

白花丹醌传递体凝胶的制备及其体外透皮研究

马闪闪, 张志锋, 吕露阳*, 张吉仲

西南民族大学药学院, 四川 成都 610041

摘要: **目的** 制备白花丹醌传递体(PBG-T)凝胶, 考察其经皮给药的渗透特性。**方法** 采用薄膜-超声分散法制备 PBG-T, 通过星点设计-效应面法优化 PBG-T 处方, 通过正交试验优化 PBG-T 凝胶的处方; 垂直式 Franz 扩散池考察 PBG-T 凝胶体外透皮扩散效果。**结果** PBG-T 的最优处方工艺为白花丹醌(PBG) 10.0 mg, 磷脂 700.0 mg, 聚山梨酯-80 91.5 mg, 超声时间 13 min; PBG-T 凝胶的最优处方为卡波姆 1%, 甘油 5%; 以最优处方制得的 PBG-T 的包封率为 $(79.88 \pm 2.26)\%$, 平均粒径为 (125.64 ± 4.54) nm, Zeta 电位为 (-30.97 ± 1.13) mV; PBG-T 凝胶 12 h 的累积渗透率为 70.0%。**结论** PBG-T 凝胶的处方工艺稳定、可行, 且可以减缓 PBG 的体外释放, 增加其累积渗透率。

关键词: 白花丹醌; 星点设计-效应面法; 传递体; 凝胶; 透皮给药; 正交试验; 薄膜-超声分散法

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)15-3625-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.15.022

Preparation of plumbagin transfersomal gel and investigation on its transdermal penetration characteristics *in vitro*

MA Shan-shan, ZHANG Zhi-feng, LV Lu-yang, ZHANG Ji-zhong

School of Pharmacy, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China

Abstract: **Objective** To prepare plumbagin transfersomal (PBG-T) gel and investigate its transdermal penetration characteristics *in vitro*. **Methods** Plumbagin transfersomes were prepared by film-ultrasonic dispersion method. The optimal prescription condition of PBG-T was selected by central composite design and response surface method. The formula of PBG-T gel was optimized by orthogonal test. The Franz diffusion cell was used to investigate transdermal penetration characteristics of PBG-T gel *in vitro*. **Results** The optimal prescription condition of transfersomes was determined as drug 10.0 mg, phospholipids 700.0 mg, Tween-80 91.5 mg, ultrasonication time 13 min. The optimal prescription condition of transfersomal gel was 1% carbomer 940 as gel matrix, and 5% glycerol as the humectant. According to the optimized prescription, the entrapment efficiency, the mean particle size, and Zeta potential of PBG-T were $(79.88 \pm 2.26)\%$, (125.64 ± 4.54) nm, and (-30.97 ± 1.13) mV. The cumulative penetration rate of PBG-T gel was 70.0% at 12 h. **Conclusion** The optimal preparation technique is stable and feasible. Transfersomal gel features a sustained release *in vitro*, the transfersomal gel can increase penetration rate of plumbagin through the skin of rats.

Key words: plumbagin; central composite design and response surface method; transfersome; gel; transdermal delivery; orthogonal test; film-ultrasonic dispersion method

白花丹是白花丹科白花丹属植物白花丹 *Plumbago zeylanica* L. 的全草及根, 具有祛风除湿、行气活血、消肿解毒的功效, 常用于治疗跌打损伤、风湿疼痛、骨质增生、胃腹胀痛等症^[1]。已被《中华人民共和国卫生部药材标准·维吾尔药分册》^[2]、《云南省中药材标准》^[3]、《广西中药材标准》^[4]等收录。白花丹醌(plumbagin, PBG)是白花丹的主

要有效成分, 临床多用 PBG 的醇溶液治疗体、股癣, 跌打损伤肿痛等^[5-7]。史岑慧^[6]将药材鲜品外敷治疗类风湿性关节炎取得了良好的效果。近几年国内外研制了 PBG 的多种新型制剂, 如脂质体冻干粉^[8]、温敏脂质体^[9]、聚乙二醇长循环脂质体^[10]、壳聚糖微球^[11]、异烟肼- β -环糊精包合物^[12]等, 但皆为注射给药, 不能有效降低其周身循环所致的肝肾毒性。

收稿日期: 2018-02-01

基金项目: 四川省科技厅应用基础项目(2015YJ0226); 中央高校基本科研业务费专项基金项目(2016NGJJPY11)

作者简介: 马闪闪(1991—), 女, 回族, 河南项城人, 硕士研究生, 主要从事中药、民族药制剂研究。Tel: 13541368675 E-mail: 1603390167@qq.com

