, 药物可通过嗅神经和三叉神经进入脑部, 从而避开血脑屏障, 可更好地发挥疗效^[3]。

收稿日期: 2014-01-19

基金项目: 广东省科技计划项目(2010B030700009024)

作者简介: 卢浩扬(1989—), 男, 硕士在读, 研究方向为中药现代化。Tel: (020)39943060 E-mail: lhy200801@163.com

*通信作者 徐月红(1969—), 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事药物新剂型与新技术研究。

Tel: (020)39943119 E-mail: lssxyh@mail.sysu.edu.cn

原位凝胶是一种新的给药剂型,它以溶液状态给药,到达用药部位后立即发生相变形成凝胶,从而延长药物的滞留时间^[4-5],根据触发相变的条件,可分为温度敏感型、离子敏感型和 pH 敏感型原位凝胶。泊洛沙姆是一类聚氧乙烯(PEO)-聚氧丙烯(PPO)嵌段共聚物,具有较好的生物相容性,现已广泛用作温敏凝胶的基质材料^[6]。其中泊洛沙姆 407(P407)最为常用,它的水溶液具有受热方向胶凝的性质,然而,单一的 P407 溶液胶凝温度较低,因此常加入少量泊洛沙姆 188(P188)调节胶凝温度使其接近人体鼻腔温度(33℃左右)^[7],从而延长药物在鼻黏膜的滞留时间。

本研究将芷芎散的适应症和鼻腔给药的优点相结合,以更好地发挥其治疗偏头痛的作用,采用星点设计-效应面法优化芷芎散温敏凝胶处方,并考察其体外释药机制和鼻黏膜渗透性,为其鼻腔给药制剂的开发提供基础。

1 仪器与材料

DV—III ULTRA 型流变仪,美国 Brookfield 公司;JY92—2D 型超声波细胞破碎仪,山东鄞城华鲁仪器公司;TK—12D 型透皮扩散仪,上海锴凯科技贸易有限公司;LC—15C 高效液相色谱仪,日本岛津公司。

白芷 *Angelicae Dahuricae Radix* (批号 YPAOG0001)、川芎 *Chuanxiong Rhizoma* (批号 20100801) 药材均购自广州采芝林药业有限公司,经中山大学药学院天然药物与中药研究所赵志敏讲师鉴定,所用药材均符合《中国药典》2010 年版要求;P188、P407,德国 BASF 公司;大孔吸附树脂 HPD100,沧州宝恩化工有限公司;欧前胡素,质量分数 98%,上海顺勃生物工程有限公司;阿魏酸,质量分数 98%,南京泽朗医药科技有限公司。新西兰家兔,广州中医药大学实验动物中心,许可证号 SCXK(粤)2008-0020;透析膜,截留相对分子质量 14 000,美国 Viskase 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 芷芎散提取物的制备

取 100 g 芷芎散药材粉末(白芷、川芎质量比 1:1),加入 800 mL 蒸馏水,水蒸气蒸馏 8 h 提取挥发油,挥发油提取率为(0.34±0.08)%,经水蒸气蒸馏提取过的药材再用 250 mL 95%乙醇超声提取 3 次,每次 20 min,合并提取液,上大孔吸附树

脂柱,用水-乙醇梯度洗脱得芷芎散醇提取物,提取率为(0.59±0.02)%,其中欧前胡素和阿魏酸质量分数分别为(1.01±0.27)%和(2.35±0.08)%。芷芎散提取物由挥发油和醇提取物合并构成。

2.2 处方优化

2.2.1 温敏凝胶的制备 采用低温溶解法,取处方量 P188 溶于蒸馏水中,在不断搅拌下缓慢加入 P407,继续搅拌使其分散均匀,4℃保存 24 h,使泊洛沙姆充分溶胀,得空白温敏凝胶。将芷芎散提取物与空白凝胶混合分散均匀,得橙黄色乳浊状含药温敏凝胶。

