

马钱子总碱脂质液晶纳米粒的制备和体外评价研究

金晨, 陈家乐, 徐玲霞, 管咏梅, 刘丽丽, 朱卫丰, 吴璐, 张凌, 陈丽华*

江西中医药大学 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004

摘要:目的 制备一种马钱子总碱(TASS)的新剂型,以期提高TASS的载药量和经皮渗透性能。方法 采用热溶剂-高压均质法制备马钱子总碱脂质液晶纳米粒(TASS-LLCN),采用超滤离心法测定包封率,以包封率为指标采用星点设计-响应面法优化TASS-LLCN的处方,并对优化后制备的TASS-LLCN的基本性能进行评价。同时,采用Franz扩散池法比较TASS-LLCN凝胶和TASS普通凝胶的体外经皮渗透特性,初步考察TASS-LLCN凝胶的经皮渗透行为。结果 TASS-LLCN的最佳制备处方为甘油单油酸酯(GMO)1 403.19 mg、GMO-泊洛沙姆407(GMO-F127)质量比为7.25:1、载药量为9.48%,预测包封率为64.01%;制剂质量评价显示制得的纳米粒平均粒径为186 nm左右,Zeta电位为-33.1 mV,pH值6.83,稳定性良好;透皮实验显示,TASS-LLCN的24 h累积透过量 and 渗透速率均大于TASS普通凝胶,具有显著性差异($P<0.05$),可以促进有效成分的吸收;TASS-LLCN的皮肤滞留量大于TASS普通凝胶,说明药物在皮下形成储库,有利于药物的持续释放。结论 TASS-LLCN可显著提高TASS的载药量和经皮渗透性能,是一种潜在的具有缓释作用的新型药物。

关键词: 脂质液晶纳米粒; 马钱子总碱; 包封率; 星点设计-响应面法; Franz扩散池法; 马钱子碱; 土的宁

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)22-5305-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.22.013

Study on preparation and evaluation *in vitro* of TASS-LLCN

JIN Chen, CHEN Jia-le, XU Ling-xia, GUAN Yong-mei, LIU Li-li, ZHU Wei-feng, WU Lu, ZHANG Ling, CHEN Li-hua

Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine (TCM), Ministry of Education, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China

Abstract: Objective To prepare a new kind of preparation formulation of the total alkaloids from seed of *Strychni Semen* (TASS), by which could improve their drug loading content and the transdermal function. **Methods** TASS-LLCN were prepared by hot solvent and high pressure homogeneous method. Using encapsulation efficiency (EE) measured by ultrafiltration as index, the prescription of TASS-LLCN was optimized by response surface methodology with central composite design, and the basic properties of the optimized TASS-LLCN was evaluated. The Franz diffuser method was used to compare the transdermal capacity of both LLCN gel and ordinary gel of TASS. **Results** The best prescription of TASS-LLCN was as follow: the content of glycerin monooleate (GMO) was 1 403.19 mg/mL, the ratio between GMO and F127 was 7.25 : 1, the drug loading content was 9.48% and the predicted encapsulation efficiency was 64.01%. The evaluation of basic properties of the optimized TASS-LLCN showed that the average grain diameter was about 186 nm, zeta potential was -33.1 mV, pH was 6.83, the stability was good. The transdermal experiment *in vitro* showed that the cumulate osmotic quantities in 24 h and the permeation rate of TASS-LLCN gel were both better than ordinary gel of TASS, which had obvious discrepancy ($P<0.05$) and showed that LLCN could promote the absorption of active components; the skin retention volume of LLCN gel was still bigger than ordinary gel, which showed that LLCN gel of TASS could store in the skin and release the drug sustainably. **Conclusion** TASS-LLCN could obviously enhance the drug loading content and the transdermal function. It is a potential new kind of preparation formulation which have the sustainable effect.

Key words: lipid liquid crystalline nanoparticl (LLCN); total alkaloids from seed of *Strychni Semen*; encapsulation efficiency; response surface methodology with central composite design; Franz diffuser method; brucine; strychnine

收稿日期: 2018-06-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81460606); 江西省卫生计生委中医药科研计划(2014A059)

作者简介: 金晨(1988—),男,硕士,讲师,研究方向为中药新剂型与新技术研究。Tel: 15180475730 E-mail: 298250381@qq.com

*通信作者 陈丽华(1972—),女,博士,教授,博士生导师,研究方向为中药新剂型与新技术研究。Tel: 13970989729 E-mail: Chilly98@163.com

马钱子为马钱科植物马钱子 *Strychnos nux Vomica* L. 的干燥成熟种子, 味苦, 性温, 有大毒, 具有散结消肿、通络止痛之功, 临床上常用于治疗风湿肿痛和跌打损伤等^[1]。生物碱作为马钱子的主要成分, 质量分数 1.5%~5.0%, 而马钱子碱和士的宁既为有效成分也为有毒成分, 约占马钱子总生物碱的 70%以上, 其有效浓度和致毒浓度非常接近^[2], 如何实现马钱子使用时的安全、有效是摆在研究者面前的一个重要挑战, 本课题组曾采用配伍减毒的方法, 通过马钱子总碱 (the total alkaloids from seed of *Strychni Semen*, TASS) 和白芍总苷配伍降低其毒性, 取得了一定的效果^[3]。

