

雷公藤甲素阿魏酸醇质体的制备与评价

何良飞, 陶 玲, 管咏梅*, 陈丽华, 朱卫丰, 金 晨, 吴 璐

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 研究雷公藤甲素阿魏酸醇质体最佳制备工艺, 并考察其制剂性能和体外透皮特性。方法 MTT 法确定雷公藤甲素与阿魏酸的配伍比例。采用注入法制备雷公藤甲素阿魏酸醇质体, 在单因素实验结果的基础上, 采用 Box-Behnken 设计优化处方, 并对其粒径、包封率、电位、分析方法学及体外释放行为进行研究。采用改良的 Franz 扩散池进行醇质体的体外透皮实验。结果 雷公藤甲素与阿魏酸的配伍比例为 1:100。醇质体优化处方为乙醇体积分数为 20%, 磷脂质量分数为 2.2%, 超声时间为 90 s, 制备出的醇质体外观为澄清液体, 微有蓝色乳光, 平均粒径为 (46.75 ± 2.39) nm, Zeta 电位为 (-46.32 ± 3.76) mV, 包封率为 $(67.72 \pm 1.10)\%$ 。醇质体中阿魏酸、雷公藤甲素的体外透皮行为均符合 Higuchi 方程。结论 醇质体粒径小、分布均匀、稳定性良好, 有良好透皮吸收特性, 可为雷公藤有效成分的局部透皮制剂开发提供一定依据。

关键词: 雷公藤甲素; 阿魏酸; 醇质体; Box-Behnken 设计; 体外透皮; Higuchi 方程

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)12-2817-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.12.013

Preparation and evaluation of triptolide and ferulic acid ethosomes

HE Liang-fei, TAO Ling, GUAN Yong-mei, CHEN Li-hua, ZHU Wei-feng, JIN Chen, WU Lu

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

Abstract: Objective In order to optimize the preparation technology of triptolide and ferulic acid ethosomes and evaluate its characteristics of the *in vitro* transdermal penetration and the preparations performance using ethosome as carrier. **Methods** The compatibility ratio between triptolide and ferulic acid was determined by MTT. The triptolide and ferulic acid ethosomes were prepared with injection method based on the results of single factor experiments, Box-Behnken design was used to optimize the particle size, electric potential, and encapsulation efficiency (EE) of the ethosomes, and the *in vitro* release behavior prepared by the optimal formulation were studied. The *in vitro* transdermal absorption experiment was carried out in optimized Franz diffusion cells. **Results** The ratio of triptolide to ferulic acid was 1:100. The optimized prescription of the ethosomes was 20% ethanol, 2.2% phospholipid, 90 s ultrasonic time. The results showed that the appearance of the triptolide and ferulic acid ethosomes was clear liquid with blue opalescence in an average diameter of (46.75 ± 2.39) nm at potential of (-46.32 ± 3.76) mV, and the EE was $(67.72 \pm 1.10)\%$. The *in vitro* transdermal behaviors of ferulic acid and triptolide in the ethosomes were in line with the Higuchi equation. **Conclusion** The ethosomes has the advantages of small particle size, uniform distribution, good stability, and good transdermal absorption property, so as to provide the basis for the development of the transdermal preparation of the effective components of *Tripterygium wilfordii*.

Key words: triptolide; ferulic acid; ethosomes; Box-Behnken design; transdermal absorption; Higuchi equation

雷公藤甲素 (triptolide, TP) 又名雷公藤内酯醇, 作为雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f. 主要活性成分, 临床口服对于治疗类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 有明确的疗效^[1-3], 但作为主要的毒性成分, 因较强的肝肾毒性严重限制了

其临床应用^[4-8]。虽然目前存在的减毒方式众多, 包括传统的配伍减毒^[9-10]、炮制减毒^[9,11]以及现代的结构修饰减毒^[12]、剂型减毒^[13]等, 但都没有解决 TP 的毒性问题。

醇质体作为一种新的经皮给药载体, 制备工艺

收稿日期: 2018-05-20

基金项目: 国家自然科学基金 2014 年度地区基金资助项目 (81460607)

作者简介: 何良飞, 男, 在读硕士, 从事中药新制剂与新技术研究。Tel: (0791)87118614 E-mail: 2927742549@qq.com

*通信作者 管咏梅, 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事中药新制剂与新技术研究。Tel: (0791)87118614 E-mail: guanym2008@163.com

简单,可以包载各种类型的药物(包括水溶性、脂溶性、两亲性以及蛋白多肽类)^[14-15],且还具有包封率高、变形性好、皮肤刺激性小、透皮效果佳、皮肤滞留量大、可以进行细胞内传递药物等^[16-18]优点,使其在经皮给药过程中更加有效。本课题组前期研究表明^[13],雷公藤微乳凝胶外用治疗类风湿性关节炎效果明确,且不良反应如肝毒性、肾毒性及生殖毒性减少,文献调研也显示 TP 与阿魏酸配伍可能降低其毒性。本实验拟制备高渗透性 TP 阿魏酸醇质体,以降低 TP 的毒性并保证其疗效,以期新型透皮给药系统的研究提供参考和依据。

1 仪器与材料

1.1 材料

狗肾小管上皮细胞(MDCK 细胞),中国科学院细胞库;胎牛血清(FBS)、0.25% EDTA-胰蛋白酶, Gibco 公司;青霉素-链霉素、无钙镁 HBSS、DMSO、MTT, Solarbio 公司;高糖型 DMEM 培养基, Hyclone 公司;非必需氨基酸, Sigma 公司;大豆卵磷脂(LipoidS100),德国 Lipoid 公司;阿魏酸对照品,质量分数>98%,成都普菲德生物技术有限公司,批号 151103;TP 对照品,质量分数≥98%,四川省维克奇生物科技有限公司,批号 140813;冰醋酸,西陇科学股份有限公司,批号 160517;甲醇、乙腈,色谱纯,美国 Tedia 公司;乙醇,西陇科学股份有限公司,批号 161217。

