

黄白温敏型原位凝胶的处方筛选与评价

朱卫丰¹, 刘水婷¹, 王万春², 管咏梅^{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. 江西中医药大学附属医院 外一科, 江西 南昌 330004

摘要: 目的 筛选并优化黄白温敏型原位凝胶的处方, 并考察其经皮渗透性能。方法 以泊洛沙姆 407 (P407)、泊洛沙姆 188 (P188)、聚乙二醇 6000 (PEG6000) 作为凝胶基质材料, 以胶凝温度为考察指标, 采用 Box-Behnken 效应面法优化温敏凝胶处方; 对制备的温敏凝胶进行理化表征, 并采用 Franz 透皮扩散池法考察黄白温敏凝胶的经皮渗透性能。结果 黄白温敏型原位凝胶的最佳处方为 P407 20.10%, P188 2.54%, PEG6000 2.00%, 胶凝温度为 (34.2±0.2) °C, 24 h 内欧前胡素、盐酸小檗碱的累积渗透量分别为 (14.07±1.34)、(395.72±35.04) μg/cm², 均符合 Higuchi 动力学方程。结论 制备的凝胶具有温敏、缓释作用, 为临床提供治疗蛇虫咬伤的制剂奠定基础。

关键词: 黄白温敏型原位凝胶; 处方优化; Box-Behnken 效应面法; 经皮渗透性能; 欧前胡素; 盐酸小檗碱; Higuchi 动力学方程; 温敏; 缓释

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)07-1914-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.07.008

Selection and evaluation of prescription of temperature-sensitive *in-situ* gel of *Phellodendron chinense* and *Angelica dahurica* (Yellow-white)

ZHU Wei-feng¹, LIU Shui-ting¹, WANG Wan-chun², GUAN Yong-mei¹

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

2. Department of External Medicine, Affiliated Hospital of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

Abstract: Objective To select and optimize the *Phellodendron chinense* and *Angelica dahurica* (Yellow-white) thermosensitive *in-situ* gel, and to investigate its transdermal permeability. **Methods** Using poloxamer 407, poloxamer 188, and PEG6000 as gel matrix materials, and taking gelation temperature as investigation index, Box-Behnken response surface method was used to optimize the gel matrix prescription. At the same time, the thermosensitive gel was characterized, and the transdermal permeability of drugs in the yellow-white thermosensitive *in-situ* gel was investigated by Franz transdermal diffusion cell. **Results** The best prescription of thermosensitive *in-situ* gel is P407 20.10%, P188 2.54%, PEG6000 2.00%, and the gelation temperature is (34.2 ± 0.2) °C. Within 24 h, the cumulative permeation of imperatorin and berberine were (14.07 ± 1.34) and (395.72 ± 35.04) μg/cm², respectively, and the release process of imperatorin and berberine followed Higuchi kinetic equation. **Conclusion** The gel prepared in this study has temperature sensitivity and slow release, which can lay the foundation for clinical preparation for treating snake and insects bites.

Key words: yellow-white temperature sensitive *in situ* gel; optimization of prescription; Box-Behnken response surface methodology; percutaneous permeability; imperatorin; berberine hydrochloride; Higuchi kinetic equation; temperature sensitive; release slowly

毒蛇咬伤是严重影响劳动人民生命健康的常见灾害性疾病, 在我国每年有超过 1 万人死于毒蛇咬伤。中医中药治疗毒蛇咬伤不仅有着悠久的历史,

并且独具特色^[1]。蛇虫咬伤后毒蛇毒虫的毒液进入人体, 患处表现出红肿热痛、皮肤表层温度升高、炎症反应等局部症状, 故临床常外用给药, 直达病

收稿日期: 2020-11-20

基金项目: 国家自然科学基金地区基金项目 (82060722); 江西省自然科学基金面上项目 (20202BAB206081)

作者简介: 朱卫丰, 教授, 博士研究生导师, 博士, 研究方向为中药新剂型与新制剂研究。E-mail: zwf0322@126.com

*通信作者: 管咏梅, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为药物新剂型、新技术。Tel: (0791)87118614 E-mail: guanym2008@163.com

灶,发挥抗炎、消肿的作用。通过中华医典数据库和中医资源网等的古文检索发现,白芷外用常用于治疗蛇虫咬伤,黄柏外用常用于解毒消肿,且以“黄柏”“白芷”“外敷/外用”为关键词检索发现,二者常配伍使用,发挥解毒、消肿、止痛等作用。然而,临床治疗蛇虫咬伤所致肿痛外用制剂多为散剂,其颗粒粗大,刺激性强,患者依从性不高。近年来,半固体凝胶剂以其制备简单、使用温和备受青睐,而具有温度响应型凝胶颇具潜力,其为智能给药系统,能够实时感知环境、用药部位等的温度变化并随之发生相转变,当温度低于临界相变温度(lower critical solution temperature, LCST)时呈液态,高于 LCST 时呈半固体凝胶态,从而延长药物滞留时间,持续释药,提高生物利用度^[2-4]。因此,本课题组研制了一种环境响应型凝胶剂——黄白温敏凝胶,旨在研发出一种便于患者使用且能快速消除蛇虫咬伤患处疼痛、肿胀的新型中药外用制剂,扩大其在临床的使用范围,为中药复方外用制剂的发展提供借鉴。

1 材料

1.1 动物

健康 SPF 级雄性昆明种小鼠,体质量 18~22 g,购于江西中医药大学动物中心,动物许可证号:SCXK(赣)2018-0003,动物实验经江西中医药大学实验动物伦理委员会批准,批准文号:JZSYDWLL-20200901。

1.2 试药

白芷饮片,江西江中中药饮片公司,批号 160718,产地安徽;黄柏饮片,江西继中堂健康科技有限公司,批号 180801,产地四川,上述药材均经江西中医药大学鉴定教研室葛菲教授鉴定,白芷为伞型科当归属植物白芷 *Angelica dahurica* (Fisch. ex Hoffm.) Benth. et Hook. f. 的干燥根,黄柏为芸香科黄柏属植物黄皮树 *Phellodendron chinense* Schneid. 的干燥树皮,均符合《中国药典》2020 年版质量要求。

对照品欧前胡素(批号 110826-201616,质量分数 99.6%)、盐酸小檗碱(批号 110713-201814,质量分数 86.7%),中国食品药品检定研究院;泊洛沙姆 407(P407,批号 GNC2192B)、泊洛沙姆 188(P188,批号 GNC33221B),德国 BASF 公司;聚乙二醇 6000(PEG6000,批号 810T032),北京索莱宝科技有限公司;聚乙二醇 4000(PEG4000,批号

