

## 黄芩苷脂质体凝胶制备、质量评价及其对痤疮的药效学评价

王佳辉, 陈麟, 孙平, 陈子豪, 李海艳, 苏青\*

成都医学院药学院, 四川 成都 610500

**摘要:** 目的 制备黄芩苷脂质体凝胶 (baicalin liposomes gels, Bai-Lip-Gels), 进行体外质量评价, 并考察其治疗轻、中度痤疮的疗效。方法 首先采用单因素试验, 以包封率、粒径为评价指标来考察处方工艺对脂质体制备的影响。其次, 利用各因素与包封率之间的相关性选出影响脂质体制备的显著因素, 并运用 Box-Behnken 设计-响应面法进一步优化处方工艺。然后制备 Bai-Lip-Gels, 采用流变学进行表征, 对其稳定性进行初步考察, 并通过透析袋释药试验和离体皮肤透皮试验考察 Bai-Lip-Gels 的释药性能。最后, 对 Bai-Lip-Gels 进行兔耳痤疮的药效学评价。结果 成功制备黄芩苷脂质体 (baicalin liposomes, Bai-Lip), 其包封率为 63.9%; 在透射电子显微镜 (TEM) 下观察可见脂质体呈规则球形, 结构完整, 分散均匀; 其粒径为  $(212.300 \pm 0.424)$  nm, 多分散性指数 (polydispersity index, PDI) 为  $0.217 \pm 0.012$ , Zeta 电位为  $(-32.4 \pm 0.9)$  mV, 制备的 Bai-Lip 稳定。制备的 Bai-Lip-Gels 流变学性质稳定, 在  $4^\circ\text{C}$  冷藏贮存稳定性良好。离体皮肤透皮试验结果表明, Bai-Lip-Gels 在 18 h 内单位面积累积渗透量 ( $Q_{18}$ ) 为  $(81.38 \pm 2.81) \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , 高于黄芩苷混悬剂凝胶 (baicalin suspension gels, Bai-Sus-Gels) [ $Q_{18}$  为  $(43.03 \pm 2.14) \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ], 并对 Bai-Lip-Gels 和 Bai-Sus-Gels 的释放曲线进行了方程拟合, Bai-Lip-Gels 体外经皮渗透符合一级方程, Bai-Sus-Gels 经皮渗透符合零级方程。初步药效学试验表明, 在给药治疗后, 组织病理染色结果可知, Bai-Lip-Gels 组的疗效显著, 主要体现在减轻角质化程度、局部组织充血、炎症程度等方面。从兔耳痤疮模型血清中肿瘤坏死因子  $\alpha$ 、白细胞介素  $1\beta$ 、白细胞介素 6、白细胞介素 8 分泌的影响发现, Bai-Lip-Gels 能显著降低兔耳痤疮的炎症因子水平, 且疗效优于阳性对照组阿达帕林凝胶。结论 制备的 Bai-Lip-Gels 用于兔耳痤疮治疗, 能有效减轻角质化程度, 减轻局部组织充血, 降低炎症因子水平, 为治疗轻、中度炎症性痤疮提供制剂开发的依据。

**关键词:** 黄芩苷; 脂质体凝胶; Box-Behnken 设计-响应面法; 经皮渗透; 痤疮; 炎症; 药效学

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)16-4860-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.16.011

## Preparation, quality evaluation of baicalin liposomes gels and its pharmacodynamic evaluation for acne

WANG Jia-hui, CHEN Lin, SUN Ping, CHEN Zi-hao, LI Hai-yan, SU Qing

College of Pharmacy, Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China

**Abstract: Objective** To prepare baicalin liposomes gels (Bai-Lip-Gels), evaluate its quality *in vitro*, and investigate its efficacy in treating mild and moderate acne. **Methods** Firstly, a single factor test was used to investigate the influence of the formulation process on the preparation of liposomes with the encapsulation efficiency and particle size as evaluation indicators. Secondly, the correlation between each factor and the encapsulation efficiency was used to select the significant factors affecting the preparation of liposomes, and then, the Box-Behnken effect surface method was used to further optimize the prescription process. Moreover, Bai-Lip-Gels was prepared, and characterized by rheology, and its stability was preliminarily investigated, and the drug release of Bai-Lip-Gels was investigated through the dialysis bag release test and the *in vitro* skin transdermal test performance. Finally, the pharmacodynamics of Bai-Lip-Gels was evaluated for rabbit ear acne. **Results** The baicalin liposomes (Bai-Lip) were successfully prepared, with an encapsulation efficiency of 63.9%; Under the transmission electron microscope, the liposomes were in a regular spherical shape, with complete structure and uniform dispersion. The particle size was  $(212.300 \pm 0.424)$  nm, polydispersity index (PDI) was  $0.217 \pm 0.012$ , Zeta potential was  $(-32.4 \pm 0.9)$  mV, and the prepared Bai-Lip was stable. The prepared Bai-Lip-gels had stable rheological properties

收稿日期: 2021-04-30

基金项目: 2020年四川省科技创新苗子工程培育及小发明小创造项目; 2020年江安县科技计划项目

作者简介: 王佳辉 (1995—), 硕士研究生, 从事中药提取物及新制剂研究。Tel: 15756327309 E-mail: 1647906146@qq.com

\*通信作者: 苏青, 博士, 副教授, 研究生导师, 从事中药提取物及新制剂研究。Tel: (028)62739516 E-mail: 74359178@qq.com

and good storage stability at 4 °C. The results of *in vitro* skin permeation test showed that the cumulative permeation per unit area in 18 h ( $Q_{18}$ ) of Bai-Lip-Gels was  $(81.38 \pm 2.81) \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , which was higher than  $Q_{18}$  of baicalin suspension gels (Bai-Sus-Gels) which was  $(43.03 \pm 2.14) \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , and the release curve of Bai-Lip-Gels and Bai-Sus-Gels was fitted with equations. The permeation of Bai-Lip-Gels *in vitro* conformed to the first-order equation, and the transdermal permeation of Bai-Sus-Gels penetration conformed to the zero-order equation. Preliminary pharmacodynamic tests showed that the therapeutic effect of the Bai-Lip-Gels group was significant after administration treatment by histopathological staining, which was mainly reflected in the reduction of keratinization, local tissue congestion, and inflammation. From the effects of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, and IL-8 secretion in the serum of rabbit ear acne model, it is found that Bai-Lip-Gels significantly reduced the level of inflammatory factors in rabbit ear acne, and the curative effect was better than Adapalene gel group. **Conclusion** The preparation of Bai-Lip-Gels for the treatment of rabbit ear acne can effectively reduce the degree of keratinization, relieve local tissue congestion, and reduce the level of inflammatory factors, which provides a basis for the development of preparation for the treatment of mild and moderate inflammatory acne.

**Key words:** baicalin; liposomes gels; Box-Behnken design-response surface methodology; percutaneous permeation; acne; inflammation; pharmacodynamics

黄芩苷 (baicalin, Bai) 是唇形科黄芩属植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 干燥根茎中提取的黄酮类活性成分<sup>[1]</sup>, 不仅有很强的抗炎活性<sup>[2]</sup>, 还具有抑制革兰氏阳性菌痤疮丙酸杆菌的作用<sup>[3]</sup>, 将其开发成外用抗痤疮制剂局部起效、避免全身影响、无肝脏首过效应<sup>[4]</sup>, 具有很大的市场潜力。但是黄芩苷存在难溶于水, 皮肤透过率低等问题, 限制了其在皮肤外用制剂上的应用<sup>[5]</sup>。陈遥等<sup>[6]</sup>采用促透剂促进黄芩苷凝胶中黄芩苷对皮肤的经皮透过量, 在一定程度上能够增加累积透过量, 但难以解决药物透过量达到一定限度时, 大量的黄芩苷滞留在皮肤表面而不能持续透过皮肤表层发挥药效的问题。熊欣等<sup>[7]</sup>制备黄芩苷脂质体凝胶 (baicalin liposomal gels, Bai-Lip-Gels) 并对体外透皮性能进行评析, 发现黄芩苷混悬剂凝胶 (baicalin suspension gels, Bai-Sus-Gels) 与普通脂质体凝胶具有相似的体外透皮性能, 在透皮性能上无显著性优势。储晓琴等<sup>[8]</sup>对 Bai-Lip-Gels 体外释药与稳定性进行了研究, 发现 Bai-Lip-Gels 具有一定的缓释性, 并在低温下贮存稳定性更佳。

近年来, 脂质体 (liposomes, Lip) 作为药用中间载体成为了一大热点, 其类脂双分子层结构具有良好的生物相容性以及药物包载能力<sup>[9]</sup>, 但是脂质体溶液的流动性, 不宜长时间滞留在皮肤表面。而将脂质体均匀混合在凝胶基质中制备的脂质体凝胶剂, 能解决流动性问题<sup>[10]</sup>, 同时也具备提高药物滞留时间、稳定性、缓释性以及减少药物本身的刺激性等优点<sup>[11]</sup>。因此, 本研究将黄芩苷制备成脂质体凝胶, 对其进行质量评价, 考察流变学性质、初步稳定性以及体外经皮渗透, 在此基础上, 以兔耳痤疮模型来评价 Bai-Lip-Gels 的初步药效学, 为将黄