1.2 仪器

Forma3111 二氧化碳培养箱,美国 Thermo 公司;SW-CJ-2F 双人双面超净工作台,苏州净化设备有限公司;TS100F,日本 Nikon 公司;QYC-Z00 恒温摇床,上海福玛实验设备有限公司;96 孔细胞培养板,美国 Corning 公司;T-25 细胞培养瓶,美

国 Corning 公司;细胞计数器,上海亚东生化仪器厂;1 000、200、50 μL 移液枪各 1 支, Thermo 公司;Agilent1260 型高效液相色谱仪,美国安捷伦科技有限公司;Malvern Nano-S 纳米粒度仪,英国马尔文公司;SIGMA3-18K 高速冷冻离心机,德国 SIGMA 公司;Nanosep[®] 10 kDa 离心超滤管,密理博中国有限公司;TT-6D Franz 扩散池,天津正通科技有限公司;4500 型三重四级杆质谱联用仪,美国 AB SCIEX 公司。

2 方法与结果

2.1 TP 阿魏酸配伍比例的确定

MDCK 细胞是一类常用于中药肾毒性研究的细胞^[19],取对数期 MDCK 细胞,以 $3 \times 10^4/\text{mL}$ 的密度接种于 96 孔板,每孔 100 μL ,24 h 后弃去培养液,用无钙镁的 HBSS 洗净,每孔加入培养液配制的一定比例 TP-阿魏酸 100 μL ,TP 共有 8 个质量浓度,为 1 000 ng/mL 倍比稀释至 7.812 5 ng/mL,每个质量浓度设置 6 个复孔,同时设置阴性对照组及空白组。细胞处理 24 h 后每孔加入 20 μL MTT,置 CO_2 培养箱继续温育 4 h 后弃去上清液,加入 150 μL DMSO 溶解蓝紫色结晶,摇床震荡 10 min 后,在酶标仪上以 490 nm 测定吸光度 A_{490} 值。按公式换算细胞存活率,细胞存活率 = $(A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{阴性}} - A_{\text{空白}})$,得不同配比下 MDCK 细胞的存活率(存活率大于 90%,即可认为无毒)结果见表 1,结合临床应用的载药量,故确定 TP 与阿魏酸的配伍比例为 1:100。

2.2 醇质体的制备

取处方量的卵磷脂、TP、阿魏酸及乙醇于西林瓶中,密封,35 $^{\circ}\text{C}$ 使其完全溶解;将水相密封于锥形瓶中,置于磁力搅拌器上,转速为 700 r/min,温

表 1 不同配伍比例下 MDCK 细胞的存活率

Table 1 Survival rate of MDCK cells in different compatibility proportion

TP 与阿魏 酸配比	细胞存活率/%							
	1 000 ng·mL ⁻¹	500 ng·mL ⁻¹	250 ng·mL ⁻¹	125 ng·mL ⁻¹	62.5 ng·mL ⁻¹	31.25 ng·mL ⁻¹	15.625 ng·mL ⁻¹	7.812 5 ng·mL ⁻¹
1:0	8.93	3.74	14.21	37.46	49.83	63.49	78.37	85.14
0:1	38.36	84.00	91.22	92.30	93.85	100.38	98.45	98.78
1:50	14.06	20.84	41.16	63.42	71.28	85.63	87.88	86.83
1:100	7.05	9.70	17.12	27.16	39.32	69.07	92.58	90.15
1:200	15.94	25.48	43.94	65.32	78.27	97.62	100.40	99.25
1:1 000	12.02	5.31	34.10	57.40	75.50	105.53	109.89	104.91
1:2 000	13.85	71.87	84.07	91.17	91.14	95.01	98.23	97.70

度设置为 35 ℃。将已经溶解均匀的有机相用注射器注入到水相中,注意缓慢匀速滴入,滴入完全后开始计时,继续水合 30 min 后冰浴探头式超声,过 0.22 μm 微孔滤膜,即得,4 ℃遮光密闭保存。

2.3 HPLC 测定醇质体中阿魏酸含量

2.3.1 色谱条件 色谱柱为菲罗门 C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-1%冰醋酸水溶液 (45:55); 体积流量 1 mL/min; 检测波长 321 nm; 柱温 35 ℃; 进样量 5 μL, 阿魏酸的相对保留时间为 6.8 min; 理论塔板数按阿魏酸计算不低于 10 000。

2.3.2 阿魏酸对照品溶液、醇质体供试品溶液、空白醇质体供试品溶液的配制

(1)对照品溶液:精密称取阿魏酸对照品 4.5 mg 置于 10 mL 量瓶中,用甲醇溶解定容,得质量浓度为 450 μg/mL 的阿魏酸对照品母液。

(2)供试品溶液:精密量取醇质体 0.5 mL 于 25 mL 量瓶内,加适量甲醇超声 10 min 使其破乳完全后用甲醇定容,即得供试品溶液。

(3)空白醇质体溶液:吸取空白醇质体 0.5 mL 于 25 mL 量瓶内,加适量甲醇超声 10 min 后用甲醇定容,即得空白醇质体溶液。

2.3.3 方法学考察 考察方法专属性、线性关系、精密度及加样回收、稳定性。在此色谱条件下方法专属性考察结果见图 1,表明醇质体中其他成分对阿魏酸的测定无干扰。阿魏酸在 0.18~90 μg/mL 与其峰面积呈良好的线性关系,其回归方程为 $Y=17.668X+5.0095$, $r=0.9999$,低、中、高 3 个质量浓度 (1.8、45、90 μg/mL) 的日内精密度的 RSD

