

积雪草总苷脂质体的制备及体外透皮研究

闫 丹^{1,2}, 江敏瑜^{1,2}, 王云红², 张 琳^{1,2}, 张传辉^{2*}, 杨荣平^{1,3*}

1. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137

2. 重庆市中药研究院, 重庆 400065

3. 西南大学药学院, 重庆 400715

摘要: 目的 优化积雪草总苷(CTG)脂质体的制备工艺, 并考察其体外透皮特性规律。方法 采用逆相蒸发法, 以羟基积雪草苷、积雪草苷的包封率为评价指标, 通过单因素考察结合 Box-Behnken 效应面法优化 CTG 脂质体的制备工艺, 并对其表面特征、包封率、粒径、Zeta 电位、体外释放度及体外透皮性能进行考察。结果 最佳处方为卵磷脂-胆固醇的质量比 4:1, 卵磷脂-CTG 的质量比 23.22:1, 有机相-水相的体积比 7:1。所得脂质体形态呈球型, 表面圆整、无粘连; 平均粒径 201.7 nm; Zeta 电位-15.7 mV; 羟基积雪草苷、积雪草苷的平均包封率为 75.85%、84.94%; 羟基积雪草苷、积雪草苷体外 12 h 累积释放率分别为 52.10%、45.97%; 脂质体中羟基积雪草苷、积雪草苷的透皮速率拟合方程分别为 $Q=67.93 t^{1/2}-50.34$, $R^2=0.988$, $Q=139.74 t^{1/2}-241.2$, $R^2=0.987$; 皮肤滞留量分别为 76.0、48.7 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 相对原料药溶液提高到 1.56 和 1.18 倍。结论 优选的制备工艺合理可行、稳定性好, 所得 CTG 脂质体包封率高、粒径小、皮肤滞留量大、缓释作用明显。

关键词: 积雪草总苷; 脂质体; Box-Behnken 效应面法; 包封率; 透皮特性

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)09-2041-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.09.010

Preparation and *in vitro* transdermal diffusion characteristics of *Centella asiatica* total glucosides liposome

YAN Dan^{1,2}, JIANG Min-yu^{1,2}, WANG Yun-hong², ZHANG Lin^{1,2}, ZHANG Chuan-hui², YANG Rong-ping^{1,3}

1. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. Chongqing Academy of Chinese Traditional Materia Medica, Chongqing 400065, China

3. College of Pharmacy, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: Objective To optimize the preparation technology for *Centella asiatica* total glucosides (CTG) liposome and to investigate its percutaneous permeability *in vitro*. **Methods** Liposomes were prepared by reverse-phase evaporation technique. Taking the entrapment efficiency of madecassoside and asiaticoside as indexes, the preparation of liposome was optimized by using single factor and Box-Behnken response surface method. The properties of liposomes including morphology, entrapment efficiency, mean diameter, Zeta potential, and accumulative release were studied. **Results** The optimal formulation was lecithin-cholesterol (4:1), lecithin-CTG (23.22:1), and organic-aqueous (7:1). The liposome was smooth and spherical in appearance, mean diameter, and Zeta potential were 201.7 nm and -15.7 mV, respectively. The entrapment efficiency of madecassoside and asiaticoside were 75.85% and 84.94%. The *in vitro* 12 h accumulative release was 52.10% and 45.97%. The equations for the permeation rate of madecassoside and asiaticoside in liposomes were $Q=67.93 t^{1/2}-50.34$, $R^2=0.988$, $Q=139.74 t^{1/2}-241.2$, $R^2=0.987$, respectively. The retention amount in the skin was 76 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ and 48.7 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, which were 1.56 and 1.18 times higher than those of solution. **Conclusion** The optimized process is rational, feasible, and good stability. The CTG liposome prepared in this study have the smaller size, the higher encapsulation efficiency, higher retain in skin and obvious sustained-release effects.

收稿日期: 2017-11-22

基金项目: 重庆市科委应用开发重大项目 (cstc2014yykfC10006)

作者简介: 闫 丹 (1991—), 女, 硕士生, 从事中药新制剂、新剂型及新技术的研究与应用。Tel: 15184386317 E-mail: 843920587@qq.com

*通信作者 杨荣平, 博士, 研究员, 硕士研究生导师, 从事中药新制剂、新剂型及新技术的研究与应用。

Tel: (029)89029068 E-mail: yangrp@cqaqmm.com

张传辉, 硕士, 助理研究员, 从事中药新制剂、新剂型及新技术的研究与应用。Tel: (029)89029068 E-mail: sdutcm20084@163.com

Key words: *Centella asiatica* total glucosides; liposome; Box-Behnken response surface method; encapsulation efficiency; transdermal characteristics

积雪草总苷 (*Centella asiatica* total glucosides, CTG) 是伞形科积雪草属植物积雪草 *Centella asiatica* (L.) Urban. 的提取物, 有效成分为三萜皂苷及其衍生物类, 其中以积雪草苷、羟基积雪草苷的含量最高, 活性最强^[1-4]。现代药理研究表明, CTG 不仅能够促进细胞生长, 加速伤口愈合, 修复皮肤损伤, 还具有抗氧化、抗溃疡、消炎以及保护神经细胞^[5-6]等作用。临床上常用于手术创伤、烧伤, 增生性疤痕等疾病的治疗^[7-9]。但由于 CTG 中多为极性大分子, 不容易透过皮肤表皮到达病变部位, 单纯的促渗不能完全达到治疗疾病的目的^[10-11]。

