

光甘草定醇质体制备及其生物活性评价

阳天舒¹, 韩晓乐^{1,2}, 孙嘉彬¹, 杨 骏², 谢 燕^{1*}

1. 上海中医药大学公共健康学院, 上海 201203

2. 上海市黄浦区香山中医医院, 上海 200020

摘要: 目的 比较乙醇、丙二醇、混合醇(乙醇-丙二醇 2:8) 3 种柔软剂对制备光甘草定醇质体(GLA-ES)的影响,为难溶性药物的醇质体研究提供柔软剂选择依据。方法 分别选用乙醇、丙二醇、混合醇(乙醇-丙二醇 2:8)作为柔软剂,采用注入-超声结合法制备 GLA-ES,并进行不同 GLA-ES 的形态、粒径、Zeta 电位、包封率、稳定性和体外释药等考察。以黑色素瘤 B16-OVA 细胞内酪氨酸酶活性评价 GLA-ES 抑制黑色素合成能力,采用铁氰化钾还原力实验评估其抗氧化效果,并使用人表皮 HaCaT 细胞和大鼠皮肤进行初步安全性评价。结果 所得 GLA-ES 为黄色半透明液体,具有囊泡状磷脂双分子层结构;光甘草定乙醇醇质体(GLA-Et-ES)、丙二醇醇质体(GLA-PG-ES)和混合醇醇质体(GLA-MA-ES)的平均粒径分别为(34.24±0.29)、(62.31±1.66)、(41.20±1.13) nm, 电位分别为(-41.0±1.8)、(-32.9±0.2)、(-35.8±1.6) mV, 包封率分别为(91.47±2.39)%、(87.33±1.31)%、(91.39±3.59)%,在 4℃放置 20 d 较稳定;其体外释药行为均符合 Higuchi 方程,具有一定缓释效果。与光甘草定混悬液相比, GLA-Et-ES、GLA-PG-ES 和 GLA-MA-ES 对黑色素瘤 B16-OVA 细胞的酪氨酸酶活性抑制率分别提高了 38.07%、19.58%、40.42%;铁氰化钾还原力实验结果也显示 GLA-ES 有较强的体外抗氧化作用;GLA-ES 对正常细胞几乎没有毒性,对大鼠皮肤无刺激性。结论 3 种柔软剂均可制备 GLA-ES,其抑制黑色素生成、抗氧化作用增强,安全性良好,为进一步开发美白护肤产品或医药外用制剂奠定基础。对于光甘草定这类难溶性药物,选择混合醇(乙醇-丙二醇 2:8)作为柔软剂,所制备的醇质体的包封率、稳定性优于单用乙醇或丙二醇。

关键词: 光甘草定;醇质体;包封率;酪氨酸酶活性;抗氧化;柔软剂;安全性;缓释

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)18-4646-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.18.007

Preparation of glabridin ethosomes and their bioactivity evaluation

YANG Tian-shu¹, HAN Xiao-le^{1,2}, SUN Jia-bin¹, YANG Jun², XIE Yan¹

1. School of Public Health, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

2. Shanghai Huangpu District Xiangshan Hospital of TCM, Shanghai 200020, China

Abstract: Objective To compare the effects of softeners including ethanol, propylene glycol and mixed alcohol (ethanol-propylene glycol 2:8) on the preparation of glabridin ethosomes (GLA-ES), and provide the selection basis of the softeners for studying the ethosomes of insoluble drugs. **Methods** GLA-ES were prepared by injection-ultrasonic binding method with ethanol, propylene glycol and mixed alcohol (ethanol-propylene glycol, 2:8) as softeners. The morphology, size, Zeta potential, entrapment efficiency, stability, and *in vitro* drug release of GLA-ES were investigated. Tyrosinase activity on melanoma B16-OVA cells were detected to evaluate the inhibition of GLA-ES on the synthesis of melanin, the experiment of potassium ferricyanide reducing power was performed to evaluate the antioxidant effect of GLA-ES, and human epidermal HaCaT cells and rat skin were used for preliminary safety evaluation. **Results** GLA-ES were yellow translucent liquid, containing vesicular phospholipid bilayer structure, the average particle size of GLA-Et-ES, GLA-PG-ES and GLA-MA-ES were (34.24±0.29), (62.31±1.66) and (41.20±1.13) nm, respectively; The Zeta potential were (-41.0±1.8), (-32.9±0.2) and (-35.8±1.6) mV, the entrapment efficiency were (91.47±2.39)%, (87.33±1.31)% and (91.39±3.59)%, respectively, which had good stability of storage at 4℃ for 20 d, *in vitro* drug release behaviors of GLA-ES fitted Higuchi equation, implying their sustained release properties. Compared with the glabridin suspension, the inhibitory

收稿日期: 2020-04-12

基金项目: 上海市卫计委中医药科技创新项目(ZYKC201701002); 上海市科委优秀学术带头人资助项目(19XD1423700)

作者简介: 阳天舒(1997—)女,在读硕士研究生,研究方向为中药制剂新技术的研究与应用。

Tel: (021)51322381 E-mail: shuyang0122@163.com

*通信作者 谢 燕(1978—),女,博士,研究员,博士生导师,研究方向为中药制剂新技术的研究与应用。

Tel: (021)51322440 E-mail: rosexie_2004@163.com

effects of GLA-Et-ES, GLA-PG-ES and GLA-MA-ES on tyrosinase activity in melanoma B16-OVA cells were increased by 38.07%, 19.58% and 40.42%, respectively. The results of potassium ferricyanide reducing power also showed that GLA-ES had a stronger *in vitro* antioxidant effect than the glabridin suspension; GLA-ES were nearly nontoxic on normal cells and had no irritation to rat skin.