*通信作者 吕露阳(1974—), 女, 四川成都人, 副教授, 硕士生导师, 主要从事中药、民族药品质评价与产品开发研究。

Tel: 13699066223 E-mail: 466472608@qq.com

经皮给药系统因其能在患处直接发挥药效,避免胃肠道吸收产生的不良反应而受到人们的广泛关注。

PBG 为萘醌类小分子化合物(相对分子质量为 188.18),具有难溶于水、熔点低、易升华、稳定性差、毒性大等特点^[8],这极大地限制了其在临床上的应用。传递体是一种高效的经皮给药载体,具有高度变形性和高效渗透性,皮肤亲和力强、安全性高,能够把难溶性药物包裹于双分子层,在药物经皮给药研究方面有着巨大的潜力^[13-15]。目前以传递体为载体的疫苗、类固醇、多肽类和蛋白质已经成功转运进入皮肤^[16]。以传递体作为 PBG 的经皮给药载体,能增加药物稳定性,改善药物的溶解性和经皮渗透特性,使药物具有缓释性、靶向性,减少肠胃刺激,避免肝脏首关效应和峰谷现象,降低其毒副作用。传递体作为液体制剂,不便于涂抹在皮肤上,而且在储存过程中容易发生聚集、融合等现象,本研究在传递体的基础上将其进一步制成凝胶剂,从而降低脂质双分子的流动性,增强制剂稳定性,改善其渗透特性,而且凝胶剂剂型能够使药物易于涂抹在关节等局部。本实验首次将民族药有效成分 PBG 制备成传递体(PBG-T)凝胶,考察其体外渗透特性,为 PBG 经皮给药制剂的开发提供实验依据。

1 仪器与材料

Waters Acquity UPLC[®] H-Class 超高效液相色谱仪,美国 Waters 公司;R-201 旋转蒸发器、W201D 恒温水浴锅,上海申顺生物科技有限公司;SHB-III 循环水式多用真空泵,郑州长城科工贸有限公司;电子天平,沈阳龙腾电子有限公司;JY92-II 型超声波细胞粉碎机,宁波新芝生物科技股份有限公司;Nano-S90 型纳米粒径测定仪,英国 Malvern 仪器有限公司;RYJ-12B 药物透皮扩散试验仪,上海黄海药检仪器有限公司。

PBG,自制,对照品质量分数>98.5%,样品质量分数>95%;卵磷脂(大豆),质量分数>99.0%,BR 级,批号 2017051501,成都市科隆化学制品有限公司;聚山梨酯-80、司盘-80,成都市科隆化学制品有限公司;曲拉通-100,成都市科隆化工试剂厂;卡波姆 C 型,固安希星药业有限公司;氯仿、石油醚、甲醇等常用试剂为分析纯,成都市科隆化学制品有限公司;超高效液相用甲醇为色谱纯,上海西格玛奥德里奇贸易有限公司;双蒸馏水,广州屈臣氏食品饮料有限公司。

昆明种小鼠,雄性,体质量 21~23 g,购自成都达硕实验动物有限公司。

2 方法与结果

2.1 PBG-T 的制备方法

采用薄膜-超声分散法,按处方量称取 PBG、磷脂、聚山梨酯-80,置于圆底烧瓶内,氯仿溶解,37 °C 下,减压旋蒸除尽有机溶剂。加 10 mL PBS (pH 7.4) 溶液,55 °C 下水合 60 min,冰水浴探头超声(工作周期:工作 2 s,间歇 3 s),样品依次经 0.80、0.45、0.22 μm 滤膜滤过,即得 PBG-T 混悬液。

2.2 PBG 测定方法的建立

2.2.1 色谱条件 色谱柱 Acquity UPLC HSS C₁₈ 柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm);流动相甲醇-水(75:25);检测波长 267 nm;柱温 30 °C;体积流量 0.15 mL/min;进样量 1.0 μL。

2.2.2 对照品和样品溶液的制备 精密称取适量 PBG 对照品,甲醇定容,得到 PBG 对照品溶液。取 0.5 mL 的 PBG-T 混悬液,加入 10%曲拉通乙醇溶液破膜,甲醇定容,离心,取上清液过 0.22 μm 滤膜即得 PBG-T 样品溶液。同法制备空白传递体对照溶液。

2.2.3 干扰性试验 按“2.2.1”项下色谱条件检测 PBG 对照品, PBG-T 样品及阴性对照的色谱行为,结果见图 1。结果表明,样品的保留时间适中,阴性对照无干扰,故 UPLC 条件选择合适,方法可行。

2.2.4 线性关系的考察 精密称取 PBG 对照品 10.0 mg 置于 50 mL 量瓶中,甲醇定容,摇匀,得质量浓度为 200 μg/mL 的对照品储备液。分别稀释成质量浓度为 0.2、0.5、1.0、4.0、10.0、20.0、40.0

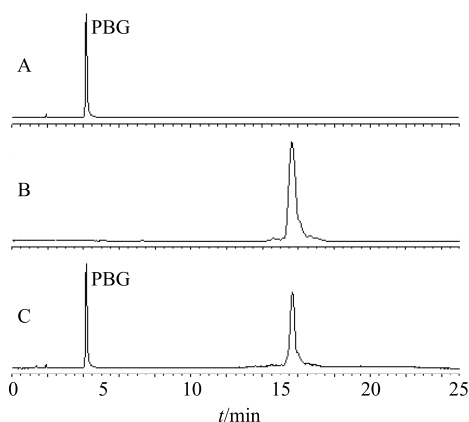


图1 PBG 对照品(A)、空白传递体(B)、PBG-T 样品(C)的 UPLC 图

Fig. 1 UPLC of PBG reference substances (A), blank transfersomes (B), and PBG-T (C)

