

• 药剂与工艺 •

基于“药辅合一”的蜗牛黏液载丹酚酸 B 纳米凝胶制备及其表征

姚碧金¹, 罗 玺¹, 张俏菊¹, 郑俊侨¹, 徐万帮^{2*}, 时 军^{1,3*}

1. 广东药科大学中药学院, 广东 广州 510006

2. 广东省药品检验所, 广东 广州 510663

3. 广东省局部精准递药制剂工程技术研究中心, 广东 广州 510006

摘要: 目的 制备丹酚酸 B-蜗牛黏液纳米凝胶 (salvianolic acid B-snail mucus nanogel, SAB-SM/Gel), 进行相关表征及体外透皮性能研究。方法 采用高压均质法制备丹酚酸 B-蜗牛黏液纳米粒 (salvianolic acid B-snail mucus nanoparticles, SAB-SM), 再用搅拌法将其与凝胶基质制成 SAB-SM/Gel。对纳米粒的形状、粒径、多分散指数 (polydispersity index, PDI)、 ζ 电位等进行表征; 用 Franz 扩散池法考察 SAB-SM/Gel 体外透皮吸收及真皮层滞留性能。结果 SAB-SM 纳米粒为透明均一的液体, 具有丁达尔效应, 透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 下呈球状或类球状结构, 大小均一, 粒子间无黏连现象, 平均粒径为 (155.55 ± 2.95) nm, PDI 为 0.31 ± 0.01 , 平均 ζ 电位为 (-15.45 ± 1.67) mV, pH 值为 6.11 ± 0.12 , SAB-SM 纳米粒中 SAB 的包封率为 (37.70 ± 1.16) %, 载药量 (1.78 ± 0.06) mg/mL; SAB-SM/Gel 在常温下为无色透明液体, TEM 下呈圆形或类圆形, pH 值为 6.24 ± 0.13 , 包封率为 (42.42 ± 1.02) %, SAB 载药量 (1.44 ± 0.04) mg/mL, 平均黏度为 0.02 Pa·s, 质地均匀细腻, 涂抹至皮肤能快速胶凝, 可涂布性能良好。体外透皮试验表明, SAB-SM/Gel 中 SAB 在 48 h 内单位面积渗透量为 (188.39 ± 2.89) $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 真皮滞留量为 (17.58 ± 0.04) $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 透皮释放过程符合 Hixson-Crowell 方程。结论 SAB-SM/Gel 处方工艺合理, 具有良好的透皮吸收性能和真皮滞留性能。

关键词: 药辅合一; 蜗牛; 黏液; 丹酚酸 B; 高压均质法; 纳米粒; 凝胶; 透皮吸收

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)21-6988-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.21.007

Preparation and characterization of salvianolic acid B-snail mucus nanogels based on “unification of drugs and excipients”

YAO Bi-jin¹, LUO Xi¹, ZHANG Qiao-ju¹, ZHENG Jun-qiao¹, XU Wan-bang², SHI Jun^{1,3}

1. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

2. Guangdong Institute for Drug Control, Guangzhou 510663, China

3. Guangdong Engineering & Technology Research Center of Topical Precise Drug Delivery Preparation, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective To prepare salvianolic acid B-snail mucus nanogel (SAB-SM/Gel) and study its related characterization and the osmotic dynamics of *ex vivo* skin. **Methods** Salvianolic acid B-snail mucus nanoparticles (SAB-SM nanoparticles) were prepared by high-pressure homogenization method, and then SAB-SM/Gel was prepared with the gel matrix by stirring. The shape, size, polydispersity index (PDI), ζ potential, etc. of nanoparticles were characterize; The Franz diffusion pool method was used to investigate the transdermal absorption and dermal retention performance of SAB-SM/Gel *in vitro*. **Results** SAB-SM nanoparticles are transparent and homogeneous liquid, with Tyndall effect, spherical or spheroid structure under transmission electron microscope (TEM), uniform size, no adhesion between particles, average particle size of (155.55 ± 2.95) nm, PDI of 0.31 ± 0.01 , average ζ potential of (-15.45 ± 1.67) mV, pH of 6.11 ± 0.12 , encapsulation rate of SAB in SAB-SM nanoparticles is (37.70 ± 1.16) %, and drug load is

收稿日期: 2023-05-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82173982); 广东省自然科学基金资助项目 (2022A1515011382)

作者简介: 姚碧金 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药制剂研究与开发。Tel: 15362945509 E-mail: 2672245967@qq.com

*通信作者: 时 军 (1990—), 男, 博士, 教授, 研究方向为纳米经皮给药系统及瘢痕的中医药防治。E-mail: shijun8008@163.com

徐万帮 (1979—), 男, 博士, 副主任中药师, 研究方向为中药外源性污染与中药标准体系研究。E-mail: wbxu@163.com

(1.78 ± 0.06) mg/mL; SAB-SM/Gel is a colorless transparent liquid at room temperature, round or quasi-circular under TEM, pH of 6.24 ± 0.13 , encapsulation rate of (42.42 ± 1.02) %, SAB loading capacity of (1.44 ± 0.04) mg/mL, average viscosity of 0.02 Pa·s, uniform and delicate texture, which can be quickly gelled applied to the skin, and has good coating performance. The *in vitro* transdermal test showed that the cumulative permeability of SAB in SAB-SM/Gel within 48 h was (188.39 ± 2.89) $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, the dermal retention amount was (17.58 ± 0.04) $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, and the transdermal release process conformed to the Hixson-Crowell equation.

Conclusion SAB-SM/Gel prescription process is reasonable, with good transdermal absorption and dermal retention performance.