经皮给药系统 (transdermal drug delivery system, TDDS) 是指在皮肤表面给药, 药物以一定速率透过皮肤各层, 进入体循环产生全身或局部治疗作用的系统^[4]。经皮给药能够利于马钱子碱和士的宁局部起效, 并降低进入循环系统的药物浓度, 从而降低毒性, 但是, 如何使药物能够透过皮肤, 特别是角质层, 是经皮给药能否起效的关键。脂质液晶纳米粒 (lipid liquid crystalline nanoparticles, LLCN) 是指两亲性脂质在水中自发组装形成的含双连续水区和脂质区的闭合脂质双层“蜂窝状 (海绵状)”结构。这种独特的内部结构使其具有多样性的包裹性, 能够同时包封水溶性、脂溶性及两亲性药物分子^[5]。

近年来, 脂质液晶纳米粒以其良好的生物黏附性、促进药物缓慢持久的释放等特点, 在经皮给药中的应用逐渐增多。本研究尝试将马钱子总碱制备成脂质液晶纳米粒 (TASS-LLCN), 通过马钱子总碱的缓慢和持续地释放起到减毒增效的作用, 为马钱子总碱的临床安全应用奠定基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent1260 型高效液相色谱仪, 美国安捷伦科技有限公司; 万分之一电子天平, 德国 Sartorius 公司; RE-5205 型旋转蒸发仪, 上海亚荣仪器公司; FA25 型高速剪切机, FLUKO 公司; 高压均质机, 意大利 Niro Soavi 公司; Microcon YM-100 超滤离心管, Millipore 公司; pH-3C pH 计, 上海仪电科学仪器股份有限公司; 激光纳米粒度仪, 美国马尔文公司。

1.2 试药

对照品马钱子碱 (50 mg/支, 质量分数 >98%,

批号 M57-140512)、士的宁 (50 mg/支, 质量分数 >98%, 批号 H57-140512), 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心; 甘油单油酸酯 (GMO), 质量分数 40%, 美国 Sigma 公司; 泊洛沙姆 407 (F127), BASF 公司, 批号 WPMI556B; 磷酸二氢钾, 国药集团化学试剂有限公司; 庚烷磺酸钠, 色谱纯, 上海蓝季科技发展有限公司; 氯化钠、无水乙醇, 西陇化工股份有限公司; 甲醇、乙腈, 色谱纯, 美国天地公司; 双蒸水 (自制)。

1.3 实验动物

清洁级昆明种小鼠, 雄性, 体质量 18~22 g, 购买于湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 许可证号 SCXK (湘) 2011-0003。

2 方法与结果

2.1 TASS-LLCN 的制备

采用热溶剂-高压均质法制备脂质液晶纳米粒。精密称取处方量的 TASS 提取物、GMO、F127, 溶于 20 mL 无水乙醇中, 超声至完全溶解, 60 °C 水浴减压旋蒸, 挥尽溶剂后加入双蒸水 80 mL, 超声 10 min, 60 °C 水浴孵化 15 min, 高速剪切 2 遍, 每遍 1 min, 冷却至室温, 得到 TASS-LLCN 粗分散体系。室温下用高压均质机进行均质处理, 迅速冷却至室温, 得 TASS-LLCN 70 mL。

2.2 TASS-LLCN 中马钱子碱和士的宁的含量测定

采用 HPLC 法测定 TASS-LLCN 中马钱子碱和士的宁的含量^[6]。

2.2.1 供试品溶液的制备 将“2.1”项下方法制备的 TASS-LLCN 1 mL 加甲醇定容到 10 mL, 即得供试品溶液。

2.2.2 混合对照品溶液的制备 称取士的宁对照品约 10 mg、马钱子碱对照品约 5 mg, 精密称定, 分别装入 10 mL 量瓶中, 加适量甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀。再分别精密量取 1 mL, 置同一 25 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得含士的宁 40.32 µg/mL、马钱子碱 20.72 µg/mL 的混合对照品溶液。

2.2.3 色谱条件 色谱柱为菲罗门 Gemini C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 µm), 检测波长 260 nm, 流动相为缓冲盐 (0.01 mol/L 庚烷磺酸钠和 0.02 mol/L 磷酸二氢钾等量混合, 用 10%磷酸调至 pH 2.8)-乙腈 (79:21), 体积流量 1 mL/min, 进样量 20 µL, 柱温 30 °C。色谱图见图 1。

