

马来酸阿塞那平微乳凝胶剂的制备及经鼻入脑的靶向性研究



张水杰¹, 童晓云¹, 曾媛², 雷刚¹

1. 武汉科技大学附属天佑医院神经内科 (武汉 430064)

2. 中部战区总医院药剂科 (武汉 430019)

【摘要】目的 制备马来酸阿塞那平微乳凝胶剂 (ASPM-Emulgel), 并通过鼻腔给药评价其脑靶向性。**方法** 根据马来酸阿塞那平 (ASPM) 在不同种类油、乳化剂和助乳化剂中的平衡溶解度以及辅料相容性结果确定马来酸阿塞那平微乳 (ASPM-Emul) 的处方组成及用量, 并以卡波姆 940 作为凝胶基质将 ASPM-Emul 制备成凝胶剂; 考察 ASPM-Emul 的粒径分布及微观形态, 通过 Franz 扩散池法比较 ASPM-Emul 与 ASPM-Emulgel 的体外释放速率以及在羊鼻黏膜的渗透性; 采用在体蟾蜍上颌模型法考察 ASPM-Emulgel 的鼻腔纤毛毒性; 评价 ASPM-Emulgel 经大鼠鼻腔给药的脑靶向性。**结果** 根据平衡溶解度和相容性结果, 选择单亚油酸甘油酯、吐温 80 和二乙二醇单乙基醚分别作为 ASPM-Emul 的油相、乳化剂和助乳化剂, 配比为 4:4:2; ASPM-Emul 为淡蓝色半透明状微乳液, 粒径为 (73.6 ± 7.4) nm, 在透射电镜下可观察到微乳呈规则球形, 均匀分散; 体外释放及渗透结果显示, ASPM-Emul 的释药速率较快, ASPM-Emulgel 释药速率持续平缓, 但两者在羊鼻黏膜中的渗透率基本一致; ASPM-Emul 和 ASPM-Emulgel 对蟾蜍鼻腔纤毛无明显毒性; 与尾静脉 ASPM 组相比, ASPM-Emul 和 ASPM-Emulgel 经鼻腔给药后在大脑中的药物含量显著增高, 均表现出明显的脑靶向性, 且 ASPM-Emulgel 的脑靶向效率更高。**结论** 将 ASPM 制备成微乳凝胶剂, 经鼻腔给药后可以显著提高药物的脑靶向性, 有望提高马来酸阿塞那平的临床治疗效果。

【关键词】 马来酸阿塞那平; 微乳凝胶剂; 鼻腔给药; 脑靶向性; Franz 扩散池法

Preparation and brain targeting via nasal route of asenapine maleate microemulsion gel

ZHANG Shuijie¹, TONG Xiaoyun¹, ZENG Yuan², LEI Gang¹

1. Department of Neurology, Wuhan University of Science and Technology Affiliated Tianyou Hospital, Wuhan 430064, China

2. Department of Pharmacy, Central Hospital of Central Theater of the PLA, Wuhan 430019, China

Corresponding author: LEI Gang, Email: whleigang202312@163.com

【Abstract】Objective To prepare asenapine maleate microemulsion gel (ASPM-Emulgel) and evaluate its brain targeting by nasal administration. **Methods** The prescription composition and dosage of asenapine maleate microemulsion (ASPM-Emul) was determined according to the equilibrium solubility of asenapine maleate (ASPM) in different oils,

DOI: 10.12173/j.issn.1008-049X.202312091

通信作者: 雷刚, 硕士, 主治医师, Email: whleigang202312@163.com

<https://zgys.whuzhmedj.com>

emulsifiers, co-emulsifiers and the compatibility results of excipients, and ASPM-Emul was prepared into a gel with carbomer 940 as the gel matrix. The particle size distribution and microstructure of ASPM-Emul were investigated. The in vitro release rates and permeability in sheep nasal mucosa of ASPM-Emul and ASPM Emulgel were compared using the Franz diffusion cell method. The nasal ciliary toxicity of ASPM-Emulgel was investigated using the in vivo toad maxillary model method. Brain targeting of ASPM-Emulgel by nasal administration in rats was evaluated. **Results** According to the results of equilibrium solubility and compatibility, Maisine 35-1, Tween 80 and Transcutol P were selected as the oil phase, emulsifier and co-emulsifier of ASPM-Emul, respectively, with the ratio of 4 : 4 : 2. ASPM-Emul was a light blue semi-transparent microemulsion with a particle size of (73.6±7.4) nm. The microemulsion was regularly spherical and uniformly dispersed under transmission electron microscopy. The results of in vitro release and permeation showed that the release rate of ASPM-Emul was relatively fast, while the release rate of ASPM-Emulgel remained stable. However, the permeability of the two formulations in sheep nasal mucosa was basically similar. ASPM-Emul and ASPM-Emulgel showed no significant toxicity to nasal cilia of toad. Compared with the tail vein ASPM group, the drug content in the brain of ASPM-Emul and ASPM-Emulgel significantly increased after nasal administration, both exhibiting significant brain targeting, and the drug targeting efficiency (DTE) of ASPM-Emulgel was higher. **Conclusion** The preparation of ASPM into microemulsion gel can significantly improve the brain targeting after nasal administration, and is expected to improve the clinical therapeutic effect of ASPM.

【Keywords】 Asenapine maleate; Microemulsion gel; Nasal administration; Brain targeting; Franz diffusion pool method

马来酸阿塞那平 (asenapine maleate, ASPM) 属于第二代 (非典型) 抗精神病药物, 用于治疗成人精神分裂症、慢性重度脑功能障碍以及 I 型双相性精神障碍等疾病^[1]。ASPM 属于生物药剂学分类系统 II 类药物, 具有低溶解度和高渗透性, 由于存在肝脏首过效应, 其口服生物利用度小于 2%^[2]。目前市售产品为舌下片, 其口服生物利用度也仅达到 35%, 未得到更大程度的改善^[3]。

近年来研究表明, 药物经鼻腔给药后可以绕过血脑屏障直接进入脑部, 不仅避免首过效应, 且比静脉给药具有更高的脑部药物浓度, 作为脑靶向的一种策略, “鼻-脑”转运途径对治疗中枢神经系统疾病已具有显著优势^[4-5], 并受到研究者的广泛重视。

