

苦参碱固体脂质纳米粒的制备及其体外透皮研究

付丽娜, 赵 宁*, 李伟泽, 韩文霞, 李 健, 杨 婷, 杨黎彬

西安医学院药学院, 陕西 西安 710021

摘要: 目的 制备苦参碱固体脂质纳米粒 (matrine solid lipid nanoparticles, MA-SLN), 并考察其药剂学性质与体外透皮给药行为。方法 采用微乳-低温固化法制备 MA-SLN, 以粒径、 ζ 电位和包封率为评价指标, 通过正交试验筛选最佳处方和工艺; 扫描电子显微镜 (SEM) 和透射电子显微镜 (TEM) 观察 MA-SLN 的形态; 差示扫描量热法 (DSC) 和 X 射线衍射扫描 (XRD) 分析苦参碱在 MA-SLN 中的包埋状态; 体外透皮实验考察药物的透皮及释放行为。结果 最佳处方工艺制得的 MA-SLN 包封率可达 $(56.12 \pm 0.82)\%$, 激光粒度仪 (DLS) 检测 MA-SLN 的平均粒径为 (196.31 ± 6.26) nm, 电位为 (-37.18 ± 2.36) mV。SEM 和 TEM 显示 MA-SLN 呈规整的均匀球状或类球状结构; DSC 和 XRD 检测可确定苦参碱可完全包裹在 SLN 内, 苦参碱与 SLN 骨架材料相容性良好; 体外透皮实验显示, 9 h 时累积透过量 (ΔM) 达到 $500 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, 且可持续释放至 24 h, 表明 MA-SLN 能够显著提高苦参碱的透皮吸收效率并具有较好的缓释行为。结论 采用微乳-低温固化法制备 MA-SLN, 其工艺简单、周期短、可控性高, 易于产业化推广; 且制成的 MA-SLN 性能优良、透皮吸收率高与缓释行为显著, 可为透皮给药制剂提供一种较好的给药模型, 为苦参碱进一步开发应用奠定基础。

关键词: 苦参碱; 固体脂质纳米粒; 透皮给药; 缓释作用; 药剂学性质; 微乳-低温固化法

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)18-5552-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.18.009

Preparation and *in vitro* transdermal study on solid lipid nanoparticles of matrine

FU Li-na, ZHAO Ning, LI Wei-ze, HAN Wen-xia, LI Jian, YANG Ting, YANG Li-bin

College of Pharmacy, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China

Abstract: Objective To prepare matrine solid lipid nanoparticles (MA-SLN), investigated the pharmaceutical properties and *in vitro* transdermal behavior. **Methods** MA-SLN was prepared by microemulsion-low temperature curing method; The optimum formulation and process were selected by orthogonal test using particle size, ζ potential and encapsulation efficiency as evaluation indexes; The morphology of MA-SLN was observed by scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM); The embedding state of matrine in nanoparticles was analyzed by differential scanning calorimetry (DSC) and X-ray diffraction scanning (XRD); *In vitro* transdermal experiments were conducted to investigate the transdermal and release behavior of the drug. **Results** The encapsulation efficiency of MA-SLN prepared by the best prescription process was $(56.12 \pm 0.82)\%$, laser particle size analyzer (DLS) showed that the average particle size of MA-SLN was (196.31 ± 6.26) nm and the potential was (-37.18 ± 2.36) mV; SEM and TEM showed that appearance of MA-SLN was spherical or nearly spherical; DSC and XRD showed that matrine could be completely encapsulated in nanoparticles and had good compatibility with SLN framework materials; Transdermal experiments showed that ΔM reached $500 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ after 9 h, and sustainable released to 24 h, which indicated that MA-SLN can significantly improve the transdermal absorption efficiency of matrine and had good slow release behavior. **Conclusion** MA-SLN can be successfully prepared by microemulsion and low temperature curing method, it has the advantages of simple process, short preparation period, high controllability and easy to be industrialized and popularized. Moreover, MA-SLN has excellent performance, high

收稿日期: 2021-04-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82004075); 陕西高校青年创新团队建设项目 (陕教 [2019] 90 号); 陕西省中医药管理局科研课题 (2019-ZZ-ZY010); 陕西省科技厅面上项目 (2020JM-610)

作者简介: 付丽娜 (1983—), 硕士, 实验师, 研究方向为药物新剂型、新制剂与制剂新技术。Tel: (029)86177546 E-mail: linafu@163.com

*通信作者: 赵 宁 (1984—), 硕士, 副教授, 研究方向为药物新剂型、新制剂与制剂新技术。

Tel: (029)86177546 E-mail: zhaoning-happy@163.com

transdermal absorption efficiency and significant sustained release behavior, which can provide a better model for transdermal drug delivery and lay a foundation for further development and application of matrine.

Key words: matrine; solid lipid nanoparticles; transdermal administration; slow-release effect; pharmaceutical properties; microemulsion-low temperature curing method

