

丹酚酸B-丹参酮II_A-甘草次酸微乳凝胶微针透皮给药的评价

曹凤媚¹, 胡等慧²

1. 广州中医药大学第三附属医院, 广东 广州 510360

2. 北京中医药大学, 北京 102488

摘要: 目的 优化丹酚酸B (Sal B)-丹参酮II_A (TSN II_A)-甘草次酸 (GA) (STG) 微乳凝胶的处方工艺, 并考察微针给药对其促透和抗炎药效的影响。方法 以微乳凝胶的综合评分为响应值, 选取卡波姆用量、微乳用量、pH值作为考察因素, 通过 Box-Behnken 响应面法筛选最佳处方工艺。采用透皮扩散试验仪考察 STG 微乳凝胶、STG 微乳凝胶+微针 (长度分别为 500、750、1 000 μm) 给药的体外经皮渗透特性, 高效液相色谱 (HPLC) 测定 TSN II_A、Sal B 和 GA 的含量。采用 10% 蛋清诱导小鼠足肿胀考察 STG 微乳凝胶 (每次 1 g, 每天 2 次, 给药 3 d)、STG 微乳凝胶+微针 (长度分别为 500、750、1 000 μm) 背部给药的抗炎作用, 同时考察给药 7 d 对小鼠皮脂腺斑组织的作用。结果 STG 微乳凝胶的最佳制备工艺中卡波姆用量为 1.00%、微乳用量为 0.10 g、pH 值为 6, 制备的 STG 微乳凝胶中含 TSN II_A、Sal B、GA 分别为 0.18、1.05、1.53 mg·g⁻¹。与 TSN II_A 比较, Sal B 和 GA 的透皮吸收较好; STG 微乳凝胶经过与不同长度微针配合使用后的累积透皮量: STG 微乳凝胶+1 000 μm 微针组 > STG 微乳凝胶+700 μm 微针组 > STG 微乳凝胶+500 μm 微针组 > STG 微乳凝胶组; 3 种药物在皮肤中的滞留量相对较高。与空白凝胶组比较, STG 微乳凝胶组小鼠足肿胀度有所减轻, 但无显著性差异; 与 STG 微乳凝胶组比较, STG 微乳凝胶+微针组小鼠足肿胀程度均明显减轻, 以 1 000 μm 微针组作用最显著 ($P < 0.05, 0.01$)。小鼠皮脂腺斑组织 HE 染色结果表明, 与空白凝胶组比较, 各组小鼠皮脂腺数目减少且体积变小, 以微针长度 1 000 μm 组效果最显著。结论 STG 微乳凝胶+微针给药具有良好的透皮特性和缓释效果, 发挥抗炎及控制皮脂腺分泌作用, 微针长度与透皮率的增加呈正相关。

关键词: 丹酚酸B; 丹参酮II_A; 甘草次酸; 微乳凝胶; 微针; 抗炎; 皮脂腺

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2022) 10-2039-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.10.014

Evaluation of microneedle transdermal administration of salvianolic acid B-tanshinone II_A-glycyrrhetic acid microemulsion gel

CAO Fengmei¹, HU Denghui²

1. The Third Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510360, China

2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

Abstract: **Objective** To optimize the formulation of salvianolic acid B (Sal B)-tanshinone II_A (TSN II_A)-glycyrrhetic acid (GA) (STG) microemulsion gel and investigate the impact of microneedle administration on its penetration promoting and anti-inflammatory effects. **Methods** The comprehensive score of the microemulsion gel was taken as the response value, the dosage of carbomer, dosage of microemulsion and pH value were selected as the investigation factors, and the preparation method was screened by the Box-Behnken response surface method. A transdermal diffusion tester was used to investigate the *in vitro* percutaneous penetration characteristics of STG microemulsion gel and STG microemulsion gel plus microneedle (500, 750, 1 000 μm in length), and the contents of Sal B, TSN II_A, and GA were determined by HPLC. The anti-inflammatory effect of STG microemulsion gel (1 g each time, twice a day, for 3 days), STG microemulsion gel + microneedles (length of 500, 750, 1 000 μm, respectively) were administered on the back was investigated by 10% egg white-induced swelling in mice and investigate its effect on mouse sebaceous plaque tissue through seven days of microneedle administration. **Results** The best preparation process of STG gel were carbomer dosage 1.00%, microemulsion dosage 0.10 g, pH 6. The content of TSN II_A, Sal B and GA were 0.18, 1.05 and 1.53 mg·g⁻¹, respectively. Compared with TSN II_A, the transdermal absorption of Sal B and GA was better. The cumulative

收稿日期: 2022-04-05

第一作者: 曹凤媚(1981—), 女, 本科, 主管中药师, 主要从事中药质量控制研究。Tel: 13826251220 E-mail: cjbo0210@126.com

transdermal volume of STG microemulsion gel combined with different lengths of microneedles: STG microemulsion gel + 1 000 μm microneedle group > STG microemulsion gel + 700 μm microneedle group > STG microemulsion gel + 500 μm microneedle group > STG microemulsion gel group. The retention of the three drugs in the skin was relatively high. Compared with the blank gel group, the degree of foot swelling in the STG microemulsion gel group was reduced, but there was no significant difference. Compared with STG microemulsion gel group, the degree of foot swelling in STG microemulsion gel + microneedle group was significantly reduced, and the effect of 1 000 μm microneedle group was the most significant ($P < 0.05, 0.01$). The results of HE staining showed that compared with the blank gel group, the number and volume of sebaceous glands in each group were decreased, and the effect of microneedle length 1 000 μm group was the most significant. **Conclusion** STG microemulsion gel + microneedle administration has good transdermal characteristics and sustained release effect, which can exert anti-inflammatory and control sebaceous gland secretion. The length of microneedle is positively correlated with the increase of transdermal rate.

