

• 药剂与工艺 •

透明质酸修饰的栀子苷传递体凝胶的制备及其对佐剂型关节炎药效学评价

颜红^{1*}, 高司琪^{2*}, 骆慧婷³, 欧阳威¹, 王旭易¹, 李爽¹

1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208
2. 湖南省中医药研究院附属医院, 湖南 长沙 410006
3. 长沙市第四医院, 湖南 长沙 410006

摘要: 目的 制备透明质酸修饰的栀子苷传递体(hyaluronic acid modified geniposide transfersomes, HA-GTFs)凝胶, 对其进行质量评价, 并考察其治疗大鼠佐剂型关节炎的疗效。方法 采用逆向旋转蒸法制备 HA-GTFs, 通过单因素与 Box-Behnken 设计-响应面法筛选处方及制备工艺, 并比较了其透明质酸修饰的栀子苷脂质体(hyaluronic acid modified geniposide liposomes, HA-GLIPs)的变形性。在此基础上, 制备了 HA-GTFs 凝胶, 考察了其黏度、稳定性、体外释放及体外透皮性能, 并进行佐剂型关节炎的初步药效学评价。结果 透射电子显微镜下, HA-GTFs 呈规则的球形, 结构完整, 分散均匀。HA-GTFs 包封率为 57.38%, 平均粒径为 (117.53 ± 0.83) nm, ζ 电位为 (-8.53 ± 0.76) mV, 且其变形性优于 HA-GLIPs。体外释放试验结果表明, 普通栀子苷凝胶在 12 h 时释放完全, HA-GLIPs 凝胶与 HA-GTFs 凝胶表现出缓释的效果, 48 h 累积释放率分别为 92%、89%。体外透皮试验结果显示, HA-GTFs 凝胶在 24 h 内的累积透皮率高于 HA-GLIPs 凝胶与普通栀子苷凝胶, 表明传递体凝胶具有良好的透皮性能。初步药效学实验显示, 与模型组相比, HA-GTFs 凝胶组能减轻大鼠炎症反应, 病理切片未见大量炎症细胞浸润, 且能降低血清炎症因子肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 与白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 水平。其中 HA-GTFs 凝胶高剂量组的治疗效果显著优于其他组。结论 HA-GTFs 凝胶的处方工艺简单、稳定, 具有良好的缓释与透皮性能, 对佐剂型关节炎具有一定的治疗效果。

关键词: 栀子苷; 透明质酸; 传递体凝胶; Box-Behnken 设计-响应面法; 佐剂型关节炎; 药效学; 逆向旋转蒸法; 肿瘤坏死因子- α ; 白细胞介素-6

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)18-5867-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.18.005

Preparation of hyaluronic acid-modified geniposide transfersomes gels and its pharmacodynamic evaluation for adjuvant arthritis

YAN Hong¹, GAO Si-qi², LUO Hui-ting³, OUYANG Wei¹, WANG Xu-yi¹, LI Shuang¹

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China
2. Affiliated Hospital of Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410006, China
3. The Fourth Hospital of Changsha, Changsha 410006, China

Abstract: Objective To prepare the hyaluronic acid modified geniposide transfersomes (HA-GTFs) gels, evaluate the quality of the gels, and investigate its therapeutic effects on adjuvant arthritis in rats. **Methods** The HA-GTFs formulation was prepared by reverse-phase evaporation and screened by single-factor and Box-Behnken design-response surface method to acquire the best prescription. The elasticity comparison of HA-GTFs and hyaluronic acid modified geniposide liposomes (HA-GLIPs) was done. On this basis, HA-GTFs gels were prepared. The viscosity, stability, release properties and percutaneous permeability *in vitro* of HA-GTFs gels were measured, and the preliminary pharmacodynamic evaluation of HA-GTFs gels was conducted. **Results** Under the transmission

收稿日期: 2023-04-13

基金项目: 湖南省自然科学基金面上项目(2022JJ30444); 湖南中医药大学重点学科中药学科(校行发规字[2023]2号); 湖南省中医药科研计划项目(2021223)

*通信作者: 颜红, 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事中药制剂新剂型与新技术研究。E-mail: yh8632@126.com
高司琪, 女, 初级中药师, 研究方向为中药制剂新剂型与新技术研究。E-mail: 1350042471@qq.com

electron microscope, the HA-GTFs was in a regular spherical shape with complete structure and uniform dispersion. The HA-GTFs were successfully prepared with an encapsulation efficiency of 57.38%. The average particle size was (117.53 ± 0.83) nm, and the ζ potential was (-8.53 ± 0.76) mV, and the deformability of HA-GTFs was better than that of HA-GLIPs. *In vitro* release test showed that common geniposide gels released completely at 12 h, and HA-GLIPs and HA-GTFs gels showed sustained release effects, with cumulative release rates of 92% and 89% at 48 h, respectively. *In vitro* transdermal test showed that the cumulative transdermal rate of HA-GTFs gels was higher than those of HA-GLIPs gels and common geniposide gels within 24 h, indicating that the transdermal properties of the HA-GTFs gels were good. *In vivo* pharmacodynamic studies showed that compared with the model group, the HA-GTFs gels groups could reduce the inflammatory response of rats, and reduce the serum levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6), without large number of inflammatory cell infiltration in pathological sections. Among them, the therapeutic effects of high-dose HA-GTFs gels group were significantly better than others. **Conclusion** The formulation process of HA-GTFs gels is simple and stable. The HA-GTFs gels have good sustained release and transdermal performance, with a certain therapeutic effect on adjuvant arthritis.

Key words: geniposide; hyaluronic acid; transfersomal gel; Box-Behnken design-response surface method; adjuvant arthritis; pharmacodynamics; reverse-phase evaporation; tumor necrosis factor- α ; interleukin-6

类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种以滑膜炎为主要病理表现的慢性自身免疫性疾病, 可导致关节肿胀疼痛、关节软骨损伤甚至关节畸形^[1-2]。西医临床治疗^[3]常以非甾体抗炎药、抗风湿药物等药物多种联用为主, 短期内能显著减轻关节炎症和疼痛, 长期服用容易产生药物依赖性, 可引发消化道损伤、肝肾功能异常等不良反应^[4-5]。中医治疗 RA 常以内治口服与外治针刺疗法、灸法、外敷法、穴位注射法、中药熏蒸法等方法并用, 具有直达疾病部位、起效快、不良反应小等特点。栀子苷是茜草科栀子属植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 中提取分离纯化得到的一种环烯醚萜类活性成分, 具有抗炎、镇痛、抗抑郁、保肝利胆等药理活性^[6-7]。栀子苷在治疗 RA 的抗炎免疫药效物质基础和分子机制研究中取得一定的成果^[8]。但由于栀子苷水溶性强、口服利用度低、无法避免肝脏首过效应等原因, 限制了其应用。透明质酸是机体关节软骨及滑液的主要组成部分^[9], 在人体关节滑液中质量浓度高达 1.400~3.600 mg/mL, 具有较好的生物相容性^[10]。此外, 透明质酸可与关节软骨细胞特异性 CD44 受体结合, 介导细胞-基质间的相互作用, 并激活细胞内信号转导通路而发挥作用, 靶向至关节炎滑膜区^[11-12]。

传递体作为一种新型脂质体, 不仅具备传统脂质体生物相容性好、毒性小等优势, 同时因表面活性剂的加入具备良好的变形性, 能通过比自身小数倍的孔道, 是经皮给药制剂的理想载体之一^[13-14]。传递体流动性强, 难以滞留在皮肤表面, 将传递体与凝胶相结合制备成传递体凝胶剂, 利用凝胶生物黏附性强的优点, 可直接涂抹于患处, 能更好地实

现经皮给药, 同时可提高药物的滞留时间, 发挥缓释作用、降低刺激性^[15-16]。本研究选择抗炎疗效确切的栀子苷及兼具临床疗效和靶向作用的透明质酸为模型药物, 以传递体为载体, 制备共载药传递体凝胶, 对其进行质量评价, 测定其 pH 值、黏度并考察了其初步稳定性、体外渗透与透皮性能, 在此基础上, 以佐剂型大鼠 RA 为模型来评价透明质酸修饰的栀子苷传递体 (hyaluronic acid modified geniposide transfersomes, HA-GTFs) 凝胶的初步药效学, 为开发一种治疗关节炎的新型中药经皮制剂提供实验依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1200 型高效液相色谱仪, 美国安捷伦公司; Scientz-II D 型超声波细胞粉碎机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; Zetasizer Nano-ZS90 型激光粒度分析仪, 英国马尔文仪器有限公司; HT-7800 型透射电镜, 日立科学仪器 (北京) 有限公司; NDJ-5S 型旋转黏度计, 上海魅宇仪器科技有限公司; Synergy HTX 型多功能酶标仪, 美国伯腾仪器有限公司。