最大 1.15%, 日间精密度的 RSD 最大 1.73%, 均小于 3%, 表明此方法精密度良好, 加样回收率分别为 94.13%、98.09%、97.92%, 6 份平行供试品溶液含量测定峰面积 RSD 为 1.49%, 24 h 内含量测定峰面积 RSD 为 1.86%。

2.4 包封率和粒径测定方法选择

2.4.1 采用离心超滤法测定醇质体的包封率 取适量阿魏酸配制成低、中、高质量浓度 (2、10、20 μg/mL) 的样品, HPLC 测定其峰面积, 另各取 0.5 mL 置于 Nanosep® 10 kDa 离心超滤管上端, 8 000 r/min 离心 20 min, HPLC 测定滤液的峰面积, 连续测定 3 次, 计算其回收率分别为 (103.07±1.49)%、(101.52±0.99)%、(102.10±1.10)%, 说明此超滤膜对游离药物阿魏酸无吸附, 故可用于包封率的测定。

精密量取 0.5 mL 醇质体样品液置于 Nanosep® 10 kDa 离心超滤管上端, 在高速冷冻离心机 (8 000 r/min, 4 ℃) 离心 20 min 后, 取 10 μL 上清液, 于 1 mL 量瓶中用甲醇定容, 混匀, 过 0.22 μm 滤膜后进行 HPLC 测定游离药物浓度 ($C_{游}$)。再另外精密量取 100 μL 醇质体样品液于 10 mL 量瓶中, 加一定量甲醇超声 10 min 使其破乳完全后, 用甲醇定容, 混匀后用 0.22 μm 滤膜滤过, 进行 HPLC 测定总药物浓度 ($C_{总}$), 计算包封率 (包封率 = $1 - C_{游}/C_{总}$), 平行测定 3 次, 取平均值。

2.4.2 采用纳米粒度仪检测醇质体粒径 样品稀释液为醇质体制备用相同比例水-乙醇溶液过 0.22 μm 滤膜的续滤液, 醇质体粒径检测和分析于醇质体制备后立即进行, 对稀释液稀释倍数进行考察, 发现稀释 50 倍时, 粒径分布较为均匀。故后续实验选定用稀释液对样品稀释 50 倍, 平行测定 3 次, 用于粒径的考察。

2.5 TP 阿魏酸醇质体制备的单因素考察

以包封率和粒径为指标, 分别对投药量、磷脂质量分数、乙醇体积分数、磁力搅拌速度、水合温度、水合时间、超声功率、超声时间进行单因素考察。结果显示, 磷脂质量分数、超声时间、乙醇体积分数对包封率和粒径影响较显著, 其他条件综合粒径和包封率结果, 确定磁力搅拌速度为 700 r/min、水合温度为 35 ℃、水合时间 30 min, 超声功率 200 W, 雷公藤甲素 0.003%, 阿魏酸 0.3%。

2.6 Box-Behnken 法优化醇质体处方

采用 Box-Behnken 设计, 在单因素实验结果的

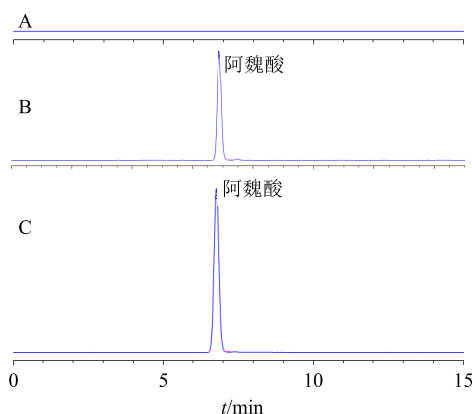


图 1 空白醇质体 (A)、醇质体 (B) 和阿魏酸对照品 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of blank ethosomes (A), ethosomes (B), and ferulic acid reference substance (C)

基础上选择对醇质体性质影响较显著的 3 个因素, 即乙醇体积分数 (X_1)、卵磷脂质量分数 (X_2)、超声时间 (X_3), 以包封率 (Y_1)、粒径 (Y_2) 为评价指标, 建立模型, 优化处方。试验设计见表 2。在优化试验中, 包封率要求最大, 粒径要求最小, 故以包封率为主, 控制一定的粒径范围。

2.6.1 模型拟合 根据各项指标的 F 检验结果, 再采用 Design-Expert 8.0 进行二次拟合, 得到如下简化模型: $Y=70.77-20.01 X_1+3.75 X_2+4.69 X_3+2.74 X_1X_2-2.44 X_1X_3-2.31 X_2X_3-19.37 X_1^2-10.61 X_2^2-10.72 X_3^2$ ($r^2=0.9611$)。通过方程可以看出, 在所选取的各因素水平范围内, 对醇质体包封率的影响为 $X_1>X_3>X_2$, 同时各因素存在交互作用。

2.6.2 方差和显著性检验 方程 Y 的 r^2 为 0.9611, 方差分析结果显示 Y 失拟检验的 P 值为 0.0045, 较

为显著, 说明该回归模型拟合情况良好, 其校正决定系数 (R_{adj}^2) 为 0.9112, 表明模型响应值的变化有 91.12% 来源于自变量, 实验误差较小, 可较好地描述各因素与响应值之间的关系, 故可以准确分析和预测包封率。显著性检验可知, 模型的一次项中 X_1 (乙醇体积分数) 最显著 ($P<0.0001$), X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 均小于 0.01, 均较为显著。