2.2.4 线性关系考察 精密吸取对照品溶液 0.1、

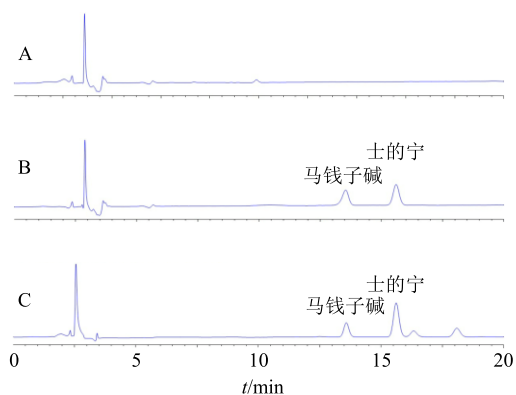


图 1 空白液 (A)、混合对照品溶液 (B) 和 TASS-LLCN 供试品溶液 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of blank solution (A), mixed reference substances solution (B), and TASS-LLCN sample (C)

0.2、0.5、1.0、2.0 mL 加入 5 mL 量瓶中, 分别用甲醇定容至刻度, 进样 20 μ L 记录峰面积 (A), 以质量浓度 (C) 为横坐标, A 值为纵坐标进行线性回归, 得马钱子碱回归方程 $A=20.368 C+4.613 1$, $r=0.998 8$, 土的宁回归方程 $A=24.026 C+3.285 4$, $r=0.998 2$, 线性范围分别为马钱子碱 0.414~8.288 μ g/mL, 土的宁 0.806~16.128 μ g/mL。

2.2.5 精密度试验 按“2.2.3”项下色谱条件, 取同一混合对照品溶液, 连续进样 6 次, 测定马钱子碱和土的宁的峰面积, 结果马钱子碱和土的宁峰面积值的 RSD 分别为 0.24%、0.18%, 结果表明试验仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性试验 取“2.2.1”项下供试品溶液, 按“2.2.3”项下色谱条件, 于 0、2、4、8、12、24 h 进样检测, 结果马钱子碱和土的宁的峰面积的 RSD 分别为 1.61%、0.57%, 结果表明实验样品稳定性良好。

2.2.7 重复性试验 按“2.1”项下方法平行制备 6 份试样, 按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2.3”项下色谱条件检测, 结果马钱子碱和土的宁的峰面积的 RSD 分别为 1.86%、0.98%, 结果表明该方法重复性良好。

2.2.8 加样回收率试验 取 1 mL 按“2.1”项下方法制备的试样 6 份, 分别加入同一已知质量浓度的混合对照品溶液, 用甲醇定容到 10 mL, 测定马钱子碱和土的宁的峰面积, 计算含量, 结果马钱子碱和土的宁的平均加样回收率为 98.80%~101.25%, RSD 分别为 1.98%、1.24%, 表明本方法准确度符合要求。

2.3 超滤离心法测定 TASS-LLCN 包封率

应用一定分子孔径的超滤膜来分离游离药物分子与纳米粒, 测定脂质液晶纳米粒的包封率^[7]。取 0.4 mL TASS-LLCN 置于 YM-100 超滤离心管中, 4 000 r/min 离心 15 min。滤液为透明的, 表明超滤管能把乳白色的脂质液晶纳米粒的材料截留。分别收集 TASS-LLCN 和下层液体, 取 0.1 mL 下层液体用甲醇定容至 5 mL, 测定马钱子碱与土的宁的含量, 计算包封率。

包封率=(脂质液晶纳米粒药物总含量-游离药物含量)/脂质液晶纳米粒药物总含量

2.4 单因素考察 TASS-LLCN 的处方优化

2.4.1 GMO 用量的影响 称取 F127 150 mg、TASS 40 mg 以及 GMO 800、1 000、1 200、1 400、1 600 mg, 加 30 mL 乙醇超声溶解, 按照“2.1”项下方法分别制备 TASS-LLCN, 其包封率结果见表 1。

表 1 GMO 用量对 TASS-LLCN 包封率的影响
Table 1 Effects of GMO content on entrapment efficiency

GMO/mg	粒径/nm	PDI	包封率/%	
			马钱子碱	土的宁
800	158.8	0.245	45.5	45.3
1 000	183.8	0.218	44.2	44.3
1 200	180.9	0.219	37.5	40.7
1 400	174.0	0.199	60.1	66.8
1 600	211.9	0.277	36.4	39.0

2.4.2 膜材比例的影响 称取 GMO 1 400 mg、TASS 40 mg, 设定 GMO 与 F127 质量比分别为 20:1、10:1、5:1、3:1、2.5:1, 加 30 mL 乙醇超声溶解, 按照“2.1”项下方法分别制备 TASS-LLCN, 其包封率结果见表 2。

2.4.3 载药量的影响 称取 GMO 1 400 mg、F127 280 mg 以及 TASS 14、42、70、98、140 mg, 加 30

表 2 膜材比对 TASS-LLCN 包封率的影响
Table 2 Effects of GMO-F127 ratio on entrapment efficiency