$\mu\text{g/mL}$ 的 PBG 溶液。按“2.2.1”项下色谱条件测定峰面积。以质量浓度 (C) 为纵坐标, 峰面积 (A) 为横坐标进行线性回归, 得线性回归方程 $C=6\times 10^{-5}A+0.1246$, $r=0.9996$ ($n=7$)。结果表明, PBG 在 $0.2\sim 40.0\mu\text{g/mL}$ 具有良好的线性关系。

2.2.5 精密度试验 配制质量浓度为 20.0 、 10.0 、 $1.0\mu\text{g/mL}$ 的 PBG 对照品溶液, 每个对照品溶液按“2.2.1”项下色谱条件进样 3 次, 每日 3 次, 连续测定 3 d, 计算 PBG 的日内 RSD 和日间 RSD。结果表明, 高、中、低质量浓度的日内 RSD 分别为 0.18% 、 0.46% 、 0.28% , 日间 RSD 分别为 0.43% 、 0.42% 、 1.04% 。

2.2.6 加样回收率试验 吸取 0.5 mL 空白传递体 9 份, 分为 3 组, 加入适量 PBG 对照品溶液, 用 10% 曲拉通破膜, 甲醇定容, 配成高、中、低质量浓度 (20.0 、 10.0 、 $1.0\mu\text{g/mL}$) 的 3 组溶液, 按上述方法测定 PBG 峰面积, 计算加样回收率。结果平均加样回收率分别为 101.2% 、 99.7% 、 101.0% , RSD 分别为 0.41% 、 0.36% 、 0.99% 。

2.2.7 稳定性试验 对高、中、低质量浓度对照品溶液 (20.0 、 10.0 、 $1.0\mu\text{g/mL}$) 的稳定性进行考察, 分别在 0 、 3 、 6 、 12 、 24 h 进行 UPLC 检测, 测定峰面积, 计算 PBG 量及其 RSD 值。3 种质量浓度的对照品溶液中 PBG 峰面积的 RSD 值分别为 0.22% 、 0.45% 、 0.83% , 表明 PBG 溶液在 24 h 内具有良好的稳定性。

2.2.8 重复性试验 取 PBG-T 0.2 mL , 按“2.2.2”项下方法平行制备 6 份, 按上述方法测定 PBG 峰面积, 结果各样品中 PBG 质量分数的 RSD 为 1.06% , 重复性良好。

2.3 包封率的测定

采用葡聚糖凝胶柱法测定 PBG-T 的包封率, 取 0.5 mL PBG-T 上柱, 以去离子水洗脱, 分离出含药传递体和游离药物, 合并传递体段的收集液, 用 10% 曲拉通破膜, 甲醇定容, 离心, 取上清液检测, 计算传递体中包封的药物量 ($W_{\text{包}}$), 同时吸取 0.5 mL 未上柱的 PBG-T 混悬液, 按“2.2.2”项下方法测定 PBG-T 中药物总量 ($W_{\text{总}}$), 按公式计算 PBG-T 的包封率。

$$\text{包封率} = W_{\text{包}} / W_{\text{总}}$$

2.4 单因素考察试验

2.4.1 制膜溶剂的选择 在制备薄膜时分别采用乙醚、醋酸乙酯、无水乙醇、氯仿、氯仿-甲醇 ($2:1$)

作为溶解介质, 实验发现乙醚、醋酸乙酯、无水乙醇均不能使原料完全溶解, 氯仿-甲醇 ($2:1$) 虽然能够使原料溶解完全, 但成膜时出现细小的颗粒物, 说明有些物质在成膜的过程中提前析出, 致使各原料不能充分融合成均匀的薄膜; 氯仿能够在较小体积下使原料充分溶解, 且形成的薄膜均匀一致, 效果较好。因此, 本实验选用氯仿作为制膜溶剂。

2.4.2 水合温度的选择 分别对 35 、 45 、 50 、 55 、 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 作为水合温度进行了考察。试验发现, 当水合温度为 55 、 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时制备的空白传递体混悬液均一、稳定, 具乳光。考虑到温度越高, PBG 因升华造成的损失就越大, 因此选择 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 作为水合温度。

2.4.3 边缘活化剂的选择 分别采用司盘-80、聚山梨酯-80 作为传递体边缘活化剂, 试验发现以司盘-80 做边缘活化剂时包封率较差, 以聚山梨酯-80 为边缘活化剂时包封率、稳定性均较好, 因此选择聚山梨酯-80 为制备传递体的边缘活化剂。

2.4.4 超声波细胞粉碎机功率的选择 以包封率、粒径、粒径分布系数为指标考察超声波细胞粉碎机功率对传递体质量的影响。由试验可知, 随着超声波细胞粉碎机输出功率的增加, 传递体的粒径由 124.0 nm 逐渐减小到 89.4 nm , 粒径分布系数由 0.245 减小到 0.195 , 而 Zeta 电位值呈下降趋势, 包封率也在逐渐下降, 综合考虑各因素, 将超声波细胞粉碎机的输出功率确定为 20% , 即 130 W 。