Key words: salvianolic acid B; tanshinone II_A; glycyrrhetic acid; microemulsion gel; microneedles; anti-inflammatory; sebaceous glands

丹参、甘草是临床上常用的中药,可以用于治疗炎症性疾病^[1-2]。丹参与甘草对痤疮具有一定治疗作用,二者可以产生协同作用^[3-5]。但所含的主要药效成分丹参酮 II_A (tanshinone II_A, TSN II_A)、丹参酚酸 B (salvianolic acid B, Sal B) 和甘草次酸 (glycyrrhetic acid, GA) 口服生物利用度均较低,难以到达病变部位发挥药效。其中,TSN II_A 和 GA 的水溶性较差,溶解度仅分别为 0.24 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[6] 和 6.32 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[7],严重影响口服吸收;Sal B 渗透性低、稳定性差^[8]。因此,选择一个适当的传递系统以提高上述药物对痤疮的药效尤为重要。

微乳凝胶作为一种新型透皮给药载体,是指将制备的微乳加入至适宜高分子材料凝胶基质中混匀,形成的半固体凝胶大分子网状结构^[9]。微乳凝胶的产生克服了微乳流动性强、保留时间短、黏附性差等缺点,是一种同时具备微乳和凝胶双重特点的制剂。一方面能够改善药物稳定性,提高难溶性药物的溶解度,另一方面易于涂布且对皮肤黏膜无刺激性^[10]。当乳剂凝胶与皮肤接触时,药物不仅可以缓慢经皮吸收到体内发挥药效,同时还对皮肤表面的病症起到很好的直接治疗作用。微乳凝胶体系还可减少药物在肝脏的首过效应^[11],是适用于易挥发、易被氧化、水难溶性药物的新型透皮给药载体。

皮肤角质层屏障作为微乳凝胶给药的天然屏障,是影响其有效成分吸收的主要障碍。滚轮微针作为物理促透方法之一^[12],具有操作便利、无痛等特点,其促透机理为滚动时短暂破坏角质层,形成多个微小孔道,药物通过微小孔道渗入真皮层,产生疗效。将微针给药技术与纳米给药(脂质体、纳米粒)体系相结合^[13-14],可以促进该给药系统药物的吸收。因此,本研究针对 TSN II_A、Sal B、GA 生物利用度低等缺点,结合乳剂凝胶的优点,制备 Sal B-

TSN II_A-GA(STG)微乳凝胶,并通过微针给药,考察微针-微乳凝胶的促渗透效果,为临床纳米制剂给药及痤疮治疗提供一定依据。

1 材料

1.1 药物及主要试剂

TSN II_A (批号 160428)、Sal B (批号 MUST-12020104)、GA (批号 171215),宝鸡国康生物制药有限公司;聚山梨酯 80 (Tween 80,天津市福晨化学试剂厂);甲醇、甲酸(色谱纯,赛默飞世尔科技有限公司);其他试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器

Waters 高效液相色谱仪(美国);双显恒温加热磁力搅拌器 SH-3 (北京金北德工贸有限公司);Beckman X-22R 型高速冷冻离心机(美国贝克曼公司);TK-24BL 型透皮扩散试验仪(上海锴凯科技贸易有限公司);滚轮微针(540 针,针长 500、750、1 000 μm ,传奇美美容仪器厂家);JS10 超细匀浆机(扬州均瑞机电设备制造有限公司);Vortex genius 3IKA 圆周振荡器(上海右一仪器有限公司)。

1.3 实验动物

雄性 SPF 级昆明种小鼠,5 周龄,体质量(20 $\pm$ 5)g,购于广州中医药大学,实验动物生产许可证号 SCXK(粤)2019-0047。所有与动物相关的程序均符合广州中医药大学伦理委员会批准的动物护理协议,动物实验伦理批准号为 NO 44005900002837。

2 方法与结果

2.1 STG 微乳凝胶的制备

2.1.1 微乳的制备 称取卵磷脂 500 mg,连同 TSN II_A 和 GA,加入 0.2 mL 的中链脂肪酸和 1 mL 乙醇,超声至溶解,60 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴,即得油相。将 Sal B 加入 10 mL 纯水溶解,60 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴,即得水相。保温条件下,同温水相加入到油相中,使用高速均质分

散器以 $10\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 分散 2 min 制备初乳,超声细胞粉碎机中 200 W 探头超声 5 min,即得乳剂。

2.1.2 STG 微乳凝胶的制备 取溶胀好的卡波姆凝胶与微乳混合充分搅拌至均匀,使得凝胶浓度为 1%,含 TSN II_A、Sal B、GA 分别为 0.18、1.05、1.53 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

2.2 STG 微乳凝胶的处方优化

2.2.1 STG 微乳凝胶成形评分标准 参照文献报道^[15],对制备的 STG 微乳凝胶进行评价,以 STG 微乳凝胶的光泽性、涂展性、均匀度、离心性的综合评分为考察指标,筛选其制备的最佳工艺,具体评分标准见表 1。

表 1 乳剂凝胶评分标准

Table 1 Emulsion gel scoring standards

指标	优(15~20)	良(10~15)	中(5~10)	差(0~5)
光泽性	光滑,有光泽	小颗粒,有光泽	明显颗粒,无光泽	粗糙,无光泽
涂展性	易于涂布,顺滑	涂布性较好	较难涂布	涂布性差
黏稠度	适中	黏稠	较黏稠	较稀
均匀度	均匀细腻	较细腻	较粗糙	粗糙
离心性	均匀外观无变化	无分层现象	略有分层现象	分层

综合评分(100分)=光泽性(20分)+涂展性(20分)+黏稠度(20分)+均匀度(20分)+离心性(20分)

Comprehensive score (100 points) = gloss (20 points) + spreading (20 points) + viscosity (20 points) + uniformity (20 points) + eccentricity (20 points)

2.2.2 Box-Behnken 响应面法实验设计 本实验根据前期预试验及相关文献报道^[16],利用 BBC 设计原理,选取卡波姆用量(A)、微乳用量(B)、pH 值(C)作为考察因素,以综合评分为响应值,设计 3 因素 3 水平的响应面优化实验,具体因素表见表 2。

表 2 设计实验因素与水平

Table 2 Design experimental factors and levels

因素	水平		
	-1	0	+1
卡波姆用量/%	0.50	1.00	1.50
微乳用量/g	0.08	0.10	0.12
pH 值	5.00	5.75	6.50

Box-Behnken 响应面法优选制备工艺实验设计及其结果见表 3,方差分析见表 4。采用 Design-Expert 进行数据分析,以因变量 Y 对 3 个自变量进行模型拟合,并通过相关系数(R^2)对拟合模型进行评价,通过比较各拟合方程的拟合度,得到二次多项式回归方程 $Y=91.40-9.00A+6.2B+1.25C+7.00AB-2.50AC+1.00BC-10.95A^2-7.95B^2-19.95C^2$, $R^2=0.9421$, $P<0.01$, $F=12.66$,表明模型差异性极显著;失拟项 $P=0.0801>0.01$,差异不显著,说明该模型实验误差小,拟合度和可信度均可靠,可以用此模型对乳剂凝胶的制备工艺进行分析和预测。