苦参碱(matrine)是来源于豆科槐属植物苦参 *Sophora flavescens* Air. 的一种生物碱类天然药物, 具有抗炎、抗菌、抗病毒、抗肝纤维化、抗肿瘤、抗心律失常、抑制中枢神经和调节免疫力等药理作用^[1-7]。目前在临床上广泛应用的苦参碱制剂主要有注射剂、胶囊剂、片剂和栓剂等^[8]。但是, 传统苦参碱制剂普遍存在半衰期短、需多次给药, 易造成肝肾聚集中毒等问题; 并且由于苦参碱的苦味强烈持久, 患者用药依从性差^[9-10]。这些限制了苦参碱口服制剂与注射制剂的广泛应用, 因此, 开发苦参碱的外用缓释给药系统具有重要意义。固体脂质纳米粒(solid lipid nanoparticles, SLN)是粒径为纳米级别的一种新型实体骨架的微粒给药系统, 可作为大分子、小分子药物的载体, 具有良好的促进药物透皮吸收作用和皮肤贮库效应, 能够增加药物的稳定性, 可提高药物对皮肤黏膜的穿透性而提高其生物利用度, 且药物泄露问题较少, 可通过透皮、口服、注射与肺部等多途径给药, 同时其成本低与利于大规模的生产, 是微乳、脂质体、聚合物纳米粒等的替代品^[11-13], 因此 SLN 具有良好的应用前景。据此, 本实验研究了以微乳-低温固化法制备苦参碱固体脂质纳米粒(matrine solid lipid nanoparticles, MA-SLN)的成型工艺及其相关药剂学性能, 并通过体外透皮给药考察了 MA-SLN 透皮给药的释药行为, 从而为苦参碱提供了一种基于纳米微粒的新型外用缓释给药系统。

1 仪器与材料

1.1 主要仪器

Agilent1260 高效液相色谱仪, 美国安捷伦科技有限公司; Verios 460 扫描电子显微镜(SEM), 美国 FEI 公司; JEM-2100F 透射电子显微镜(TEM), 日本电子株式会社; X'Pert PRO X-射线衍射仪(XRD), 荷兰帕纳科公司; ZEN-3600 激光粒度仪, 英国马尔文公司; Quintix224-1 CN Sartorius 分析天平, 赛多斯科学仪器北京有限公司; Stare 系统 DSC 差式扫描量热仪(DSC), 瑞士梅特勒-托利多公司; Allegra 64R Centrifuge 离心机, 美国 Beckman 公司。

1.2 药材与试剂

苦参碱对照品, 中国食品药品检定研究院, 质

量分数 110805-201803; 苦参碱, 质量分数 $\geq 98\%$, 批号 XC20190410, 西安小草植物科技有限责任公司; 大豆卵磷脂, 上海太伟药业有限公司; 硫酸鱼精蛋白, 质量分数 99%, Sigma 公司; 单硬脂酸甘油酯, 南昌华鑫医药化工有限公司; 普朗尼克 F-68, 天津市科密欧化学试剂有限公司; 其他试剂均为分析纯, 水为双蒸水。

1.3 动物

健康昆明种小鼠, 雌雄各半, 体质量(20 ± 2) g, 批号 20191003, 购自西安交通大学医学部。所有动物实验遵循陕西省有关实验动物管理和使用的规定, 均符合 3R 原则。

2 方法与结果

2.1 MA-SLN 的制备

采用微乳-低温固化法^[14-15]制备 MA-SLN。称取苦参碱 50 mg, 适量单硬脂酸甘油酯和大豆卵磷脂, 并加入 5 mL 无水乙醇作为油相; 另取 0.2 g 普朗尼克 F-68, 加入一定量纯化水作为水相; 油相与水相分别置于 65 °C 水浴中, 使溶解; 并于一定转速条件下将水相缓慢加入油相, 搅拌乳化, 再高速匀质 4 min 后将乳化体系分散到冷水中, 300 r/min 条件下搅拌固化 20 min, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得 MA-SLN。同法不加苦参碱, 制备空白脂质纳米粒(blank solid lipid nanoparticles, B-SLN)。

2.2 苦参碱检测方法的建立

2.2.1 供试品溶液的制备 取一定量 MA-SLN 于 2 mL 的离心管中, 加入同体积 10 $\mu\text{g/mL}$ 鱼精蛋白溶液, 静置 3 min, 于 10 °C、13 000 r/min 条件下离心 60 min, 取上清液, 过 0.22 μm 滤膜, 即得。

2.2.2 色谱条件 色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C₁₈ (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水(85:15); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 35 °C; 进样量为 20 μL ; 检测波长 220 nm。

2.2.3 线性关系考察 精密称取苦参碱对照品, 加蒸馏水配制成质量浓度分别为 20、30、60、100、200、400 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液, 分别标为 1~6 号, 取上述各对照品溶液过 0.22 μm 微孔滤膜, 取滤液 20 μL 用 HPLC 按照“2.2.2”项下色谱条件测定, 以峰面积为纵坐标(Y)、质量浓度为横坐标(X),

进行线性回归, 计算得回归方程为 $Y=6.649\ 2\ X+100.99$, $r^2=0.999\ 8$, 表明苦参碱在 20~400 $\mu\text{g/mL}$ 时质量浓度与峰面积线性关系良好。

2.2.4 专属性考察 取苦参碱对照品溶液, B-SLN 和 MA-SLN, 其中 B-SLN 和 MA-SLN 按照 2.2.1 项下方法处理, 并按“2.2.2”项下色谱条件检测, 结果见图 1。实验结果显示, 该色谱条件下, 色谱峰分离度好, 同时峰形稳定, 无干扰。

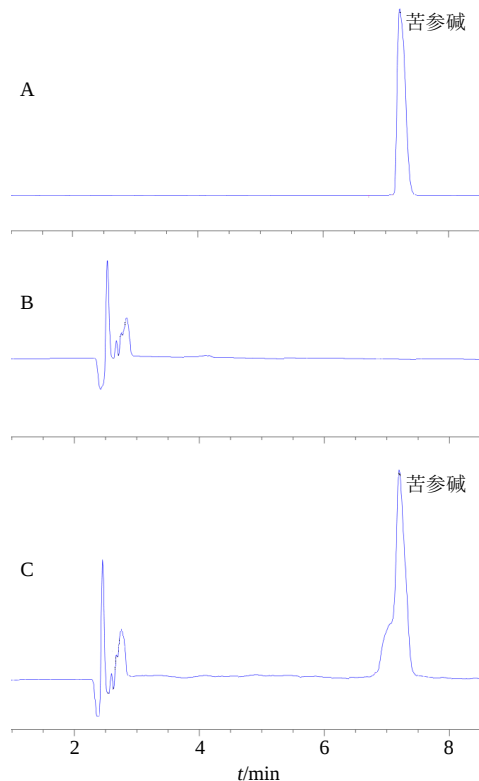


图 1 苦参碱对照品 (A)、B-SLN (B) 和 MA-SLN (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of matrine reference substance (A), B-SLN (B) and MA-SLN (C)