2.5 星点设计-效应面法 (CCD-RSM) 优化处方工艺

2.5.1 试验设计 在单因素考察实验的基础上, 选择对 PBG-T 性质影响较为显著的 4 个因素作为考察对象, 即投药量 (A)、磷脂用量 (B)、聚山梨酯-80 用量 (C)、超声时间 (D) 作为考察对象, 因素水平、试验设计与结果见表 1。

2.5.2 模型拟合和效应面优化 采用 Design-Expert 8.0 软件对数据进行处理和效应面处方工艺优化, 分别以包封率 (Y_1)、载药量 (Y_2)、粒径 (Y_3) 为因变量, 以投药量 (A)、磷脂量 (B)、聚山梨酯-80 量 (C) 和超声时间 (D) 为自变量进行模型拟合。二次模型拟合方程为 $Y_1=10.3A-0.0310B+0.124C+0.223D-5.03\times 10^{-3}AB+0.0272AC+0.0849AD+1.45\times 10^{-3}BC+2.68\times 10^{-3}BD+0.0208CD-0.612A^2-1.90\times 10^{-6}B^2-0.01C^2-0.172D^2+16.6$, $r^2=0.9798$, $P<0.0001$; $Y_2=0.283A-3.05\times 10^{-3}B+2.54\times 10^{-3}C+0.0242D-1.39\times 10^{-4}AB-7.50\times 10^{-4}AC-1.35\times 10^{-3}AD+2.24\times 10^{-5}BC+$

表 1 星点设计试验安排及结果

Table 1 Experimental design and results of CCD

编号	A/mg	B/mg	C/mg	D/min	Y ₁ /%	Y ₂ /%	Y ₃ /nm	编号	A/mg	B/mg	C/mg	D/min	Y ₁ /%	Y ₂ /%	Y ₃ /nm
1	6 (-1)	255 (-1)	100	8 (-1)	21.83	0.15	87.54	16	6	645	40	16	56.28	0.23	165.20
2	9 (0)	450 (0)	70 (0)	12 (0)	52.59	0.52	117.50	17	12	255	40	16	44.03	1.00	174.30
3	6	645 (+1)	100 (+1)	16 (+1)	66.84	0.38	105.80	18	12	645	40	8	50.01	0.46	156.80
4	6	255	40 (-1)	16	41.94	0.37	119.40	19	9	450	70	12	66.50	0.51	122.20
5	12 (+1)	255	100	16	26.28	0.39	92.24	20	6	255	40	8	60.99	0.38	110.50
6	12	255	40	8	56.35	1.19	179.00	21	9	450	70	20 (+2)	55.88	0.49	114.60
7	12	645	40	16	49.74	0.46	160.90	22	15 (+2)	450	70	12	47.43	0.59	135.80
8	12	645	100	8	60.93	0.53	118.00	23	9	450	10 (-2)	12	37.01	0.39	169.40
9	6	645	40	8	68.48	0.29	177.30	24	9	840 (+2)	70	12	86.82	0.37	160.70
10	9	450	70	12	50.25	0.43	116.60	25	3 (-2)	450	70	12	41.35	0.05	111.70
11	12	645	100	16	64.79	0.49	118.50	26	9	450	70	12	61.78	0.49	114.30
12	6	645	100	8	65.37	0.39	108.80	27	9	450	130 (+2)	12	23.63	0.16	94.43
13	9	450	70	12	50.26	0.49	121.60	28	9	60 (-2)	70	12	45.47	1.35	72.16
14	6	255	100	16	19.58	0.19	89.85	29	9	450	70	12	70.22	0.52	113.50
15	12	255	100	8	33.27	0.46	88.89	30	9	450	70	4 (-2)	54.97	0.42	109.40

$9.62 \times 10^{-6} BD + 9.38 \times 10^{-5} CD - 5.60 \times 10^{-3} A^2 + 2.22 \times 10^{-6} B^2 - 6.85 \times 10^{-5} C^2 - 1.04 \times 10^{-3} D^2 - 0.302$, $r^2 = 0.8833$, $P = 0.0054$; $Y_3 = 8.54A + 0.212B - 1.04C + 2.25D - 0.0139AB - 0.0507AC + 0.0379AD + 1.66 \times 10^{-4}BC - 1.63 \times 10^{-4}BD + 3.63 \times 10^{-3}CD + 0.178A^2 - 5.98 \times 10^{-6}B^2 + 4.05 \times 10^{-3}C^2 - 0.834D^2 + 59.2$, $r^2 = 0.8736$, $P = 0.0077$ 。

对各指标进行方差分析,由 P 值结果可知, Y_1 、 Y_2 、 Y_3 二次模型拟合的差异显著 ($P < 0.01$), 适合作为分析及预测的模型, 用 Design Expert 8.0 软件

绘制效应面图, 见图 2。经分析, 得到 PBG-T 的最优处方工艺为 PBG 量 10.0 mg、磷脂量 700.0 mg、聚山梨酯-80 量 91.5 mg、超声时间 13 min。