2.2.3 响应面优化分析 根据拟合方程,通过 Design-Expert V 8.0.6.1 软件绘制综合评分随各因素变化的等高线图和响应面图。

表 3 Box-Behnken 响应面法优选制备工艺实验设计及结果

Table 3 Box-Behnken response surface method optimization design and results of processing experiments

试验号	卡波姆用量/%	微乳用量/g	pH	综合评分
1	1.00	0.08	6.50	55
2	1.00	0.10	5.75	91
3	0.50	0.12	5.75	74
4	1.50	0.10	5.00	50
5	0.50	0.10	5.00	70
6	1.00	0.10	5.75	96
7	0.50	0.10	6.50	76
8	1.50	0.08	5.75	57
9	1.00	0.10	5.75	92
10	1.50	0.10	6.50	46
11	1.00	0.12	6.50	76
12	1.00	0.08	5.00	53
13	1.00	0.10	5.75	86
14	1.50	0.12	5.75	77
15	1.00	0.10	5.75	92
16	0.50	0.08	5.75	82
17	1.00	0.12	5.00	70

由图 1 可知,卡波姆用量、微乳用量、pH 对综合评分的影响均为抛物线关系,即在一定范围内,综合评分随着三者含量的增加先增大后减小。分析各图可知,卡波姆用量曲面最陡,微乳用量次之,pH 最不明显,说明卡波姆用量对综合评分影响最为显著,pH 影响不显著;由等高线图可知,AB 交互作用最为明显,对综合评分影响最为显著。

表4 方差分析

Table 4 Variance Analysis

项目	平方和	自由度	F值	P值	显著性
回归模型	3 877.56	9	12.66	0.001 5	**
A	648.00	1	19.04	0.003 3	**
B	312.50	1	9.18	0.019 1	*
C	12.50	1	0.37	0.563 6	
AB	196.00	1	5.76	0.047 5	*
AC	25.00	1	0.73	0.419 7	
BC	4.00	1	0.12	0.741 8	
A ²	504.85	1	14.84	0.006 3	**
B ²	266.12	1	7.82	0.026 7	*
C ²	1 675.80	1	49.25	0.000 2	**
剩余	238.20	7			
失拟值	187.00	3	4.87	0.080 1	不显著
误差	51.20	4			
总和	4 115.76	16			

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

2.2.4 制备工艺优化结果及验证 分析回归模型, 根据优化的处方剂量, 结合实际情况, 各因素值保留为整数, 即卡波姆用量 1.00%、微乳用量 0.10 g、pH 6。在此条件下进行 3 次平行实验, 综合评分平均值为 94.21 与理论值 93.73 比较接近, 且 $RSD < 4\%$ 。说明该回归方程与实际情况拟合较好, 该最佳工艺切实可行, 可操作性强。

2.3 体外透皮考察

2.3.1 皮肤预处理 30 只雄性昆明小鼠适应性饲养 3 d, 取体质量合格的健康小鼠 24 只, 脱颈椎处死, 采用剃毛器配合脱毛膏脱去小鼠腹部被毛, 剥去腹部皮肤, 剔除脂肪、肌肉层及结缔组织, 用生理盐水洗净, 滤纸吸干, 铺平, -20°C 冰箱保存, 制备离体鼠皮备用。

随机分成 STG 微乳凝胶组 (A) 和 $500\ \mu\text{m}$ (B)、 $700\ \mu\text{m}$ (C)、 $1\ 000\ \mu\text{m}$ (D) 3 种不同微针长度的“STG 微乳凝胶+微针”组, 每组平行 6 份。A 组

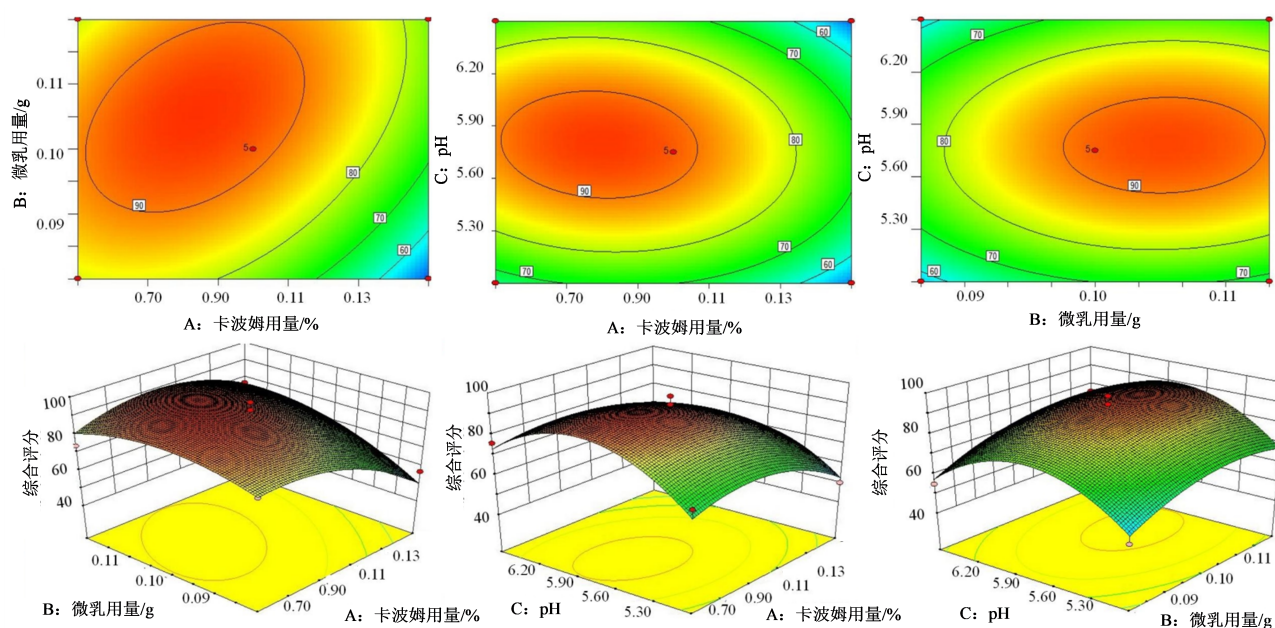


图1 卡波姆用量、微乳用量、pH值的等高线图和响应面图

Fig. 1 Contour plot and response surface diagram of Carbomer dosage, microemulsion dosage, and pH value