Conclusion GLA-ES can be obtained by three kinds of softeners, which can inhibit the synthesis of melanin and enhance the antioxidant effect with good safety. The present research will provide the basis for further developing skin-whitening cosmetics or pharmaceutical external preparation. For the insoluble drugs such as glabridin, when mixed alcohol (ethanol-propylene glycol) was selected as the softener to prepare ethosome, it exhibited better encapsulation efficiency and stability than that of ethanol or propylene glycol as the softener alone.

Key words: glabridin; ethosome; entrapment efficiency; tyrosinase activity; antioxidant effect; softener; safety; sustained release

光甘草定 (glabridin, GLA) 是从豆科甘草属植物光果甘草 *Glycyrrhiza labra* L. 根及根茎中提取出来的异黄酮类物质^[1], 具有抗氧化、抗色素异常沉积、清除自由基^[2]以及抑制酪氨酸酶活性^[3]等生物活性, 可用于皮肤美白、减轻色素沉着和红斑^[3-4]。但是光甘草定在水中的溶解度仅为 1.5 mg/L^[5], 几乎不溶于水, 致使其生物利用率较低、无法充分发挥生物活性, 限制了其在化妆品及外用皮肤制剂中的广泛应用; 此外, 甘草产地相对固定, 且光甘草定提取率低 (1.1 mg/g^[6]), 采用增加外用制剂中光甘草定的用量来提高其利用率的方法, 成本较高, 可行性较差; 鉴于此, 有必要运用适宜制剂技术来改善光甘草定水溶性以提高其生物利用率。

醇质体 (ethosomes, ES) 是一种新型柔性纳米脂质体, 是由磷脂、水和生物相容性醇如乙醇、丙二醇组成的具有脂质双分子层的囊泡结构, 可以包载亲脂性、两亲性和亲水性物质^[7-8], 具有制备方法简单、囊泡柔软灵活、包封效率高、稳定性高、细胞毒性低等优良特性^[9-10], 可实现皮肤类药物的有效递送。有报道称, 醇质体可装载水难溶性药物, 在改善其溶解性的同时, 还能够提高药物的生物活性^[11]。因此, 为改善光甘草定的水溶性、提高其生物活性, 本实验采用注入-超声结合法制备光甘草定醇质体 (GLA-ES), 并进行粒径大小、分布、形态等表征, 以及稳定性、体外释放度等药剂学评价; 在此基础上, 考察其抑制黑色素生成、抗氧化等生物活性, 并进行安全性评价。以期将为光甘草定有效用于医药外用制剂提供有益参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

MS-H-Pro+型磁力搅拌器, 美国 Scilogex 公司; CP225D 型电子天平, 德国 Sartorius 公司; HZS-H 型水浴振荡器, 哈尔滨东联电子技术开发有限公司; PHS-25 型 pH 计, 上海精密科学仪器有限公司;

5422R 型离心机, 德国 Eppendorf 公司; SCIENTZ-IIID 型超声波细胞粉碎机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; SpectraMax 190 光吸收酶标仪, 美国 Molecular Devices 公司; ZETA SIZER Nano-ZS 型粒径仪, 英国马尔文公司; Agilent 1260 高效液相色谱仪, 美国安捷伦科技有限公司; HT7700 透射电子显微镜 (TEM), 日本日立公司; HL-2 型恒流泵, 上海沪西分析仪器厂有限公司; ESCO CCL-170-B-8 型细胞培养箱, 新加坡 ESCO 公司。

1.2 材料与试剂

光甘草定原料, 质量分数 40%, 南京景竹生物科技有限公司; 光甘草定对照品, 批号 JZ18041702, 质量分数 98%, 陕西绿清生物工程有限公司; B16-OVA 细胞、HaCaT 细胞, 中国科学院上海生科院细胞资源中心; 胎牛血清、PBS、0.25% Trypsin-EDTA, 美国 Gibco 公司; DMEM 高糖培养基, 美国 Life 公司; 卵磷脂, 质量分数 >90%, 阿拉丁试剂 (上海) 有限公司; 十二烷基硫酸钠 (SDS), 陕西九州制药有限责任公司; 左旋多巴, 阿拉丁试剂 (上海) 有限公司; 酪氨酸酶, 美国 Worthington 生物公司; BCA 蛋白检测试剂盒, 上海碧云天生物技术有限公司; MTS 细胞增殖试剂盒, 美国 Promega 公司; 透析袋, 截留相对分子质量 3 500, 上海源叶生物科技有限公司; 羧甲基纤维素钠、氢氧化钠、丙二醇、乙醇、甲醇, 国药集团化学试剂有限公司; 硫化钠、可溶性淀粉, 中国医药集团上海化学试剂公司。

1.3 实验动物

SD 大鼠, 体质量 280~300 g, 上海西普尔-必凯实验动物有限公司。

2 方法与结果

2.1 GLA-ES 制备

采用注入-超声结合法^[12], 分别以乙醇、丙二醇、混合醇 (乙醇-丙二醇 2:8) 为柔软剂制备 GLA-ES。

称取卵磷脂 0.3 g、光甘草定原料 0.2 g，分别加入 4 mL 上述醇溶液使完全溶解；磁力搅拌（700 r/min）下，缓慢注入 6 mL 含 SDS 的水溶液，使处方中 SDS 终质量浓度为 0.1 mg/mL，继续搅拌 5 min，室温放置 30 min 使其充分水化，探针超声（90 W，6 min），离心（4 000 r/min，5 min），取上清，即得光甘草定乙醇醇质体（GLA-Et-ES）、光甘草定丙二醇醇质体（GLA-PG-ES）、光甘草定混合醇醇质体（GLA-MA-ES）。