将药物包封于脂质体中, 不仅可以发挥良好的促透作用, 还可使药物尽可能少的进入血液循环, 集中于皮肤病灶, 形成药物贮库, 缓释药物, 是理想化的皮肤局部给药载体。与普通外用制剂相比, 脂质体可以增加药物的治疗指数, 减少给药次数及剂量, 提高患者的顺应性^[12-13]。本研究在前期基础上, 采用单因素结合 Box-Behnken 效应面法优化 CTG 脂质体的制备工艺, 并对其理化性质及体外透皮特性进行考察, 以期为 CTG 外用制剂的研究奠定基础。

1 仪器与材料

岛津 20A 系列高效液相色谱仪, 包括二元泵、在线脱气、DAD 检测器、自动进样器、柱温箱, 日本岛津公司; AUW220D 型电子天平 (十万分之一)、AW220 型电子天平 (万分之一), 日本岛津公司; TD3 台式离心机, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; RE-2000A 旋转蒸发器, 上海贤德实验仪器有限公司; SB-5200D 超声波清洗器, 宁波新艺超声设备有限公司; Zen-3600 型激光散射粒度仪, 英国 Malvern 公司; Merlin 扫描电子显微镜, 德国 Zeiss 公司; 透析袋, 截留相对分子质量 8 000~14 000, 美国联合碳化公司; 超滤离心管, 截留相对分子质

量 10 000, 美国 Milipore 公司; TP-3A 智能药物透皮扩散仪, 河南佳创仪器设备有限公司。

对照品羟基积雪草苷 (批号 20160821C, 质量分数 99.78%)、积雪草苷 (批号 20160411C, 质量分数 98.53%) 购于 PureChemLand Inc.; CTG 样品, 西安通泽科技股份有限公司, 批号 20161120, 总苷质量分数 >80%; 蛋黄卵磷脂 (PL-100M), 上海艾韦特医药科技有限公司, 批号 EK16033; 胆固醇, 上海泰坦科技股份有限公司, 批号 P1190444; β -环糊精, 批号 JN1123RA13, 上海源叶生物科技有限公司; 乙腈、甲醇为色谱纯, 水为自制超纯水, 其他试剂均为分析纯。

昆明种小鼠, 雄性, 由重庆市中药研究院实验动物中心提供, 合格证号为 SCXK (渝) 2016-0009。

2 方法与结果

2.1 HPLC 定量方法的建立

2.1.1 供试品溶液的制备 精密移取 CTG 脂质体 0.5 mL, 置于 5 mL 量瓶中, 用甲醇破乳并定容至刻度, 超声处理 2 min, 用 0.22 μ m 滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.1.2 对照品溶液的制备 取积雪草苷、羟基积雪草苷对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成各含 0.2 mg/mL 的对照品溶液, 即得。

2.1.3 色谱条件 色谱柱为 Sepax Bio-C₁₈ 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相为乙腈-2 mmol/L β -环糊精水溶液 (22:78), 等度洗脱 40 min, 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 30 $^{\circ}$ C, 检测波长 205 nm; 理论塔板数不低于 4 000。上述色谱条件下, 各成分分离度良好, 色谱图见图 1。

2.1.4 线性关系考察 分别取积雪草苷、羟基积雪草苷对照品溶液适量, 用甲醇分别稀释成系列质量浓度混合对照品溶液, 其中羟基积雪草苷分别为 1.008、0.504、0.252、0.126、0.063、0.031、0.016

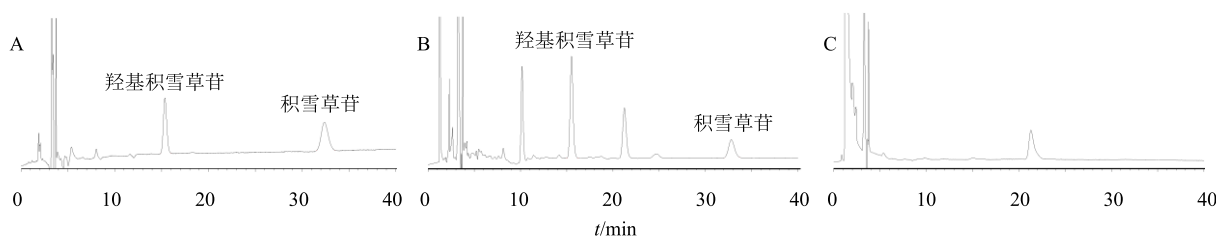


图 1 混合对照品 (A)、CTG 脂质体 (B) 和空白脂质体 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of mixed reference substances (A), CTG liposomes (B), and negative sample (C)

mg/mL, 积雪草苷分别为 1.028、0.514、0.257、0.128、0.064、0.032、0.016 mg/mL。精密吸取上述混合对照品溶液 10 μ L, 进样, 按“2.1.3”项下色谱条件测定峰面积。以峰面积积分值 (Y) 对进样量 (X) 进行线性回归, 得回归方程: 羟基积雪草苷为 $Y=192\ 779 X-2.157\ 2$, $r=0.999\ 9$; 积雪草苷为 $Y=227\ 844 X-6.873\ 9$, $r=0.999\ 9$ 。结果表明羟基积雪草苷在 0.16~10.08 μ g、积雪草苷在 0.16~10.28 μ g 有良好的线性关系。

2.1.5 精密度试验 按照“2.1.3”项下色谱条件, 精密吸取同一对照品溶液 (羟基积雪草苷、积雪草苷质量浓度分别为 1.008、1.028 mg/mL) 10 μ L, 连续进样 6 次, 记录峰面积, 结果羟基积雪草苷、积雪草苷峰面积的 RSD 分别为 1.69%、1.57%, 表明仪器精密度良好。