涂抹载药微乳凝胶; B、C、D 3 组分别用滚轮微针沿 4 个交叉方向滚动处理离体鼠皮 (滚动方向如图 2 所示), 每个方向滚动 5 次^[17], 涂抹 STG 微乳凝胶。采用 TK-12D 型透皮扩散试验仪, 进行体外透皮实验。将离体鼠皮真皮层向下, 固定在供给池和接收池之间, 透皮面积为 $3.14\ \text{cm}^2$, 接收池体积为 20 mL, 分别将空白微乳凝胶和载药微乳凝胶 (1 g) 涂抹于鼠皮角质层上, 接收室中注入接收液 35% 甲醇, 排除气

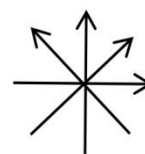


图2 微针滚动方向图

Fig. 2 Microneedle rolling direction

泡, 在液面处画 1 条线作为标记。水浴温度 $(37.0 \pm 0.5)^{\circ}\text{C}$, 磁力搅拌速度为 $200\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ (模拟人体皮肤

上的血液内循环),分别于2、4、6、8、10、12、24 h取接收液2 mL(及时补充同温接收液至标记处),取得试样经0.22 μm微孔滤膜滤过,用高效液相法测定含量^[18]。按以下公式计算各时间点的单位面积累积透皮量(Q_n)。

$$Q_n = \frac{C_n V + \sum_{i=1}^{n-1} C_i V_i}{A}$$

C_n 为第 n 次取样测定浓度, V 为扩散池体积, V_i 为每次取样体积(mL); C_n 和 C_i 分别为第 n 次和第 i 次取样时接收液的浓度; A 为有效皮肤渗透面积(cm^2)

2.3.2 体外渗透曲线 以 t 为横坐标, Q_n 为纵坐标,绘制TSN II_A、Sal B、GA 3种组分的体外渗透曲线,见图3。

2.3.3 体外透皮参数 采用Higuchi函数方程对数据进行模型拟合,得到各组药物的透皮速率(J_s),并

计算皮肤滞留量(Q_0),结果见表5。

2.3.4 Q_0 实验结束后取下皮肤,剪掉未接触药物的边缘皮肤,用生理盐水冲洗,再用棉签蘸取生理盐水由中央向周围擦拭净皮肤表面残留药物3次,用干棉签将皮肤表面擦干。将鼠皮剪碎,加入接收液0.5 mL匀浆,再加入接收液1.0 mL混匀,超声提取20 min,涡旋振荡3 min,10 000 rmin^{-1} 离心10 min。取上清液用0.22 μm微孔滤膜滤过,取续滤液测定含量^[18],由相应的标准曲线计算药物浓度,再计算 Q_0 。

由图3和表5可知,与TSN II_A比较,Sal B和GA的透皮吸收较好,这可能与药物的亲水性与亲脂性有关。比较STG微乳凝胶经过与不同长度微针配合使用后的透皮情况, Q_n :D>C>B>A,即1 000 μm组>700 μm组>500 μm组>微乳凝胶组。说明经过微针处理药物的透过量增多,且在一

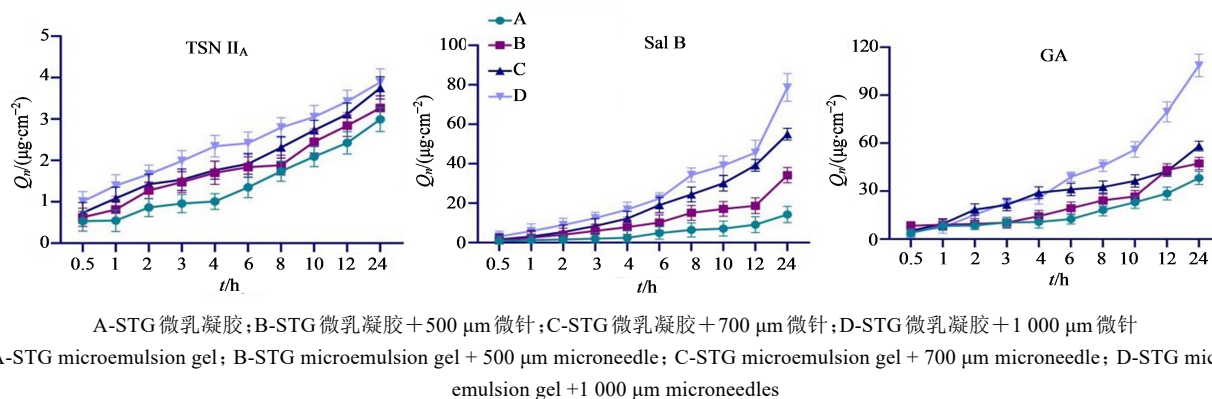


图3 不同微针长度下TSN II_A、Sal B、GA的经皮渗透曲线

Fig. 3 Transdermal permeation curve of TSN II_A, Sal B, and GA under different microneedle length

表5 不同制剂中TSN II_A、Sal B、GA的透皮动力学方程及相关参数

Table 5 Transdermal dynamic equations and permeability parameters of TSN II_A, GA and GA in different preparations

药物	组别	Higuchi函数方程	R^2	$Q_n/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2})$	$J_s/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1})$	$Q_0/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2})$
TSN II _A	A	$Q_n=0.706\ 6\ t^{1/2}+0.728\ 4$	0.965\ 3	2.992\ 1	0.707	1.303
	B	$Q_n=0.733\ 8\ t^{1/2}+0.303\ 3$	0.979\ 3	3.270\ 7	0.734	1.267
	C	$Q_n=0.651\ 0\ t^{1/2}+0.278\ 6$	0.960\ 3	3.753\ 9	0.651	1.822
	D	$Q_n=0.646\ 6\ t^{1/2}-0.078$	0.969\ 0	3.894\ 7	0.647	1.799
Sal B	A	$Q_n=0.058\ 2\ t^{1/2}-2.877\ 5$	0.961\ 6	14.307\ 0	0.058	9.137
	B	$Q_n=7.757\ 7\ t^{1/2}-6.650\ 2$	0.972\ 2	34.216\ 0	7.758	18.729
	C	$Q_n=13.587\ 0\ t^{1/2}-12.271$	0.975\ 9	55.068\ 1	13.587	16.263
	D	$Q_n=18.074\ 0\ t^{1/2}-16.024$	0.968\ 6	78.725\ 0	18.074	21.143
GA	A	$Q_n=8.233\ 7\ t^{1/2}-3.242$	0.948\ 7	38.267\ 9	8.234	19.814
	B	$Q_n=10.631\ 0\ t^{1/2}-3.92$	0.899\ 4	47.327\ 8	10.631	18.134
	C	$Q_n=12.197\ 0\ t^{1/2}-0.375\ 2$	0.976\ 4	58.281\ 2	12.197	23.562
	D	$Q_n=25.865\ 0\ t^{1/2}-20.679$	0.971\ 1	108.705\ 6	25.865	20.413