不添加光甘草定原料，同法制备空白醇质体。

称取光甘草定原料 20 mg，加入 10 mL 0.2% CMC-Na 水溶液，超声分散使混悬均匀，即得光甘草定原料混悬液（GLA suspension）。

2.2 光甘草定的分析方法

2.2.1 光甘草定对照品溶液的制备 精密称取光甘草定对照品适量，置于 10 mL 量瓶中，加少量甲醇使溶解并定容至刻度，摇匀，得到质量浓度为 640 $\mu\text{g/mL}$ 的光甘草定浓配液；移取 0.5 mL 浓配液至 10 mL 量瓶中，用流动相稀释并定容至刻度，即得质量浓度为 32 $\mu\text{g/mL}$ 的光甘草定对照品溶液。

2.2.2 GLA-ES 供试品溶液的制备 精密移取 GLA-ES 0.2 mL，置于 10 mL 量瓶中，加适量甲醇，超声 15 min，放冷，以甲醇定容至刻度，摇匀，取适量离心（13 000 r/min、10 min、4 $^{\circ}\text{C}$ ），取上清，注入高效液相色谱仪进行检测。

取空白醇质体样品，同法制备空白醇质体供试品溶液。

2.2.3 液相色谱条件 色谱柱为 CNW Athena C₁₈（250 mm $\times$ 4.6 mm，5 μm ）；流动相为甲醇-0.2%磷酸水溶液（78:22）；检测波长 280 nm；进样量 20 μL ；柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ ；体积流量 1 mL/min。

由图 1 可知，在该色谱条件下，样品中光甘草定的保留时间与对照品中一致，约为 8.6 min，且被检测峰与其他杂质峰分离度良好，空白醇质体样品无干扰，表明该方法可以用于醇质体中光甘草定的定量分析。

2.3 载药量和包封率测定

采用透析法测定 GLA-ES 包封率^[13]。取“2.1”项下制备的 GLA-ES 1 mL 注入透析袋（截留相对分子质量 3 500）内，浸没于 150 mL 透析介质中，透析 3 h 后，取透析袋内 GLA-ES 按“2.2”项下方法测定其中光甘草定含量（ $M_{\text{包裹}}$ ），同时测定透析前醇质体中光甘草定含量（ $M_{\text{含药量}}$ ），计算 GLA-ES 的

包封率；根据投入的光甘草定与磷脂的总质量（ $M_{\text{总质量}}$ ），计算 GLA-ES 的载药量。GLA-ES 的包封率和载药量结果见表 2。

$$\text{包封率} = M_{\text{包裹}} / M_{\text{含药量}}$$

$$\text{载药量} = M_{\text{包裹}} / M_{\text{总质量}}$$

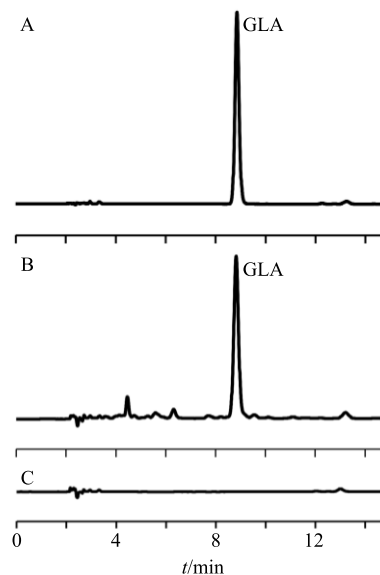


图 1 GLA 对照品 (A)、GLA-Et-ES (B) 和空白醇质体 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of GLA reference substance (A), GLA-Et-ES sample (B) and blank ethosomes (C)

表 2 GLA-ES 包封率和载药量 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Entrapment efficiency and drug loading amount of GLA-ES ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	包封率/%	载药量/%
GLA-Et-ES	91.47 $\pm$ 2.39	2.46 $\pm$ 0.06
GLA-PG-ES	87.33 $\pm$ 1.31	1.77 $\pm$ 0.03
GLA-MA-ES	91.39 $\pm$ 3.59	2.41 $\pm$ 0.09

由表 2 可知，3 种醇质体中光甘草定的包封率均大于 85%，其中乙醇醇质体和混合醇醇质体包封率较高，分别为 91.47%、91.39%，丙二醇醇质体的包封率稍低，为 87.33%；乙醇醇质体和混合醇醇质体的载药量较高，分别为 2.46%、2.41%，丙二醇醇质体的载药量稍低，为 1.77%。可见，乙醇和混合醇比丙二醇更适于制备 GLA-ES，可能是由于浓度适当的无水乙醇增强了双分子层膜的流动性，使双分子层空间增加，从而包封率得到提高^[14]。

2.4 粒径、PDI 和 Zeta 电位测定

取“2.1”项下制备的 GLA-ES 溶液适量，用相应比例的水醇溶液稀释 10 倍后，置于纳米粒度仪测定各醇质体的粒径、PDI 和 Zeta 电位。结果见表 3

和图 2。3 种 GLA-ES 粒径均在 30~70 nm，且呈现出单一正态分布的窄峰，PDI 小于 0.3，说明粒径较小，且分布均一；3 种 GLA-ES 电位都小于 -25 mV，比较稳定；3 种 GLA-ES 外观显示为黄色半透明的液体，略泛淡蓝色乳光。

2.5 GLA-ES 形态学考察

取“2.1”项下制备的 GLA-ES 溶液，加适量纯水稀释后滴加在铜网上，用 2.0% 磷钨酸负染，自然晾干，在 TEM 下观察 GLA-ES 的形态。结果见图 3。

由图 3 可以看出，光甘草定乙醇醇质体、丙二醇醇质体和混合醇醇质体均呈现出类球状囊泡结

构，有可见层纹状结构，与文献报道相符^[15]，粒径在 40 nm 左右，且粒径分布较均一，与粒径仪测定的结果一致。

表 3 GLA-ES 平均粒径、PDI 和 Zeta 电位结果 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

样品	平均粒径/nm	PDI	电位/mV
GLA-Et-ES	34.24 ± 0.29	0.212 ± 0.003	-41.0 ± 1.8
GLA-PG-ES	62.31 ± 1.66	0.275 ± 0.014	-32.9 ± 0.2
GLA-MA-ES	41.20 ± 1.13	0.247 ± 0.005	-35.8 ± 1.6