Key words: unification of drugs and excipients; snail; mucus; salvianolic acid B; high pressure homogenization method; nanoparticles; gel; transdermal absorption

皮肤衰老包括内源性衰老和外源性衰老。外源性衰老是由于外在环境刺激而加速的皮肤衰老，其中以紫外线照射为主，占 80%，因此，外源性衰老又称为光老化^[1]。紫外线照射皮肤会产生过量的自由基，在皮肤细胞中产生严重的氧化应激，可导致细胞损伤、细胞凋亡、炎症反应，进而造成皮肤松弛、粗糙、皱纹增多、色素异常，甚至诱发鳞状细胞癌等恶性皮肤癌^[2-4]。预防和改善皮肤光老化已成为皮肤问题研究热点，具有重要的社会价值和意义。

丹酚酸 B (salvianolic acid B, SAB) 是丹参中的一种多酚酸类化合物，具有较强的抗氧化性和清除自由基功能，其作用强度优于维生素 E，还兼具抗炎、抑制细胞凋亡等作用^[5]。SAB 通过降低活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的产生、调节抗氧化酶活力、增加沉默信息调节因子 1 (silent information regulator 1, SIRT1) 蛋白表达、抑制炎症因子的产生等多种途径，减少氧化应激损害，保护细胞，发挥抗光老化作用^[6-8]。蜗牛黏液 (snail

mucus, SM) 是从白玉等蜗牛足腺分泌的黏液中过滤萃取的精华物，富含尿囊素、乙醇酸、透明质酸及多酚等活性成分^[9]。尿囊素以脱皮作用促进细胞增殖和伤口愈合；乙醇酸具有极好的渗透皮肤的能力，并能够增加胶原蛋白的合成；透明质酸具有保湿功能；而多酚则抵消与氧化应激有关的损害^[10-12]。SM 已被证明在抗菌、抗炎、抗氧化、抗酪氨酸酶和抗肿瘤等方面具有一定的作用。同时其具有复杂网状结构，是一种天然的载体材料^[13]。本课题组前期通过细胞试验证实，SAB 可能具有抗光老化的潜力^[7]，本研究结合 SM 独特的药理活性和物理特性，运用“药辅合一”理念^[14-15]设计纳米粒。将 SM 作为载体包裹 SAB，制备丹酚酸 B-蜗牛黏液纳米粒 (salvianolic acid B-snail mucus nanoparticles, SAB-SM)，再加入泊洛沙姆制备其纳米凝胶，为丹酚酸 B 抗老化研究提供科学依据。图 1 为丹酚酸 B-蜗牛黏液纳米粒 (salvianolic acid B-snail mucus nanogel, SAB-SM/Gel) 制剂设计思路图。

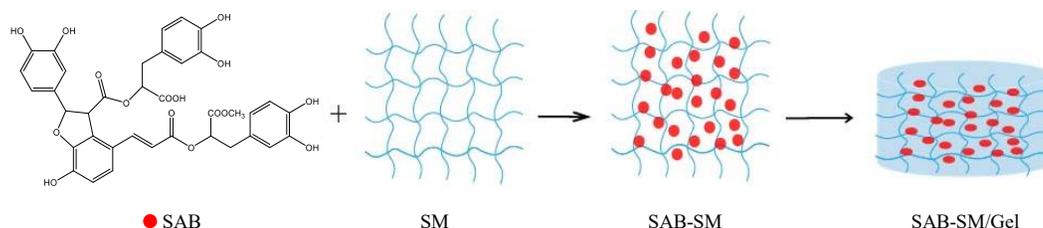


图 1 SAB-SM/Gel 制剂设计思路图

Fig. 1 SAB-SM-Gel preparation design idea diagram

1 仪器与材料

1.1 仪器

Ultimate 3000 型高效液相色谱仪系统，赛默飞世尔科技公司；NS1001L 型高压均质机，意大利 GEA Niro Soavi 公司；Hitachi HT7800 型透射电子显微镜 (TEM)，日立有限公司；Delsa Nano C 型纳米粒度/Zeta 电位分布分析仪，贝克曼库尔特公司；MS-H-Pro+型磁力搅拌器，美国赛洛捷克公司；PHS-25 型电子数显 pH 计，上海雷磁仪器厂；FD-1A-50

型冷冻干燥机，北京博医康实验仪器有限公司；HH-2 型数显恒温水浴锅，常州智博瑞仪器制造有限公司；MX-S 型漩涡混匀器，大龙兴创实验仪器 (北京) 股份公司；BSA124S 型万分之一电子天平、单道可调节移液器 (10、20、50、100、200、1000 μL)，北京赛多利斯仪器系统有限公司；TP-6 型透皮扩散仪，天津市精拓仪器科技有限公司；Tiss-24 型高速组织研磨机，上海净信实业发展有限公司；TGL-16 型台式高速冷冻离心机，湖南湘仪离心机仪器有限

公司。

1.2 材料

丹酚酸 B 对照品, 批号 PS011518, 质量分数 ≥ 98%, 成都普思生物科技股份有限公司; 蜗牛黏液, 批号 210912, 广州雨霖蜗牛有限公司; 蔗糖, 批号 20204112081, 天津市致远化学试剂有限公司; 泊洛沙姆 407 (批号 GND11321B)、泊洛沙姆 188 (批号 GND17422B), 武汉胜天宇生物科技有限公司; 乌来糖, 批号 M25HS183263, 上海源叶生物科技有限公司; 氯化钠, 批号 20220701, 天津市大茂化学试剂厂; SAB-SM 纳米粒, 实验室自制; SAB-SM/Gel, 实验室自制。

1.3 动物

SPF 级健康 SD 雄大鼠, 体质量 200~250 g, 合格证号为 SCXK (粤) 2021-0041; 所有动物实验遵循广东药科大学试验动物伦理委员会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 SAB-SM 纳米粒的制备

