

## 表没食子儿茶素没食子酸酯壳聚糖纳米粒的制备及其药剂学性质研究

孙 静<sup>1</sup>, 张小飞<sup>1</sup>, 唐志书<sup>1</sup>, 果秋婷<sup>2</sup>

1. 陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712000

2. 咸阳职业技术学院医学院, 陕西 咸阳 712000

**摘要:** 目的 制备表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)壳聚糖(CS)纳米粒(EGCG-CS-NPs), 并初步评价其理化性质。方法 采用离子凝胶化法制备 EGCG-CS-NPs, 通过对处方优化: CS 质量浓度( $X_1$ )、三聚磷酸钠(TPP)质量浓度( $X_2$ )、EGCG 质量浓度( $X_3$ )为考察对象, 以包封率( $Y_1$ , %)、平均粒径( $Y_2$ , nm)为评价指标, 利用 Box-Behnken 设计-效应面法优化 EGCG-CS-NPs 处方; 采用 Malvern 粒度仪测定 EGCG-CS-NPs 的粒径分布和 Zeta 电位, 透射电镜考察其形态; 并考察 EGCG-CS-NPs 的体外释药行为。结果 EGCG-CS-NPs 的最优处方: CS 质量浓度为 2.6 g/L、TPP 质量浓度为 1.5 g/L、EGCG 质量浓度为 2.7 g/L, 制备的 EGCG-CS-NPs 的包封率为  $(85.8 \pm 3.1)\%$ ; 粒径为  $(102.2 \pm 27.1)$  nm, Zeta 电位为  $(25.5 \pm 4.1)$  mV; 透射电镜显示 EGCG-CS-NPs 粒径均一, 呈球状; EGCG-CS-NPs 在 24 h 内平稳缓慢释药 (pH 4.5 PBS)。结论 通过对处方的优化, 制备得到圆整、释药缓慢的 EGCG-CS-NPs, 为进一步考察 EGCG-CS-NPs 在大鼠体内药效学奠定了基础。

**关键词:** 表没食子儿茶素没食子酸酯; 壳聚糖纳米粒; 离子凝胶化法; Box-Behnken 效应面法; 三聚磷酸钠; 体外释药行为  
中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)05-0741-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.05.009

## Preparation and characterization of epigallocatechin-3-gallate chitosan nanoparticles

SUN Jing<sup>1</sup>, ZHANG Xiao-fei<sup>1</sup>, TANG Zhi-shu<sup>1</sup>, GUO Qiu-ting<sup>2</sup>

1. Shanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712000, China

2. College of Medicine, Xianyang Vocational Technical College, Xianyang 712000, China

**Abstract: Objective** To prepare the epigallocatechin-3-gallate (EGCG) chitosan nanoparticles (CS-NPs) and investigate their physicochemical properties. **Methods** The EGCG-CS-NPs were prepared by ion gelation method. The formulation variables were optimized by Box-Behnken Design (BBD) of response surface methodology (RSM) of CS concentration ( $X_1$ ), sodium tripolyphosphate concentration ( $X_2$ ), and EGCG concentration ( $X_3$ ) as independent variables and encapsulation efficiency ( $Y_1$ , %) and particle size ( $Y_2$ , nm) as dependent variables. The optimized CS-NPs were characterized for encapsulation efficiency (EE), particle size, Zeta potential, morphology, and *in vitro* drug release behavior of EGCG-CS-NPs were studied. **Results** An optimal EGCG-CS-NPs consisting of CS concentration as 2.6 g/L, sodium tripolyphosphate concentration as 1.5 g/L and EGCG concentration as 2.7 g/L. For EE, particle size, Zeta potential of EGCG-CS-NPs were found to be  $(85.8 \pm 3.1)\%$ ,  $(102.2 \pm 27.1)$  nm, and  $(25.5 \pm 4.1)$  mV, respectively. The CS-NPs were found to be small and spherical as seen in transmission electron microscopy (TEM). The *in vitro* release data proved that the drug release was steady within 24 h (pH 4.5 PBS). **Conclusion** Through optimizing the formulation, we obtain the uniform EGCG-CS-NPs with *in vitro* sustained-release behavior. This work is useful for the further research on pharmacodynamics of EGCG-CS-NPs.

**Key words:** epigallocatechin-3-gallate; chitosan nanoparticles; ion gelation method; Box-Behnken response surface methodology; *in vitro* drug release behavior

创伤性脑损伤 (traumatic brain injury, TBI) 是临床上常见的多发性疾病, 尽管在脑损伤的诊治及相关基础研究方面取得了许多进展, 但其致死率和

致残率依然高居身体各部位损伤之首<sup>[1]</sup>。表没食子儿茶素没食子酸酯 (epigallocatechin-3-gallate, EGCG) 是从茶叶的有效成分茶多酚中分离出的单

收稿日期: 2015-11-09

基金项目: 中国科学院“西部之光”人才培养计划项目资助; 陕西省科技新星计划项目 (2013KJXX-71); 陕西省中医药管理局中医药科研课题 (15-ZY001)