A-STG微乳凝胶;B-STG微乳凝胶+500 μm微针;C-STG微乳凝胶+700 μm微针;D-STG微乳凝胶+1 000 μm微针

A-STG microemulsion gel; B-STG microemulsion gel + 500 μm microneedle; C-STG microemulsion gel + 700 μm microneedle; D-STG microemulsion gel + 1 000 μm microneedles

定范围内,微针长度越长,透过效果越好,本实验以1 000 μm 微针处理透皮效果最佳。除此之外,Sal B和GA在不同处理条件下的 J_s 均为 $D>C>B>A$ 且均较低,显示了一定的缓释作用;3种药物的 Q_0 相对较高,原因可能是制剂进入皮肤后,形成了药物储存,随后再与皮肤发生相互作用,药物在皮肤中的储存量大可以延缓药效的发挥,可增强缓释作用。结合Higuchi函数方程模型拟合结果,表明几种药物在不同微针处理下的渗透动力学均符合Higuchi函数方程,显示了良好的透皮特性和缓释效果。

2.4 炎症药效

2.4.1 分组与给药 取30只雄性昆明小鼠,随机分成5组,除空白凝胶组,其他4组同“2.3.1”项的分组,每组6只,实验前用乙醚将小鼠麻醉,用宠物电推剪剃净小鼠背部皮肤约2 cm $\times$ 2 cm大小区域的毛发,75%医用酒精消毒以备给药。空白凝胶组与STG微乳凝胶组(A组)小鼠背部皮肤不用微针处理,直接涂抹空白凝胶和STG微乳凝胶,使用微针的B、C、D 3组小鼠背部皮肤分别用不同长度微针处理后,涂抹STG微乳凝胶,给药剂量每只1 g,每日2次^[19]。

2.4.2 足肿胀实验^[20] 各组于第3天给药1 h后,在右踝关节处画圈标记,用溢水法^[21]测定各组鼠右后足的容积,作为小鼠右后足的正常容积。之后各组在右后肢足掌心向关节方向进针,sc 10%鸡蛋清(每只0.1 mL)致炎。分别于致炎后1、2、4、6 h测定右后足的容积。分别计算各组小鼠的足肿胀度,比较各组肿胀度的差异。

足肿胀度=(致炎后足容积-致炎前足容积)/致炎前足容积

2.4.3 微乳凝胶微针透皮给药小鼠足趾肿胀抗炎效果 如表6所示,与空白凝胶组比较,A组小鼠足肿胀度有所降低,但无显著性差异,说明STG微乳凝胶具有一定的抗炎作用,但效果不佳;C组在致炎后1、2、4 h足肿胀度显著降低($P<0.05$ 、 0.01);D组在各个时间点足肿胀度均显著降低($P<0.05$ 、 0.01)。与A组比较,B、C、D组小鼠足肿胀度均明显减轻,其中以D组小鼠足肿胀度减轻最为显著,且在各个时间点均具有显著性差异($P<0.05$ 、 0.01),说明不同微针处理后给药,STG微乳凝胶能显著抑制10%蛋清引起的炎症反应,以微针长度为1 000 μm 时透皮促渗效果最好、STG微乳凝胶抗炎作用最明显。

表6 各组小鼠足趾肿胀度比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 6 Comparison of swelling rate of toes in each group ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	足肿胀度/%			
	1 h	2 h	4 h	6 h
空白凝胶	0.13 $\pm$ 0.02	0.12 $\pm$ 0.03	0.08 $\pm$ 0.02	0.06 $\pm$ 0.01
A	0.11 $\pm$ 0.02	0.09 $\pm$ 0.01	0.07 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0.01
B	0.09 $\pm$ 0.03	0.07 $\pm$ 0.02*	0.05 $\pm$ 0.02	0.03 $\pm$ 0.02
C	0.07 $\pm$ 0.01**	0.05 $\pm$ 0.01***	0.04 $\pm$ 0.01*	0.03 $\pm$ 0.02
D	0.05 $\pm$ 0.02**	0.04 $\pm$ 0.01***	0.02 $\pm$ 0.02*	0.01 $\pm$ 0.01***

与空白凝胶组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与STG微乳凝胶组比较: # $P<0.05$ ### $P<0.01$; A-STG微乳凝胶; B-STG微乳凝胶+500 μm 微针; C-STG微乳凝胶+700 μm 微针; D-STG微乳凝胶+1 000 μm 微针

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs blank gel group; # $P<0.05$ ### $P<0.01$ vs STG microemulsion gel; A-STG microemulsion gel; B-STG microemulsion gel + 500 μm microneedle; C-STG microemulsion gel + 700 μm microneedle; D-STG microemulsion gel + 1 000 μm microneedles

2.5 STG微乳凝胶对小鼠皮脂腺斑组织的作用

2.5.1 实验动物分组及给药 30只雄性昆明小鼠随机分成5组,分组及给药方法同“2.4.1”项,连续给药7 d。

2.5.2 测定方法 给药7 d后,小鼠脱颈椎处死,剔除小鼠腹部的被毛,摘取下侧腹部皮脂腺斑组织放入8~10倍体积的中性福尔马林组织固定液中,切片后HE染色,并在显微镜下观测其组织结构。

已有文献报道,生理情况下小鼠皮脂腺排列疏松且部分开口于毛囊,结构完整;病理情况下皮脂

腺体积相应变大且数量增多^[22]。基于此,本研究根据各给药组皮脂腺变化情况(图4)判断可知:与空白凝胶组比较,各组小鼠皮脂腺数目减少且体积变小,其中以1 000 μm 组皮脂腺体积最小、腺体萎缩程度最重且排列最疏松、700 μm 组次之。由此可知,STG微乳凝胶结合微针给药可使皮脂腺发生萎缩,在一定程度上控制皮脂分泌,且以微针长度1 000 μm 组的效果最佳。