采用高压均质法制备 SAB-SM 纳米粒。精密称取适量 SM, 加入 5 mL 去离子水, 搅拌均匀; 称取适量 SAB, 去离子水定容于 1 mL 量瓶中, 在 400 r/min 磁力搅拌条件下, 缓慢匀速加入至蜗牛黏液中, 搅拌 10 min, 采用高压均质机在 70 MPa 压力下均质 10 次, 过 0.22 μm 滤膜, 即得 SAB-SM 纳米粒。

2.2 丹酚酸 B 含量测定

2.2.1 色谱条件 Cosmosil C₁₈-PAQ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液, 梯度洗脱程序: 0~5 min, 32%乙腈; 5~20 min, 42%乙腈; 柱温 30 °C; 体积流量 1.0 mL/min; 进样量 10 μL; 检测波长 286 nm。

2.2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取适量丹酚酸 B 对照品于 1 mL 棕色量瓶中, 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得质量浓度为 1000 μg/mL 和 100 μg/mL 的丹酚酸 B 对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密吸取 SAB-SM 1 mL 于 10 mL 棕色量瓶中, 甲醇稀释至刻度, 超声 20 min, 过 0.22 μm 滤膜, 即得供试品溶液。

2.2.4 空白对照溶液的制备 精密吸取 SM 1 mL 于 10 mL 量瓶中, 甲醇稀释至刻度, 超声 20 min, 过 0.22 μm 滤膜, 即得空白对照溶液。

2.2.5 线性关系考察 制备高质量浓度 (1000

μg/mL) 和低质量浓度 (100 μg/mL) SAB 对照品溶液, 并分别绘制标准曲线。将 2 个质量浓度对照品溶液进行梯度稀释, 分别精密吸取 1、2、4、6、8、10 mL 于 10 mL 的量瓶中, 甲醇稀释至刻度, 摇匀。以“2.2.1”项下色谱条件进行检测, 记录峰面积。以 SAB 峰面积 (*A*) 对其质量浓度 (*C*) 进行线性回归, 得到高质量浓度曲线回归方程为 $A = 0.2109C + 3.5791$ ($R^2 = 0.9997$), 低质量浓度曲线回归方程为 $A = 0.2302C - 0.2209$ ($R^2 = 0.9993$), 结果表明, SAB 在 100~1000 μg/mL 和 10~100 μg/mL 线性关系良好。

2.2.6 专属性考察 精密吸取 SAB、SM、SAB-SM 溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件, 进样测定。结果如图 2 所示, SAB 保留时间为 (6.15 ± 0.20) min, 峰拖尾因子在 0.95~1.05, 理论板数不低于 8000, 表明该方法专属性强, SAB 峰形稳定, 分离度良好, 无其他物质干扰, 符合试验要求。

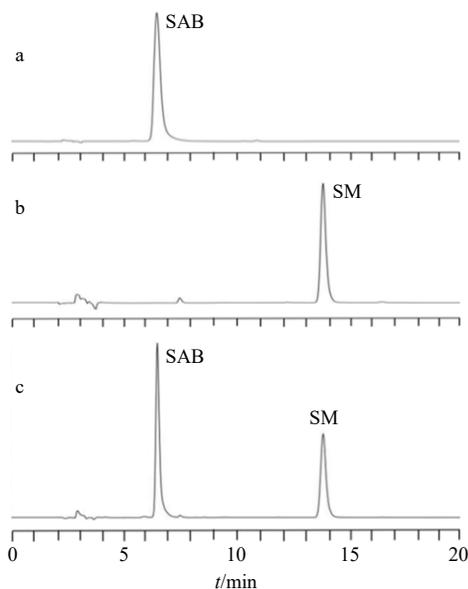


图 2 SAB 对照品溶液 (a)、SM (b) 和 SAB-SM 纳米粒 (c) 的 HPLC 图

Fig. 2 HPLC of SAB reference substance solution (a), SM (b) and SAB-SM nanoparticles (c)

2.2.7 精密度考察 制备 3 种不同质量浓度的 SAB 对照品溶液 (1000、500、100 μg/mL), 连续进样测定 6 次, 计算精密度。RSD 均小于 3%, 说明仪器精密度良好, 符合试验检测要求。

2.2.8 重复性考察 平行制备 6 份供试品溶液, 进样测定。RSD 小于 2%, 表明该实验方法操作误差较小, 方法可行。

2.2.9 稳定性考察 精密吸取供试品溶液 10 μL, 分

别在 0、2、4、6、8、12、24 h 进样，测定 SAB 含量。RSD 小于 3%，说明 SAB 在 24 h 内检测稳定性良好。

2.2.10 加样回收率考察 配制 500 μg/mL 的 SAB-SM 溶液，分别精密加入 SAB-SM 样品中 SAB 含量 50%、100%、150% 的 SAB 对照品溶液，甲醇定容于 5 mL 量瓶中，平行 3 次，进样测定加样回收率。50%、100%、150% SAB 加入量的平均加样回收率分别为 100.47%、99.98%、100.59%，RSD 分别为 1.02%、1.56%、0.74%，均小于 2%，符合试验检测要求。

2.3 SAB-SM 纳米粒的工艺优化及基本性能表征

2.3.1 超滤离心法测定 SAB-SM 包封率

(1) 游离药物加样回收率考察：用去离子水配制 1.03、2.00、3.02 mg/mL 3 种质量浓度的 SAB 溶液，平行 3 次；取 0.5 mL SAB 溶液，分别置于截留相对分子质量 (molecular weight cut off, MWCO) 为 1.0×10^4 、 3.0×10^4 、 5.0×10^4 超滤离心管上层，4000 r/min 离心 (离心半径为 6.4 cm) 30 min，取滤液和滤过前的溶液，加甲醇稀释 1 倍，过 0.22 μm 滤膜，进行 HPLC 测定。结果如表 1 所示，MWCO 1.0×10^4 超滤管平均加样回收率为 $(85.51 \pm 0.33)\%$ ，MWCO 3.0×10^4 超滤管平均加样回收率为 $(95.28 \pm 0.57)\%$ ，MWCO 5.0×10^4 超滤管平均加样回收率为 $(98.87 \pm 0.73)\%$ ，因此，选用 MWCO 5.0×10^4 超滤管进行后续实验。