F127/mg	粒径/nm	PDI	包封率/%	
			马钱子碱	土的宁
70	183.7	0.198	42.0	45.0
140	174.7	0.210	43.7	45.0
280	148.9	0.195	40.4	43.5
420	156.6	0.248	45.2	48.2
560	132.5	0.240	44.9	49.8

mL 乙醇超声溶解, 按照“2.1”项下方法分别制备 TASS-LLCN, 其包封率结果见表 3。

表 3 载药量对 TASS-LLCN 包封率的影响

Table 3 Effects of TASS-GMO ratio on entrapment efficiency

TASS/mg	粒径/nm	PDI	包封率/%	
			马钱子碱	土的宁
14	163.7	0.185	43.0	43.0
42	166.2	0.227	41.5	35.6
70	162.6	0.166	35.9	35.9
98	162.9	0.140	50.2	44.8
140	179.8	0.245	23.3	24.9

表 4 星点设计试验及结果

Table 4 Central composite design and its results

编号	A/mg	B	C/mg	Y/%	编号	A/mg	B	C/mg	Y/%
1	1 400.00 (0)	8.00 : 1 (0)	7.00 (0)	60.36	11	1 756.76 (+1)	4.43 : 1	4.03	37.82
2	1 043.24 (-1)	4.43 : 1 (-1)	4.03 (-1)	41.20	12	1 043.24	11.57 : 1 (+1)	9.97	37.71
3	1 400.00	8.00 : 1	7.00	70.21	13	1 400.00	2.00 : 1	7.00	43.01
4	1 400.00	8.00 : 1	7.00	59.32	14	1 756.76	11.57 : 1	4.03	30.76
5	1 400.00	14.00 : 1 (+1.682)	7.00	53.12	15	800.00 (-1.682)	8.00 : 1	7.00	49.25
6	1 400.00	8.00 : 1	2.00	26.77	16	1 043.24	11.57 : 1	4.03	37.79
7	1 400.00	8.00 : 1	12.00 (+1.682)	65.49	17	1 400.00	8.00 : 1	7.00	57.95
8	2 000.00 (+1.682)	8.00 : 1	7.00	36.17	18	1 756.76	11.57 : 1	9.97	52.07
9	1 043.24	4.43 : 1	9.97 (+1)	56.93	19	1 756.76	4.43 : 1	9.97	52.73
10	1 400.00	8.00 : 1	7.00	53.29	20	1 400.00	8.00 : 1	7.00	60.72

表 5 回归模型各项方差分析

Table 5 Analysis of variance for fitted regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	2 252.77	9	250.31	4.93	0.010 1	A ²	608.89	1	608.89	12.00	0.006 1
A	35.86	1	35.86	0.71	0.420 1	B ²	308.43	1	308.43	6.08	0.033 4
B	12.98	1	12.98	0.26	0.624 0	C ²	404.50	1	404.50	7.97	0.018 1
C	1 002.10	1	1 002.10	19.75	0.001 2	残差	507.41	10	50.74		
AB	28.50	1	28.50	0.56	0.470 8	失拟项	353.47	5	70.69	2.30	0.191 4
AC	52.53	1	52.53	1.04	0.332 9	纯差	153.94	5	30.79		
BC	10.81	1	10.81	0.21	0.654 3	总和	2 760.18	19			

0.05)。C 对包封率影响显著 ($P < 0.01$); 交互项 AB、AC、BC 间的交互影响不大 ($P > 0.05$)。 $r^2 = 0.816 2$, 说明模型能够很好地反映响应值的变化, 拟合度好。可以用此模型来分析和预测 TASS-LLCN 的处方结果, 各因素的交互结果见图 2。

2.5.3 优化处方验证 通过 Design-Expert 8.0 软件, 结合表 5 方差分析的结果, 选取 TASS-LLCN

2.5 星点设计-效应面法优化 TASS-LLCN 处方

2.5.1 因素与水平的确定 综合单因素实验结果, 选择 GMO 用量 (A)、GMO-F127 质量比 (B)、载药量 (C) 为考察因素, 采用 3 因素 5 水平效应面分析方法, 以包封率 (Y) 为评价指标, 星点设计因素水平及结果见表 4。

2.5.2 数据处理 通过 Design-Expert 8.0 软件, 结合实验结果, 进行二次多项式逐步回归拟合, 得到模型为 $Y = 60.35 - 1.62 A - 0.97 B + 8.57 C + 1.89 AB + 2.56 AC - 1.16 BC - 6.50 A^2 - 4.63 B^2 - 5.30 C^2$ ($r^2 = 0.816 2$), 回归模型各项方差分析见表 5, 分析结果可见, 实验模型具有高度的显著性 ($P <$