2.6.3 效应面优化和预测 根据二次多项回归方程拟合结果, 固定其中 1 个因素水平, 即作为中心点值, 绘出 Y 与其他 2 个因素的三维效应曲面图和等高线图, 预测 TP 阿魏酸醇质体最佳处方配比, 如图 2 所示。

2.7 优化工艺验证试验

根据 Box-Behnken 效应面法试验设计结果, 得到优化后的处方为 $X_1=16.54$, $X_2=2.13$, $X_3=88.31$ 。

表 2 Box-Behnken 设计表及效应值 ($n=3$)

Table 2 Box-Behnken design table and effect values ($n=3$)

试验号	$X_1/\%$	$X_2/\%$	X_3/s	$Y_1/\%$	Y_2/nm	试验号	$X_1/\%$	$X_2/\%$	X_3/s	$Y_1/\%$	Y_2/nm
1	20 (0)	2 (0)	60 (0)	70.00	57.54	10	30 (1)	1 (-1)	60 (0)	7.35	66.71
2	10 (-1)	1 (-1)	60 (0)	57.24	92.53	11	20 (0)	2 (0)	60 (0)	72.32	62.57
3	20 (0)	1 (-1)	0 (-1)	41.62	194.80	12	20 (0)	3 (1)	0 (-1)	44.26	116.13
4	20 (0)	1 (-1)	120 (1)	59.26	69.24	13	30 (1)	2 (0)	0 (-1)	22.41	116.20
5	20 (0)	2 (0)	60 (0)	68.00	58.00	14	20 (0)	2 (0)	60 (0)	71.53	64.24
6	10 (-1)	3 (1)	60 (0)	68.74	90.91	15	10 (-1)	2 (0)	120 (1)	63.83	65.29
7	30 (1)	3 (1)	60 (0)	29.83	60.30	16	30 (1)	2 (0)	120 (1)	23.30	60.00
8	10 (-1)	2 (0)	0 (-1)	53.19	214.73	17	20 (0)	2 (0)	60 (0)	72.00	65.82
9	20 (0)	3 (1)	120 (1)	52.63	57.05						

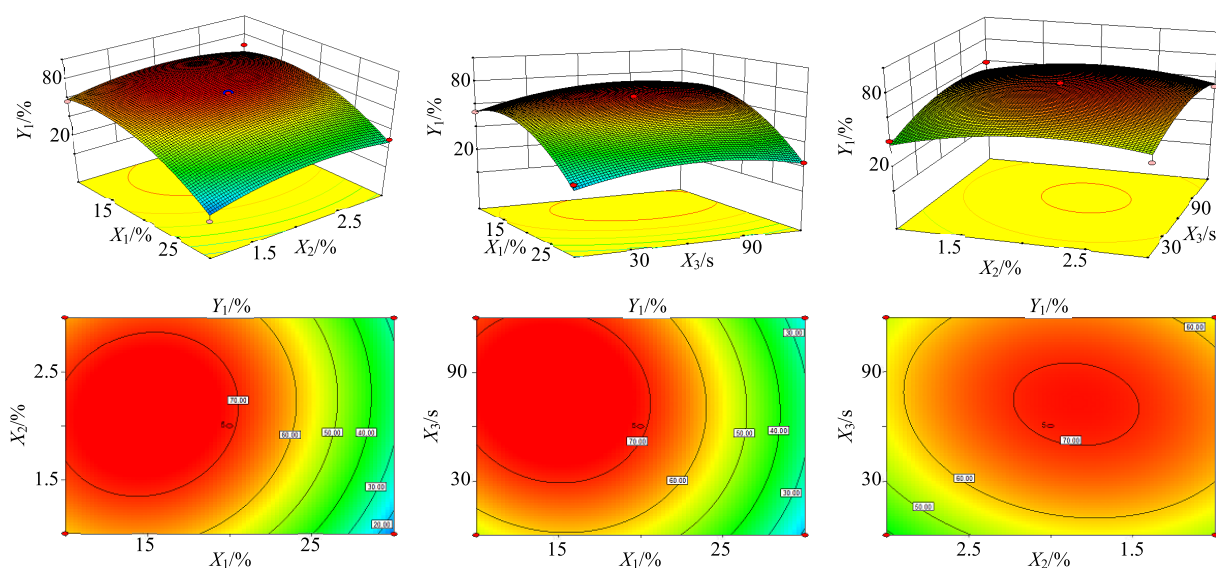


图 2 效应值 Y_1 与 X_1 、 X_2 、 X_3 3 因素的三维曲面图和等高线图

Fig. 2 Three dimensional surface plots of effect value Y_1 and three factors X_1 , X_2 , and X_3 and contour plots

考虑到醇质体的透皮吸收效果,故设置乙醇体积分数为 20%~50%,粒径最大值为 100 nm,重新优选结果为 $X_1=20\%$, $X_2=2.23\%$, $X_3=88.99\text{ s}$,考虑实际操作的可信性与便宜性,处方最终为乙醇体积分数为 20%,磷脂质量分数为 2.2%,超声时间 90 s,按最优处方分别制备 3 批醇质体,测定包封率、粒径,将预测值与实测值进行比较,计算二者偏差[偏差=(预测值-实验值)/预测值],结果见表 3,预测值与实测值的偏差较小,证明所建立的数学模型预测性较好。