M1005A)、聚乙二醇 400(PEG400,批号 D1101A)、甘油(批号 M1101A),大连美仑生物技术有限公司;甲醇,色谱纯,西陇科学股份有限公司;磷酸,西陇化工股份有限公司;无水乙醇(批号 2008239),西陇科学股份有限公司;纯水,实验室纯水仪自制。

1.3 仪器

EPED 实验室级超纯水器,南京易普易达科技发展有限公司;Anto paar Physica MCR101 型流变仪,奥地利安东帕公司;ZNCL-BS 智能磁力搅拌器,西安安泰仪器科技有限公司;Agilent1260 型高效液相色谱仪,美国安捷伦科技有限公司;Turbiscan Lab 稳定性分析仪,法国 Formulacion 公司;BSA 124S 型电子分析天平,德国 Sartorius 公司;PHS-3C 型 pH 计,上海雷磁仪器有限公司;SU8010 扫描电子显微镜(SEM),日本日立公司。

2 方法与结果

2.1 提取物的制备

在前期的提取工艺考察基础上,提取药材得到提取液,水浴蒸干后置于 45 °C 真空干燥得提取物粉末。黄柏提取物:8 倍量 60%乙醇为溶剂,提取 3 次,每次 1 h,投药量为 5% (按原粉计,浸膏得率为 13.42%);白芷提取物:10 倍量 75%乙醇为溶剂,提取 3 次,每次 1 h,投药量为 5% (按原粉计,浸膏得率为 10.12%)。

2.2 助溶剂的筛选

采用法国 Turbiscan Lab 型近红外稳定性分析仪比较温敏凝胶的稳定性^[5-6]。固定 P407 和 P188 的比例不变,以不同的助溶剂(PEG6000、PEG4000、甘油、PEG400)制备温敏凝胶,筛选最佳助溶剂;将样品置于样品瓶中,25 °C 下测定,每天扫描 1 次,连续测定 7 d。体系整体动力学不稳定性结果如图 1 所示,由图 1 可知动力学不稳定性指数(TSI)值为 PEG4000>甘油>PEG400>PEG6000,即以 PEG6000 为助溶剂时温敏凝胶的稳定性最佳,因此

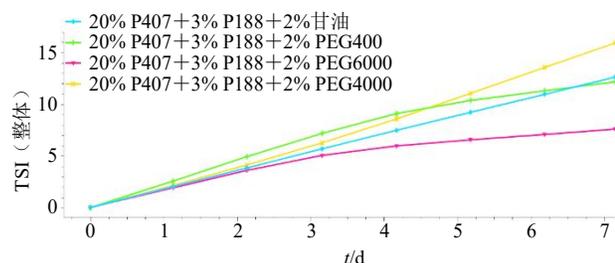


图 1 稳定性扫描图

Fig. 1 Stability of different formulations

选择 PEG6000 作为凝胶助溶剂。

2.3 制备工艺

采用“冷溶法”制备温敏凝胶^[7]，将 PEG6000 溶于处方量的水中，并加入处方量的黄柏和白芷提取物，超声使其完全溶解，冰水浴下依次缓慢加入处方量的 P407、P188，搅拌均匀，然后置于 4~10 °C 冰箱冷藏 24 h，使其充分溶胀，得到澄清、分散均匀的药物凝胶溶液。

2.4 胶凝温度 (gelation temperature, T_g) 的测定

采用“搅拌子法”测定温敏凝胶的 T_g ^[8-9]，取温敏凝胶液 5 mL，加入搅拌子，并插入探针式温度计 (准确度为 0.1 °C)，使温度计的探针完全浸没在温敏凝胶液中，置于磁力搅拌器上，转速设置为 200 r/min，持续缓慢升温，使凝胶液的温度上升速率为 1~2 °C/min，观察并记录凝胶完全凝结 (不流动) 时的温度，即为 T_g ，每个样品平行测定 3 次，取平均值。

2.5 处方优化

2.5.1 单因素考察 以 T_g 作为考察指标，对不同用量的 P407 (20%、21%、22%、23%、24%)、P188 (1%、2%、3%、4%、5%) 及 PEG6000 (1%、2%、3%、4%、5%) 进行单因素考察，结果 P407 用量越高， T_g 越低；P188 用量越高， T_g 越高；PEG6000

用量越高， T_g 越高，且 PEG6000 用量超过 3% 时凝胶黏度降低，用量为 5% 时温度加热至 55 °C 仍无法完全胶凝。

2.5.2 Box-Behnken 效应面法优化温敏凝胶基质处方 使用 Design Expert 8.0.6 软件，根据单因素考察的试验结果，选择 P407 用量 (X_1)、P188 用量 (X_2)、PEG6000 用量 (X_3) 为主要影响因素，并确定其用量范围： X_1 20%~24%、 X_2 1%~5%、 X_3 1%~3%，以 T_g 为评价指标进行处方优选，根据星点设计的原理，各因素设置 3 水平，用代码值 -1、0、+1 来表示，以 T_g 为评价指标进行处方优选，Box-Behnken 效应面法实验的因素水平、实验设计及结果见表 1。

2.5.3 方差分析与显著性检验 采用 ANOVA 分析实验数据，由表 2 的各回归系数的显著性检验可得，模型方程中 X_1 、 X_2 、 X_3 均为对 T_g 有极显著影响。

2.5.4 模型拟合 根据实验结果，应用 Design Expert 8.0.6 软件进行二次多项式逐步回归拟合，得到方程： $T_g = 30.66 - 4.34 X_1 + 1.75 X_2 + 1.94 X_3 - 0.40 X_1 X_2 - 0.83 X_1 X_3 + 0.35 X_2 X_3 - 0.14 X_1^2 - 0.017 X_2^2 - 1.54 X_3^2$ 。通过方程可以看出，在测定范围内，随着 X_1 的升高，胶凝温度明显降低，而随着 X_2 、 X_3 的升高，胶凝温度明显升高。该模型 $P < 0.000 1$ ，表明有极显著性差异；相关系数 $R^2 = 0.985 8$ ，表明

表 1 Box-Behnken 效应面法实验的因素水平、实验设计与结果

Table 1 Design and results of Box-Behnken response surface methodology

试验号	X_1 /%	X_2 /%	X_3 /%	T_g /°C	试验号	X_1 /%	X_2 /%	X_3 /%	T_g /°C	试验号	X_1 /%	X_2 /%	X_3 /%	T_g /°C
1	22 (0)	3 (0)	2 (0)	31.3	7	20 (-1)	6 (+1)	2 (0)	37.2	13	22 (0)	3 (0)	2 (0)	30.5
2	20 (-1)	1 (-1)	2 (0)	33.1	8	22 (0)	1 (-1)	3 (+1)	28.4	14	24 (+1)	3 (0)	1 (-1)	23.4
3	22 (0)	3 (0)	2 (0)	30.9	9	24 (+1)	1 (-1)	2 (0)	24.6	15	20 (-1)	3 (0)	1 (-1)	29.8
4	24 (+1)	3 (0)	3 (+1)	26.5	10	20 (-1)	3 (0)	3 (+1)	36.2	16	24 (+1)	6 (+1)	2 (0)	27.1
5	22 (0)	3 (0)	2 (0)	30.4	11	22 (0)	6 (+1)	1 (-1)	29.1	17	22 (0)	1 (-1)	1 (-1)	26.1
6	22 (0)	6 (+1)	3 (+1)	32.8	12	22 (0)	3 (0)	2 (0)	30.2					