微乳是由油、乳化剂、助乳化剂和水按适当比例自发形成的粒径小于 500 nm 的热力学稳定的胶体分散体系, 可显著增加难溶性药物的溶解度及生物利用度^[6]。近年来研究表明, 微乳在鼻腔给药脑靶向方面具有广阔的应用前景^[7]。但低黏度的微乳给药后在鼻纤毛正常生理条件下极易被清除,

严重制约了药物的吸收与利用。而卡波姆凝胶具有极强的生物黏附性, 且对鼻黏膜刺激性小, 已作为微乳的优良载体广泛应用于鼻腔给药^[8]。

本研究针对 ASPM 的药物特点, 结合微乳与凝胶两种剂型的优势, 将 ASPM 制备成微乳凝胶剂, 延长了药物鼻腔内的停留时间, 促使药物充分吸收, 进而提高药物的治疗疗效, 为 ASPM 的临床使用提供一种新的给药途径。

1 材料

1.1 主要仪器

DF-101S 型集热式恒温磁力搅拌器 (天津市予华仪器科技有限公司); GL21M 型高速冷冻离心机 (湖南凯达科学仪器有限公司); Malvern Zetasizer Nano S90 型纳米粒度电位仪 (英国马尔文公司); JEM-1400 型透射电子显微镜 (日本电子公司); Franz 扩散池 (上海玉研科学仪器有限公司)。

1.2 主要药品与试剂

ASPM 原料药 (湖北广奥生物科技有限公

司, 批号: 20220109, 含量 99.6%); 油酸聚乙二醇甘油酯 (Labrafil M 1944, 批号: 15305)、辛酸/癸酸甘油酯 (Capmul MCM, 批号: 336418)、丙二醇单辛酸酯 (Capmul PG8, 批号: 52147)、豆蔻酸异丙酯 (Isopropyl Myristate, 批号: 336418)、丙二醇单月桂酸酯 (Lauroglycol 90, 批号: 423769)、单亚油酸甘油酯 (Maisine 35-1, 批号: 645211)、辛酸/癸酸聚乙二醇甘油酯 (Labrasol, 批号: 554714)、二乙二醇单乙基醚 (Transcutol P, 批号: 261781)、丙二醇单辛酸酯 (Capryol 90, 批号: 325871) 均由嘉法狮贸易有限公司惠赠; 吐温 80 (Tween 80, 批号: 33T26147)、聚氧乙炔蓖麻油 EL (Cremophor EL, 批号: 41L05324)、聚氧乙炔氢化蓖麻油 RH 40 (Cremophor RH 40, 批号: 34F21402)、聚乙二醇-15 羟基硬脂酸酯 (Solutol HS 15, 批号: 41P02426)、丙二醇 (Propylene glycol, 批号: 224789M1) 均由巴斯夫应用化工有限公司惠赠; 聚乙二醇 400 (PEG400, 批号: 20211204)、大豆油 (批号: 20210901)、橄榄油 (批号: 20220115)、玉米油 (批号: 20211214)、芝麻油 (批号: 20210911)、葵花籽油 (批号: 20220209) 均购自于湖南尔康制药股份有限公司; 卡波姆 940 (路博润先进材料公司, 批号: P210823); 羊鼻黏膜 (下马湖畜禽屠宰场); 透析袋 (上海新睿生物科技有限公司); pH 6.4 磷酸盐缓冲液 (实验室临用现配)。

1.3 实验动物

SPF 级 Wistar 大鼠, 体重 200~250 g, 雌雄各半, 购于武汉市万千佳兴生物科技有限公司, 饲养于屏障系统内聚碳酸酯鼠盒中, 饲养环境温度为 20~26℃, 相对湿度为 40%~70%, 实验动物生产许可证号: SCXK (鄂) 2016-0011。中华大蟾蜍, 普通级, 体重 30~40 g, 雌雄各半, 饲养环境温度为 20~26℃, 购自北京科宇动物养殖中心, 实验动物生产许可证号: SCXK (京) 2018-0010。本实验严格按照动物实验伦理要求进行操作, 且通过华中科技大学实验动物管理和使用委员会 (IACUC) 审批 (批件号: 3240)。

2 方法与结果

2.1 溶解度测定

ASPM-Emul 中油、乳化剂和助乳化剂的选择

通常分两步进行, 首先通过平衡溶解度研究, 选择对药物溶解性较大的辅料, 其次根据所选择的辅料配伍相容性进一步确定辅料配比^[9]。为了筛选 ASPM-Emul 处方中的油、乳化剂和助乳化剂, 分别测定了 ASPM 在油 (大豆油、橄榄油、玉米油、芝麻油、葵花籽油、Labrafil M 1944、Capmul MCM、Capmul PG8、Isopropyl Myristate、Lauroglycol 90、Maisine 35-1、Capryol 90)、乳化剂 (Labrasol、Tween 80、Cremophor EL、Cremophor RH 40、Solutol HS 15) 和助乳化剂 (Transcutol P、PEG400、Propylene glycol) 中的溶解度。称取不同油、乳化剂和助乳化剂各 2.0 g 分别加入小瓶中, 再加入过量 ASPM, 加塞密封, 涡旋混合 10 min, 固定在水浴摇床中, 在 25℃ 条件下连续振荡 48 h, 将样品从摇床中取出, 静置 12 h, 取上层药液并离心 (5 590 × g) 10 min, 分别收集上清液并测定药物含量^[10], 计算药物在各辅料中的平衡溶解度。重复测定 3 次, 取平均值, 结果见表 1。

表1 ASPM在不同种类油、乳化剂和助乳化剂中的平衡溶解度 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1. Equilibrium solubility of asenapine maleate in different oils, emulsifiers and co-emulsifiers ($\bar{x} \pm s, n=3$)