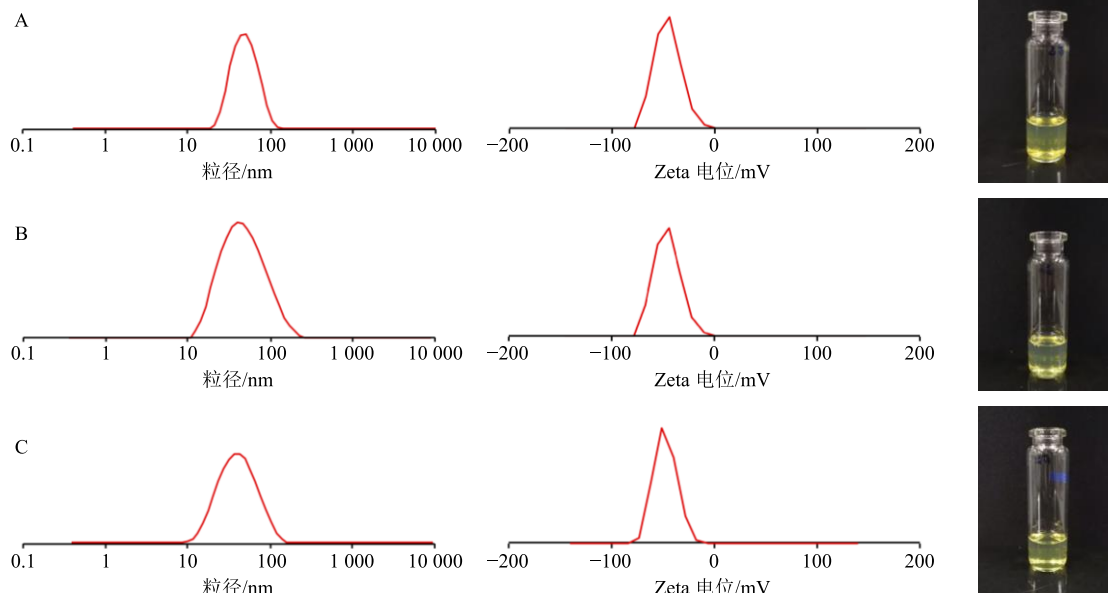


图 2 GLA-Et-ES (A)、GLA-PG-ES (B) 和 GLA-MA-ES (C) 的外观和粒径电位分布图

Fig. 2 Appearance, size, and Zeta potential distribution of GLA-Et-ES (A), GLA-PG-ES (B) and GLA-MA-ES (C)

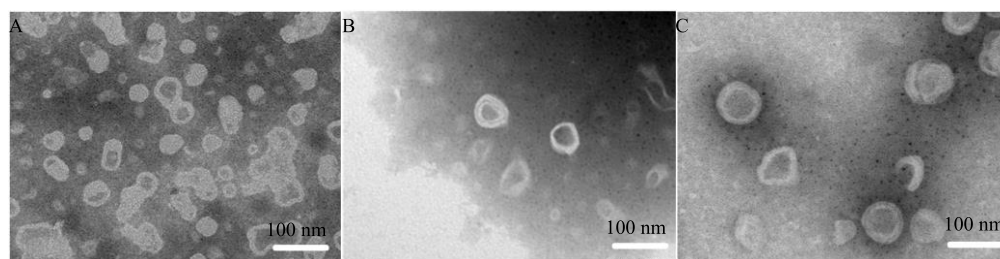


图 3 GLA-Et-ES (A)、GLA-PG-ES (B) 和 GLA-MA-ES (C) 的 TEM 图

Fig. 3 TEM photographs of GLA-Et-ES (A), GLA-PG-ES (B) and GLA-MA-ES (C)

2.6 稳定性考察

取“2.1”项下制备的 GLA-ES，于 4 ℃放置，分别于 0、5、10、15、20 d 取样，按“2.3”与“2.4”项下方法，测定光甘草定含量、醇质体粒径、PDI 等，考察其放置稳定性，结果见图 4。在 4 ℃放置过程中，光甘草定乙醇醇质体粒径有增大趋势但仍

小于 60 nm；丙二醇醇质体和混合醇醇质体粒径变化较小，且 3 种醇质体 PDI 均小于 0.3；此外，3 种醇质体中光甘草定的含量基本无变化。表明所制备的 GLA-ES 在 4 ℃放置稳定性良好，且以丙二醇、混合醇制备的 GLA-ES 稳定性更优，可能是因为乙醇具有挥发性、对卵磷脂有一定溶解性，易造成囊