(2) 超滤加样回收率考察：在空白 SM 溶液中，分别加入上述不同质量浓度的 SAB 对照品溶液，然后转移到 MWCO 5.0×10^4 超滤管上层，平行 3 次。

表 1 游离药物加样回收率考察结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Results of free drug sampling recovery rate ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

超滤管 MWCO	质量浓度/(mg·mL ⁻¹)		平均回 收率/%	RSD/ %
	总 SAB	滤液中 SAB		
1.0×10^4	1.03	0.873 6 ± 0.113 8	84.82	1.21
	2.00	1.717 1 ± 0.022 5	85.86	1.13
	3.02	2.592 4 ± 0.337 3	85.84	1.20
3.0×10^4	1.03	0.971 0 ± 0.018 3	94.28	1.74
	2.00	1.937 0 ± 0.022 2	96.85	1.02
	3.02	2.860 3 ± 0.048 1	94.71	1.67
5.0×10^4	1.03	1.002 5 ± 0.010 5	97.33	0.91
	2.00	1.994 2 ± 0.035 8	99.71	1.58
	3.02	3.008 5 ± 0.065 1	99.62	1.98

SAB 含量测定同上。结果如表 2 所示，低、中、高 3 个质量浓度的平均加样回收率分别为 95.01%、95.67%、96.76%，RSD 分别为 1.18%、1.47%、1.49%，均小于 2%，符合实验要求。

表 2 超滤加样回收率考察结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Results of ultrafiltration sampling recovery rate ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

超滤管 MWCO	质量浓度/(mg·mL ⁻¹)		平均回 收率/%	RSD/ %
	总 SAB	滤液中 SAB		
5.0×10^4	1.03	0.978 6 ± 0.004 0	95.01	1.18
	2.00	1.913 4 ± 0.008 6	95.67	1.47
	3.02	2.922 3 ± 0.009 5	96.76	1.49

(3) 包封率的测定：采用超滤离心法测定 SAB-SM 包封率。取 0.5 mL SAB-SM 于 MWCO 5.0×10^4 超滤管，4000 r/min 离心 30 min，取滤液 (C₁) 和滤过前的溶液 (C₂)，甲醇稀释 10 倍，过 0.22 μm 滤膜，HPLC 测定，代入标准曲线计算 SAB 含量，根据下面公式计算 SAB 的包封率。

$$\text{包封率} = (C_2 - C_1) / C_2$$

C₁ 为 SAB-SM 中未被包封的药量，C₂ 为 SAB-SM 中总药量

2.3.2 蜗牛黏液用量的筛选 分别精密称取 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 g 蜗牛黏液，其余步骤同“2.3.1”，并测定其包封率。结果如表 3 所示，蜗牛黏液为 0.4 g 时，包封率较高。

2.3.3 SAB 用量的筛选 分别精密称取 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mg 的 SAB，其余步骤同“2.3.1”项，并测定其包封率。结果如表 4 所示，SAB 用量为 2.0 mg 时，包封率较高。

表 3 SM 用量对包封率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effects of SM dosage on entrapment efficiency ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

SM 用量/g	SAB 包封率/%	SM 用量/g	SAB 包封率/%
0.1	27.54 ± 0.58	0.4	37.78 ± 0.56
0.2	29.21 ± 1.20	0.5	37.01 ± 0.39
0.3	32.06 ± 0.94		

表 4 SAB 用量对包封率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effects of SAB dosage on entrapment efficiency ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

SAB 用量/mg	SAB 包封率/%	SAB 用量/mg	SAB 包封率/%
0.5	30.58 ± 1.43	2.0	37.76 ± 1.48
1.0	31.56 ± 0.76	2.5	31.98 ± 0.92
1.5	34.04 ± 1.04		

2.3.4 SAB-SM 纳米粒的最优工艺 采用高压均质法制备 SAB-SM 纳米粒。精密称取 0.4 g SM，加入 5 mL 去离子水，搅拌均匀；称取 2 mg SAB，去离子水定容于 1 mL 量瓶中，在 400 r/min 磁力搅拌条件下缓慢匀速加入至蜗牛黏液中，搅拌 10 min，采用高压均质机在 70 MPa 压力下均质 10 次，过 0.22 μm 滤膜，即得 SAB-SM 纳米粒。

2.3.5 SAB-SM 纳米粒的基本性能表征 根据最优工艺制备 SAB-SM，取适量处方优化后的 SAB-SM 观察外观性状，用激光笔照射，观察是否具有丁达尔现象；取适量 SAB-SM 于 10 mL 小烧杯中，利用 pH 计测定其 pH 值；用移液枪吸取适量 SAB-SM 纳米粒滴至铜网上，滴加 2% 磷钨酸溶液进行负染，静置 3~5 min，自然干燥后，利用 TEM 观察其形貌特征；利用马尔文激光粒度仪测定 SAB-SM 的平均粒径、粒度多分散系数 (polydispersity index, PDI) 和 ζ 电位。结果如图 3 所示，SAB-SM 纳米粒为透明均一的液体，激光笔照射可观察到一条明显的光路，表明具有丁达尔效应；pH 值为 6.11 ± 0.12 ；TEM 下呈球状或类球状结构，大小均一，分散均匀，粒子间无黏连现象；SAB-SM 纳米粒的平均粒径为 (155.55 ± 2.95) nm，PDI 为 0.312 ± 0.011 ，平均 ζ 电位为 (-15.45 ± 1.67) mV；SAB 的平均包封率为 (37.70 ± 1.16) %，载药量 (1.78 ± 0.06) mg/mL。

