

马钱子总碱-白芍总苷脂质立方液晶纳米粒制备及体外评价

刘丽丽^{1,2}, 史焜女¹, 方 蕾¹, 徐玲霞¹, 金 晨¹, 管咏梅¹, 朱卫丰¹, 陈丽华^{1*}

1. 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

2. 江西中医药大学科技学院, 江西 南昌 330004

摘要: 目的 制备马钱子总碱(TASS)-白芍总苷(TGP)脂质立方液晶纳米粒(TASS-TGP LLCN), 并考察其体外经皮吸收行为。方法 运用前体注入法制备 TASS-TGP LLCN, 采用超滤离心法测定包封率, 以包封率为指标采用均匀设计优化 TASS-TGP LLCN 处方, 并对优化后制备的 TASS-TGP LLCN 基本性能进行评价。同时, 采用泊洛沙姆 407(F127)作为凝胶基质制备凝胶, 运用 Franz 扩散池法比较 TASS-TGP LLCN 凝胶和 TASS-TGP 普通凝胶的体外经皮渗透特性, 初步考察 TASS-TGP LLCN 凝胶的经皮渗透行为。结果 TASS-TGP LLCN 的最佳制备处方为甘油单油酸酯(GMO) 1.0 g, F127 0.25 g, 分散相 60 mL, 马钱子碱、土的宁及芍药苷包封率均大于 50%, 制剂质量评价显示制得的纳米粒平均粒径为 (245.3 ± 16.4) nm, pH 值 6.62, 在透射电镜下呈立方体结构, 大小均一; 透皮实验显示, TASS-TGP LLCN 凝胶的 24 h 累积透过量、渗透速率及皮肤滞留量均大于 TASS-TGP 普通凝胶。结论 TASS-TGP LLCN 呈现促渗和皮肤贮库的双重效应, 具有潜在的开发前景。

关键词: 脂质立方液晶纳米粒; 马钱子总碱; 白芍总苷; 体外评价; 经皮渗透; 前体注入法; 超滤离心法; 包封率; 均匀设计; 凝胶; 马钱子碱; 土的宁; 芍药苷

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)17-4076-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.17.011

Preparation and *in vitro* evaluation of total alkaloids of *Strychni Semen*-total glucosides of paeony lipid-based cubic liquid crystalline nanoparticles

LIU Li-li^{1,2}, SHI Tian-nv¹, FANG Lei¹, XU Ling-xia¹, JIN Chen¹, GUAN Yong-mei¹, ZHU Wei-feng¹, CHEN Li-hua¹

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

2. College of Science and Technology, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China

Abstract: Objective To prepare total alkaloids of *Strychni Semen* (TASS) - total glucosides of paeony (TGP) lipid-based cubic liquid crystalline nanoparticles (TASS-TGP LLCN) and investigate its percutaneous absorption behavior. **Methods** TASS-TGP LLCN was prepared by precursor injection method, and the encapsulation efficiency (EE) was determined by ultrafiltration centrifugation. The prescription of TASS-TGP LLCN was optimized by uniform design with the encapsulation efficiency as the index, and the basic properties of the optimized TASS-TGP LLCN were evaluated. Meanwhile, Poloxamer 407 (F127) was used as matrix to prepare gel, Franz diffusion method was used to compare the *in vitro* percutaneous permeability of TASS-TGP LLCN gel with TASS-TGP ordinary gel. **Results** The optimal formula of TASS-TGP LLCN was glycerol monooleate (GMO) 1.0 g, F127 0.25 g, dispersed phase 60 mL. The EE of brucine, strychnine and paeoniflorin were all more than 50%, the average particle size was about (245.3 ± 16.4) nm, the pH value was 6.62, and the cubic structure was uniform in size under transmission electron microscope. The cumulate osmotic quantities in 24 h, the permeation rate and the skin retention volume of TASS-TGP LLCN gel were all better than ordinary gel of TASS-TGP. **Conclusion** TASS-TGP LLCN has dual effects of promoting permeability and skin reservoir, which has a potential development prospect.

收稿日期: 2019-05-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81760717); 国家自然科学基金资助项目(81460606); 江西省教育厅科学技术研究项目(GJJ171541)

作者简介: 刘丽丽(1985—), 女, 博士, 讲师, 研究方向为中药新剂型与新技术研究。Tel: 15879075884 E-mail: liulili1985@163.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

Key words: lipid-based cubic liquid crystalline nanoparticles (LLCN); total alkaloids of *Strychni Semen* (TASS); total glucosides of paeony (TGP); evaluation *in vitro*; percutaneous penetration; precursor injection method; ultrafiltration centrifugation; encapsulation efficiency; uniform design; gel; brucine; strychnine; paeoniflorin

马钱子始载于《本草纲目》，古人多为外用，用于痈疽初起、瘰癧结核及关节肿痛等。马钱子的主要成分为生物碱，质量分数约 1.5%~5%，马钱子碱和土的宁既是有效成分也是有毒成分，约占马钱子总生物碱（马钱子总碱，total alkaloids of *Strychni Semen*, TASS）的 70%^[1-2]。白芍为毛茛科芍药属植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根，味苦、酸、性微寒，归肝经，功能平肝止痛、养血收阴。白芍总苷（total glucosides of paeony, TGP）为其主要的药效成分^[3]。