2.1.6 重复性试验 按照“2.1.1”项下方法取同一批号脂质体 6 份制备供试品溶液, 按照“2.1.3”项下色谱条件, 进样测定, 计算质量分数。结果羟基积雪草苷、积雪草苷的 RSD 分别为 1.81%、1.304%, 表明供试品溶液制备方法重复性良好。

2.1.7 稳定性试验 分别精密吸取“2.1.1”项下方法制备的同一批号脂质体供试品溶液各 10 μ L, 按照“2.1.3”项下相应的色谱条件于 0、4、8、12、16、24 h 注入液相色谱仪, 记录峰面积。结果积雪草苷、羟基积雪草苷的 RSD 分别为 0.36%、0.78%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.1.8 加样回收率试验 精密移取脂质体溶液 6 份, 精密加入积雪草苷 (114 μ g/mL)、羟基积雪草苷 (338 μ g/mL) 混合对照品溶液 0.5 mL, 按照“2.1.1”项下方法分别制备供试品溶液, 进样测定, 计算积雪草苷平均加样回收率为 99.7%, RSD 为 1.33%; 羟基积雪草苷平均加样回收率为 102.6%, RSD 为 1.75%, 结果表明该方法的加样回收率符合要求。

2.2 CTG 脂质体包封率的测定

取 CTG 脂质体, 加入甲醇破乳, 0.22 μ m 滤膜滤过, 取续滤液测定脂质体的总药物量 ($W_{总}$)。采用超滤离心管分离脂质体和游离药物, 另取 CTG 脂质体于超滤离心管内, 4 000 r/min 离心 20 min, 取外管溶液, 测定游离药物量 ($W_{游}$)。按下式计算包封率。

$$\text{包封率} = 1 - W_{游}/W_{总}$$

2.3 CTG 脂质体制备方法的筛选

2.3.1 薄膜分散法 称取卵磷脂 200 mg、胆固醇

50 mg, 氯仿溶解, 旋转蒸发至形成均匀脂质薄膜。继续抽真空 20 min 除尽有机溶剂。加入 CTG 的水溶液振荡水合 1 h 使薄膜脱落。冰水浴超声至形成脂质体混悬液。结果积雪草苷、羟基积雪草苷的包封率分别为 65.50%、56.79%。

2.3.2 乙醇注入法 称取卵磷脂 200 mg、胆固醇 50 mg, 无水乙醇溶解, 缓慢匀速滴入 CTG 的水溶液, 300 r/min 恒温搅拌 1 h, 旋蒸除乙醇, 冰水浴超声得 CTG 脂质体。结果积雪草苷、羟基积雪草苷的包封率分别为 61.77%、52.51%。

2.3.3 逆相蒸发法 称取卵磷脂 200 mg、胆固醇 50 mg, 溶于氯仿, 加入 CTG 的水溶液, 冰水浴超声, 形成均匀乳剂。旋转蒸发至形成凝胶状态, 加入适量水溶液, 继续旋蒸 1 h 使胶体脱落。冰水浴超声即得脂质体。结果积雪草苷、羟基积雪草苷的包封率分别为 74.11%、60.05%。

以上 3 种方法以逆相蒸发法制备的脂质体具有较大的水容积, 适合于水溶性药物的包封^[15], CTG 脂质体的包封率最高, 故选择逆相蒸发法用于 CTG 脂质体的制备。

2.4 CTG 脂质体处方的单因素考察

2.4.1 卵磷脂-胆固醇的质量比 固定卵磷脂-CTG 的质量比为 20:1, 有机相-水相的体积比为 5:1, 水化介质为 2 mL 超纯水, 选取卵磷脂-胆固醇的质量比分别为 2:1、3:1、4:1、5:1、6:1 制备脂质体, 结果见表 1。结果表明, 随着卵磷脂用量的增加, 2 种成分的包封率均呈先增大后减小的趋势; 当卵磷脂-胆固醇的质量比较小时 (2:1、3:1), 在水化阶段, 胶体脱落困难, 放置过夜脂质体溶液产生絮凝沉淀现象, 提示卵磷脂-胆固醇的质量比在 4:1~8:1 时具有较好的稳定性。

2.4.2 卵磷脂-CTG 的质量比 固定卵磷脂-胆固醇

表 1 卵磷脂-胆固醇的质量比对 CTG 包封率的影响

Table 1 Effect of lecithin-cholesterol mass ratio on CTG entrapment efficiency

卵磷脂-胆固醇质量比	包封率/%	
	积雪草苷	羟基积雪草苷
2:1	58.72	45.34
3:1	67.01	50.12
4:1	76.80	65.74
5:1	77.35	62.16
6:1	73.23	59.87
8:1	70.84	56.43

的质量比为 4:1, 有机相-水相的比为 5:1, 水化介质为 2 mL 超纯水, 选取卵磷脂-CTG 的质量比分别为 1:1、5:1、10:1、20:1、40:1 制备脂质体, 结果见表 2, 结果表明, 卵磷脂-CTG 的质量比是影响脂质体包封率的显著因素, 过大或过小包封率均较低, 其中卵磷脂-CTG 的质量比为 20:1 时, 脂质体包封率高。