2.2.5 精密度试验 取 1、3、6 号对照品溶液, 按“2.2.2”项色谱条件测定峰面积, 每天 0、2、4、6、8、10 h 进样, 连续进样 3 d, 测定峰面积, 考察日内和日间精密度, 结果其日间和日内精密度 RSD 分别为 1.63% 和 1.87%。

2.2.6 重复性试验 精密量取同一批次 MA-SLN 6 份, 按照“2.2.1”项下处理后, 按“2.2.2”项下色谱条件进样测定峰面积, 计算苦参碱质量浓度, RSD 值为 1.76%, 表明该方法重复性良好。

2.2.7 稳定性试验 将同一批次供试品溶液室温下放置, 分别于 0、3、6、12、24、48 h 取 20 μL 注入 HPLC 测定, 苦参碱峰面积的 RSD 为 0.92%, 表

明供试品溶液在 48 h 内稳定。

2.2.8 加样回收率试验 取 9 份 B-SLN 0.5 mL, 置于 2 mL 离心管内, 分别加入 80、100、120 $\mu\text{g/mL}$ 苦参碱对照品溶液 0.5 mL, 再按 2.2.1 项下方法加 10 $\mu\text{g/mL}$ 鱼精蛋白溶液 1 mL, 静置 3 min, 于 10 $^{\circ}\text{C}$ 、13 000 r/min 条件下离心 60 min, 取上清液, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 按照“2.2.2”项下色谱条件测定, 测得平均加样回收率为 99.77%, RSD 为 1.87%。

2.3 MA-SLN 处方筛选

2.3.1 MA-SLN 包封率测定 采用鱼精蛋白凝聚法测定包封率^[16], 精密吸取 MA-SLN 样品 0.8 mL, 置于 2 mL 离心管, 加 10 $\mu\text{g/mL}$ 鱼精蛋白溶液 0.8 mL, 混匀, 静置 3 min, 于 10 $^{\circ}\text{C}$ 、13 000 r/min 条件下离心 60 min, 取上清液 1 mL 置于 10 mL 量瓶中, 定容, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 取 20 μL 按照“2.2.2”项下色谱条件测定苦参碱的量, 计算包封率。

$$\text{包封率} = (\text{投药量} - \text{游离药物量}) / \text{投药量}$$

2.3.2 粒径和 ζ 电位的测定 取 MA-SLN 用蒸馏水稀释至 10 倍, 使溶液呈现半透明乳光色, 用激光粒度仪测定其粒径与 ζ 电位。

2.3.3 评价指标的确定 包封率、粒径和 ζ 电位为 SLN 质量控制的重要指标。因此, 本实验以包封率、粒径和 ζ 电位为 MA-SLN 处方筛选的评价指标。其中, 包封率是纳米粒质量控制的一个重要的因素, 也是提高药物治疗效果, 减少药物剂量降低不良反应的关键因素。因此, 设定包封率在 0~100% 内, 每增大 10%, 加 1 分, 满分 10 分, 占比 60%; SLN 的粒径一般为 50~1000 nm, 粒径越小, 纳米粒的透皮吸收效果越好, 根据实验过程中不同工艺所测 MA-SLN 的粒径范围, 设定以 490 nm 为基数, 减小 40 nm, 加 1 分, 满分 10 分, 占比 20%; ζ 电位在一定程度上反应粒子的荷电情况, 对维持体系的稳定性有很大影响, 当微粒表面电位的绝对值大于 30 mV 时, 微粒间由于存在较大的静电斥力而有利于制剂稳定性的提高并使粒径保持均匀, 因本实验所制备的 MA-SLN 带负电荷, 因此设定, ζ 电位在 -60~0 mV, 比 0 mV 小 6 mV, 加 1 分, 满分 10 分, 占比 20%。将评分进行综合加权处理, 并以处理后的综合得分为评价指标。

2.3.4 正交试验设计与结果 根据前期单因素中各因素对实验结果的影响, 选择单硬脂酸甘油酯 (A)、卵磷脂 (B) 的用量和油水两相比比例 (C) 进行处方优化考察, 以综合得分为评价指标, 采用 $L_9(3^4)$ 表

进行正交设计实验, 正交试验的因素水平、实验设计与结果见表 1, 方差分析见表 2。由表 1、2 可知, 各因素对 MA-SLN 包封率和粒径的综合的影响大小依次为 $A > B > C$, 单硬脂酸甘油酯 (A) 和卵磷脂 (B) 对 MA-SLN 包封率和粒径有显著影响, 根

据正交表直观分析, 选择最佳工艺条件为 $A_2B_3C_2$, 即 MA-SLN 的最佳制备处方为苦参碱 50 mg、单硬脂酸甘油酯 0.15 g、大豆磷脂 0.3 g、普朗尼克 F-68 0.2 g、油相 5 mL 和水相体积 10 mL, 制得的 MA-SLN 的包封率较高、粒径小、 ζ 电位合适。