2.4 SAB-SM/Gel 的制备与表征

2.4.1 药物载体的选择 水溶性凝胶常用的基质如泊洛沙姆、卡波姆、透明质酸等天然高分子材料，具有生物降解性和生物相容性，已广泛应用于药物递送系统。卡波姆凝胶常用于弱碱性药物体系，不适于作为酸类活性成分的载体。透明质酸单独作为药物载体时易被酶解，其改性操作复杂，且价格昂贵。泊洛沙姆是一类热敏性高分子聚合物，与其他半固体和液体制剂相比，黏性没那么大、容易清洗、比液体配方停留时间长、更方便使用。综合考虑各基质的材料特性，结合 SAB 特性及凝胶的物理性质，最终选择泊洛沙姆作为药物载体。

2.4.2 SAB-SM/Gel 的制备 采用搅拌法制备 SAB-SM/Gel。取适量 SAB-SM，加入 10% 蔗糖作为冻干保护剂，冷冻干燥 24 h，得 SAB-SM 纳米粒冻干粉；配制一定质量浓度的泊洛沙姆溶液，4 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏过夜，充分溶胀。精密称取适量 SAB-SM 纳米粒冻干粉，加至泊洛沙姆溶液中，搅拌均匀，静置，即得丹酚酸 B-蜗牛黏液纳米凝胶 (SAB-SM/Gel)。

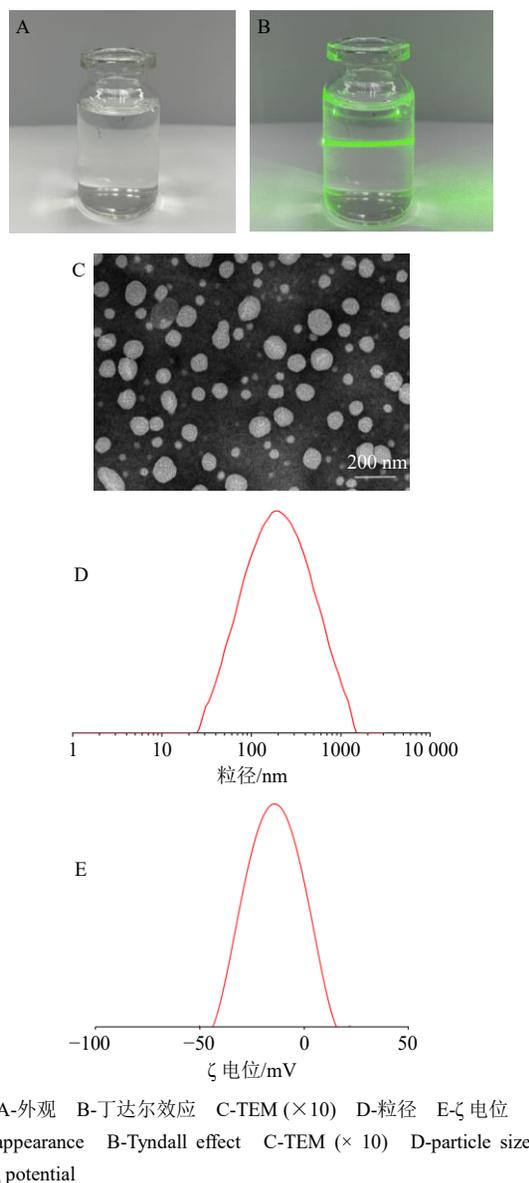


图 3 SAB-SM 相关表征 ($n = 3$)

Fig. 3 Characterizations of SAB-SM ($n = 3$)

2.4.3 凝胶基质的筛选 考察不同浓度泊洛沙姆 407 (P407) 与泊洛沙姆 188 (P188) 的胶凝温度。配置不同浓度的 P407-P188，每组平行 3 次，实时观察并记录其胶凝温度。结果如表 5 所示，以 $\bar{x} \pm s$ 表示胶凝温度。理想状态下，SAB-SM/Gel 纳米凝胶在室温状态下为液体，当涂抹至皮肤后，迅速胶凝，黏附于皮肤表面。当胶凝温度为 30 $^{\circ}\text{C}$ 时，胶凝时间较短，涂抹至皮肤时涂展性良好，质地均匀细腻。结合胶凝温度、胶凝时间及基质性状，最终选择 19% P407-1% P188 作为凝胶基质。

2.4.4 SAB-SM 投料量的考察 考察 SAB-SM 纳米粒冻干粉的加入对基质胶凝温度的影响。不同 SAB-SM 投料量对胶凝温度的影响如表 6 所示，可以发

表5 不同浓度 P407 与 P188 的胶凝温度 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 5 Gelling temperatures of P407 and P188 at different concentrations ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

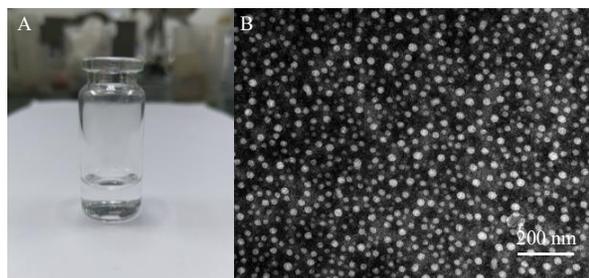
P407/%	胶凝温度/℃		
	1.0% P188	1.5% P188	2.0% P188
18.0	35.2±0.3	37.3±0.2	—
18.5	32.0±0.5	34.2±0.3	37.0±0.5
19.0	30.2±0.3	32.3±0.2	36.0±0.5
19.5	31.0±0.5	32.3±0.2	31.0±0.5
20.0	29.0±0.5	28.7±0.3	31.2±0.3