表 3 预测值与实测值的比较

Table 3 Comparison between predicted and measured values

指标	包封率/%	粒径/nm
预测值	70.22	47.28
实测值	67.72 ± 1.10	46.75 ± 2.39
偏差/%	3.56	1.13

得到最终醇质体制备方案为:称取处方量卵磷脂 2.2%、雷公藤甲素 0.003%、阿魏酸 0.3%,加入 20%乙醇于西林瓶中溶解得醇相,将水相密封于西林瓶中,注射器与水相西林瓶密封连接,置于磁力搅拌器上(35℃,700 r/min),缓慢地将醇相加入水相中,滴加完全后继续水合 30 min,探头式超声(200 W,90 s),冷却至常温,然后用 0.22 μm 微孔滤膜滤过,得醇质体,密避,于 4℃保存。

2.8 TP 阿魏酸醇质体质量评价

2.8.1 外观评价 TP 阿魏酸醇质体为澄清液体,微有蓝色乳光,见图 3。

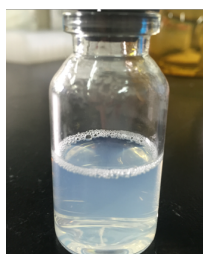


图 3 醇质体外观

Fig. 3 Appearance diagram of ethosomes

2.8.2 形态观察 将 TP 阿魏酸醇质体加入适量冻干保护剂冻干后镀金于扫描电子显微镜(SEM)下观察,分布为均匀的球状囊泡结构,见图 4。

2.8.3 粒径与电位分布 样品稀释液使用 20%乙醇测定 3 个不同批次的醇质体的粒径与电位,计算平均水溶液过 0.22 μm 的续滤液,稀释适宜倍数后分别均值,平均粒径为 $(46.75 \pm 2.39)\text{ nm}$,Zeta 电位为 $(-46.32 \pm 3.76)\text{ mV}$,具体结果见图 5。

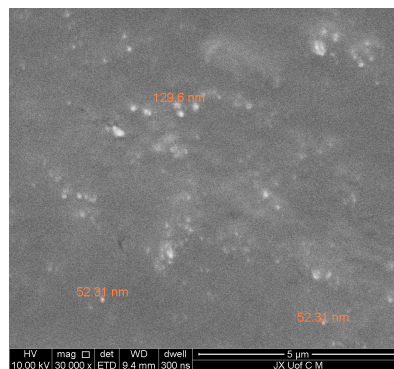


图 4 醇质体 SEM 图

Fig. 4 SEM diagram of ethosomes

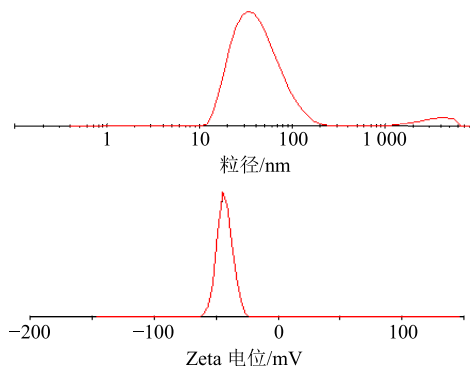


图 5 醇质体粒径与 Zeta 电位分布

Fig. 5 Particle size and Zeta potential distribution of ethosomes

2.8.4 渗漏率的考察 采用最佳制备工艺制备醇质体 3 批,测得首日包封率后,于冰箱 4℃保存 1 周后,再测其包封率,其计算公式为渗透率=(制备首日测得的包封率-一定期测得的包封率)/制备首日测得的包封率,渗透率为 $(3.11 \pm 1.07)\%$ 小于 5%,说明其稳定性较好。

3 TP 阿魏酸醇质体体外透皮吸收

3.1 HPLC 测定透皮吸收中阿魏酸含量

3.1.1 色谱条件 菲罗门 C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相为乙腈-1%冰醋酸水溶液(14:86);体积流量 1.0 mL/min;检测波长 321 nm;柱温 25℃;进样量 20 μL;阿魏酸的保留时间约为 25.00 min,理论塔板数以阿魏酸计算不低于 10 000。

3.1.2 方法学考察 配制阿魏酸对照品溶液、醇质体透皮供试品溶液、空白醇质体透皮供试品溶液,考察方法专属性、线性关系、精密性及加样回收、稳定性。在此色谱条件下方法专属性考察结果见图 6,表明接收液中其他成分对阿魏酸的测定无干扰。阿魏酸在 0.16~39.44 μg/mL 与其峰面积 A 呈良好的线性关系,其回归方程为 $Y=80.882 X+0.243 3$,

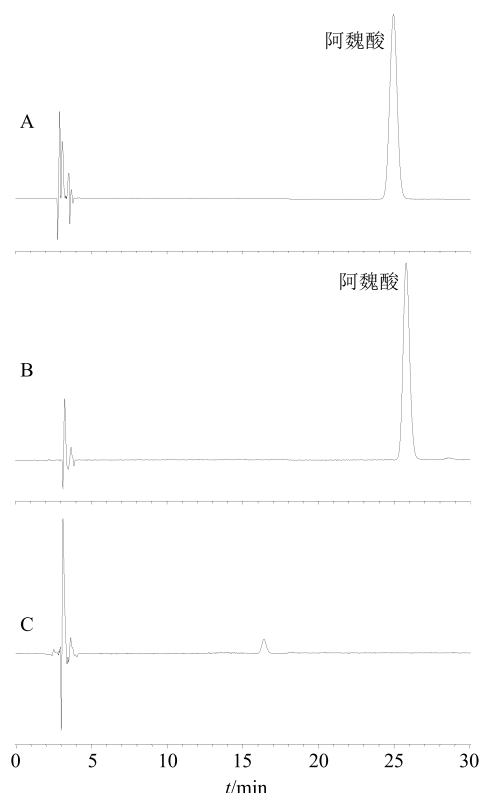


图 6 阿魏酸对照品溶液 (A)、醇质体透皮供试品溶液 (B) 和空白醇质体透皮供试品溶液 (C) 的 HPLC 图

Fig. 6 HPLC chromatograms of ferulic acid reference substance (A), ethosomes percutaneous trial solution (B), and blank ethosomes percutaneous trial solution (C)