表 2 各项因素回归系数和方差分析

Table 2 Factor regression coefficients and ANOVA

方差来源	平方和	自由度	F 值	P 值	显著性	方差来源	平方和	自由度	F 值	P 值	显著性
模型	219.18	9	53.87	<0.000 1	极显著	X_1^2	0.085	1	0.19	0.676 7	
X_1	150.51	1	332.94	<0.000 1	极显著	X_2^2	1.289×10^{-3}	1	2.852×10^{-3}	0.958 9	
X_2	24.50	1	54.19	0.000 2	极显著	X_3^2	10.02	1	22.16	0.002 2	极显著
X_3	30.03	1	66.43	<0.000 1	极显著	残差	3.16	7			
$X_1 X_2$	0.64	1	1.42	0.272 9		失拟项	2.39	3	4.13	0.102 1	不显著
$X_1 X_3$	2.72	1	6.02	0.043 8		纯误差	0.77	4			
$X_2 X_3$	0.49	1	1.08	0.332 4		总误差	222.34	16			

该模型预测值与测定值的相关性良好。失拟项 $P=0.102$ $1>0.05$, 不具有显著性, 表明方程拟合度和

可信度良好。利用 Design Expert 8.0.6 软件绘制实验结果的二维等高线图和三维效应图见图 2。

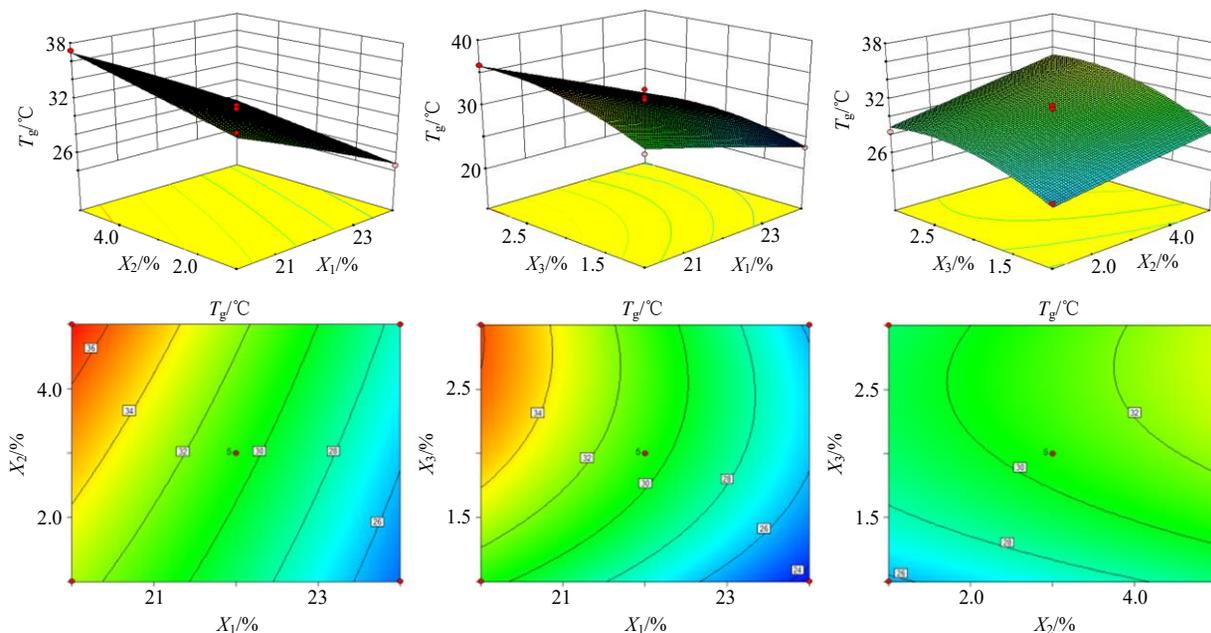


图 2 X_1 、 X_2 、 X_3 对 T_g 影响的效应面图与等高线图

Fig. 2 Contour plot and response surface of effect of variables X_1 , X_2 , X_3 on T_g

2.5.5 优化工艺验证 通过分析结果, 并将胶凝温度控制在 $34\sim 36\text{ }^\circ\text{C}$, 从而得到最佳处方为 $X_1=20.10\%$, $X_2=2.54\%$, $X_3=2.00\%$; 即 P407 20.10%, P188 2.54%, PEG6000 2.00%。按优化工艺制备 3 批温敏凝胶, 测定其 T_g , 实测值为 $(34.2\pm 0.2)\text{ }^\circ\text{C}$ ($n=3$), 预测值为 $34.15\text{ }^\circ\text{C}$, 偏差为 0.73%。

2.6 凝胶载药量的考察

2.6.1 载药量对温敏凝胶性状的影响考察 采用上述最优处方, 考察不同载药量, 按照“2.3”项方法制备载药量为 2%、3%、4%、5%、6%、7%、9%、10%、12%、15%、20% (按原粉计, 且黄柏-白芷 1:1) 的凝胶, 比较以下性状, 结果见表 3。

2.6.2 载药量对凝胶黏弹性区间及频率扫描曲线的影响考察 使用 Anton Paar Physica MCR101 型流变仪, 试样用 PP50 不锈钢平行板 (直径 50 mm), 间隙 1 mm, 测定储能模量 (G') 和损耗模量 (G''), 测试均在 $(35.0\pm 0.5)\text{ }^\circ\text{C}$ 下进行。通过振幅扫描 (应变为 0.01%~100%, 频率为 10 rad/s) 测定样品的线性黏弹区间, 结果如图 3 所示, 频率扫描 (应变为 1%, 频率扫描范围 0.1~100 Hz) 如图 4 所示。