“中医外治”法是治疗疼痛、炎症等风湿痹症最常用、最有效的给药方式之一。马钱子、白芍均具有较强的抗炎作用，在现代治疗风湿性关节炎、类风湿性关节炎等风湿痹症的外用药物制剂中常配伍应用^[4]。课题组前期研究结果显示，马钱子与白芍配伍经皮给药呈现一定的“增效减毒”效应^[5]。

脂质立方液晶纳米粒（lipid-based cubic 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，独特的内部结构使其具有多样化的包裹性，能够同时包封水溶性、脂溶性及两亲性药物分子^[6]。但研究多集中于对单一成分的包封^[7-15]，近年来出现了对多种混合成分的包封，但也多为溶解性质相似或同类型成分^[16-17]。目前，尚未见亲水亲脂复合型液晶纳米粒的文献报道。本实验尝试将 TASS 及 TGP 同时包封于 LLCN 中，制备成亲水亲脂复合型液晶纳米凝胶，对其新剂型进行制剂学研究及经皮转运行为评价，旨在建立马钱子总碱-白芍总苷脂质立方液晶纳米粒（TASS-TGP LLCN）的制备方法，同时开展体外透皮行为比较，为含马钱子新制剂的开发奠定基础。

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；色谱柱为 Gimini C₁₈（250 mm×4.6 mm，5 μm），美国 Phenomenex 公司；BSA 124S 万分之一及 BT 25S 十万分之一电子分析天平，北京赛多利斯仪器系统有限公司；EPED 超纯水仪，南京易普易达科技发展有限公司；ZNCL-BS 智能磁力搅拌器，西安安泰仪器科技有限公司；JY92-IIN 超

声波细胞粉碎机，宁波新艺超声设备有限公司；Nano-S 激光纳米粒度仪，美国马尔文公司；Tecnai G2 透射电子显微镜，美国 FEI 公司；TT-6D Franz 扩散池，天津正通科技有限公司；TK-20B 透皮扩散试验仪，上海锴凯科技贸易有限公司。

1.2 试药

TASS 提取物，自制，经 HPLC 测定，马钱子碱质量分数为 16.97%、土的宁质量分数为 34.05%；TGP 提取物，自制，经 HPLC 测定，芍药苷质量分数为 52.84%；聚乙二醇 400（PEG400），西陇化工股份有限公司；泊洛沙姆 407（F127），BASF 公司，批号 WPMI556B；马钱子碱对照品，50 mg/支，质量分数 98%以上，江西本草天工有限公司，批号 BCTG-0553；土的宁对照品，50 mg/支，质量分数 98%以上，江西本草天工有限公司，批号 BCTG-0260；芍药苷对照品，20 mg/支，质量分数以 95.2%计，中国食品药品检定研究院，批号 110736-201640；甘油单油酸酯（GMO），西亚试剂有限公司，质量分数大于 99%；磷酸二氢钾，分析纯，国药集团化学试剂有限公司；庚烷磺酸钠，色谱纯，上海展云化工有限公司；无水乙醇，分析纯，西陇科学股份有限公司；甲醇及乙腈，色谱纯，美国 Tedia 公司。

1.3 实验动物

清洁级 KM 小鼠，雄性，体质量为 18~22 g，购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司，生产许可证号 SCXK（湘）2016-0002。

2 方法与结果

2.1 TASS-TGP LLCN 的制备

精密称取适量 GMO 于 50 mL 烧杯中，分别加入处方量的 TASS 及无水乙醇溶液 20 mL，超声处理 15 min，使其充分溶解，作为 A 相；精密称取适量 F127 于 100 mL 烧杯中，分别加入处方量的 TGP 及超纯水适量，超声 15 min，使其充分溶解，作为 B 相；将 A 相缓缓滴加至 B 相中，以 750 r/min 转速于 50 °C 下磁力搅拌 3 h，再于细胞超声破碎仪上超声破碎 5 min（超声功率为 150 W，5 s/次，每次间隔 5 s），即得 TASS-TGP LLCN。

2.2 TASS-TGP LLCN 含量测定方法的建立

2.2.1 马钱子碱及土的宁混合对照品溶液的制备

精密称取马钱子碱及土的宁对照品适量,置于25 mL量瓶中,加入甲醇适量,超声处理加速溶解,放冷后加甲醇稀释定容至刻度,混匀即得质量浓度均为200 $\mu\text{g/mL}$ 的马钱子碱及土的宁混合对照品溶液。

2.2.2 芍药苷对照品溶液的制备 精密称取芍药苷对照品适量,置于25 mL棕色量瓶中,加入甲醇适量,超声处理加速溶解,放冷后用甲醇稀释定容至刻度,混匀即得质量浓度为213 $\mu\text{g/mL}$ 的芍药苷对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密量取 TASS-TGP LLCN 1 mL,置5 mL棕色量瓶中,加入甲醇超声处理30 min,并定容至刻度,摇匀,微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.4 马钱子碱及土的宁色谱条件 Agilent1260型高效液相色谱仪,色谱柱为 Phenomenex Gemini C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm),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,缓冲盐用10%磷酸调pH 2.8)-乙腈(79:21),检测波长为260 nm,体积流量1 mL/min,柱温30 $^{\circ}\text{C}$,进样量20 μL ,理论板数应不低于5 000。