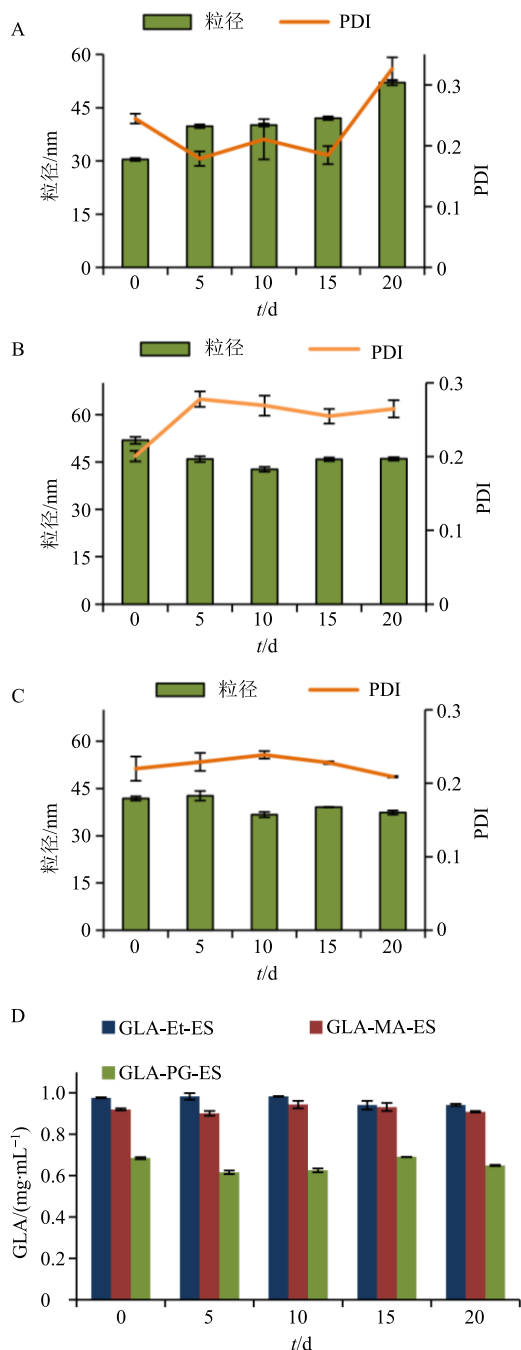


图 4 GLA-Et-ES (A)、GLA-PG-ES (B)、GLA-MA-ES (C) 的粒径和 GLA 含量 (D) 的稳定性考察结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 4 Stability of size of GLA-Et-ES (A), GLA-PG-ES (B), GLA-MA-ES (C), and content of GLA in ethosomes (D) ($\bar{x} \pm s, n=3$)

泡聚集所致；但丙二醇黏度大、不易挥发，混合醇醇质体中丙二醇含量也较大，减弱了其中少量乙醇对稳定性造成的不良影响^[14,16]。

2.7 体外释放度考察

采用透析法进行 GLA-ES 体外释放度考察^[17]，取“2.1”项下制备的光甘草定乙醇醇质体、丙二醇

醇质体、混合醇醇质体、光甘草定原料混悬液各 1 mL，注入透析袋（截留相对分子质量 3 500）内，浸没于 50 mL 35%乙醇水溶液中，平行 3 份，置于 37 °C 水浴振荡（120 r/min），分别于 1、2、4、8、12、24、48 h 取样 1 mL，同时补充 1 mL 同温度空白释放介质，按照“2.2”项下方法测定样品中光甘草定质量浓度，计算各时间点光甘草定的累积释放率，绘制释放曲线，结果见图 5。光甘草定混悬液在 8 h 累积释放率为 48.38%，高于 3 种醇质体，之后释放速度减缓，GLA-Et-ES 和 GLA-MA-ES 在 48 h 时的累积释放率分别为 57.78% 和 54.22%，低于光甘草定混悬液的 62.94%，表明以乙醇、混合醇制备 GLA-ES 后可减慢药物释放；GLA-PG-ES 在 48 h 累积释放率为 64.45%，稍高于光甘草定混悬液，可能是由于丙二醇黏度较大，在释放介质中产生的渗透压较大所致^[9]。对释放度进行方程拟合，相关系数最大者即为最佳拟合方程^[16]，GLA-Et-ES、GLA-PG-ES 和 GLA-MA-ES 的体外释药行为均符合 Higuchi 方程，分别为 $Q=11.721 t^{1/2}-4.333 8$ ($r^2=0.987 6$)、 $Q=12.464 t^{1/2}-6.061 7$ ($r^2=0.997 9$)、 $Q=10.502 t^{1/2}-4.962 7$ ($r^2=0.996 8$)，具有一定缓释效应。

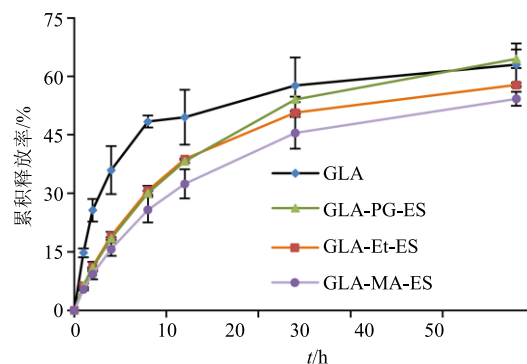


图 5 光甘草定醇质体的体外释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 5 In vitro drug release profile of GLA-ES ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.8 生物活性测定

2.8.1 酪氨酸酶活性抑制能力 取密度为 0.8×10^5 个/mL 的 B16-Ova 细胞混悬液 2 mL，接种至 6 孔板，置于 37 °C 培养箱（5% CO₂）中培养，待细胞贴壁后，吸弃旧培养液，分别加入 2 mL 含 GLA-ES 或混悬液的 DMEM 培养基溶液，其中光甘草定质量浓度为 4 μg/mL，以空白 DMEM 培养基为对照，置培养箱中孵育 48 h。取出，加入 1% Triton-X 220 μL 裂解 0.5 h，13 000 r/min、4 °C 离心 10 min。取 50 μL 上清液加入 96 孔板中，另加 50 μL 3 mmol/L 的左

旋多巴溶液, 37 °C 恒温反应 2 h, 采用酶标仪于 490 nm 处测定各样品的吸光度 (A) 值, 同时用 BCA 蛋白检测试剂盒测定各细胞样品蛋白浓度, 计算酪氨酸酶相对活性^[18], 采用 SPSS 21.0 统计软件对数据进行处理, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用组间 t 检验, $P < 0.05$ 表示具有显著性差异, 结果见图 6。GLA-Et-ES、GLA-PG-ES 和 GLA-MA-ES 作用于 B16-Ova 细胞后, 细胞酪氨酸酶的相对活性分别为 $(61.60 \pm 4.84) \%$ 、 $(80.09 \pm 1.67) \%$ 和 $(59.25 \pm 1.23) \%$, 均低于光甘草定混悬液 ($P < 0.05$), 表明 GLA-ES 能够抑制 B16-Ova 细胞的酪氨酸酶活性。可能与以下 2 方面原因有关: (1) 光甘草定被制备成醇质体后, 溶解性增加; (2) 载药醇质体囊泡能够与细胞膜融合, 携带药物进入细胞; 从而使光甘草定的生物活性得以充分发挥^[14]。