类别	辅料名称	平衡溶解度 (mg/g)
油	大豆油	18.4 ± 1.5
	橄榄油	22.6 ± 2.1
	玉米油	15.2 ± 0.9
	芝麻油	19.3 ± 0.8
	葵花籽油	23.7 ± 1.5
	Isopropyl Myristate	19.6 ± 0.9
	Capmul MCM	101.5 ± 3.1
	Capmul PG8	55.6 ± 2.3
	Labrafil M 1944	379.2 ± 4.6
	Lauroglycol 90	82.6 ± 3.5
乳化剂	Maisine 35-1	301.5 ± 4.3
	Capryol 90	76.2 ± 2.8
	Labrasol	66.3 ± 1.6
	Tween 80	75.7 ± 2.6
	Cremophor EL	20.1 ± 0.8
	Cremophor RH 40	23.6 ± 1.0
助乳化剂	Solutol HS 15	41.5 ± 2.1
	Transcutol P	154.6 ± 5.2
	PEG400	43.7 ± 2.0
	Propylene glycol	98.6 ± 4.7

测定结果显示,油中 ASPM 在 Labrafil M 1944 和 Maisine 35-1 的溶解度最大,需要对这两种油作进一步筛选;乳化剂中 ASPM 在 Labrasol 和 Tween 80 中的溶解度最大,同样需要对这两种乳化剂作进一步筛选;助乳化剂中 ASPM 在 Transcutol P 的溶解度最大。故本研究分别选择 Labrafil M 1944 或 Maisine 35-1 作为油相, Labrasol 或 Tween 80 作为乳化剂, Transcutol P 作为助乳化剂进行配伍相容性考察。

2.2 配伍相容性考察

按照质量比为 2:1 分别称取乳化剂 (Labrasol 或 Tween 80) 和助乳化剂 (Transcutol P), 涡旋混合 5 min 形成均匀的乳化剂混合物 (Smix),

再按照质量比为 3:7、4:6 和 5:5 称取油相 (Labrafil M 1944 或 Maisine 35-1) 和 Smix, 涡旋混合 5 min, 得到 12 组样品。取各组分样品各 1.0 g 均加入到 50 mL 纯化水中, 100 r/min 磁力搅拌, 观察形成的微乳液体性状, 测定粒径分布, 以及离心 ($2\ 795 \times g$) 15 min 是否出现分层^[11], 结果见表 2。

相容性结果显示, 以 Maisine 35-1/Tween 80/Transcutol P 组成的混合物加水后均能形成微乳, 且粒径较小, 物理稳定性较好, 故本研究选择 Maisine 35-1 作为油相, Tween 80 作为乳化剂, Transcutol P 作为助乳化剂制备 ASPM-Emul, 其质量比为 4:4:2。

表2 配伍相容性评估结果

Table 2. The results of compatibility evaluation

油相/乳化剂/助乳化剂	油:Smix (w/w)	乳液外观	乳液粒径 (nm)	离心情况
Labrafil M 1944/Labrasol/Transcutol P	3:7	蓝白色, 半透明状	377.3 ± 21.6	未分层
	4:6	蓝白色, 半透明状	379.5 ± 19.7	未分层
	5:5	亮白色, 不透明	574.6 ± 23.6	分层
Maisine 35-1/Labrasol/Transcutol P	3:7	淡蓝色, 透明状	141.3 ± 12.1	未分层
	4:6	蓝白色, 半透明状	227.7 ± 15.2	未分层
	5:5	蓝白色, 半透明状	301.6 ± 23.6	未分层
Maisine 35-1/Tween 80/Transcutol P	3:7	淡蓝色, 透明状	77.1 ± 6.50	未分层
	4:6	淡蓝色, 透明状	78.7 ± 6.10	未分层
	5:5	淡蓝色, 透明状	80.8 ± 5.20	未分层
Labrafil M 1944/Tween 80/Transcutol P	3:7	淡蓝色, 透明状	129.7 ± 7.90	未分层
	4:6	淡蓝色, 透明状	126.4 ± 8.40	未分层
	5:5	淡蓝色, 透明状	132.6 ± 10.6	未分层

2.3 马来酸阿塞那平微乳凝胶剂的制备

向玻璃瓶中分别称取 ASPM 0.5 g 和 Maisine 35-1 4.0 g, 涡旋混合直至药物完全溶解, 再称取 Tween 80 4.0 g、Transcutol P 2.0 g 加入玻璃瓶中, 涡旋混合 5 min, 形成透明状油溶液, 备用; 取上述样品 1.0 g 加入 50 mL 纯化水中, 100 r/min 磁力搅拌, 制备得马来酸阿塞那平微乳凝胶剂 (asenapine maleate microemulsion gel, ASPM-Emulgel) (图 1-A)。另称取卡波姆 9 401.0 g 加入 40 mL 纯化水充分分散, 再缓慢滴加氢氧化钠溶液并不断搅拌, 直至 pH 范围在 6.0~6.5 内, 形成凝胶基质; 再将制备的 ASPM-Emul 加入凝胶基质中, 充分搅拌, 定重至 100 g, 脱气后低温密封保存, 即得 ASPM-Emulgel (图 1-B)。

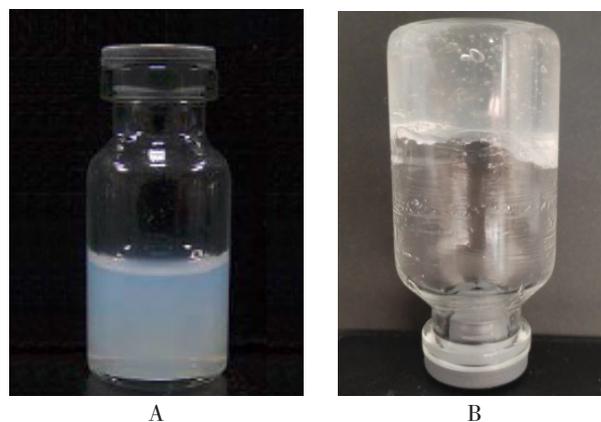


图1 ASPM-Emul (A) 和 ASPM-Emulgel (B) 外观

Figure 1. The appearance of ASPM-Emul (A) and ASPM-Emulgel (B)

2.4 ASPM-Emul与ASPM-Emulgel的质量评价

2.4.1 ASPM-Emul粒径分布

移取 ASPM-Emul 0.1 mL 加入聚苯乙烯比色皿中,再加入纯化水 0.9 mL,轻轻振摇,混合均匀,采用纳米粒度仪测定粒径分布(图2)。测定参数设置如下:氦氛激光器,功率为 4 mW,波长为 633 nm,室温为 25℃,角度固定为 90°。每份样品均测定 3 次,并取平均值。测得 ASPM-Emul