2.4.3 有机相-水相的体积比 固定卵磷脂-胆固醇的质量比为 4:1, 卵磷脂-CTG 的质量比为 20:1, 水化介质为 2 mL 超纯水, 选取有机相-水相的比为 4:1、5:1、6:1、7:1、8:1 制备脂质体, 结果见表 3, 结果表明, 当有机相-水相的体积比在 5:1~7:1 时, 形成的乳剂较均一, 无分层现象, 且包封率高。

表 2 卵磷脂-CTG 的质量比对 CTG 包封率的影响

Table 2 Effect of lecithin-CTG mass ratio on CTG entrapment efficiency

卵磷脂-CTG 的质量比	包封率/%	
	积雪草苷	羟基积雪草苷
1:1	39.93	30.11
5:1	58.71	48.05
10:1	68.42	56.90
20:1	78.55	69.64
40:1	44.11	32.96

表 3 有机相-水相的体积比对 CTG 包封率的影响

Table 3 Effect of organic-aqueous volume ratio on CTG entrapment efficiency

有机相-水相的体积比	包封率/%	
	积雪草苷	羟基积雪草苷
4:1	71.39	61.91
5:1	78.26	68.85
6:1	82.11	71.37
7:1	80.79	76.33
8:1	73.90	64.84

2.5 CTG 脂质体的处方优化

为进一步优化 CTG 脂质体处方, 在单因素考察的基础上, 选取卵磷脂-胆固醇的质量比 (A)、卵磷脂-CTG 的质量比 (B)、有机相-水相的体积比 (C) 3 个显著变量, 以积雪草苷、羟基积雪草苷的包封率 (Y_1 、 Y_2) 为响应值, 采用 Box-Behnken 效应面法进行优化设计, 通过 Design-Expert 软件对实验结果进行响应面分析, 试验安排及结果见表 4, 方差

分析见表 5。

2.5.1 模型拟合 采用 Design-Expert 软件对数据进行分析处理, 以评价指标 Y_1 、 Y_2 对自变量进行模型拟合处理, 以相关系数 (R^2) 和置信度 (P) 为拟合模型评价。得二次多项回归方程: $Y_1 = -27.54 + 11.77 A - 0.74 B + 23.46 C - 0.03 AB - 1.92 AC +$

表 4 响应面分析方案和试验结果

Table 4 Project and results of response surface analysis

试验号	A	B	C	Y_1 /%	Y_2 /%
1	6:1 (0)	27:1 (+1)	7:1 (+1)	77.91	67.38
2	4:1 (-1)	27:1	6:1 (0)	75.52	63.01
3	6:1	15:1 (0)	6:1	75.01	64.04
4	8:1 (+1)	15:1	5:1 (-1)	68.03	59.09
5	8:1	3:1 (-1)	6:1	54.90	42.41
6	4:1	15:1	5:1	69.82	50.14
7	6:1	15:1	6:1	73.11	61.50
8	6:1	27:1	5:1	60.97	49.54
9	6:1	15:1	6:1	72.32	59.90
10	4:1	3:1	6:1	68.51	54.93
11	6:1	15:1	6:1	76.61	58.90
12	6:1	15:1	6:1	72.02	65.20
13	6:1	3:1	5:1	62.21	50.25
14	8:1	15:1	7:1	65.44	52.54
15	8:1	27:1	6:1	59.50	52.52
16	4:1	15:1	7:1	82.63	74.31
17	6:1	3:1	7:1	55.62	43.12

表 5 方差分析

Table 5 Analysis of variance

方差来源	自由度	Y_1			Y_2		
		平方和	F 值	P 值	平方和	F 值	P 值
模型	9	988.37	19.28	0.000 4	1 143.31	17.44	0.000 5
A	1	294.76	51.74	0.000 2	160.38	22.02	0.002 2
B	1	132.11	23.19	0.001 9	217.67	29.88	0.000 9
C	1	52.99	9.30	0.018 6	100.32	13.77	0.007 5
AB	1	1.51	0.27	0.622 2	1.04	0.14	0.716 7
AC	1	59.44	10.43	0.014 4	235.93	32.39	0.000 7
BC	1	138.89	24.38	0.001 7	155.88	21.40	0.002 4
A ²	1	3.83	0.67	0.439 5	5.27	0.72	0.423 1
B ²	1	285.24	50.07	0.000 2	241.04	33.09	0.000 7
C ²	1	8.14	1.43	0.270 8	13.06	1.79	0.222 4
残差	7	39.88			50.99		
失拟值	3	24.88	2.21	0.229 2	22.53	1.06	0.460 4
纯误差	4	15.00			28.46	7.12	

$0.49 BC - 0.24 A^2 - 0.06 B^2 - 1.39 C^2$, $Y_2 = -127.24 + 23.84 A - 1.24 B - 39.91 C + 0.02 AB - 3.84 AC + 0.52 BC - 0.27 A^2 - 0.05 B^2 - 1.76 C^2$, 拟合方程中各项系数绝对值的大小直接反映了各因素对相应值的影响程度,系数的正负反映了其影响的方向。由方程可知制备工艺的影响顺序为有机相-水相的体积比>卵磷脂-胆固醇的质量比>卵磷脂-CTG 的质量比。由拟合结果可知模型 R^2 ($R_1^2=0.961\ 2$, $R_2^2=0.957\ 3$) 均大于 0.95, 说明实测值与预测值间有高度相关性,能够准确地预测实际情况;校正决定系数 R_{adj}^2 ($R_{1adj}^2=0.911\ 3$, $R_{2adj}^2=0.907\ 3$), 说明该实验误差较小,操作可信;模型 P 值均小于 0.01, 该模型拟合度较高,极具统计学意义。失拟项 P 值大于 0.05, 模型失拟不显著,该回归方程能较好的拟合真实的效应面,可用来反映卵磷脂-胆固醇的质

