

柴黄鼻腔即型凝胶剂的制备与评价*

刘婷婷^{1,2}, 郭朋程¹, 刘婧昕^{1,3}, 秦晶¹, 蒋新国¹, 傅超美², 王建新^{1,Δ}

1. 复旦大学药学院 智能化递药教育部重点实验室(上海 201203); 2. 成都中医药大学药学院(成都 611137);

3. 黑龙江中医药大学药学院(哈尔滨 150040)

【摘要】目的 制备含有柴胡挥发油与黄芩苷有效组分的鼻腔给药温度/离子双敏感即型凝胶剂。**方法** 以泊洛沙姆407与去乙酰结冷胶为凝胶基质, 10%Pharmasolve与2%聚山梨酯-80为增溶剂, 0.8%三乙醇胺为pH调节剂, 制备柴黄鼻用即型凝胶鼻腔剂, 对制剂外观、相转换温度、黄芩苷释放性能等进行研究, 并采用大鼠干酵母致热模型和小鼠耳廓肿胀炎症模型进行药效学评价。**结果** 凝胶剂的相转换温度为36℃, 黄芩苷从中的释放具有明显的缓释特征, 符合零级动力学方程。大鼠干酵母高热模型和小鼠二甲苯耳廓肿胀炎症模型实验结果显示凝胶剂具有显著的解热和抗炎效果, 且均显著优于空白基质和柴黄颗粒对照组。纤毛毒性实验结果显示凝胶剂对蟾蜍上颌黏膜纤毛无明显毒性。**结论** 所制备的柴黄即型凝胶剂具有速效、高效、长效的特点, 具有进一步应用开发的前景。

【关键词】 柴胡-黄芩药对 柴胡挥发油 黄芩苷 即型凝胶 鼻腔给药

Preparation and Evaluation of Intranasal *in situ* Gel of *Bupleuri Radix* Volatile Oil and Baicalin LIU Ting-ting^{1,2}, GUO Peng-cheng¹, LIU Jing-xin^{1,3}, QIN Jing¹, JIANG Xin-guo¹, FU Chao-mei², WANG Jian-xin^{1,Δ}. 1. Key Laboratory of Smart Drug Delivery of the Ministry of Education, School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 201203, China; 2. School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China; 3. School of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

Δ Corresponding author, E-mail: jxwang@fudan.edu.cn

【Abstract】Objective To prepare and evaluate a new formulation of thermosensitive and ion-sensitive *in situ* gel for nasal administration, using the volatile oil of *Bupleuri radix* and baicalin, the effective component extracted from *Scutellariae radix*. **Methods** Formulation of *in situ* nasal gel of *Bupleuri radix* volatile oil and baicalin was prepared by using poloxamer 407 and deacetylated gellan gum as the gel base, 10% pharnasolve and 2% polysorbate 80 as the solubilizer, and 0.8% triethanolamine as the pH regulator. The physical appearance, phase transition temperature, and baicalin release performance of the prepared gel were examined. The pharmacodynamic evaluation was done with the rat fever model developed with dry yeast and the mouse auricle swelling inflammation model. **Results** The phase transition temperature of the gel was optimized to be 36℃. The release of baicalin from the gel showed obvious features of sustained release, which accorded well the zero-order kinetics equation. The results of experiments with the rat dry yeast fever model and the mouse xylene auricle swelling inflammation model showed that the gel had significant antipyretic and anti-inflammatory effects that were significantly better than those of the groups treated with the blank gel base and the *Bupleuri radix* and *Scutellariae radix* granule. Results from the cilia toxicity test showed that the gel did not have obvious toxic effect on toad palate mucosal cilia. **Conclusion** The *in situ* nasal gel of *Bupleuri radix* volatile oil and baicalin prepared in the study had a rapid onset time, high efficiency, and prolonged release of active ingredients, thus showing promises for further applicational development.

【Key words】 Herb pair of *Bupleuri radix* and *Scutellariae radix* *Bupleuri radix* volatile oil Baicalin *In situ* gel Nasal mucosal administration

柴胡(*Bupleuri radix*)、黄芩(*Scutellariae radix*)配伍为中医经典“药对”, 首见于《伤寒论》, 其中柴胡解表退热、疏肝解郁, 黄芩清热燥湿、泻火解毒, 二者合用, 循中药配伍“七情和合”理论, 奏“透散半表之邪、清泻半里之热”之功效, 目前基于此药对研发的中成药包括柴黄口服液、柴黄片、柴黄颗粒、柴黄胶囊等, 具有清热解表之功, 主要用于治疗感冒引起的发热、咽喉肿痛、周身不适、目

眩、头痛以及上呼吸道感染等症^[1]。但目前的柴黄制剂以口服给药为主, 虽然具有较好的安全性, 但却难以达到速效、高效的目的。研究表明, 柴胡中的挥发油成分和黄芩中的黄芩苷(baicalin)有明确的解热作用^[2-3], 但口服制剂中柴胡挥发油的含量和生物利用度都很低。同时研究发现, 感冒发热、上呼吸道感染引起的发热, 主要是通过调节下丘脑体温调节中枢, 致热发热介质增多而引起发热, 其作用靶点主要在脑内, 药物需要通过转运入脑才能充分发挥疗效^[4]。但口服给药后, 由于胃肠屏障、首过效应、血脑屏障的存在, 能够入脑的药物量很少, 严重影响