作者简介: 孙 静, 女, 陕西柞水人, 副教授, 研究方向为药物制剂过程的关键技术及适宜性研究。Tel: (029)38184958 E-mail: ph.175@163.com

体化合物, 药理学研究表明<sup>[2-3]</sup>, EGCG 对 TBI 具有保护作用。

血脑屏障 (blood brain barrier, BBB) 是在脑和脊髓内的毛细血管与神经组织之间存在的一个调节界面。由于 BBB 的存在, 100% 的大分子药物和 98% 的小分子药物不能透过 BBB<sup>[4]</sup>。因此寻找克服 BBB 或促进药物透过 BBB 的方法成为增进脑部疾病治疗的关键。鼻黏膜在解剖生理上与脑部存在着独特的天然联系, 部分药物经鼻腔给药后可以绕过 BBB 由嗅区吸收进入脑脊液, 进入中枢神经系统, 从而起到脑靶向作用, 提高药物治疗效果。由于鼻腔黏膜带负电, 因此带正电荷的药物或药物载体容易通过鼻黏膜吸收<sup>[5-7]</sup>。

壳聚糖 (chitosan, CS) 是甲壳素 (chitin) 脱乙酰基后的产物, 是一种天然的带正电荷高分子聚合物, 具有许多独特的物理化学特性、良好的生物相容性和生物降解性, 已成为药物传递系统研究的热点和重点<sup>[8-12]</sup>。为了使 EGCG 透过 BBB 发挥药效, 本研究以 CS 作为载体材料, 采用离子凝胶化法<sup>[13]</sup>制备 EGCG-CS 纳米粒 (EGCG-CS-NPs), 并以粒径分布和包封率为评价指标, 利用 Box-Behnken 设计-效应面法 (BBD-RSM) 优化 EGCG-CS-NPs 处方。通过对处方的优化, 制备得到均匀圆整、释药缓慢的 EGCG-CS-NPs, 为进一步考察 EGCG-CS-NPs 在体内药动学行为奠定了基础。

## 1 仪器与材料

1200 型高效液相色谱系统, 美国安捷伦科技公司; DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器, 巩义市英峪予华仪器厂; RC-806 溶出试验仪, 天津天大天发科技有限公司; BP200 型电子天平, 德国赛多利斯集团公司; JEM-1200EX 型透射电子显微镜, 日本 JEOL 公司; ZetaSizer 2000HS 激光粒度测定仪, 英国 Malvern 公司; TGL-16G 型台式离心机, 上海安亭科学仪器厂; 10K 超滤离心管, 美国 Milipore 公司; 透析袋, 截留相对分子质量 ( $M_w$ ) 14 000, 斯百全化学上海有限公司。

CS, 脱乙酰度为 95%,  $M_w$ : 120 000~140 000、67 000~72 000、22 000~26 000, 浙江玉环海洋生物化学有限公司; EGCG 对照品, 上海友思生物技术有限公司, 批号 130414, 质量分数 >99.5%; 三聚磷酸钠 (TPP), Sigma 试剂公司; EGCG 原料药, Sigma 试剂公司, 批号 639218, 质量分数 >98.5%; 冰醋酸, 天津市博迪化工有限公司。

## 2 方法与结果

### 2.1 EGCG-CS-NPs 及空白 CS-NPs 的制备

采用离子凝胶化法<sup>[13]</sup>制备 EGCG-CS-NPs。取处方量的 CS 加入到 20 mL 醋酸溶液 (pH 4.5) 中, 室温条件下搅拌溶解; 称取处方量的 EGCG 加入到上述溶液中, 室温条件下搅拌溶解; 在高速 (3 500 r/min) 磁力搅拌下, 以一定的滴定速度, 用注射器缓慢加入处方量的 TPP 溶液 (1 g/L), 室温条件下搅拌 60 min, 将 EGCG-CS-NPs 溶液用 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜滤过, 即得。

空白 CS-NPs 制备参照 EGCG-CS-NPs 的制备方法, 即: 取处方量的 CS 加入到 20 mL 醋酸溶液 (pH 4.5) 中, 室温条件下搅拌溶解, 在高速 (3 500 r/min) 磁力搅拌下, 以一定的滴定速度, 用注射器缓慢加入处方量的 TPP 溶液 (1 g/L), 室温条件下搅拌 60 min, 将空白 CS-NPs 溶液用 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜滤过, 即得。

### 2.2 EGCG-CS-NPs 中 EGCG 的 HPLC 测定

**2.2.1 色谱条件<sup>[14]</sup>** 色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub> 柱 (250 mm×4.6 mm, 5  $\mu$ m); 流动相为 1.0% 醋酸水溶液-乙腈 (13:87), pH 调为 3.5; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 280 nm; 柱温 25  $^{\circ}$ C; 进样量 20  $\mu$ L。

