

蛇床子挥发油纳米粒在双骨架复合凝胶基质中的稳定性及其对积雪草总苷透黏膜吸收的影响

赵宁¹, 王军栋², 关丽¹, 张育珍¹, 付丽娜¹, 李伟泽^{1*}, 杨黎彬¹

1. 西安医学院, 陕西 西安 710021

2. 山东省烟台市食品药品检验检测中心, 山东 烟台 264000

摘要:目的 考察复方葡配甘露聚糖水凝胶(专利号:ZL202010787982.9)处方中蛇床子挥发油纳米粒(*Cnidii Fructus* volatile oil nano-particulates, CVOP)在双骨架复合凝胶基质中的稳定性,以及CVOP对方中积雪草总苷透黏膜吸收的影响。方法通过冷冻电子显微镜(cryo-electron microscopy, Cryo-EM)、扫描电子显微镜(SEM)、透射电子显微镜(TEM)对凝胶基质结构以及其中的CVOP进行观察,以CVOP的外观形态、粒径为评价指标,结合GS-MS法,以CVOP的组成成分谱图及含量变化为判断依据,评价CVOP的稳定性;采用体外透黏膜试验考察CVOP对方中积雪草总苷透阴道黏膜吸收的影响。**结果** 蛇床子挥发油(*Cnidii Fructus* volatile oil, CO)在双骨架复合凝胶基质中能够形成圆整的球形粒子结构,平均粒径为(185±26) nm; CVOP在凝胶基质中稳定性良好,6个月加速试验后其形态结构、粒径与组成成分基本不变; CVOP对大鼠阴道黏膜不产生刺激性;在不含CVOP的空白水凝胶(B)中,积雪草苷(asiaticoside, AS)和羟基积雪草苷(madecassoside, MAS)的黏膜渗透性始终低于含有CVOP的水凝胶(A)组;在6.0h时,水凝胶A中AS和MAS的累积渗透量分别是水凝胶B中AS和MAS的4.68倍与2.01倍,表明CVOP能够提高水溶性积雪草总苷的阴道黏膜渗透性。**结论** CO在双骨架复合凝胶基质中能够形成稳定的球形纳米粒,并可提高积雪草总苷的黏膜渗透性而有利于发挥多成分间的协同治疗作用。

关键词: 双骨架复合凝胶; 蛇床子挥发油; 纳米粒; 积雪草总苷; 黏膜渗透性; 积雪草苷; 羟基积雪草苷

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)15-5061-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.15.006

Stability of *Cnidii Fructus* volatile oil nano-particulates in double skeleton composite hydrogel matrix and its effects on transmucosal absorption of asiaticosides

ZHAO Ning¹, WANG Jundong², GUAN Li¹, ZHANG Yuzhen¹, FU Lina¹, LI Weize¹, YANG Libin¹

1. Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China

2. Yantai Food and Drug Testing Center, Yantai 264000, China

Abstract: Objective To investigate the stability of Shechuangzi (*Cnidii Fructus*) volatile oil nano-particulates (CVOP) in the double skeleton composite hydrogel matrix and the effect of CVOP on the transmucosal absorption of Jixuecao Zonggan (*Centella Total Glucosides*) in the prescription of compound glucomannan hydrogel (ZL.202010787982.9). **Methods** The structure of the hydrogel matrix and the CVOP in the double skeleton composite hydrogel matrix were observed by cryo-electron microscopy (Cryo-EM), scanning electron microscope (SEM) and transmission electron microscope (TEM). The appearance and particle size of CVOP were used as evaluation indexes, and the stability of CVOP was evaluated by combining with the GS-MS method based on the spectrogram of the components and content change of CVOP. The effect of CVOP on the transvaginal mucosal absorption of *Centella Total Glucosides* in the prescription was investigated by *in vitro* transmucosal test. **Results** The *Cnidii Fructus* volatile oil (CO) could form a spherical nano-particulates with round appearance in the double skeleton composite hydrogel matrix, and the CVOP with an average

收稿日期: 2024-02-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(82004075); 陕西省教育厅项目(23JP154); 西安医学院科研能力提升计划项目(2022NLTS059); 西安医学院科研能力提升计划项目(2022NLTS062); 江苏省扬中市“江雁计划”产业领军人才项目([2021]26号)