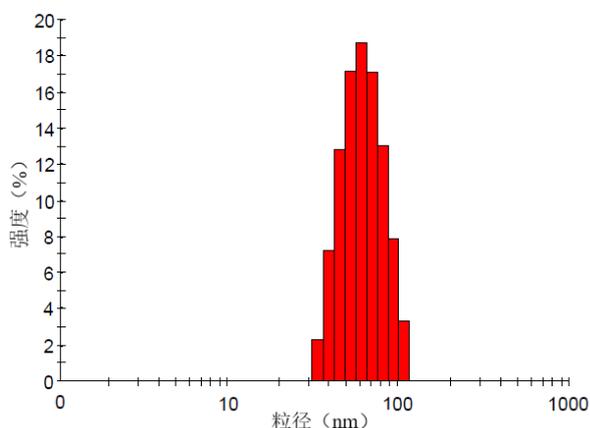


图2 ASPM-Emul的粒径分布

Figure 2. The particle size distribution of ASPM-Emul

2.4.3 ASPM-Emulgel理化性质

分别在(25±1)℃和(32±1)℃条件下使用黏度计和 pH 计分别测定 ASPM-Emul、卡波姆 940 凝胶以及 ASPM-Emulgel 的黏度及 pH,结果见表3。

结果显示,溶液状 ASPM-Emul 的黏度较低,鼻腔给药后不利于长时间黏附于鼻粘膜表面;而 ASPM-Emul 制备成凝胶后黏度明显增加,经涂抹测试,ASPM-Emulgel 不仅有利于涂布,而且有利于黏附到鼻粘膜表面^[12];另外,ASPM-Emulgel 的 pH 接近中性,不会对鼻粘膜产生刺激性。

2.4.4 体外药物释放与鼻黏膜渗透性

药物经鼻黏膜渗透吸收分为释放和渗透两个过程,因此本研究通过体外半透膜和体外羊鼻黏

的平均粒度为(73.6±7.4) nm,多分散系数为(0.163±0.007)。

2.4.2 ASPM-Emul微观形态

取少量 ASPM-Emul 用纯化水稀释,移取稀释液滴加到 300 目涂有碳膜铜网格上,并滴加磷酸钨酸溶液染色 10 min,阴凉处风干后,在透射电镜下观察并拍摄照片(图3)。电镜照片显示,ASPM-Emul 呈规则球形,均匀分散,无聚集,粒径大多数在 50~100 nm 范围内。

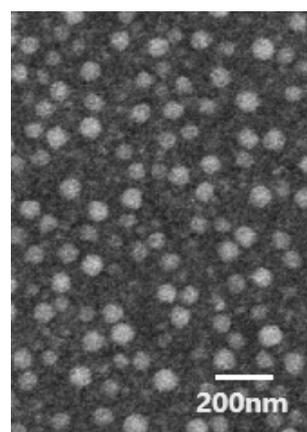


图3 ASPM-Emul透射电镜照片

Figure 3. Transmission electron micrograph of ASPM-Emul

膜评价制剂的体外释放速率与渗透率^[13]。

采用 Franz 扩散池法比较 ASPM 溶液、ASPM-Emul 和 ASPM-Emulgel 的体外释药速率。取浸泡过夜的透析袋(截留分子量:5 000 Da)裁剪成单层膜,固定于供给池与接收池之间,接收池中加入磷酸盐缓冲液(pH 6.4) 7 mL,水浴温度为(32±0.5)℃,磁力搅拌速度为 100 r/min,分别精密称取 ASPM 溶液、ASPM-Emul 和 ASPM-Emulgel 各 1.0 g 均匀涂布至供给池的半透膜上表面,并于给药后 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12 h 取样 1 mL(同时补加同温同体积空白介质)经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,测定药物含量,计算药物累积释放度,绘制释放度-时间曲线图,结果见图4。

表3 ASPM-Emulgel理化性质评价结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3. Evaluation results of physical and chemical properties of ASPM-Emulgel ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	(25±1)℃		(32±1)℃	
	黏度/厘泊	pH	黏度/厘泊	pH
ASPM-Emul	18.5±2.7	6.94±0.02	16.1±3.4	6.86±0.03
卡波姆940凝胶	5 472.4±85.3	6.35±0.02	5 163.7±91.6	6.31±0.01
ASPM-Emulgel	5 143.7±72.6	6.48±0.03	4 951.3±84.6	6.34±0.02

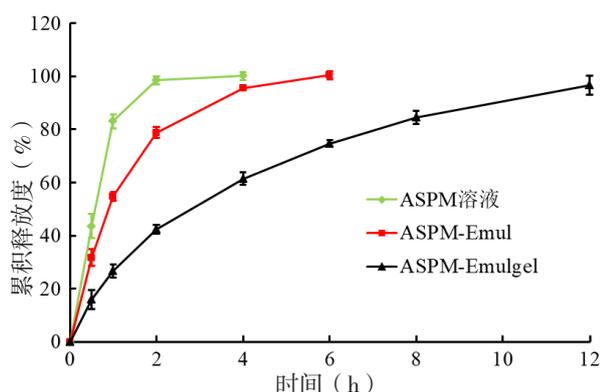


图4 ASPM溶液、ASPM-Emul和ASPM-Emulgel体外药物释放曲线比较 ($n=3$)

Figure 4. The comparison of drug release profiles of ASPM solution, ASPM-Emul and ASPM-Emulgel in vitro ($n=3$)

另采用 Franz 扩散池法考察 ASPM 溶液、ASPM-Emul 和 ASPM-Emulgel 体外鼻黏膜渗透性。取新鲜羊鼻黏膜用生理盐水冲洗干净，使黏膜侧朝上固定于供给池与接收池之间，接收池中加入磷酸盐缓冲液 (pH 6.4) 7 mL，水浴温度为 $(32 \pm 0.5) ^\circ\text{C}$ ，磁力搅拌速度为 100 r/min，分别精密称取 ASPM 溶液、ASPM-Emul 和 ASPM-Emulgel 各 1.0 g 均匀涂布至供给池的羊鼻黏膜表面，并于给药后的 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12 h 取样 1 mL (同时补加同温同体积空白介质) 经 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤，测定药物含量，计算药物累积释放度，绘制渗透率-时间曲线图，结果见图 5。