2.5.3 最优处方工艺的验证 按最优处方工艺制备 PBG-T, 重复 5 次, 比较预测值与实验值, 计算偏差 [偏差 = (预测值 - 实测值) / 预测值], 结果见表 2。由表 2 可知, 各指标的预测值和实测值偏差较小, 说明星点设计-效应面法所得的数学模型能够较好地描述各因素与指标之间的关系, 预测性好, 适用于 PBG-T 处方工艺的优化。

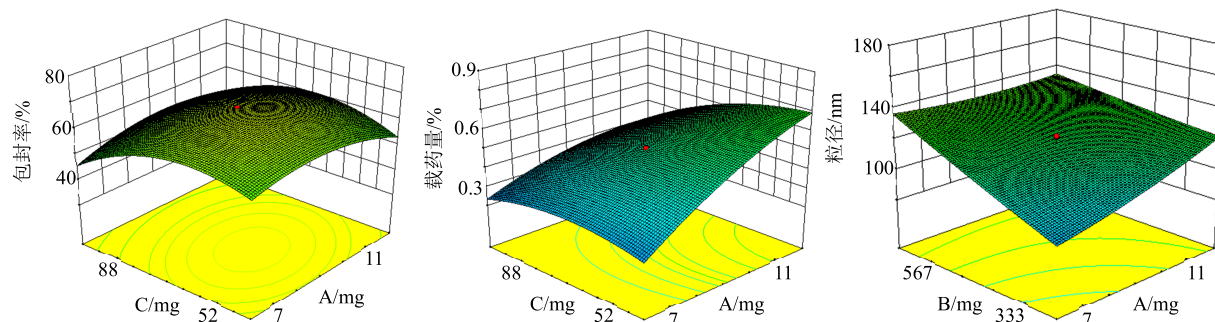


图 2 效应面图

Fig. 2 Response surface

表 2 预测值与实测值的比较 ($n = 5$)Table 2 Comparison on predicted and measured values ($n = 5$)

指标	预测值	实际值	偏差/%
包封率/%	79.57	79.88	0.39
载药量/%	0.52	0.51	-1.92
粒径/nm	129.30	125.64	-2.83

2.6 PBG-T 主要药剂学性质考察

2.6.1 粒径、Zeta 电位的测定 所得 PBG-T 为黄棕色混悬液, 透光性好。采用纳米粒度及 Zeta 电位分析仪测定 PBG-T 的平均粒径、粒径分布 (PDI) 和 Zeta 电位, 重复 3 次, 取平均值。测得其平均粒径为 (125.64 ± 4.54) nm, 粒径分布系数为 $(0.226 \pm$

0.004), Zeta 电位为 (-30.97 ± 1.13) mV。传递体的粒径分布趋近于正态分布, 分布曲线见图 3。

2.6.2 稳定性的考察 将新鲜制备的 PBG-T 混悬液密封、避光储存, 分别在第 0、10、20、30、60 天时取样检测, 以渗漏率为指标考察 PBG-T 在 4 °C 条件下放置 60 d 的稳定性。结果表明, PBG-T 在第 60 天的渗漏率为 (4.13 ± 0.71) %, 说明以该处方

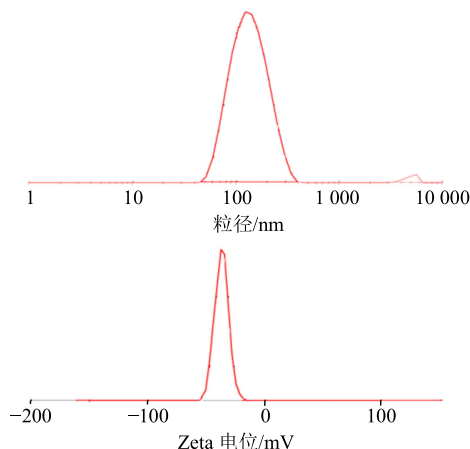


图 3 PBG-T 平均粒径和 Zeta 电位分布图

Fig. 3 Distribution of average particle size and Zeta Potential of PBG-T

工艺制得 PBG-T 在 4 °C 条件下稳定性较好。

2.7 PBG-T 凝胶的制备

2.7.1 PBG-T 凝胶及普通凝胶的制备 称取凝胶基质、甘油, 加到适量去离子水中, 溶胀过夜(12 h); 精密量取促渗剂, 加入其中并搅拌均匀, 滴加三乙醇胺调整 pH 为 7.0~7.5, 搅拌均匀, 得空白凝胶。PBG-T 混悬液与空白凝胶按 3:2 的比例混合, 研磨均匀, 即得 PBG-T 凝胶。称取 PBG, 加适量 50% 乙醇溶解, 制备与传递体中含等量药物的普通溶液, 与空白凝胶按 3:2 的比例混合, 研磨均匀, 即得 PBG 普通凝胶剂。