由上述结果可知, 载药量对温敏凝胶的黏弹性及频率扫描曲线无显著性影响, 但是随着载药量增加温敏凝胶的 pH 值也随之降低, 并呈现出一定的

表 3 不同载药量的考察

Table 3 Investigation of different drug loads

载药量/%	外观性状	稳定性	pH 值	$T_g/^\circ\text{C}$
2	橙黄色、均一透明	稳定	6.27	34.9
3	黄色、均一透明	稳定	6.12	35.5
4	黄色、均一透明	稳定	6.03	34.8
5	黄棕色、均一透明	稳定	5.78	34.2
6	黄棕色、均一透明	离心后少量沉淀	5.68	34.4
7	黄棕色、均一透明	离心后沉淀	5.57	34.2
9	黄棕色、透明, 底部少量沉淀	离心后沉淀	5.50	34.2
10	黄棕色、透明, 底部沉淀	离心后沉淀	5.47	34.0
12	黄棕色、底部沉淀	离心后沉淀	5.43	33.0
15	黄棕色、底部浑浊	离心后沉淀	5.34	32.5
20	黄棕色、底部浑浊	离心后沉淀	5.30	30.7

pH 值依赖性, 当载药量过大时, 温敏凝胶的胶凝温度开始下降, 可能原因为载药量增加, pH 值降低, 溶液存在大量氢离子, 从而影响了分子间氢键结合力, 相邻分子间的缠结作用减弱, 致使胶凝温度降低。综合以上结果确定最终凝胶载药量为 5%。