**2.2.2 线性关系及方法学考察** 称取 EGCG 对照品 10.0 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加入流动相超声溶解, 放冷至室温, 作对照品贮备液 (EGCG 200  $\mu$ g/mL)。精密量取对照品贮备液 0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 mL, 置于 25 mL 量瓶中, 以流动相稀释成 4.0、8.0、20.0、40.0、80  $\mu$ g/mL 的对照品溶液, 摇匀, 微孔滤膜滤过, 精密吸取 20  $\mu$ L, 按“2.2.1”项色谱条件测定。以 EGCG 质量浓度 ( $C$ ) 对峰面积 ( $A$ ) 作线性回归, 得回归方程为  $A=18\ 165\ C-8\ 454$ ,  $r=0.999\ 9$ 。由结果可知, EGCG 在 4.0~80.0  $\mu$ g/mL 药物质量浓度与峰面积线性关系良好。方法学考察表明, 在本色谱条件下辅料对 EGCG 的测定无干扰, 日内、日间精密度分别为 RSD 1.83% ( $n=6$ )、1.51% ( $n=6$ ), 低、中、高 (8.0、20.0、40.0  $\mu$ g/mL) 3 个质量浓度的平均回收率为 98.4%, RSD 1.88% ( $n=9$ )。

### 2.3 包封率测定

取 1.0 mL EGCG-CS-NPs 溶液置于超滤离心管 (截留  $M_w$  10 000) 上端, 5 000 r/min 离心 10 min, 收集所有滤液至 10 mL 量瓶中, 加入流动相, 定容得溶液 A; 另取 1.0 mL EGCG-CS-NPs 溶液, 加入

1%的醋酸溶液, 超声破坏 10 min, 定容得溶液 B。分别取溶液 A 及溶液 B 的续滤液(过微孔滤膜), 按照“2.2.1”项下色谱条件分别测得 EGCG-CS-NPs 溶液中未被包封的 EGCG 质量( $W_{游离}$ )和 EGCG-CS-NPs 溶液中 EGCG 的总质量( $W_{总}$ ), 计算包封率(包封率 =  $1 - W_{游离}/W_{总}$ )。

**2.4 EGCG-CS-NPs 处方单因素考察**

离子凝胶化法制备 CS-NPs 的原理为 CS 分子中带正电的氨基与 TPP 分子中带负电的磷酸基之间的静电作用, 二者质量浓度不同会对 NPs 的形成有较大影响。因此需要考察不同质量浓度下 CS、TPP 和 EGCG 交联形成 NPs 的情况, 据此得出较佳的质量浓度范围。

**2.4.1 CS  $M_w$  对 NPs 制备的影响** CS 作为药物载体具有生物相容性好、体内易降解和毒性低等特点, 在新型给药系统中得到广泛应用。根据预试验结果发现 CS  $M_w$  对 CS-NPs 的制备成型性有较大影响, 因此, 本研究首先应确定 CS 的  $M_w$  范围, 分别选择 120 000~140 000、67 000~72 000、22 000~26 000 3 个  $M_w$  范围的 CS, 按照“2.1”项下方法制备空白 CS-NPs, 考察不同  $M_w$  的 CS 对 NPs 成型性的影响, 结果见表 1。结果表明, TPP 质量浓度在 0.5~5.0 g/L,  $M_w$  为 22 000~26 000 的 CS 质量浓度在 1.0~2.5 g/L 可以形成 NPs; 高  $M_w$  的 CS 在上述质量浓度范围内形成的 NPs 区域较为狭窄, 因此, 本研究确定采用  $M_w$  为 22 000~26 000 的 CS 作为制备 EGCG-CS-NPs 的载体。

**2.4.2 CS 质量浓度对 NPs 性质的影响** 在预试验的基础上初步得到 EGCG-CS-NPs 处方的比例范围。固定处方中 EGCG 质量浓度为 2.0 g/L, TPP 质量浓度为 1.0 g/L, 按照“2.1”项下方法制备 CS ( $M_w$  22 000~26 000) 质量浓度分别为 0.25、0.50、1.00、2.50、5.00、7.50 g/L 的 EGCG-CS-NPs。以 CS-NPs 的平均粒径、多分散指数 (PDI)、Zeta 电位、包封

表 1 CS  $M_w$  筛选  
Table 1 Screening of CS  $M_w$

CS $M_w$	CS 质量浓度/(g·L <sup>-1</sup> )	TPP 质量浓度/(g·L <sup>-1</sup> )			
		0.1	0.5	1.0	5.0
120 000~140 000	1.0	溶液	沉淀	NPs	沉淀
	2.5	溶液	溶液	沉淀	沉淀
	5.0	溶液	溶液	沉淀	沉淀
67 000~72 000	1.0	溶液	NPs	NPs	NPs
	2.5	溶液	溶液	NPs	NPs
	5.0	溶液	溶液	NPs	沉淀
22 000~26 000	1.0	溶液	NPs	NPs	NPs
	2.5	溶液	NPs	NPs	NPs
	5.0	溶液	溶液	NPs	NPs