最佳制备处方: GMO 用量 1 403.19 mg、GMO-F127 质量比为 7.25 : 1、载药量为 9.48%, 预测包封率为 64.01%, 按照选取的最佳工艺条件重复 3 次实验, 将预测值与实测值进行比较并计算偏差, 预测值与实测值的偏差为 1.17%, 说明采用效应面分析法得到的处方准确可靠。

偏差 = (预测值 - 实测值) / 预测值

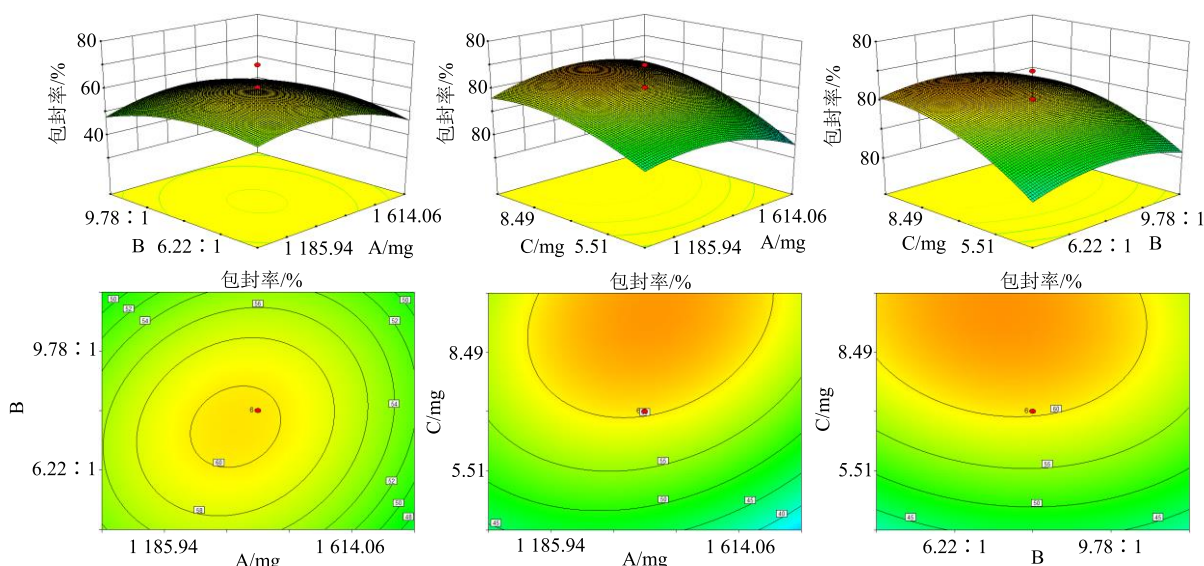


图 2 AB、AC、BC 对 TASS-LLCN 的影响的效应面图和等高线图

Fig. 2 Response surfaces and contour map of effects of different factors on entrapment efficiency

2.6 TASS-LLCN 的质量评价

2.6.1 粒径分布和 Zeta 电位 取 TASS-LLCN 分散液适当稀释后, 用马尔文粒度仪测定粒径分布, 见图 3。结果表明制得的纳米粒平均粒径为 186 nm 左右, 粒径大小相近, Zeta 电位为 -33.1 mV。

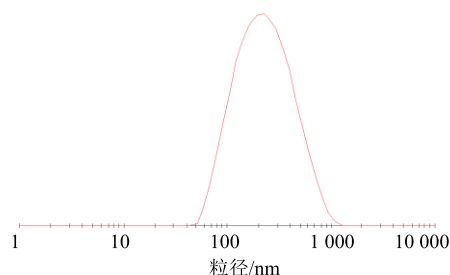


图 3 TASS-LLCN 的粒径分布

Fig. 3 Distribution of particle size of TASS-LLCN

2.6.2 pH 值的测定 按最佳处方平行制备 3 批 TASS-LLCN, 分别测定其 pH 值, 结果显示平均值为 6.83, RSD 为 0.94%。

2.6.3 形态及结构的表征

(1) 扫描电镜观察: 将 TASS-LLCN 稀释至一定浓度, 滴于 ITO 导电玻璃上, 自然晾干, 干燥后于样品表面镀一层金膜, 再将样品置于扫描电镜中进行观察, 结果见图 4。由图 4 可见制得的 TASS-LLCN 呈圆球状, 粒径符合马尔文粒度仪检测结果。

(2) 透射电镜: 取 TASS-LLCN 10 μ L 滴加于铜网上, 再滴加 0.1% 的磷钨酸溶液染色, 用透射电子显微镜观察, 结果见图 5。由图 5 可见 TASS-LLCN 呈现圆球状, 边界分明, 大小均一。

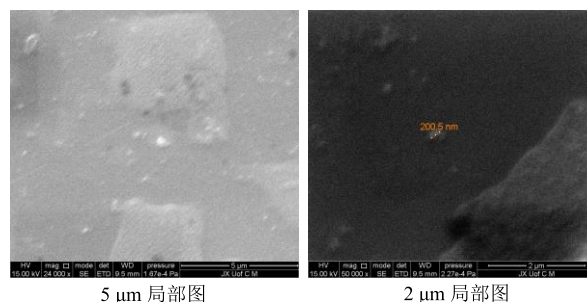


图 4 不同标尺下不同区域 TASS-LLCN 的扫描电镜图

Fig. 4 Scanning electron microscope photo of TASS-LLCN with different scales and regions