2.2.2 胶凝温度(T_{gel})的测定 采用黏度法^[8],取液体状态的温敏凝胶于流变仪样品池中,以 0.5~1℃/min 的速率缓慢升温,测定 10~40℃各温度点的黏度,当黏度发生突跃时的温度即为胶凝温度。

2.2.3 星点设计-效应面法优化温敏凝胶基质处方 为确定 P407 和 P188 的范围,先分别制备不同质量分数的 P407 和 P188 水溶液并测定其 T_{gel} ,结果显示,随着质量分数的增大,P407 和 P188 水溶液的 T_{gel} 均降低,当 P407 质量分数为 16%时即可形成凝胶,且 T_{gel} 较低,而 P188 质量分数需达到 30%才能形成凝胶,且 T_{gel} 过高,故采用 P407 为主要基质,用少量 P188 调节 T_{gel} 。根据星点设计的原理^[7,9],以 P407 的质量分数(X_1)和 P188 的质量分数(X_2)为考察因素,根据单因素考察的结果,确定 X_1 的范围为 15%~21%, X_2 的范围为 0~15%,各因素设置 5 个水平,其代码分别为 $\pm\alpha$ 、 ± 1 和 0,本实验为 2 因素的星点设计,因而 $\alpha=1.414$ 。各因素水平安排见表 1,具体实验设计方案与结果见表 1。以 X_1 和 X_2 为自变量, T_{gel} 为因变量,使用 SPSS 18.0

表 1 星点设计安排与结果

Table 1 Central composite design and results

编号	X_1 / %	X_2 / %	T_{gel} / °C
1	20.12 (+1)	12.80 (+1)	32.9±0.1
2	20.12 (+1)	2.20 (-1)	26.2±0.1
3	15.88 (-1)	12.80 (+1)	43.6±0.2
4	15.88 (-1)	2.20 (-1)	42.3±0.1
5	21.00 (+1.414)	7.50 (0)	31.9±0.2
6	15.00 (-1.414)	7.50 (0)	48.9±0.2
7	18.00 (0)	0 (-1.414)	38.0±0.2
8	18.00 (0)	15.00 (+1.414)	26.5±0.1
9~13	18.00 (0)	7.50 (0)	39.6±0.2

对结果进行二次多项式模型拟合, 结果如下 $Y=128.44-7.29 X_1+0.55 X_2+0.09 X_1^2-0.14 X_2^2+0.12 X_1 X_2$ ($R^2=0.9867$, $P<0.01$)。

由拟合得到的模型绘制效应面图(图1), 结果可见随着 P407 质量分数增加, T_{gel} 呈下降趋势, 而 P188 则低质量分数使 T_{gel} 升高, 高质量分数使 T_{gel} 降低。根据拟合结果, 确定 T_{gel} 为 33 °C, 在 15~21 °C 改变 X_1 的值, 计算出对应的 X_2 值。当 $X_1<17\%$ 时, 对应的 X_2 值过高(超过 15%), 当 $X_1>20\%$ 时, 无论如何改变 X_2 的值均无法使 $T_{gel}=33$ °C。在 17%~20% 范围内改变 X_1 的值, 计算得以下 5 个处方: 处方 1 (X_1 17%, X_2 0.5%), 处方 2 (X_1 18%, X_2 2.3%), 处方 3 (X_1 19%, X_2 4.2%), 处方 4 (X_1 20%, X_2 6.5%), 处方 5 (X_1 20%, X_2 14%)。