* 国家重大新药创制科技重大专项(No. 2018ZX09721003-009-010)和上海市科技支撑计划项目(No. 17401902000)资助

Δ 通信作者, E-mail: jxwang@fudan.edu.cn

制剂的治疗效果。因此,开展基于有效组分的柴胡黄芩口服新制剂的研究,对于改善其疗效、提升临床应用价值具有重要意义。

即型凝胶是一种对环境因素敏感的新型给药系统,其以高分子溶液剂的形式制备、储存和应用,在到达用药部位后,利用高分子材料对外界刺激响应,在生理条件下瞬间发生相转变,形成非化学交联的半固体制剂,由溶液向凝胶转化,从而形成凝胶。即型凝胶剂不仅具备良好的组织相容性、黏膜亲和性,更可以增加药物在用药部位的滞留时间,控制药物释放,提高药物的生物利用度^[5]。将凝胶溶液剂通过鼻腔给药,在鼻腔特定的温度和离子强度条件下,迅速转变为半固体的凝胶;药物从凝胶中释放出来以后,不仅可以快速吸收入血,而且可以通过嗅黏膜途径绕过血脑屏障而直接入脑;同时可控制药物从凝胶中的释放速率,从而达到速效、高效、长效的目的^[6]。基于以上研究,我们分别选择具有温度敏感的泊洛沙姆407和离子敏感的去乙酰结冷胶(deacetylatedgellan gum, DGG)为辅料,设计含有柴黄组分的鼻腔给药温度/离子双敏感即型凝胶剂。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1200高效液相色谱仪(安捷伦公司,美国); IKARCT基本型磁力搅拌器(IKA公司,德国); BS224S电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司); H1650台式高速离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司); NDJ-5S数字旋转粘度计(上海地学仪器厂); DMI4000D倒置荧光显微镜(Leica,德国); Five easy pH计(METTLER TOLEDO); TK-12D型透皮扩散试验仪(上海镭凯科技有限公司)。

1.2 药品与试剂

黄芩苷对照品(批号:21967-11-9,大连美仑生物技术有限公司,纯度>98%),黄芩提取物(批号1509111,上海凯宝药业有限公司提供,HPLC测定黄芩苷为91.2%),柴胡挥发油(批号:20160710,自制),柴黄颗粒(批号:Z20003383,江西京通美联药业有限公司),聚山梨酯80(批号:20150403,国药化学试剂有限集团),泊洛沙姆407(批号:WPNZ560B, BASF), DGG(批号:090725,上海众伟化工有限公司),Pharmasolve(批号:0001731787, Ashland Industries Europe GmbH),水为超纯水。

1.3 实验动物

中华大蟾蜍购于南京圣科动物公司;SD大鼠(普通级,体质量180~200 g,雄性)、昆明种小鼠(普通级,体质量18~20 g,雄性),均由复旦大学药学院动物实验中心提

供,实验动物许可证号:SYXK(沪)2015-0023。动物实验符合我国《实验动物福利伦理审查指南(GB/T 35892-2018)》要求。

2 方法与结果

2.1 柴黄即型凝胶剂的处方优化

2.1.1 增溶剂的筛选 柴胡挥发油水溶性差,需加入适量增溶剂使其溶解,但必须同时考虑挥发油对鼻腔黏膜和纤毛的刺激性。因此,预实验中以溶液澄明度和纤毛毒性为指标,对聚山梨酯80、丙二醇、Pharmasolve等增溶剂的种类和用量进行筛选。以溶液在600 nm处的吸光度(A)作为澄明度的评价指标,吸光度越小表明澄明度越优。澄明度评分=最澄明处方的吸光度/样品测得的吸光度;纤毛毒性评价采用显微镜观察蟾蜍上颌黏膜纤毛的运动时间(ciliary movement time)及完整性,纤毛毒性评分=样品纤毛摆动时间/最大纤毛摆动时间(毒性最小处方的纤毛摆动时间);综合评分=澄明度评分+纤毛毒性评分^[7]。

预实验结果显示,5%聚山梨酯80和17%丙二醇合用可使挥发油完全溶解,但用量较大,具有明显的纤毛毒性,而聚山梨酯80和Pharmasolve以一定比例配伍具有较好的挥发油增溶效果与安全性。进一步对二者的浓度进行优化,以聚山梨酯80和Pharmasolve为考察因素,在预实验的基础上,各取2%、5%和10% 3个浓度水平进行筛选。以溶液的澄明度及纤毛毒性为评价指标,按L₉(3⁴)方案筛选并确定处方中混合辅料的组成及用量。正交试验结果见表1。

表 1 正交试验优化结果
Table 1 The optimization of solubilizer in *in situ* gel

A	B	C	A ₆₀₀	Ciliary movement time/h	Score
2%	2%	2%	1.41	9.12	1.03
2%	5%	5%	0.20	8.38	1.12
2%	10%	10%	0.055	5.03	1.30
5%	2%	5%	0.99	7.21	0.83
5%	5%	10%	0.12	7.15	1.13
5%	10%	2%	0.11	4.32	0.85
10%	2%	10%	0.062	7.05	1.43
10%	5%	2%	0.053	5.43	1.37
10%	10%	5%	0.041	3.11	1.34

A: Pharmasolve; B: Tween-80; C: Control.