芩苷开发成治疗轻、中度痤疮的外用制剂提供参考。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

千分之一电子天平、十万分之一电子天平, 德国 Mettler Toledo 公司; pHs-4C+智能型酸度计, 成都世纪方舟科技有限公司; MCR302 流变仪, 安东帕; DV3T 粘度计, 德国 Brookfield 公司; Agilent1260 高效液相色谱仪, 美国安捷伦公司; NanoZS90 激光粒度仪, 英国马尔文仪器有限公司; JY90-IIN 超声波细胞粉碎机、ST16R 高速冷冻离心机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; RV10 旋转蒸发仪、RW20 顶置式搅拌器, 德国 IKA 集团; 优普纯水机, 四川优普超纯科技有限公司; JEM-1200EX 透射电子显微镜 (TEM), 日本 JEOL 公司; Epoch 酶标检测仪, 美国 BioTek Instruments 公司。

### 1.2 动物

健康 SPF 级 SD 雄性大鼠, 200~250 g, 成都达硕实验动物有限公司, 许可证号: SCXK (川) 2019-031。

清洁级雄性新西兰兔, 质量 2.0~2.5 kg, 购于成都达硕动物养殖中心。饲养于成都医学院实验动物中心动物室, 使用许可证: SYXK (川) 2020-196, 清洁级, 温度 18~20 °C, 相对湿度 40%。

本实验过程中所有动物实验均符合成都医学院实验动物伦理审查委员会相应的审查要求。

### 1.3 试剂

黄芩苷对照品, 成都曼思特生物科技有限公司, 批号 15112909, 质量分数 99%; 黄芩苷原料药 (批号 G07S11L123706, 质量分数 90%)、大豆卵磷脂 (批号 T12O10F99737)、维生素 E (批号 D20D9S77848), 上海源叶生物科技有限公司; 胆

固醇,批号 2020010101,成都市科隆化学品有限公司;聚山梨酯 80,天津市科密欧化学试剂有限公司;卡波姆 974P,批号 22318012,美国 Lubrizo 公司;氯仿,天津市大茂化学试剂厂;甲醇,色谱纯,赛默飞世尔科技有限公司;氢氧化钠,批号 190501,四川金山制药有限公司;中性树胶,批号 10004160,国药集团化学试剂有限公司;痤疮丙酸杆菌 *Propionibacterium acnes*,批号 336443,河南省微生物菌种保藏中心;油酸,嘉兴科隆化工有限公司;兔肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、兔白细胞介素 (interleukin, IL) -1 $\beta$ 、IL-6、IL-8 酶联免疫分析 (批号 ml0016961、ml027836、ml051629、ml027347),上海酶联生物科技有限公司;所用纯化水为实验自制超纯水。

## 2 方法与结果

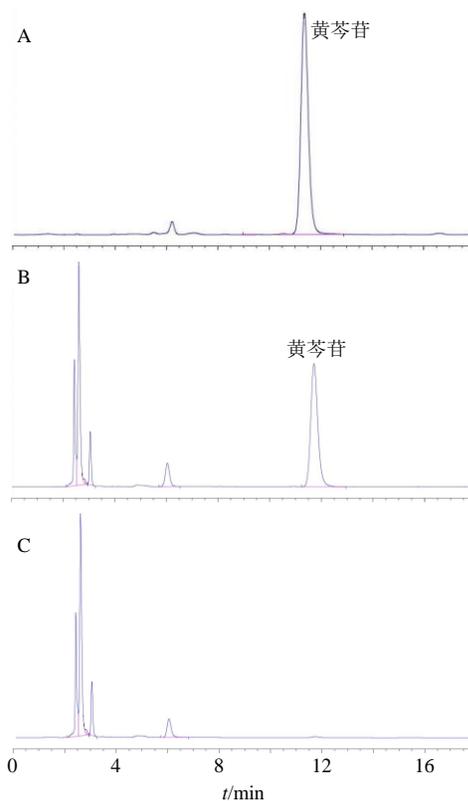
### 2.1 黄芩苷含量测定

**2.1.1 色谱条件** 色谱柱为 Welchrom-C<sub>18</sub> 柱 (250 mm×4.6 mm, 5  $\mu$ m);流动相为甲醇-0.1%磷酸水溶液 (47:53, 磷酸调 pH 值至 2.20±0.05);体积流量 1.0 mL/min;检测波长 280 nm;柱温 35  $^{\circ}$ C;进样量 20  $\mu$ L。

**2.1.2 供试品溶液的配制** 取 Bai-Lip-Gels 1.0 g,置于 10 mL 量瓶中,加流动相溶解定容至刻度线,同法制备 3 份,微孔滤膜滤后,吸取滤液 1 mL 至 10 mL 量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,即得供试品溶液,待测定。

**2.1.3 专属性考察** 称取黄芩苷对照品 10.00 mg,置于 100 mL 量瓶中,用流动相溶解并定容至刻度,制成 100  $\mu$ g/mL 对照品储备液。精密量取储备液 5 mL,置于 10 mL 量瓶中,使用流动相稀释并定容至刻度,制成 50  $\mu$ g/mL 的对照品溶液;称取空白脂质体凝胶 1.00 g,置于 10 mL 量瓶中,加流动相溶解并定容至刻度;称取 Bai-Lip-Gels 1.00 g,置于 10 mL 量瓶中,加流动相溶解并定容至刻度;分别取上述溶液,按“2.1.1”项下色谱条件测定,记录色谱峰,考察系统适应性。结果见图 1,结果表明,空白的脂质体凝胶基质不会干扰黄芩苷的测定,方法专属性较高。

**2.1.4 线性关系考察** 称取黄芩苷对照品 10.00 mg 于 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解稀释并定容至刻度,得到 1 mg/mL 的对照品母液。吸取母液各 50、100、200、300、400、600、800  $\mu$ L 于 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释定容至刻度,制得质量浓度分别为 5、10、



A-黄芩苷对照品 B-Bai-Lip-Gels C-空白凝胶基质  
A-baicalin reference substance B-BALip-Gels C-blank matrix

图 1 专属性试验色谱图

Fig. 1 Chromatogram of specific test

20、30、40、60、80  $\mu$ g/mL 的系列对照品溶液。采用高效液相色谱仪进行测定。以黄芩苷质量浓度为横坐标 (x),峰面积为纵坐标 (y) 进行线性回归,得到标准曲线为  $y=62.171x-29.414$ ,  $R^2=0.9998$ ,表明黄芩苷在 5~80  $\mu$ g/mL 线性关系良好。

**2.1.5 精密度试验** 取黄芩苷对照品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件,连续进样测定 6 次,记录峰面积,计算得黄芩苷峰面积 RSD 为 1.38%,表明实验仪器精密度良好。

**2.1.6 稳定性试验** 按“2.1.2”项下方法配制 10、30  $\mu$ g/mL 黄芩苷的供试品溶液,分别在室温下于 0、2、4、6、8、10、12、24 h 进样测定,记录峰面积。结果显示,10、30  $\mu$ g/mL 黄芩苷的供试品溶液在 24 h 内峰面积的 RSD 分别为 0.33%、0.38%,表明在 24 h 内供试品溶液稳定性良好。

**2.1.7 重复性试验** 取 Bai-Lip-Gels 6 份,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件测定,记录峰面积,计算黄芩苷质量分数的 RSD 为 2.78%,表明本实验重复性良好。

**2.1.8 加样回收率试验** 按“2.1.2”项下方法配制

低、中、高质量浓度 (10、30、60 μg/mL) 黄芩苷的供试品溶液各 3 份, 分别加入处方比例量的辅料, 进液相测定。结果显示, 高、中、低质量浓度回收率均在 95%~105%, 平均回收率为 100.03%, RSD 为 0.25%。

## 2.2 黄芩苷脂质体 (baicalin liposomes, Bai-Lip) 的制备工艺优化

**2.2.1 Bai-Lip 的制备** 在前期脂质体制备方法筛选的基础上, 采用薄膜分散法<sup>[12]</sup>制备 Bai-Lip。称取处方量的大豆卵磷脂、胆固醇、维生素 E 和聚山梨酯 80 在氯仿和甲醇混合液中溶解混合均匀, 置于旋转蒸发器上, 在 28 °C、55 r/min 转速下制得类脂薄膜, 加入由磷酸盐缓冲液 (PBS) 溶解的处方量黄芩苷, 在 45 °C、低压、旋蒸震荡制得 Bai-Lip, 将制得的 Bai-Lip 放置常温后冰箱冷藏一定时间, 随即将冷藏后的样品通过探针式超声, 滤膜滤过, 整粒得到 Bai-Lip。