2.7 黄白温敏凝胶的质量评价

2.7.1 外观及性状观察 室温下, 载药溶胶为黄棕

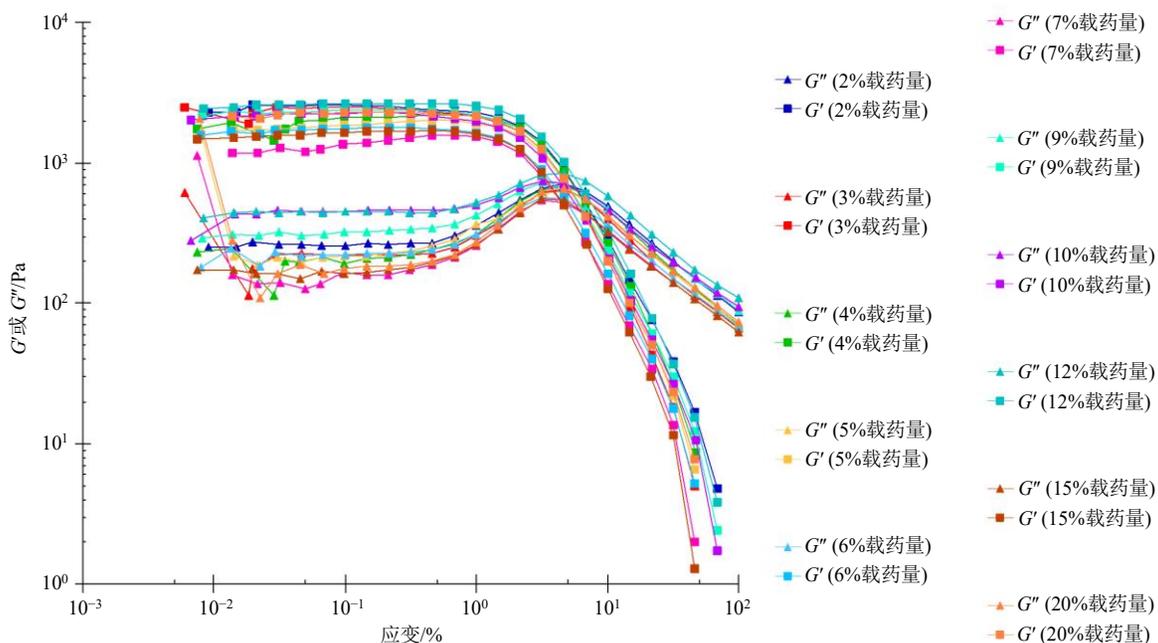


图3 不同载药量的线性黏弹区间图

Fig. 3 Linear viscoelastic interval diagram of different drug loadings

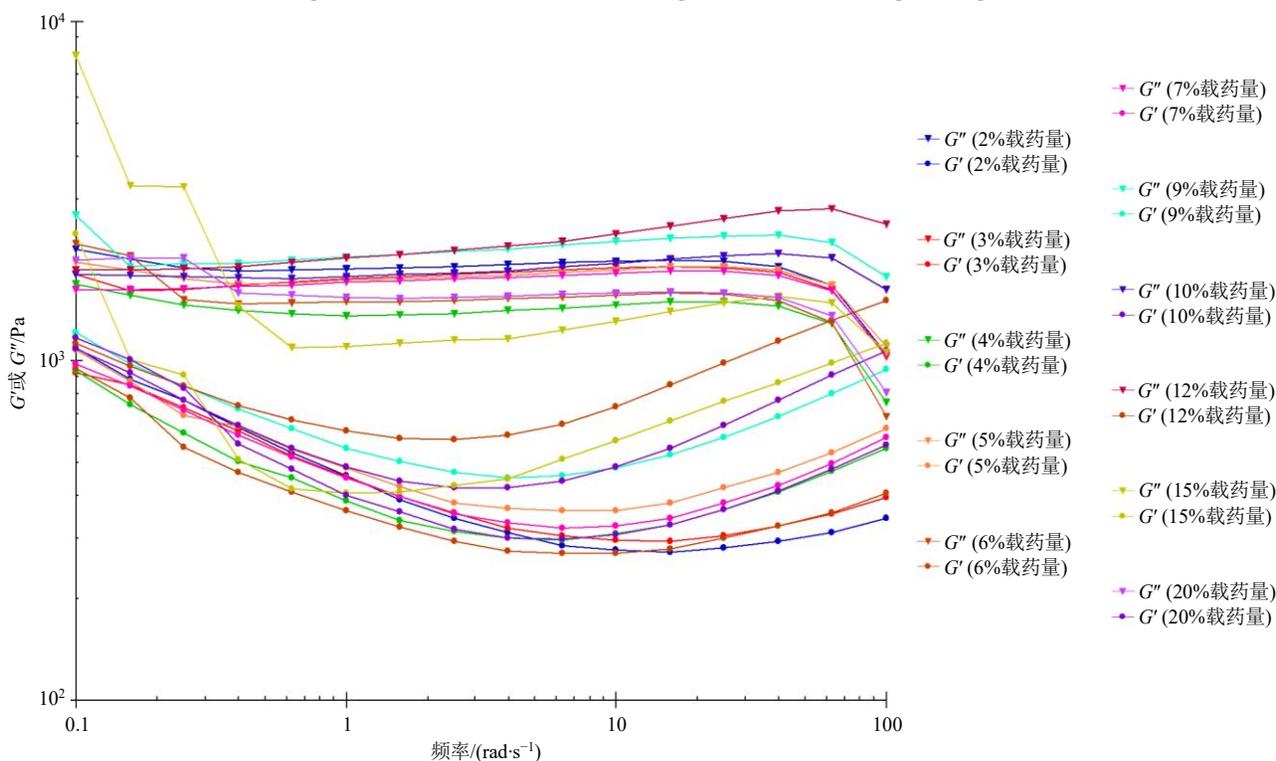


图4 不同载药量的频率扫描曲线图

Fig. 4 Frequency scanning curves of different drug loadings

色均匀分散的溶液，流动性好。相变温度以上（温度 > 34.2 °C）载药凝胶为黄棕色的半固体，形态良好，透明均匀，有一定弹性，不能流动，见图 5。

2.7.2 胶凝温度与胶凝时间的测定 采用“2.4”项下方法测定凝胶的胶凝温度为 (34.2 ± 0.2) °C，另

取 4 °C 冷藏 24 h 的温敏凝胶溶液，恢复至室温后，取 5 mL 于西林瓶中，放在 35 °C 水浴锅中，以倒置西林瓶 15 s 凝胶溶液未发生流动时的时间作为该凝胶溶液的胶凝时间，平行测定 3 次，结果胶凝时间为 (53.6 ± 0.8) s。



图 5 温敏凝胶形态

Fig. 5 Thermosensitive gel morphology

2.7.3 pH值的测定 使用pH计直接测定温敏凝胶的pH值,结果pH值为 5.78 ± 0.02 ,符合经皮给药制剂pH 5~7的要求。

2.7.4 离心、耐寒、耐热稳定性 取本品适量置于离心管中,分别于3000 r/min离心30 min、50 °C和-20 °C储存24 h,均未出现分层现象。

2.7.5 温敏凝胶的SEM观察 先将温敏凝胶制成冻干粉,取适量凝胶粉末,喷金,加速电压3.0 kV,采用场发射SEM^[10-11]观察凝胶表面的微观结构形态及其孔径大小。结果温敏凝胶三维网状结构图见图6。

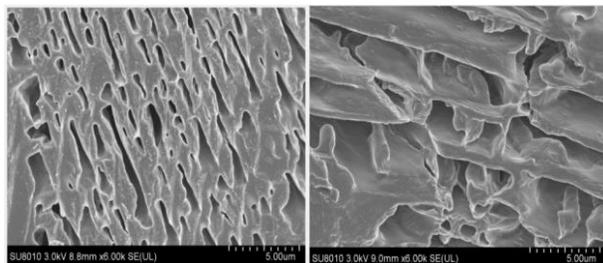


图 6 温敏凝胶 SEM 图

Fig. 6 SEM image of temperature sensitive gel

2.7.6 温敏凝胶的渗透压的测定 采用 Osmomat 030 冰点渗透压计测定凝胶的渗透压^[12],测得其平均渗透压为1302 mOsmol/kg,大于等渗溶液(280~320 mOsmol/kg),即其具有高渗作用,基于唐南平衡理论,表明该制剂应用于蛇虫咬伤所致的肿胀伤口,具有良好的消肿作用。

2.7.7 温敏凝胶的流变学性质考察^[13-14] 使用 Anton Paar Physica MCR101 型流变仪,试样用 PP50 不锈钢平行板(直径50 mm),间隙1 mm,除相变温度测定外其他均在 (35.0 ± 0.5) °C下进行测试。

(1) 凝胶线性黏弹区(LVER):通过LVER测试结果可得到凝胶的内部三维网状结构被破坏所能承受的最大形变,振幅扫描(应变为0.01%~100%,频率为10 rad/s)测定样品的LVER的结果见图7。从图中可知应变(γ) < 1%, $G' > G''$, 弹

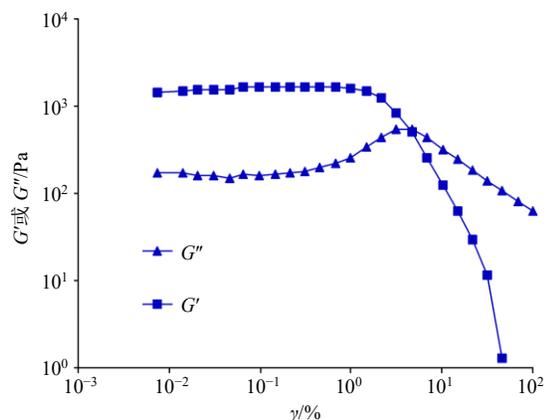


图 7 凝胶线性黏弹区间

Fig. 7 Linear viscoelastic interval of gel

性占主体,既样品表现出凝胶结构,当 $\gamma > 1%$, G' 开始下降,当 $G' = G''$ 时,凝胶结构完全被破坏, $G' < G''$,黏性占主体,表现出流体性质。因此,所有的动态振荡实验都需控制 γ 在1%以内。

(2) 相变温度测定:在振荡模式下测量凝胶的溶胶-凝胶转变温度。频率固定在1 Hz,进行1%应变。样品以2 °C/min的速率加热,温度范围在5~50 °C。结果见图8和9。由图8可知,在34 °C左右 G' 和 G'' 相交,交点即其相变温度。在此温度前样品主要存在损耗模量,表现出明显的流体性质,相变温度后逐渐 $G' > G''$,说明凝胶结构正在形成,且 G' 和 G'' 趋于平缓,证明凝胶黏弹性趋于稳定。图9为通过复合黏度可表征样品整体的黏弹性质,随着温度的升高,样品的复合黏度发生突变,突变点即为凝胶的相变温度,与图8一致。

(3) 频率扫描:频率扫描旨在描述样品在非破坏性变形范围内的时间相关特性,在振荡模式下对凝胶进行频率扫描(应变为1%,频率扫描范围0.1~100 Hz)。高频率指在较短时间尺度内的快速运动,而低频率指在较长时间尺度内的缓慢运动或静止状

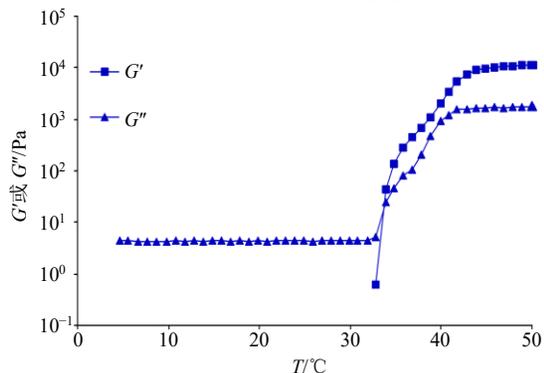


图 8 动态温度扫描图

Fig. 8 Dynamic temperature scanning diagram

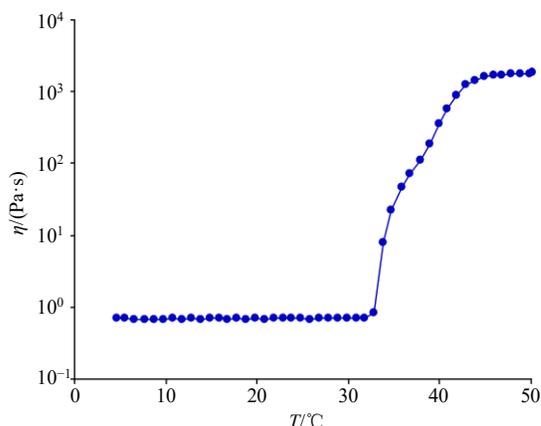


图 9 复合黏度随温度变化扫描图

Fig. 9 Scanning diagram of composite viscosity changing with temperature

态。可用于表征凝胶内部结构的长期稳定性。结果如图 10 所示。在整个频率扫描范围内中, G' 曲线始终高于 G'' 曲线, 表现出明显的以弹性为主的特性, 且 G' 较稳定, 未出现显著的频率依赖性, 表明凝胶始终具有稳定的三维网状结构。