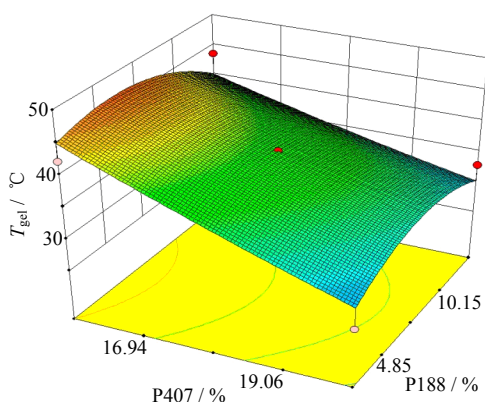


图1 T_{gel} 随 P407 和 P188 质量分数变化效应面图

Fig. 1 Response surface plot of T_{gel} with P407 and P188 content changes

将以上处方按 100 g 芷芎散原药材提取所得提取物载到 20 g 温敏凝胶的载药量制备含药温敏凝胶, 平行 3 份, 分别测定载药前和载药后的 T_{gel} , 结果见表 2。由表 2 的结果可得出处方 3、4 载药后 T_{gel} 变化相对较小, 接近人体鼻腔温度, 因此选择这 2 个处方进行后续研究。

表 2 星点设计优化所得处方的验证

Table 2 Validation of gel formulations optimized by central composite design

处方	P407 / %	P188 / %	T_{gel} / °C	
			载药前	载药后
1	17	0.5	30.1±0.3	23.2±0.2
2	18	2.3	33.8±0.6	27.2±0.5
3	19	4.2	34.1±0.3	29.5±0.2
4	20	6.5	34.6±0.2	30.4±0.6
5	20	14.0	35.1±1.5	28.1±0.8

2.3 样品测定方法

2.3.1 欧前胡素的测定^[10] 采用 HPLC, 色谱柱为 BDS HYPERSIL C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm, Thermo Scientific), 流动相为甲醇-水 (62:38), 体积流量 1 mL/min, 紫外检测波长 300 nm, 进样量 20 μL, 40 °C 下测定。该方法具有较好的专属性, 在 0.05~15 μg/mL 具有良好的线性, 标准曲线为 $Y=67\,651 X-3\,024$ (X 代表欧前胡素质量浓度, Y 代表峰面积), $R^2=0.9997$, 日内和日间精密度 RSD 分别为 0.78% 和 1.81%; 平均回收率为 98.6%, RSD 为 2.43%; 重复性 RSD 为 0.78%。

2.3.2 阿魏酸的测定^[10] 采用 HPLC, 色谱柱为 Welchrom C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm, Welch Materials), 流动相为甲醇-1%乙酸 (30:70), 体积流量 1 mL/min, 紫外检测波长 322 nm, 进样量 20 μL, 40 °C 下测定。该方法具有较好的专属性, 在 0.05~10 μg/mL 具有良好的线性, 标准曲线为 $Y=130\,386 X-4\,360$ (X 代表阿魏酸质量浓度, Y 代表峰面积), $R^2=0.9999$, 日内和日间精密度 RSD 分别为 0.34% 和 1.99%; 平均回收率为 102.2%, RSD 为 1.84%; 重复性 RSD 为 0.34%。

2.4 体外释放机制研究

采用 Franz 扩散池法^[11], 将透析膜固定于 Franz 扩散池中间, 称取载药凝胶 0.1 g 于供给池中, 以含 20% PEG 400 的 Ringer's 液 (NaCl 8.5%, KCl 0.03%, CaCl₂ 0.033%) 为释放介质^[12], 调节扩散仪水浴温度为 33 °C, 搅拌子转速为 300 r/min, 分别于 15、30 min 及 1.0、1.5、2.0、3.0、4.0、6.0、8.0、12.0、24.0 h 于接收池中取样 1 mL, 并补足接收液体积, 测定各时间点欧前胡素和阿魏酸的质量浓度, 计算累积释放度, 以时间为横坐标、累积释放度为纵坐标绘制欧前胡素和阿魏酸的释放曲线(图 2)。