$r=0.999\ 9$, 低、中、高 3 个质量浓度 (3.94、7.89、15.78 $\mu\text{g/mL}$) 的日内精密度的 RSD 最大 0.22%, 日间精密度的 RSD 最大 0.35%, 均小于 3%, 表明此方法精密度良好, 加样回收率分别为 $(101.90 \pm 0.20)\%$, 24 h 内含量测定峰面积 RSD 为 0.11%。

3.2 LC-MS/MS 测定透皮吸收中 TP 含量

3.2.1 色谱与质谱条件

(1) 色谱条件: Ultimate XB-C₁₈ 色谱柱 (150 mm $\times$ 3.0 mm, 3 μm); 流动相为乙腈-0.1%甲酸的 10 mmol/L 乙酸铵溶液 (65:35); 进样量 20 μL ; 体积流量 0.7 mL/min; 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$ 。

(2) 质谱条件: 采用电喷雾离子源 (ESI 源), 离子源温度为 600 $^{\circ}\text{C}$, 正离子模式检测, IS (离子化电压) 5 500 V, CUR (气帘气) 262.01 kPa (38 psi), GS1 (喷雾气) 379.23 kPa (55 psi), GS2 (辅助加热器) 344.75 kPa (50 psi), 扫描方式为多反应监测 (multiple reaction monitor, MRM), 优化后 TP 和内标 (雷公藤内酯甲) 的 MRM 见表 4。

3.2.2 方法学考察 配制空白接收液、空白接收液

加 TP 和内标、样品溶液加内标, 考察方法专属性、残留效应、线性关系、精密度及准确度、稳定性。专属性结果见图 7, 表明接收液中其他成分对 TP 的测定无干扰, TP 在 1.23~1 230.77 ng/mL 呈良好的线性关系, 其回归方程为 $Y=0.007\ 53\ X+0.027\ 4$ ($r=0.997\ 7$), 进样高质量浓度 (492.31 ng/mL) 的样品溶液后, 进针空白甲醇溶液, 反复进行 3 次, 均未出现明显的目标峰, 表明仪器无残留效应, 且分别取 10、50、100 ng/mL 的高、中、低质量浓度的对照品溶液进样测定, 得日内、间精密度平均值均小于 5%, 准确度均小于 12.34%, 冻融稳定性、短期稳定性、长期稳定性的 RSD 均小于 7%, 表明样品稳定性良好。

表 4 TP 和雷公藤内酯甲 MRM 参数

Table 4 Multiple polyion reaction monitoring parameters of TP and wilforlide A

检测物	母离子 (m/z)	去簇电压 (DP)/V	碰撞能 (CE)/eV	碎片离子 (m/z)
TP	361.2	110	37	145.0
雷公藤内酯甲	472.4	60	25	191.2

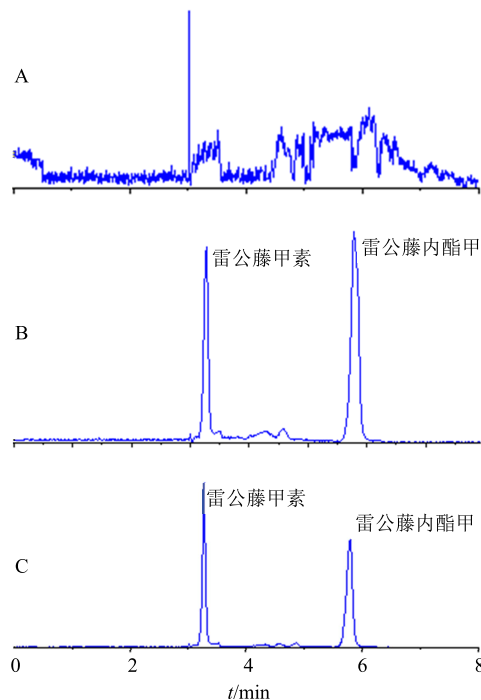


图 7 空白接收液 (A)、空白接收液+TP 对照品和内标 (B) 及样品+内标 (C) 的 MRM 色谱图

Fig. 7 MRM chromatogram of blank receptor fluid (A), blank receptor fluid + TP reference substance + internal standard (B), and sample + internal standard (C)

3.3 体外透皮研究

3.3.1 离体小鼠腹皮的准备 将小鼠腹部毛小心剪去，颈椎脱臼处死后剪下腹部皮肤，小心剥离脂肪及皮下组织，生理盐水清洗皮肤，用锡箔纸包好置于-20℃冰箱中冷冻保存，备用。

3.3.2 醇质体体外透皮研究 取出低温贮藏的离体皮肤，自然解冻，生理盐水反复冲洗，剪成适当大小，平铺固定于改良后的 Franz 扩散池的扩散界面上，真皮层面向接收池，注入 20%乙醇生理盐水接收液到接收池中，排尽接收液中气泡，于(37.0±0.2)℃ 150 r/min 循环水浴，平衡 30 min 后，取醇质体 100 μL 于供给池，每个平行 6 份。分别于 0.5、1、2、4、6、8、10、12、24 h 从接收池中取样 1 mL，每次补充同温度同体积的空白接收液并排除接收池中气泡。取出的接收液用高速离心机(10 000 r/min，4℃)离心 10 min，取上清液 100 μL 进行 HPLC 测定接收液中阿魏酸的含量，继续离心(18 000 r/min，4℃)20 min，取 80 μL 的上清液加 50 μL 的 500 ng/mL 雷公藤内酯甲作为内标，涡旋 5 min 混匀，进行 LC-MS/MS 测定接收液中 TP 的含量。