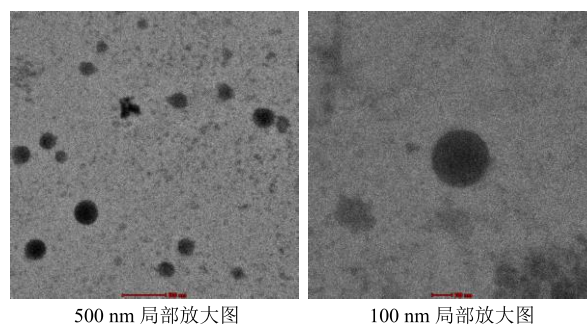


图 5 不同标尺下 TASS-LLCN 的透射电镜图

Fig. 5 Transmission electron microscope photo of TASS-LLCN with different scales

2.6.4 物理稳定性考察 稳定性实验的主要目的是观察药物制剂在温度、光线、湿度等外界因素影响下随时间推移产生的变化, 给药品的生产、包装、储存、运输要求提供科学依据。本实验采用多指标综合考察的方法对 TASS-LLCN 的温度稳定性进行了初步研究。

按最佳处方平行制备 3 批 TASS-LLCN, 置 4、25、40 °C 条件下, 放置一段时间后, 采用外观性状、pH 及包封率为评价指标, 进行初步稳定性考察。结果显示制备的制剂在 4 °C 时比较稳定, 在 25 °C 和 40 °C 条件下放置 30 d 后出现悬浮物和包封率下降。

2.7 TASS-LLCN 凝胶离体经皮吸收行为研究

2.7.1 供试品的制备 取 GMO 1 400 mg、F127 190 mg、TASS 130 mg, 加 30 mL 乙醇超声溶解, 60 °C 旋蒸, 得共熔物, 加 100 mL 的水超声 10 min, 再用 60 °C 水浴 15 min, 13 000 r/min 高速剪切 2 min, 80.0 MPa (800 bar) 压力下均质 5 min, 冷却至室温即得 TASS-LLCN; 向脂质液晶纳米粒中加入 25% 的 F127^[8], 于 4 °C 的冰箱中放置过夜, 第 2 天取出恢复至室温即得 TASS-LLCN 凝胶。

精密称取适量 TASS 溶解在适量聚乙二醇-400 (PEG-400) 中, 缓慢加入双蒸水, 用玻璃棒持续搅拌, 制备成含量相同的 TASS 水溶液, 加入 25% 的 F127 在冰箱中放置过夜, 第 2 天取出恢复室温, 即得 TASS 普通凝胶。

2.7.2 离体小鼠皮肤的制备 取健康雄性小鼠, 处死后, 用电动剃毛器剃掉腹部毛, 立即剥离腹部皮肤, 用脱脂棉擦去脂肪组织和黏连物, 用生理盐水冲洗干净, 用铝箔包裹后-20 °C 冷冻保存, 24 h 内使用。

2.7.3 渗透扩散装置 透皮吸收渗透扩散装置采用改良 Franz 扩散池。扩散池由 2 部分组成, 上室为扩散室, 下室为接收室, 接收室底部连一个取样管。接收池容积为 12 mL, 扩散面积 1.85 cm², 恒温水浴温度维持在 (37.0±0.5) °C, 转速 150 r/min, 取样量为 1 mL。

2.7.4 累积透过量 (Q_n) 实验 剪取面积略大于扩散池表面积的皮肤, 放置在 Franz 扩散池的供给池

与接收池结合处, 使角质层面向供给池, 并用弹簧夹固定, 先用接收液平衡 30 min 后给药, 取 TASS 凝胶、TASS-LLCN 凝胶各 0.3 g, 均匀地涂抹在皮肤表面, 使药物与鼠皮充分接触, 保持转速与温度, 平行 5 份, 于 2、4、6、8、10、12、24 h 取 1 mL 接收液 (每次取样后均补加等量的空白接收液), 将取出的样品以 10 000 r/min 的速度离心 10 min, 取上清液, 用 HPLC 测定马钱子碱和士的宁的含量, 计算 Q_n 。

$$Q_n = (VC_n + \sum_{i=1}^{n-1} C_i V_i) / A$$

A 为有效扩散面积, V 为接收液总体积, C_n 为第 n 次取样时接收液中药物的质量浓度, C_i 为第 i 次取样时接收液中药物的质量浓度, V_i 为取样体积