由图 2 可见欧前胡素和阿魏酸分别于 12、8 h 释放完全, 且 2 个处方的释放行为相似。将得到的数据用以下半经验方程(用于描述聚合物系统的释药机制)进行拟合^[13]: $M_t/M_\infty=kt^n$, $\log(M_t/M_\infty)=\log k+n \log t$, 其中 M_t/M_∞ 为累积释放度, k 为释放常数, n 为释放指数。当 $n=0.5$ 时, 药物释放遵循 Fick 扩散定律 (Higuchi 模型), 当 $n=1.0$ 时为零级释放, 若 n 介于 0.5 和 1.0 之间则是 2 种机制的综合。根据拟合结果计算 k 、 n 值, 结果见表 3, 由结果可见欧前胡素接近零级释放模型, 阿魏酸接近 Higuchi 模型。

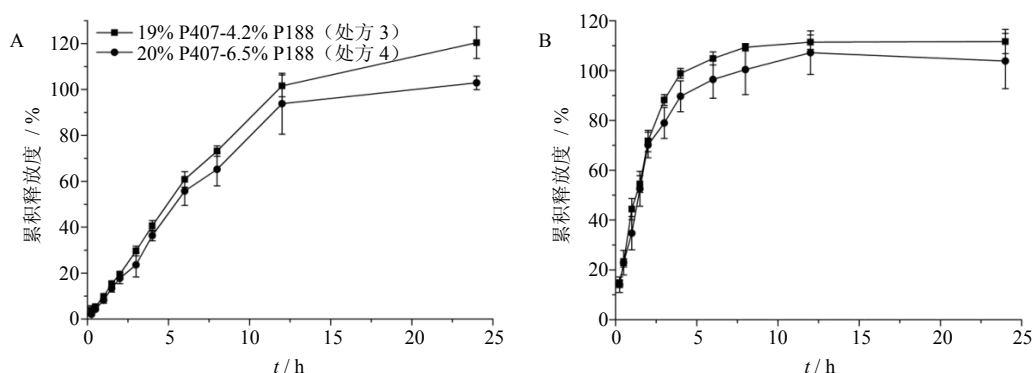


图2 欧前胡素 (A) 和阿魏酸 (B) 累积释放曲线

Fig. 2 Cumulative release profiles of imperatorin (A) and ferulic acid (B)

表3 欧前胡素和阿魏酸释放模型拟合参数

Table 3 Fitting parameters of imperatorin and ferulic acid release model

处方	欧前胡素		阿魏酸	
	<i>n</i>	<i>k</i>	<i>n</i>	<i>k</i>
3	0.893	11.194	0.553	39.084
4	0.995	8.531	0.547	36.475

2.5 离体家兔鼻黏膜渗透性研究

耳缘 iv 过量乌拉坦将家兔致死, 取下家兔鼻腔前部, 沿鼻中隔小心剥离两侧的鼻黏膜, 立刻浸没在冷冻的 Ringer's 液中, 备用^[14]。

采用改良 Franz 扩散池法, 用玻璃导管 (内径 0.42 cm) 代替供给池, 将家兔鼻黏膜固定于供给池下方, 称取载药凝胶 0.05 g 于供给池中, 接收池加入 4 mL Ringer's 液 (含 20% PEG 400), 调节供给

池位置至家兔鼻黏膜刚好与接收液液面接触, 同时以芷芎散提取物为对照 (控制原药材的量相同)。

设定扩散仪水浴温度为 33 °C, 搅拌子转速为 300 r/min, 分别于 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、6.0、8.0、12.0、24.0 h 从接收池中取样 1 mL, 并补足接收液体积, 测定各时间点欧前胡素和阿魏酸的质量浓度, 计算累积渗透量 (*Q*), 以时间为横坐标、*Q* 为纵坐标, 绘制欧前胡素和阿魏酸的经鼻黏膜渗透曲线 (图 3), 得到的结果用以下方程计算表观渗透系数 (P_{app})^[15]: $P_{app} = (dQ/dt)(1/AC_0)$, 其中 dQ/dt 为稳态渗透速率, 即累积渗透曲线的斜率, *A* 为有效渗透面积, *C*₀ 为供给池初始质量浓度。