3 讨论

痤疮是发生在毛囊皮脂腺的一种慢性炎症性

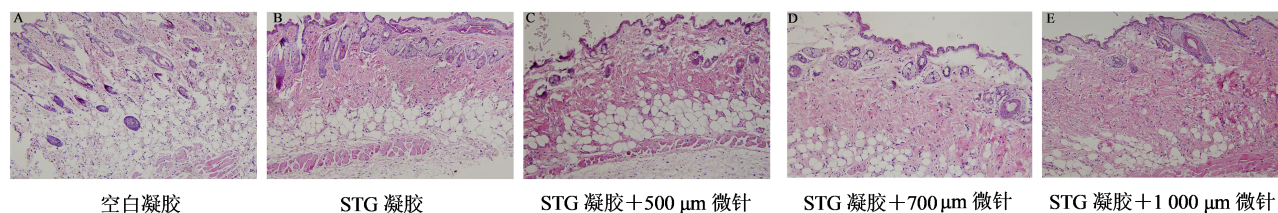


图4 小鼠皮脂腺纤维结构

Fig. 4 Fibrous structure of mouse sebaceous glands

皮肤病,好发于青春期^[23]。目前,本病临床治疗主要以口服和外用抗生素或异维A酸类药物为主,但两者临床应用均具有一定局限性,抗生素易耐药、异维A酸存在副作用^[24]。而本实验考察的微乳凝胶剂属于透明半固体制剂,和传统制剂比较,易于涂抹和吸收,且能长时间与皮肤黏附,生物相容性良好,不经过胃肠及肝脏代谢,副作用小,疗效可靠,患者顺应性好。与此同时,采用滚轮微针给药,提高了药物透皮率,促进了药物的吸收,更加适于作为痤疮给药的制剂形式。

3.1 药效成分的选择

丹参各脂溶性成分中TSN II_A含量相对较高,约为药材的0.1%~0.9%。水溶性成分中Sal B的含量较高,约占总丹酚酸的70%,且在水溶性成分中活性最强。TSN II_A和Sal B为丹参中发挥抗炎、抗凝血、抗纤维化等药理作用的主要活性成分^[25-27]。三萜皂苷是甘草中最主要的活性部位,甘草酸为其代表。但甘草酸的口服生物利用度较低,主要经肠道水解直接或分步脱去葡萄糖醛酸生成GA后被吸收。GA进入血液后,羟化代谢生成相应的代谢产物发挥抗炎杀菌等药效作用。同时,GA具有两亲性物质的结构特点,能与细胞膜上胆固醇或磷脂相互作用,辅助药物跨膜运输^[28-29]。

故选择Sal B、TSN II_A、GA 3个成分制备抗炎微乳凝胶,协同增效。

3.2 微乳的形成

微乳的形成通常包括油相、水相、乳化剂3种,在其制备微乳的过程中,乳化剂的种类、乳化温度、pH是影响成型的关键因素。本实验所制备微乳为水包油(O/W)型,通常选用亲水疏水平衡(HLB)值为8~18、毒性较小的非离子型乳化剂。实验结果表明,当选用聚山梨酯80时,水油两相能够迅速被乳化,形成微乳;当乳化温度为60℃时,乳剂澄清透明。实验发现,乳化温度高于或低于60℃,微乳的外观状态均较差,当高于60℃时微乳的物理外观由澄清透明逐渐变浑浊,当低于60℃时,乳化能力不够。pH值对微乳形成的影响主要与分子结构有关,

本实验中Sal B中含有较多酚羟基,能够与水分子形成氢键,这种分子键氢键阻碍了水分子与表面活性剂分子之间的作用力,从而对微乳的形成产生影响,载药微乳中含Sal B越多,其与水相之间的作用力越强,对微乳的形成影响越大。相关文献报道显示^[8],Sal B在pH 3.32的缓冲盐溶液中,稳定性最佳,故本实验选用甘氨酸与0.1 mol·L⁻¹盐酸配制的缓冲盐溶液作为水相。

药物透皮吸收过程包括释放、穿透及吸收。虽然基质与皮肤的水合作用,能增加药物的穿透,油包水(W/O)型乳剂基质较O/W型乳剂基质水合作用强,但本实验中TSN II_A极不稳定,制备成O/W型乳剂可以保护TSN II_A,提高稳定性。除此之外,影响药物吸收的还有药物的性质和相对分子质量,一般脂溶性药物与皮肤性质相似更易穿透皮肤,但由于组织液的极性,导致药物又必须具有一定的极性,因此,具有一定油溶性和水溶性的药物穿透作用较理想。而在油、水中都难溶的药物则很难透皮吸收,强亲油性药物可能聚积在角质层表面而难以透皮吸收。当药物穿透表皮后,相对分子质量又成为影响吸收的主要因素,通常相对分子质量愈小,吸收愈快,反之亦然。而本研究选用的3种药物既包括亲脂性,又包括亲水性,通过乳剂作为载体,正好符合药物促透的机制,选用卡波姆作为基质,制备成微乳凝胶,延长了与皮肤接触的时间,正好满足透皮给药的条件,有利于药物的进一步释放,从而发挥药效。

3.3 微针的使用

人体皮肤角质层厚15~20 μm,为皮肤的主要屏障。使用滚轮微针滚动时,可短暂破坏角质层,形成多个微小孔道,再进行微乳凝胶的涂抹,可物理促透药物。微针联合给药与单独使用透皮制剂比较,可显著提高药物透皮吸收的效率,促进水溶性药物的透皮吸收和提高大分子药物的透皮能力。

微针的长度是引起疼痛的主要因素,微针头的形状、厚度、宽度等并不会影响疼痛感。一般人体皮肤1 mm下才有丰富的神经和血管,故微针刺入

皮肤深度达1 mm以上时,疼痛才会明显增加。而且即使微针刺入深度达到1.5 mm,产生的疼痛感也比普通皮下注射小的多。一般认为微针在角质层形成的通道会在15 min后关闭,发生感染及出血的可能极低,大量的临床和动物实验也没有相关微针引起感染的报道^[30-32]。

本实验使用1 000 μm 滚轮微针滚动时,操作简易,刺入皮肤深度未完全达到1 000 μm ,人体尝试没有明显痛感。同时在动物实验和实验者的试验中未发现该微针对皮肤造成红斑、水肿等皮肤功能紊乱的实际伤害,使用较为安全。