酪氨酸酶相对活性 = $(A_{\text{样品}} \times \text{对照组蛋白浓度}) / (A_{\text{对照}} \times \text{样品蛋白浓度})$

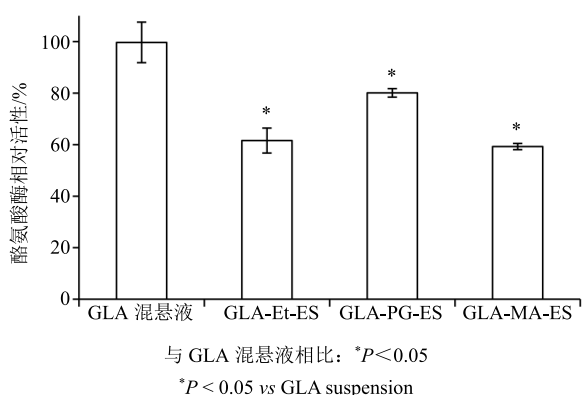


图 6 光甘草定混悬液、GLA-Et-ES、GLA-PG-ES、GLA-MA-ES 对 B16-Ova 细胞酪氨酸酶活性的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Inhibition of GLA suspension, GLA-Et-ES, GLA-PG-ES and GLA-MA-ES on tyrosinase activity in B16-Ova cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.8.2 抗氧化活性 (铁离子还原能力的测定) 进行铁氰化钾还原力测定考察 GLA-ES 的抗氧化活性^[19]。分别移取光甘草定质量浓度为 100、200、300、400 $\mu\text{g/mL}$ 的混悬液与醇质体溶液 1 mL, 加入 2.5 mL 磷酸盐缓冲溶液 (pH 6.6) 和 2.5 mL $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 溶液 (1%), 50 °C 水浴加热 20 min。迅速冷却, 加入 2.5 mL 三氯乙酸溶液 (10%) 终止反应, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 2.5 mL, 加入 2.5 mL 蒸馏水及 0.5 mL FeCl_3 溶液 (0.1%)。室温放置 10 min 后, 使用紫外-可见分光光度仪在 700 nm 处

测定样品的 A 值, 结果如图 7 所示。光甘草定质量浓度在 100~400 $\mu\text{g/mL}$ 时, 光甘草定混悬液与铁氰化钾反应后的 A 值由 0.022 ± 0.006 增加至 0.066 ± 0.007 , 呈质量浓度相关性; GLA-Et-ES 的 A 值由 0.141 ± 0.008 增加至 0.565 ± 0.074 , 且相同质量浓度下 GLA-Et-ES 溶液的 A 值均大于混悬液; GLA-PG-ES、GLA-MA-ES 也表现出与 GLA-Et-ES 类似的变化趋势; 表明光甘草定制备成醇质体后, 还原能力强于光甘草定混悬液, 具有较强的抗氧化能力, 这可能是醇质体提高了光甘草定的溶解度, 使其生物活性得以充分发挥所致。此外, 在相同光甘草定质量浓度下, GLA-Et-ES、GLA-MA-ES 的 A 值比 GLA-PG-ES 的高, 可能因为乙醇对光甘草定的溶解效果更佳, 与上述包封率结果相同。

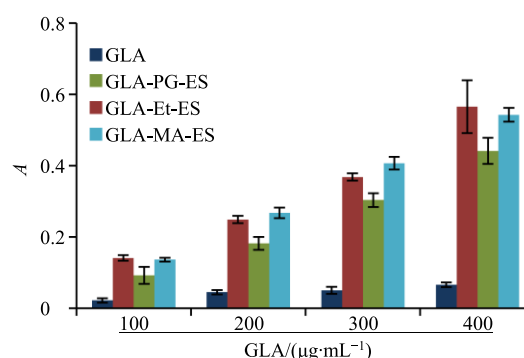


图 7 GLA-ES 铁氰化钾还原能力结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Results of potassium ferricyanide reducing power of GLA-ES ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.9 安全性评价

2.9.1 细胞毒性 取密度为 1.3×10^5 个/mL 的 HaCaT 细胞悬液 100 μL 接种于 96 孔板, 置于 37 °C 培养箱 (5% CO_2) 中培养 24 h, 待细胞贴壁后, 吸弃旧培养液, 加入 100 μL 含 GLA-ES (相当含量空白醇质体) 的 DMEM 溶液, 每组复 3 孔, 96 孔板边缘用等体积纯水填充, 置培养箱中孵育 48 h。吸弃药液后每孔加入 120 μL MTS 溶液 (MTS-DMEM 1:5), 置培养箱中孵育 1 h, 酶标仪于 490 nm 波长处检测各孔的 A 值, 计算细胞生存率, 结果见图 8。当光甘草定质量浓度在 0.05~3.00 $\mu\text{g/mL}$ 时, GLA-ES 作用 HaCaT 细胞 48 h 后, 细胞生存率均在 90% 以上, 说明 GLA-ES 对 HaCaT 细胞的毒性较弱, 即 GLA-ES 对人皮肤细胞安全性较好。

细胞生存率 = $(A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{溶剂对照}} - A_{\text{空白}})$
 $A_{\text{样品}}$ 为醇质体作用细胞后 A 值, $A_{\text{溶剂对照}}$ 为空白醇质体作用细胞后 A 值, $A_{\text{空白}}$ 为调零组 A 值