1.2 材料

大豆卵磷脂、胆固醇, 艾伟拓 (上海) 医药科技有限公司; 二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇-透明质酸 (DSPE-PEG-HA), 批号 RS0210810, 西安瑞禧科技有限公司; 栀子苷原料药, 质量分数 $\geq 96\%$, 批号 BLT20210307, 西安博联特化工有限公司; 栀子苷对照品, 质量分数 $\geq 98\%$, 批号 110749-201919, 中国食品药品检定研究院; 完全弗式佐剂, 美国 Sigma 公司; 胆酸钠、卡波姆 940, 上海麦克

林生化科技有限公司；丙三醇、三乙醇胺、氯仿均为分析纯，国药集团化学试剂有限公司；甲醇、乙腈均为色谱纯，美国斯百全公司；羟丙基甲基纤维素（HPMC），天津市光复精细化工研究所；羧甲基纤维素钠（CMC-Na），国药集团化学试剂有限公司。

1.3 动物

雄性 SD 大鼠，SPF 级，180~220 g，湖南斯莱克景达实验动物有限公司，许可证号：SCXK（湘）2019-0009，动物实验经湖南中医药大学动物实验伦理委员会批准，所有动物实验遵循湖南中医药大学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 HA-GTFs 和透明质酸修饰的栀子苷脂质体（hyaluronic acid modified geniposide liposomes, HA-GLIPs）的制备

2.1.1 HA-GTFs 根据预实验制备方法的筛选结果，采用逆向旋转蒸发法^[7]制备 HA-GTFs。精密称定处方量大豆卵磷脂与胆固醇，以氯仿溶解，作为油相；另精密称定处方量胆酸钠、栀子苷与 DSPE-PEG-HA，以磷酸盐缓冲液（PBS，pH 7.2）溶解，作为水相。将油相与水相混合，探头超声 15 s 形成 W/O 型乳剂，于 40 °C 下减压旋蒸除去氯仿。加入 PBS（pH 7.2）于 40 °C 下水化，探头超声，过 0.22 μm 微孔滤膜，即得 HA-GTFs。

2.1.2 空白传递体 除不加栀子苷与 DSPE-PEG-HA 外，其余操作同 HA-GTFs 的制备，制得空白传递体。

2.1.3 HA-GLIPs 除不加胆酸钠外，其余制备过程同 HA-GTFs。

2.2 栀子苷含量测定方法的建立

2.2.1 色谱条件 Hypersil Gold a Q C₁₈ 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5.0 μm）；流动相为乙腈-水（15：85）；检测波长 238 nm；体积流量为 1.0 mL/min；柱温 35 °C；进样量 20 μL。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取栀子苷对照品 10 mg，以甲醇稀释定容至 10 mL，即得 1 mg/mL 的栀子苷对照品母液，吸取 3 mL 母液，以甲醇稀释定容至 100 mL，即得含栀子苷 30 μg/mL 的对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 称取 HA-GTFs 1 g，以甲醇定容到 10 mL，放置 24 h，超声 1 h，过 0.45 μm 微孔滤膜，即得供试品溶液。

2.2.4 阴性对照溶液的制备 称取空白传递体 1 g，

以甲醇定容到 10 mL，放置 24 h，超声 1 h，过 0.45 μm 微孔滤膜，即得阴性对照溶液。

2.2.5 专属性试验 分别精密吸取栀子苷对照品溶液、供试品溶液以及阴性对照溶液，按“2.2.1”项下色谱条件分析测定，结果见图 1。HA-GTFs 中其他辅料对栀子苷的含量测定无干扰，方法专属性好。

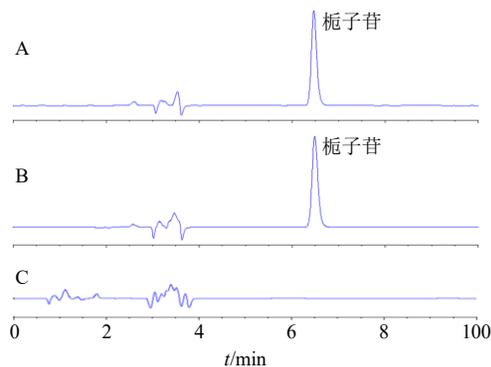


图 1 栀子苷对照品 (A)、HA-GTFs 样品 (B) 和空白传递体样品 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of geniposide reference substance (A), HA-GTFs sample (B) and blank transfersomes sample (C)

2.2.6 线性关系的考察 分别精密移取上述对照品溶液一定体积，以甲醇为稀释液，配成质量浓度分别为 10、20、40、60、80、100、120 μg/mL 的对照品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件分析测定。以栀子苷对照品质量浓度值为横坐标（X），峰面积分值为纵坐标（Y），进行线性回归分析。得到线性回归方程 $Y=19.179X-28.409$ ， $r=0.9997$ ，结果表明栀子苷在 10~120 μg/mL 线性关系良好。

2.2.7 精密度试验 精密吸取栀子苷对照品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件进行测定，连续进样测定 6 次，记录峰面积。测得栀子苷峰面积的 RSD 为 0.72%，表明该仪器精密度良好。

2.2.8 稳定性试验 精密吸取同一份供试品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件进行测定，分别于 1、2、4、8、12、24 h 进样检测。结果显示，栀子苷峰面积的 RSD 为 0.76%，表明 24 h 内供试品溶液稳定性良好。

2.2.9 重复性试验 精密吸取同一批次 HA-GTFs，平行 6 份，制备供试品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件进行分析，计算栀子苷的平均含量与 RSD 值。结果栀子苷质量浓度的 RSD 为 1.24%，表明该测定方法的重复性良好。

2.2.10 加样回收率试验 吸取 1 mL 空白传递体 9 份，分为 3 组，分别加入适量栀子苷对照品溶液，

以甲醇定容,配成高、中、低(120、60、10 μg/mL)质量浓度的溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进行检测。结果显示栀子苷的平均加样回收率为100.15%,RSD为1.76%。

2.3 HA-GTFs 包封率的测定

精密移取 HA-GTFs 溶液 1 mL 于透析袋中,以 50 mL 水为透析介质,于 25 °C、300 r/min 下,平衡透析 75 min,取袋外透析液加甲醇定容,过膜,按“2.2.1”项下色谱条件检测游离栀子苷含量(W_1);另精密移取 HA-GTFs 1 mL 加甲醇破乳定容到 25 mL,放置 24 h,超声 1 h,过膜,按“2.2.1”项下色谱条件检测其中栀子苷的总量(W_2);按照公式计算 HA-GTFs 的包封率。

$$\text{包封率} = (W_2 - W_1) / W_2$$

2.4 单因素考察 HA-GTFs 的处方工艺

2.4.1 表面活性剂胆酸钠与磷脂的质量比(表脂比)考察 固定其他因素:药物与磷脂的质量比(药脂比)为 1:6,胆固醇与磷脂的质量比(胆脂比)为 1:8,PBS 与氯仿体积比为 2:9,水化体积 6 mL,以氯仿作为有机溶剂,DSPE-PEG-HA 与磷脂的质量比为 1:20,按“2.1”项下方法制备 HA-GTFs 传递体,考察表脂比(1:3、1:6、1:9、1:12、1:15)对 HA-GTFs 处方工艺的影响,测定其平均粒径、多分散系数(polydispersity index, PDI)、ζ 电位与包封率,结果见表 1。不同水平的表脂比对 HA-GTFs 的平均粒径、PDI、ζ 电位影响不大,表脂比

1:6 的样品包封率略高于其他比例的样品,因此,选择表脂比为 1:6。

2.4.2 药脂比考察 固定其他因素:表脂比为 1:6,胆脂比为 1:8,PBS 与氯仿体积比为 2:9,水化体积 6 mL,以氯仿作为有机溶剂,DSPE-PEG-HA 与磷脂的质量比为 1:20,按“2.1”项下方法制备 HA-GTFs,考察药脂比(1:6、1:9、1:12、1:15、1:18)对 HA-GTFs 处方工艺的影响,测定其平均粒径、PDI、ζ 电位与包封率,结果见表 2。不同水平的药脂比对 HA-GTFs 平均粒径、PDI、ζ 电位影响不大,同时考虑到药物投入量太低会导致致药量过低,因此,选择药脂比为 1:12。