2.2.5 芍药苷色谱条件 Agilent1260型高效液相色谱仪,色谱柱为 Phenomenex Gemini C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm),检测波长为230 nm,流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液(14:86),体积流量1 mL/min,进样量20 μL ,柱温30 $^{\circ}\text{C}$,理论板数按芍药苷峰计算应不低于2 000。

2.2.6 线性关系考察 分别精密量取马钱子碱及土的宁混合对照品溶液、芍药苷对照品溶液0.1、0.2、0.5、1.0、2.0 mL置于5 mL棕色量瓶中,分别用甲醇定容至刻度,混匀,取20 μL 进样,以峰面积积分值为纵坐标(Y),质量浓度为横坐标(X)进行线性回归,得芍药苷的回归方程 $Y=15.76 X+21.79$, $r=0.999 5$,马钱子碱的回归方程为 $Y=14.11 X-19.45$, $r=0.999 5$,土的宁的回归方程为 $Y=20.45 X-27.89$, $r=0.999 5$,线性范围分别为芍药苷4.26~213.00 $\mu\text{g/mL}$,马钱子碱2.00~200.00 $\mu\text{g/mL}$,土的宁2.00~200.00 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.2.7 精密度试验 按“2.2.4”“2.2.5”项下色谱条件,分别精密量取上述马钱子碱及土的宁混合对照品溶液与芍药苷对照品溶液,连续进样6次,测定3者的峰面积,结果显示马钱子碱、土的宁及芍药苷的峰面积RSD分别为0.19%、0.12%、0.15%,结

果表明试验仪器精密度良好。

2.2.8 稳定性试验 取同一份 TASS-TGP LLCN,按照“2.2.3”项下方法处理,分别于0、4、8、10、12 h进样检测,结果马钱子碱、土的宁及芍药苷的峰面积RSD分别为1.24%、1.05%、0.60%,结果表明供试品溶液在12 h内稳定性良好。

2.2.9 重复性试验 按“2.2.3”项下方法平行制备6份供试品溶液,按“2.2.4”“2.2.5”项下色谱条件检测,结果马钱子碱、土的宁和芍药苷质量浓度RSD分别为1.82%、0.58%及0.83%,结果表明该方法重复性良好。

2.2.10 加样回收率试验 分别精密量取9份已测定的 TASS-TGP LLCN 各1 mL,置于5 mL棕色量瓶中,分别加入相当于样品含量80%、100%及120%对照品溶液,按“2.2.3”项下方法处理,依法测定,结果显示马钱子碱、土的宁及芍药苷的平均加样回收率分别为93.12%、94.84%、101.00%,RSD分别为1.86%、1.92%、1.61%,表明该方法准确度符合要求。

2.3 超滤离心法测定 TASS-TGP LLCN 包封率及载药量

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LLCN的包封率^[18]。精密量取0.4 mL TASS-TGP LLCN置于YM-100超滤离心管中,4 000 r/min离心15 min。下层滤液为澄清溶液,表明超滤管能把乳白色的LLCN的材料截留。分别精密量取 TASS-TGP LLCN 和下层液体0.1 mL,用甲醇定容至2 mL,测定两液中马钱子碱、土的宁及芍药苷的含量,计算包封率。

包封率=(LLCN 药物总含量-游离药物含量)/LLCN 药物总含量

载药量=(脂质立方液晶纳米粒药物总量-游离药物量)/(脂质立方液晶纳米粒包封药物量+载体材料用量)

2.4 单因素考察 TASS-TGP LLCN 处方

2.4.1 载体用量的考察 精密称取0.5、1.0、1.5 g GMO,按“2.1”项下方法分别制备 TASS-TGP LLCN,其包封率结果见表1。实验结果显示,载体用量对马钱子碱、土的宁及芍药苷的包封率影响均较大,尤其是对芍药苷包封率的影响较大,载体用量为1.0 g时3者包封率均较高。

2.4.2 分散相用量的考察 分散相用量分别为40、60、80 mL,按“2.1”项下方法分别制备 TASS-TGP LLCN,其包封率结果见表2。实验结果显示,分散

表 1 不同载体用量下马钱子碱、土的宁及芍药苷包封率测定结果

Table 1 Encapsulation efficiency determination of brucine, strychnine and paeoniflorin by different dosages of carrier materials

载体 用量/g	包封率/%		
	马钱子碱	土的宁	芍药苷
0.5	46.50	56.82	22.58
1.0	58.69	59.44	49.80
1.5	55.99	61.25	45.14

表 2 不同分散相用量下马钱子碱、土的宁及芍药苷包封率测定结果

Table 2 Encapsulation efficiency determination of brucine, strychnine and paeoniflorin by different dosages of dispersed phases

分散相 用量/mL	包封率/%		
	马钱子碱	土的宁	芍药苷
40	47.08	53.62	38.30
60	55.93	62.52	51.24
80	58.83	60.79	39.73