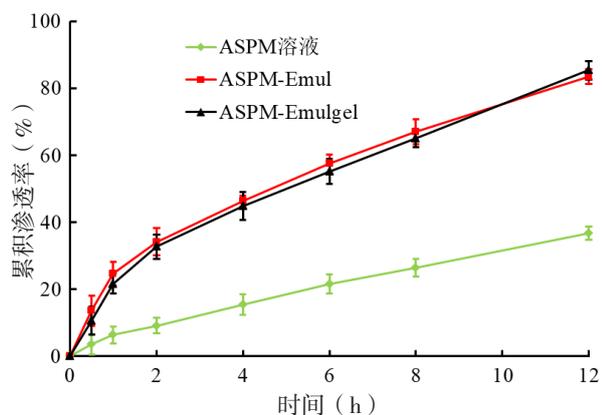


图5 ASPM溶液、ASPM-Emul和ASPM-Emulgel体外药物渗透曲线比较 ($n=3$)

Figure 5. The comparison of drug permeability profiles of ASPM solution, ASPM-Emul and ASPM-Emulgel in vitro ($n=3$)

体外释放结果显示，ASPM 溶液的药物释放速率最快，ASPM-Emul 中的药物释放速率相对较快，而 ASPM-Emulgel 中药物释放速率较为缓慢，推测是由于药物需先从微乳内相扩散至外相，再通过凝胶的网状结构最终释放出来，因此表现出缓释现象。鼻黏膜渗透性结果显示，ASPM-Emul 和 ASPM-Emulgel 的鼻黏膜渗透率均较 ASPM 溶液快，推测是由于微乳中的表面活性剂可使细胞膜变形，并打开鼻黏膜细胞的紧密连接，增加了药物的渗透性所致^[14]。

2.5 安全性评价

通过在体蟾蜍上颚涂布制剂并接触一段时间后观察其对鼻腔纤毛活动的影响，初步评价制剂经鼻腔给药的安全性^[15]。取 15 只体重均在 30~40 g 的健康中华大蟾蜍，编号后随机分为 5 组：生理盐水组 (空白对照)、1% 盐酸麻黄碱组 (阴性对照)、1% 脱氧胆酸钠组 (阳性对照)、ASPM-Emul 组和 ASPM-Emulgel 组，每组 3 只。实验前用探针刺破蟾蜍脊髓和脑，仰卧固定于手术板上，用止血钳牵拉使口腔张开，露出上颚，避免吞咽药液及口腔闭合。取生理盐水，1% 盐酸麻黄碱、1% 脱氧胆酸钠、ASPM-Emul 和 ASPM-Emulgel 各 0.5 mL 分别滴加至各组蟾蜍的上颚黏膜处，确保上颚完全被浸没并保持 30 min，用生理盐水洗净药物，剥离上颚黏膜，并用生理盐水洗净血渍与异物，将黏膜平铺于载玻片表面，使纤毛面向上，盖上盖玻片，并从一侧滴加少量生理盐水，在显微镜下观察各组纤毛摆动情况。观察结束后立即将标本放入已被水蒸气饱和的层析缸中保存，每隔 30 min 取出样本，滴加少量生理盐水，在显微镜下观察纤毛摆动情况，重复上述操作，直至纤毛停止运动为止，记录各组纤毛持续摆动总时长 (persistent vibration duration, PVD)，生理盐水组 PVD 作为 100%，其他各组与之比较，其比率越大表明对鼻纤毛毒性越小^[16]。采用 SPSS 19.0 软件对数据进行统计分析，计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 t 检验对两组数据进行分析，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。结果见表 4。

实验结果显示，1% 脱氧胆酸钠组在第 1 个 30 min 时间点时观察到蟾蜍鼻腔纤毛已全部脱落，无摆动的纤毛，而其他各组均可清晰地观察到摆动的纤毛。ASPM-Emul 组和 ASPM-Emulgel 组的 PVD 与生理盐水组、1% 盐酸麻黄碱组相比较差

异无统计学意义 ($P > 0.05$)，可认为本研究制备的 ASPM-Emul 和 ASPM-Emulgel 对鼻腔纤毛运动影响较小，安全性高。

2.6 脑靶向性评价

2.6.1 实验方案

取 Wistar 大鼠，雌雄各半，体重 200~250 g，实验前 12 h 禁食不禁水，实验期间禁食禁水。分为 A、B、C 3 组，A 组作为对照，尾静脉注射 ASPM 注射液，剂量为 2.5 mg/kg，B 组和 C 组大鼠均腹腔注射 20% 乌拉坦溶液，使其麻醉，固定手术板上，通过接一柔软 PE 管的微量注射器插入到大鼠鼻腔约 5 mm 处^[17]，B、C 组大鼠分别缓慢推入 ASPM-Emul 和 ASPM-Emulgel，给药剂量均为 2.5 mg/kg，给药后立即扎紧食管避免药液流失。3 组大鼠在给药后第 0.25, 0.5, 1, 1.5, 3, 6, 12 h 断头处死，收集血样至肝素化离心管中，2 795 × g 离心 10 min，分离血浆；同时，剥离出完整脑组织，生理盐水洗净，滤纸吸干，精密称重。将上述血浆和脑组织样品存放于 -20℃ 条件下保存，备用。

取出血浆样品在室温环境中缓慢解冻，用移液枪精密移取 200 μL 血浆至离心管中，加入乙腈 300 μL，涡旋混合 5 min，再 2 795 × g 离

心 10 min，沉淀血浆蛋白，取上清液 20 μL 采用 HPLC 法检测药物含量。同样，取出脑组织在室温环境中缓慢解冻，加入 0.9% 生理盐水 1 mL 组织匀浆，匀浆液 4 472 × g 离心 10 min，移取上清液 200 μL 至离心管中，加入乙腈 300 μL，涡旋混合 5 min，再 2 795 × g 离心 10 min，沉淀血浆蛋白，取上清液 20 μL 采用 HPLC 法检测药物含量。HPLC 色谱条件如下：采用 Phenomenex C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)，流动相为乙腈 -pH 3.2 磷酸二氢钾缓冲液 (35 : 65)，流速为 1 mL/min，检测波长为 230 nm^[18]。