作者简介: 赵宁(1984—),女,硕士,副教授,从事中药新制剂、新剂型及新技术的研究与应用。

Tel: 18629409280 E-mail: zhaoning-happy@163.com

*通信作者: 李伟泽,博士,教授,从事中药新制剂、新剂型及新技术的研究与应用。Tel: (029)86177546 E-mail: weizeli@126.com

size of (185 ± 26) nm. The CVOP had good stability in the hydrogel matrix, and its morphology, particle size and composition were basically unchanged after six months of accelerated test, and it did not cause irritation to the rat vaginal mucosa. In the hydrogel without CVOP (B), the mucosal permeability of asiaticoside (AS) and madecassoside (MAS) was always lower than that of the hydrogel containing CVOP (A). At 6.0 h, the cumulative permeability of AS and MAS in hydrogel A was 4.68 times and 2.01 times of AS and MAS in hydrogel B, respectively. It was shown that CVOP could improve the vaginal mucosal permeability of water-soluble *Centella Total Glucosides*. **Conclusion** The CO could form stable spherical nano-particulates in the double skeleton composite hydrogel matrix, and the CVOP could exert synergistic therapeutic effects of the multi-components by promoting the mucosal permeability of *Centella Total Glucosides*.

Key words: double skeleton composite hydrogel; *Cnidii Fructus* volatile oil; nano-particulates; *Centella Total Glucosides*; mucosal permeability; asiaticoside; madecassoside

阴道给药系统具有如下优点：可避免口服给药的首过效应和生物利用度低的问题；药物直达病灶而局部靶向作用强，可避免由于全身吸收导致的不良反应；可避免药物对胃肠道的刺激与加重肝肾负担；具有将药物传递到子宫循环系统的第一子宫传递效应；使用便捷，患者依从性高；因此，阴道给药已成为治疗妇科疾病的重要手段^[1-2]。

压力性尿失禁 (stress urinary incontinence, SUI) 又称漏尿，是由于妊娠生产与高龄衰老导致盆底和尿道周围结缔组织中胶原蛋白表达减少而引起尿道闭合与自禁功能减弱所致的局部性疾病^[3-4]，因此，阴道给药是靶向治疗 SUI 的理想方法。复方葡配甘露聚糖水凝胶是一款以蛇床子挥发油 (*Cnidii Fructus volatile oil*, CO)、积雪草总苷和葡配甘露聚糖 (中药白及 *Bletillae Rhizoma* 的主要药效成分) 配伍而成的组方中药制剂 (专利号: ZL202010787982.9)，其通过阴道给药后促进女性泌尿生殖系统的内源性自体胶原蛋白表达而对 SUI 发挥靶向治疗作用^[5]。

挥发油是一类药理活性显著的药效成分^[6]，但其不溶于水、易挥发、易氧化变质而稳定性较低。目前，在实践中常将挥发油类制成乳剂、微乳、纳米乳或胶束等水性制剂的形式应用，但各类乳剂或胶束均需要一定量的乳化剂才能成型，而乳化剂则对于机体黏膜具有一定的刺激性，特别是频繁给药后刺激性加重。也可将其制成脂质体或包合物，但载药量较低且成型工艺复杂而难于工业化推广^[7]。因此，适宜的药物递送载体对挥发油类的开发与应用具有十分重要的作用。

CO 是复方葡配甘露聚糖水凝胶的主要药效成分之一。该凝胶剂制备成型过程中，在不使用乳化剂的条件下，CO 可均匀分散在流变学性质良好的葡配甘露聚糖-卡波姆形成的双骨架复合凝胶基质

中而稳定存在。但是，CO 在其中的存在形态与稳定性尚不清楚，以及其对处方中水溶性积雪草总苷的黏膜渗透性是否存在影响也不清楚。因此，本实验考察了 CO 在葡配甘露聚糖-卡波姆双骨架复合凝胶基质中的存在形态、形成原理、稳定性及其对积雪草总苷透阴道黏膜吸收的影响，以期 SUI 的靶向治疗提供一种新型高效的阴道给药水凝胶制剂。