率为评价指标, 筛选出合适的 CS 质量浓度, 结果见表 2。结果表明, 在固定 EGCG 和 TPP 质量浓度条件下, CS 质量浓度对 NPs 的平均粒径和包封率有很大的影响。CS 质量浓度在较低条件下, 相对过量的 TPP 可引发 CS 团聚成较大的颗粒而沉淀下来; 随着 CS 质量浓度的增加, 质量浓度在 1.0~5.0 g/L, NPs 的形成越来越容易, 逐渐出现乳光, 且随着 CS 质量浓度的增加平均粒径增大; 但 CS 质量浓度增加到一定程度时, 溶液中 TPP 量不足, 难以与 CS 交联成 NPs, 为澄清状态。综合考虑选取 CS 质量浓度在 1.0~5.0 g/L 作进一步研究。

**2.4.3 TPP 质量浓度对 NPs 性质的影响** 固定处方中 EGCG 质量浓度为 2.0 g/L, CS 质量浓度为 2.5 g/L, TPP 质量浓度分别选择 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 g/L 作为离子交联剂, 按照“2.1”项下方法制备 EGCG-CS-NPs。以 CS-NPs 的平均粒径、PDI、Zeta 电位、包封率为评价指标, 筛选出合适的 TPP 质量浓度, 结果见表 3。结果表明, 在固定 CS 和 EGCG 质量浓度条件下, TPP 质量浓度对 NPs 的平均粒径和包封率有很大的影响。TPP 在质量浓度较低条件下, CS 相对过量, 形成的 NPs 粒径较小,

表 2 CS 质量浓度筛选  
Table 2 Screening of CS concentration

CS 质量浓度/(g·L <sup>-1</sup> )	外观	平均粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV	包封率/%
0.25	沉淀	未测定	未测定	未测定	未测定
0.50	沉淀	未测定	未测定	未测定	未测定
1.00	NPs	81.5±23.1	0.151±0.025	27.2±3.4	73.2±5.3
2.50	NPs	127.1±32.5	0.191±0.037	26.9±4.1	83.1±4.3
5.00	NPs	384.3±62.6	0.361±0.047	23.1±4.1	87.8±6.1
7.50	溶液	未测定	未测定	未测定	未测定

表 3 TPP 质量浓度筛选  
Table 3 Screening of TPP concentration

TPP 质量浓度/(g·L <sup>-1</sup> )	外观	平均粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV	包封率/%
0.5	NPs	86.4±25.7	0.168±0.031	25.1±4.7	77.1±4.7
1.0	NPs	127.1±32.5	0.191±0.037	26.9±4.1	83.1±4.3
2.0	NPs	156.7±47.4	0.201±0.041	28.1±5.2	83.1±4.3
3.0	NPs	219.4±32.5	0.252±0.063	25.9±6.4	83.6±3.2
4.0	NPs	247.1±37.1	0.235±0.041	25.2±5.9	84.1±4.8
5.0	NPs	424.1±77.4	0.271±0.047	23.1±4.1	86.1±5.2

药物包封率也较低; TPP 在质量浓度较高时, 形成的 NPs 粒径较大。综合考虑选取 TPP 质量浓度在 1.0~4.0 g/L 作进一步研究。

**2.4.4 EGCG 质量浓度对 NPs 性质的影响** 固定处方中 CS 质量浓度为 2.5 g/L, TPP 质量浓度为 1.0 g/L, 分别以 EGCG 质量浓度为 1.0、2.0、4.0、6.0 g/L 投药, 按照“2.1”项下方法制备 EGCG-CS- NPs。以 CS-NPs 的平均粒径、包封率为评价指标, 考察 EGCG 质量浓度对 NPs 性质的影响, 结果见表 4。结果表明, 在固定 CS 和 TPP 质量浓度条件下, EGCG 质量浓度变化对 NPs 的平均粒径影响不大, 但对包封率有很大的影响。随着 EGCG 质量浓度的增加, CS-NPs 的包封率呈下降趋势, 这是由于 EGCG 为水溶性药物, 当 EGCG 质量浓度增加时, CS-NPs 不能对其有效地吸附和包裹, EGCG 以游离状态的数量增加所致。综合考虑选取 EGCG 质量浓度在 1.0~4.0 g/L 作进一步研究。

单因素考察结果表明, 采用离子凝胶化法制备 EGCG-CS-NPs 的过程中, CS、TPP 和 EGCG 质量浓度对 EGCG-CS-NPs 的性质都有显著影响。因此, 采用 CS 质量浓度在 1.0~5.0 g/L, TPP 质量浓度在 1.0~4.0 g/L, EGCG 质量浓度在 1.0~4.0 g/L, 应用

表 4 EGCG 质量浓度筛选  
Table 4 Screening of EGCG concentration

EGCG 质量浓度/(g·L <sup>-1</sup> )	外观	平均粒径/nm	包封率/%
1.0	NPs	112.3±36.2	87.4±3.9
2.0	NPs	121.4±39.7	85.2±4.5
4.0	NPs	114.2±40.0	76.6±3.2
6.0	NPs	132.8±36.8	67.3±3.6