以 24 h 药物的 Q_{24} 对取样时间 t 做曲线, 并对曲线中的直线部分进行线性回归, 求出的直线斜率即为稳态透皮速率 (J_s)。利用 t 检验进行差异显著性比较, 结果见表 6、7。可知, TASS-LLCN 凝胶和 TASS 普通凝胶中马钱子碱的 Q_{24} 分别为 19.383 0、16.249 7 μg/cm², J_s 分别为 0.467 5、0.354 5 μg/(cm²·h); 士的宁的 Q_{24} 分别为 51.926 1、36.828 4 μg/cm², J_s 分别为 1.436 0、0.926 5 μg/(cm²·h)。

2.7.5 皮肤滞留量 (Q_s) 试验 24 h 累积透过量实验结束后, 取下皮肤, 用生理盐水洗净皮肤表面的药物, 剪下给药部分, 剪碎, 加 1 mL 甲醇, 涡旋 5 min, 超声 30 min, 4 000 r/min 离心 10 min, 取上清液用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 用 HPLC 法测定马钱子碱和士的宁的含量及药物的 Q_s ($Q_s = VC/A$, A 为有效扩散面积, V 为溶解样品的体积, C 为测得的马钱子碱和士的宁的质量浓度)。结果见表 7。

TASS-LLCN 凝胶和 TASS 普通凝胶中马钱子碱的 Q_s 分别为 0.913 5、0.838 9 μg/cm², 士的宁的 Q_s 分

表 6 马钱子碱和士的宁 24 h 的 Q_n

Table 6 Q_n of burcine and strychnine at 24 h

t/h	TASS-LLCN 凝胶 $Q_n/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2})$		TASS 普通凝胶 $Q_n/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2})$	
	马钱子碱	士的宁	马钱子碱	士的宁
2	8.263 5±0.663 4	19.046 0± 2.293 5	8.263 5±0.463 2	15.761 8±1.657 8
4	10.437 5±1.110 0	24.876 5± 4.012 7	9.471 8±0.848 9	19.729 4±2.107 8
6	11.921 7±1.433 9	29.471 4± 5.578 6	10.654 5±0.947 5	21.810 5±2.603 1
8	13.199 3±1.618 1	33.674 1± 6.438 2	11.755 8±1.125 9	25.180 6±3.009 0
10	14.473 8±1.873 5	37.372 2± 7.125 4	12.939 4±1.173 4	27.813 2±3.224 5
12	15.629 4±2.205 4	40.409 2± 8.527 3	13.674 5±1.492 9	29.582 1±3.697 0
24	19.383 0±3.636 8	51.926 1±11.185 8	16.249 7±2.460 8	36.828 4±5.306 8

表 7 马钱子碱和士的宁的渗透动力学参数

Table 7 Percutaneous kinetic parameters of brucine and strychnine

样品	成分	Q_n - t 方程	r	$Q_{24}/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2})$	$J_s/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1})$	$Q_s/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2})$
TASS-LLCN 凝胶	马钱子碱	$Q_n=0.467\ 5\ t+9.010\ 8$	0.973\ 1	$19.383\ 0\pm3.636\ 8^*$	0.467\ 5	$0.913\ 5\pm0.191\ 3$
	士的宁	$Q_n=1.436\ 0\ t+20.285\ 7$	0.966\ 7	$51.926\ 1\pm11.185\ 8^*$	1.436\ 0	$2.038\ 4\pm0.473\ 8$
TASS 普通凝胶	马钱子碱	$Q_n=0.354\ 5\ t+8.372\ 9$	0.969\ 1	$16.249\ 7\pm2.460\ 8$	0.354\ 5	$0.838\ 9\pm0.119\ 1$
	士的宁	$Q_n=0.926\ 5\ t+16.547\ 2$	0.962\ 9	$36.828\ 4\pm5.306\ 8$	0.926\ 5	$1.783\ 3\pm0.439\ 8$

与普通凝胶组比较: * $P<0.05$

* $P<0.05$ vs ordinary gel group

别为 2.038 4、1.783 3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。

3 讨论

LLCN 的制备方法通常有超声法、高压均质法、自发乳化法、喷雾干燥法和热溶剂法等^[9-10]。本实验采用热溶剂-高压均质法制备 TASS-LLCN, 该方法条件温和, 是目前比较常用的制备方法, 经 HPLC 检测使用此方法制备的 TASS-LLCN 中马钱子碱和士的宁的包封率均达 60%以上, 能较好地满足实验要求。

目前常用的测定包封率的方法有透析法、凝胶柱色谱法等, 水溶性药物适合采用凝胶色谱分离法, 而溶解度较低的药物由于几乎无法溶解在水中, 适合采用超滤离心法测定包封率^[7]。预试验结果显示该方法能使 LLCN 中游离的药物完全沉淀, 因此该方法适用于 TASS-LLCN 包封率的测定。

星点设计-效应面优化法是近年来常用的一种设计方法, 其结果可以采用集数学和统计学方法于一体的效应面法进行优化, 预测性好^[11-12]。本实验主要考察的目标是包封率, 包封率随自变量的变化而变化, 优化处方的预测值与实测值吻合较好。