2.7.2 正交试验 依据文献报道^[17-20], 选择对传递体凝胶影响较显著的基质类型(A)、基质用量(B)、保湿剂甘油用量(C)、促渗剂(D)作为考察对象, 因素水平见表 3。以单位面积累积渗透量(Q_n , $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)为指标, 采用正交试验筛选传递体凝胶剂的最佳处方, 结果见表 3。方差分析见表 4。

试验结果表明 8 号方案最优, 该处方的 Q_n 可以达到 $20.01 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。从极差角度分析, 促进剂影响因素最大, 其次是保湿剂甘油用量, 基质的影响最小, 最优组合为 $A_1B_1C_1D_3$ 。由方差分析可知, 考察

表 3 正交试验设计与结果

Table 3 Design of orthogonal test

试验号	A	B/%	C/%	D	$Q_n/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2})$
1	卡波姆-940 (1)	1 (1)	5 (1)	3%油酸 (1)	19.91
2	卡波姆-940 (1)	2 (2)	10 (2)	3%氮酮 (2)	9.54
3	卡波姆-940 (1)	3 (3)	15 (3)	无 (3)	19.36
4	羧甲基纤维素钠 (2)	1 (1)	10 (2)	无 (3)	19.11
5	羧甲基纤维素钠 (2)	2 (2)	15 (3)	3%油酸 (1)	15.49
6	羧甲基纤维素钠 (2)	3 (3)	5 (1)	3%氮酮 (2)	13.69
7	羟丙基甲基纤维素 (3)	1 (1)	15 (3)	3%氮酮 (2)	13.68
8	羟丙基甲基纤维素 (3)	2 (2)	5 (1)	无 (3)	20.01
9	羟丙基甲基纤维素 (3)	3 (3)	10 (2)	3%油酸 (1)	14.37
K_1	48.81	52.70	53.61	49.77	
K_2	48.29	45.04	43.02	36.91	
K_3	48.06	47.42	48.53	58.48	
R	0.75	7.66	10.59	21.57	

表 4 方差分析

Table 4 Variance analysis

误差来源	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
A	0.098 4	2	1.000 0	
B	10.246 5	2	104.107 5	$P < 0.01$
C	18.701 6	2	190.014 2	$P < 0.01$
D	78.501 0	2	797.593 8	$P < 0.01$

$F_{0.01}(2,2)=99.00$

因素 B、C、D 对累积渗透量具有显著性影响($P < 0.01$)。因此, 考虑到该制剂工艺稳定可行, 确定最佳处方为卡波姆-940 1%、甘油 5%、不加促渗剂。

2.7.3 验证试验 按最佳处方 $A_1B_1C_1D_3$, 即卡波姆-940 1%、甘油 5%, 按“2.7.1”项下方法制备凝胶。重复 3 次透皮扩散试验, 计算 PBG-T 凝胶的 Q_n 和 3 次试验的均值, 结果见表 5。

表 5 验证实验结果

Table 5 Results of verification test

序号	A	B	C	D	$Q_n/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2})$	Q_n 均值/ $(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2})$
1	1	1	1	3	36.11	
2	1	1	1	3	35.86	36.14±0.76
3	1	1	1	3	36.46	

2.8 体外皮肤渗透实验

2.8.1 离体鼠皮的制备 剃除小鼠背部毛后断颈处死，剥离背部无损伤皮肤，小心除去皮下脂肪组织和血管，用生理盐水冲洗干净，置于 4℃ 冰箱中保存，在 24 h 内使用。

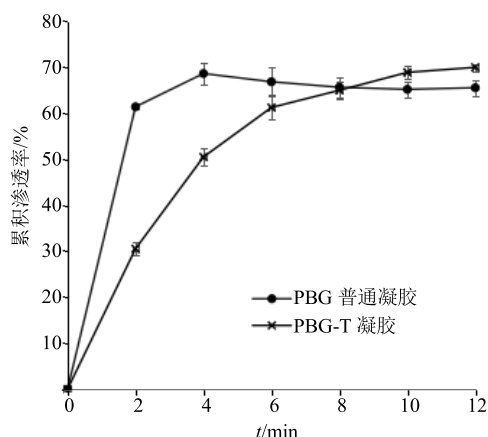
2.8.2 透皮实验方法 将离体皮肤固定于透皮实验装置上，排尽皮肤下面的气泡，以含 30% 乙醇的 PBS (pH 7.4) 溶液为接收液，恒温水浴 37℃，运行转速 400 r/min。将 0.5 g 凝胶加到供给池中，分别在 2、4、6、8、10、12 h 时从接收池中取样 1.0 mL，每次取样后立即补充等量 37℃ 的空白接收液，12 h 后中止实验。各样液经破膜、甲醇定容、离心、0.22 μm 滤膜滤过后，按“2.2.1”项下色谱条件测定药物含量，计算 Q_n 和稳态渗透速率 (J , $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$)。

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

$$J = (dQ/dt) / A$$

C_n 为各取样时间点接收池中药物的质量浓度， C_i 为各取样点时取样液的质量浓度， V 和 V_i 分别为接收池体积和取样体积， A 为透皮扩散面积 (2.8 cm²)