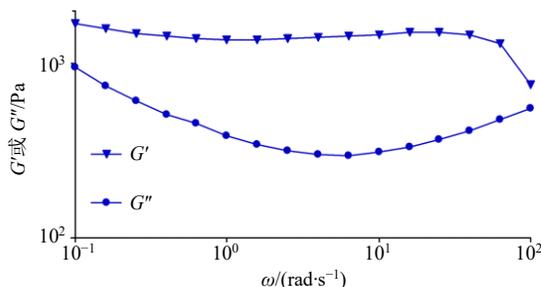


图 10 频率扫描图

Fig. 10 Frequency scanning diagram

2.8 温敏凝胶离体经皮渗透性研究^[15-16]

2.8.1 白芷中欧前胡素经皮渗透方法学的建立

(1) 色谱条件: 菲罗门 C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.1%磷酸水溶液 (75 : 25); 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 300 nm; 进样 20 μL; 柱温 30 °C。理论塔板数 ≥ 5000, 分离度 > 1.5。

(2) 对照品溶液的配制: 精密称定欧前胡素对照品适量于量瓶中, 加甲醇定容并制成欧前胡素质量浓度为 14.75 μg/mL 的对照品储备液, 低温密封储存, 备用。

(3) 专属性试验: 精密吸取欧前胡素对照品溶液、药物凝胶透皮接收液、空白凝胶透皮接收液各 20 μL, 按“2.8.1 (1)”项色谱条件测定, 记录色谱图 (图 11), 结果表明方法专属性良好。

(4) 线性关系考察: 取欧前胡素对照品储备液,

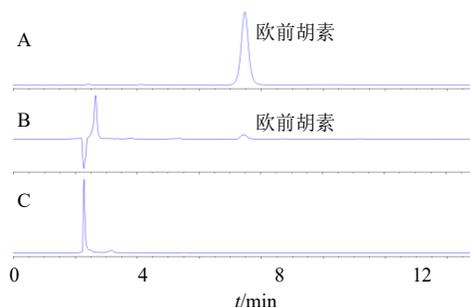


图 11 欧前胡素对照品 (A)、药物凝胶透皮接收液 (B) 和空白凝胶透皮接收液 (C) 的 HPLC 图

Fig. 11 HPLC diagram of imperatorin reference standard (A), drug gel transdermal receiver (B), and blank gel transdermal receiver (C)

用甲醇依级稀释至 7.38、3.69、1.84、0.92、0.46、0.23 μg/mL 的系列欧前胡素对照品溶液, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 将对照品溶液注入液相色谱仪, 按“2.8.1 (1)”项方法测定峰面积。以对照品质量浓度为横坐标 (x), 峰面积积分为纵坐标 (y), 绘制标准曲线, 结果显示欧前胡素的线性方程为 $y = 34.857x - 0.9166$, $r = 1.0000$, 结果表明欧前胡素在 0.23~14.75 μg/mL 线性关系良好。

(5) 精密度试验: 精密吸取 0.92 μg/mL 欧前胡素对照品溶液 20 μL, 按“2.8.1 (1)”项方法重复进样 6 次, 测定峰面积, 结果欧前胡素峰面积的 RSD 为 0.59%, 表明仪器精密度良好。

(6) 重复性试验: 平行制备透皮供试品溶液 6 份, 按“2.8.1 (1)”项方法测定, 计算的欧前胡素质量浓度的 RSD 为 4.37%, 结果表明该实验重复性良好。

(7) 稳定性试验: 取同一供试品溶液, 分别于 0、2、4、6、8、12、24 h 进样, 测定峰面积, 计算其峰面积的 RSD 为 0.34%。结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

(8) 加样回收率试验: 精密吸取 1.88、3.76、7.36 μg/mL 欧前胡素对照品储备液, 用空白凝胶透皮接收液配制低、中、高质量浓度的质控样品, 各平行 3 份, 按“2.8.1 (1)”项下色谱条件测定, 并计算加样回收率, 结果平均加样回收率为 101.64%, RSD 为 2.08%。

2.8.2 黄柏中盐酸小檗碱经皮渗透方法学的建立

(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-0.1%磷酸溶液 (50 : 50) (每 100 毫升加十二烷基磺酸钠 0.08 g); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 °C, 检测波长 265 nm,

进样量 5 μL 。

(2) 对照品溶液的配制: 精密称定盐酸小檗碱对照品适量于量瓶中, 加甲醇定容并制成盐酸小檗碱质量浓度为 125.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的对照品储备液, 低温密封储存, 备用。

(3) 专属性试验: 精密吸取盐酸小檗碱对照品溶液、药物凝胶透皮接收液、空白凝胶透皮接收液各 5 μL , 按“2.8.2 (1)”项色谱条件测定, 记录色谱图 (图 12), 结果表明方法专属性良好。

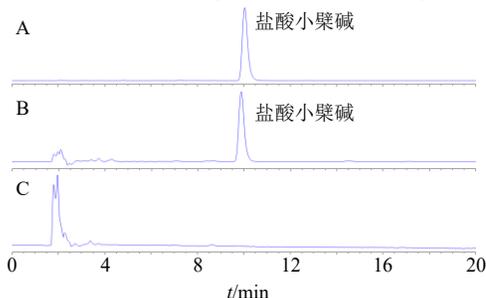


图 12 盐酸小檗碱对照品 (A)、药物凝胶透皮接收液 (B) 和空白凝胶透皮接收液 (C) 的 HPLC 图

Fig. 12 HPLC diagram of berberine hydrochloride reference standard (A), drug gel transdermal receiver (B), and blank gel transdermal receiver (C)