1 仪器与材料

1.1 主要仪器

JEM-2100 Plus 型透射电子显微镜 (TEM) 与 JEM-Z200FSC 型冷冻电子显微镜 (Cryo-electron microscopy, Cryo-EM)，日本电子株式会社；Hitachi-3500 型扫描电子显微镜 (SEM)，日本日立公司；Agilent-1260 型高效液相色谱仪与 7890A-5975C 型气质联用色谱 (GC-MS) 仪，美国安捷伦公司；Labonice-120CGS 型药品稳定性试验箱，北京兰贝石恒温技术有限公司；Franz 立式扩散池 (7 mL)，容积为 10 mL，有效扩散面积为 1.77 cm²，上海玉研科学仪器有限公司。

1.2 试剂与动物

对照品积雪草苷 (asiaticoside, AS, 批号 DSTDJ001601) 和羟基积雪草苷 (madecassoside, MAS, 批号 DST230330-032)，质量分数均 ≥ 98%，成都德思特生物技术有限公司；积雪草总苷，批号 YTC2209063，质量分数 ≥ 85%，桂林益天成生物技术有限公司；CO，水蒸气蒸馏法自制；卡波姆-934，质量分数 ≥ 99%，武汉卡诺斯科技有限公司；葡配甘露聚糖，质量分数 ≥ 98%，西安格林生物科技有限公司；甘油，质量分数 ≥ 99%，国药控股星鲨制药有限公司；醋酸氯己定，质量分数 ≥ 98%，湖北艺康源化工有限公司；其他试剂均为分析纯。

SPF 级雌性 SD 大鼠，体质量 200~250 g，购自中国食品药品检定研究院，许可证号 SCXK (京)

2017-0005, 批号 111251210100065347。动物饲养于动物屏障 SPF 环境系统, 温度 20~25 °C, 相对湿度 40%~70%, 通风次数为 15 次/h 全新风, 光照为 12 h 明/暗。动物实验经西安医学院医学伦理委员会批准, 批准号 XYLS2022194; 猪阴道黏膜组织, 西安市屠宰场。

2 方法与结果

2.1 积雪草总苷中 AS 和 MAS 的测定^[8]

采用 HPLC 法测定 AS 和 MAS 的质量浓度。

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 C₁₈ 柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水, 洗脱程序: 0~10 min, 20%~26%乙腈; 10~20 min, 26%~35%乙腈; 检测波长 204 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 进样量 20 μL; 色谱图见图 1。

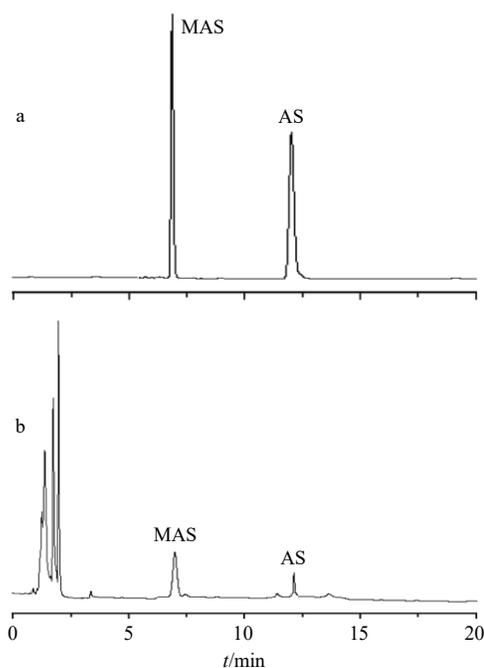


图 1 混合对照品溶液 (a) 和积雪草总苷样品溶液 (b) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of mixed reference substances solution (a) and *Centella Total Glucosides* sample solution (b)

2.1.2 混合对照品溶液的配制 分别精密称取 AS 和 MAS 对照品适量, 用甲醇溶解制成质量浓度均为 200 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.1.3 线性关系考察 分别精密吸取上述对照品溶液适量, 超纯水稀释定容, 得到 AS 和 MAS 质量浓度均依次为 3.00、10.00、20.00、30.00、50.00、100.00 μg/mL 对照品溶液, 取各质量浓度对照品溶液 20 μL, 注入 HPLC 中测定峰面积, 分别以 AS、MAS 的峰面积为纵坐标 (Y)、质量浓度为横坐标 (X),