根据方差分析结果,Pharmasolve浓度对制剂的质量具有显著影响($F=132.73, P<0.01$),而聚山梨酯80浓度对制剂的影响较小($F=8.29, P>0.05$),从经济角度及制剂安

全考虑, 选取较少用量, 因此, 筛选出较优混合增溶剂组合为10% Pharmasolve和2%聚山梨酯80。

2.1.2 pH调节剂的筛选 由于鼻黏膜的缓冲能力弱, 因此鼻用制剂药物溶液的pH应接近人体生理pH(4.0~7.0)。同时pH对凝胶剂的稳定性具有较大影响, 当pH小于5时, 黄芩苷的溶解度下降可能会导致析出。因此, 分别以黄芩苷的溶解度、制剂的稳定性、澄明度与纤毛毒性为指标, 对NaOH、醋酸钠、三乙醇胺等pH调节剂的种类和用量进行筛选。结果表明, 由于本制剂是基于温度/离子敏感原理设计的即型凝胶不宜选用NaHCO₃、NaOH、醋酸钠等碱金属缓冲盐。经过溶解度、稳定性和纤毛毒性实验考察, 确定以0.8%的三乙醇胺作为本品的pH调节剂, 将本品的pH调至5.5~6.0, 经蟾蜍纤毛毒性实验验证了其毒性小、安全性好。

2.1.3 泊洛沙姆407和DGG用量的筛选 泊洛沙姆为常用的温度敏感高分子材料, 其中泊洛沙姆407以其较好的温度敏感性和溶蚀性被广泛用作温敏即型凝胶的主要基质^[8], 因此, 本研究选择其作为柴黄鼻用凝胶剂的基质材料。为进一步提高即型凝胶在鼻腔内的相转换敏感性, 在处方中添加具有离子敏感性质的去乙酰结冷胶DGG^[9], 人鼻腔中Na⁺、K⁺和Ca²⁺的浓度分别为150、41和8 mmol/L^[10], 利用鼻腔内的特定离子强度, 以实现由溶液剂向凝胶剂的快速转换。分别配制0.1%、0.2%、0.3%、0.5%、0.75%和1.0%五种不同质量分数的DGG溶液, 将各质量分数DGG溶液与人工鼻液以不同体积比(10:10、10:9、10:8、10:7、10:6、10:5、10:4、10:3、10:2、10:1、10:0)混合, 测定黏度, 以接近5 Pa.s为凝胶剂在鼻黏膜滞留时间的理想黏度^[11]。结果表明当DGG质量分数为0.1%时凝胶的黏度过低, 而1%的DGG黏度过高; 当质量分数为0.2%~0.5%时, 能在少量鼻液的环境下形成较为理想的凝胶。

在预实验的基础上, 分别选择泊洛沙姆质量分数为16%、18%和20%, DGG为0.2%、0.3%和0.5%, 采用旋转黏度计法测定相转换温度作为评价指标, 对二者的浓度和比例进行优化。正常人体的鼻腔温度为33~35℃, 在发热状况下会略微升高^[12]。由表2可知, 当泊洛沙姆407为18%、DGG为0.3%时, 即型凝胶的胶凝温度为(36.0±0.10)℃, 符合处方设计要求, 因此, 选择该比例作为凝胶组成。

2.2 柴胡挥发油和黄芩提取物比例的优化

分别采用皮下注射干酵母致大鼠发热模型和二甲苯致小鼠耳廓肿胀炎症模型, 考察经滴鼻给药后, 不同比例柴胡挥发油和黄芩提取物制备的即型凝胶制剂的药效差

表2 不同浓度泊洛沙姆407和DGG组成基质的胶凝温度 (n=3)
Table 2 The *in situ* gelling temperature of different concentrations of poloxamer407 and deacylated gellan gum (DGG) (n=3)

Concentration (m/m, %)		Gelling temperature/℃
DGG	Poloxamer407	
0.2	16	45.12±0.14
0.2	18	40.05±0.12
0.2	20	37.11±0.20
0.3	16	43.06±0.14
0.3	18	36.05±0.10
0.3	20	28.33±0.42
0.5	16	37.21±0.11
0.5	18	32.12±0.42
0.5	20	27.23±0.20

异。在预实验的基础上, 根据柴胡挥发油和黄芩提取物的得率, 将柴胡与黄芩的生药比分别设为0:10、4:1、6:1、8:1、10:0不同的比例, 筛选二者最佳配比。