(4) 线性关系考察: 取盐酸小檗碱对照品储备液, 用甲醇依级稀释至 62.50、31.25、15.63、7.81、3.91、1.96 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的系列盐酸小檗碱对照品溶液, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 将对照品溶液注入液相色谱仪, 按“2.8.2 (1)”项方法测定峰面积。以对照品质量浓度为横坐标 (x), 峰面积积分为纵坐标 (y), 绘制标准曲线, 结果显示欧前胡素的线性方程为 $y=11.231x-10.604$, $r=0.9998$, 结果表明盐酸小檗碱在 1.96~125.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 线性关系良好。

(5) 精密度试验: 精密吸取 15.63 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 盐酸小檗碱对照品溶液 5 μL , 按“2.8.2 (1)”项方法重复进样 6 次, 测定峰面积, 结果盐酸小檗碱峰面积的 RSD 为 0.15%, 表明仪器精密度良好。

(6) 重复性试验: 平行制备透皮供试品溶液 6 份, 按“2.8.2 (1)”项方法测定, 计算盐酸小檗碱质量浓度的 RSD 为 2.19%, 结果表明该实验重复性良好。

(7) 稳定性试验: 取同一供试品溶液, 分别于制备后 0、2、4、6、8、12、24 h 进样, 测定峰面积, 计算盐酸小檗碱峰面积的 RSD 为 0.13%。结果表明供试品溶液 24 h 内稳定性良好。

(8) 加样回收率试验: 精密吸取 15.63、31.25、

62.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 盐酸小檗碱对照品储备液, 用空白凝胶透皮接收液配制低、中、高质量浓度的质控样品, 各平行 3 份, 按“2.8.2 (1)”项色谱条件测定, 并计算加样回收率, 结果平均加样回收率为 104.16%, RSD 为 0.38%。

2.8.3 小鼠离体皮肤的制备 选取 18~22 g 健康 SPF 级昆明雄性小鼠, 剃除腹部毛发, 麻醉后剃毛, 快速分离腹部皮肤, 用脱脂棉擦除皮下脂肪及黏液组织, 生理盐水冲洗, 滤纸吸干水分后用铝箔纸包裹, 于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存备用。

2.8.4 离体透皮渗透扩散装置及条件 采用改良 Franz 扩散池, 扩散面积 1.825 cm^2 , 接收池容积为 12 mL, 恒温水浴温度控制在 $(37.0\pm 0.5)\text{ }^{\circ}\text{C}$, 转速设定为 300 r/min, 每次取样量为 1 mL。将制备好的小鼠腹部皮肤按照扩散池面积裁剪, 置于扩散池与接收池之间, 真皮层面向接收池。接收池中放入磁力搅拌子, 并加入含 30%乙醇溶液的生理盐水 12 mL, 使用前超声脱气。将 1 mL 凝胶均匀涂抹于皮肤表面, 平行 6 份。分别于 4、6、8、10、12、24 h 精密移取接收液 1 mL, 同时立即补加等量的空白接收液, 以保证接收液环境不变。接收液以 0.22 μm 的微孔滤膜滤过, 备用。

2.8.5 数据分析^[17] 药物的累积透过量 (Q_n) 的计算公式如下。

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

A 表示有效扩散面积 (1.825 cm^2), V 为接收液总体积 (12 mL), V_i 为取样体积 (1 mL), C_n 为第 n 次取样时接收液中药物的质量浓度, C_i 表示第 i 次取样时接收液中药物的质量浓度

以药物的 Q_n 为纵坐标, 时间 t 为横坐标, 并采用零级、一级、Higuchi、Ritger-Peppas、Hixon-Crowell 模型对 $Q-t$ 进行模型拟合, 同时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 , $\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$], 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, 超声 30 min, 于 8000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 测定含量, 并计算药物滞留量 (Q_s , $Q_s = VC/A$, A 为有效扩散面积, V 为溶解样品体积, C 为测得的药物质量浓度), 结果见图 13 和表 4。黄白温敏凝胶中欧前胡素与盐酸小檗碱的释药均 Higuchi 释放动力学方程, 且 Ritger-Peppas 方程拟合系数均大于 0.89。

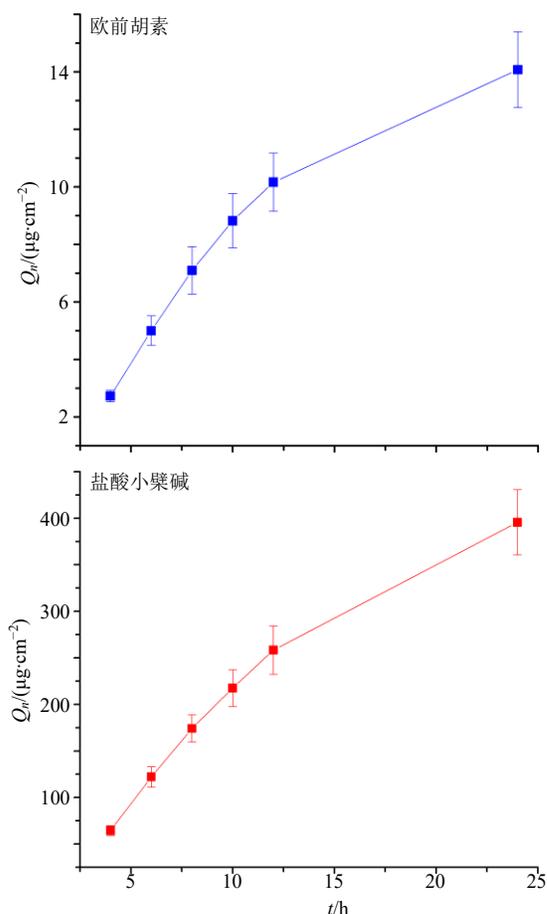


图 13 温敏凝胶中欧前胡素和盐酸小檗碱累积透过量 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 13 Cumulative permeation of imperatorin and berberine in thermosensitive gel amount ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

表 4 欧前胡素和盐酸小檗碱的经皮渗透动力学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 4 Percutaneous permeation kinetic parameters of imperatorin and berberine ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

成分	Q_n-t 方程	R^2	模型	$Q_{24}/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2})$	$J_s/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1})$	$Q_s/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2})$
欧前胡素	$Q_n=3.8871 t^{1/2}-4.1881$	0.9645	Higuchi	14.07 ± 1.34	3.89	0.1783 ± 0.0078
盐酸小檗碱	$Q_n=114.04 t^{1/2}-151.51$	0.9909	Higuchi	395.72 ± 35.04	114.04	1.6476 ± 0.0409