相用量为 60 mL 时，马钱子碱、土的宁及芍药苷 3 者的包封率均较高。

2.4.3 F127 用量的考察 F127 用量分别为 0.12、0.24、0.36 g，按“2.1”项下方法分别制备 TASS-TGP LLCN，其包封率结果见表 3。实验结果显示，随着 F127 用量的不断增加，马钱子碱、土的宁及芍药苷 3 者包封率均不断增大。

2.4.4 药物用量的考察 实验室前期研究显示马钱子与白芍 1:6 配伍比例下“减毒增效”效果最佳^[5]，因此本实验中 TASS 与 TGP 用量比例为 1:3.6（折算成原药材比例为马钱子-白芍 1:6），两者用量总和分别相当于 GMO 用量的 5%、7%、10%、15%、20%、25%。按“2.1”项下方法分别制备 TASS-TGP LLCN，其包封率结果见表 4。实验结果显示药载比

表 3 不同 F127 用量下马钱子碱、土的宁及芍药苷包封率测定结果

F127 用量/g	包封率/%		
	马钱子碱	土的宁	芍药苷
0.12	52.67	58.98	43.57
0.24	58.53	62.01	48.71
0.36	60.94	62.22	55.68

表 4 不同药物用量下马钱子碱、土的宁及芍药苷包封率
Table 4 Encapsulation efficiency determination of brucine, strychnine and paeoniflorin by different dosages of drug loading ratio

药载比/%	包封率/%		
	马钱子碱	土的宁	芍药苷
5	13.25	27.25	23.79
7	25.00	34.88	29.36
10	29.06	36.37	39.98
15	33.88	47.73	46.80
20	58.67	55.11	53.36
25	56.83	52.42	40.70

对马钱子碱、土的宁及芍药苷的包封率影响较大，随着投药量的不断增大，3 者的包封率均呈上升趋势，但当药载比达到 25% 时，3 者包封率均下降，说明投药量过大时，可能会破坏液晶的内部结构。

2.5 均匀设计优化 TASS-TGP LLCN 处方

2.5.1 因素与水平的确定 由单因素考察结果可知，药载比（ X_1 ）、F127 用量（ X_2 ）及分散相用量（ X_3 ）这 3 个因素对包封率的影响较大，固定 GMO 用量为 1.0 g，选取以上 3 个因素 4 个水平，采用均匀设计以 TASS-TGP LLCN 的包封率（马钱子碱、土的宁、芍药苷的包封率分别用 Y_1 、 Y_2 、 Y_3 表示）和载药量（马钱子碱、土的宁、芍药苷的载药量分别用 Y_4 、 Y_5 、 Y_6 表示）为评价指标进行综合加权评分 [Y , $Y=(Y_1/Y_{1\max}+Y_2/Y_{2\max}+Y_3/Y_{3\max}+Y_4/Y_{4\max}+Y_5/Y_{5\max}+Y_6/Y_{6\max})/6$]，优化 TASS-TGP LLCN 最优处方工艺。具体因素水平表见表 5。

根据 $U_8(8^3)$ 均匀设计表，将各因素的水平数进行合并： $\{1,2\}=1'$ ； $\{3,4\}=2'$ ； $\{5,6\}=3'$ ； $\{7,8\}=4'$ ，具体实验安排及实验结果见表 6。

2.5.2 数据处理 通过 DPS V7.05 数据处理系统，结合实验结果，进行 2 次多项式逐步回归拟合，获得以下方程： $Y=-11.403\ 7+43.007\ 8\ X_2+0.161\ 1\ X_3+65.861\ 1\ X_1^2-66.152\ 4\ X_1X_2-0.506\ 4\ X_2X_3$ ，其

表 5 因素水平表

Table 5 Factor and level schedule

水平数	药载比/%	F127 用量/g	分散相用量/mL
1	12	0.25	45
2	16	0.30	55
3	20	0.35	65
4	24	0.40	75

表 6 均匀设计试验安排及结果

Table 6 Uniform design experiment schedule

实验号	$X_1/\%$	X_2/g	X_3/mL	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$	$Y_3/\%$	$Y_4/\%$	$Y_5/\%$	$Y_6/\%$	Y
1	5 (3')	8 (4')	3 (2')	56.88	46.38	57.73	0.33	0.54	3.69	0.879 7
2	4 (2')	1 (1')	6 (3')	51.12	47.91	29.72	0.24	0.45	1.55	0.627 2
3	1 (1')	3 (2')	4 (2')	47.67	49.65	35.60	0.17	0.35	1.39	0.576 3
4	2 (1')	7 (4')	7 (4')	31.81	43.19	44.10	0.11	0.30	1.72	0.516 8
5	7 (4')	2 (1')	2 (1')	43.62	52.35	41.15	0.31	0.74	3.17	0.820 6
6	8 (4')	6 (3')	5 (3')	48.23	55.21	34.43	0.34	0.78	2.66	0.821 0
7	6 (3')	4 (2')	8 (4')	53.68	56.44	49.12	0.31	0.66	3.16	0.863 4
8	3 (2')	5 (3')	1 (1')	61.94	66.52	54.43	0.29	0.63	2.80	0.893 7