Box-Behnken 效应面法进一步优化处方。

**2.5 BBD-RSM 优化 EGCG-CS-NPs 处方**

**2.5.1 试验设计及结果** 通过处方单因素考察, 选取对 EGCG-CS-NPs 性质影响较显著的 3 个因素: CS 质量浓度 (X<sub>1</sub>)、TPP 质量浓度 (X<sub>2</sub>)、EGCG 质量浓度 (X<sub>3</sub>) 为考察对象, 以包封率 (Y<sub>1</sub>, %)、平均粒径 (Y<sub>2</sub>, nm) 为评价指标, 利用 BBD-RSM 优化 EGCG-CS-NPs 处方。因素水平见表 5, 处方优化试验安排及结果见表 5。

**2.5.2 数据处理及模型拟合** 采用 Design expert 7.0 实验设计软件, 对 EGCG-CS-NPs 处方优化所得数据进行处理, 以评价指标 (因变量) 分别对各因素 (自变量) 进行多元二项式方程拟合。对二项式方程中的各项系数进行 F 检验, 所得结果见表 6、7。

表 5 BBD-RSM 试验设计与结果  
Table 5 Design and results of BBD-RSM test

试验号	X <sub>1</sub> /(g·L <sup>-1</sup> )	X <sub>2</sub> /(g·L <sup>-1</sup> )	X <sub>3</sub> /(g·L <sup>-1</sup> )	Y <sub>1</sub> /%	Y <sub>2</sub> /nm	试验号	X <sub>1</sub> /(g·L <sup>-1</sup> )	X <sub>2</sub> /(g·L <sup>-1</sup> )	X <sub>3</sub> /(g·L <sup>-1</sup> )	Y <sub>1</sub> /%	Y <sub>2</sub> /nm
1	1 (-1)	4 (+1)	2.5 (0)	69.2	88.6	9	1 (-1)	1 (-1)	2.5 (0)	83.2	104.2
2	3 (0)	1 (-1)	1 (-1)	87.6	254.7	10	3 (0)	1 (-1)	4 (+1)	87.2	264.1
3	3 (0)	4 (+1)	4 (+1)	75.4	159.1	11	5 (+1)	1 (-1)	2.5 (0)	87.6	547.8
4	5 (+1)	2.5 (0)	1 (-1)	90.1	564.3	12	1 (-1)	2.5 (0)	1 (-1)	78.6	95.4
5	3 (0)	4 (+1)	1 (-1)	85.5	161.3	13	1 (-1)	2.5 (0)	4 (+1)	67.3	101.1
6	3 (0)	2.5 (0)	2.5 (0)	88.4	117.4	14	5 (+1)	4 (+1)	2.5 (0)	84.5	346.9
7	5 (+1)	2.5 (0)	4 (+1)	86.2	483.7	15	3 (0)	2.5 (0)	2.5 (0)	87.9	116.2
8	3 (0)	2.5 (0)	2.5 (0)	90.6	141.7						

由表 6 中数据结果可知  $R^2=0.970 1(P<0.05)$ , 说明  $Y_1$  采用多元二项式方程拟合是适合的。方程中  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ 、 $X_1X_2$ 、 $X_1^2$  对  $Y_1$  影响较显著。在 EGCG 质量浓度固定时,  $Y_1$  随着 CS 质量浓度的增加而增大, 随着 TPP 质量浓度的增加而减小 (图 1-A);

在 TPP 质量浓度固定时,  $Y_1$  随着 CS 质量浓度的增加而增大, 随着 EGCG 质量浓度的增加而减小 (图 1-B); 在 CS 质量浓度固定时,  $Y_1$  随着 TPP 和 EGCG 质量浓度的增加而降低 (图 1-C)。

由表 7 中数据结果可知  $R^2=0.989 9(P<0.05)$ ,

表 6  $Y_1$  的多元二项式方程中的各项系数

Table 6 Each regression coefficient of polynomial functions of  $Y_1$

因素	平方和	df	F 值	P 值	因素	平方和	df	F 值	P 值	因素	平方和	df	F 值	P 值
模型	730.42	9	18.05	0.002 7**	$X_1X_3$	13.69	1	3.05	0.141 4	残差	22.48	5		
$X_1$	313.75	1	69.79	0.000 4**	$X_2X_3$	23.52	1	5.23	0.070 9	失拟项	45.72	3	2.96	0.262 3
$X_2$	120.13	1	26.72	0.003 6**	$X_1^2$	116.14	1	25.83	0.003 8**	纯误差	25.91	2		
$X_3$	82.56	1	18.36	0.007 8**	$X_2^2$	18.42	1	4.10	0.098 9	$R^2=0.970 1$				
$X_1X_2$	29.70	1	6.61	0.049 0*	$X_3^2$	29.12	1	6.48	0.051 6					

\*表示显著性 ( $P<0.05$ ); \*\*表示极显著性 ( $P<0.01$ ), 表 7 同

\*indicates a significant ( $P < 0.05$ ); \*\*indicates very significant ( $P < 0.01$ ), same as Table 7