进行线性回归, 得到 AS 的标准曲线回归方程为 $Y=3.2409X+0.6116$, $r=0.9997$, MAS 的标准曲线回归方程为 $Y=4.9074X-24.3686$, $r=0.9996$, 二者线性范围均为 3.00~100.00 μg/mL。

2.1.4 精密度考察 精密吸取 50 μg/mL 的混合对照品溶液 20 μL, 连续进样 6 次, 按“2.1.1”项下色谱条件进行检测, AS 和 MAS 峰面积的 RSD 分别为 1.1%和 1.05%。

2.1.5 稳定性考察 取复方葡配甘露聚糖水凝胶体外透黏膜 4 h 时的接收液, 室温下放置, 分别在 0、2、4、6、12 h 取 20 μL, 按照“2.1.1”项下色谱条件进行检测, AS 和 MAS 峰面积的 RSD 分别为 1.67%和 1.28%。

2.1.6 重复性考察 取复方葡配甘露聚糖水凝胶透黏膜 4 h 时的接收液 0.2 mL, 平行取 6 份, 样品经 0.45 μm 滤膜滤过后取 20 μL, 按照“2.1.1”项下色谱条件进行检测, AS 和 MAS 质量浓度的 RSD 分别为 0.86%和 1.43%。

2.1.7 加样回收率考察 精密取 4 h 时的接收液 400 μL, 分别加入 200 μg/mL 的 AS 和 MAS 混合对照品溶液 320、400、480 μL, 振摇使其均匀, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过后, 精密吸取 20 μL, 按“2.1.1”项下色谱条件进行测定, 结果显示, AS 的平均加样回收率为 95.61%, RSD 为 2.50%; MAS 的平均加样回收率为 101.73%, RSD 为 1.52%。

2.2 水凝胶的制备

复方葡配甘露聚糖水凝胶 (A): 量取加热煮沸的纯化水 600 mL, 趁热加入积雪草总苷 12.5 g, 搅拌至溶解, 再加入葡配甘露聚糖 29.5 g, 边加边搅拌至聚糖充分溶解, 得到聚糖相, 备用; 量取纯化水 280 mL, 加入 3.5 g 卡波姆-934, 边加边搅拌使卡波姆分散均匀, 得到卡波姆相, 备用; 称取 0.55 g 醋酸氯己定加入 50 g 甘油中, 于 65 °C 加热使其溶解, 得到甘油相, 备用; 聚糖相与卡波姆相混合后将甘油相加入其中并混匀, 再加入 3.0 g CO, 搅拌至挥发油分散均匀且混合体系表面无油滴, 最后加入 4.05 g 三乙醇胺, 搅拌至均匀并调节体系 pH 值至 6.0, 即得。空白水凝胶 (B): 除了不加 CO 外, 其余操作同上。

2.3 CO 纳米粒 (CO nano-particulates, CVOP) 在双骨架复合凝胶基质中的形态与性能表征

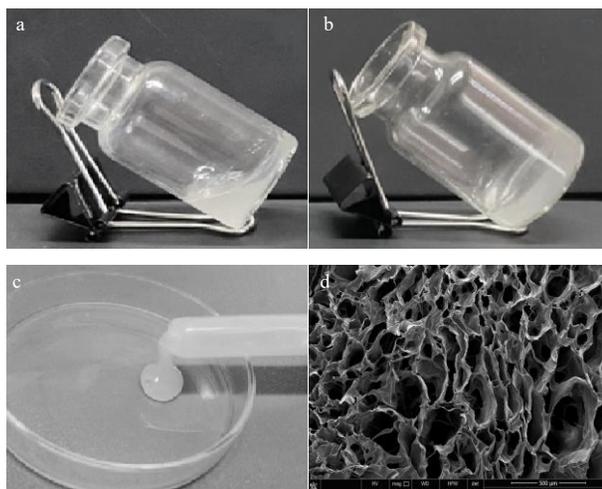
取水凝胶 A 样品适量置于铜载网上, 用 1.5% 磷钨酸负染色, 自然晾干, 用 TEM 进行外观形态观

察。另取水凝胶 A 样品适量铺展在铜网上，放入液氮中快速冷冻，再用 Cryo-EM 进行观察。同时，考察水凝胶 A 样品的流变学特征，并用 SEM 观察其基质结构。