3.4 接收液的选择

本实验所选模型药TSN II_A、GA均为脂溶性物质,在水中溶解度差,而在甲醇中溶解度较好,结合3者的溶解性能,最终选用在接收液中增加甲醇以提高药物溶解度。但高浓度的甲醇可破坏小鼠皮肤的生理结构,综合考虑,最终选用30%的甲醇作为接收液进行体外透皮实验。另或可选用加入一定剂量的乳化剂如聚山梨酯80的水溶液作为接收液,以增加药物的溶解度,但此法需要实验进一步验证。

体外透皮和小鼠足肿胀实验说明,不同微针均能提高药物的透过率与减轻小鼠足肿胀。与微乳凝胶组比较,不同长度微针处理后,TSN II_A、Sal B和GA 3种药物的透过率均有所增强,且透过量与微针长度成正相关,随着微针长度的增长, Q_n 也增多,这与微针处理时刺透了皮肤的角质层有关,微针刺透皮肤角质层会形成细小的通道加速药物的透过,微针长度越长,细小孔道越长,药物透过更易到达真皮层,因此透过量越高。同理,透过的药物量越高,发挥抗炎作用的药效成分越多,即小鼠足肿胀减轻程度越明显。

本研究以微乳作为药物载体,以微针-微乳凝胶作为给药方式,既增大脂溶性药物在水中的溶解度和皮肤给药的促透作用,提高药物的生物利用度,又实现了中药丹参与甘草的联合使用,增强了药物的治疗作用,为今后研制中药复方微乳和给药形式提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 韩浩伦, 吴玮. 中药丹参抗炎作用研究进展 [J]. 总装部医学学报, 2010, 12(2): 118-119.
Han H L, Wu W. Research Progress on anti-inflammatory effect of *Salvia miltiorrhiza* [J]. Med J Gen Equip Head, 2010, 12(2): 118-119.
- [2] 缪雨青, 周文丽, 王杰军. 甘草次酸及其衍生物对炎症和免疫功能影响的研究进展 [J]. 中国中西医结合杂志, 2018, 38(11): 1405-1408.
Miao Y Q, Zhou W L, Wang J J. Progress of effects of glycyrrhetic acid and its derivatives on inflammation and immune functions [J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2018, 38(11): 1405-1408.
- [3] 吴海娟. 小剂量异维A酸联合复方甘草酸苷治疗重度痤疮患者的效果观察 [J]. 中国实用医药, 2020, 15(23): 139-140.
Wu H J. Effect of low dose isotretinoin combined with Compound Glycyrrhizin in the treatment of severe acne [J]. China Pract Med, 2020, 15(23): 139-140.
- [4] 廖智灵. 微针联合丹参酮胶囊治疗中度痤疮效果观察 [J]. 临床合理用药杂志, 2020, 13(14): 112-113.
Liao Z L. Effect of microneedle combined with Tanshinone Capsule on moderate acne [J]. Chin J Clin Ration Drug Use, 2020, 13(14): 112-113.
- [5] 蓝宇频. 丹参酮联合异维A酸治疗中重度痤疮效果观察 [J]. 皮肤病与性病, 2019, 41(6): 832-833.
Lan Y P. Effect of tanshinone combined with isotretinoin in the treatment of moderate and severe acne [J]. J Dermatol Venereol, 2019, 41(6): 832-833.
- [6] 范广俊, 范青, 赵珊, 等. 丹参酮II_A理化性质的研究 [J]. 药学服务与研究, 2008, 8(4): 295-296.
Fan G J, Fan Q, Zhao S, et al. Study on physical and chemical properties of tanshinone II_A [J]. Pharm Care Res, 2008, 8(4): 295-296.
- [7] 郭波红, 程怡, 林绿萍, 等. 甘草次酸平衡溶解度和表观油水分分配系数的测定 [J]. 广东药学院学报, 2011, 27(3): 221-223.
Guo B H, Cheng Y, Lin L P, et al. Determination of equilibrium solubility and apparent oil/water partition coefficient of glycyrrhetic acid [J]. J Guangdong Pharm Univ, 2011, 27(3): 221-223.
- [8] 林珈好, 王秀丽, 管辉达, 等. 丹参酮II_A-甘草次酸复方脂质体中丹酚酸B的载入研究 [J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(5): 1608-1611.
Lin J H, Wang X L, Guan H D, et al. Study on encapsulation of salvianolic acid B into tanshinone II_A-glycyrrhetic acid compound liposomes [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2014, 29(5): 1608-1611.
- [9] 谢明华, 葛敏, 高建青. 微乳凝胶经皮给药制剂的研究与应用进展 [J]. 中国现代应用药学, 2015, 32(6): 764-768.
Xie M H, Ge M, Gao J Q. Progress of investigation and application for microemulsion-based gels transdermal delivery system [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2015, 32