**2.2.2 Bai-Lip 包封率测定** 取 Bai-Lip 1 mL 于 4 °C 条件下高速冷冻离心 15 min (14 000 r/min), 精密吸取上清液适量, 定容到 1 mL, 在上述“2.1”项 HPLC 条件测定其中黄芩苷的含量作为  $W_{游}$ 。另取 1 mL 脂质体, 以 10 倍量的甲醇进行破乳, 测定其中黄芩苷的含量作为  $W_{总}$ , 计算包封率。

$$\text{包封率} = (W_{总} - W_{游}) / W_{总}$$

**2.2.3 处方工艺的单因素考察** 制备 Bai-Lip, 固定处方中其他比例不变 (基于平衡溶解度实验确定黄芩苷用量 15 mg、水化转速 55 r/min), 分别对有机溶剂 (氯仿、甲醇及氯仿-甲醇 2:1、1:1、1:2)、类脂比 (胆固醇-磷脂 4:9、3:10、2:11、1:12)、水化温度 (30、35、40、45 °C)、探超振幅 (20、40、60、80、100 W)、水化体积 (1、2、3、4、5 mL)、水化时间 (25、35、45、55、65 min) 进行单因素考察, 结果见表 1~6。采用 NanoZS90 激光粒度仪

表 1 溶剂种类对 Bai-Lip 的粒径及包封率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 1 Effect of solvent types on particle size and entrapment efficiency of Bai-Lip ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

溶剂种类	包封率/%	粒径/nm
氯仿	35.2±2.7	215.608±1.400
甲醇	39.5±1.8	222.701±1.626
氯仿-甲醇 2:1	56.4±3.2	230.915±2.313
氯仿-甲醇 1:1	46.3±2.1	224.112±3.675
氯仿-甲醇 1:2	43.5±2.4	233.403±4.203

表 2 类脂比对 Bai-Lip 的粒径及包封率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Effect of lipid ratio on particle size and entrapment efficiency of Bai-Lip ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

类脂比	包封率/%	粒径/nm
胆固醇-磷脂 4:9	39.7±2.7	232.015±1.877
胆固醇-磷脂 3:10	57.6±2.4	212.131±0.424
胆固醇-磷脂 2:11	47.5±1.8	210.710±1.818
胆固醇-磷脂 1:12	35.6±3.1	200.821±0.675

表 3 水化温度对 Bai-Lip 的粒径及包封率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 3 Effect of hydration temperature on particle size and entrapment efficiency of Bai-Lip ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

水化温度/°C	包封率/%	粒径/nm
30	36.8±1.7	213.111±1.803
35	42.6±2.5	210.415±2.050
40	62.7±1.8	214.913±0.929
45	54.2±1.3	204.723±0.436

表 4 探超振幅对 Bai-Lip 的粒径及包封率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 4 Effect of probe-type ultrasound amplitude on particle size and entrapment efficiency of Bai-Lip ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

探超振幅/W	包封率/%	粒径/nm
20	36.8±1.7	287.813±2.739
40	45.6±1.5	251.314±3.024
60	59.6±2.3	225.708±0.873
80	54.3±1.3	122.735±1.041
100	52.3±2.7	113.210±2.172

表 5 水化体积对 Bai-Lip 的粒径及包封率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 5 Effect of hydration volume on particle size and entrapment efficiency of Bai-Lip ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

水化体积/mL	包封率/%	粒径/nm
1	48.6±2.7	251.222±0.907
2	57.5±2.4	246.310±1.700
3	63.7±1.9	223.059±0.200
4	53.3±1.4	224.567±2.364
5	45.4±1.5	210.630±0.818

和 HPLC 法测定 Bai-Lip 的粒径及包封率, 以考察各因素对脂质体纳米粒的粒径及包封率的影响。

**2.2.4 各因素与包封率的相关性分析** 对各因素与包封率之间进行相关性分析, 结果见表 7。类脂

表 6 水化时间对 Bai-Lip 的粒径及包封率的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Table 6 Effect of hydration time on particle size and entrapment efficiency of Bai-Lip ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

水化时间/min	包封率/%	粒径/nm
25	38.8±1.5	248.714±3.623
35	46.7±1.6	221.815±2.404
45	58.5±2.8	234.822±1.158
55	55.9±2.3	234.500±2.173
65	41.3±1.8	233.110±2.203

比和水化体积与包封率之间的相关性显著 ( $P < 0.01$ ), 其他因素对 Bai-Lip 包封率影响不明显, 其影响依次为类脂比 > 水化体积 > 水化时间 > 水化温度 > 溶剂比例 > 探超功率。后续的处方工艺的优化将从类脂比、水化体积等因素入手。

**2.2.5 响应面法优化处方** 根据各因素与包封率之间进行相关性分析, 选取影响较大的因素水化体积 ( $X_1$ )、类脂比 ( $X_2$ )、水化时间 ( $X_3$ ), 进行工艺优化, 采用 3 因素 3 水平进行实验设计, Box-behnken 试验设计及结果见表 8, 共进行 17 次实验。采用

表 7 各因素与包封率的相关性分析结果

Table 7 Correlation analysis results of various factors and entrapment efficiency

因素	相关系数						
	溶剂比例	类脂比	水化温度	探超功率	水化体积	水化时间	包封率
溶剂比例	1.000	0.066	0.112	0.050	0.130	0.017	0.025
类脂比	0.066	1.000	0.085	0.050	0.013	0.017	0.563**
水化温度	0.112	0.085	1.000	0.120	0.031	0.041	0.083
探超功率	0.050	0.050	0.120	1.000	0.025	0.033	0.015
水化体积	0.013	0.013	0.031	0.025	1.000	0.009	0.547**
水化时间	0.017	0.017	0.041	0.033	0.009	1.000	0.214
包封率	0.025	0.563**	0.083	0.015	0.547**	0.214	1.000

\*\*相关系数在 0.01 水平上显著 (双侧)

\*\* the correlation coefficient is significant at the 0.01 level (two-sided)

表 8 Bai-Lip 处方工艺 Box-behnken 试验设计及结果

Table 8 Box-behnken trial design and results of Bai-Lip prescribing process

试验号	$X_1$ /mL	$X_2$	$X_3$ /min	Y/%	试验号	$X_1$ /mL	$X_2$	$X_3$ /min	Y/%	试验号	$X_1$ /mL	$X_2$	$X_3$ /min	Y/%
1	3 (0)	3 : 10 (0)	45 (0)	64.5	7	2	3 : 10	35 (-1)	47.0	13	3	2 : 11	55	51.7
2	3	3 : 10	45	63.3	8	3	2 : 11	35	49.8	14	3	4 : 9	55	56.0
3	4 (+1)	2 : 11 (-1)	45	51.2	9	4	3 : 10	35	51.4	15	3	3 : 10	45	65.9
4	3	3 : 10	45	64.6	10	3	4 : 9 (+1)	35	52.7	16	3	3 : 10	45	66.2
5	2 (-1)	2 : 11	45	45.3	11	4	4 : 9	45	54.0	17	2	4 : 9	45	52.6
6	2	3 : 10	55 (+1)	53.6	12	4	3 : 10	55	57.2					

Design-Expert 12 软件进行处理。并对得到的结果进行相应的验证和对比, 以此来判断制备工艺的优势和可靠性。

模型拟合及方差分析以包封率 ( $Y$ ) 为响应值, 应用 Design Expert 12 软件分别对  $X_1$  (类脂比)、 $X_2$  (水化体积)、 $X_3$  (水化时间) 进行多元线性回归和二项式拟合, 得到回归方程  $Y = 64.90 + 1.91 X_1 + 1.91 X_2 + 2.53 X_3 - 1.13 X_1 X_2 - 0.20 X_1 X_3 - 0.15 X_2 X_3 - 7.51 X_1^2 - 6.61 X_2^2 - 5.09 X_3^2$ ,  $R^2 = 0.9844$ 。

由表 9 可知, 表明实验模型有很高的显著性 ( $F$  值 = 48.99,  $P < 0.0001$ ), 该方程与实际情况拟

合较好。失拟项  $F$  值 = 1.38,  $P = 0.3691$ , 说明失拟项不显著, 未知因素对试验结果干扰小。3 种因素都有比较明显的影响 ( $P < 0.01$ ), 影响 Bai-Lip 制备的显著性排列顺序为水化时间 > 水化体积 = 类脂比。模型的相关系数  $R^2 = 0.9844$ , 因此, 可以用此模型方程对制备的脂质体的实验结果进行合理分析。

采用响应面对其优化和预测, 应用 Design-Expert 12 软件, 基于二项式拟合模型, 固定 3 个变量中的 1 个变量, 绘制另外 2 个变量对包封率影响的三维响应面, 结果见图 2。

表 9 Bai-Lip 包封率回归模型方差分析

Table 9 Variance analysis of regression model of Bai-Lip encapsulation efficiency