2.6.2 脑靶向性评价

计算 3 组大鼠给药后的血浆及脑组织中各时间点的平均药物浓度，绘制血药浓度 - 时间曲线 (图 6)，并使用 WinNonlin 药代动力学软件计算药动学参数，通过梯形法计算 3 组大鼠血浆和脑组织中的血药浓度时间曲线下面积 (AUC)。脑靶向效率 (drug targeting efficiency, DTE) 计算公式如下： $DTE (\%) = [(AUC_{\text{脑}} / AUC_{\text{血浆}})_{\text{in}} / (AUC_{\text{脑}} / AUC_{\text{血浆}})_{\text{iv}}] \times 100$ ，式中 AUC_脑 代表脑组织中的 AUC，AUC_{血浆} 代表血浆中的 AUC，in 代表鼻腔给药，iv 为尾静脉给药^[19]。统计方法参照“2.5”项，药动学参数结果见表 5。

表4 各组纤毛持续摆动时间结果比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4. The comparison of ciliary persistent vibration duration ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	PVD (min)	相对摆动百分比 (%)
生理盐水组	662 ± 15	100.0
1%盐酸麻黄碱组	633 ± 21	95.6
1%脱氧胆酸钠组	无摆动	0
ASPM-Emul组	638 ± 28	96.4
ASPM-Emulgel组	628 ± 31	94.9

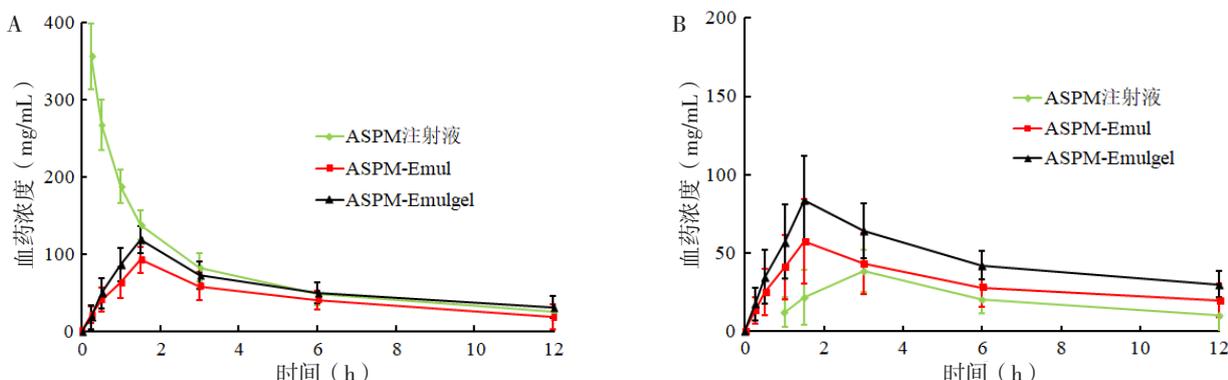


图6 不同制剂血 (A) 和脑 (B) 中的血药浓度-时间曲线 (n=6)

Figure 6. The blood drug concentration-time curve in blood (A) and brain (B) of different preparations (n=6)

表5 ASPM在大鼠体内和脑组织中的药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n=6$)Table 5. ASPM pharmacokinetic parameters in plasma and brain ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	C_{max} (ng/mL)		T_{max} (h)		AUC (ng · h/mL)		DTE (%)
	血浆	脑	血浆	脑	血浆	脑	
ASPM注射液	-	35.6 ± 14.1	-	3.3 ± 0.3	969.2 ± 117.8	208.1 ± 51.4	-
ASPM-Emul	96.1 ± 13.3	58.2 ± 17.1 ^a	1.4 ± 0.3	1.4 ± 0.3	589.2 ± 84.8	363.1 ± 48.2 ^a	287.1
ASPM-Emulgel	121.9 ± 21.7	87.6 ± 19.4 ^{ab}	1.4 ± 0.5	1.3 ± 0.5	704.5 ± 103.6	565.3 ± 58.4 ^{ab}	373.7 ^b

注: C_{max} 为药峰浓度; T_{max} 为达峰时间; “-”表示无数据; 与ASPM注射液组比较, ^a $P < 0.05$; 与ASPM-Emul组比较, ^b $P < 0.05$ 。

结果显示, 经鼻给药的 ASPM-Emul 和 ASPM-Emulgel 在脑内的 T_{max} 值显著小于 ASPM 注射液组 ($P < 0.05$), ASPM-Emul 和 ASPM-Emulgel 在脑组织中 ASPM 的 C_{max} 值显著高于 ASPM 注射液组 ($P < 0.05$), 表明 ASPM-Emul 和 ASPM-Emulgel 能更有效地将药物通过鼻腔转运至脑组织; 另外, 可以观察到 ASPM-Emulgel 组比 ASPM-Emul 组的 C_{max} 值更大 ($P < 0.05$), 这是由于 ASPM-Emulgel 黏附于鼻粘膜表面, 减轻鼻纤毛的清除作用, 延长其在鼻腔中的保留时间, 促进药物吸收^[20]。此外, 经鼻内给药时, ASPM 在血循环中的浓度较低, 说明全身暴露率较少, 可以减轻药物的不良反应。DTP 结果显示, 在 ASPM-Emul 组和 ASPM-Emulgel 组中, DTE 均超过 100%, 说明具有明显的脑靶向性, 而 ASPM-Emulgel 组的 DTP 高于 ASPM-Emul 组, 表明 ASPM-Emulgel 的脑靶向效率更高 ($P < 0.05$)。