量比、卵磷脂-CTG 的质量比、有机相-水相的体积比对脂质体包封率的影响,模型可用于优化 CTG 脂质体的制备工艺。

2.5.2 参数预测和工艺优化 通过多元回归方程作等高线及三维效应曲面图,预测 CTG 脂质体的最佳处方配比,结果模型 Y_1 、 Y_2 见图 2。从回归系数显著性检验结果可知:在模型 Y_1 中: A ($P=0.000\ 2$)、 B ($P=0.001\ 9$)、 C^2 ($P=0.000\ 2$)、 BC ($P=0.001\ 7$) 项极显著, C ($P=0.018\ 4$)、 AC ($P=0.014\ 4$) 显著,其他项均不显著;模型 Y_2 中: A ($P=0.002\ 2$)、 B ($P=0.000\ 9$)、 C^2 ($P=0.000\ 2$)、 BC ($P=0.002\ 4$)、 C ($P=0.007\ 5$)、 AC ($P=0.000\ 7$) 项极显著,其他项均不显著;由此可知,各因素对响应值的影响并非简单的线性关系,所选因素间存在交互作用。

效应面的等高线图和三维效应曲面图可以直观

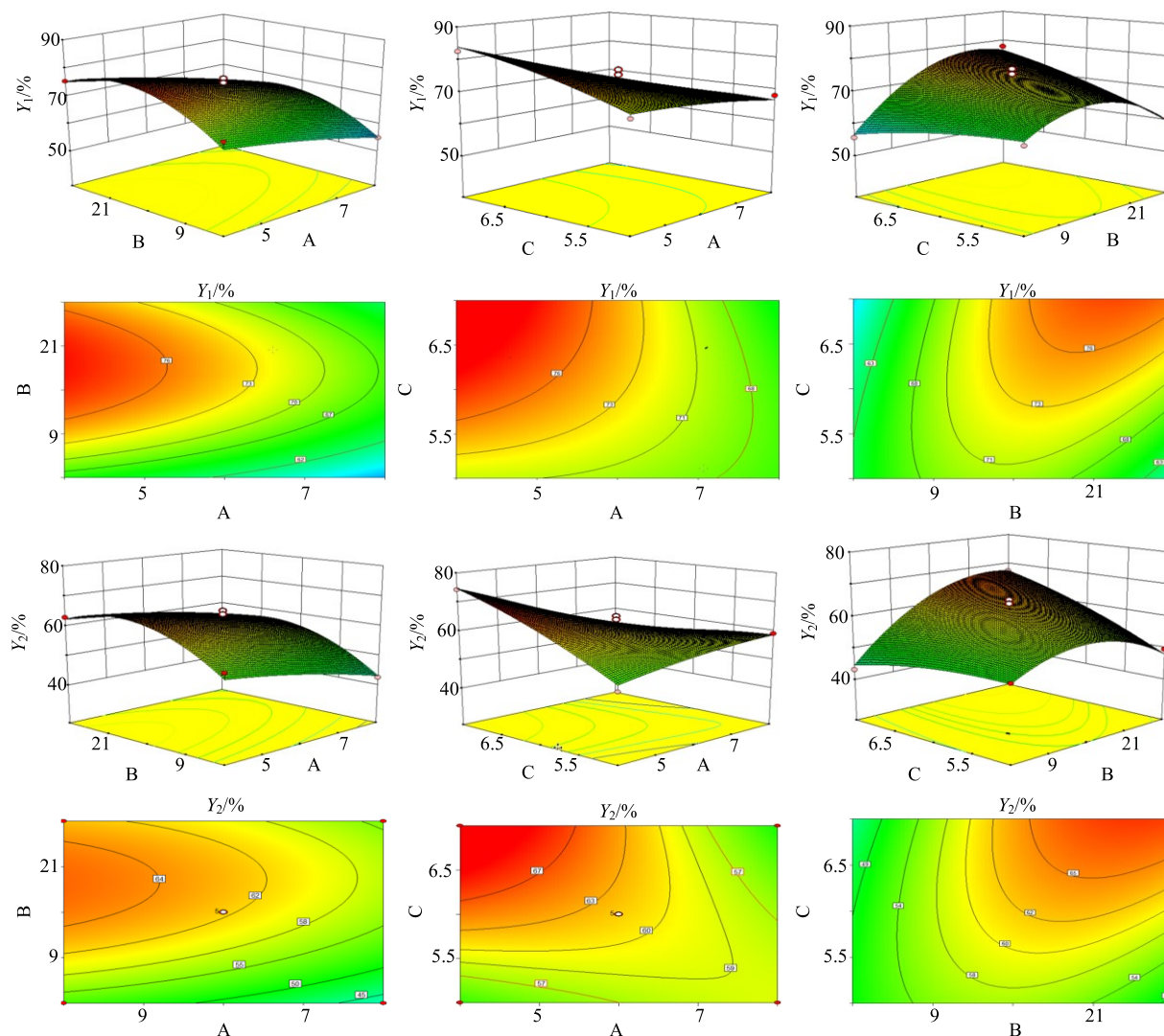


图 2 各因素的交互作用对 Y_1 和 Y_2 影响的等高线图及三维效应面图

Fig. 2 3D response surface and contour plots of effect of various factors on Y_1 and Y_2