方差来源	平均平方和	自由度	均方	F 值	P 值	方差来源	平均平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	705.87	9	78.43	48.99	0.000 1	$X_1^2$	237.63	1	237.63	148.42	0.000 1
$X_1$	29.26	1	29.26	18.28	0.003 7	$X_2^2$	184.11	1	184.11	114.99	0.000 1
$X_2$	29.26	1	29.26	18.28	0.003 7	$X_3^2$	108.98	1	108.98	68.07	0.000 1
$X_3$	51.01	1	51.01	31.86	0.000 8	残差	11.21	7	1.60		
$X_1X_2$	5.06	1	5.06	3.16	0.118 6	失拟项	5.71	3	1.90	1.38	0.369 1
$X_1X_3$	0.16	1	0.16	0.10	0.761 1	纯误差	5.50	4	1.38		
$X_2X_3$	0.09	1	0.09	0.06	0.819 4	总值	717.08	16			

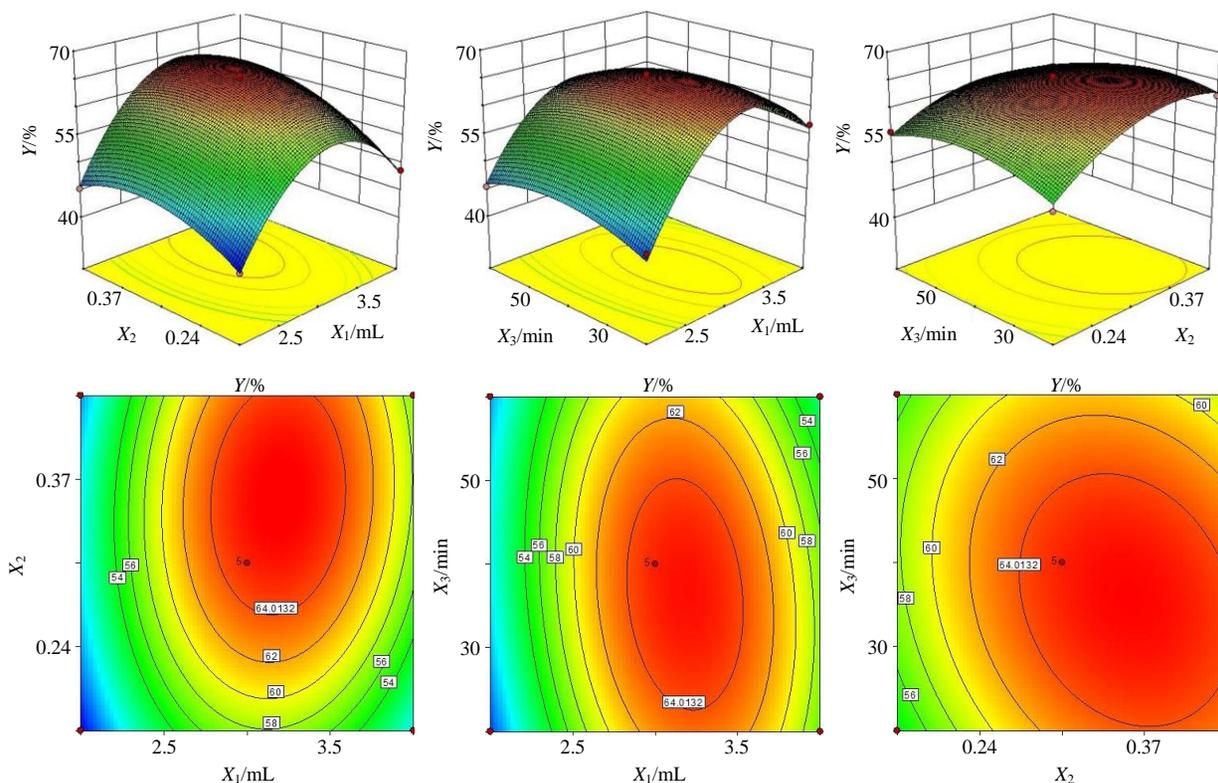


图 2 各因素相互关系及包封率的三维响应面和等高线图

Fig. 2 Three-dimensional response surface and high-line plot of relationship between various factors and encapsulation efficiency

经软件分析筛选, 得到 Bai-Lip 的最优制备工艺参数为水化时间 47 min, 类脂比 3 : 10, 水化体积 3 mL, 预测包封率分别为 65.7%。

### 2.3 脂质体的形态粒径及包封率

**2.3.1 形态观察** 取适量脂质体, 移取 PBS 液进行 10 倍体积稀释。稀释后再移取 20  $\mu$ L 溶液, 置于铜网上吸收后, 加 1% 磷钨酸适量染色 1 min, 自然风干后, TEM 下观察其形状并进行拍照, 结果见图 3。可见脂质体呈规则球形, 结构完整, 分散均匀。

**2.3.2 平均粒径及 Zeta 电位** 取适量 Bai-Lip, 用 PBS 缓冲液 10 倍体积稀释, 采用马尔文激光粒度

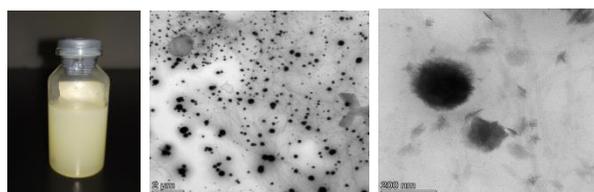


图 3 Bai-Lip 的外观及 TEM 图

Fig. 3 Appearance and TEM image of Bai-Lip

仪对脂质体的粒径分布及 Zeta 电位进行测定。其平均粒径为  $(212.300 \pm 0.424)$  nm, 分布均匀, 多分散指数 (polymer dispersity index, PDI) 为 0.217  $\pm$  0.012, Zeta 电位为  $(-32.4 \pm 0.9)$  mV。

**2.3.3 验证试验** 通过相应的优选处方进行溶液的配制,选择3批样品,并将包封率作为一个验证标准。结果见表10。其中优选配方的平均包封率为63.9%,与预测包封率(65.7%)较为接近。进一步表明处方的可行性。

表10 脂质体制剂处方验证试验结果

Table 10 Liposome preparation prescription verification results

编号	包封率实际值/%	包封率平均值/%	RSD/%
1	63.5	63.9	1.10
2	62.8		
3	65.4		

**2.4 Bai-Lip-Gels 的制备**

脂质体为液体剂型,在皮肤上的保留时间较短,为了使药物长时间与皮肤接触,需采用凝胶基质对其进行赋形。称取卡波姆 974P 0.5 g 置于烧杯中并加入 15.0 g 纯化水使其在搅拌器中先低转速再高转速搅拌溶胀,待溶胀充分,形成透明、细腻、无颗粒感的凝胶后加入适量的 5% NaOH 溶液调节 pH 值,使 pH 值在 6.5~7.5,即得空白凝胶基质。

取新制备的脂质体溶液、黄芩苷混悬液各 30 mL 加入至空白凝胶中抽真空缓慢搅拌形成 Bai-Lip-Gels 和黄芩苷混悬凝胶,形成的凝胶中黄芩苷的含药量为 3 mg/g。

**2.4.1 黏度测试** 采用 DV3T 旋转粘度计<sup>[13]</sup>,计算 2~5 min 的单点平均值即为 Bai-Lip-Gels 的黏度。由表 11 可知,黏度计在 25 °C、转速 20 r/min 条件下测得 3 批的黏度差异不大,扭矩在 40%~60%,测得的黏度值可信,黏度在 33~35 Pa·s,表明制备的凝胶具有良好的重现性。

**2.4.2 流变学表征** 流变学作为常见研究黏弹性流体力学性质的重要试验<sup>[14]</sup>,是作为表征流变性质的特征量<sup>[15]</sup>。本实验运用流变学方法,通过测量凝胶的流变参数,考察该凝胶在不同剪切应力或者剪切应变条件下测试黏度扫描、屈服应力扫描以及振幅扫描,评价所形成凝胶的力学性能,为 Bai-Lip-Gels

表11 Bai-Lip-Gels 黏度测试

Table 11 Viscosity test of Bai-Lip-Gels

批号	温度/°C	扭矩/%	黏度/(Pa·s)
20200620	24.9	48.5	34.50
20200704-1	25.1	55.1	33.48
20200704-2	24.9	54.4	33.94

体外评价及全面质量控制提供参考和借鉴。

安东帕流变仪程序中选择测量的项目模板,仪器预热 30 min 后,先将 Bai-Lip-Gels 置于下板中央,再用平面刮刀将多余的样品刮掉,待准备就绪后,运行仪器。

黏度曲线确定凝胶的流变类型以及样品的触变回复能力。程序参数为剪切速率 0.01~100 s<sup>-1</sup>/100~0.01 s<sup>-1</sup> 对数变化;取样时间:20~1 s/1~20 s,对数变化,41 个取样点;温度设定为 25 °C。Bai-Lip-Gels 黏度曲线见图 4。由图 4 可知,随着剪切速率的增大,Bai-Lip-Gels 的黏度逐渐变稀,表明该凝胶属于剪切变稀流体,即假塑性流体。