测量粒径方法一般有激光衍射法、沉积场流速分级法和电子显微镜法等。激光粒度仪是利于激光衍射的原理, 测定给定样品中的全部粒子, 测定所得的结果是全部被测样品的统计信息。本实验采用激光粒度仪对 TASS-LLCN 的粒径及其分布进行了测定, 结果表明 TASS-LLCN 的平均粒径在 186 nm 左右, 且分布范围比较窄, 说明体系比较稳定; Zeta 电位与纳米粒体系的稳定性密切相关, Zeta 电位的测量有助于确定纳米粒分散体系的稳定性。当 Zeta 电位在 -60~-30 mV 时体系的物理稳定性良好, 当电位下降至 -15 mV 时体系则开始发生凝胶化^[13]。本实验使用激光粒度仪在测定粒径的同时也检测了 Zeta 电位。测定结果表明, 所制备的脂质液晶纳米粒表面带有负电荷, 其 Zeta 电位值为 -33.1 mV, 说

明体系比较均一稳定。

扫描电镜和透射电镜是目前用来表征制剂结构的常用方法。扫描电镜在医药领域有广泛应用^[14], 但从本实验的研究中发现对于粒径比较小的纳米级材料其使用存在一定的局限性, 为了尽可能地放大样品局部而反复扫描同一区域可能出现破坏试样(局部烧焦), 背景较暗, 影响观察的情况; 透射电镜则可以较好地表征纳米制剂^[5]。

从透皮实验结果可知, TASS-LLCN 凝胶的 Q_{24} 和 J_s 均大于 TASS 普通凝胶, 具有显著性差异 ($P<0.05$), 可以促进有效成分的吸收; TASS-LLCN 凝胶的 Q_s 大于 TASS 普通凝胶, 说明药物在皮下形成储库, 有利于药物的持续释放。

本实验将 TASS 制成 LLCN, 提高了其的溶解度, 使其在皮下形成储库, 提高皮肤局部的药物浓度, 从而达到持续释放的作用, 在一定程度上可以降低 TASS 的给药量和给药次数, 从而避免给药次数过多、给药浓度过大可能引起的毒性反应, 作为一种潜在的新型药物, 有较好的应用和开发前景。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 赵引利, 何燕宁, 杨宇杰, 等. 马钱子及其制剂剂动力学研究进展 [J]. 中草药, 2015, 46(11): 1710-1714.
- [3] 陈丽华, 陈家乐, 温思菁, 等. 马钱子总碱-白芍总苷配伍凝胶剂的制备及其经皮吸收性能的考察 [J]. 中国药理学杂志, 2016, 51(22): 1953-1957.
- [4] 华晓东, 任变文. 经皮给药系统的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2009, 24(5): 282-285.
- [5] 邱玲, 尹蓉莉, 申宝德, 等. 芍药苷脂质液晶纳米粒制备及体外释放研究 [J]. 中草药, 2015, 46(23): 3495-3499.
- [6] 翟小燕, 梁基智, 邓洁芳, 等. 反相高效液相色谱法测定马红丸中马钱子碱和士的宁的含量 [J]. 中药材, 2010, 33(7): 1179-1180.
- [7] 周恺, 姚亮, 戴浩志, 等. 超滤离心法测定银杏内

- 酯 B 纳米结构脂质载体包封率 [J]. 安徽中医药大学学报, 2015, 34(22): 78-81.
- [8] 温思菁, 陈家乐, 管咏梅, 等. 马钱子总碱脂质体凝胶的制备及其体外透皮作用 [J]. 中国医院药学杂志, 2017, 37(1): 36-39.
- [9] 吴红兵, 霍东风, 蒋新国. 脂质立方液晶纳米粒作为药物载体的研究进展 [J]. 药学学报, 2008, 43(5): 450-455.
- [10] 刘丽丽, 陈谢谢, 陈家乐, 等. 脂质立方液晶纳米粒的研究进展及其在经皮给药系统中的应用 [J]. 中国药学杂志, 2017, 52(12): 1005-1010.
- [11] 汤 涛, 袁其红, 董 伟, 等. 星点设计-效应面优化欧前胡素脂质微球的处方工艺研究及质量评价 [J]. 中草药, 2018, 49(1): 109-114.
- [12] 张洪兵, 朱雪瑜, 张铁军, 等. 星点设计-效应面优化法优选复方止痛巴布剂基质处方 [J]. 中草药, 2013, 44(8): 985-988.
- [13] 孟祥平, 周 群, 王治平, 等. 口服葛根总黄酮固体脂质纳米粒冻干粉的制备及其 4 种成分释放度考察 [J]. 中草药, 2014, 45(17): 2467-2474.
- [14] 罗晓晶. 扫描电镜的发展及其在医药领域的应用 [J]. 山东工业技术, 2018(4): 22.