表 1 $L_9(3^4)$ 正交试验设计及结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 1 Design and results of $L_9(3^4)$ orthogonal test ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

试验号	A/g	B/g	C	D (误差)	包封率/%	包封率得分	粒径/nm	粒径得分	ζ 电位/mV	ζ 电位得分	综合得分
1	0.10 (1)	0.10 (1)	1 : 1 (1)	(1)	52.07 $\pm$ 1.36	5.00	361.23 $\pm$ 8.49	4.00	-29.97 $\pm$ 1.87	5.33	4.87
2	0.10 (1)	0.20 (2)	1 : 2 (2)	(2)	52.40 $\pm$ 1.23	5.00	210.23 $\pm$ 6.92	7.67	-39.17 $\pm$ 1.17	7.00	5.93
3	0.10 (1)	0.30 (3)	1 : 3 (3)	(3)	51.93 $\pm$ 1.42	5.00	219.70 $\pm$ 9.83	7.33	-40.83 $\pm$ 1.83	7.33	5.93
4	0.15 (2)	0.10 (1)	1 : 2 (2)	(3)	58.60 $\pm$ 4.07	5.33	207.97 $\pm$ 9.85	7.67	-37.67 $\pm$ 1.12	7.00	6.13
5	0.15 (2)	0.20 (2)	1 : 3 (3)	(1)	58.70 $\pm$ 3.58	5.67	198.33 $\pm$ 8.85	8.00	-39.60 $\pm$ 2.29	7.33	6.47
6	0.15 (2)	0.30 (3)	1 : 1 (1)	(2)	58.50 $\pm$ 3.12	5.67	193.67 $\pm$ 7.09	8.00	-38.73 $\pm$ 1.65	7.00	6.40
7	0.20 (3)	0.10 (1)	1 : 3 (3)	(2)	43.67 $\pm$ 2.43	4.00	319.87 $\pm$ 7.01	5.00	-30.77 $\pm$ 1.69	5.67	4.53
8	0.20 (3)	0.20 (2)	1 : 1 (1)	(3)	49.87 $\pm$ 2.12	4.67	256.63 $\pm$ 8.95	6.33	-33.20 $\pm$ 1.90	6.00	5.22
9	0.20 (3)	0.30 (3)	1 : 2 (2)	(1)	59.23 $\pm$ 2.21	5.67	234.43 $\pm$ 9.40	7.00	-36.46 $\pm$ 1.78	6.33	6.07
K_1	16.73	15.53	16.49	17.41							
K_2	19.00	17.62	18.13	16.86							
K_3	15.82	18.40	16.93	17.28							
R	3.18	2.87	1.64	0.55							
优选方案	A_2	B_3	C_2								

表 2 方差分析

Table 2 Analysis of variance

误差来源	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
A	1.788 2	2	32.459 5	$P < 0.05$
B	1.468 2	2	26.650 7	$P < 0.05$
C	0.480 4	2	8.719 6	
D (误差)	0.055 1	2		

$F_{0.5}(2, 2) = 19.00$

2.4 MA-SLN 制备工艺优化

工艺优化的评价指标和评判方法同“2.3.3”项。研究表明, 乳化体系的形成过程中需要充分的乳化速度和乳化时间才能保证乳化剂的效用^[17]。因此,

本实验用单因素实验法考察了不同搅拌时间、搅拌速度与不同稀释相体积对 MA-SLN 包封率、粒径和 ζ 电位的影响, 按照“2.3.3”项将实验结果进行加权处理得出综合评分, 最后根据综合评分筛选出最优成型工艺。

2.4.1 不同搅拌速度对 MA-SLN 包封率、粒径、 ζ 电位的影响 按照“2.3.4”项下确定的最优处方, 在搅拌时间 30 min, 分散相体积 30 mL 的条件下, 考察不同搅拌速度的 MA-SLN 综合评分的影响。结果见表 3。

2.4.2 不同搅拌时间对 MA-SLN 包封率、粒径、 ζ 电位的影响 按照“2.3.4”项下确定的最优处方,

表 3 搅拌速度对 MA-SLN 综合评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 3 Effect of stirring speed on MA-SLN comprehensive score ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

搅拌速度/(r·min ⁻¹)	包封率/%	包封率得分	粒径/nm	粒径得分	ζ 电位/mV	ζ 电位得分	综合得分
600	43.77 $\pm$ 1.30	4.00	387.70 $\pm$ 5.22	3.00	-18.07 $\pm$ 1.42	3.33	3.67
800	51.67 $\pm$ 0.96	5.00	361.23 $\pm$ 7.49	4.00	-29.33 $\pm$ 0.93	5.33	4.87
1000	56.77 $\pm$ 3.65	5.33	215.47 $\pm$ 5.76	7.33	-41.20 $\pm$ 1.28	7.33	6.13
1200	53.83 $\pm$ 1.27	5.00	208.10 $\pm$ 4.83	7.67	-42.40 $\pm$ 0.95	7.67	6.07
1400	51.83 $\pm$ 1.65	5.00	211.60 $\pm$ 6.74	7.67	-38.17 $\pm$ 1.56	7.00	5.93

在搅拌速度 1000 r/min, 分散相体积 30 mL 的条件下, 考察不同搅拌时间的 MA-SLN 的综合评分的影响。结果见表 4。

2.4.3 不同分散相体积对 MA-SLN 包封率、粒径、

ζ 电位的影响 按照“2.3.4”项下确定的最优处方, 在搅拌速度 1000 r/min, 搅拌时间 30 min 的条件下, 考察不同分散相体积的 MA-SLN 的综合评分的影响。结果见表 5。