针对非牛顿流体,在施加的剪应力较小时流体只发生变形,不产生流动<sup>[16]</sup>,当剪切应力增大到某一定值时该凝胶才开始流动,此时的剪切应力达到最大值也称为该凝胶的屈服应力。程序参数:剪切速率恒定值 0.2 s<sup>-1</sup>,测试点取点时间 1 s,数据点 60 个点,结果见图 5。

振幅扫描对凝胶施加剪切应力或者剪切应变在

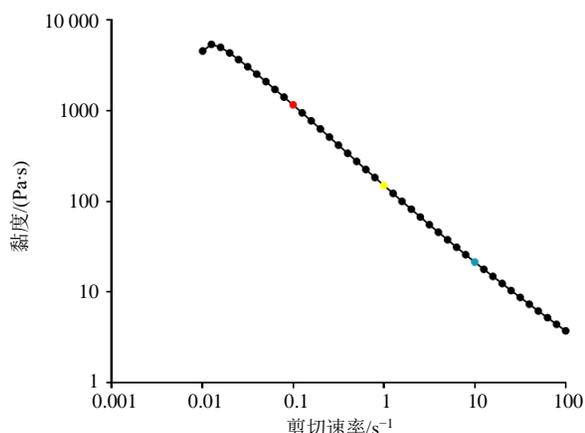


图4 黏度扫描测试

Fig. 4 Viscosity scan test

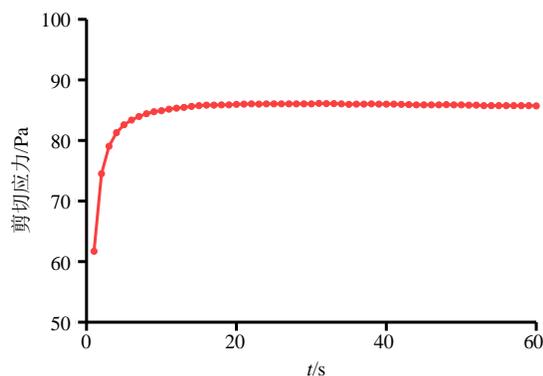


图5 屈服应力测试

Fig. 5 Yield stress test

一定范围内时,凝胶的结构产生弹性形变,并且产生的形变能够回复,结构没有被破坏,此时相应的应力或应变为凝胶的线性黏弹区。当施加的应力或应变产生的形变不能回复时,此区域为凝胶的非线性黏弹区。通过对 Bai-Lip-Gels 进行振幅扫描来确定样品的线性粘弹区,在此区域样品为凝胶状态,当储能模量 ( $G'$ ) 与损耗模量 ( $G''$ ) 相等时,此时为样品的流动点,见图 6。程序参数:剪切应变 0.02%~100%,角频率 5 rad/s,取点时间 30~1 s/1~30 s,共 41 个取样点,温度 25 °C。

制备 3 批 Bai-Lip-Gels,进行流变学测试:黏度曲线扫描、屈服应力扫描以及振幅扫描测试,得到该凝胶的相关流变学特性,结果见表 12。由表 12 可知,黏度曲线扫描可知,剪切速率为 0.1、1、10  $s^{-1}$  时,3 批样品对应的黏度变化范围不大。振幅扫描可知,当储能模量  $G'$  大于 400 Pa 时,样品处于线性黏弹区,此时样品呈凝胶状态。由屈服应力扫描结果可知,剪切应力在 70~90 Pa 为该凝胶的屈服应力值,3 批脂质体的流变数据较为稳定,无明显差异,表明该凝胶剂的流变性质稳定。

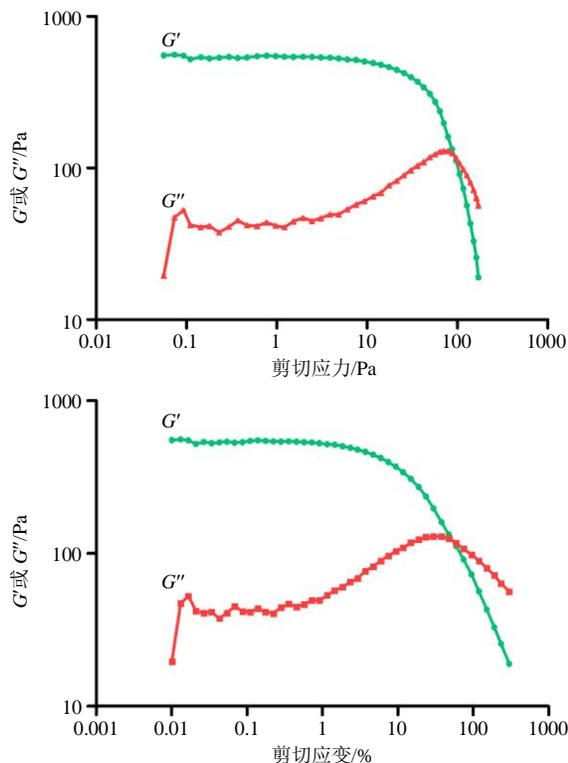


图 6 振幅扫描测试

Fig. 6 Amplitude sweep test

表 12 Bai-Lip-Gels 流变学测试

Table 12 Rheology test of Bai-Lip-Gels

批号	黏度/(Pa·s)			$A_{rel}/$ ( $Pa \cdot s^{-1} \cdot cm^{-3}$ )	流动点			线性黏弹区 (限制 5%)				屈服应力	
	$\gamma=0.1 s^{-1}$	$\gamma=1 s^{-1}$	$\gamma=10 s^{-1}$		剪切应变/%	$\tau/Pa$	$G'/Pa$	剪切应变/%	$G'/Pa$	$\tau/Pa$	$G'/Pa$	$\tau/Pa$	$t/s$
20200620	482.400	78.948	22.644	3.583 9	73.53	105.70	104.70	2.03	468	7.05	483	86.125	31
20200704	495.790	81.676	18.409	3.793 2	59.14	84.42	107.04	2.60	421	8.37	321	81.101	35
20200912	465.840	71.949	16.018	7.802 9	56.80	72.68	90.52	1.07	414	4.44	414	77.576	33

$\gamma$ -剪切速率  $\tau$ -剪切应力  $A_{rel}$ -触变面积  
 $\gamma$ -share rate  $\tau$ -shear stress  $A_{rel}$ -thixotropic area

**2.4.3 Bai-Lip-Gels 的初步稳定性考察** 本品进行肉眼外观的考察,为淡黄色、细腻、均匀性良好、粘度适中的半固体凝胶,见图 7,取 1.0 g 加纯化水稀释至 10 g,分散均匀后,用 pH 计测得其 pH 值为  $6.42 \pm 0.13$ 。

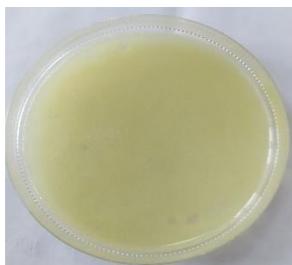


图 7 Bai-Lip-Gels 外观图

Fig. 7 Appearance of Bai-Lip-Gels

取 Bai-Lip-Gels 3 批,分别装入西林瓶中,于 4 °C 冷藏条件下放置 30 d,分别在第 7、14、21、30 天取样<sup>[17]</sup>,与第 0 天样品比较,Bai-Lip-Gels 的外观性状、黏度及含量的变化,含量测定按“2.1”项下的 HPLC 方法进行检测,结果见表 13。由表 13 可知,存放于 4 °C 冷藏条件下 30 d,其外观性状、黏度和含量均无明显变化,表明 Bai-Lip-Gels 在此条件下状态稳定。

**2.4.4 透析袋释放实验** 分析比较 Bai-Lip-Gels 与黄芩苷混悬剂凝胶体 (Bai-Sus-Gels) 外释放度<sup>[18]</sup>。500 mL PBS 等渗缓冲液作为释放介质,温度 32 °C,搅拌速度控制在 300 r/min,确保释放介质的流动性良好。在 1、2、4、6、8、10、12、18、24、36 h,按时取样,每次取样 3 mL,并补充 3 mL 等温释放