2.9.2 皮肤刺激性 取健康的雄性 SD 大鼠 3 只, 按照 0.003 mL/g ip 10% 水合氯醛使麻醉, 用自配的脱毛膏 (分别称取 2 g 洗衣粉、6 g 硫化钠、14 g 淀粉, 加适量温水调至膏状) 涂布于背部脊椎两侧, 脱毛膏完全覆盖大鼠毛, 脱毛面积约为 4 cm×2 cm, 5 min 后, 用温水擦净脱毛部位, 静养 24 h 后, 划分脱毛区, 涂抹 3 种空白醇质体和 3 种 GLA-ES 各 300 μ L。每天 2 次, 连续 7 d, 观察皮肤是否出现红斑和水肿, 结果见图 9。

3 种空白和光甘草定载药醇质体给药 7 d 后, 大鼠皮肤均没有出现红斑和水肿, 和生理盐水作用后没有明显差异, 说明空白醇质体和光甘草定载药醇质体对皮肤没有刺激性。

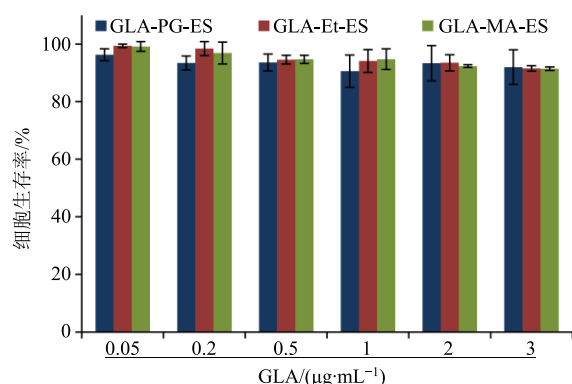


图8 光甘草定醇质体的 HaCaT 细胞毒性测定结果 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 8 Cell viability results of GLA-ES in HaCaT cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

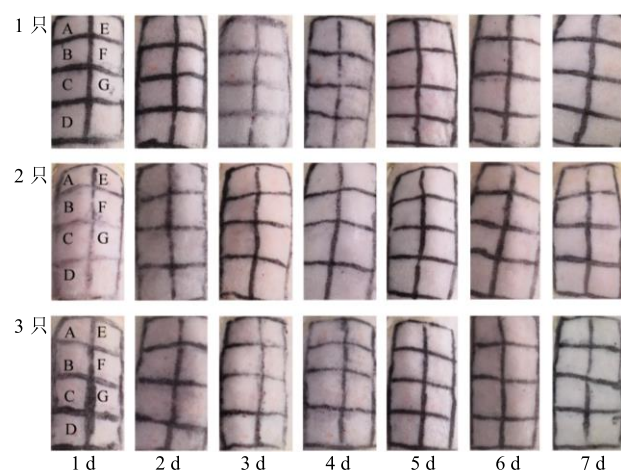


图9 Et-ES (A)、PG-ES (B)、MA-ES (C)、生理盐水 (D)、GLA-Et-ES (E)、GLA-PG-ES (F)、GLA-MA-ES (G) 对大鼠皮肤刺激性 ($n = 3$)

Fig. 9 Dermal irritation of Et-ES (A), PG-ES (B), MA-ES (C), normal saline (D), GLA-Et-ES (E), GLA-PG-ES (F) and GLA-MA-ES (G) on rat skins ($n = 3$)

3 讨论

本实验所用的 GLA-ES 制备工艺, 是在前期对制备方法、注入搅拌速度、超声时间及功率等工艺因素考察, 以及表面活性剂、醇种类、磷脂浓度等处方因素考察的基础上而得出的较优工艺。所得 GLA-ES, 为黄色半透明液体, 具有磷脂双分子层的囊泡结构, 粒径为 30~70 nm, 且分布较均一, Zeta 电位均小于 -25 mV, 包封率高于 85%。

由于高浓度醇 (通常为乙醇) 的存在, 醇质体囊泡具有高度延展性, 能有效包封亲水性、亲脂性小分子药物^[20], 但其稳定性和安全性欠佳, 有研究使用丙二醇替代乙醇制备醇质体, 以克服其稳定性与潜在安全性问题^[21]。本实验使用乙醇、丙二醇和混合醇制备了 3 种 GLA-ES, 结果显示, GLA-Et-ES 和 GLA-MA-ES 包封率略高于 GLA-PG-ES, GLA-MA-ES 和 GLA-PG-ES 的稳定性比 GLA-Et-ES 更好, 这与乙醇对药物的溶解性和其自身的挥发性有关, 与文献报道相符^[9]。

对于难溶性药物而言, 乙醇醇质体可提高其溶解度, 但稳定性略差; 丙二醇黏度大, 稳定性好, 但其对药物的溶解能力有限, 作为柔软剂所制得醇质体的包封率和生物活性均不如乙醇醇质体^[14,16]。乙醇和丙二醇按一定体积混合后, 不仅能保证醇质体的包封率, 还能提高其稳定性和药物生物活性。因此, 使用混合醇 (乙醇-丙二醇) 作为柔软剂制备难溶性药物的醇质体是一种较好的选择。

光甘草定具有抑制黑色素合成^[22]而发挥皮肤美白作用。酪氨酸酶为皮肤黑色素合成的关键酶和限速酶, 抑制酪氨酸酶的活性可阻止黑色素的形成^[23]; B16-Ova 黑色素瘤细胞, 其黑色素形成过程和机制与人体皮肤色素细胞一致^[24]。因此, 本实验以 B16-Ova 细胞为研究对象, 通过考察光甘草定及其醇质体对该细胞中酪氨酸酶活性的抑制作用, 来评价其潜在的美白效应。结果表明, 光甘草定制备成醇质体后, 对 B16-Ova 细胞中酪氨酸酶活性的抑制作用增强, 提升了光甘草定的生物活性。