地反映因素间交互作用的强弱及最优条件下各因素的取值。等高线呈椭圆形且较越密集, 则表明影响因素对响应值的影响大, 交互作用强; 响应面 3D 图越弯曲、陡峭, 表明交互作用越明显^[15-16]。模型 Y_1 中, AC、BC 效应面等高线图呈椭圆形交互作用强, 但 BC 效应面 3D 图曲面弯曲程度稍大, BC 为影响积雪草苷包封率的主要交互因素。模型 Y_2 中, AC 效应面等高线图呈椭圆形, 且 3D 图曲面坡度陡峭, 表明 AC 对羟基积雪草苷包封率交互作用最强。Design-Expert 软件优选出最佳脂质体制备处方: 卵磷脂-胆固醇的质量比 4:1, 卵磷脂-CTG 的质量比 23.22:1, 有机相-水相的体积比 7:1。

2.6 验证试验

按最优制备工艺制备 3 批 CTG 脂质体, 测定 2 种成分的包封率, 积雪草苷实测包封率为 86.58%、84.64%、83.61%, 平均值为 84.94%, RSD 为 1.51%, 该成分预测值为 87.30%; 羟基积雪草苷实测包封率为 75.79%、78.14%、75.85%, 平均值为 75.85%, RSD 为 2.26%, 预测值为 78.67%。各指标的实测值与预测值接近, 相对偏差低于 3%, 表明该模型具有良好的预测性, 且工艺稳定可行。

2.7 CTG 脂质体形态、粒径和 Zeta 电位测定

采用扫描电子显微镜观察 CTG 脂质体的形态,

取脂质体适量, 稀释至适当浓度, 滴少量于载玻片上, 在室温下自然风干, 然后真空镀金后, 观察其形态。采用激光粒度仪测脂质体平均粒径分布及 Zeta 电位。见图 3, 结果表明脂质体呈类球型, 表面圆整, 无粘连, 其粒径为 201.7 nm, Zeta 电位为 -15.7 mV。

2.8 CTG 脂质体体外释放度测定

采用《中国药典》2015 年版四部溶出度与释放度测定法中第三法(小杯法)进行测定, 相关参数: 温度 37.5 °C、转速 120 r/min、释放介质为脱气的生理盐水 100 mL。精密移取 CTG 脂质体混悬液及原料药溶液各 6 mL 分别置于处理好的透析袋内, 扎紧并绑于溶出仪搅拌桨上, 分别于 1、2、3、4、5、6、7、8、10、12 h 定位吸取溶液 2 mL (同时补充同温介质 2 mL) 过微孔滤膜后, HPLC 法进样检测, 计算样品各时间点的累积释放率 (Q), 并对时间 t 作图, 见图 4。结果表明, 脂质体中羟基积雪草苷、积雪草苷体外 12 h Q 分别为 52.10%、45.97%; 有明显的缓释效果, 与之相比, 游离药物 7 h 内几乎释放完全。

2.8.1 离体皮肤的制备 用 8% Na_2S 溶液脱去小鼠腹部的毛发, 24 h 后将小鼠处死, 剥离腹部皮肤, 用生理盐水洗净, 置生理盐水中, 于 4 °C 保存。

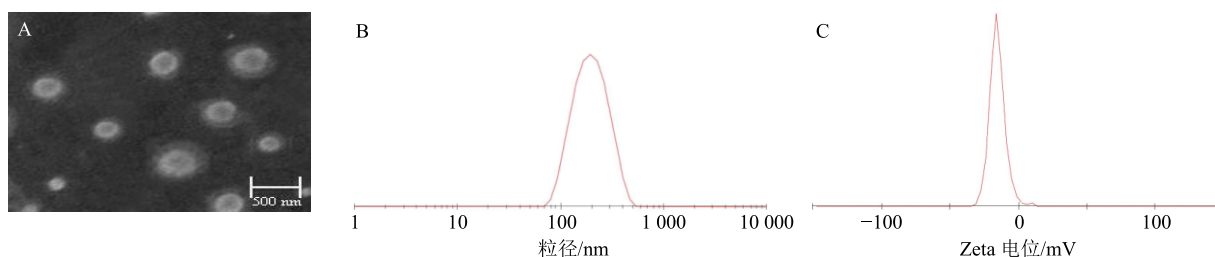


图 3 CTG 脂质体的电镜图 (A)、粒径分布 (B) 和 Zeta 电位 (C)

Fig. 3 Electron photomicrograph (A), size distribution (B), and Zeta potential (C) of CTG liposome