2.4.3 胆脂比考察 固定其他因素:表脂比为 1:6,药脂比为 1:12,PBS 与氯仿体积比为 2:9,水化体积 6 mL,以氯仿作为有机溶剂,DSPE-PEG-HA 与磷脂的质量比为 1:20,按“2.1”项下方法制备 HA-GTFs,考察胆脂比(1:2、1:4、1:6、1:8、1:10)对 HA-GTFs 处方工艺的影响,测定其平均粒径、PDI、ζ 电位与包封率,结果见表 3。不同水平的胆脂比对 HA-GTFs 平均粒径、PDI、ζ 电位影响不大,根据包封率的结果选择胆脂比为 1:4 来制备 HA-GTFs。

2.4.4 PBS 与氯仿用量比考察 固定其他因素:表脂比为 1:6,药脂比为 1:12,胆脂比为 1:4,水化体积 6 mL,以氯仿作为有机溶剂,DSPE-PEG-HA 与磷脂的质量比为 1:20,按“2.1”项下方法制备

表 1 表脂比考察结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Results of superficial fat ratio investigation ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表脂比	外观性状	平均粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV	包封率/%
1:3	澄清透明,有淡蓝色乳光	100.21±0.35	0.319±0.002	-3.51±0.63	24.44±2.50
1:6	澄清透明,有淡蓝色乳光	123.43±0.70	0.241±0.005	-3.87±0.22	31.22±2.59
1:9	澄清透明,有淡蓝色乳光	134.90±1.30	0.230±0.001	-4.01±0.58	26.51±1.22
1:12	澄清透明,有淡蓝色乳光	129.16±0.55	0.253±0.015	-4.16±1.11	24.26±1.24
1:15	澄清透明,有淡蓝色乳光	138.93±0.30	0.286±0.011	-3.72±0.38	22.89±0.64

表 2 药脂比考察结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Results of drug to lipid ratio investigation ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

药脂比	外观性状	平均粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV	包封率/%
1:6	澄清透明,有淡蓝色乳光	130.05±4.35	0.264±0.021	-3.88±0.25	37.06±0.70
1:9	澄清透明,有淡蓝色乳光	126.85±2.95	0.267±0.007	-3.64±1.59	38.98±0.38
1:12	澄清透明,有淡蓝色乳光	123.70±2.10	0.235±0.004	-4.29±0.17	50.86±1.16
1:15	澄清透明,有淡蓝色乳光	131.20±2.10	0.236±0.021	-3.74±0.91	49.18±1.05
1:18	澄清透明,有淡蓝色乳光	126.20±1.30	0.249±0.002	-4.07±0.35	49.68±0.46

表3 胆脂比考察结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Result of bile lipid ratio investigation ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

胆脂比	外观性状	平均粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV	包封率/%
1 : 2	澄清透明, 有淡蓝色乳光	132.40 ± 3.40	0.339 ± 0.007	-3.61 ± 0.24	41.95 ± 0.29
1 : 4	澄清透明, 有淡蓝色乳光	124.05 ± 2.40	0.263 ± 0.011	-3.49 ± 0.62	51.23 ± 0.63
1 : 6	澄清透明, 有淡蓝色乳光	128.35 ± 1.15	0.245 ± 0.014	-3.85 ± 0.31	46.41 ± 0.82
1 : 8	澄清透明, 有淡蓝色乳光	120.71 ± 1.10	0.239 ± 0.023	-3.52 ± 0.03	41.20 ± 1.45
1 : 10	澄清透明, 有淡蓝色乳光	124.15 ± 1.55	0.249 ± 0.002	-3.84 ± 0.17	35.99 ± 0.31

HA-GTFs, 考察 PBS 与氯仿体积比 (1 : 4.5、1.5 : 6.75、2 : 9、2.5 : 11.25、3 : 13.5) 对 HA-GTFs 处方工艺的影响, 测定其平均粒径、PDI、ζ 电位与包封率, 结果见表 4。因为 PBS 与氯仿体积比对 HA-GTFs 平均粒径、PDI、ζ 电位影响不大, 根据包封率的结果选择 PBS 与氯仿用量比为 2.5 : 11.25 来制备 HA-GTFs。

2.4.5 水化体积考察 固定其他因素: 药脂比为 1 :

12, 胆脂比为 1 : 4, PBS 与氯仿体积比为 2 : 9, 以氯仿作为有机溶剂, DSPE-PEG-HA 与磷脂的质量比为 1 : 20, 按“2.1”项下方法制备 HA-GTFs, 考察水化体积 (3、4、5、6、7 mL) 对 HA-GTFs 处方工艺的影响, 测定其平均粒径、PDI、ζ 电位与包封率, 结果见表 5。因为不同水化体积对 HA-GTFs 平均粒径、PDI、ζ 电位影响不大, 根据包封率的结果选择来水化体积 5 mL 制备 HA-GTFs。

表4 PBS 与氯仿体积比考察结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Investigation results of volume ratio of PBS to chloroform ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

PBS 与氯仿体积比	外观性状	平均粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV	包封率/%
1 : 4.5	澄清透明, 有淡蓝色乳光	123.95 ± 1.25	0.272 ± 0.009	-3.21 ± 0.43	39.49 ± 1.26
1.5 : 6.75	澄清透明, 有淡蓝色乳光	123.75 ± 4.55	0.249 ± 0.005	-3.81 ± 0.57	43.28 ± 0.43
2 : 9	澄清透明, 有淡蓝色乳光	125.15 ± 1.55	0.284 ± 0.007	-3.07 ± 1.05	51.16 ± 0.22
2.5 : 11.25	澄清透明, 有淡蓝色乳光	128.85 ± 1.65	0.246 ± 0.010	-3.59 ± 0.94	59.09 ± 0.42
3 : 13.5	澄清透明, 有淡蓝色乳光	128.20 ± 0.90	0.259 ± 0.027	-3.63 ± 0.77	47.22 ± 0.48

表5 水化体积考察结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Results of hydration volume investigation ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

水化体积/mL	外观性状	平均粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV	包封率/%
3	澄清透明, 有淡蓝色乳光	124.40 ± 3.90	0.244 ± 0.007	-3.39 ± 0.37	43.39 ± 0.58
4	澄清透明, 有淡蓝色乳光	120.45 ± 0.75	0.224 ± 0.005	-3.69 ± 0.24	48.47 ± 0.50
5	澄清透明, 有淡蓝色乳光	126.01 ± 3.62	0.237 ± 0.001	-3.95 ± 1.29	60.00 ± 0.25
6	澄清透明, 有淡蓝色乳光	131.35 ± 2.15	0.242 ± 0.003	-3.06 ± 1.01	50.85 ± 1.01
7	澄清透明, 有淡蓝色乳光	127.24 ± 4.16	0.265 ± 0.016	-3.21 ± 0.67	52.91 ± 0.04

2.4.6 油相溶剂种类考察 固定其他因素: 药脂比为 1 : 12, 胆脂比为 1 : 4, PBS 与氯仿体积比为 2 : 9, 水化体积 6 mL, DSPE-PEG-HA 与磷脂的质量比为 1 : 20, 按“2.1”项下方法制备 HA-GTFs, 考察油相有机溶剂种类 (氯仿、氯仿-乙醚 1 : 1、氯仿-乙醚 2 : 1、氯仿-乙醚 4 : 1) 对 HA-GTFs 处方工艺的影响, 测定其平均粒径、PDI、ζ 电位与包封率, 结果见表 6。因为油相溶剂种类对 HA-GTFs 平均粒径、PDI、ζ 电位影响不大, 根据包封率的结果选择氯仿来制备 HA-GTFs。

2.4.7 DSPE-PEG-HA 与磷脂的质量比考察 固定其他因素: 药脂比为 1 : 12, 胆脂比为 1 : 4, PBS 与氯仿体积比为 2 : 9, 水化体积 6 mL, 以氯仿作为有机溶剂, 按“2.1”项下方法制备 HA-GTFs, 考察 DSPE-PEG-HA 与磷脂的质量比 (1 : 10、1 : 20、1 : 30) 对 HA-GTFs 处方工艺的影响, 测定其平均粒径、PDI、ζ 电位与包封率, 结果见表 7。因为 DSPE-PEG-HA 的加入量对 HA-GTFs 平均粒径、PDI、ζ 电位影响不大, 根据包封率的结果选择 DSPE-PEG-HA 与磷脂的质量比为 1 : 20 来制备 HA-GTFs。