表 13 Bai-Lip-Gels 4 °C 冷藏试验  
Table 13 Cold storage test of Bai-Lip-Gels at 4 °C

批号	放置时间/d	外观性状	黏度/ (Pa·s)	黄芩苷/ %
20200620-1	0	淡黄色、均匀、细腻	36.580	98.63
	7	淡黄色、均匀、细腻	35.860	97.11
	14	淡黄色、均匀、细腻	36.370	96.75
	21	淡黄色、均匀、细腻	35.040	95.25
	30	淡黄色、均匀、细腻	34.620	93.31
20200620-2	0	淡黄色、均匀、细腻	35.830	97.51
	7	淡黄色、均匀、细腻	35.370	96.79
	14	淡黄色、均匀、细腻	34.810	96.32
	21	淡黄色、均匀、细腻	36.390	95.89
	30	淡黄色、均匀、细腻	34.830	94.55
20200620-3	0	淡黄色、均匀、细腻	36.980	98.31
	7	淡黄色、均匀、细腻	34.520	97.27
	14	淡黄色、均匀、细腻	35.130	96.58
	21	淡黄色、均匀、细腻	34.830	95.75
	30	淡黄色、均匀、细腻	35.860	95.03

介质, 采用“2.1”项下的 HPLC 法测量黄芩苷含量。

实验表明, Bai-Sus-Gels 有着较快的释放速度, 在 12 h 前释放较快, 且在 12 h 时, 其释放率已经超过了 90%, 在 18 h 之后, 释放趋于稳定。Bai-Lip-Gels 中药物释放在前 2 h 释放较快, 由未包封的黄芩苷释放所引起, 2 h 后释放速率开始变缓慢, 表现出缓释的效果, 36 h 内释放 68.53%, 见图 8。

**2.4.5 离体皮肤透皮实验** 将 SD 大鼠采用随机数字表将其分为 2 组, 腹部备皮, 剥离腹皮, 刮去角质层以及浅表层脂肪, 用生理盐水洗净后剪成若干

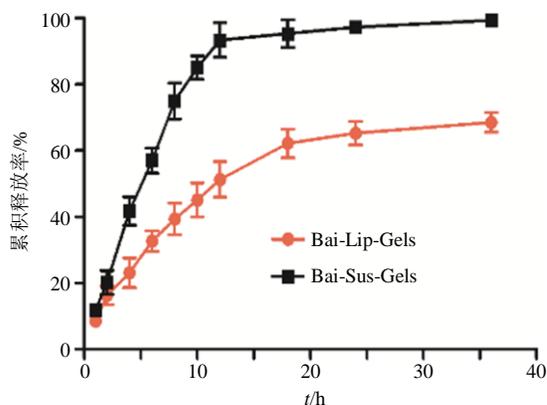


图 8 Bai-Lip-Gels 与 Bai-Sus-Gels 36 h 累积释放率曲线 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Fig. 8 Cumulative release rate curve of Bai-Lip-Gels and Bai-Sus-Gels within 36 h ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

份相同大小的腹部组织, 置于无菌生理盐水中, 放入 -20 °C 冰箱保存备用。

将处理好的大鼠腹皮从 -20 °C 冰箱中取出, 用生理盐水浸泡半小时。等渗 PBS (pH 7.4) 作为透皮吸收试验的接收液。皮肤角质层面向供给池, 且鼠皮面积略大于扩散池表面积, 置于 Franz 扩散池的供给池与接收池结合处, 用夹子固定<sup>[19]</sup>。先用接受液平衡 30 min 后给药<sup>[20]</sup>。将 Bai-Lip-Gels 与 Bai-Sus-Gels 分别涂于 2 组大鼠腹部皮肤表面, 接触面积为 3.14 cm<sup>2</sup>, 水浴恒温至 (32.0 ± 0.5) °C, 300 r/min 恒速搅拌。于 1、2、4、6、8、10、12、18 h 从接收池中取 3 mL 并补加相同量的释放介质。样品置于 13 500 r/min 下冷冻离心 15 min 后, 采用“2.1”项下的 HPLC 法测定药物含量, 计算单位面积累积渗透量 ( $Q_n$ , 图 9)。

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

$C_i$  表示为第  $i$  个时间点测定的药物质量浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ ),  $V_i$  表示为第  $i$  个时间点的取样体积 (mL),  $C_n V_n$  表示为第  $i-1$  个时间点的总药物渗透量,  $A$  则为接收池面积 (cm<sup>2</sup>), 本实验中,  $V=3 \text{ mL}$ ,  $A=3.14 \text{ cm}^2$

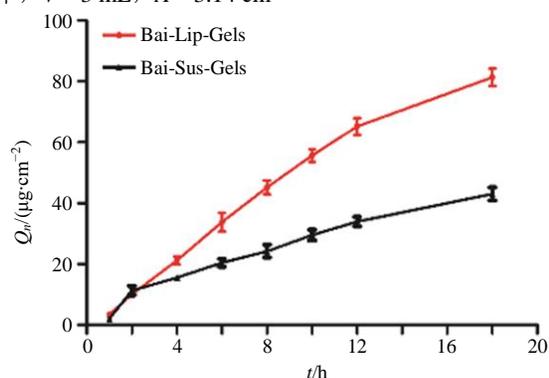


图 9 Bai-Lip-Gels 与 Bai-Sus-Gels 在 18 h 内的  $Q_n$  曲线 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Fig. 9  $Q_n$  curves of Bai-Lip-Gels and Bai-Sus-Gels within 18 h ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

对 2 种凝胶在 18 h 内的经皮渗透的单位面积累积渗透量 ( $Q_{18}$ ) 进行计算, 结果详见表 14, Bai-Lip-Gels 在 18 h 的单位面积累积渗透量 (81.38 ± 2.81)  $\mu\text{g/cm}^2$  远高于 Bai-Sus-Gels 的 (43.03 ± 2.14)  $\mu\text{g/cm}^2$ , Bai-Lip-Gels 在累积透皮率上更加优异。对 Bai-Lip-Gels 和 Bai-Sus-Gels 的单位面积累积渗透曲线进行方程拟合, 结果见表 15, Bai-Lip-Gels 的经皮渗透符合一级方程要求, 而 Bai-Sus-Gels 经皮渗透符合零级方程。

表 14 Bai-Lip-Gels 与 Bai-Sus-Gels 各时间点的  $Q_n$  ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ )

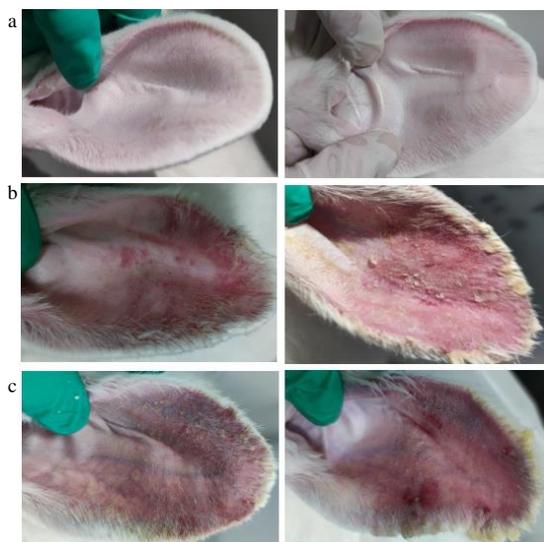
Table 14  $Q_n$  of Bai-Lip-Gels and Bai-Sus-Gels at each time point ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ )

t/h	$Q_n/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2})$	
	Bai-Lip-Gels	Bai-Sus-Gels
1	3.34±0.43	2.05±0.13
2	10.08±0.86	11.29±1.46
4	21.17±1.34	15.50±0.82
6	33.76±3.07	20.44±1.30
8	45.23±2.29	24.24±2.11
10	55.67±2.08	29.52±1.73
12	65.20±2.77	33.96±1.59
18	81.38±2.81	43.03±2.14
平均值	51.11±1.76	27.02±1.34

表 15 Bai-Lip-Gels 与 Bai-Sus-Gels 释放曲线方程拟合

Table 15 Fitting of release curve equations of Bai-Lip-Gels and Bai-Sus-Gels

拟合模型	Bai-Lip-Gels	Bai-Sus-Gels
零级方程	$Q_n=4.77 t+3.09$ , $R^2=0.966 05$	$Q_n=2.03 t+8.015$ , $R^2=0.987 79$
一级方程	$Q_n=162.63 (1-e^{-0.04 t})$ , $R^2=0.990 32$	$Q_n=57.24 (1-e^{-0.07 t})$ , $R^2=0.975 30$
Higuchi 方程	$Q_n=25.26 t^{1/2}-25.45$ , $R^2=0.989 57$	$Q_n=12.08 t^{1/2}-8.54$ , $R^2=0.987 75$



a-造模后第 1 天兔耳 b-造模后第 7 天兔耳 c-造模后第 14 天兔耳  
A-rabbit ears on the 1<sup>st</sup> day after modeling b-rabbit ears on the 7<sup>th</sup> day after modeling c-rabbit ears on the 14<sup>th</sup> day after modeling