2.2.1 大鼠解热实验 SD大鼠, 雄性, 体质量180~220 g, 每天上午9:00和下午2:00测肛温, 连续测定3 d, 选取体温波动不超过0.3℃的大鼠42只。实验前24 h自由进食、饮水, 并进行鼻腔检查, 以确保无任何鼻部损伤, 随机分为7组, 每组6只, 分别为空白对照组(模型组)、空白基质组、5个不同生药比给药组。给药方法为在造模前后分别滴鼻给药一次, 每次30 μL, 空白对照组给予生理盐水、空白基质组给予不含药的即型凝胶基质、给药组给予不同柴胡-黄芩比例(生药比)0:10、4:1、6:1、8:1和10:0制成的即型凝胶。

开始实验前测定大鼠体温(T₀), 将T₀作为初始体温, 每组大鼠均皮下注射20%干酵母混悬液10 mL/kg, 每隔1 h测定肛温。在注射之前滴鼻给予对照或相应比例的柴黄鼻用即型凝胶30 μL/只, 于致热4 h之后再次滴鼻给药30 μL/只, 测定大鼠肛温至造模后10 h。

由图1可知, 给予生理盐水或空白凝胶基质组后, 大鼠于3 h时体温开始逐渐升高, 且之后一直处于发热状态, 证明造模成功。各比例的柴黄即型凝胶均有一定的解热效果, 柴胡与黄芩生药比为6:1时, 降温效果最为显著, 在2 h时达到最低, 且随后大鼠体温升高的速率明显降低。与生理盐水和空白凝胶基质组相比, 其在各个时间点的体温差异均有统计学意义(P<0.05), 在给予发热剂10 h后, 大鼠体温降至正常值, 其降热速率及降热效果均优于其他各组。因此, 当柴胡与黄芩生药比为6:1时, 其解热效果最佳。

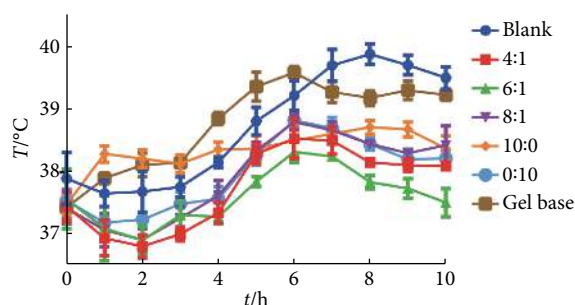


图 1 不同比例的柴胡挥发油和黄芩提取物即型凝胶对大鼠的解热作用 ($n=6$)

Fig 1 Antipyretic effect of *in situ* gel of *Bupleuri radix* volatile oil and baicalin of different proportions ($n=6$)

2.2.2 小鼠抗炎实验 取昆明种小鼠, 雄性, 体质量 22 ~ 25 g。实验前 24 h 自由进食、饮水, 并进行鼻腔检查, 以确保无任何鼻部损伤, 取小鼠 42 只, 随机共分为 7 组, 每组 6 只, 分为空白对照组(模型组)、空白基质组、5 个不同生药比给药组。给药方法为在造模前连续滴鼻给药 3 d, 每天给药 1 次, 每次 5 μ L。空白对照组给予生理盐水、空白基质组给予不含药的即型凝胶基质、给药组给予不同柴胡-黄芩不同比例(生药比) 0 : 10、4 : 1、6 : 1、8 : 1 和 10 : 0 制成的即型凝胶; 最后一次给药后 30 min 于小鼠右耳涂 100% 二甲苯 0.02 mL 致炎, 左耳不涂, 15 min 后处死, 沿耳廓基线剪下双耳, 用 9 mm 直径打孔器分别在同一部位打下圆耳片, 称重。每鼠的右耳片质量减去左耳片质量即为肿胀度, 以给药后药物对小鼠右耳的肿胀抑制率为指标, 比较各组给药后的抗炎效果。肿胀抑制率 (%) = (空白基质组平均肿胀度 - 给药组平均肿胀度) \div 空白基质组平均肿胀度 \times 100%。

由表 3 可知, 给予生理盐水后, 小鼠耳肿胀度较大, 说明二甲苯具有明显的致炎作用, 模型建立成功。空白基质组对小鼠耳肿胀炎症模型几乎没有抑制作用, 各比例的柴黄即型凝胶均具有一定的抗炎效果, 均优于空白基质组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。当柴胡-黄芩生药比为 6 : 1 时, 抗炎效果优于其他各比例组 ($P < 0.01$), 表明其抗炎效果最佳。

根据上述实验结果, 当柴胡-黄芩生药比为 6 : 1 时, 其解热、抗炎药效均优于其他比例, 因此, 选择柴胡与黄芩生药的比例为 6 : 1 作为柴黄鼻用即型凝胶剂的处方比例。