表 4 搅拌时间对 MA-SLN 综合评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of stirring time on MA-SLN comprehensive score ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

搅拌时间/min	包封率/%	包封率评分	粒径/nm	粒径评分	ζ 电位/mV	ζ 电位评分	综合评分
10	26.13 $\pm$ 0.67	2.00	396.53 $\pm$ 6.16	3.00	-16.95 $\pm$ 2.33	3.33	2.47
20	37.63 $\pm$ 1.71	3.00	338.07 $\pm$ 9.12	4.33	-29.60 $\pm$ 2.05	5.33	3.73
30	58.27 $\pm$ 4.85	5.33	213.27 $\pm$ 8.89	7.67	-42.27 $\pm$ 1.50	7.67	6.27
40	49.83 $\pm$ 2.27	4.67	258.17 $\pm$ 10.40	6.33	-31.80 $\pm$ 2.01	5.67	5.20
50	44.86 $\pm$ 1.70	4.00	343.53 $\pm$ 5.03	4.00	-25.80 $\pm$ 2.40	4.67	4.13

表 5 分散相体积对 MA-SLN 综合评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of dispersed phase volume on MA-SLN comprehensive score ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

分散相体积/mL	包封率/%	包封率评分	粒径/nm	粒径评分	ζ 电位/mV	ζ 电位评分	综合评分
15	25.03 $\pm$ 1.50	2.00	418.07 $\pm$ 9.01	2.33	-16.27 $\pm$ 1.29	3.00	2.27
25	37.23 $\pm$ 1.79	3.00	327.57 $\pm$ 8.92	4.67	-28.53 $\pm$ 2.06	5.33	3.80
35	51.26 $\pm$ 2.46	4.67	248.60 $\pm$ 7.13	6.67	-37.83 $\pm$ 1.47	7.00	5.53
45	57.33 $\pm$ 4.67	5.33	197.20 $\pm$ 4.35	8.00	-37.23 $\pm$ 1.46	6.67	6.13
55	51.67 $\pm$ 0.97	5.00	274.53 $\pm$ 7.69	6.00	-34.90 $\pm$ 1.48	6.33	5.47

由表 4、5 可知, 当搅拌速度低于 800 r/min 时, 由于无法为乳化体系的形成提供足够的能量因而 MA-SLN 成型与性能不佳, 而搅拌速度过高 (大于 1000 r/min) 会由于速度过大而增加微粒的动能、增大碰撞合并机率而影响微粒制剂的成型。乳化体系的形成是油相由整体逐渐变为微粒的渐进过程, 因此需要一定的时间, 当搅拌时间低于 30 min 时导致乳化不足而粒径过大, 且微粒的形状不规整; 而搅拌时间过长, 高于 30 min 则由于增大微粒碰撞、合并机率而影响成型与粒径。研究表明, 稀释相体积对 MA-SLN 的粒径影响较大, 其原因是当稀释相体积过小时, 单位体积内微粒的浓度增大, 因此增大了微粒的碰撞机率增加聚集程度而使粒径变大; 稀释相体积过大时, 如大于 45 mL 时, 则由于微粒稀释程度较大, 得到的分散液固体含量过低, 增加药物泄露且后续处理困难。因此, 综合分析得到最佳制备工艺为搅拌速度为 1000 r/min、搅拌时间为 30 min 与稀释相相体积为 45 mL。

2.5 MA-SLN 制备工艺和处方的确定

按照上述处方和工艺考察结果制备 MA-SLN。称取苦参碱 50 mg, 单硬脂酸甘油酯 0.15 g 和大豆卵磷脂 0.3 g, 并加入 5 mL 无水乙醇作为油相; 另

取 0.2 g 普朗尼克 F-68, 加入纯化水 10 mL 作为水相; 油相与水相分别置于 65 °C 水浴中, 使溶解; 并于 1000 r/min 条件下将水相缓慢加入油相, 搅拌乳化 30 min, 高速匀质 4 min 后将乳化体系分散到 45 mL 冷水中, 300 r/min 条件下搅拌固化 20 min, 过 0.45 μ m 微孔滤膜, 即得, 于 4 °C 存放, 备用。

制备 6 批 MA-SLN, 其外观均匀一致无差异, MA-SLN 粒径密度分布图和电势分布图见图 2。测得其包封率为 (56.12 $\pm$ 0.82) %; 平均粒径为 (196.31 $\pm$ 6.26) nm, 多分散指数 (polydispersity index, PDI) 为 0.184 $\pm$ 0.020; ζ 电位为 (-37.18 $\pm$ 2.36) mV。表明本实验优化的制剂处方与制备工艺稳定、重现性高。研究表明^[18], 当微粒表面电位的绝对值大于 30 mV 时, 微粒间由于存在较大的静电斥力而有利于制剂稳定性的提高并使粒径保持均匀, 因此, MA-SLN 具有较高的稳定性。

2.6 MA-SLN 药剂学性质考察

2.6.1 MA-SLN 形态观察 将 MA-SLN 样品适量, 按照 SEM 和 TEM 的常规操作处理后, 观察其外观形态结构。结果如图 3 所示, MA-SLN 为规整平滑的均匀实体骨架球状结构, 球体表面无苦参碱的规则晶体析出、内部显示均匀一致, 表明苦参碱与