表6 油相溶剂种类考察结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Results of investigation on types of oil phase solvents ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

油相溶剂种类	外观性状	平均粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV	包封率/%
氯仿	澄清透明, 有淡蓝色乳光	125.55 ± 1.25	0.219 ± 0.003	-3.47 ± 0.13	58.77 ± 0.75
氯仿-乙醚 1 : 1	澄清透明, 有淡蓝色乳光	125.75 ± 3.65	0.254 ± 0.005	-3.62 ± 0.22	52.84 ± 0.21
氯仿-乙醚 2 : 1	澄清透明, 有淡蓝色乳光	126.95 ± 1.25	0.243 ± 0.006	-3.19 ± 1.45	46.69 ± 0.54
氯仿-乙醚 4 : 1	澄清透明, 有淡蓝色乳光	122.95 ± 3.45	0.246 ± 0.022	-3.85 ± 2.65	42.62 ± 0.44

表7 DSPE-PEG-HA 与磷脂的质量比考察结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 7 Investigation results of mass ratio of DSPE-PEG-HA to phospholipid ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

DSPE-PEG-HA 与磷脂的比例	外观性状	平均粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV	包封率/%
1 : 10	澄清透明, 有淡蓝色乳光	112.85 ± 0.97	0.314 ± 0.027	-8.76 ± 0.26	56.92 ± 1.05
1 : 20	澄清透明, 有淡蓝色乳光	108.92 ± 0.35	0.309 ± 0.003	-9.86 ± 0.41	60.83 ± 0.74
1 : 30	澄清透明, 有淡蓝色乳光	110.91 ± 1.53	0.307 ± 0.034	-9.08 ± 1.84	53.35 ± 0.41

2.5 Box-behnken 设计-响应面法 (Box-Behnken design-response surface method, BBD-RSM) 优化 HA-GTFs 的处方工艺

结合文献及前期单因素考察结果, 选择对 HA-GTFs 处方工艺影响较大的胆脂比 (X_1)、药脂比 (X_2)、表脂比 (X_3) 3 个因素为考察对象, 以包封率

(Y_1) 与载药量 (Y_2) 的综合评分 (Y) 作为评价指标进行实验, Y_1 与 Y_2 的权重系数分别设为 0.6 与 0.4, $Y = 0.6 \times Y_1/Y_{1max} + 0.4 \times Y_2/Y_{2max}$ 。响应面试验设计与结果见表 8。采用 Design-Expert 10 软件对试验结果进行处理, 并对响应面的结果进行验证。

采用 Design-Expert V10.0 软件以综合评分 Y 对

表8 HA-GTFs 处方工艺 Box-behnken 试验设计与结果

Table 8 Box-behnken trial design and results of HA-GTFs formulation process

试验号	X_1	X_2	X_3	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$	$Y/\%$	试验号	X_1	X_2	X_3	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$	$Y/\%$
1	6 : 1 (+1)	16 : 1 (+1)	6 : 1 (0)	40.51	0.785 0	70.36	10	4 : 1	12 : 1	8 : 1	33.39	1.090 9	74.27
2	4 : 1 (0)	16 : 1	8 : 1 (+1)	34.59	0.823 3	65.69	11	6 : 1	12 : 1	6 : 1	40.86	0.973 9	77.65
3	2 : 1 (-1)	16 : 1	6 : 1	45.93	0.801 3	76.53	12	4 : 1	12 : 1	4 : 1	46.86	0.836 4	78.77
4	6 : 1	14 : 1 (0)	8 : 1	43.85	0.955 6	80.05	13	4 : 1	14 : 1	6 : 1	57.68	0.998 6	95.82
5	2 : 1	14 : 1	4 : 1 (-1)	51.10	0.910 1	85.82	14	4 : 1	14 : 1	6 : 1	56.38	0.967 5	93.35
6	4 : 1	16 : 1	4 : 1	43.21	0.756 8	72.11	15	4 : 1	14 : 1	6 : 1	57.16	0.974 1	94.39
7	6 : 1	14 : 1	4 : 1	53.57	0.805 7	84.54	16	4 : 1	14 : 1	6 : 1	56.22	0.943 2	92.30
8	2 : 1	14 : 1	8 : 1	52.92	0.799 6	83.64	17	4 : 1	14 : 1	6 : 1	58.45	0.965 3	95.39
9	2 : 1	12 : 1 (-1)	6 : 1	47.84	0.828 1	79.47							

X_1 、 X_2 、 X_3 进行二次项式回归方程拟合。得到二次多项式回归方程为 $Y = 94.25 - 1.61 X_1 - 3.18 X_2 - 2.20 X_3 - 1.09 X_1 X_2 - 0.58 X_1 X_3 - 0.48 X_2 X_3 - 3.72 X_1^2 - 14.53 X_2^2 - 7.02 X_3^2$ 。方差分析见表 9, 结果表明, 回归模型 $P < 0.000 1$, 失拟项水平不显著 ($P > 0.05$), 说明模型拟合良好。 X_1 、 X_2 、 X_3 对 Y 均具有显著影响 ($P < 0.05$), 各因素之间交互作用不显著 ($X_1 X_2$ 、 $X_1 X_3$ 、 $X_2 X_3$ 的 P 均 > 0.05)。

以 Y 为评价指标对交互因素的响应面 3D 效果图见图 2。在保证 Y 与拟合度均最高的前提下, 经

软件筛选最终确定了 HA-GTFs 最优处方参数: 胆脂比 1 : 3.6, 药脂比 1 : 13.8, 表脂比 1 : 5.7。

按上述优化处方, 采用逆向旋转蒸发法制备 HA-GTFs, 将大豆卵磷脂与胆固醇(胆脂比 1 : 3.6), 以氯仿溶解, 作为油相; 另精密称定处方量的胆酸钠、栀子苷与 DSPE-PEG-HA (药脂比 1 : 13.8, 表脂比 1 : 5.7, 导脂比 1 : 20), 以 PBS 溶解, 作为水相。将油相与水相混合, 探头超声 15 s 形成均匀不分层的乳白色 W/O 型乳剂, 于 40 °C 下减压旋蒸除去氯仿。加入 PBS, 于 40 °C, 550 r/min 下水化 30

表9 方差分析结果

Table 9 Results of variance analysis

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性	方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	1 393.76	9	154.86	72.23	<0.000 1	极显著	X_1^2	58.35	1	58.35	27.21	0.001 2	显著
X_1	20.67	1	20.67	9.64	0.017 2	显著	X_2^2	888.32	1	888.32	414.31	<0.000 1	极显著
X_2	81.09	1	81.09	37.82	0.000 5	极显著	X_3^2	207.20	1	207.20	96.64	<0.000 1	极显著
X_3	38.68	1	38.68	18.04	0.003 8	显著	残差	15.01	7	2.14			
X_1X_2	4.73	1	4.73	2.21	0.181 0		失项	6.61	3	2.20	1.05	0.462 2	不显著
X_1X_3	1.33	1	1.33	0.62	0.456 1		净误差	8.40	4	2.10			
X_2X_3	0.92	1	0.92	0.43	0.533 0		总离差	1 408.77	16				

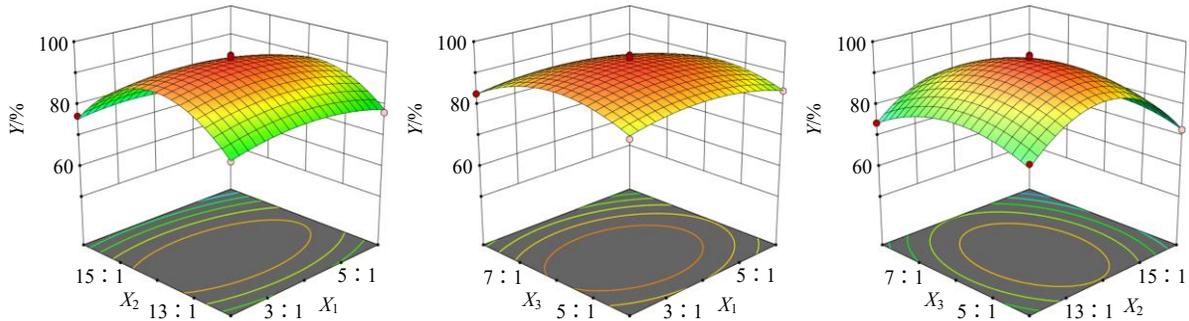


图2 各因素间交互作用的响应面图

Fig. 2 Response surface map of relationship between various factors

min, 超声 3 min, 待冷却至室温, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 4 °C 密封保存。验证实验结果见表 10, 结果测得 Y 值为 94.26 (n=3) 与预测值 (Y=95.25) 较为接近, 相对偏差低于 3%, 说明 Box-Behnken 响应面预测结果可靠。