图 10 痤疮造模情况

Fig. 10 Performance of modeled rabbit ears

耳染色切片, 毛囊周围大量细胞浸润, 真皮毛囊数量增多, 周围有炎症细胞浸润, 表皮层增厚, 角化不全等现象, 表明兔耳痤疮造模成功。

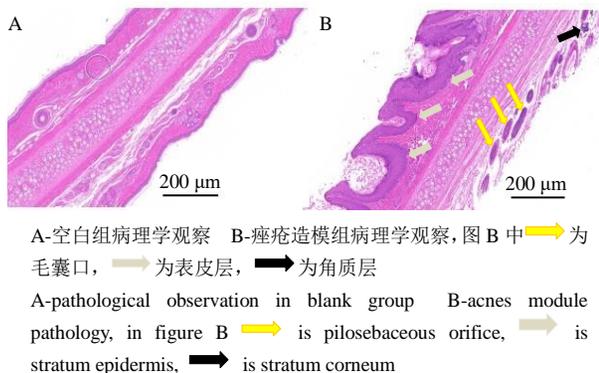
2.5.2 分组及给药 查阅痤疮临床指南, 选用治疗

2.5 对痤疮的初步药效学评价

2.5.1 兔耳痤疮造模 选用清洁级雄性新西兰兔 18 只, 采用 Kligman 法造模<sup>[21]</sup>, 每天用棉签将油酸外涂抹于双侧兔耳管开口 2 cm×2 cm 处, 每日 1 次, 连续 15 d。于涂抹油酸第 3 天时同时涂抹 *P. acnes* 菌液, 100 μL/耳, 选用处于对数生长期的 *P. acnes* 菌液。

造模第 1 天, 兔耳柔软, 其上毛细血管清晰可见, 未出现角化和粉刺状颗粒生成; 造模第 7 天, 毛囊口隆起, 有较多黑色角栓物质生成, 角化现象加重, 粉刺状颗粒物增多; 造模第 14 天, 兔耳红肿明显, 有隆起的丘疹和脓疱, 表明痤疮造模成功。见图 10。

造模结束后, 分别随机选取空白兔耳朵和模型兔耳进行染色切片, 染色结果见图 11。其中造模兔



A-空白组病理学观察 B-痤疮造模组病理学观察, 图 B 中 → 为毛囊口, → 为表皮层, → 为角质层  
A-pathological observation in blank group B-acnes module pathology, in figure B → is pilosebaceous orifice, → is stratum epidermis, → is stratum corneum

图 11 空白组及痤疮造模组病理学变化 (×40)

Fig. 11 Pathological changes of blank group and acne model (×40)

轻、中度痤疮的一线药物阿达帕林凝胶作为阳性对照; 以空白脂质体凝胶作为阴性组。

18 只清洁级雄性新西兰兔, 质量 2.0~2.5 kg, 适应性饲养 1 周后, 随机分为 6 组, 分别为正常对照组: 不采用痤疮造模及药物治疗; 模型实验组: 造模成功后, 不采用任何药物治疗; Bai-Lip-Gels 组、Bai-Sus-Gels 组、阳性对照组和阴性对照组分别在痤疮病损处涂抹约 1 g, 2 次/d, 治疗用药 21 d。给药结束后, 每组新西兰兔随机选取一只进行兔耳

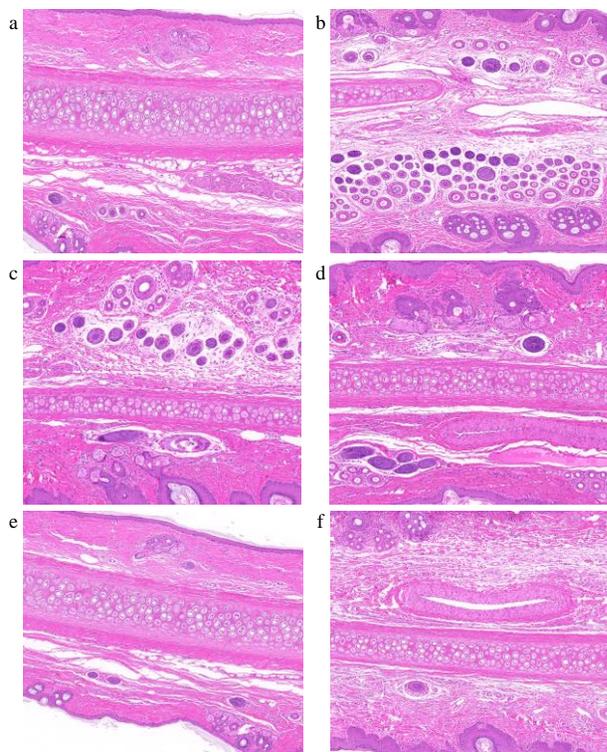
H&E 染色切片, 对其给药后的疗效进行病理组织分析<sup>[22]</sup>, 结果见图 12。正常组兔耳皮肤结构完整, 无慢性炎症改变; 模型组细胞结构不完整, 皮脂腺增大, 角质化堵塞严重<sup>[23]</sup>, 呈急慢性炎症改变; 阴性组存在大量单核细胞、中性粒细胞浸润, 呈急慢性炎症改变; Bai-Sus-Gels 组的细胞层结构紊乱, 组织炎性程度较重; Bai-Lip-Gels 组在组织病理形态学上与正常组较接近, 角质化程度、局部组织充血、

炎性程度等方面得到改善; 阳性药物组毛囊角质化依然明显, 在炎症细胞的聚集、角质化等方面有所改善。

**2.5.3 ELISA 法测定兔耳痤疮模型血清中的炎症因子水平** 在兔耳痤疮造模 15 d 时, 在医用酒精消毒条件下, 取造模兔耳的耳缘静脉血 2 mL/只, 随即用低温离心机离心 5 min (4 °C、3500 r/min), 然后静置 30 min 取上清液分装于离心管中, 保存在 -80 °C 冰箱中待检测。在分组给药 21 d 时, 分别取 6 组兔耳耳缘静脉血 2 mL/只, 同上方法操作, 低温离心, 取静置后上清液于离心管中, 在 -80 °C 冰箱中保存待检。采用酶联免疫吸附 (ELISA) 法检测家兔兔耳痤疮模型血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 IL-8 的含量。

(1) 统计学分析: 本实验数据采用 SPSS (21.0) 软件, 运用多个样本均数比较的方差分析检验, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 方差齐, 采用 LSD 法作两两比较; 如果方差不齐, 选用 Dunnett T3 法作两两比较<sup>[24]</sup>。P<0.05 表示差异具有统计学意义。

(2) 血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8 浓度变化: 由表 16 可知, 与模型组对比, 正常组和 Bai-Lip-Gels 组血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8 的质量浓度水平均非常显著性的低于模型组 (P<0.001)。表明 Bai-Lip-Gels 能显著性降低兔耳痤疮的炎症因子水平, 其中阳性药物组中血清中 TNF- $\alpha$  的质量浓度水平非常显著的低于模型组 (P<0.001); 而阳性药物组中 IL-1 $\beta$  和 IL-8 的质量浓度水平极为显著低于模型组 (P<0.01); 阳性药物组中 IL-6 的质量浓度水平则显著低于模型组 (P<0.05)。由以上统计学结果可以大致了解脂质体凝胶组与阳性药物组对兔耳痤疮的炎症因子水平均有显著性降低, 但是脂质体凝胶组在降低炎症因子质量浓度的疗效更好。



a-正常对照组 b-模型组 c-阴性对照组 d-Bai-Sus-Gels 组  
e-Bai-Lip-Gels 组 f-阳性对照组  
a-normal control group b-model group c-negative control group  
d-Bai-Sus-Gels group e-Bai-Lip-Gels group f-positive control group

图 12 各组的兔耳组织病理学观察 (×40)

Fig. 12 Histopathological observation of rabbit ears in each group (×40)

表 16 各组家兔血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8 水平 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 16 Contents of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-8 in serum of rabbits in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	TNF- $\alpha$ /(pg·mL <sup>-1</sup> )	IL-1 $\beta$ /(pg·mL <sup>-1</sup> )	IL-6/(pg·mL <sup>-1</sup> )	IL-8/(pg·mL <sup>-1</sup> )
正常对照	104.748 ± 4.210***	109.791 ± 3.445***	128.099 ± 3.279***	117.927 ± 3.158***
模型	139.001 ± 4.576###	150.355 ± 4.290###	162.599 ± 5.795###	185.485 ± 4.657###
Bai-Lip-Gels	112.253 ± 3.637***#	118.834 ± 4.571***	137.047 ± 4.147***#	144.643 ± 5.470****#
Bai-Sus-Gels	135.815 ± 5.452	144.589 ± 2.964	156.543 ± 5.493	174.752 ± 5.441
阳性对照	120.249 ± 3.562****#	129.909 ± 5.668***#	152.511 ± 7.899***#	160.331 ± 6.784****#
阴性对照	143.302 ± 4.279	155.453 ± 4.311	160.192 ± 8.388	189.021 ± 8.622

与模型组比较: \*P<0.05 \*\*P<0.01 \*\*\*P<0.001; 与正常对照组比较: #P<0.05 ##P<0.01 ###P<0.001  
\*P<0.05 \*\*P<0.01 \*\*\*P<0.001 vs model group; #P<0.05 ##P<0.01 ###P<0.001 vs normal control group