2.8.3 体外渗透曲线 以药物累积渗透率为纵坐标，时间为横坐标作图，绘制 PBG 的累积渗透率-时间曲线，见图 4。运用 Excel 对实验数据进行模型拟合，药物渗透曲线符合 Quadratic Model 模型，即 $Q = -0.371 4 t^2 + 7.233 6 t + 1.446 1$, $r = 0.994$ 。

图 4 2 种凝胶剂的药物渗透曲线 ($n = 3$)Fig. 4 Drug permeation curves of two kinds of gels ($n = 3$)

PBG 普通凝胶和 PBG-T 凝胶剂 12 h 的 Q_n 分别为 (33.85±1.13)、(36.14±0.31) $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, J 分别为 2.82、3.01 $\mu\text{g}/(\text{cm}^2\cdot\text{h})$ ，皮肤滞留量 (皮肤滞留量=皮肤中药物量/透皮扩散面积) 分别为 (0.37±0.02)、(0.52±0.01) $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ，药物累积渗透率 (药物累积渗透率=药物总渗透量/总给药量) 分别为 (65.6±1.8)%、(70.0±0.8)%。

3 讨论

本研究采用薄膜-超声分散法制备 PBG-T 制剂，其包封率基本符合《中国药典》2015 年版要求 (>80%)，粒径适宜，分布较均匀。在传递体单因素考察实验中发现，以司盘-80 作为边缘活化剂时，制得的传递体混悬液分层明显，包封率极低。有研究发现，亲水亲油平衡值 (HLB 值) 不同的表面活性剂在脂质相与水相的亲亲和分布能力存在显著差异，从而导致其与类脂质膜相互作用能力的大小也有差异^[21]。司盘-80 的 HLB 值为 4.3，亲脂性很强，能够与脂溶性药物竞争性插于类脂质膜中，扰乱脂质双分子层结构，造成药物的泄漏。而聚山梨酯-80 的 HLB 值为 15，亲水性较强，以其为边缘活化剂制备的 PBG-T 包封率高，稳定性好。

传递体破膜是否彻底，直接影响包封率测定的准确性。本实验考察了甲醇、乙醇、异丙醇、曲拉通-100 的破膜效果，从澄清度和 UPLC 测得结果来看曲拉通-100 破膜更为彻底。有文献报道，当曲拉通达到一定浓度时，能与双层类脂质膜中的磷脂分子形成混合胶束，破坏脂质囊泡，释放出被包裹的药物^[22]。溶解度是药物的重要理化性质之一，它对药物的经皮吸收产生着重要的影响。一般情况下，由于脂溶性药物在水中溶解性很低，不能满足透皮扩散实验的漏槽条件，导致药物的累积透过量较小^[23]。PBG 为脂溶性药物，为了更好地表征其在体外经皮渗透的效果，应选择具有一定增溶能力的接收介质。本实验考察了 PBG 在含有一定量有机溶剂或者增溶剂的溶媒体系中的溶解度，实验结果表明，在含有 30% 乙醇的溶媒体系中，PBG 的溶解度能够满足药物透皮扩散实验所需的漏槽条件。因此，最终选择含 30% 乙醇的 PBS (pH 7.4) 溶液作为接收介质。

PBG 普通凝胶在透皮实验的第 4 小时已达到最大渗透率，而 PBG-T 凝胶在第 4 小时的累积渗透率为 50.6%，并持续增加，10 h 后增长趋于平缓，12 h 达到最大渗透率，且 PBG-T 凝胶 12 h 的皮肤滞留

量为 $(0.52 \pm 0.01) \mu\text{g}/\text{cm}^2$, 高于 PBG 普通凝胶的皮肤滞留量($P < 0.01$), 说明 PBG-T 凝胶比普通凝胶更能使药物在皮肤内形成药物储库, 使药物缓慢释放。此外, PBG 普通凝胶的累积渗透率随时间的延长呈下降趋势, 而 PBG-T 凝胶剂未出现此现象, 说明 PBG-T 凝胶剂对药物的稳定性作用优于 PBG 普通凝胶。实验结果表明, PBG-T 凝胶能够增加药物的稳定性, 且具有缓释作用, 经皮渗透效果较为理想。本实验在制备凝胶剂时发现, 渗透促进剂对 PBG-T 凝胶剂的经皮渗透呈负面效应, 因此, 在 PBG-T 凝胶剂处方中选择不加促渗剂。国内外研究的凝胶处方中基本都含有氮酮, 其对水溶性药物有不同程度的促渗作用, 而对脂溶性较强的药物其促渗作用并不明显, 甚至可能有负面效应^[24]。

本研究将药物包裹在类脂结构中, 再将其制备成凝胶, 得到的传递体-凝胶复合制剂不仅保留了载体的优势和凝胶剂的特点, 而且改善了单独载体制剂或普通凝胶剂的不足^[25-26]。本实验制备的制剂增强了 PBG 的溶解性和稳定性, 避免有机溶剂对皮肤的损伤, 同时以传递体凝胶作为 PBG 经皮给药的载体改善了药物的渗透特性, 使其具有靶向性和缓释性, 避免药物浓度在患处出现峰谷现象, 减少皮肤刺激性, 增强了 PBG 使用的安全性。因此, PBG-T 凝胶具有良好的开发应用价值。