- (6): 764-768.
- [10] 吴超群, 李小芳, 郑宇, 等. 微乳凝胶在中药经皮给药系统中的应用进展 [J]. 山东化工, 2019, 48(11): 38-40.
Wu C Q, Li X F, Zheng Y, et al. Progress in application of microemulsion gel in transdermal drug delivery system of traditional Chinese medicine [J]. Shandong Chem Ind, 2019, 48(11): 38-40.
- [11] Hussain A, Samad A, Singh S K, et al. Nanoemulsion gel-based topical delivery of an antifungal drug: *in vitro* activity and *in vivo* evaluation [J]. Drug Deliv, 2016, 23(2): 642-647.
- [12] 张超, 韩丽, 张定堃, 等. 经皮给药系统促透方法及其联用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(7): 231-235.
Zhang C, Han L, Zhang D K, et al. Research progress on penetration methods and its combination of transdermal drug delivery system [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2014, 20(7): 231-235.
- [13] 张玮. 基于微针给药的靶向黑素细胞抗色素沉着纳米粒的研究 [D]. 上海: 第二军医大学, 2011.
Zhang W. Study on anti-pigmentation NPs targeted to melanocyte by microneedles [D]. Shanghai: Second Military Medical University, 2011.
- [14] Qiu Y Q, Gao Y H, Hu K J, et al. Enhancement of skin permeation of docetaxel: A novel approach combining microneedle and elastic liposomes [J]. J Control Release, 2008, 129(2): 144-150.
- [15] 卢秀霞, 潘婷婷, 洪于琦, 等. 茶树油微乳凝胶的制备及其质量评价 [J]. 中草药, 2015, 46(13): 1892-1900.
Lu X X, Pan T T, Hong Y Q, et al. Preparation and quality evaluation of tea tree oil microemulsion gel [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2015, 46(13): 1892-1900.
- [16] 彭金飞, 向大雄. 复方莪术油微乳凝胶的制备及初步质量评价 [J]. 中南药学, 2018, 16(11): 1542-1546.
Peng J F, Xiang D X. Preparation and quality evaluation of compound zedoary turmeric oil microemulsion gel [J]. Central South Pharm, 2018, 16(11): 1542-1546.
- [17] 张娟娟, 傅翔, 朱全刚, 等. 滚轮微针处理次数对药物皮肤渗透、分布及皮肤刺激性的影响 [J]. 药学实践杂志, 2019, 37(5): 416-421.
Zhang J J, Fu X, Zhu Q G, et al. Effects of microneedle-roller insertion times on skin permeation characteristics, drug distribution and skin irritation [J]. J Pharm Pract, 2019, 37(5): 416-421.
- [18] 林珈好. 丹参酮II_A、丹酚酸B与甘草次酸复方脂质体构建及体内评价研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2014.
Lin J H. Development of salvianolic acid B-tanshinone II_A-glycyrrhetic acid compound liposomes: Formulation optimization and study on its *in vivo* and *in vitro* evaluation [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2014.
- [19] 李越, 刘悦, 王晓杰, 等. 基于"药辅合一"制备紫黄乳膏及其对大鼠II度烫伤的修复作用 [J]. 现代中药研究与实践, 2020, 34(2): 9-14.
Li Y, Liu Y, Wang X J, et al. Preparation of zihuang emulsifiable paste based on 'drugs-supplements combination' and its pharmacodynamic study on second degree scald in rats [J]. Res Pract Chin Med, 2020, 34(2): 9-14.
- [20] 王颖娟, 张培, 李子忠. 蚁狮多糖对小鼠炎症模型影响的实验研究 [J]. 四川动物, 2016, 35(2): 266-269.
Wang Y J, Zhang P, Li Z Z. Effects of antlion polysaccharide on different inflammation models of mice [J]. Sichuan J Zool, 2016, 35(2): 266-269.
- [21] 姜守国. 溢水法测量末端肢体肿胀程度 [J]. 医学研究通讯, 1990, 19(10): 32-33.
Jiang S G. The swelling degree of extremity was measured by overflow method [J]. China Civ Eng J, 1990, 19(10): 32-33.
- [22] 陆翼, 纪薇, 张淼, 等. 中医药治疗痤疮作用机制的研究进展 [J]. 科技风, 2020(33): 151-152.
Lu Y, Ji W, Zhang M, et al. Research progress on the mechanism of traditional Chinese medicine in treating acne [J]. Technol Wind, 2020(33): 151-152.
- [23] 杨彦洁. 中药治疗寻常性痤疮的文献分析及中医药内外科结合治疗痤疮的临床研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2014.
Yang Y J. Literature analysis on the treatment of acne vulgaris with traditional Chinese medicine and clinical study on the treatment of acne vulgaris with internal and external combination of traditional Chinese Medicine [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2014.
- [24] 陈梦瑶. 中药消痤汤对痤疮患者皮肤生理指标的影响 [J]. 皮肤病与性病, 2020, 42(4): 539-540.
Chen M Y. Effect of Xiaocuo Decoction on skin physiological indexes of acne patients [J]. J Dermatol Venereol, 2020, 42(4): 539-540.
- [25] 曾彩雯, 夏春华, 熊玉卿. 丹参及其制剂主要效应组分的药代动力学研究进展 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2011, 16(2): 237-240.
Zeng C W, Xia C H, Xiong Y Q. Progress in studies of the pharmacokinetics of Danshen and its preparations' main effect components [J]. Chin J Clin Pharmacol Ther, 2011, 16(2): 237-240.
- [26] 原景, 杜韩, 万梅绪, 等. 丹参有效成分及丹参类制剂抗炎药理作用的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2021, 44(11): 2322-2332.

- Yuan J, Du H, Wan M X, et al. Research progress on anti-inflammatory pharmacological action of components of *Salvia miltiorrhiza* and its preparations [J]. Drug Eval Res, 2021, 44(11): 2322-2332.
- [27] 冯科冉, 李伟霞, 王晓艳, 等. 丹参化学成分、药理作用及其质量标志物(Q-Marker)的预测分析 [J]. 中草药, 2022, 53(2): 609-618.
- Feng K R, Li W X, Wang X Y, et al. Chemical components and pharmacological action for *Salviae Miltiorrhizae Radix* et *Rhizoma* and predictive analysis on quality markers [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2022, 53(2): 609-618.
- [28] 罗子宸, 张雯, 杨瑞, 等. 甘草"调和诸药"生物药剂学机制的研究进展 [J]. 中草药, 2021, 52(1): 267-277.
- Luo Z C, Zhang W, Yang R, et al. Research progress on biopharmaceutical mechanism of *Glycyrrhiza uralensis* "moderating property of herbs" [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2021, 52(1): 267-277.
- [29] 王若宁, 柳雨影, 陈健, 等. 甘草酸、甘草次酸的抗肿瘤机制及其作为药物递送载体的研究进展 [J]. 中草药, 2019, 50(23): 5876-5886.
- Wang R N, Liu Y Y, Chen J, et al. Antitumor mechanism of glycyrrhizic acid and glycyrrhetic acid and their application as drug delivery carriers [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2019, 50(23): 5876-5886.
- [30] 鲁洋, 程祝强, 金毅, 等. 微针透皮递药系统研究进展 [J]. 中国药学杂志, 2018, 53(12): 945-950.
- Lu Y, Cheng Z Q, Jin Y, et al. Research updates on microneedle-based transdermal drug delivery systems [J]. Chin Pharm J, 2018, 53(12): 945-950.
- [31] 李伟泽, 张寒, 韩文霞, 等. 实体微针透皮给药的安全性研究 [J]. 中国药学杂志, 2011, 46(23): 1818-1822.
- Li W Z, Zhang H, Han W X, et al. Study on the safety of solid microneedles for transdermal drug delivery [J]. Chin Pharm J, 2011, 46(23): 1818-1822.
- [32] 陈丹洋, 吴小蔚. 微针在美容整形外科应用中的进展 [J]. 安徽医药, 2018, 22(1): 12-16.
- Chen D Y, Wu X W. Application of microneedle in esthetic and plastic surgery [J]. Anhui Med Pharm J, 2018, 22(1): 12-16.

[责任编辑 兰新新]