3.3.3 皮肤滞留量 透皮实验结束后，用生理盐水洗净皮肤表面的药物，用滤纸吸干，剪下给药部位位于 5 mL 离心管中减碎。加 2 mL 甲醇，涡旋 5 min，超声 30 min，离心(10 000 r/min，4℃)20 min，取上清液 80 μL 加入 20 μL 超纯水混匀，采用 HPLC 测定阿魏酸的质量分数。继续离心(18 000 r/min，4℃)20 min，取 80 μL 的上清液加 50 μL 的 500 ng/mL 雷公藤内酯甲作为内标，涡旋 5 min 混匀，进行 LC-MS/MS 测定接收液中 TP 的质量分数。结果表明阿魏酸、TP 的皮肤滞留量分别为(12.15±0.22)μg/cm²和(0.10±0.01)μg/cm²。

3.3.4 累积透过量(Q_n)的测定 药物各个时间点的 Q_n 可由以下公式计算。

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

Q_n 为第 n 个时间点的单位面积累积透过量， A 表示有效透皮面积， C_n 表示第 n 个点测得的药物质量浓度， V 为接收池体积， V_i 为每次取样体积

以药物的 Q_{24} 对取样时间(t)作曲线，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)。结果表明阿魏酸与 TP 的 Q_{24} 为(165.856 3±26.128 7) μg/cm²和(806.276 8±81.873 7) ng/cm²，见表 5 和图 8。且两者的体外透皮量-时间模型拟合方程均符合 Higuchi 方程，结果见表 6。渗透动力学参数见表 7。

表 5 醇质体中阿魏酸和 TP 的 Q_n ($n=6$)

Table 5 Q_n of ferulic acid and TP in ethosomes ($n=6$)

t/h	阿魏酸 $Q_n/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2})$	TP $Q_n/(\text{ng}\cdot\text{cm}^{-2})$
0.5	3.888 8±0.312 7	47.286 5±1.651 2
1.0	17.394 7±0.835 5	140.587 0±18.298 9
2.0	54.635 8±7.847 1	253.437 8±35.513 7
4.0	79.548 8±2.834 9	447.129 7±46.129 7
6.0	95.395 2±9.509 1	586.363 2±82.642 0
8.0	142.668 3±22.288 3	642.438 9±83.857 3
10.0	152.736 9±25.072 2	692.038 9±85.032 8
12.0	157.949 7±25.234 1	733.487 6±86.669 1
24.0	165.856 3±26.128 7	806.276 8±81.873 7

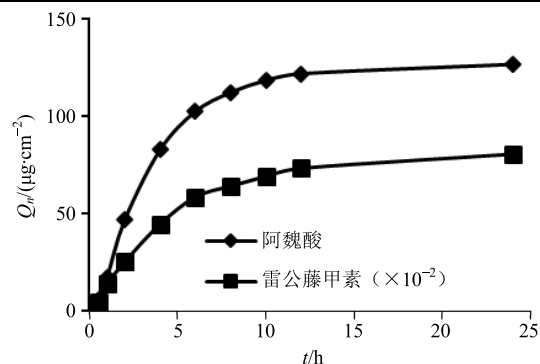


图 8 醇质体中阿魏酸与 TP 的 Q_n ($n=6$)

Fig. 8 Q_n of ferulic acid and TP in ethosomes ($n=6$)

表 6 醇质体中阿魏酸与 TP 的体外透皮量-时间模型拟合方程

Table 6 Model fitting equation of time-*in vitro* transdermal volume of ferulic acid and triptolide in ethosomes

模型	阿魏酸		TP	
	模型拟合方程	r^2	模型拟合方程	r^2
零级方程	$Q=15.468 t+8.433 6$	0.961 4	$Q=67.873 t+95.896$	0.929 1
一级方程	$\lg Q=0.132 4 t+1.087 9$	0.696 1	$\lg Q=0.101 2 t+2.014 9$	0.732 1
Higuchi 方程	$Q=60.917 t^{1/2}-39.981$	0.980 3	$Q=272.82 t^{1/2}-127.23$	0.986 9
Hixson-Crowell 方程	$Q^{1/3}=1.428 3 t+1.147 1$	0.919 6	$Q^{1/3}=0.491 8 t+4.734 8$	0.819 0

表 7 醇质体中阿魏酸和 TP 的渗透动力学参数

Table 7 Osmotic kinetic parameters of ferulic acid and TP in ethosomes

成分	$Q-t$ 方程	r^2	$Q_{24}/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2})$	$J_s/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1})$	$Q_s/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2})$
阿魏酸	$Q=15.468t+8.4336$	0.96	165.8563 ± 26.1287	15.47	12.15 ± 0.22
TP	$Q=0.0679t+0.0959$	0.93	0.8063 ± 0.0819	0.07	0.10 ± 0.01

4 讨论

体外细胞毒性评价由于其周期短、成本低和作用机制易于探明等优势得到广泛关注^[20]。本实验在前期文献调研的基础上,采用 MDCK 细胞毒性试验来筛选 TP 与阿魏酸的配伍比例,对于课题组的后期研究具体独特的意义,但是由于细胞毒性评价只是在体外单细胞水平上做出的毒性评估,准确性有待考证,需课题组后期验证。脂溶性强的药物在醇质体中包封率较高,朱希聪等^[21]制作的 TP 醇质体包封率约为 97.9%,而阿魏酸的脂溶性稍差且 TP 阿魏酸醇质体中两者配伍比例为 1:100,差异较大,故以阿魏酸的包封率为指标来评价 TP 阿魏酸醇质体,另以 Box-Behnken 效应面法在单因素实验结果的基础上选择对醇质体性质影响较显著的 3 个因素,建立模型,优化处方,经验证优化处方的包封率、粒径的预测值与试验值吻合情况良好,但随着乙醇浓度的升高,阿魏酸的包封率急剧下降,猜测在高浓度乙醇时,阿魏酸更趋向分布在外水相中,导致包封率下降,醋酸钙梯度法^[22-23]一般可显著增加弱酸性药物的包封率,但未见对 TP 的相关报道,故若想进一步提高阿魏酸这种弱酸性药物的包封率,下一步可以考虑从优选制备方法、扩大各因素水平的设置等方面进行研究。