2.6 HA-GTFs 的理化性质研究

2.6.1 形态观察 制备的 HA-GTFs 产品外观澄清透明, 带有淡蓝色乳光。取适量 HA-GTFs 溶液滴于铜网上, 在 37 °C 烘箱中放置 24 h 挥干溶液, 在透射电子显微镜下观察其形状, 可见 HA-GTFs 呈球形或类圆形, 外观完整, 无明显变形与成团凝聚现象, 分散均匀, 结果见图 3。

2.6.2 粒径、PDI 及 ζ 电位的测定 采用马尔文激光粒径测定仪对 HA-GTFs 进行粒径、PDI、ζ 电位测定, 结果见图 4。测得 HA-GTFs 平均粒径为

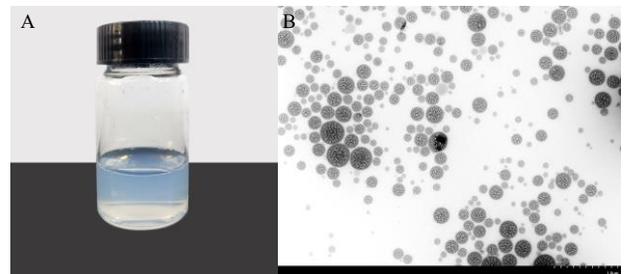


图3 HA-GTFs 的外观 (A) 与 TEM 图 (B)

Fig. 3 Appearance (A) and TEM image (B) of HA-GTFs

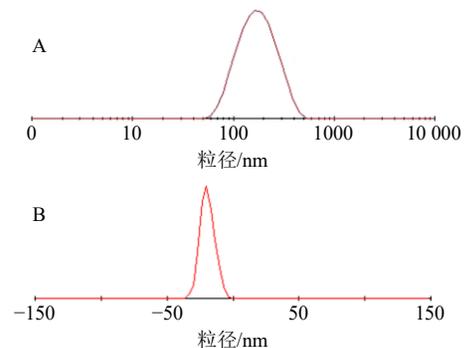


图4 HA-GTFs 粒径分布 (A) 及 ζ 电位 (B)

Fig. 4 Particle size distribution (A) and ζ potential (B) of HA-GTFs

(117.53 ± 0.83) nm, PDI 为 0.314 ± 0.021, ζ 电位为 (-8.53 ± 0.76) mV。

表10 验证结果

Table 10 Verification results

试验号	封装率/ %	载药量/ %	Y/%		RSD/ %
			实际值	预测值	
1	57.09	0.962 5	93.89	95.25	1.04
2	56.27	0.953 7	92.73		
3	58.79	0.985 7	96.15		

2.6.3 变形性测定^[18] 使用横截面积为 1 cm² 的注射器,并在上方以水的重力制造 0.3 MPa 压强,在规定时间内 1 min 内收集液体,测定 HA-GTFs 与 HA-GLIPs 通过膜(220 nm)的体积,每个样品平行测定 3 次,按公式计算变形性指数(D)及其 RSD 值。测得 HA-GTFs 的 D 值为 1.86 ± 0.03 , HA-GLIPs 的 D 值为 1.45 ± 0.02 ,由此可知 HA-GTFs 的变形性优于 HA-GLIPs。

$$D = J \times (r_v / r_p)^2$$

D 为变形性指数, J 为单位时间内传递体的挤出体积(mL), r_v 为 HA-GTFs 或 HA-GLIPs 过膜挤出后的粒径(nm), r_p 为微孔滤膜的孔径(nm)

2.7 HA-GTFs 凝胶、透明质酸修饰的栀子苷脂质体(hyaluronic acid modified geniposide liposomes, HA-GLIPs)凝胶和普通栀子苷凝胶的制备

2.7.1 HA-GTFs 凝胶的制备

(1) HA-GTFs 的制备:按“2.5”项下优选的处方及工艺制备 HA-GTFs。

(2) HA-GTFs 凝胶的制备:称取 5 g 甘油加入适量蒸馏水中,搅拌均匀,另称取 2 g 卡波姆 940 加入甘油水溶液中,放置 24 h 过夜溶胀,再加蒸馏水至 100 g,以三乙醇胺调节 pH 值为 6.5~7.5,得空白凝胶基质。将空白凝胶基质与 HA-GTFs 溶液等质量比涡旋混合均匀,即得 HA-GTFs 凝胶。

2.7.2 HA-GLIPs 凝胶的制备

(1) HA-GLIPs 的制备:除不加表面活性剂胆酸钠外,其余制备过程同 HA-GTFs 的制备。

(2) HA-GLIPs 凝胶的制备:将空白凝胶基质与 HA-GLIPs 溶液等质量比涡旋混合均匀,即得 HA-GLIPs 凝胶。

2.7.3 普通栀子苷凝胶的制备

(1) 栀子苷溶液的配制:精密称定处方量栀子苷于 5 mL 棕色量瓶中,加 pH 7.2 的 PBS 溶解至刻度,超声 5 min,得栀子苷溶液。

(2) 普通栀子苷凝胶的制备:将空白凝胶基质与栀子苷溶液等质量比涡旋混合均匀,即得普通栀子苷凝胶。

2.7.4 凝胶基质种类的筛选 以卡波姆 940、羧甲基纤维素钠(CMC-Na)和羟丙基甲基纤维素(HPMC)作为基质,考察基质种类对传递体凝胶的影响。分别配制卡波姆 940、CMC-Na 与 HPMC 水溶液,加入 5%甘油,搅拌均匀,放置过夜使其充分溶胀。其中,卡波姆 940 水溶液以三乙醇胺调 pH 至

6.5~7.5。将凝胶基质与传递体溶液以质量比 1:1 混合,搅拌均匀,以外观性状、黏性、涂展性等为指标,筛选基质种类。结果显示 CMC-Na 基质制备的凝胶成型性差、流动性较大、涂抹不匀;HPMC 制备的凝胶流动性大、质地较稀;卡波姆 940 制备的凝胶涂展性好,呈现凝胶状。故选用卡波姆 940 为凝胶基质进行后续实验。

2.7.5 凝胶基质浓度的筛选 以卡波姆 940 作为凝胶基质,分别配制不同浓度的卡波姆 940 水溶液,加入 5%甘油,搅拌均匀,放置过夜使其充分溶胀,将凝胶基质与传递体溶液以质量比 1:1 混合,搅拌均匀,以外观性状、黏性、涂展性、离心稳定性为指标,筛选基质浓度。结果显示,1%卡波姆 940 成型性不好,流动性大,涂抹不匀。当基质的浓度越高,所制得的凝胶越稠,2%卡波姆 940 制备的凝胶各项参数良好,符合凝胶制剂要求,故进行下一步筛选。

2.7.6 传递体与基质混合比例的筛选 以 2%卡波姆 940 作为基质,考察传递体与凝胶基质不同混合比例来制备传递体凝胶,凝胶基质与传递体溶液分别按质量混合比 1:1、1:1.5、1:2 混合,搅拌均匀,以外观性状、黏性、涂展性、离心稳定性为指标,筛选最佳混合比例。结果显示,基质与传递体溶液的质量混合比例为 1:1 时,外观形状良好,具有一定的流动性,符合凝胶制剂要求。

2.7.7 最佳工艺确定及实验验证 按上述优化处方,制备了 HA-GTFs 凝胶,将凝胶基质与传递体溶液以质量比 1:1 混合,搅拌均匀,即得。所制得的凝胶外观形状良好,具有一定的流动性,符合凝胶制剂要求。

2.8 HA-GTFs 凝胶的质量评价

2.8.1 外观性状 本品为外观澄清,均匀细腻,带有淡蓝色乳光的半固体凝胶。称取 HA-GTFs 凝胶 1 g,加 10 mL 蒸馏水,超声,使其溶解并分散均匀,采用 pH 计测定 pH 值为 6.98 ± 0.12 ,符合经皮外用制剂的要求。

2.8.2 黏度测试 采用 NDJ-5S 旋转黏度计进行测定,测得 HA-GTFs 凝胶黏度在 23~25 Pa·s。

2.8.3 初步稳定性考察 取 3 批 HA-GTFs 凝胶样品适量,置于西林瓶中密封避光保存,分别于 4℃、室温、40℃条件下放置,在第 0、15、30、45、60、90 天分别取样,以外观性状、黏度及栀子苷相对含量(相对含量=测得的栀子苷含量/加入的栀子苷含