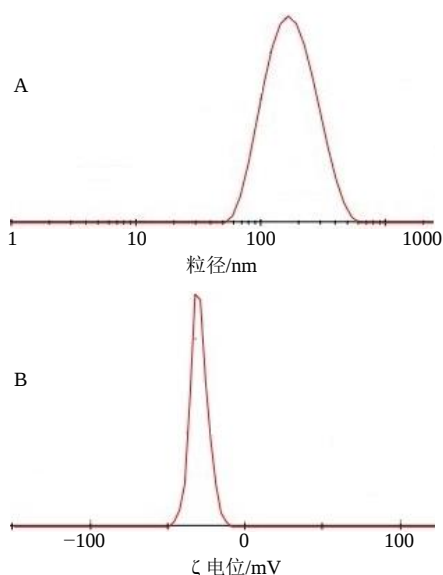


图 2 MA-SLN 粒径密度分布 (A) 和电势分布 (B)

Fig. 2 Particle size distribution by intensity (A) and ζ potential distribution (B)

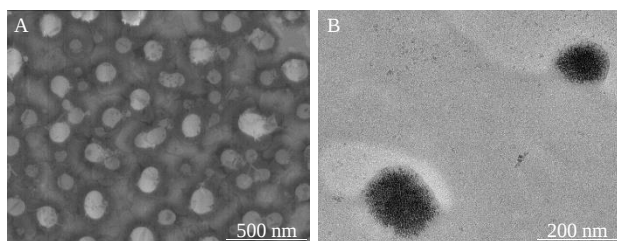


图 3 MA-SLN 扫描电镜图 (×2400, A) 和透射电镜图 (×6000, B)

Fig. 3 SEM image (×2400, A) and TEM images (×6000, B) of MA-SLN

SLN 的骨架材料相容性良好而使苦参碱在 MA-SLN 呈现均匀分布, 这种分布行为利于提高药物的稳定性和载药量。

2.6.2 苦参碱包裹情况考察

(1) DSC 扫描: 分别取适量 MA-SLN、B-SLN、苦参碱粉末、苦参碱与 SLN 物理混合物用 DSC 扫描检测苦参碱及载体特征峰的变化情况。DSC 扫描条件为 99.99% N₂, 升温速度 20 °C/min, 温度范围 0~280 °C, 结果如图 4。由图 4 可知, 苦参碱在 70~78 °C 出现特征峰, B-SLN 在 55 °C 左右出现特征峰, 物理混合物苦参碱+SLN 分别出现了 SLN 和苦参碱的特征峰; 而将苦参碱制成 MA-SLN 后, 苦参碱的特征峰消失, 仅显示 SLN 的特征峰。

(2) XRD 分析: 用 XRD 测定苦参碱粉末、MA-SLN 和 B-SLN。样品在 45 kV、40 mA 的 Cu-Kα 辐射下进行分析, 测试范围 5°~90°, 扫描速率为

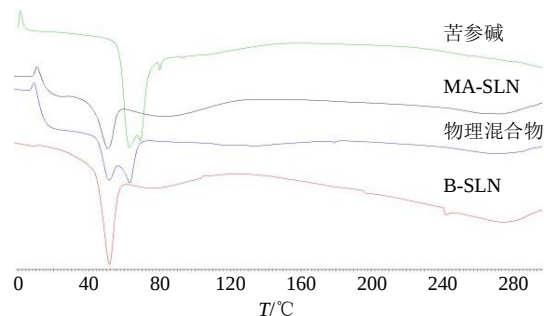


图 4 MA-SLN 的 DSC 扫描分析图

Fig. 4 Analysis diagram of MA-SLN by DSC scan

2°/min。扫描结果见图 5。由图 5 可知, 纯药物苦参碱的 XRD 谱图在 6°~25°扫描角度之间显示出许多尖峰, 表明苦参碱具有高结晶性, 而 MA-SLN 则没有了药物苦参碱的主峰, 结晶度降低; 与 B-SLN 相比, MA-SLN 的主峰没有移动, 整体强度变化不大, 在 7°扫描角度处强度略有提高, 这可能是由于脂质纳米粒中苦参碱的加入, 导致了包载苦参碱的 SLN 结晶度发生变化。结合 DSC 扫描结果推断, 苦参碱可被充分包裹到 SLN 中的实体骨架中, 且苦参碱与 SLN 骨架材料相容性良好。

2.7 MA-SLN 体外释药特点

采用透析法考察 MA-SLN 的释药特点, 精密称取 MA-SLN 2 mL, 放入截留相对分子质量为 2500 的透析袋中, 扎紧, 置于 50 mL 的生理盐水溶液中,

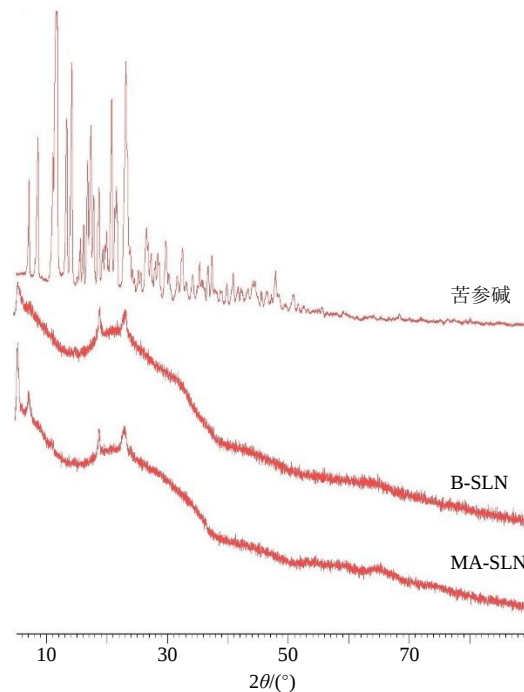


图 5 MA-SLN 的 XRD 扫描分析图

Fig. 5 Analysis diagram of MA-SLN by XRD

调整介质 37 ℃、转速 150 r/min 进行体外透析试验, 取样时间为 1、2、3、4、6、9、12、18、24 h, 取样量为 3 mL, 并补充同温等量的生理盐水, 同法以相同质量浓度的苦参碱水溶液作为对照, 计算累积释放率。结果见图 6。由图 6 可知, 苦参碱水溶液中苦参碱可快速释药, 并在 6 h 后达基本释放完药物到平衡。而 MA-SLN 较苦参碱水溶液体外透析释药过程缓慢, 在 24 h 后才逐渐达到平衡, 因此 MA-SLN 体外释药具有缓释效果。