通过对 TP 阿魏酸醇质体理化性质的考察,表明该方制备的醇质体稳定性好且具有粒径小,分布均匀等特点,进一步体外释放研究结果表明,在 10 h 内阿魏酸与 TP 释放均接近 Higuchi 方程,表明其具有缓释的作用效果,且渗透都可以维持 24 h。药物的缓慢释放可直接持久地对病变部位发挥治疗作用,从而一定程度上减轻 TP 的毒性作用,考虑到醇质体流动相较较大不利于后期毒性实验和药效实验中的动物给药,适宜的给药剂型有待进一步的探索。

参考文献

- [1] 杨 坤, 吴东方, 程 虹. 雷公藤提取物治疗类风湿关节炎的 Meta 分析 [J]. 药物流行病学杂志, 2016, 25(11): 677-682.
- [2] 吴少辉, 刘光明. 雷公藤内酯的提取、分析和药理作用

研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2011, 26(1): 36-39.

- [3] Fan D, He X, Bian Y, *et al.* Triptolide modulates TREM-1 signal pathway to inhibit the inflammatory response in rheumatoid arthritis [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(4): 498-???
- [4] 黄郑隽, 阙慧卿, 朱 惠, 等. 雷公藤甲素对生殖系统毒性的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2013, 36(3): 224-227.
- [5] Lu Y, Xie T, Zhang Y, *et al.* Triptolide Induces hepatotoxicity via inhibition of CYP450s in rat liver microsomes [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2017, doi: 10.1186/s12906-016-1504-3.
- [6] Yang J, Sun L, Wang L, *et al.* Activation of Sirt1/FXR signaling pathway attenuates triptolide-induced hepatotoxicity in rats [J]. *Front Pharmacol*, 2017, doi: 10.3389/fphar.2017.00260.
- [7] Li X, Jiang Z, Zhang L. Triptolide: Progress on research in pharmacodynamics and toxicology [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 155(1): 67-79.
- [8] 王 贝, 江振洲, 张陆勇. 雷公藤甲素毒性及减毒的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2012, 35(3): 211-215.
- [9] 赵小梅, 宫 嫚, 董捷鸣, 等. 甘草炮制雷公藤降低其肝毒性作用的初步研究 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(1): 119-124.
- [10] 张 静, 江 莹, 王 芳, 等. 基于“异类相制”理论探讨雷公藤肝毒性配伍减毒的作用 [J]. 中草药, 2014, 45(18): 2711-2715.
- [11] 邵 丹, 李晓菲, 尹 萍, 等. 基于炮制减毒思想的何首乌肝毒性物质基础初步研究 [J]. 中草药, 2017, 48(10): 2044-2050.
- [12] 韩菁婕, 柳 芳, 张相林, 等. 雷公藤主要活性成分的结构修饰及药理活性研究进展 [J]. 中国药房, 2016, 27(4): 560-562.
- [13] 陶 玲, 肖 芳, 朱卫丰, 等. 雷公藤减毒研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(5): 229-234.
- [14] 施晓琴, 赵继会, 王志东, 等. 醇质体在经皮给药方面的应用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(12): 352-355.
- [15] 吴艳丽, 危红华, 张朵朵, 等. 辛夷挥发油鼻腔醇质体喷雾剂的制备及其质量评价 [J]. 中草药, 2014, 45(10): 1393-1397.

- [16] Abdulbaqi I M, Darwis Y, Khan N A K, et al. Ethosomal nanocarriers: The impact of constituents and formulation techniques on ethosomal properties, *in vivo* studies, and clinical trials [J]. *Int J Nanomed*, 2016, 11: 2279-2304.
- [17] 叶 菲, 许东航. 肉桂提取物醇质体透皮吸收研究 [J]. 药物评价研究, 2013, 36(2): 119-122.
- [18] 朱亚楠, 王 满, 王璐璐, 等. 含聚乙二醇 1000 维生素 E 琥珀酸酯的秋水仙碱醇质体的制备及其体外透皮效果研究 [J]. 中草药, 2015, 46(24): 3655-3660.
- [19] 阮浩澜, 陈 琪, 黎 旸, 等. 基于狗肾小管上皮细胞的雷公藤甲素体外肾毒性研究 [J]. 中国药师, 2015, 18(1): 1-4.
- [20] 刘 涛, 郭 辰, 赵晓红. 毒理学研究中的体外细胞毒性评价 [J]. 生命科学, 2014, 26(3): 319-324.
- [21] 朱希聪, 张 为, 林兰英, 等. 雷公藤甲素醇质体体外透皮性能和在体抗炎活性的研究 [J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2012, 28(4): 277-279.
- [22] 李海霞, 杨 耀, 路春波, 等. 醋酸钙梯度主动载药法制备芦丁纳米脂质体 [J]. 郑州大学学报: 医学版, 2015, 50(5): 682-686.
- [23] 张 越, 瞿叶清, 陈 军, 等. 阿魏酸脂质体的体外释放度考察 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(19): 1-5.