表 7  $Y_2$  的多元二项式方程中的各项系数

Table 7 Each regression coefficient of polynomial functions of  $Y_2$

因素	平方和	df	F 值	P 值	因素	平方和	df	F 值	P 值	因素	平方和	df	F 值	P 值
模型	$4.016 \times 10^5$	9	54.48	0.000 2**	$X_1X_3$	1 861.92	1	2.27	0.192 0	残差	4 095.08	5		
$X_1$	$3.016 \times 10^5$	1	368.28	<0.000 1**	$X_2X_3$	33.64	1	0.041	0.847 4	失拟项	3 681.02	3	5.93	0.147 8
$X_2$	21 517.75	1	26.27	0.003 7**	$X_1^2$	56 818.72	1	69.37	0.000 4**	纯误差	414.06	2		
$X_3$	572.91	1	0.70	0.441 1	$X_2^2$	1 906.80	1	2.33	0.187 6	$R^2=0.989 9$				
$X_1X_2$	8 584.02	1	10.48	0.023 0*	$X_3^2$	14 181.79	1	17.32	0.008 8**					

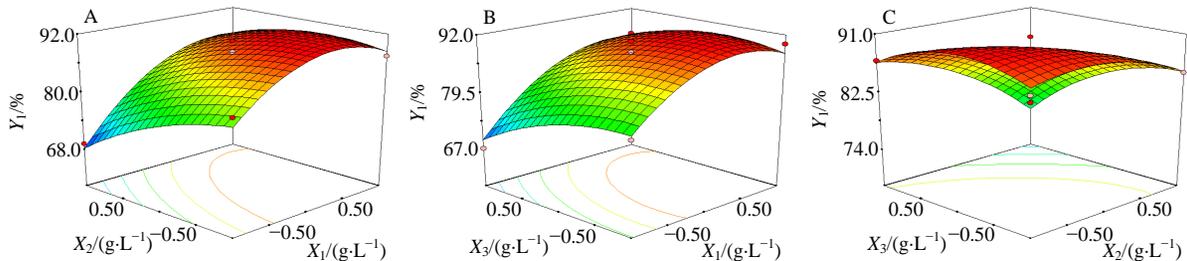


图 1 自变量  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$  与因变量  $Y_1$  的 3D 效应面图

Fig. 1 Response surface plots (3D) of effects of  $X_1$ ,  $X_2$ , and  $X_3$  on  $Y_1$

说明  $Y_2$  结果采用多元二项式方程拟合是适合的。方程中  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_1X_2$ 、 $X_1^2$ 、 $X_3^2$  对  $Y_2$  影响较显著 ( $P<0.05$ 、 $0.01$ )。在 EGCG 质量浓度固定时,  $Y_2$  随着 CS 质量浓度的增加而增大, 随着 TPP 质量浓度的增加而增大 (图 2-A); 在 TPP 质量浓度固定时,  $Y_2$  随着 CS 质量浓度的增加而增大, 随着 EGCG 质量浓度的增加先降低后增大 (图 2-B); 在 CS 质量浓度固定时,  $Y_2$  随着 TPP 质量浓度的增加而减小, 随着 EGCG 质量浓度的增加先降低后增大 (图 2-C)。

2.5.3 优化处方验证 根据 Design expert 7.0 实验

设计软件得 EGCG-CS-NPs 最优处方: CS 质量浓度为 2.6 g/L、TPP 质量浓度为 1.5 g/L、EGCG 质量浓度为 2.7 g/L。以优化的最优处方按照“2.1”项下方法制备 3 批 EGCG-CS-NPs, 按照“2.3”和“2.6”项下方法测定 EGCG-CS-NPs  $Y_1$  和  $Y_2$ , 实验观察值与模型预测值见表 8, 可知, 实验观察值和模型预测值比较接近, 说明模型预测性良好。

2.6 EGCG-CS-NPs 粒径分布及 Zeta 电位测定

取 EGCG-CS-NPs 溶液适量, 用蒸馏水稀释适量倍数, 采用 ZetaSizer 3000HS 激光粒度测定仪测定

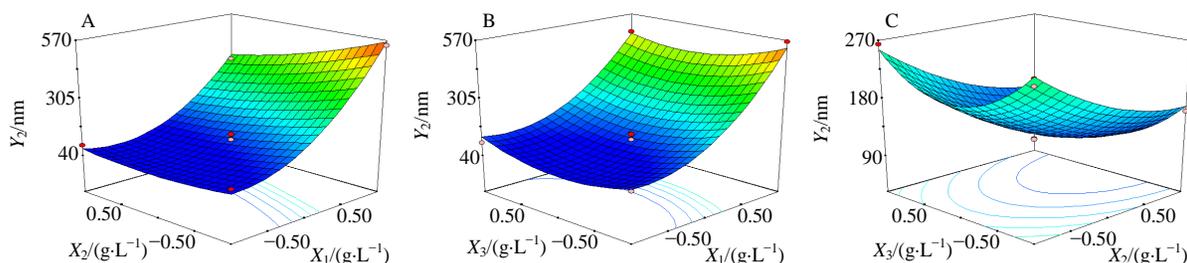


图 2 自变量  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$  与因变量  $Y_2$  的 3D 效应面图

Fig. 2 Response surface plots (3D) of effects of  $X_1$ ,  $X_2$  and  $X_3$  on  $Y_2$