2.3 即型凝胶的制备与表征

2.3.1 即型凝胶的制备工艺 取处方量柴胡挥发油, 加入增溶剂与适量去离子水, 搅拌使挥发油完全溶解, 作为溶液 1; 取处方量黄芩提取物, 加入适量去离子水, 调节 pH, 搅拌至完全溶解, 作为溶液 2; 取处方量去乙酰结冷胶, 加入适量去离子水, 80 $^{\circ}$ C 左右加热至完全溶解, 放冷

表 3 不同比例的柴胡挥发油和黄芩提取物的抗炎结果 ($n=6$)

Table 3 Anti-inflammation effect of *in situ* gel of *Bupleuri Radix* volatile oil and baicalin with different ratio ($n=6$)

Group	Degree of swelling/mg	Inhibition rate/%
Blank	24.16 \pm 4.26	—
Gel base	20.19 \pm 0.12	16.43
<i>Bupleuri Radix</i> volatile oil : Baicalin		
10 : 0	10.55 \pm 0.063 [*]	56.33
8 : 1	10.35 \pm 0.061 [*]	57.16
6 : 1	5.63 \pm 0.095 ^{*,#}	76.69
4 : 1	7.69 \pm 0.028 [*]	68.17
0 : 10	11.47 \pm 0.083 [*]	52.52

* $P < 0.01$, compared with gel base group; # $P < 0.05$, compared with other different ratio.

至室温, 依次加入溶液 1、2, 以及处方量的维生素 C、苯甲醇, 搅拌均匀作为溶液 3; 按比例称取泊洛沙姆 407, 加入适量去离子水使其完全湿润, 放入 4 $^{\circ}$ C 的冰箱中保存 24 h 以上, 至完全溶解, 作为溶液 4; 将溶液 4 和溶液 3 混合, 搅拌均匀, 加去离子水至足量, 即得。

2.3.2 即型凝胶溶液的外观性状、pH 和相转换温度测定 参照《中国药典》2020 年版四部通则项下规定, 分别对即型凝胶溶液的外观性状、pH 等进行测定。3 批样品的检查结果显示, 制剂为澄清的黄色溶液, pH 为 5.5 ~ 6.0, 相转换温度为 (36.0 \pm 0.21) $^{\circ}$ C。

2.3.3 即型凝胶中黄芩苷的释放度测定 以黄芩苷为指标, 考察有效成分从凝胶剂中的释放情况。

2.3.3.1 色谱条件 Hypersil-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m), 流动相: 0.1% 磷酸水溶液-甲醇 (体积比 55 : 45); 检测波长: 280 nm, 流速: 1 mL/min, 进样量: 10 μ L, 柱温: 30 $^{\circ}$ C。

2.3.3.2 线性关系考察 取黄芩苷对照品 60 mg, 精密称定, 置 10 mL 棕色量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 配制成 6 mg/mL 对照品溶液。将对照品溶液用流动相稀释成 6、12、60、180、240、300 μ g/mL, 分别精密吸取 10 μ L 注入液相色谱仪, 测定。以峰面积 (A) 对质量浓度 (C) 进行线性回归, 得回归方程为 $A = 2630.089C + 760.01$ ($r = 0.9995$), 表明黄芩苷在 6 ~ 300 μ g/mL 质量浓度范围内线性关系良好。

2.3.3.3 精密性与回收率 吸取对照品溶液, 在 1 d 内和连续 5 d 测定, 计算得日内和日间 RSD 分别为 0.32% 和 0.85%。取柴黄鼻用即型凝胶各 6 份, 精密称定, 分别精密加入对照品溶液各 20 μ L, 进样, 测定, 计算得到加样回收率为 99.18% \pm 3.31%。

2.3.3.4 释放度测定 采用透析膜法模拟药物在鼻腔中

的释放过程。精密吸取柴黄即型凝胶剂溶液 0.5 mL(含黄芩苷 0.58 mg), 置于截留分子量 1.2 万的透析膜中, 然后于 5 mL 37 °C 人工鼻液介质中进行释放实验, 转速 100 r/min。分别于 10 min、0.5 h、1 h、2 h、3 h、4 h、5 h、6 h、8 h、9 h、10 h 取样 0.5 mL(同时补加同体积保温介质), HPLC 法测定接收液中黄芩苷的含量, 计算各取样时间点释放药物的百分比, 绘制释放曲线。

由图2可知, 黄芩苷从凝胶剂中的释放具有良好的缓释特征, 分别对释放过程采用不同方程进行拟合, Higuchi 方程: $M_t/M_\infty = 30.77t^{1/2} - 22.21$, $r = 0.9599$; 一级方程: $M_t/M_\infty = 93.366(1 - \exp(-0.1457t))$, $r = 0.9610$; 零级方程: $M_t/M_\infty = 11.8215t - 6.8923$, $r = 0.9745$ 。结果表明黄芩苷的释放与零级方程拟合度较好, 符合零级释放规律, 表明药物的释放是水分子由凝胶表面逐渐进入内部使其溶解的过程, 药物以恒定的速率缓慢地从即型凝胶体系中释放, 从而可以实现给药后的缓释长效目的。