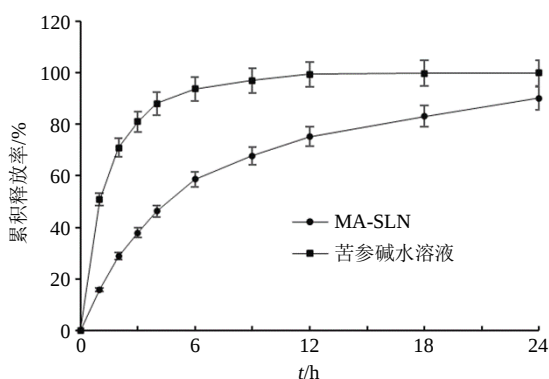


图 6 苦参碱水溶液和 MA-SLN 体外释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 In vitro release of WMA and MA-SLN ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.8 MA-SLN 经皮渗透研究

取昆明种小鼠, 脱颈处死后剥离皮肤, 剪净皮肤上的毛, 小心剔除皮下黏膜膜和脂肪组织, 用生理盐水冲洗干净后切成小块 (3.0 cm × 3.0 cm), -20 ℃ 冷冻保存, 1 周内使用。

将角质层向上固定于立式双室扩散池上, 在接收池加入 7 mL 生理盐水作为接收液, 保持恒温在 (32.0 ± 0.5) ℃, 搅拌速度 300 r/min; 在供给池中分别加入相同苦参碱量的 MA-SLN 和苦参碱水溶液。分别在 1、2、3、4、6、9、12、18、24 h 取接收液 0.5 mL, 并补加 0.5 mL 新鲜接收液, 将取得样品经 0.22 μm 微孔滤膜。按照“2.2.2”项下色谱条件测定苦参碱含量, 按公式计算各时间点苦参碱累积透过量 (ΔM) [19]。

$$\Delta M = \sum CV/A_e$$

C 为接收液中的药物质量浓度 (μg/mL), V 为接收液的体积 (mL), A_e 为扩散池的有效面积 (cm²)

结果如图 7 所示。由图可知 MA-SLN 较苦参碱经皮渗透释药快, 1~9 h 时 ΔM 达到 500 μg/cm² 左右, 是苦参碱水溶液的 3.93 倍 (t 检验, $P < 0.05$), 表明 MA-SLN 能够显著促进苦参碱的经皮渗透, 其原因可能是 MA-SLN 以其较小的粒径 (197 nm) 和

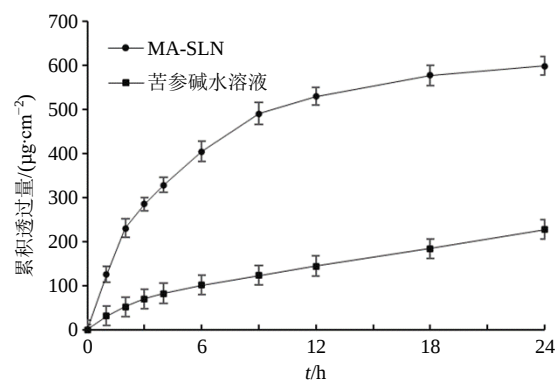


图 7 苦参碱累积透过量 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Cumulative permeation of matrine ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

亲脂性而增强了苦参碱的经皮渗透性, 同时, 药物在 MA-SLN 微粒中以高浓度的分子状态分布增大了其热力学活性, 进一步利于苦参碱的经皮渗透吸收。9~24 h, MA-SLN 可以持续稳定释放药物, 以维持药物的经皮渗透吸收, 表明 MA-SLN 具有良好的缓释行为; 而水溶液中药物虽然也随时间延长而 ΔM 缓慢增加, 但是增加不明显 (t 检查, $P > 0.05$), 表明苦参碱在苦参碱水溶液中难于经皮渗透吸收。结果表明 MA-SLN 不仅可以提高药物经皮渗透吸收的效率, 还具有良好的缓释行为。

3 讨论

苦参碱具有多种药理作用, 是一种具有巨大临床应用价值的天然药物。但是, 由于苦参碱存在强烈持久的苦味且对胃肠道黏膜存在刺激, 加之其生物半衰期较短, 血浆清除快, 临床为保证疗效需大剂量给药, 进而增加不良反应发生频次, 这些限制了苦参碱口服给药与注射给药的广泛应用。

本实验研究了以微乳-低温固化法制备 MA-SLN, 并对其药剂学性质与透皮给药行为进行了考察。研究发现, 采用微乳-低温固化法制备 MA-SLN, 其工艺简单、周期短、成本低与可控性高, 因此易于产业化放大。

实验中, 为了准确测定苦参碱固体脂质纳米粒的包封率, 必须将纳米粒和游离的药物有效分离。常用葡聚糖凝胶柱色谱法、透析法和超速离心法等分离方法。其中透析法过程缓慢, 药物容易泄露; 实验过程中也采用过超速离心法, 但实验不易产生沉淀, 且结果不稳定; 而鱼精蛋白凝聚法主要是通过纳米粒表面吸附某种蛋白质来增加固体脂质纳米粒的密度使游离药物与纳米粒通过离心后达到有效分离。本实验用约含 2/3 以上精氨酸的鲑鱼精蛋白, 一种含有胍基的带正电的碱性氨基酸。苦参碱