2.3.1 双骨架复合凝胶基质的表征 结果如图 2 所示，由于葡配甘露聚糖是中药白及的主要药效成分，是一种“药辅合一”的水溶性高分子多糖，在给药系统方面有着广泛的应用前景^[9-10]。然而，单一的葡配甘露聚糖形成的凝胶基质具有流动性（图 2-a），包载 CO 后，在存放过程中易发生油水分层与从医用包装管中泄漏。当加入卡波姆-934 后，由于葡配甘露聚糖（含有大量-OH）与卡波姆（含有大量-COOH）均为水溶性长链分子，二者可通过分子间相互作用发生缔合、纠缠而形成具有网状空间结构的双骨架复合水凝胶基质（图 2-d），表明葡配甘露聚糖与卡波姆之间相容性良好。这种三维网状结构不仅利于凝胶剂包载药物，也利于凝胶剂能够耐受体液稀释而保持与机体黏膜的黏附作用^[11]，从而提高局部治疗效果。如图 2-b、c 所示，半透明状的葡配甘露聚糖-卡波姆双骨架复合凝胶基质的流变学性质良好，能够耐受蠕变而避免凝胶从包装管中发生泄漏，因此，便于工业化生产线的灌封与使用过程的推注。

2.3.2 CVOP 在水凝胶中的形态及表征 结果如图 3 所示，在不使用乳化剂的条件下，CO 在葡配甘露

聚糖-卡波姆双骨架复合凝胶基质中能够形成外观圆整的球形粒子，其平均粒径为 (185 ± 26) nm，符合纳米微粒制剂的范畴^[12-14]，并根据《中国药典》2020 年版四部微粒制剂指导原则（9014）的相关定义，可将其称为蛇床子挥发油纳米粒（CVOP）。

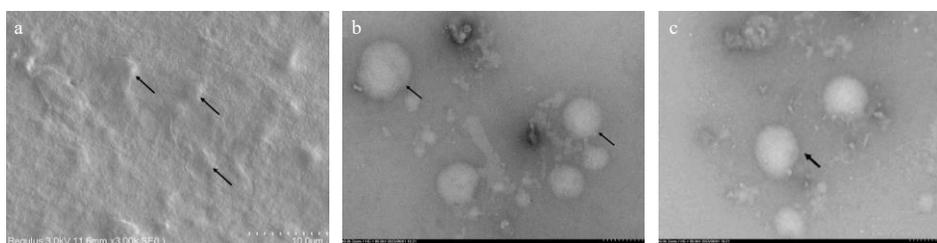


a-葡配甘露聚糖水凝胶的流变行为；b-双骨架复合水凝胶的流变行为；c-双骨架复合水凝胶的注射性能；d-双骨架复合水凝胶的 SEM 图。

a-rheological behavior of glucomannan gel; b-rheological behavior of double skeleton composite hydrogel; c-injection properties of double skeleton composite hydrogel; d-SEM diagram of double skeleton composite hydrogel.

图 2 水凝胶的流变性

Fig. 2 Rheological properties of hydrogels



a-搅拌时间 30 min (Cryo-EM 图)；b-搅拌时间 30 min (TEM 图)；c-搅拌时间 60 min (TEM 图)。

a-stirring time 30 min (Cryo-EM diagram); b-stirring time 30 min (TEM diagram); c-stirring time 60 min (TEM diagram).

图 3 双骨架复合凝胶基质中的 CVOP 电镜图

Fig. 3 Electron microscope diagrams of CVOP in double skeleton composite hydrogel matrix

CVOP 的成型机制可能是，在加入三乙醇胺调节体系 pH 值前，葡配甘露聚糖与卡波姆混合液的黏稠度不高、内聚力较小，且二者与 CO 间的亲和性较高，因此，挥发油可在搅拌器内以纳米微粒形式均匀分散于水相中而被葡配甘露聚糖与卡波姆高分子吸附、包埋。理论上，挥发油的分散过程会在一定程度上随着搅拌强度增大和时间延长而加快，但是，搅拌强度增大后易于引入难以除掉的气泡而