中 X_1 为药载比 (%), X_2 为 F127 用量 (g), X_3 为分散相用量 (mL), Y 为各实验组包封率及载药量的综合评分。回归模型方差分析结果表明, 该试验模型具有高度的显著性 ($P < 0.05$), 剩余标准差为 0.021 9, F 值为 61.300 0, 显著性 P 值为 0.016 1, 相关系数 (r) = 0.996 7, 说明该模型能够很好地反映响应值的变化, 拟合度较好。可以用此模型来分析和预测处方结果。

分析自变量和因变量间关系可以得出, X_1 (药载比) 与综合得分呈曲线相关, X_2 (F127 用量) 及 X_3 (分散相用量) 与综合得分呈线性关系。说明药载比、F127 用量及分散相用量均是影响马钱子碱、土的宁及芍药苷包封率及载药量的主要因素。

2.5.3 优化及处方验证 通过 DPS V7.05 数据处理系统的分析结果可知, 系统选出的最优组合为 GMO 用量为 1.0 g; TASS 用量为 0.043 g, TGP 用量为 0.157 g, F127 用量为 0.25 g, 分散相用量为 60 mL。按照优选的最佳工艺条件重复 3 次试验, 结果见表 7。

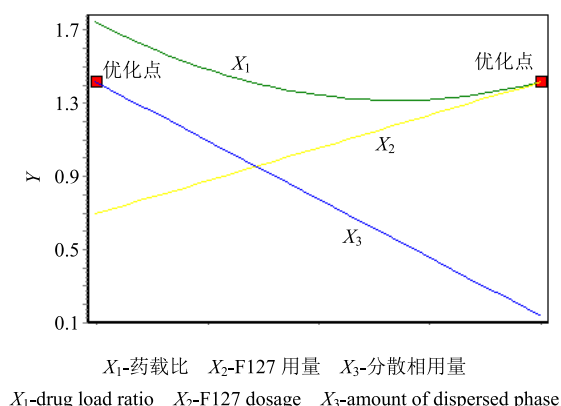
图 1 各因素与 Y 关系图

Fig. 1 Relationship between factors and comprehensive score

表 7 处方工艺验证结果

Table 7 Validation results of prescription process

试验号	包封率/%			载药量/%		
	马钱子碱	土的宁	芍药苷	马钱子碱	土的宁	芍药苷
1	61.90	66.84	55.62	0.36	0.78	3.56
2	59.85	64.03	57.37	0.35	0.74	3.67
3	62.76	67.87	54.29	0.36	0.79	3.48

2.6 TASS-TGP LLCN 的质量评价

2.6.1 pH 值 平行制备 TASS-TGP LLCN 3 批, 分别测定其 pH 值, 结果 pH 值分别为 6.56、6.68、6.63, 平均值为 6.62, RSD 为 0.91%。

2.6.2 粒径分布 取 TASS-TGP LLCN 适量, 用水适当稀释后, 用马尔文粒度仪测定粒径分布, 具体结果见图 2。结果表明制得的纳米粒平均粒径为 $(245.3 \pm 16.4) \text{ nm}$, 多分散指数 (polydispersity index, PDI) 为 0.24 ± 0.10 。

2.6.3 微观形态 取 TASS-TGP LLCN 10 μL 滴加于铜网上, 滴加 1.0% 的磷钨酸溶液染色, 用透射电子显微镜观察, 结果见图 3。可直观看出 TASS-TGP LLCN 呈现立方体形态, 边界分明, 大小均一。