表6 不同 SAB 投料量的考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 6 Investigation of SAB dosage ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

SAB 投料量/%	胶凝温度/℃
40	30.5±0.5
60	30.2±0.3
80	30.0±0.5

现 SAB-SM 投料量对泊洛沙姆的胶凝温度影响较小, 所制得的 SAB-SM/Gel 均一细腻, 无颗粒感。为尽可能提高处方含药量, 确定 SAB-SM 投料量为 80%。

2.4.5 SAB-SM/Gel 的表征 取适量处方优后制得的 SAB-SM/Gel 于烧杯中, 用 pH 计测定其 pH 值; 取适量 SAB-SM/Gel 观察外观性状; 另取适量 SAB-SM/Gel, 用 2% 的磷钨酸负染, 自然干燥后, TEM 下观察其形态。结果如图 4 所示, SAB-SM/Gel 的 pH 值为 6.24 ± 0.13 , 在常温下为无色透明液体, TEM



A-外观 B-TEM (×10)
A-appearance B-TEM (×10)

图4 SAB-SM/Gel 形态 ($n = 3$)
Fig. 4 SAB-SM/Gel morphology ($n = 3$)

下呈圆形或类圆形, 分布均匀, 可见泊洛沙姆的加入对 SAB-SM 纳米粒结构没有显著影响。SAB-SM/Gel 中 SAB 的包封率为 $(42.42 \pm 1.02)\%$, SAB 载药量 (1.44 ± 0.04) mg/mL。

2.4.6 胶凝温度的测定 采用试管法测定胶凝温度。将 2 mL P407-P188 置于 10 mL 西林瓶内, 西林瓶置于 25 °C 恒温水浴锅中, 每隔一段时间升高 0.5 °C, 待温度稳定后, 将西林瓶倒置, 观察液面是否流动, 液面不再流动时, 为胶凝温度。结果发现, 室温状态下, SAB-SM/Gel 为无色透明液体, 当温度升高至 30 °C, SAB-SM/Gel 快速胶凝, 倒置不流动 (如图 5 所示), 表现出良好的胶凝能力, 符合皮肤给药要求。

2.4.7 SAB-SM/Gel 的黏度考察 取适量 SAB-SM/Gel, 按照黏度测定法用旋转式黏度计测定, 测得平均黏度为 $0.02 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ ($n = 3$)。

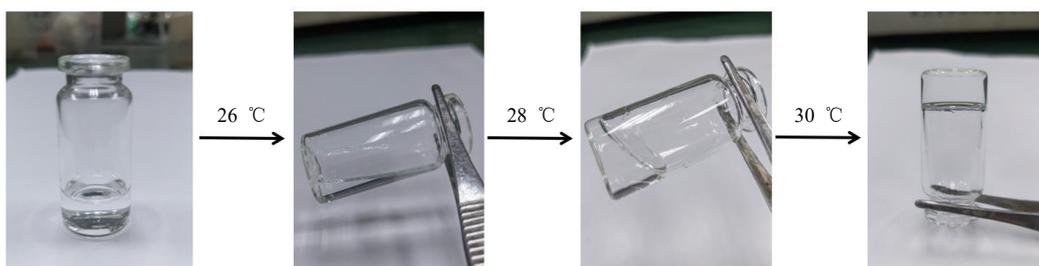


图5 SAB-SM/Gel 在不同温度下的物理状态 ($n = 3$)

Fig. 5 Physical states of SAB-SM/Gel at different temperatures ($n = 3$)

2.4.8 SAB-SM/Gel 的可涂布性能 取适量 SAB-SM/Gel, 涂抹至皮肤, 评价其可涂布性能。SAB-SM/Gel 质地均匀细腻, 涂抹至皮肤能快速胶凝, 可涂布性能良好。

2.5 SAB-SM/Gel 透皮性能研究

选用 Franz 扩散池法考察 SAB-SM/Gel 体外透皮性能和真皮层滞留性能, 计算并拟合药物释放模

型, 探究 SAB-SM/Gel 在皮肤内渗透动力学规律, 为其在药物递送领域的应用提供了理论依据。

2.5.1 体外透皮实验 取 SD 大鼠进行脱毛处理, 处死后剥取腹部皮肤并去除皮下脂肪及黏液组织, 将皮肤固定于 Franz 扩散池的供给室和接收室之间, 角质层朝向供给室, 接收介质溶液为生理盐水, 37 °C、350 r/min 进行试验; 分别在供给室中加入 1

mL 同等质量浓度的 SAB 溶液、SAB-SM 纳米粒和 SAB-SM/Gel, 分别于 0、1、2、4、6、8、10、12、24、30、36、48 h 取样 1 mL, 并补加等温等量接收介质, 保证接收液的液面与皮肤真皮层紧密接触, 没有气泡。将各时间点的样品溶液过 0.22 μm 滤膜, HPLC 法测定 SAB 的质量浓度, 按公式计算单位面积累积透过量 (Q_n)。

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

Q_n 为 n 时间点单位面积累积透过量, C_n 为第 n 个取样点所取样品中药物的质量浓度, C_i 为第 i ($i=n-1$) 个时间点所取样品中药物的质量浓度, V 为接收池体积 (15 mL), V_i 为取样体积, A 为扩散池有效接触面积 (1.766 cm²)

2.5.2 真皮滞留量 透皮试验结束后, 用生理盐水洗净离体皮肤, 剪碎, 加入 1 mL 生理盐水, 制成 10% 皮肤匀浆, 3500 r/min 离心 10 min, 取上清液, 过 0.22 μm 滤膜, HPLC 法测定 SAB 含量, 按公式

计算真皮滞留量 (Q_s)。

$$Q_s = C V / A$$

Q_s 为药物的真皮滞留量, C 为皮肤样品液中药物的质量浓度, V 为皮肤样品液的总体积 (1 mL)