影响成品质量，因此，生产过程中搅拌器的搅拌速度设定为恒速（100 r/min）。此外，搅拌 30 min 即可使挥发油在水相中分散均匀，再继续延长则对挥发油的分散与纳米粒的成型不产生显著影响（图 3-c）。之后，随着三乙醇胺的加入，卡波姆分子链充分伸展，并与葡配甘露聚糖分子发生缔合、纠缠而使双骨架复合凝胶基质形成与体系黏稠度增大，从而在 CVOP 的周围形成机械性凝胶膜屏障

(图3, 黑色箭头) 并降低纳米粒的表面自由能, 增加 CVOP 的稳定性。

2.4 CVOP 的稳定性考察

取水凝胶 A 样品适量, 市售包装, 置于药品稳定性试验箱中, 在温度 (40±2) °C、相对湿度 (75±5)% 的条件下放置 6 个月, 于第 6 个月, 采用 TEM 观察 CVOP 的外观形态, 通过 GC-MS 测定 CVOP 的组成成分, 并与第 0 天的样品进行对照。

2.4.1 CVOP 的外观形态变化 结果如图 4 所示, 在加速试验条件下放置 6 个月 (180 d) 后, CVOP 在葡配甘露聚糖-卡波姆双骨架复合凝胶基质中依然呈外观圆整的球形粒子, 其平均粒径为 (188±28) nm。CVOP 的外观形态与粒子大小和加速试验前比较没有显著性变化。

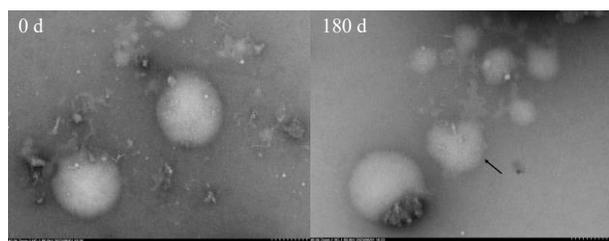


图 4 加速试验前后 CVOP 的 TEM 图

Fig. 4 TEM images of CVOP after accelerated test

2.4.2 GC-MS 测定 CVOP 的组成成分^[15-17]

(1) GC 条件: 色谱柱为 HP-5MS 柱 (30.0 m×250 μm, 0.25 μm); 色谱柱起始温度 50 °C 保持 6 min, 以 10 °C/min 的速率升至 250 °C 保持 10 min; 气化室温度 250 °C; 传输线温度 260 °C; 载气 He; 载气体积流量 1 mL/min; 分流比 10:1, 进样量 1 μL。

(2) MS 条件: EI 源; 电子能量 70 eV; 离子源温度 230 °C; 四极杆 150 °C; 扫描模式为 Scan; 扫描质量范围为 m/z 20~500。

(3) GC-MS 分析结果: 取水凝胶 A 样品适量, 加入到 5 mL 石油醚中, 超声处理 45 min, 将石油醚提取液通过 0.22 μm 有机系滤膜后, 取 1 μL 注入气质联用色谱仪进行测定。结果显示, 在加速试验条件下放置 6 个月 (180 d) 后, CVOP 中挥发油的 GC-MS 谱图在加速试验前后, 所得谱图相似性较高, 特征峰基本没有明显变化^[17] (图 5)。对稳定性试验前后 CVOP 中 36 种主要成分相对含量进行比较, 结果 (表 1) 显示, CO 中 α-蒎烯、蒎烯、β-月桂烯、D-柠檬烯、α-愈创木烯、乙酸异龙脑酯、α-松油烯等主要成分相对含量未见明显变化。综上, 葡配甘露聚糖-卡波姆双骨架复合凝胶基质通过吸附