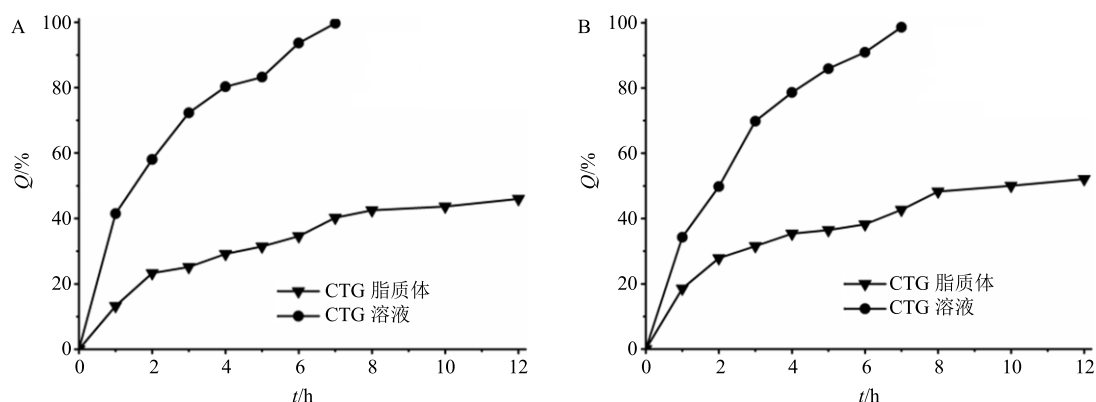


图 4 羟基积雪草苷 (A) 和积雪草苷 (B) Q - t 曲线

Fig. 4 Q - t Curve of madecassoside (A) and asiaticoside (B) infiltration

2.8.2 体外透皮实验 采用 Franz 扩散池法, 进行体外透皮试验。将“2.8.1”项下皮肤固定于扩散池供给室与接收室之间, 分别精密移取 CTG 脂质体混悬液、原料药溶液 2 mL 于皮肤表面, 接收池加入 20%乙醇-生理盐水, 排净气泡使真皮一侧与接收液完全接触。水浴温度为 32 ℃, 磁力搅拌速度 200 r/min。分别于 4、8、12、16、20、24 h, 取出接收介质 2 mL, 同时向接收池中补加等量的新鲜接收介质。取出的接收介质经 0.22 μm 微孔滤膜滤过后, 测定含量。以 $Q_n = (V_{\text{总}} C_n + \sum C_{n-1} V_{\text{取}}) / A$ (Q_n 为累积透皮量, $V_{\text{总}}$ 为接收池体积, C_n 为该次取样测定浓度, $V_{\text{取}}$ 为每次取样体积, A 为渗透面积) 计算单位面积累积透皮量 (Q_n), 以 Q_n-t 作图, 见图 5, 并对 Q_n-t 透皮吸收速率曲线进行模型拟合, 结果积雪草苷、羟基积雪草苷在水溶液中符合零级释药模型, 透皮速率拟合方程分别为 $Q = 28.50 t - 58.87$, $R^2 = 0.995$; $Q = 16.46 t - 37.01$, $R^2 = 0.983$; 积雪草苷、羟基积雪草苷脂质体符合 Higuchi 释药模型, 透皮速率拟合方程分别为 $Q = 139.74 t^{1/2} - 241.2$, $R^2 = 0.987$; $Q = 67.93 t^{1/2} - 50.34$, $R^2 = 0.988$ 。结果表明, CTG 脂质体 2 种成分透皮速率较小于原料药溶液, 脂质体组表现出明显的缓释性。

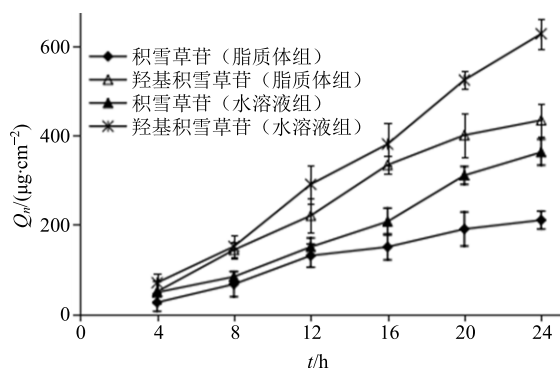


图 5 羟基积雪草苷和积雪草苷 Q_n-t 曲线

Fig. 5 Curve of madecassoside and asiaticoside cumulative penetration amount

2.8.3 皮肤滞留量实验 取 CTG 脂质体混悬液、原料药溶液, 按“2.8.2”项下方法进行透皮实验, 分别在 4、8、12、16、20、24 h 取透皮实验给药后的皮肤, 轻轻拭净表面残留, 用打孔器打下半径 8 mm 的圆皮肤片, 剪碎, 加入生理盐水 0.5 mL 匀浆, 加入 1.0 mL 水饱和正丁醇, 涡旋 5 min, 13 000 r/min 离心 30 min, 分离有机层, 氮气吹干。残渣用 0.1 mL 甲醇溶解, 涡旋 5 min 混匀, 10 000 r/min 离心 15 min, 取上清液用 HPLC 法检测, 计算不同时间单

位面积皮肤滞留量 (Q_s , $Q_s = C_s \times 0.1 / A$; C_s 为第 n 个时间点测得的皮肤样品液中药物质量浓度, A 为渗透面积), 见图 6。结果表明, 经 24 h 透皮后, 脂质体组羟基积雪草苷、积雪草苷的 Q_s 分别为 76.0、48.7 μg/cm²; 水溶液组为 34.7、29.3 μg/cm²。经 24 h 透皮之后, 脂质体组 2 种有效成分的 Q_s 均高于水溶液对照组, 提示药物主要集中于皮肤病灶, 以贮库的形式产生缓释作用。