量)为指标,观察同条件下各参数的变化,评价温度对产品稳定性的影响,结果见表11。HA-GTFs凝胶在低温4℃下储存外观、黏度及栀子苷含量的变

化较小,表明其在该温度下状态稳定,因此,应在低温4℃储存HA-GTFs凝胶。

2.8.4 体外释放实验 采用透析袋法测定体外释放

表11 HA-GTFs凝胶稳定性参数的测定

Table 11 Determination of stability parameter of HA-GTFs gels

t/d	外观			黏度/(Pa·s)			栀子苷相对含量/%		
	4℃	室温	40℃	4℃	室温	40℃	4℃	室温	40℃
0	澄清,有淡蓝色乳光	澄清,有淡蓝色乳光	澄清,有淡蓝色乳光	23.77	24.40	23.85	100.00	100.00	100.00
15	澄清,有淡蓝色乳光	澄清,有淡蓝色乳光	澄清,有淡蓝色乳光	22.83	22.89	20.36	99.78	97.30	92.57
30	澄清,有淡蓝色乳光	澄清,有淡蓝色乳光	颜色变深	22.14	19.65	18.74	98.36	94.65	84.62
45	澄清,有淡蓝色乳光	澄清,有淡蓝色乳光	颜色变深	21.45	18.23	15.88	96.47	91.38	77.49
60	澄清,有淡蓝色乳光	澄清,有淡蓝色乳光	颜色变深	20.86	17.11	13.59	94.32	88.63	68.35
90	澄清,有淡蓝色乳光	澄清,有淡蓝色乳光	颜色变深	20.42	15.65	10.47	92.18	86.72	51.68

度^[19],比较普通栀子苷凝胶、HA-GLIPs凝胶与HA-GTFs凝胶的体外释放性能。精密称取1g凝胶于透析袋中,以50mL生理盐水作为释放介质,于32℃、100r/min条件下透析,分别于0.5、1.0、1.5、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0、24.0、36.0、48.0、72.0h取透析介质1mL,同时补充同体积等温的透析介质,按“2.2.1”项下色谱条件检测,考察各时间点栀子苷累积释放情况,结果见图5。结果显示,普通栀子苷凝胶在12.0h时释放完全,累积释放率达到98%,之后趋于稳定。HA-GLIPs凝胶与HA-GTFs凝胶在前2.0h释放较快,由未包封的栀子苷释放所引起,之后释放速度开始减慢,表现出缓释的效果,在48h后几乎释放完全,累积释放率分别达到92%、89%。分别应用零级方程、一级方程、Higuchi

方程进行拟合,结果见表12。3种制剂的体外释放规律均符合Higuchi方程,与普通栀子苷凝胶、HA-GLIPs凝胶相比,HA-GTFs凝胶具有更好的缓释能力,更有利于形成药物释放储库。

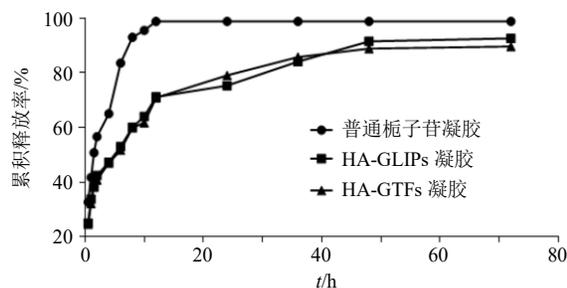


图5 3种制剂的体外释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 *In vitro* release curve of three preparations ($\bar{x} \pm s, n=3$)

表12 3种制剂的体外释放曲线的拟合方程

Table 12 Fitting equations of *in vitro* release curve equation of three preparations

样品	零级方程	一级方程	Higuchi 方程
普通栀子苷凝胶	$Q=0.0565t+0.4038, R^2=0.9204$	$\ln(1-Q)=-0.3218t-0.1077, R^2=0.9712$	$Q=0.2458t^{1/2}+0.1876, R^2=0.9783$
HA-GLIPs 凝胶	$Q=0.0347t+0.3093, R^2=0.9463$	$\ln(1-Q)=-0.0728t-0.3364, R^2=0.9783$	$Q=0.1493t^{1/2}+0.1801, R^2=0.9812$
HA-GTFs 凝胶	$Q=0.0342t+0.3053, R^2=0.9364$	$\ln(1-Q)=-0.0706t-0.3323, R^2=0.9656$	$Q=0.1469t^{1/2}+0.1781, R^2=0.9716$

2.8.5 大鼠离体皮肤透皮实验^[20] 取雄性SD大鼠,对其腹部脱毛后处死,剪下腹部皮肤,除去皮下脂肪和组织,用生理盐水洗净,滤纸擦干表面水分,铝箔纸包裹,置于-20℃冰箱中冷冻保存,备用。使用改良的Franz扩散池(表面积约1.76cm²,体积约6.5mL)考察体外透皮性能,将大鼠离体皮肤固定在Franz扩散池中,角质层朝上,以生理盐水作为透皮接收液,排尽皮肤下气泡,向供药池内分别加入0.2gHA-GTFs凝胶、HA-GLIPs凝胶与普

通栀子苷凝胶,保持(32±1)℃恒温,分别于0.5、1、2、4、6、8、10、12、24h时吸取所有透皮接收液,同时补加等量等温且已超声脱气处理的生理盐水。各时间段的接收液分别经0.45μm微孔滤膜滤过,按“2.2.1”项下色谱条件检测,根据下式计算单位面积累积透皮量(Q_n)、累积渗透率(R)。从扩散池上将皮肤取下,剪去有效透皮面积,以生理盐水洗净,加5mL生理盐水匀浆,加等量甲醇超声30min,12000r/min离心(离心半径8.95cm)15

min 后取上清液，过膜，采用 HPLC 法测定栀子苷含量，计算药物滞留量。

$$Q_n = \sum_{i=1}^n C_i V_i / A$$

$$R = Q_n A / M$$

Q_n 表示时间 t 内单位面积累积透皮量 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)， M 表示样品中栀子苷的含量 (μg)， C_i 表示第 i 个时间点的样品质量浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)， A 表示有效透皮面积 (cm^2)， V 表示每次采样的体积 (mL)

以单位面积累积透皮量 Q_n 为纵坐标，时间 t 为横坐标进行线性回归，所得斜率即为透皮速率 [J_s , $\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$]。

由表 13 和图 6 可知 HA-GTFs 凝胶、HA-GLIPs 凝胶与普通栀子苷凝胶 24 h 单位面积的累积透皮量分别为 (39.31 ± 0.53) 、 (28.07 ± 0.62) 、 (23.66 ± 0.74) $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ，24 h 累积透皮率分别为 70.29%、53.41%、44.61%，透皮速率 (J_s) 分别为 4.987 1、3.562 9、3.118 1 $\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$ ，皮肤滞留量分别为 13.12、9.37、5.26 μg 。

结果表明 HA-GTFs 凝胶的累积透皮量、累积透皮率、透皮速率与皮肤滞留量在 3 种栀子苷制剂中均为最优，其次是 HA-GLIPs 凝胶，说明传递体凝胶透皮能力优于脂质体凝胶与普通凝胶，能使药物在皮肤形成药物储库。

表 13 3 种制剂经皮渗透参数的对比 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 13 Comparison of percutaneous penetration parameters of three preparations ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	$Q_{24}/(\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2})$	$Q-t$ 方程	r 值	$Q_{24}/\%$	$J_s/(\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1})$	药物滞留量/ μg
普通栀子苷凝胶	23.66 ± 0.74	$Q = 3.118 1 t - 2.150 9$	0.967 5	44.61	3.118 1	5.26
HA-GLIPs 凝胶	28.07 ± 0.62	$Q = 3.562 9 t - 1.208 8$	0.929 0	53.41	3.562 9	9.37
HA-GTFs 凝胶	39.31 ± 0.53	$Q = 4.987 1 t - 2.390 7$	0.982 9	70.29	4.987 1	13.12

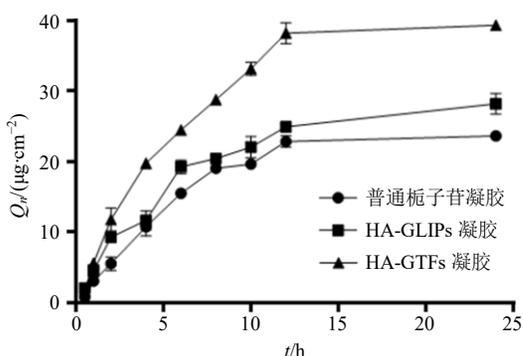


图 6 3 种制剂的体外透皮曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 *In vitro* transdermal curves of three preparations ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.9 对 RA 的初步药效学评价