2.7 TASS-TGP LLCN 凝胶离体经皮吸收行为研究

2.7.1 供试品的制备 精密称取 1.0 g GMO 于 50 mL 烧杯中, 分别加入 0.043 g TASS 及无水乙醇溶

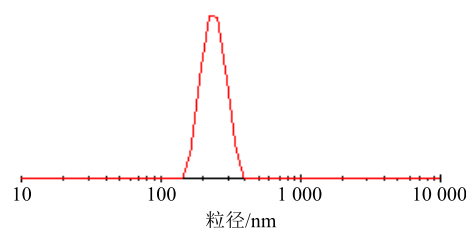


图 2 TASS-TGP LLCN 的粒径分布

Fig. 2 Distribution of particle size of TASS-TGP LLCN

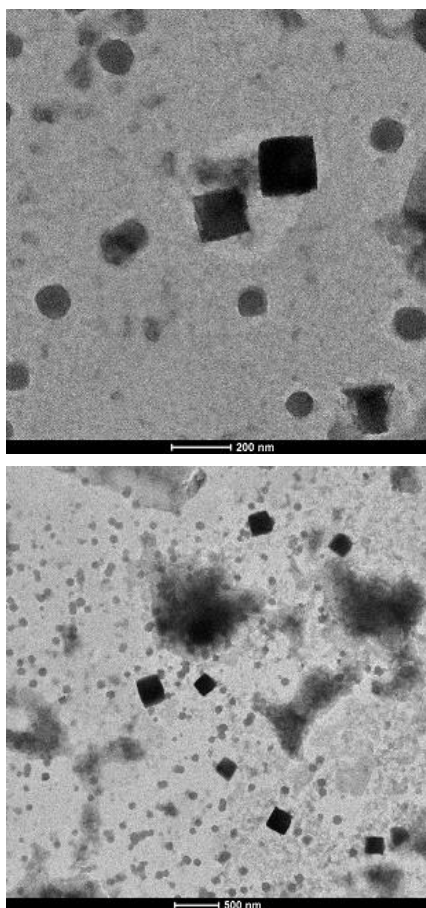


图 3 TASS-TGP LLCN 透射电镜图

Fig. 3 Transmission electron micrograph of TASS-TGP LLCN

液 20 mL, 超声处理 15 min, 使其充分溶解, 作为 A 相; 精密称取 0.25 g F127 于 100 mL 烧杯中, 分别加入 0.157 g TGP 及超纯水 60 mL, 超声 15 min, 使其充分溶解, 作为 B 相; 将 A 相缓缓滴加至 B 相中, 以 750 r/min 转速于 50 °C 下磁力搅拌 3 h,

再于细胞超声破碎仪上超声破碎 5 min (超声功率为 150 W, 5 s/次, 每次间隔 5 s), 即得 TASS-TGP LLCN 混悬液, 加入 25% F127, 于 4 °C 冰箱中放置过夜, 24 h 后取出, 恢复室温, 即得 TASS-TGP LLCN 凝胶。

精密称取 0.043 g TASS, 加入 1 g PEG400, 玻棒持续搅拌, 将 0.157 g TGP 适量溶解于双蒸水中, 将 TGP 溶液缓缓滴加入 TASS PEG400 混合液中, 持续搅拌, 混匀, 加入 25% F127, 于 4 °C 冰箱中放置过夜, 24 h 后取出, 恢复室温, 即得 TASS-TGP 普通凝胶。

2.7.2 离体小鼠皮肤的制备 健康雄性 KM 小鼠, 脱颈处死后, 剃除腹部毛发, 快速分离腹部皮肤, 用脱脂棉擦除皮下脂肪组织及粘连物, 生理盐水冲洗, 滤纸吸干后用铝箔纸包裹, 于 -20 °C 冷冻保存, 于 24 h 内使用。

2.7.3 渗透扩散装置 离体透皮渗透扩散装置采用改良 Franz 扩散池。扩散面积 1.85 cm², 接收池容积为 12 mL, 恒温水浴温度保持在 (37.0±0.5) °C, 转速设定为 150 r/min, 每次取样量为 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, 置于 Franz 扩散池供给池与接收池结合处, 弹簧夹固定, 实验前先用接收液平衡 30 min 后, 分别取 TASS-TGP 凝胶、TASS-TGP LLCN 凝胶 0.5 g 均匀地涂抹于皮肤表面, 每组平行 6 份。分别于 2、4、6、8、10、12、24 h 精密移取接收液 1 mL (每次取样后均补加等量的空白接收液), 将取出的接收液于 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, HPLC 测定马钱子碱、土的宁及芍药苷的含量, 并计算 Q_n 。结果见表 8。

表 8 马钱子碱、土的宁及芍药苷的 Q_n

Table 8 Relationship of cumulative penetration amount of brucine, strychnine and paeoniflorin

t/h	TASS-TGP 普通凝胶 $Q_n/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2})$			TASS-TGP LLCN 凝胶 $Q_n/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2})$		
	马钱子碱	土的宁	芍药苷	马钱子碱	土的宁	芍药苷
2	0.055 7±0.013 5	0.356 8±0.076 6	0.453 4±0.076 5	0.086 8±0.014 0	0.238 2±0.175 3	0.440 9±0.070 2
4	0.154 2±0.038 7	0.457 3±0.228 5	0.710 3±0.226 3	0.302 3±0.205 0*	1.046 6±0.429 8*	0.749 2±0.341 9
6	0.220 5±0.180 0	0.827 8±0.221 9	0.742 8±0.263 8	0.492 8±0.338 0	2.137 6±0.973 7**	0.990 4±0.374 0
8	0.310 3±0.072 6	1.340 0±0.444 9	0.978 1±0.311 1	0.780 4±0.235 7*	3.158 9±1.414 4**	1.298 4±0.658 9
10	0.360 1±0.202 2	1.972 5±0.329 1	1.273 5±0.330 6	0.908 1±0.106 6**	4.244 2±1.766 1	1.525 0±0.754 7
12	0.413 1±0.195 4	2.477 5±0.380 8	1.486 5±0.317 4	0.973 0±0.224 4*	5.260 7±1.993 0**	1.718 5±0.653 5
24	0.718 8±0.445 8	5.756 6±0.803 5	1.280 8±0.566 8	1.552 5±0.322 8**	11.087 4±3.494 3**	2.482 2±0.809 4**

与普通凝胶组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs ordinary gel group

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

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, V_i 为取样体积, C_i 为第 i 次取样时接收液中药物的质量浓度

以药物的 24 h 累积透过量 (Q_{24}) 对取样时间 (t) 作图, 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)。由结果可知, LLCN 凝胶和普通凝胶中马钱子碱的 Q_{24} 分别为 1.552 5、0.718 8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, J_s 分别为 0.093 4、0.030 5 $\mu\text{g}/(\text{cm}^2\cdot\text{h})$, 土的宁的 Q_{24} 分别为 11.087 4、5.756 6