以 t 为横坐标, Q_n 为纵坐标, 绘制 $Q-t$ 曲线并进行模型拟合, 结果见图 6 和表 7。

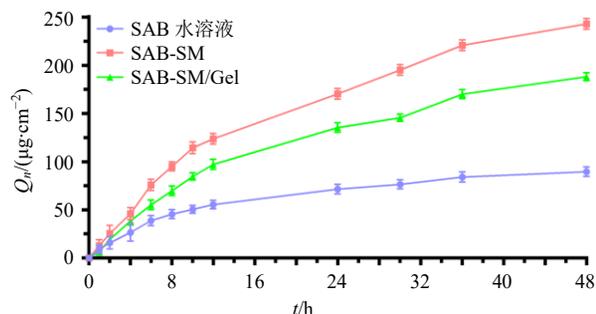


图 6 SAB-SM/Gel 透皮吸收曲线 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 6 Accumulative transdermal absorption curve of SAB-SM/Gel ($\bar{x} \pm s, n=3$)

表 7 SAB-SM/Gel 体外透皮试验结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 7 Results of *in vitro* transdermal experiment of SAB-SM/Gel ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	透皮吸收方程	R^2	皮肤滞留/($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)	累积透皮速率/%
SAB 水溶液	$Q=0.0021t^3-0.1975t^2+6.5789t+2.8880$	0.9936	6.00 ± 0.37	9.51
SAB-SM	$Q=0.0035t^3-0.3509t^2+13.9950t+0.2826$	0.9955	9.77 ± 0.06	24.02
SAB-SM/Gel	$Q=0.0027t^3-0.2730t^2+10.8320t-0.8706$	0.9969	17.58 ± 0.04	18.84

如图 6 所示, SAB-SM/Gel 中 SAB 累积透皮量高于 SAB 水溶液, 表明 SAB-SM/Gel 能提高 SAB 体外透皮性能。SAB-SM 中 SAB 累积释放量最高, 高于 SAB-SM/Gel。这可能是由于凝胶具有良好的药物缓释性, SAB-SM/Gel 中部分 SAB 储存于皮肤真皮层。SAB-SM/Gel 中 SAB 的真皮滞留量为 (17.58 ± 0.04) $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($n=3$), 高于 SAB 溶液、SAB-SM 纳米粒, 表明 SAB-SM/Gel 在可以皮肤真皮层蓄积, 形成药物贮库, 缓慢持续释放药物。

如表 7 所示, SAB-SM/Gel 中 SAB 在 48 h 内 Q_n 为 (188.3903 ± 2.8900) $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($n=3$), $Q=0.0027t^3-0.2730t^2+10.8320t-0.8706$ ($R^2=0.9969$), 透皮释放过程符合 Hixson-Crowell 方程, 释药过程遵循扩散和溶蚀规律, 表明 SAB-SM/Gel 具有一定的缓释作用。

3 讨论

丹酚酸 B 是丹参中含量最高的水溶性成分, 有较好的抗氧化活性, 能够调节细胞氧化应激, 清除细胞内的活性氧, 改善组织细胞损伤, 为天然有效

的自由基清除剂^[16-19]。此外还具有抗炎、改善微循环、增强新陈代谢等作用。研究表明, SAB 具有抑制皮肤光老化的功能^[19-20]。Wang 等^[6]研究发现 SAB 可以抑制 H₂O₂ 诱导大鼠肠上皮细胞的细胞活力下降和细胞凋亡, 改善了 H₂O₂ 诱导的肠上皮屏障功能障碍和线粒体功能障碍, 并不同程度地抑制了 H₂O₂ 诱导的 ROS 产生。然而 SAB 性质不稳定, 在水中极易水解, 对温度比较敏感, 且透皮性能较差, 阻碍了其在皮肤制剂领域中的应用。

蜗牛黏液是一种有吸引力的天然物质, 由于其润肤、保湿、保护和修复性能, 越来越多地用于药物和化妆品中。SM 已被证明在抗氧化、抗菌、抗病毒和免疫调节等方面发挥重要作用^[21]。SM 不仅可以治疗黑色素生成, 而且具有抗人黑色素瘤细胞的肿瘤活性。SM 刺激胶原蛋白, 弹性蛋白和真皮成分的形成, 修复光老化的迹象, 并最大限度地减少自由基产生的损伤^[22]。在壳聚糖基和纤维素基薄膜中添加 SM, 显著改善了其水分屏障和生物粘附性能、薄膜伸长率、黏附强度和紫外线屏蔽效果^[23]。

纳米凝胶是具有高度交联结构的多孔的三维网状系统, 尺寸在 10~1000 nm^[24]。纳米凝胶结合了水凝胶和纳米粒的特性, 具有一定的黏附性, 避免了纳米粒的皮肤滞留效果不佳的情况; 保护不稳定性药物, 避免药物受外界因素影响而被破坏^[25]; 具有较高的载药量; 并具有生物相容性和生物可降解性^[26]。此外, 多项研究证明, 纳米凝胶具有优良的缓释性能, 有利于在真皮层形成药物贮库, 提高生物利用度。因此, 其在药物载体方面具有广阔的应用前景。