固体脂质纳米粒带有负电荷。多聚阳离子鱼精蛋白会与带负电的纳米粒产生絮凝作用,并通过离心将纳米粒和游离药物分离,该法简单易行,且分离效果较好。

本实验制备的 MA-SLN 呈规整平滑的均匀实体骨架球状结构,苦参碱在 SLN 均匀分布且二者相容性良好,MA-SLN 对苦参碱具有较高的包封率(56.12 ± 0.82)%,因此载药量大,可满足不同疾病治疗的需求;MA-SLN 的平均粒径为 197 nm (PDI 为 0.184),电位为 (-32.0 ± 2.1) mV,表明 MA-SLN 粒径分布均匀并具有良好的稳定性。MA-SLN 具有较小的粒径,并且由于 SLN 的亲脂性材料将药物包裹于脂质结构中,增加了药物的稳定性和细胞透过率,因此,可以极大地促进苦参碱的透皮吸收^[20-21],9 h 时 ΔM 达到 $500 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 是苦参碱水溶液的 3.93 倍 (t 检验, $P < 0.05$),同时,由于苦参碱被充分包埋于 MA-SLN 的实体骨架材料中因而具有较好的缓释行为,可持续释药 24 h。MA-SLN 为苦参碱提供了一种基于纳米微粒的新型外用缓释给药系统,在一定程度上促进了中药的传承与创新,因此,MA-SLN 具有广阔的应用前景。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 曹建,魏润杰,邓茹芸,等. 苦参碱及氧化苦参碱抑制肿瘤作用机制研究进展及展望 [J]. 中草药, 2019, 50(3): 753-760.
- [2] 张翹,马悦,高慧敏,等. 苦参化学成分研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(4): 205-214.
- [3] 于娜,范红艳. 苦参黄酮类化合物药理作用的研究进展 [J]. 吉林医药学院学报, 2021, 42(4): 304-307.
- [4] 苏丽丽. 苦参的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 化学工程师, 2021, 35(3): 58-61.
- [5] 穆甲骏,王卫国,侯启昌. 苦参生理活性物质研究现状与展望 [J]. 河南师范大学学报: 自然科学版, 2014, 42(6): 131-137.
- [6] Gu Y Y, Chen M H, May B H, et al. Matrine induces apoptosis in multiple colorectal cancer cell lines *in vitro* and inhibits tumour growth with minimum side effects *in vivo* via Bcl-2 and caspase-3 [J]. *Phytomedicine*, 2018, 51: 214-225.
- [7] Pu J, Tang X, Zhuang X, et al. Matrine induces apoptosis via targeting CCR7 and enhances the effect of anticancer drugs in non-small cell lung cancer *in vitro* [J]. *Innate Immun*, 2018, 24(7): 394-399.
- [8] 苏婷婷,傅春升,张学顺. 苦参碱制剂的研究进展 [J]. 中南药学, 2016, 14(3): 295-299.
- [9] 和欢,尚新悦,宋少江. 苦参碱及其制剂的研究进展 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2016, 18(7): 1099-1107.
- [10] 张明发,沈雅琴. 苦参碱的药动学研究进展 [J]. 药物评价研究, 2020, 43(12): 2571-2578.
- [11] 王贤儿,钟希文,梅全喜,等. 固体脂质纳米粒在中药经皮给药中的研究进展 [J]. 中国药房, 2015, 26(13): 1860-1862.
- [12] 宋春晓,何书莲,曹春风,等. 固体脂质纳米粒和纳米结构脂质载体在药物传递中的研究进展 [J]. 药学研究, 2016, 35(4): 234-236, 245.
- [13] 侯文书,张丹参,张力,等. PEG 修饰姜黄素固体脂质纳米粒的制备、表征及溶出特征 [J]. 中草药, 2019, 50(8): 1927-1934.
- [14] 王小宁,罗国平,李伟泽,等. 酮洛芬固体脂质纳米粒的制备与评价 [J]. 中国药师, 2017, 20(10): 1705-1709.
- [15] 朱可馨,王志成,王冰,等. 白藜芦醇固体脂质纳米粒的处方和制备工艺优化 [J]. 中成药, 2015, 37(2): 409-413.
- [16] 程玉钊,郝旭亮,付丽娜,等. 基于白及多糖的黄藤素纳米柔性脂质体膜剂的制备研究 [J]. 中草药, 2018, 49(11): 2551-2556.
- [17] 覃成鹏,杨宁. 多相分散体系中气泡/液滴聚并和破碎的群平衡模拟 [J]. 化学进展, 2016, 28(8): 1207-1223.
- [18] Wang H, Liu M, Du S. Optimization of madecassoside liposomes using response surface methodology and evaluation of its stability [J]. *Int J Pharm*, 2014, 473(1/2): 280-285.
- [19] 李伟泽,赵宁,梁泽,等. 连翘挥发油纳米胶束对其水溶性成分连翘苷体外透皮、透黏膜吸收的影响 [J]. 中药材, 2016, 39(1): 134-137.
- [20] 邓向涛,阮晓东,郝海军. 马钱子碱固体脂质纳米粒凝胶骨架缓释片的研制 [J]. 中草药, 2018, 49(22): 5298-5304.
- [21] 谭梅娥,姜雯,曾诚,等. 田蓟苷固体脂质纳米粒的优化及其在 Caco-2 细胞模型中的吸收和转运研究 [J]. 中草药, 2017, 48(10): 2051-2060.

[责任编辑 郑礼胜]