分子材料制备的温敏凝胶剂具有高渗作用，基于唐南平衡理论，可知其作用于肿胀皮肤可以快速的反渗出肿胀部位的组织液，以达到良好的消肿止痛作用，这不仅解决了散剂由于矿物药加入，在溶解时放热和高浓度盐溶液环境带来的皮肤刺激性，同时水凝胶的使用也可以增加患者舒适性与适应性；同时还采用流变仪对温敏凝胶流变学性质进行了评价，流变学特性是凝胶剂的重要特征^[19]，相对于黏稠度、硬度、涂展性这类宏观且主观性质评价，流变学的精确度、可信度、重复性更高^[20]，且获得的参数对于分析凝胶结构、凝胶强度、黏弹性、胶凝行为、物理稳定性等具有更高价值和意义，并使凝

3 讨论

温敏凝胶是一种新型的智能缓释制剂，其凝胶过程不需要额外的添加剂和化学反应参与，且温度是生物体本身所具备的一种体征，故其自发现以来一直是医药领域的研究热点，已被应用于黏膜给药、注射给药、直肠给药及经皮给药等。

在凝胶剂的制备过程中，通常以水作为介质，故只能溶解水溶性药物，当需要在凝胶体系中加入不溶于水或难溶于水的药物时，亲水性助溶剂的使用是必要的。本研究使用 Turbiscan Lab 稳定性分析仪比较了不同助溶剂对温敏凝胶体系的稳定性影响，其优点在于：①温敏凝胶在常温下呈液态溶胶状态，符合 Turbiscan Lab 稳定性分析仪的测定要求；②仪器测量时采用非进入式方法，不稀释，无外力，不搅动，可直接表述分散体系的真实状态；③可准确、快速、完全地表征处方不稳定性和变化过程，为温敏凝胶的处方筛选和评价提供了理想手段。

本实验采用 Box-Behnken 响应面法^[18]对方进行了优化，二项式拟合效应面反映了 P407、P188、PEG6000 与温度的变化规律，且模型拟合度和可信度良好。此外，本研究还对温敏凝胶进行了表征，扫描电镜结果可看出温敏凝胶形成了一定的三维网状结构，且网状结构排列整齐，孔隙疏松，相互贯通；通过冰点渗透压仪测定其渗透压，发现以高

胶剂的质量评价更趋科学化^[21]。

本实验采用 Franz 扩散池法研究了黄白温敏凝胶的体外经皮吸收行为，结果显示其中欧前胡素和盐酸小檗碱的累积渗透量 Q_n-t 模型拟合均符合 Higuchi 释放动力学方程，表明药物释放存在一定的缓释效果，且 Ritger-Peppas 方程拟合系数大于 0.89，说明释药机制骨架溶蚀作用。

由于本实验主要研究了完整皮肤的经皮渗透性，而临床实际情况为被蛇虫咬伤的破损皮肤，故后期应该增加其他更深入的研究从而更真实的描述药物的经皮吸收行为。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 王志强, 陈思婷, 吴事仁, 等. 王万春运用中医药综合治疗毒蛇咬伤经验 [J]. 光明中医, 2017, 32(12): 1706-1708.
- [2] Wang W, Wat E, Hui P C, *et al.* Dual-functional transdermal drug delivery system with controllable drug loading based on thermosensitive poloxamer hydrogel for atopic dermatitis treatment [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 24112.
- [3] Qi X J, Liu X Y, Tang L M, *et al.* Anti-depressant effect of curcumin-loaded guanidine-chitosan thermo-sensitive hydrogel by nasal delivery [J]. *Pharm Dev Technol*, 2020, 25(3): 316-325.
- [4] Gong C, Qi T, Wei X, *et al.* Thermosensitive polymeric hydrogels as drug delivery systems [J]. *Curr Med Chem*, 2013, 20(1): 79-94.
- [5] Bordes C, Snabre P, Frances C, *et al.* Optical investigation of shear- and time-dependent microstructural changes to stabilized and depletion-flocculated concentrated latex sphere suspensions [J]. *Powder Technol*, 2003, 130(1/2/3): 331-337.
- [6] 孙美洁, 郑剑平, 王浩, 等. 利用 Turbiscan Lab 稳定性分析仪研究水焦浆的稳定性 [J]. 石油学报: 石油加工, 2016, 32(6): 1164-1170.
- [7] 卢浩扬, 林媛媛, 车俊秀, 等. 星点设计-效应面法优化芷芎散温敏凝胶的处方及其鼻黏膜渗透特性研究 [J]. 中草药, 2014, 45(13): 1845-1849.
- [8] 梁浩明, 龙晓英, 卢彬. 黄芩苷外用温敏凝胶的处方设计及优化 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(24): 34-38.
- [9] 刘媛媛. 温敏型眼用葛根素原位凝胶的制备与质量评价 [J]. 华西药理学杂志, 2019, 34(3): 132-136.
- [10] 潘亚辉, 高树中. 基于温度响应性纳米复合物对脐疗新制剂及药物释放的研究 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(5): 2145-2149.
- [11] 罗尧尧, 廖倩, 王婷, 等. 美洲大蠊温敏凝胶的制备及其促糖尿病大鼠创面修复作用考察 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(14): 164-172.
- [12] 李春雨, 张丹参, 王树, 等. 珍珠滴眼凝胶的渗透压测定 [J]. 河北北方学院学报: 医学版, 2009, 26(1): 16-18.
- [13] 唐随意. 布地奈德温敏凝胶灌肠液的研究 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2019.
- [14] 李曼. 托吡卡胺眼用温度敏感原位凝胶的研制 [D]. 重庆: 第三军医大学, 2014.
- [15] 管咏梅, 宋昕祁, 刘佳, 等. 解郁安神凝胶贴膏剂的处方优选与质量评价 [J]. 中草药, 2019, 50(23): 5731-5738.
- [16] 刘丽丽, 史焄女, 方蕾, 等. 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 [J]. 中草药, 2019, 50(17): 4076-4083.
- [17] 夏爱晓, 蒋正立, 李胜英, 等. 马来酸噻吗洛尔温敏凝胶的制备及体外透皮考察 [J]. 中国药师, 2020, 23(7): 1453-1456, 1463.
- [18] 甘帅, 章津铭, 江茂源, 等. 基于响应面法优选美洲大蠊口腔原位温敏凝胶的制备研究 [J]. 中草药, 2020, 51(8): 2134-2140.
- [19] Pisal P B, Patil S S, Pokharkar V B. Rheological investigation and its correlation with permeability coefficient of drug loaded carbopol gel: Influence of absorption enhancers [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2013, 39(4): 593-599.
- [20] 郑学晶, 刘芳蓓, 裴莹, 等. 水凝胶流变学研究概况 [J]. 高分子通报, 2017(5): 1-10.
- [21] Siska B, Snejdrova E, Machac I, *et al.* Contribution to the rheological testing of pharmaceutical semisolids [J]. *Pharm Dev Technol*, 2019, 24(1): 80-88.

[责任编辑 郑礼胜]