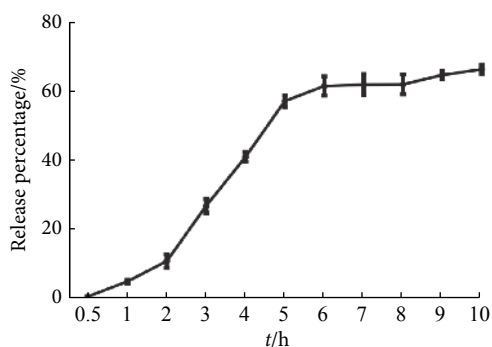


图2 黄芩苷在模拟鼻腔37 °C下从凝胶剂中的释放曲线 (n=6)

Fig 2 The release curve of baicalin from *in situ* gel in simulated nasal medium at 37 °C (n=6)

2.4 柴黄鼻腔即型凝胶剂的药效学评价

2.4.1 大鼠解热实验 实验动物与实验方法同2.2.1。选取体温波动不超过0.3 °C的大鼠18只, 随机分为空白基质组、即型凝胶剂组和阳性对照组(柴黄颗粒组), 每组6只。给药前测定体温作为初始体温, 各组大鼠均皮下注射20%干酵母混悬液10 mL/kg, 每隔1 h测定肛温。即型凝胶剂组在注射之前使用微量进样器进行滴鼻给药, 每只给予30 μL(黄芩苷1.67 mg/只), 于致热4 h之后再次以相同剂量滴鼻给药; 阳性对照组在注射干酵母前灌胃给予柴黄颗粒, 给药剂量为0.42 g/kg(黄芩苷31.5 mg/kg), 于致热4 h之后再次灌胃给药。每隔1 h测定大鼠肛温至造模后10 h。给药后3组大鼠的体温变化曲线见图3。

由图3可知, 大鼠经皮下注射干酵母致热后, 空白基质组的温度持续升高, 第8小时达到最高温度, 之后体温略有下降, 但仍处于高热状态, 表明致热模型建立成功。

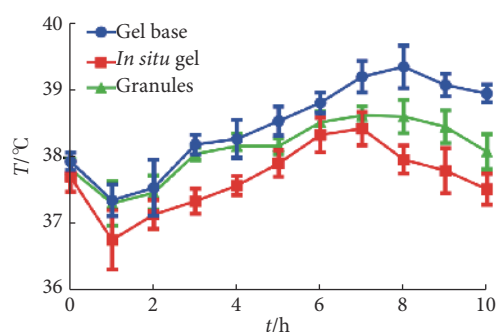


图3 柴黄鼻腔即型凝胶剂的大鼠解热作用 (n=6)

Fig 3 Antipyretic effect of *in situ* nasal gel of *Bupleuri radix* volatile oil and baicalin (n=6)

空白基质不具有退热效果, 与空白基质组相比, 柴黄颗粒剂和即型凝胶剂均可显著降低大鼠体温, 且解热作用可持续10 h。即型凝胶剂组与空白基质组相比, 致热1 h以后, 每个时间点降热效果差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 其中在2 h、3 h、4 h和10 h的降温效果更为明显 ($P < 0.01$)。与阳性对照组相比, 在测定体温的10 h内, 即型凝胶剂组大鼠的平均体温均更低, 在致热后1 h、2 h、3 h、4 h、5 h、6 h、8 h、9 h、10 h, 二者解热效果差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 表明鼻腔给予柴黄即型凝胶剂具有更显著的解热效果, 且较柴黄颗粒剂起效时间更快, 具有速效、高效、长效的特点。

2.4.2 小鼠抗炎实验 实验动物与实验方法同2.2.2。取雄性昆明小鼠24只, 随机分为空白对照组(模型组)、空白基质组、即型凝胶剂组和阳性对照组(柴黄颗粒组), 每组6只。其中空白对照组、空白基质组和即型凝胶剂组给药方法为在造模前连续滴鼻给药3 d, 每天给药1次, 每次5 μL; 空白对照组给予生理盐水, 空白基质组给予即不含药的即型凝胶基质, 即型凝胶剂组给予柴黄即型凝胶剂(黄芩苷0.33 mg/只); 柴黄颗粒组造模前连续灌胃给药3 d, 每天给药1次, 每次0.61 g/kg(黄芩苷45.75 mg/kg)。结果见表4。

由表4可知, 给予生理盐水或空白基质后, 小鼠耳肿胀度较大, 二甲苯具有明显的致炎作用, 说明模型建立成功。与模型组比较, 空白凝胶基质基本不具有抗炎作用 ($P > 0.05$)。与空白基质组比较, 给予灌胃柴黄颗粒剂和即型凝胶剂后, 均有明显的抗炎效果 ($P < 0.01$), 且即型凝胶剂组的抗炎效果优于阳性对照组 ($P < 0.05$)。

2.5 柴黄鼻腔即型凝胶剂的安全性评价

采用蟾蜍纤毛毒性实验考察柴黄鼻用即型凝胶剂鼻腔给药的安全性。取中华大蟾蜍24只, 随机分为空白对照组(模型组)、空白基质组、阳性对照组(去氧胆酸钠溶液组)和柴黄鼻用即型凝胶组, 每组6只。将蟾蜍固定并

表 4 柴黄鼻腔即型凝胶剂的小鼠抗炎作用 (n=6)

Group	Degree of swelling/mg	Inhibition rate/%
Blank	26.80±9.780	—
Gel base	22.72±0.416	15.22
<i>In situ</i> gel	10.47±0.508 ^{*#}	60.93
Granules	5.08±0.663 [*]	81.04

* $P < 0.01$, vs. gel base; # $P < 0.05$, vs. granules.