本研究基于“药辅合一”这一中药复方制剂中的重要指导原则, 将 SM 与 SAB 制成纳米凝胶, 既发挥 SAB 和 SM 的抗氧化、抗炎的药理作用, 又利用 SM 良好的保湿性、润肤性及其复杂网状结构, 发挥药物载体作用。本实验结果表明, SAB-SM/Gel 制备方法简单, 具有良好的缓释性能, 且药物真皮滞留性能良好, 可提高患者顺应性, 后续试验将深入研究 SAB-SM/Gel 抗光老化效果及作用机制, 为丹参抗光老化研究提供科学依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Cui B N, Wang Y, Jin J H, *et al.* Resveratrol treats UVB-induced photoaging by anti-MMP expression, through anti-inflammatory, antioxidant, and antiapoptotic properties, and treats photoaging by upregulating VEGF-B expression [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 6037303.
- [2] 罗珍, 宁初光, 李祚祺, 等. 番茄、野樱莓提取物抗光老化功效及机制研究 [J]. *食品工业科技*, 2023, 44(16): 395-402.
- [3] 孔翔, 徐开颜, 吴芷菁, 等. 小细胞外囊泡在皮肤光老化等皮肤疾病中的作用及机制研究进展 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2023, 45(2): 334-344.
- [4] 陈诚, 肖洁银, 余梦. 强脉冲光联合超脉冲点阵 CO₂ 激光治疗皮肤光老化的有效性及安全性分析 [J]. *中国美容医学*, 2022, 31(7): 1-4.
- [5] 王瑞醒, 谢毅鹏, 王车礼. 丹酚酸 B 杂化纳米花的合成与体外抗氧化活性研究 [J]. *化工新型材料*, 2023, 51(4): 238-242.
- [6] Wang D, Lu X N, Wang E B, *et al.* Salvianolic acid B attenuates oxidative stress-induced injuries in enterocytes by activating Akt/GSK3 β signaling and preserving mitochondrial function [J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 909: 174408.
- [7] 罗玺. 丹酚酸 B 抗光老化作用及其纳米凝胶制备考察 [D]. 广州: 广东药科大学, 2023.
- [8] Lou Y T, Wang C G, Zheng W H, *et al.* Salvianolic acid B inhibits IL-1 β -induced inflammatory cytokine production in human osteoarthritis chondrocytes and has a protective effect in a mouse osteoarthritis model [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 46: 31-37.
- [9] Noothuan N, Apitanyasai K, Panha S, *et al.* Snail mucus from the mantle and foot of two land snails, *Lissachatina fulica* and *Hemiplecta distincta*, exhibits different protein profile and biological activity [J]. *BMC Res Notes*, 2021, 14(1): 138.
- [10] Mane P C, Sayyed S A R, Kadam D D, *et al.* Terrestrial snail-mucus mediated green synthesis of silver nanoparticles and *in vitro* investigations on their antimicrobial and anticancer activities [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 13068.
- [11] Messina L, Bruno F, Licata P, *et al.* Snail mucus filtrate reduces inflammation in canine progenitor epidermal keratinocytes (CPEK) [J]. *Animals*, 2022, 12(14): 1848.
- [12] Cilia G, Fratini F. Antimicrobial properties of terrestrial snail and slug mucus [J]. *J Complement Integr Med*, 2018, doi: 10.1515/jcim-2017-0168.
- [13] 郭思旖, 陈桂添, 时军, 等. 丹酚酸-蜗牛黏液纳米凝胶理化性质考察及抗兔耳增生性瘢痕作用研究 [J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(22): 4857-4863.
- [14] 邱菁, 徐纯艺, 周玮玲, 等. 基于“药辅合一”理念的当归精油纳米乳递药系统的构建、表征及评价 [J]. *中草药*, 2023, 54(6): 1783-1792.
- [15] 彭磊, 封亮, 杨艳君, 等. 基于“药辅合一”理念的 Pickering 乳技术提升儿科用药羚珠散中石菖蒲挥发油热稳定性的研究 [J]. *中草药*, 2023, 54(2): 544-552.
- [16] 何珊, 付先军, 张玲, 等. 响应面法优化丹参有效成分的提取工艺及其体外抗氧化活性研究 [J]. *中华中医药学刊*, 2021, 39(1): 28-32.
- [17] 王怡, 高秀梅, 邢永发, 等. 丹酚酸 B、丹参酮治疗心血管疾病的药理学研究进展 [J]. *上海中医药杂志*, 2010, 44(7): 82-87.
- [18] Wang D, Lu X N, Wang E B, *et al.* Salvianolic acid B attenuates oxidative stress-induced injuries in enterocytes by activating Akt/GSK3 β signaling and preserving mitochondrial function [J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 909: 174408.
- [19] 廖泳, 陈驹. 丹酚酸 B 乳剂抗小鼠皮肤光老化的效果评价 [J]. *中国皮肤性病学杂志*, 2017, 31(10): 1073-1076.
- [20] 王璐, 李中平, 曹艳亚, 等. 沙参麦冬汤对皮肤光老化模型小鼠的保护作用 [J]. *中国老年学杂志*, 2015, 35(6): 1628-1631.

- [21] Song Y M, Cui Y X, Hao L M, *et al.* Wound-healing activity of glycoproteins from white jade snail (*Achatina fulica*) on experimentally burned mice [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 175: 313-321.
- [22] Ellijimi C, Ben Hammouda M, Othman H, *et al.* *Helix aspersa* maxima mucus exhibits antimelanogenic and antitumoral effects against melanoma cells [J]. *Biomedecine Pharmacother*, 2018, 101: 871-880.
- [23] di Filippo M F, Albertini B, Dolci L S, *et al.* Novel drug-loaded film forming patch based on gelatin and snail slime [J]. *Int J Pharm*, 2021, 598: 120408.
- [24] Qureshi M A, Khatoon F. Different types of smart nanogel for targeted delivery [J]. *J Sci*, 2019, 4(2): 201-212.
- [25] 杨雪华, 李大伟, 毛楷凡, 等. 纳米凝胶的研究进展 [J]. *食品与药品*, 2022, 24(2): 183-187.
- [26] Neamtu I, Rusu A G, Diaconu A, *et al.* Basic concepts and recent advances in nanogels as carriers for medical applications [J]. *Drug Deliv*, 2017, 24(1): 539-557.

[责任编辑 郑礼胜]