结果见表 4, 欧前胡素和阿魏酸均表现为芷芎散温敏凝胶渗透速率比芷芎散提取物快, 而处方 3、4 无明显差异。

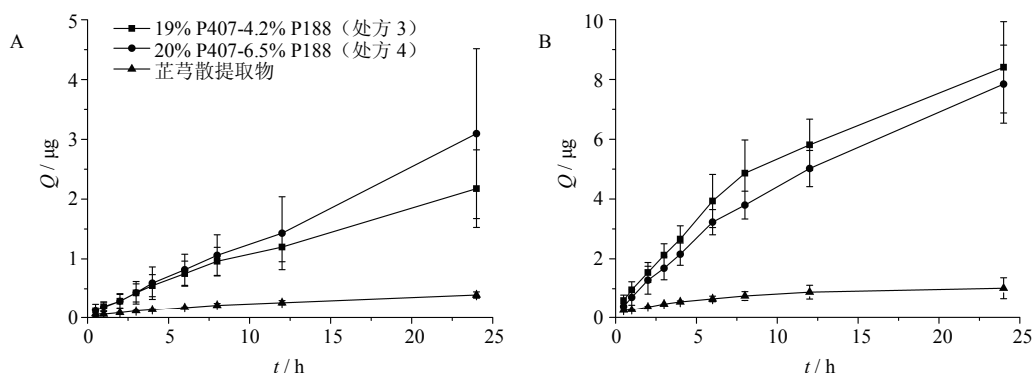


图3 欧前胡素 (A) 和阿魏酸 (B) 家兔鼻黏膜累积渗透量

Fig. 3 Cumulative permeability of imperatorin (A) and ferulic acid (B) in nasal mucosa of rabbits

3 讨论

泊洛沙姆是 PEO/PPO 的嵌段共聚物, 其水溶液具有反向胶凝的性质。在合适的浓度, 温度的升高可促进泊洛沙姆分子链间的氢键交联, 使整个体系形成网状结构, 从而形成凝胶。对于 P407 或 P188

溶液, 浓度升高都能使 T_{gel} 降低, 但在 P407/P188 混合体系中, 少量的 P188 反而使 T_{gel} 升高, 当 P188 到达一定浓度时才降低 T_{gel} , 这可能与体系中 PEO 和 PPO 的比例有关^[16], P188 中 PEO 的质量分数高于 P407, 因此, 在 P407 溶液中加入 P188 后可增加

表4 欧前胡素和阿魏酸的 P_{app}
Table 4 P_{app} of imperatorin and ferulic acid

处方	$P_{app} / (\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1})$	
	欧前胡素	阿魏酸
3	$1.56 \pm 0.44^*$	$2.11 \pm 0.36^*$
4	$2.17 \pm 0.98^*$	$1.96 \pm 0.32^*$
芷芎散原粉	0.56 ± 0.12	$0.30 \pm 0.06^\Delta$

与芷芎散原粉比较: $^*P < 0.05$ 与欧前胡素比较: $^\Delta P < 0.05$

$^*P < 0.05$ vs ZXS $^\Delta P < 0.05$ vs imperatorin

PEO 的相对量,使整个体系的特征偏向于 P188,即具有较高的 T_{gel} ,若继续增加 P188 的量,聚合物浓度的影响将大于 PEO 相对量的影响,从而使 T_{gel} 降低。

药物从凝胶释放主要由药物本身的溶出速率和在凝胶中的扩散速率决定,阿魏酸分子具有一个亲水性的羧基,可快速溶出,因此其释放主要受扩散速率影响,即遵循 Fick 扩散定律,而欧前胡素水溶性较差,溶出速率比扩散速率慢,因此其释放机制主要由溶出速率决定,受凝胶中药物浓度影响不大,接近零级释放^[13]。