打开口腔,取试验样品溶液0.5 mL滴加至上颚黏膜处,使其浸没上颚黏膜,0.5 h后用生理盐水清洗干净,将上颚黏膜取出洗净,使黏膜面向上平铺于载玻片上并滴加适量生理盐水,加盖盖玻片,置于光学显微镜(400倍)下观察纤毛情况。观察完毕后,将载玻片置于加有少量蒸馏水的层析缸中,密闭,室温条件使缸内水蒸气近饱和,每隔15 min间取出标本观察,持续观察10 h。

由图4可见,给予生理盐水的蟾蜍上颚黏膜面完整,无纤毛脱落现象,纤毛运动非常活跃;给予空白凝胶基质溶液组、柴黄鼻用即型凝胶溶液组黏膜面完整,纤毛数量多,运动活跃,但部分纤毛运动略有减弱,表明柴黄鼻用即型凝胶会在一定程度上减弱纤毛运动,但影响很小,说明空白基质和含药凝胶均有较好的安全性;给予去氧胆酸钠后15 min时即可观察到黏膜表明杂乱,纤毛脱落,纤毛运动缓慢,约1 h后观察到纤毛完全脱落,纤毛运动完全停止,说明其对黏膜组织纤毛运动有严重影响。

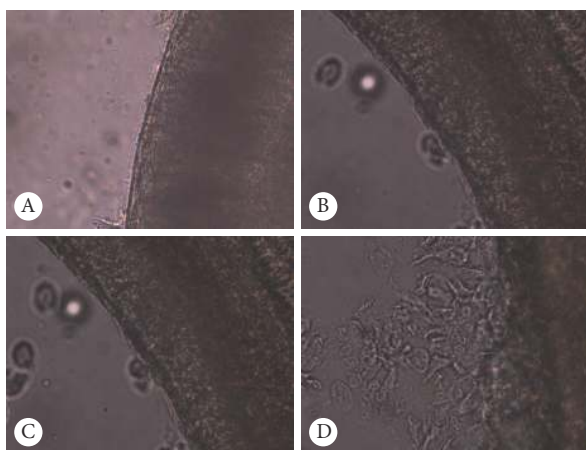


图 4 柴黄鼻腔即型凝胶剂的纤毛毒性。×400

Fig 4 The toxicity effect of *in situ* nasal gel of *Bupleuri radix* volatile oil and baicalin on the toad upper mucosa cilia. ×400

A: Saline; B: Gel base; C: *In situ* nasal gel of *Bupleuri radix* volatile oil and baicalin; D: Deoxysodium cholate.

3 讨论

药物鼻腔给药具有吸收迅速、起效快、可避免胃肠

道及肝脏的首过效应、生物利用度高等优点^[13]。目前常见的鼻腔给药剂型(滴鼻剂、喷雾剂、凝胶剂等)^[14]仍在临床应用方面存在一定的不足:如滴鼻剂流动性较强,易造成药液损耗,患者适应性较差;喷雾剂载药量较小,生产成本高;凝胶剂对药物的溶解性质有较高的要求(水溶性药物更易制成凝胶剂),且进入鼻腔后流动性较差,使用不便。即型凝胶剂是近年来发展起来的新剂型,其具有独特的溶液-凝胶物理转相性质以及凝胶制剂亲水性三维网络结构和良好的组织相容性,同时制备简单、使用方便、与药用部位特别是黏膜组织具有较强的组织亲和力、滞留时间长,具有良好的缓释性能。

目前研究较多的即型凝胶剂是温度敏感型和离子敏感型。温度敏感型可在一定的温度条件下发生转相,泊洛沙姆407作为常见的温敏性材料具有可自组装成胶束、热可逆以及优良的生物相容性和理化特性,单独使用一般需要较高的辅料浓度,可能对机体产生伤害^[15]。离子敏感型即型凝胶为高分子溶液剂,可在体内外不同的离子的强度下发生分散状态或与 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 K^+ 结合形成凝胶,组织相容性和复配性良好,去乙酰结冷胶是常用的离子敏感性材料^[16]。