### 3 讨论

中医认为, 痤疮的发生发展和外受风邪、毒热互结、肝肾阴虚、冲任失调、肺经蕴热、湿热蕴结、痰湿互结等有关。从中医视角来研究痤疮, 形成了以“湿”“热”为辩证核心, 重点从肺、肝、脾、肾来论治的思路<sup>[25]</sup>。现阶段, 临床上治疗重度痤疮以口服抗生素为主, 包括异维 A 酸软胶囊、多西环素片、红霉素片等, 这些药物普遍存在着疗效周期长、容易产生耐药性、副作用多等问题。轻、中度痤疮以局部外用药物为主, 包括阿达帕林凝胶、红霉素软膏等, 但受阻于角质层的屏障功能, 此类药物不能持续有效透过皮肤, 难以达到让人满意的疗效。在中医古籍中记载痤疮治疗的外用方或是内服方<sup>[26]</sup>, 黄芩高频率的作为君药使用。与痤疮以“湿”“热”为辩证核心的论治思路相统一的是, 中药黄芩具有清热燥湿、泻火解毒的功效<sup>[27]</sup>, 其提取物黄芩苷是其所有提取物中最具抗炎活性的物质<sup>[2]</sup>, 相关研究表明<sup>[3]</sup>, 在同样浓度下, 黄芩苷对于痤疮丙酸杆菌的抑制作用是甲硝唑的 2 倍左右, 而与同浓度的红霉素相比, 药效也在 1.5 倍以上。因此, 将中药单体黄芩苷制备成外用制剂具有较大的潜力。

通过单因素试验考察了 6 个因素对 Bai-Lip 粒径和包封率的影响, 研究发现粒径可以通过适宜的探超功率来控制粒径大小, 而包封率需要通过多个因素来综合评价。在形成 Bai-Lip 的前提下, 水化温度越高越不利于后续的稳定储存, 随着储存时间的延长, 容易导致脂质体破相, 药物泄露出来。前期的预实验以及单因素考察结果表明, 40 °C 左右作为水化温度制备样品, 在脂质体后期的稳定性试验考察中发现是最为稳定的。

单因素考察筛选出对 Bai-Lip 的包封率影响较大的 3 个因素, 可以减少 Box-Behnken 设计-响应面试验的因素, 减少试验次数, 得到较优的处方工艺参数。根据最优工艺参数制备的脂质体包封率较大, 且实测值与预测值偏差较小, 表明 Box-Behnken 设计-响应面具有较好的预测性, 可用于 Bai-Lip 的处方和制备工艺的优化设计。

根据透析袋释药结果, 选取 0~18 h 做离体皮肤透皮试验, Bai-Lip-Gels 在 18 h 内的单位面积累积渗透量能达到  $(81.38 \pm 2.81) \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , 是 Bai-Sus-Gels 累积渗透量的 1.88 倍, 并对 Bai-Lip-Gels 和 Bai-Sus-Gels 的释放曲线进行了方程拟合, Bai-Lip 凝胶体外经皮渗透规律符合一级方程, 且方程拟合

系数大于 0.99, Bai-Sus-Gels 经皮渗透规律更符合零级方程, 方程拟合系数大于 0.98, 提示了 2 种制剂的释放机制不同。

油酸堵塞兔耳毛囊, 涂抹痤疮丙酸杆菌 15 d 后, 痤疮模型造模成功。给药 21 d 后, 从组织病理染色结果来观察脂质体凝胶组的疗效比较显著, 主要体现在减轻角质化程度、局部组织充血、炎症程度等方面。通过给药治疗后, 兔耳痤疮模型血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8 分泌的影响发现, Bai-Lip-Gels 能显著降低兔耳痤疮的炎症因子水平。说明 Bai-Lip-Gels 在短期治疗轻、中度痤疮具有良好的疗效。

综上所述, 本实验成功制备的 Bai-Lip-Gels 为治疗因痤疮丙酸杆菌引发炎症引起的痤疮提供了制剂的依据。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

### 参考文献

- [1] Ma A T, Zhong X H, Liu Z M, *et al.* Protective effects of baicalin against bromocriptine induced abortion in mice [J]. *Am J Chin Med*, 2009, 37(1): 85-95.
- [2] 苏青, 吴婷婷, 黄雅兰, 等. 黄芩提取物制备过程中化学成分及药效的变化规律分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(14): 1-6.
- [3] Hamza M, Tohid H, Maibach H. Shaving effects on percutaneous penetration: Clinical implications [J]. *Cutan Ocular Toxicol*, 2015, 34(4): 335-343.
- [4] Xing J, Chen X, Zhong D. Absorption and enterohepatic circulation of baicalin in rats [J]. *Life Sci*, 2005, 78(2): 140-146.
- [5] 张建春, 张华, 施瑛, 等. 黄芩苷的研究近况 [J]. *时珍国医国药*, 2005, 16(3): 247-249.
- [6] 陈遥. 黄芩苷外用制剂透皮吸收及初步药效学研究 [D]. 广州: 广东药学院, 2015.
- [7] 熊欣, 刘淑芝, 项佳音, 等. 黄芩苷脂质载体凝胶的制备及其体外透皮性能评析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(12): 28-30.
- [8] 储晓琴, 王琦, 刘玉娟, 等. 黄芩苷脂质体凝胶体外释药与稳定性研究 [J]. *安徽中医学院学报*, 2013, 32(4): 80-83.
- [9] 周婷, 黎春燕, 李运, 等. 正交设计法优化羟基喜树碱脂质体处方工艺 [J]. *中药材*, 2019, 42(9): 2128-2132.
- [10] 赖滢滢, 周若鹏, 张英丰, 等. 蛇床子素脂质体凝胶剂的制备及其体外透皮试验的初步研究 [J]. *广东药学院学报*, 2016, 32(1): 5-8.
- [11] 史亚军, 张小飞, 果秋婷. Box-Behnken 效应面法优化紫杉醇长循环脂质体处方及制备工艺 [J]. *中药材*,

- 2015, 38(12): 2606-2610.
- [12] Hou L F, Gu K R, Wu Y H. Research on preparation methods of different preparation liposome [J]. *J Henan Univ Technol*, 2016, 37(5): 118-124.
- [13] 陈林. 布地奈德直肠原位温敏凝胶的制备及评价 [D]. 成都: 成都医学院, 2020.
- [14] Azeem M, Mu T H, Zhang M. Effects of hydrocolloids and proteins on dough rheology and *in vitro* starch digestibility of sweet potato-wheat bread [J]. *LWT*, 2021, 142. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.110970>.
- [15] 魏刚. 体温敏感眼用凝胶的研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2002.
- [16] 邱爽, 宋铮, 张璟琳, 等. 细菌素 bifidocin A 对凝固型发酵乳品质及贮藏性能的影响 [J]. *中国食品学报*, 2020, 20(9): 156-165.
- [17] 李传灵. 叶黄素脂质体眼用温敏型原位凝胶的研究 [D]. 南昌: 江西中医药大学, 2019.
- [18] 郑杭生, 黄绳武, 徐莲英. 全缘千里光碱脂质体及其凝胶剂的体外释药比较研究 [J]. *中成药*, 2013, 39(9): 2027-2030.
- [19] 肖卫红, 徐宏峰, 张耕, 等. 高乌甲素脂质体凝胶制备工艺及体外释药性能研究 [J]. *中国医院药学杂志*, 2019, 39(5): 466-470.
- [20] 仵文英, 李莎, 徐晓娜, 等. 苦参碱脂质体的稳定性及体外释放度研究 [J]. *中国药房*, 2013, 24(37): 3542-3544.
- [21] 谢碧. 丹连消痤散外用对兔耳痤疮模型 TNF- $\alpha$ 、TNFR1、ERK 含量影响的实验研究 [D]. 哈尔滨: 黑龙江省中医药科学院, 2019.
- [22] Han R, Blencke H M, Cheng H, *et al.* The antimicrobial effect of CEN1HC-Br against *Propionibacterium acnes* and its therapeutic and anti-inflammatory effects on acne vulgaris [J]. *Peptides*, 2018, 99: 36-43.
- [23] 胡彬. 不同浓度的石榴皮多酚软膏对兔耳粉刺模型组织病理形态学的影响 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2017.
- [24] 马英, 项蕾红. 痤疮发病机制及治疗目标的新认识 [J]. *临床皮肤科杂志*, 2015, 44(1): 66-69.
- [25] 周晓梅. 寻常痤疮的外治综述 [J]. *名医*, 2020(13): 52-53.
- [26] 杨星哲. 黄芩苷治疗痤疮丙酸杆菌引起痤疮的分子机制研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2019.
- [27] 高光武, 李玲. 黄芩提取物的抗炎作用及其作用机制研究 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2014, 30(6): 550-552.

[责任编辑 郑礼胜]