从离体鼻黏膜渗透性实验结果可知芷芎散温敏凝胶透黏膜速率明显较芷芎散快,说明泊洛沙姆可能起促渗作用^[17],同时,由于欧前胡素的亲脂性,与鼻黏膜具有较强的亲和力,处方4欧前胡素及阿魏酸均具有较好的鼻黏膜渗透性,而且处方4最接近鼻腔的温度,因此确定处方4即 P407 20%和 P188 6.5%构成最优的芷芎散温敏凝胶处方,该处方对药物透过鼻黏膜具促渗作用,可为芷芎散新给药途径的制剂开发提供基础。

参考文献

- [1] Arulmozhi D K, Veeranjanyulu A, Bodhankar S L. Migraine: current concepts and emerging therapies [J]. *Vascul Pharmacol*, 2005, 43(3): 176-178.
- [2] 邹秋萍,王淑云.川芎在头痛治疗中的应用[J].*中国中医药现代远程教育*, 2010, 8(15): 74-75.
- [3] 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.
- [4] Cao S L, Ren X W, Zhang Q Z, et al. In situ gel based on gellan gum as new carrier for nasal administration of mometasone furoate [J]. *Int J Pharm*, 2009, 365(1/2): 109-115.

- [5] 胡人杰,董岸杰.抗肿瘤药物可注射原位凝胶系统的药理学评价[J].*药物评价研究*, 2011, 34(3): 194-198.
- [6] Cho H J, Balakrishnan P, Park E K, et al. Poloxamer/cyclodextrin/chitosan-based thermoreversible gel for intranasal delivery of fexofenadine hydrochloride [J]. *J Pharm Sci*, 2011, 100(2): 681-691.
- [7] 孟冬梅,徐月红,丁平田,等.星点设计-效应面法优化磷酸川芎嗪温敏凝胶的处方[J].*中药材*, 2008, 32(2): 286-288.
- [8] Hsu S H, Leu Y L, Hu J W, et al. Physicochemical characterization and drug release of thermosensitive hydrogels composed of a hyaluronic acid/pluronic F127 graft [J]. *Chem Pharm Bull*, 2009, 57(5): 453-458.
- [9] 张瑜,白颖.星点设计-效应面法优化法优化盐酸青藤碱脉冲片处方的研究[J].*中草药*, 2010, 41(7): 1088-1091.
- [10] 中国药典[S].一部.2010.
- [11] Ganguly S, Dash A K. A novel *in situ* gel for sustained drug delivery and targeting [J]. *Int J Pharm*, 2004, 276(1/2): 83-92.
- [12] 李晓松,叶锐彬,阳秀平,等.伤科止痛膏中透皮促进剂的选择[J].*中成药*, 2010, 32(8): 1348-1351.
- [13] Siepmann J, Peppas N A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 48(2/3): 139-157.
- [14] Bortolotti F, Balducci A G, Sonvico F, et al. In vitro permeation of desmopressin across rabbit nasal mucosa from liquid nasal sprays: the enhancing effect of potassium sorbate [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2009, 37(1): 36-42.
- [15] Wengst A, Reichl S. PRMI 2650 epithelial model and three-dimensional reconstructed human nasal mucosa as in vitro models for nasal permeation studies [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2010, 74(2): 290-297.
- [16] Radivojsa M, Grabnar I, Ahlin Grabnar P. Thermoreversible *in situ* gelling poloxamer-based systems with chitosan nanocomplexes for prolonged subcutaneous delivery of heparin: design and *in vitro* evaluation [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2013, 50(1): 93-101.
- [17] van Hemelrijck C, Muller-Goymann C C. Rheological characterization and permeation behavior of poloxamer 407-based systems containing 5-aminolevulinic acid for potential application in photodynamic therapy [J]. *Int J Pharm*, 2012, 437(1/2): 120-129.