中药制剂的鼻腔即型凝胶制剂研究开发还比较少。本实验以中医经典药对“柴胡-黄芩”两药的主要药效成分为研究对象,将中药经典处方与现代制剂相结合,根据鼻腔的生理特点,即具有一定的温度和少量的鼻液(鼻液富含 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 K^+),将泊洛沙姆与DGG相联合制成具有温度和离子双重敏感的鼻用即型凝胶剂,减少辅料的用量,同时增加了制剂对环境的敏感性,提高了即型凝胶剂在鼻腔中的转相性能,在优化柴胡挥发油与黄芩提取物比例的基础上,对即型凝胶的释药特性、药效学、安全性进行了系统的研究。实验结果表明,该剂型制备工艺简单、使用方便、在人鼻腔中可以迅速完成转相过程,具有较长的作用时间。进一步将本制剂与已上市且被证明有良好的解热抗炎效果的柴黄颗粒进行了药效学对比研究,结果表明柴黄鼻用即型凝胶剂具有更佳的治疗效果。研究结果为该制剂的进一步开发应用提供了科学依据。

由于鼻液离子强度的测定受到测定温度、体积、放置时间等很多因素的影响,因此,关于鼻液的离子强度并没有统一的标准^[17-18],本研究选择了文献较为公认的人工鼻液的组成配制了人工鼻液,用于实验。

在药效学实验验证中,我们选择了已上市的柴黄颗粒作为对照。为了更好的贴近临床用药实际用量,我们根据柴黄颗粒的人用剂量折算为小鼠剂量,而不是简单的以黄芩苷的含量相同确定柴黄颗粒的剂量,因为后者

只有前者的约1/3。即使这样,柴黄鼻腔喷雾剂的药效仍然显著优于口服的柴黄颗粒。同时,我们采用高效液相色谱法进行了给药后脑中黄芩苷浓度的测定,但可能由于检测方法的灵敏度问题,只能在几个时间点内测到,不能得到完整的药动学曲线,我们将继续探索采用HPLC-MS-MS的方法测定脑中药物浓度,以更好地阐明本制剂的体内过程。

* * *

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典, 一部. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 1457-1458.
- [2] SUN P, LI Y, WEI S, *et al.* Pharmacological effects and chemical constituents of bupleurum. *Mini Rev Med Chem*, 2019, 19(1): 34-55.
- [3] 杨献光, 孙阁阁, 丁翠红, 等. 黄芩苷的生物学功能及作用机理. *中国细胞生物学学报*, 2021, 43(4): 850-855.
- [4] 卢建, 余应年, 吴其夏. 新编病理生理学. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999: 216-218.
- [5] 唐随意, 杨晶, 符旭东. 布地奈德灌肠用温敏性凝胶的体外释放度及局部滞留性评价. *中国医院药学杂志*, 2019, 39(13): 1332-1336.
- [6] 陈厚云, 徐秦岚, 郭安臣, 等. 脑靶向性鼻腔给药的研究进展. *中医外治杂志*, 2018, 27(3): 52-54.
- [7] 陈恩, 陈钧, 曹师磊, 等. 柴胡鼻用pH敏感型原位凝胶的制备及退热效果评价. *中国医药工业杂志*, 2008, 39(9): 666-670.
- [8] 陈桂添, 吴艳婷, 时军, 等. 温敏凝胶的研究进展. *广东药科大学学报*, 2017, 33(4): 556-560.
- [9] 王健, 王春仁. 离子敏感性生物材料的研究进展. *中国药事*, 2019, 33(10): 1143-1148.
- [10] CARLFORS J, EDSMAN K, PETERSSON R, *et al.* Rheological evaluation of Gelrite *in situ* gels for ophthalmic use. *Eur J Pharm Sci*, 1998, 6(2): 113-119.
- [11] 李新方, 王骥榕, 陈敏, 等. 薄荷脑鼻用原位凝胶流变与凝胶特性研究. *海军医学杂志*, 2018, 39(3): 214-218.
- [12] 《耳鼻咽喉科学》编写组. 耳鼻咽喉科学. 上海: 上海人民出版社, 1977: 56-58.
- [13] 万红, 何中美, 毛得宏, 等. 中药鼻腔给药研究进展. *实用中医药杂志*, 2021, 37(2): 325-328.
- [14] ALSHWEIAT A, AMBRUS R, CSOKA I. Intranasal nanoparticulate systems as alternative route of drug delivery. *Curr Med Chem*, 2019, 26(35): 6459-6492.
- [15] 张圆圆, 杜丽娜, 金义光. 环境敏感型水凝胶在药物递送中的应用. *药学学报*, 2021, 56(5): 1314-1331.
- [16] RUFATO K B, SOUZA P R, DE OLIVERIRA A C, *et al.* Antimicrobial and cytocompatible chitosan, N, N, N-trimethyl chitosan, and tanfloc-based polyelectrolyte multilayers on gellan gum films. *Int J Biol Macromol*, 2021, 183: 727-742.
- [17] LORIN M I, GAERLAN P F, MANDEL I D. Quantitative composition of nasal secretions in normal subjects. *J Lab Clin Med*, 1972, 80: 275-281.
- [18] BURKE W. The ionic composition of nasal fluid and its function. *Health*, 2014, 6: 720-728.

(2021-02-25收稿, 2021-06-19修回)

编辑 汤 洁