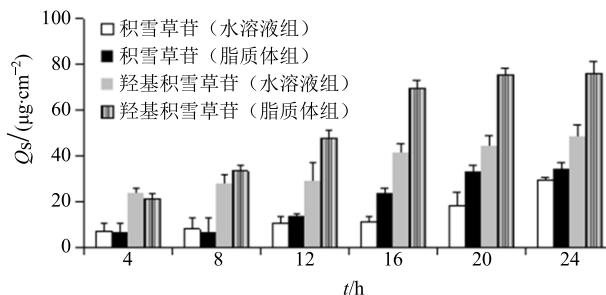


图 6 羟基积雪草苷和积雪草苷的 Q_s

Fig. 6 Q_s of madecassoside and asiaticoside

3 讨论

制备脂质体影响因素很多, 前期实验考察了卵磷脂-CTG 的质量比、卵磷脂-胆固醇的质量比、有机相的种类及用量、水化介质种类及用量、水化温度等因素对包封率影响, 发现脂材在氯仿中溶解效果最好, 且形成凝胶的过程中无起泡现象, 与水相混匀后超声可形成均一的乳剂, 故选择氯仿为有机相; 预试验用 PBS 缓冲液制备脂质体, 在水化阶段, 凝胶脱落不完全, 残留量大, 且放置过夜后出现分层现象, 故选择超纯水为水化介质; 水化温度考察了 40、50、60 ℃, 其中 50 ℃时所需的水化时间短, 凝胶易脱落且脂质体稳定性较好, 故选择 50 ℃为水化温度。在单因素筛选的基础上对影响较大的卵磷脂-CTG 的质量比、胆固醇-卵磷脂的质量比、有机相-水相体积比采用 Box-Behnken 效应面法进行优化试验, 得到最佳工艺参数, 并对最优处方进行验证, 相对偏差较小, 表明该回归模型可较好地预测 CTG 脂质体的包封率, 结果预测准确, 真实可靠。与目前普遍采用的正交和均匀设计优化工艺相比, Box-Behnken 效应面法可连续对试验各水平进行分析, 在反映各因素不同程度对制备工艺影响的同时, 还直观体现了因素间的交互作用, 具有实验精度高、预测性好的优势^[17-18]。

在分离游离药物与脂质体的过程中尝试采用透析法, 发现所需时间较长; 凝胶柱色谱法重现性差,

洗脱过程中会因为洗脱剂的稀释而出现药物泄露的现象;超滤离心法效果较好,且分离迅速,故采用超滤离心法测定 CTG 脂质体的包封率。

由体外透皮考察结果可知,羟基积雪草苷和积雪草苷的 Q_n-t 曲线具有相似性,其原因可能是两者的化学结构、性质和相对分子质量具有相似性^[19]。由图 5 可知,经皮给药前期,CTG 脂质体 2 种成分的透皮速率较原料药溶液无明显差异,随着时间的增加,脂质体透皮速率逐渐降低;皮肤滞留量实验表明脂质体组羟基积雪草苷、积雪草苷的 Q_s 分别为 76.0、48.7 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$;水溶液组为 34.7、29.3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$,相对提高到 1.56 和 1.17 倍。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 张蕾磊,王海生,姚庆强,等. 积雪草化学成分研究 [J]. 中草药, 2005, 36(12): 1761-1763.
- [3] 戴卫波,梅全喜,孔祥廉. 积雪草的化学成分与药理作用研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(6): 1566-1568.
- [4] 翁小香,黄文武,孔德云. 积雪草中三萜类成分及其药理活性研究进展 [J]. 中国医药工业杂志, 2011, 42(9): 710-716.
- [5] 冯旭,郭飞飞,赵龙,等. 积雪草酸药理作用及其结构修饰的研究进展 [J]. 中草药, 2014, 45(7): 1037-1042.
- [6] 王毅. 积雪草苷类化合物对神经系统药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2016, 39(1): 136-142.
- [7] Wan J, Gong X, Jiang R, et al. Antipyretic and anti-inflammatory effects of asiaticoside in lipopolysaccharide-treated rat through up-regulation of heme oxygenase-1 [J]. *Phytother Res Ptr*, 2013, 27(8): 1136-1142.
- [8] 祁少海,谢举临,利天增,等. 积雪草甙对烧伤增生性瘢痕作用的实验研究 [J]. 中华烧伤杂志, 2000, 16(1): 53-56.
- [9] Liu M, Dai Y, Li Y, et al. Madecassoside isolated from *Centella asiatica* herbs facilitates burn wound healing in mice [J]. *Planta Med*, 2008, 74(8): 809-815.
- [10] 薛冰心. 影响药物经皮吸收的客观因素 [J]. 中国现代医学杂志, 2010, 20(16): 2479-2483.
- [11] 翁骏. 积雪草苷及其类似物的吸收和代谢性质研究 [D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2006.
- [12] 王佳宇,郭成杰,袁瑞娟,等. 积雪草总苷脂质体的肠吸收特征研究 [J]. 中草药, 2015, 46(10): 1487-1492.
- [13] 彭向前,张鉴. 脂质体作为经皮局部给药载体的研究进展 [J]. 中国药事, 2005, 19(6): 358-360.
- [14] 苏瑾,王丹,胡孟洋,等. 山药总多糖脂质体的制备及表征 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(16): 18-21.
- [15] 程怡,吴琼,余秋强,等. Box-Behnken 效应面法优化多西他赛长循环脂质体处方 [J]. 中草药, 2012, 43(10): 1946-1950.
- [16] 张丹,廖芳,周洁,等. Box-Behnken Design-响应面优化法优化芍药总苷脂质体的制备工艺及体外释放研究 [J]. 中草药, 2015, 46(3): 359-364.
- [17] 张传辉,贾成友,李微,等. 三七接骨凝胶膏剂的制备及体外透皮特性研究 [J]. 中草药, 2015, 46(5): 654-664.
- [18] 马伟,尹莉芳,周建平,等. Box-Behnken 中心组合设计优化甘草酸二铵缓释片的处方 [J]. 中草药, 2008, 39(10): 1486-1490.
- [19] 邹节明,周艳林,吴敏菊. HPLC-ELSD 法测定三金片和三金胶囊中积雪草苷和羟基积雪草苷的含量 [J]. 药物分析杂志, 2005, 25(10): 1250-1252.