2.9.1 大鼠佐剂型关节炎造模及分组 将 42 只 SD 大鼠随机分为 7 组，即对照组、模型组、阳性药物组（雷公藤多苷片混悬液 ig 组）和 HA-GTFs 低、中、高剂量组及普通栀子苷凝胶中剂量组。以完全弗式佐剂作为造模剂，除对照组外其余组均于每鼠右后足趾 sc 0.1 mL 完全弗式佐剂致炎，对照组于每鼠右后足趾 sc 等量生理盐水。

2.9.2 给药 造模成功第 10 天开始给药，每日给药 1 次，连续给药 21 d。在给药前，对大鼠膝关节及膝以下进行剃毛。阳性药物组以雷公藤多苷片混悬液 ig，给药剂量为 5 mg/(kg·d)；HA-GTFs 凝胶低、

中、高剂量组均涂抹给药，给药剂量分别为 11.875、23.750、47.500 mg/(kg·d)；普通栀子苷凝胶中剂量组涂抹给药，给药剂量为 23.750 mg/(kg·d)；对照组与模型组分别涂抹等量的空白凝胶基质。

2.9.3 关节炎指数 每隔 3 d 采用大鼠关节炎指数 (AI) 评分法记录各组大鼠关节炎病变的发生及严重程度，分为 0~4 级。0 级：无红肿；1 级：足小趾关节红肿；2 级：趾关节、足趾均红肿；3 级：踝关节以下均红肿；4 级：包括踝关节在内的全部足爪红肿。结果见表 14。与对照组相比，模型组关节炎指数评分显著性升高 ($P < 0.05$)，说明造模成功。与模型组相比，各给药组关节炎指数评分显著性降低 ($P < 0.05$)，其中 HA-GTFs 凝胶高剂量组降低最显著 ($P < 0.05$)。

2.9.4 大鼠踝关节病理组织切片 给药 21 d 后，处死各组大鼠，对踝关节周围肌肉进行钝性分离，使其暴露出完整的踝关节，取出踝关节，以 4% 甲醛溶液常温固定后，再放入 10% EDTA 脱钙液中于 37 °C 下脱钙处理，石蜡包埋，切片，HE 染色，于光镜下进行组织学观察。

结果表明，对照组的大鼠踝关节组织切片未见炎症细胞浸润，滑膜组织完整、边滑；模型组有大量炎症细胞浸润，关节滑膜组织不完整，滑膜增厚，可见明显的病变；阳性药物组的大鼠踝关节组织切

表 14 关节炎指数评分 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 14 Arthritis index score ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	评分							
		0 d	3 d	6 d	9 d	12 d	15 d	18 d	21 d
对照	-	0	0	0	0	0	0	0	0
模型	-	4.84±0.05*	4.90±0.05*	4.84±0.07*	4.91±0.06*#	4.86±0.07*	4.89±0.06*	4.83±0.04*	4.84±0.05*
阳性药物	5	4.87±0.07*#	4.68±0.10*#	4.48±0.15*#	4.10±0.12*#	3.85±0.07*#	3.57±0.09*#	3.38±0.10*#	3.15±0.09*#
HA-GTFs 凝胶	11.875	4.85±0.05*#	4.73±0.07*#	4.57±0.11*#	4.37±0.11*#	4.17±0.13*#	4.00±0.08*#	3.83±0.07*#	3.68±0.06*# ^Δ
	23.750	4.87±0.05*#	4.68±0.07*#	4.47±0.07*#	4.23±0.09*#	3.97±0.09*#	3.75±0.05*#	3.60±0.09*#	3.47±0.07*# ^Δ
	47.500	4.87±0.05*#	4.65±0.08*#	4.40±0.11*#	4.10±0.10*#	3.85±0.09*#	3.60±0.12*#	3.33±0.09*#	3.08±0.07*# ^Δ
普通栀子苷凝胶	23.750	4.87±0.07*#	4.73±0.07*#	4.57±0.05*#	4.38±0.07*#	4.20±0.06*#	4.02±0.04*#	3.87±0.07*#	3.73±0.09*# ^Δ

与对照组比较: *P<0.05; 与模型组比较: #P<0.05; 与 HA-GTFs 凝胶低剂量组比较: ΔP<0.05; 与阳性药物组比较: ^P<0.05; 与 HA-GTFs 凝胶中剂量组比较: §P<0.05, 表 15 同

*P < 0.05 vs control group; #P < 0.05 vs model group; ΔP < 0.05 vs HA-GTFs low dose group; ^P < 0.05 vs positive drug group; §P < 0.05 vs HA-GTFs medium dose group, same as table 15

片可见少数炎症细胞浸润, 滑膜完整; HA-GTFs 凝胶低剂量组可见炎症细胞浸润, 滑膜组织稍有不完整与增厚, 边缘毛躁; HA-GTFs 凝胶中剂量组仍可见少量炎症细胞浸润, 滑膜组织略显毛躁; HA-GTFs 凝胶高剂量组未见炎症细胞浸润, 滑膜组织完整; 普通栀子苷凝胶中剂量组可见少量炎症细胞浸润, 滑膜组织有损伤、不完整, 结果见图 7。

2.9.5 酶联免疫吸附测定 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 法测定血清中肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis factor-α, TNF-α) 与白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 水平 给药 21 d 后, 分别将各组大鼠以 10%水合氯醛麻醉, 腹主动脉取血, 4 °C 静置 20 min, 3000 r/min 离心 (离心半径 8.95 cm) 10 min (4 °C), 吸取上层血清, -80 °C 冷藏待测。

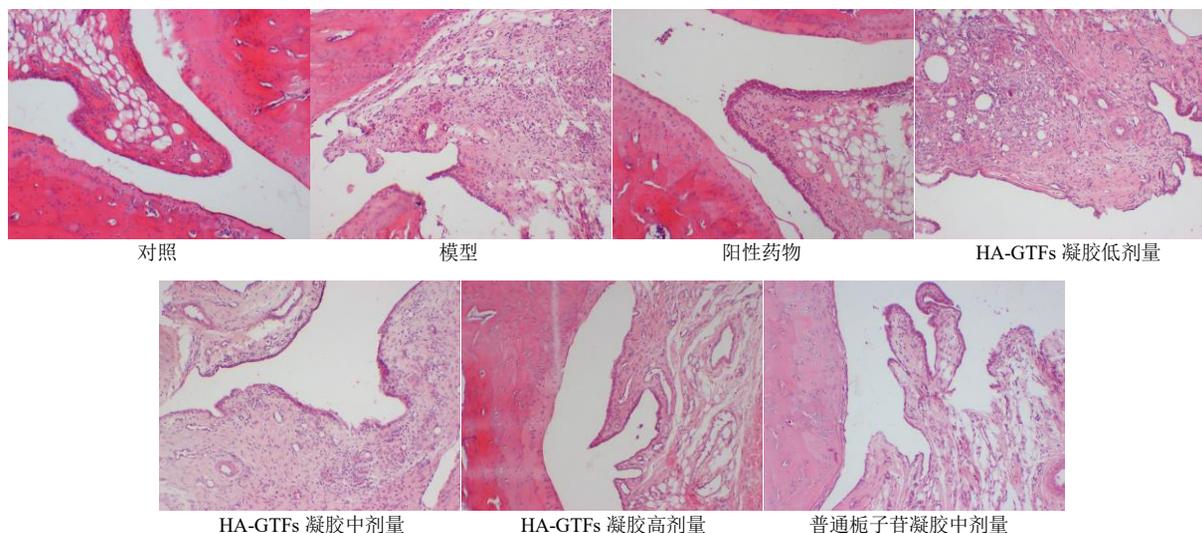


图 7 各组大鼠踝关节病理组织学切片 (HE 染色, ×100)

Fig. 7 Histological sections of ankle joint in each group (stained with HE, × 100)

按照 TNF-α 与 IL-6 ELISA 试剂盒操作说明书, 对血清 TNF-α 与 IL-6 水平进行检测, 结果见表 15。与对照组相比, 模型组血清 TNF-α 与 IL-6 水平显著性升高 (P<0.05)。与模型组相比, 各给药组 TNF-α 与 IL-6 水平显著性降低 (P<0.05), 其中阳性药物中 IL-6 水平显著高于 HA-GTFs 高剂量组 (P<0.05), 显著低于 HA-GTFs 低、中剂量组 (P<0.05)。