文献报道, 光甘草定作为光果甘草中特有的异黄酮类成分, 具有抗氧化作用^[25], 本实验采用铁氰化钾还原力实验来考察光甘草定及其醇质体的抗氧化作用。抗氧化物质通常会将铁氰化钾 $K_3Fe(CN)_6$ 还原成亚铁氰化钾 $K_4Fe(CN)_6$, $K_4Fe(CN)_6$ 再与 Fe^{3+} 作用, 会生成 700 nm 波长处有最大吸收的普鲁士蓝, 通过测定普鲁士蓝的生成量 (吸光度值), 能够

反映抗氧化物质的还原能力^[25]。本研究发现, GLA-ES 溶液的 A 值均大于其相应混悬液, 说明光甘草定制备成醇质体后, 抗氧化能力增强。

综上, 光甘草定制备成醇质体后, 由于水溶性得到改善, 其抑制黑色素生成、抗氧化作用增强, 安全性良好, 为将其后续开发成美白护肤产品或医药外用制剂提供参考与借鉴。

参考文献

- [1] Yoshioka Y, Kubota Y, Samukawa Y, *et al.* Glabridin inhibits dexamethasone-induced muscle atrophy [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2019, 664: 157-166.
- [2] Simmler C, Pauli G F, Chen S N. Phytochemistry and biological properties of glabridin [J]. *Fitoterapia*, 2013, 90: 160-184.
- [3] Wang W P, Hu J, Sui H, *et al.* Glabridin nanosuspension for enhanced skin penetration: Formulation optimization, *in vitro* and *in vivo* evaluation [J]. *Pharmazie*, 2016, 71(5): 252-257.
- [4] Yokota T, Nishio H, Kubota Y, *et al.* The inhibitory effect of glabridin from licorice extracts on melanogenesis and inflammation [J]. *Pigment Cell Res*, 1998, 11(6): 955-961.
- [5] Hespeler D, Kaltenbach J, Pyo S M. Glabridin smart pearls-silica selection, production, amorphous stability and enhanced solubility [J]. *Int J Pharm*, 2019, 561: 228-235.
- [6] Ao M, Shi Y, Cui Y, *et al.* Factors influencing glabridin stability [J]. *Nat Prod Commun*, 2010, 5(12): 1907-1912.
- [7] Zhang Y T, Xia Q, Li Y Y, *et al.* CD44 assists the topical anti-psoriatic efficacy of curcumin-loaded hyaluronan-modified ethosomes: A new strategy for clustering drug in inflammatory skin [J]. *Theranostics*, 2019, 9(1): 48-64.
- [8] 费雅蓉, 徐 畅, 周丹婷, 等. 延胡索乙素醇质体的制备及其离体皮肤渗透特性研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(3): 1088-1094.
- [9] 刘 基, 王 媚, 王 露, 等. 经皮给药系统研究进展 [J]. *现代中医药*, 2018, 38(6): 156-159.
- [10] 何良飞, 陶 玲, 管咏梅, 等. 雷公藤甲素阿魏酸醇质体的制备与评价 [J]. *中草药*, 2018, 49(12): 2817-2825.
- [11] Marto J, Vitor C, Guerreiro A, *et al.* Ethosomes for enhanced skin delivery of griseofulvin [J]. *Colloid Surf B Biointerf*, 2016, 146: 616-623.
- [12] 刘园园, 郝谜谜, 王 艳, 等. 醇质体在经皮给药系统中的应用研究 [J]. *中国药房*, 2017, 28(28): 4008-4011.
- [13] Zhang Y T, Shen L N, Zhao J H, *et al.* Evaluation of psoralen ethosomes for topical delivery in rats by using *in vivo* microdialysis [J]. *Int J Nanomed*, 2014, 9(1): 669-678.
- [14] 邢文善, 路 芳, 徐 阳. 经皮给药新型脂质体——二元醇质体的研究进展 [J]. *中国医药导刊*, 2018, 20(4): 221-224.
- [15] Dayan N, Touitou E. Carriers for skin delivery of trihexyphenidyl HCl: Ethosomes vs. liposomes [J]. *Biomaterials*, 2000, 21(18): 1879-1885.
- [16] 郭咸希, 何 文, 李 华, 等. 十一酸睾酮二元醇质体处方优化及体外性质考察 [J]. *中国药师*, 2015, 18(8): 1280-1283.
- [17] Razavi S, Partoazar A, Takzaree N, *et al.* Silver sulfadiazine nanoethogel for burn healing: Characterization and investigation of its *in vivo* effects [J]. *Nanomedicine*, 2018, 13(11): 1319-1331.
- [18] 林锦彬, 任 桐, 连一江, 等. 红杜仲的美白活性及其途径研究 [J]. *中国生化药物杂志*, 2015, 35(12): 21-23.
- [19] 厉彦翔, 任禹思, 张苗苗, 等. 白藜芦醇苷的体外抗氧化活性研究 [J]. *中国民族民间医药*, 2019, 28(16): 24-26.
- [20] 李理宇, 王洪权. 新型经皮给药载体——醇质体的研究进展 [J]. *中国新药杂志*, 2010, 19(1): 33-38.
- [21] 张 露, 赵应征, 李文峰. 姜黄素丙二醇质体的制备及体外细胞药物摄取实验研究 [J]. *中华中医药学刊*, 2015, 33(11): 2770-2774.
- [22] Chen J M, Yu X J, Huang Y F. Inhibitory mechanisms of glabridin on tyrosinase [J]. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2016, 168: 111-117.
- [23] 骆从艳, 慕春海, 王园姬, 等. 光甘草定抑制酪氨酸酶及体外抗氧化活性的研究 [J]. *中药材*, 2010, 33(11): 1776-1780.
- [24] 马晶波. 红景天甙对黑素细胞生物学作用的研究及美白中草药筛选过程中一些问题的探讨 [D]. 上海: 复旦大学, 2003.
- [25] Romdhane M B, Haddar A, Ghazala I, *et al.* Optimization of polysaccharides extraction from watermelon rinds: Structure, functional and biological activities [J]. *Food Chem*, 2017, 216: 355-364.