参考文献

- [1] 谭明雄, 王恒山, 陈振锋, 等. 白花丹化学成分和药理活性研究进展 [J]. 中草药, 2007, 38(2): 289-293.
- [2] 中华人民共和国卫生部药材标准·维吾尔药分册 [S]. 1999.
- [3] 云南省中药材标准·第四册 [S]. 2005.
- [4] 广西中药材标准·第四册 [S]. 1992.
- [5] 韦燕飞, 李景强, 张志伟, 等. 白花丹醌对瘦素刺激的人肝星状细胞周期及其相关蛋白表达的影响 [J]. 中草药, 2012, 43(9): 1776-1780.
- [6] 史岑慧. 白花丹治疗类风湿性关节炎的实验研究 [D]. 广州: 广东中医药大学, 2013.
- [7] 朱芳, 伍钢, 何远桥, 等. 白花丹醌对肝癌细胞 HepG2 增殖及血管内皮生长因子表达的影响 [J]. 中草药, 2010, 41(5): 775-778.
- [8] 黄慧学. 白花丹醌脂质体给药系统的研究 [D]. 南宁: 广西医科大学, 2008.
- [9] Tiwari S B, Pai R M, Udupa N. Temperature sensitive liposomes of plumbagin: Characterization and *in vivo* evaluation in mice bearing melanoma B16F1 [J]. *J Drug Target*, 2002, 10(8): 585-591.
- [10] Aithal B K. Formulation of plumbagin loaded long circulating pegylated liposomes: Evaluation in C57BL/6J mice bearing B16F1 melanoma [J]. *Drug Deliv*, 2011, 18(7): 511-522.
- [11] Rayabandla S K M, Aithal K, Anandam A, et al. Preparation, *in vitro* characterization, pharmacokinetic, and pharmacodynamic evaluation of chitosan-based plumbagin microspheres in mice bearing B16F1 melanoma [J]. *Drug Deliv*, 2010, 17(3): 103-113.
- [12] Dandawate P, Vemuri K, Venkateswara S K, et al. Synthesis, characterization, molecular docking and anti-tubercular activity of plumbagin-isoniazid analog and its β -cyclodextrin conjugate [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2014, 24(21): 5070-5075.
- [13] 魏燕, 张永生, 郑杭生, 等. 盐酸青藤碱传递体的制备及其对大鼠类风湿性关节炎的药效评价 [J]. 中草药, 2017, 48(23): 4872-4879.
- [14] 毛雨婷, 纪宏宇, 郑东友, 等. 新型脂质体在经皮给药系统中的应用 [J]. 中国药师, 2015, 18(12): 2141-2144.
- [15] 王娟, 郑杭生, 魏燕, 等. 盐酸青藤碱挥发油边缘活化 PEG 修饰传递体的离体皮肤渗透研究 [J]. 中草药, 2016, 47(20): 3602-3609.
- [16] 李莎莎, 宋艳丽, 危红华, 等. 传明酸传递体的制备及其性质考察 [J]. 中草药, 2013, 44(22): 3141-3146.
- [17] Khan M A, Pandit J, Sultana Y, et al. Novel carbopol-based transfersomal gel of 5-fluorouracil for skin cancer treatment: *In vitro* characterization and *in vivo* study [J]. *Drug Deliv*, 2015, 22(6): 795-802.
- [18] Shamma R N, Elsayed I. Transfersomal lyophilized gel of buspirone HCl: Formulation, evaluation and statistical optimization [J]. *J Lipos Res*, 2013, 23(3): 244-254.
- [19] Wasankar S R. Formulation and development of liposomal gel for topical drug delivery system [J]. *Int J Pharm Sci Res*, 2012, 3(11): 4461-4474.
- [20] Widyanati P, Jufri M, Elya B. Formulation and penetration study of liposome gel xanthone of extract mangosteen pericarp (*Garcinia mangostana* L.) [J]. *Int J Pharm Sci Rev Res*, 2014, 27(2): 1-6.
- [21] 雷伟, 余楚钦, 林华庆, 等. Box-Behnken 响应面法优化他克莫司传递体制备工艺 [J]. 医药导报, 2014, 33(3): 355-360.
- [22] 曾灿丽. 盐酸去氢骆驼蓬碱传递体透皮给药系统及泡囊透皮给药系统的研究 [D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2013.
- [23] 陈雯雯, 云琦, 陶亮, 等. 小茴香挥发油贴剂体外释放和透皮性能的研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2016, 28(1): 65-70.
- [24] 郭红叶, 伊博文, 闫小平, 等. 新型辅料卡波姆在凝胶剂中应用现状 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(17): 372-374.
- [25] 熊欣, 刘淑芝, 项佳音, 等. 新型载体经皮凝胶剂的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(22): 244-249.
- [26] 熊蕊, 吴方建. 经皮给药系统中新型载体的应用 [J]. 中国药师, 2017, 20(12): 2233-2237.