3 讨论

为了提高 ASPM 的生物利用度及治疗效果, 国内外制剂研究者已将其制备成新型药物递送系统, 如: Avachat 等^[21]以可生物降解材料聚乳酸-羟基乙酸共聚物作为载体将 ASPM 制备成原位凝胶, 与舌下片相比较, 大鼠皮下给药后生物利用度提高了 2.215 倍, 然而该原位凝胶采用 N-甲基-2-吡咯烷酮和二甲基亚砜作为有机溶剂, 产生一定的不良反应, 不利于临床应用; Kulkarni 等^[22]先将 ASPM 制备成羟丙基-β-环糊精包合物, 再以泊洛沙姆 407 和聚维酮 K30 作为凝胶基质将药物包合物制备成温敏凝胶 (凝胶化温度为 29~34℃), 用于鼻腔给药, 与舌下片相比较, 大鼠鼻腔给药后生物利用度提高了 2.5 倍, 然而该凝胶需要保存在低温环境中, 患者携带不便; Zhai 等^[23]以可生物降解材料聚乳酸-羟基

乙酸共聚物作为载体将 ASPM 制备成长效微球, 研究结果显示, 采用微流控工艺制备的 ASPM 微球, 其大小均匀, 药物可持续释放 40 d, 可显著提高药物的生物利用度, 但微球制备工艺复杂, 需要特殊设备, 不利于工业化生产; Managuli 等^[24]将 ASPM 制备成纳米结构脂质载体, 与原料药混悬剂相比, 大鼠口服纳米结构脂质载体后 AUC_{0-1} 由 (10 101.74 ± 683.23) ng · h/mL 提高至 (7 309.06 ± 458.23) ng · h/mL, 然而纳米结构脂质载体为热力学不稳定体系, 不易长期保存; Patel 等^[25]将 ASPM 制备成固体脂质纳米粒, 与原料药混悬剂相比, 大鼠口服固体脂质纳米粒后生物利用度提高了 50.19 倍, 但固体脂质纳米粒同样存在物理稳定性差、不易长期保存的问题。本研究以 Maisine 35-1 作为油相, Tween 80 作为乳化剂, Transcutol P 作为助乳化剂, 其配比为 4:4:2, 制备的 ASPM-Emul 粒径为 (73.6 ± 7.4) nm, 粒径较小且分散均匀, ASPM-Emul 与 ASPM-Emulgel 在羊鼻黏膜中的渗透率基本一致, 且均对蟾蜍鼻腔纤毛无明显毒性; 与尾静脉 ASPM 组相比, ASPM-Emul 和 ASPM-Emulgel 经鼻腔给药后在大脑中的药物含量显著增高, 均表现出明显的脑靶向性, 且 ASPM-Emulgel 的脑靶向效率更高。本研究将 ASPM 制备成微乳凝胶剂, 经鼻腔给药后可以显著提高药物的脑靶向性, 从而增强药物疗效, 减少对非靶向组织的不良反应, 甚至可降低剂量进一步提高用药安全性。

然而, 本文仅对 ASPM-Emulgel 的辅料筛选、处方配伍、体外释放及渗透性、安全性及脑靶向性评价进行了初步考察, 缺乏更深入的机理探索, 因此本文制备的 ASPM-Emulgel 真正应用到临床还需要更全面、更系统的研究。