表 8 EGCG-CS-NPs 各指标预测值和观察值

Table 8 Predicted and observed response values for each indicator

优化指标	预测值	观察值	偏差/%
$Y_1/\%$	88.9	$85.8 \pm 3.1$	-3.5
$Y_2/\text{nm}$	106.8	$102.2 \pm 27.1$	4.5

偏差 = (观察值 - 预测值) / 预测值

deviation = (observed value - predictive value) / predictive value

EGCG-CS-NPs 的粒径分布和 Zeta 电位, 结果见图 3。EGCG-CS-NPs 的平均粒径为  $(102.2 \pm 27.1)$  nm, PDI 为  $0.193 \pm 0.019$ , Zeta 电位为  $(25.5 \pm 4.1)$  mV。

### 2.7 EGCG-CS-NPs 形态观察

取适量 EGCG-CS-NPs 滴在喷碳铜网表面, 使液体尽量铺满整个铜网, 加入重蒸馏水稀释适当倍数, 保持 15 min, 用滤纸吸除大部分水分, 滴加 2.0% 的磷钨酸水溶液, 染色 5 min, 用滤纸吸去水分, 将铜网取出, 待干后用透射电镜观察 EGCG-CS-NPs 的形态结构。由图 4 可见, EGCG-CS-NPs 呈球形。

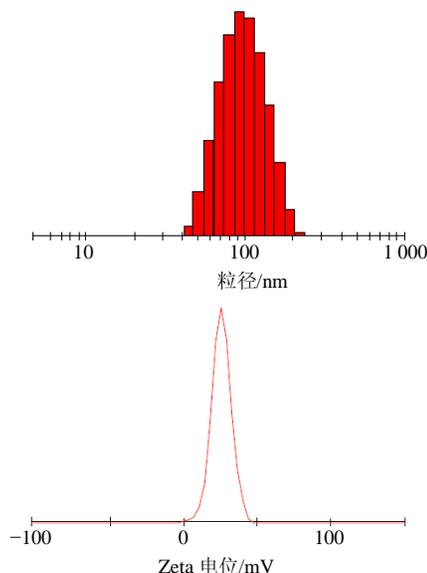


图 3 EGCG-CS-NPs 粒径分布和 Zeta 电位

Fig. 3 Particle size distribution and Zeta potential of EGCG-CS-NPs

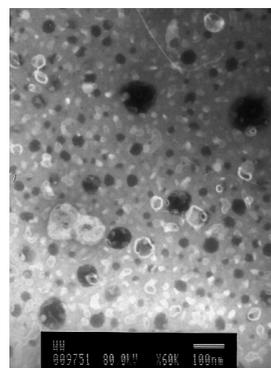


图 4 EGCG-CS-NPs 透射电镜图

Fig. 4 TEM photomicrograph of EGCG-CS-NPs

### 2.8 EGCG-CS-NPs 体外释放行为考察

采用透析法考察 EGCG-CS-NPs 在体外 PBS (pH 4.5) 中的释放行为。精密吸取 2.0 mL EGCG-CS-NPs 3 份, 分别置于处理好的透析袋 (截留  $M_w$  14 000) 内, 扎紧后置于溶出仪的桨叶底部。分别移取 100 mL 释放介质放入 250 mL 溶出杯中。恒温  $(32.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ , 转速 50 r/min, 分别于 0.25、0.5、0.75、1、2、4、6、8、12、16、24 h 吸取 1 mL 释放介质 (同时补加等量、同温的释放介质)。取出的释放介质用  $0.22 \mu\text{m}$  微孔滤膜滤过, 按照“2.2.1”项下色谱条件测定 EGCG 的量。另取 2 mL EGCG 溶液置于透析袋内, 同上进行释放试验, 计算 EGCG 的累积释放率, 结果见图 5。体外释放研究结果表明, EGCG 溶液在 1.0 h 内基本释放完全; 而 EGCG-CS-NPs 在释放初期有药物突释现象, 这是可能由于 EGCG-CS-NPs 中的游离药物以及吸附在 NPs 表面的药物释放所致, 随后药物释放较为缓慢, 24 h 累积释放率为  $(90.4 \pm 4.6)\%$ , 表明 EGCG-CS-NPs 有延缓药物释放的作用。

### 3 讨论

鼻腔黏膜按照功能分为呼吸区和嗅觉区, 其中嗅觉区仅仅占总面积的 5%, 但是嗅觉区却提供了从鼻腔入脑的一个直接通路<sup>[4]</sup>。由于鼻腔黏膜带负

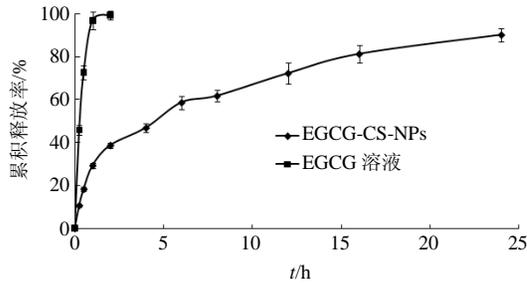


图 5 EGCG-CS-NPs 与 EGCG 溶液体外释放曲线

Fig. 5 Release profile *in vitro* of EGCG-CS-NPs and EGCG solution

电, 因此带正电荷的药物或药物载体容易通过鼻黏膜吸收。EGCG-CS-NPs 表面带正电荷, 因此能与鼻黏膜上皮细胞形成共价键结合, 抵抗黏膜纤毛对药物的清除, 保证药物的跨细胞膜传递; 同时, CS 能可逆性的、暂时性打开上皮细胞之间的紧密连接, 增强黏膜对药物的吸收作用<sup>[15]</sup>, 从而实现药物的靶向性。