$\mu\text{g}/\text{cm}^2$, J_s 分别为 0.498、0.256 5 $\mu\text{g}/(\text{cm}^2\cdot\text{h})$; 芍药苷的 Q_{24} 分别为 2.482 2、1.280 8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, J_s 分别为 0.090 9、0.101 3 $\mu\text{g}/(\text{cm}^2\cdot\text{h})$ 。结果见表 9。

2.7.5 皮肤滞留量 (Q_s) 试验 Q_{24} 实验结束后, 取下皮肤, 生理盐水洗净, 将给药部分皮肤剪碎后, 加入甲醇 1 mL, 涡旋混合 5 min 后, 超声 30 min, 于 4 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 测定马钱子碱、土的宁及芍药苷的含量, Q_s 按 $Q_s = VC/A$ (A 为有效扩散面积, V 为溶解样品体积, C 为测得的马钱子碱、土的宁及芍药苷的质量浓度) 计算, 结果见表 9。

表 9 马钱子碱、土的宁及芍药苷的渗透动力学参数

Table 9 Percutaneous penetration kinetic parameters of brucine, strychnine, and paeoniflorin

成分	Q - t 方程	r	$Q_{24}/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2})$	$J_s/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1})$	$Q_s/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2})$
A	$Q=0.064\ 7\ t+0.118\ 1$	0.966 7	$1.552\ 5\pm0.322\ 8$	0.093 4	$0.085\ 6\pm0.022\ 6$
B	$Q=0.498\ t-0.813\ 4$	0.999 7	$11.087\ 4\pm3.494\ 3$	0.498 0	$0.581\ 4\pm0.185\ 0$
C	$Q=0.090\ 9\ t+0.458\ 3$	0.975 0	$2.482\ 2\pm0.809\ 4$	0.090 9	$0.159\ 9\pm0.030\ 3$
D	$Q=0.029\ t+0.014\ 1$	0.947 9	$0.718\ 8\pm0.445\ 8$	0.030 5	$0.076\ 2\pm0.036\ 5$
E	$Q=0.256\ 5\ t-0.533\ 3$	0.994 5	$5.756\ 6\pm0.803\ 5$	0.256 5	$0.460\ 8\pm0.166\ 3$
F	$Q=0.101\ 3\ t+0.231\ 7$	0.985 3	$1.280\ 8\pm0.566\ 8$	0.101 3	$0.104\ 9\pm0.028\ 6$

A-LLCN 凝胶中的马钱子碱 B-LLCN 凝胶中的土的宁 C-LLCN 凝胶中的芍药苷 D-普通凝胶中的马钱子碱 E-普通凝胶中的土的宁 F-普通凝胶中的芍药苷

A-brucine in LLCN gel group B-strychnine in LLCN gel group C-paeoniflorin in LLCN gel group D-brucine in ordinary gel group E-strychnine in ordinary gel group F-paeoniflorin in ordinary gel group

3 讨论

本实验对 TASS-TGP LLCN 的制备工艺及处方进行筛选优化, 采用前体注入法制备, 选取 GMO 作为载体材料, F127 作为稳定剂, 制得的 TASS-TGP LLCN 中马钱子碱、土的宁及芍药苷的包封率均大于 50%。TASS-TGP LLCN 平均粒径为 (245.3 ± 16.4) nm, 粒径分布较均匀。在透射电镜下, TASS-TGP LLCN 呈现立方体形态, 边界分明, 大小均一。采用 Franz 扩散池法开展 TASS-TGP LLCN 凝胶与 TASS-TGP 普通凝胶的体外经皮吸收行为比较。结果表明, 液晶凝胶中马钱子碱、土的宁及芍药苷的 Q_s 较普通凝胶组均有所增加, 提示立方液晶能增强皮肤贮库效应, 有利于药物的持续释放, 这与课题组前期开展的马钱子总碱 LLCN 的制备及体外评价研究结果相吻合^[19]。

3.1 包封率的测定方法

包封率的测定方法较多, 常用的有超滤离心法、透析膜法、葡聚糖凝胶柱色谱法、微柱离心法等, 由于 TASS 及 TGP 的溶解性质差异较大, 采用透析

膜法及葡聚糖凝胶柱色谱法难度较大, 因此最终选用超滤离心法, 该法操作简便快速, 适用于 TASS-TGP LLCN 包封率的测定。

3.2 制备及处方工艺考察

前期课题组在预试验过程中, 分别对各类载体材料、制备方法、制备工艺参数 (搅拌转速、搅拌温度、搅拌时间、超声功率/样品体积比及超声次数) 等进行了单因素考察优化。其中搅拌温度及搅拌时间对包封率的影响较大, 尤其是对芍药苷的包封率影响极大, 分析原因可能是搅拌温度及搅拌时间与处方中无水乙醇是否驱除完全有直接关系, 无水乙醇在较低温度及较短时间内驱除不完全, 导致包封率较低。但由于温度和光照对芍药苷的稳定性影响较大^[20-22], 综合考虑, 最终将搅拌温度设定为 50 $^{\circ}\text{C}$, 搅拌时间确定为 3 h。