由以上数据结果可知 HA-GTFs 组与阳性药物组对大鼠佐剂型关节炎的炎症因子水平均有显著性降低, HA-GTFs 高剂量组在降低炎症因子水平的疗效更好。

3 讨论

本实验在前期比较了 3 种传递体包封率的测定方法: 葡聚糖凝胶柱层析法、离心法与透析法。结

表 15 各组大鼠血清中 TNF- α 与 IL-6 水平 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 15 Contents of TNF- α and IL-6 in serum of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	TNF- α / (pg·mL ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)
对照	-	42.03 ± 1.90	56.20 ± 2.48
模型	-	85.47 ± 3.84*	171.55 ± 4.59*
阳性药物	5	63.21 ± 5.17*#	113.18 ± 7.77*#
HA-GTFs 凝胶	11.875	78.22 ± 5.68*# Δ	148.90 ± 12.14*# Δ
	23.750	63.41 ± 2.52*#&	129.12 ± 12.97*#& Δ
	47.500	57.31 ± 4.59*#&	94.15 ± 12.63*#& Δ S
普通栀子苷凝胶	23.750	69.27 ± 2.39*#	137.00 ± 9.60*#

果发现葡聚糖凝胶柱层析法对 HA-GTFs 与游离栀子苷的分离度差, 流出曲线始终只有 1 个峰。对比了低速 (4000、8000 r/min) 低温 (4 °C) 离心 (离心半径 8.95 cm) 与高速 (14 000、30 000 r/min) 低温 (4 °C) 离心 (离心半径 8.95 cm), 均不能有效分离 HA-GTFs 与游离栀子苷, 考虑到离心转速过高可能会使传递体结构破坏从而导致药物泄漏, 因此此法亦不适用于 HA-GTFs 包封率的测定。采用透析法使用截留相对分子质量 8000~14 000 的透析袋测定 HA-GTFs 的包封率, 能够达到透析平衡, 此平衡点可作为取样测定点。透析曲线达到平衡点后, 再继续透析, 曲线再次上升, 原因是袋内游离药物不断通过透析袋孔隙, 进入到袋外透析介质中, 直至达到平衡, 再继续透析, 包裹在传递体中的药物泄漏, 进入透析介质, 药物含量再次上升。

本实验制备的 HA-GTFs 其包封率未达到《中国药典》2020 年版^[21]对于微粒制剂包封率的要求 (不低于 80%), 可能是因为表面活性剂的亲水亲油平衡值 (HLB 值) 会影响其自身在传递载体系统中的分布, 从而导致其与脂质膜相互作用能力的差异。表面活性剂聚山梨酯 80、胆酸钠与脱氧胆酸钠的 HLB 值分别为 15、18、16, 亲水性较强, 有可能与亲水性药物竞争水相包裹位置, 从而导致栀子苷包封率较低。

大鼠佐剂型关节炎模型是常用的关节炎类药效模型^[22], 给药第 21 天后, 大鼠踝关节组织病理染色结果显示 HA-GTFs 凝胶疗效更显著, 可减少炎症细胞浸润、滑膜组织连续、完整。通过给药治疗后, HA-GTFs 凝胶高剂量组相较于阳性药物雷公藤多苷片混悬液 (ig) 能显著降低血清中 TNF- α 与 IL-6 炎症因子, 表明 HA-GTFs 凝胶对佐剂型关节炎有

显著的改善作用, 可有效抑制 TNF- α 与 IL-6 炎症因子的表达, 提高治疗效果。

本研究制备了一种兼具高变形性与良好透皮性能的 HA-GTFs 凝胶, 并将其与凝胶剂结合, 提高了药物经皮给药效果, 对大鼠佐剂型关节炎模型具有良好的治疗效果。此外, 新型微粒给药系统传递体与凝胶剂的结合为经皮给药系统提供了新思路, 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] Daikh D I. Rheumatoid arthritis: Evolving recognition of a common disease [J]. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2022, 36(1): 101740.
- [2] Gokhale J P, Mahajan H S, Surana S J. Quercetin loaded nanoemulsion-based gel for rheumatoid arthritis: *In vivo* and *in vitro* studies [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 112: 108622.
- [3] Wang Y, Chen S J, Du K Z, et al. Traditional herbal medicine: Therapeutic potential in rheumatoid arthritis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 279: 114368.
- [4] Ke J T, Zhang H, Bu Y H, et al. Metabonomic analysis of abnormal sphingolipid metabolism in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts in hypoxia microenvironment and intervention of geniposide [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 969408.
- [5] Capellino S. Dopaminergic agents in rheumatoid arthritis [J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2020, 15(1): 48-56.
- [6] Chen X Y, Jiang W W, Liu Y L, et al. Anti-inflammatory action of geniposide promotes wound healing in diabetic rats [J]. *Pharm Biol*, 2022, 60(1): 294-299.
- [7] Bu Y H, Wu H, Deng R, et al. Geniposide restricts angiogenesis in experimental arthritis via inhibiting Dnmt1-mediated PTEN hypermethylation [J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 111: 109087.
- [8] Marinho A, Nunes C, Reis S. Hyaluronic acid: A key ingredient in the therapy of inflammation [J]. *Biomolecules*, 2021, 11(10): 1518.
- [9] Puluhulawa L E, Joni I M, Elamin K M, et al. Chitosan-hyaluronic acid nanoparticles for active targeting in cancer therapy [J]. *Polymers*, 2022, 14(16): 3410.
- [10] Zhang R, Jiang Y Y, Hao L K, et al. CD44/folate dual targeting receptor reductive response PLGA-based micelles for cancer therapy [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 829590.
- [11] Sato T, Shirai R, Isogai M, et al. Hyaluronic acid and its receptor CD44, acting through TMEM2, inhibit

- morphological differentiation in oligodendroglial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2022, 624: 102-111.
- [12] Zhang Y Y, Gao Z J, Chao S S, *et al.* Transdermal delivery of inflammatory factors regulated drugs for rheumatoid arthritis [J]. *Drug Deliv*, 2022, 29(1): 1934-1950.
- [13] Fadeel D A A, Fadel M, Tawfik A, *et al.* Transfersomal eosin topical delivery assisted by fractional CO₂ laser for photodynamic treatment of palmar hyperhidrosis: Case study [J]. *Drug Deliv Transl Res*, 2022, 12 (12): 3000-3006.
- [14] Morsi N M, Aboelwafa A A, Dawoud M H. Improved bioavailability of timolol maleate via transdermal transfersomal gel: Statistical optimization, characterization, and pharmacokinetic assessment [J]. *J Adv Res*, 2016, 7(5): 691-701.
- [15] 马闪闪, 张志锋, 吕露阳, 等. 白花丹醌传递体凝胶的制备及其体外透皮研究 [J]. *中草药*, 2018, 49(15): 3625-3631.
- [16] Nagaraja S, Basavarajappa G M, Attimarad M, *et al.* Topical nanoemulgel for the treatment of skin cancer: Proof-of-technology [J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13(6): 902.
- [17] Mirnezami S M S, Heydarinasab A, Akbarzadeh A, *et al.* Investigation of characterization and cytotoxic effect of PEGylated nanoliposomal containing Melphalan on ovarian cancer: An *in vitro* study [J]. *J Exp Nanosci*, 2021, 16(1): 101-115.
- [18] Abdallah M H, Abu Lila A S, Shawky S M, *et al.* Experimental design and optimization of nano-transfersomal gel to enhance the hypoglycemic activity of silymarin [J]. *Polymers*, 2022, 14(3): 508.
- [19] Zhao Y P, Han J F, Zhang F Y, *et al.* Flexible nanoliposomes-based transdermal hydrogel for targeted delivery of dexamethasone for rheumatoid arthritis therapy [J]. *Drug Deliv*, 2022, 29(1): 2269-2282.
- [20] Guimarães D, Lager F, Renault G, *et al.* Folate-targeted liposomal formulations improve effects of methotrexate in murine collagen-induced arthritis [J]. *Biomedicines*, 2022, 10(2): 229.
- [21] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 401-402.
- [22] 孙瑞濛, 杨白雪, 宫艳畅, 等. 完全弗氏佐剂雌性 SD大鼠类风湿关节炎模型的建立及塞来昔布对其治疗效果 [J]. *海军军医大学学报*, 2022, 43(10): 1217-1221.

[责任编辑 郑礼胜]