CS-NPs 的制备方法有: 复凝聚法<sup>[16]</sup>、共价交联法<sup>[17]</sup>、离子凝胶化法<sup>[13]</sup>、乳滴聚结法<sup>[18]</sup>等。离子凝胶化法是目前文献报道较多的制备载药 CS-NPs 的方法, 其原理是利用 CS 分子中带正电的氨基与生物相容性较好的 TPP 分子中带负电的磷酸基之间的静电作用, 并在外力作用下形成 NPs。在磁力搅拌条件下, 将 TPP 溶液缓慢滴加到 pH 值 4~6 的 CS 溶液中, 通过磷酸根负离子与 CS 分子链上带正电的质子化氨基发生分子内和分子间交联凝胶化, 便可迅速生成 NPs。由于该实验条件温和, 操作方便, 不使用有机溶剂, 因此在 CS-NPs 的制备中得到广泛的应用。

#### 参考文献

- [1] 王忠诚. 神经外科学 [M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2005.
- [2] Itoh T, Tabuchi M, Mizuguchi N, *et al.* Neuroprotective effect of (-)-epigallocatechin-3-gallate in rats when administered pre- or post-traumatic brain injury [J]. *J Neural Transm*, 2013, 120(5): 767-783.
- [3] 王苗苗, 韩杰, 娄海燕. 表没食子儿茶素没食子酸酯对心脑血管缺血再灌注损伤保护作用机制的研究进展 [J]. 中草药, 2014, 45(18): 2732-2736.
- [4] Pardridge W M. *Brain Drug Targeting* [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1998.
- [5] Baltzley S, Mohammad A, Malkawi A H, *et al.* Intranasal

drug delivery of olanzapine-loaded chitosan nanoparticles [J]. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2014, 15(6): 1598-1602.

- [6] Jafarieh O, Md S, Ali M, *et al.* Design, characterization, and evaluation of intranasal delivery of ropinirole-loaded mucoadhesive nanoparticles for brain targeting [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2015, 41(10): 1674-1681.
- [7] 卢浩扬, 林媛媛, 车俊秀, 等. 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 [J]. 中草药, 2014, 45(13): 1845-1849.
- [8] 宋燕青, 张四喜, 尹一子, 等. 胰岛素纳米粒温敏凝胶的制备及体外释药性能 [J]. 中国医院药学杂志, 2011, 31(2): 116-120.
- [9] 张洪, 沈瑶, 闫士君, 等. 青蒿琥酯-壳聚糖纳米粒的制备及质量评价 [J]. 中国医院药学杂志, 2013, 33(5): 349-355.
- [10] 李纳, 汤丹丹, 王丽雯, 等. 喷雾干燥法制备姜黄素磷脂复合物壳聚糖微球干粉吸入剂及其表征 [J]. 中草药, 2014, 45(17): 2475-2481.
- [11] 张亚会, 李喜香, 包强, 等. 甘草次酸-壳聚糖纳米粒的制备及其质量评价 [J]. 中草药, 2015, 46(15): 2232-2237.
- [12] 周闻舞, 顾海铮. 壳聚糖微/纳米粒在定向给药系统中的应用研究 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(4): 290-295.
- [13] Fazil M, Md S, Haque S, *et al.* Development and evaluation of rivastigmine loaded chitosan nanoparticles for brain targeting [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2012, 47(1): 6-15.
- [14] Illum L. Transport of drugs from the nasal cavity to the central nervous system [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2000, 11(1): 1-18.
- [15] Artursson P, Lindmark T, Davis S S, *et al.* Effect of chitosan on the permeability of monolayers of intestinal epithelial cells (Caco-2) [J]. *Pharm Res*, 1994, 11(9): 1358-1361.
- [16] Figueiro J F, Parra A, Silva A M, *et al.* Validation of a high performance liquid chromatography method for the stabilization of epigallocatechin gallate [J]. *Int J Pharm*, 2014, 475(1/2): 181-190.
- [17] Hu Y, Jiang X Q, Ding Y, *et al.* Synthesis and characterization of chitosan-poly (acrylic acid) nanoparticles [J]. *Biomaterials*, 2002, 23(15): 3193-3201.
- [18] Futoshi S, Hiroyuki T, Hideki I, *et al.* *In vitro* cellular accumulation of gadolinium incorporated into chitosan nanoparticles designed for neutron-capture therapy of cancer [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2002, 53(1): 57-63.