参考文献

1 Tarazi FI, Shahid M. Asenapine maleate: a new drug for

- the treatment of schizophrenia and bipolar mania[J]. *Drugs Today (Barc)*, 2009, 45(12): 865–876. DOI: [10.1358/dot.2009.45.12.1421561](https://doi.org/10.1358/dot.2009.45.12.1421561).
- 2 Al-Nimry SS, Khanfar MS. Enhancement of the solubility of asenapine maleate through the preparation of co-crystals[J]. *Curr Drug Deliv*, 2022, 19(7): 788–800. DOI: [10.2174/1567201818666210805154345](https://doi.org/10.2174/1567201818666210805154345).
 - 3 Suresh A, Narayan R, Nayak UY. Recent advances in the development of asenapine formulations[J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2020, 17(10): 1377–1393. DOI: [10.1080/17425247.2020.1792439](https://doi.org/10.1080/17425247.2020.1792439).
 - 4 Khan AR, Liu M, Khan MW, et al. Progress in brain targeting drug delivery system by nasal route[J]. *J Control Release*, 2017, 268: 364–389. DOI: [10.1016/j.jconrel.2017.09.001](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.09.001).
 - 5 梁会敏, 刘哲鹏, 刘芸雅. 脑靶向鼻腔纳米给药系统的研究进展 [J]. *生物医学工程学进展*, 2019, 40(4): 206–210. [Liang HM, Liu ZP, Liu YY. Progress in brain-targeted nasal nano drugs delivery systems[J]. *Progress in Biomedical Engineering*, 2019, 40(4): 206–210.] DOI: [10.3969/j.issn.1674-1242.2019.04.005](https://doi.org/10.3969/j.issn.1674-1242.2019.04.005).
 - 6 Miyashita A, Ito J, Parida IS, et al. Improving water dispersibility and bioavailability of luteolin using microemulsion system[J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 11949. DOI: [10.1038/s41598-022-16220-4](https://doi.org/10.1038/s41598-022-16220-4).
 - 7 Froelich A, Osmatek T, Jadach B, et al. Microemulsion-based media in nose-to-brain drug delivery[J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13(2): 201. DOI: [10.3390/pharmaceutics13020201](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13020201).
 - 8 Mathure D, Ranpise H, Awasthi R, et al. Formulation and characterization of nanostructured lipid carriers of rizatriptan benzoate-loaded in situ nasal gel for brain targeting[J]. *Assay Drug Dev Technol*, 2022, 20(5): 211–224. DOI: [10.1089/adt.2022.044](https://doi.org/10.1089/adt.2022.044).
 - 9 孙经宽, 刘晶红. 木犀草素过饱和和自乳化释药系统的制备与大鼠药动学的研究 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2023, 40(10): 1277–1283. [Sun JK, Liu JH. Preparation and in vivo pharmacokinetics of luteolin supersaturated self-microemulsifying drug delivery systems[J]. *Journal of Shenyang Pharmaceutical University*, 2023, 40(10): 1277–1283.] DOI: [10.14066/j.cnki.cn21-1349/r.2022.0131](https://doi.org/10.14066/j.cnki.cn21-1349/r.2022.0131).
 - 10 Kumbhar SA, Kokare CR, Shrivastava B, et al. Screening of nanoemulsion components for asenapine maleate using validated RP-HPLC method[J]. *Ann Pharm Fr*, 2020, 78(5): 379–387. DOI: [10.1016/j.pharma.2020.04.005](https://doi.org/10.1016/j.pharma.2020.04.005).
 - 11 黄四周, 赖世忠. 多替拉韦自微乳化释药系统的制备与大鼠药动学评价 [J]. *安徽医药*, 2023, 27(12): 2371–2377. [Huang SZ, Lai SZ. Preparation and pharmacokinetic evaluation of dolutegravir self-microemulsifying drug delivery systems in rats[J]. *Anhui Medical and Pharmaceutical Journal*, 2023, 27(12): 2371–2377.] DOI: [10.3969/j.issn.1009-6469.2023.12.009](https://doi.org/10.3969/j.issn.1009-6469.2023.12.009).
 - 12 Sonvico F, Clementino A, Buttini F, et al. Surface-modified nanocarriers for nose-to-brain delivery: From bioadhesion to targeting[J]. *Pharmaceutics*, 2018, 10(1): 34. DOI: [10.3390/pharmaceutics10010034](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10010034).
 - 13 Gadhave D, Tupe S, Tagalpallewar A, et al. Nose-to-brain delivery of amisulpride-loaded lipid-based poloxamer-gellan gum nanoemulgel: *in vitro* and *in vivo* pharmacological studies[J]. *Int J Pharm*, 2021, 607: 121050. DOI: [10.1016/j.ijpharm.2021.121050](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.121050).
 - 14 Khallaf RA, Aboud HM, Sayed OM. Surface modified niosomes of olanzapine for brain targeting via nasal route; preparation, optimization, and *in vivo* evaluation[J]. *J Liposome Res*, 2020, 30(2): 163–173. DOI: [10.1080/08982104.2019.1610435](https://doi.org/10.1080/08982104.2019.1610435).
 - 15 蒋文文, 宋煜, 许文, 等. 常绿钩吻碱微乳处方优化及其安全性评价 [J]. *中成药*, 2023, 45(10): 3187–3193. [Jiang WW, Song Y, Xu W, et al. Formulation optimization and safety evaluation of sempervirine microemulsion[J]. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 2023, 45(10): 3187–3193.] DOI: [10.3969/j.issn.1001-1528.2023.10.004](https://doi.org/10.3969/j.issn.1001-1528.2023.10.004).
 - 16 王晓丹, 王晖, 吴江锋, 等. 复方地西洋对蟾蜍鼻黏膜纤毛毒性作用的研究 [J]. *中药新药与临床药理*, 2012, 23(3): 255–258. [Wang XD, Wang H, Wu JF, et al. Study on nasal mucociliary toxicity of compound diazepam in toads[J]. *Traditional Chinese Drug Research and Clinical Pharmacology*, 2012, 23(3): 255–258.] DOI: [10.3969/j.issn.1003-9783.2012.03.005](https://doi.org/10.3969/j.issn.1003-9783.2012.03.005).
 - 17 Pokharkar V, Patil-Gadhe A, Palla P. Efavirenz loaded nanostructured lipid carrier engineered for brain targeting through intranasal route: *in vivo* pharmacokinetic and toxicity study[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 94: 150–164. DOI: [10.1016/j.biopha.2017.07.067](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.067).
 - 18 Managuli RS, Gourishetti K, Shenoy RR, et al. Preclinical pharmacokinetics and biodistribution studies of asenapine

- maleate using novel and sensitive RP-HPLC method[J]. *Bioanalysis*, 2017, 9(14): 1037–1047. DOI: [10.4155/bio-2017-0069](https://doi.org/10.4155/bio-2017-0069).
- 19 Abdou EM, Kandil SM, Miniawy HMFE. Brain targeting efficiency of antimigrain drug loaded mucoadhesive intranasal nanoemulsion[J]. *Int J Pharm*, 2017, 529(1–2): 667–677. DOI: [10.1016/j.ijpharm.2017.07.030](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.07.030).
- 20 Kumbhar SA, Kokare CR, Shrivastava B, et al. Antipsychotic potential and safety profile of TPGS-based mucoadhesive aripiprazole nanoemulsion: development and optimization for nose-to-brain delivery[J]. *J Pharm Sci*, 2021, 110(4): 1761–1778. DOI: [10.1016/j.xphs.2021.01.021](https://doi.org/10.1016/j.xphs.2021.01.021).
- 21 Avachat AM, Kapure SS. Asenapine maleate in situ forming biodegradable implant: an approach to enhance bioavailability[J]. *Int J Pharm*, 2014, 477(1–2): 64–72. DOI: [10.1016/j.ijpharm.2014.10.006](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.10.006).
- 22 Kulkarni JA, Avachat AM. Pharmacodynamic and pharmacokinetic investigation of cyclodextrin-mediated asenapine maleate in situ nasal gel for improved bioavailability[J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2017, 43(2): 234–245. DOI: [10.1080/03639045.2016.1236808](https://doi.org/10.1080/03639045.2016.1236808).
- 23 Zhai J, Wang YE, Zhou X, et al. Long-term sustained release poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres of asenapine maleate with improved bioavailability for chronic neuropsychiatric diseases[J]. *Drug Deliv*, 2020, 27(1): 1283–1291. DOI: [10.1080/10717544.2020.1815896](https://doi.org/10.1080/10717544.2020.1815896).
- 24 Managuli RS, Wang JT, Faruqu FN, et al. Asenapine maleate-loaded nanostructured lipid carriers: optimization and *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* evaluations[J]. *Nanomedicine (Lond)*, 2019, 14(7): 889–910. DOI: [10.2217/nmm-2018-0289](https://doi.org/10.2217/nmm-2018-0289).
- 25 Patel M, Mundada V, Sawant K. Enhanced intestinal absorption of asenapine maleate by fabricating solid lipid nanoparticles using TPGS: elucidation of transport mechanism, permeability across Caco-2 cell line and *in vivo* pharmacokinetic studies[J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, 47(1): 144–153. DOI: [10.1080/21691401.2018.1546186](https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1546186).

收稿日期: 2023年12月13日 修回日期: 2024年01月27日
本文编辑: 钟巧妮 李 阳