在处方工艺优化过程中, 分别考察了载体用量、药载比、F127 用量及分散相用量对马钱子碱、土的宁及芍药苷包封率及载药量的影响, 并运用均匀设计开展处方工艺优化, 得到最佳制备工艺处方, 马

钱子碱、土的宁及芍药苷的包封率均大于50%，达到实验预期。

3.3 体外经皮吸收行为比较

本实验采用 Franz 扩散池法开展 TASS-TGP LLCN 凝胶与 TASS-TGP 普通凝胶的体外经皮吸收行为比较，结果显示液晶凝胶能一定程度上增加马钱子碱、土的宁及芍药苷的 Q_s ，在皮肤中形成贮库效应。另一方面，从 Q_{24} 及渗透速率的变化规律均显示液晶凝胶较大幅度促进了马钱子碱、土的宁和芍药苷的经皮渗透。值得注意的是马钱子碱及土的宁的 Q_{24} 增大可能导致体内吸收增加，应关注血药浓度是否在治疗窗内，是否会产生不良反应。

最终皮肤贮库效应和促渗效应会使得立方液晶体内经皮吸收呈现怎样的变化，还需进一步深入开展在体经皮吸收行为研究，探索其体内释放规律。

参考文献

- [1] 赵引利, 何燕宁, 杨宇杰, 等. 马钱子及其制剂药动力学研究进展 [J]. 中草药, 2015, 46(11): 1710-1714.
- [2] Liu L, Xiao J, Peng Z H, et al. *In vitro* metabolism of strychnine by human cytochrome P450 and its interaction with glycyrrhetic acid [J]. *Chin Herb Med*, 2012, 4(2): 118-125.
- [3] 厉洪江, 刘翠华, 田明, 等. 白芍总苷胶囊联合依那西普治疗幼年特发性关节炎的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2017, 32(6): 1043-1047.
- [4] 李伟东, 王素霞. 马钱子在痹症的配伍应用 [J]. 陕西中医, 2003, 24(12): 1124-1125.
- [5] 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): 49-53.
- [6] 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]. 中国药理学杂志, 2017, 52(12): 39-44.
- [7] 徐玲霞, 刘水婷, 刘骏, 等. Box-Behnken 效应面法优化吴茱萸次碱脂质液晶纳米粒的处方研究 [J]. 中草药, 2018, 49(21): 5076-5081.
- [8] Esposito E, Cortesi R, Drechsler M. Cubosome dispersions as delivery systems for percutaneous administration of indomethacin [J]. *Pharm Res*, 2005, 22(12): 2063-2173.
- [9] Hundekar Y R, Saboji Dr J K, Patil S M. Preparation and evaluation of diclofenac sodium cubosomes for percutaneous administration [J]. *World J Pharm Pharmaceut Sci*, 2014, 3(1): 523-539.
- [10] Prajapati V, Jain A, Jain R. Treatment of cutaneous candidiasis through fluconazole encapsulated cubosomes [J]. *Drug Deliv Transl Res*, 2014, 4(12): 400-408.
- [11] Jain V, Jain N K. Cubosomes: A tool for percutaneous administration of an antifungal agent [A] // International Conference on Bioencapsulation [C]. Porto: Bioencapsulation Research Group, 2010.
- [12] Peng X S, Zhou Y F, Han K, et al. Characterization of cubosomes as a targeted and sustained transdermal delivery system for capsaicin [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2015, 9(8): 4209-4218.
- [13] 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.
- [14] 苏旬, 贺秀丽, 刘秀菊, 等. 姜黄素脂质立方液晶纳米粒的制备及理化性质研究 [J]. 中药材, 2012, 35(2): 296-299.
- [15] 郭秀君, 刘志东, 黄瑜, 等. 丹酚酸 B 立方液晶纳米粒的制备及大鼠在体肠吸收 [J]. 天津中医药大学学报, 2014, 33(3): 177-180.
- [16] 付建武. 复方姜黄素脂质立方液晶的制备、表征与评价 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2013.
- [17] Kwon T K, Kim J C. *In vitro* skin permeation and anti-atopic efficacy of lipid nanocarriers containing water soluble extracts of *Houttuynia cordata* [J]. *Drug Devel Ind Pharm*, 2014, 40(10): 1350-1357.
- [18] 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.
- [19] 金晨, 陈家乐, 徐玲霞, 等. 马钱子总碱脂质液晶纳米粒的制备和体外评价研究 [J]. 中草药, 2018, 49(22): 5305-5312.
- [20] 闫兴丽, 张建军, 李小燕, 等. 温度对白芍药材, 白芍提取物及乾坤清颗粒成品中芍药苷含量稳定性的影响 [J]. 中草药, 2003, 34(2): 131-132.
- [21] 罗娟, 呼延玲, 刘晓玲. 光照对芍药苷稳定性的影响 [J]. 中国药师, 2011, 14(1): 87-88.
- [22] 解江纯, 刘志东, 田慧, 等. 芍药苷稳定性研究 [J]. 天津中医药, 2010, 27(4): 344-345.