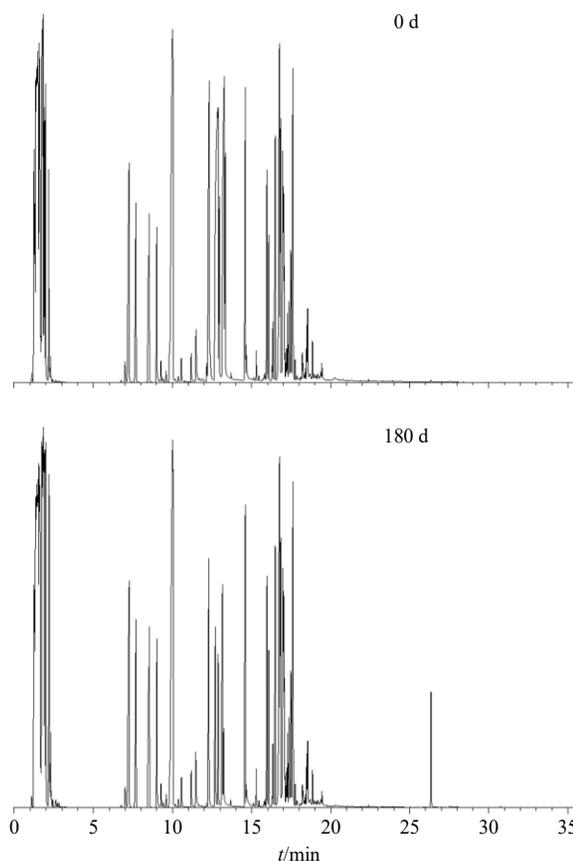


图 5 加速试验前后 CVOP 的 GC-MS 总离子流图

Fig. 5 GC-MS total ion flow diagrams of CVOP after accelerated test

包埋在 CVOP 的周围, 形成凝胶膜屏障利于提高 CVOP 的物理稳定性, 也隔绝了 CO 与外界不稳定因素接触从而提高其化学稳定性, 为其药效的发挥提供了保障。

2.5 CVOP 的黏膜刺激性考察

将雌性 SD 大鼠^[18-19]随机分为 CO 组、CVOP 组即水凝胶 A 组、水凝胶 B 组和对照组, 每组 6 只。CO 组、CVOP 组与水凝胶 B 组, 根据人体临床用药量 (3.5 g/d) 按照动物体质量折算, 大鼠给药剂量 0.437 g/kg, 1 d 给药 1 次, 连续给药 7 d 后, 处死动物, 解剖得到阴道组织并进行组织学检查, 对照组不作任何处理。由图 6 可知, 对照组大鼠阴道组织结构清晰, 未见坏死脱落, 黏膜上皮层细胞排列紧密有序, 固有层胶原丰富、排列紧密, 可见少量的炎性细胞散在浸润 (黑色箭头), 为周期性变化中的正常生理现象。

CO 组则可见较多炎性细胞散在浸润, 包括中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞 (黑色箭头), 与对照组比较, 显示有轻度的炎症反应, 表明单独的 CO

表 1 加速试验前后 CVOP 中主要成分相对含量变化

Table 1 Relative content changes of main components in CVOP after accelerated test

编号	<i>t_R</i> / min	化合物名称	相对分 子质量	相对含量/%	
				0 d	180 d
1	1.25	戊烷 (pentane)	72.09	2.13	2.05
2	1.30	2,2-二甲基丁烷 (2,2-dimethyl-butane)	86.11	1.26	1.73
3	1.45	<i>n</i> -己烷 (<i>n</i> -hexane)	86.11	2.95	2.85
4	1.82	3-甲基己烷 (3-methyl-hexane)	100.12	3.23	2.85
5	1.97	庚烷 (heptane)	100.12	1.35	2.40
6	2.18	甲基环己烷 (methyl-cyclohexane)	98.11	2.12	2.40
7	2.28	乙基环戊烷 (ethyl-cyclopentane)	98.11	0.33	0.36
8	7.00	4-甲基-1(异丙基)-双环[3.1.0]己二烯 {bicyclo[3.1.0]hex-2-ene,4-methyl-1-(1-methylethyl)-}	136.12	0.26	0.29
9	7.26	α -蒎烯 (α -pinene)	136.12	3.29	3.58
10	7.68	蒎烯 (camphene)	136.12	1.84	2.02
11	8.53	β -蒎烯 (β -pinene)	136.12	1.14	1.17
12	9.01	β -月桂烯 (β -myrcene)	136.12	1.30	1.52
13	9.27	α -水芹烯 (α -phellandrene)	136.12	0.18	0.21
14	9.41	3-萜烯 (3-carene)	136.12	0.04	0.05
15	9.59	(+)-2-萜烯 [(+)-2-carene]	136.12	0.11	0.13
16	10.00	<i>D</i> -柠檬烯 (<i>D</i> -limonene)	136.12	9.08	8.45
17	10.56	γ -松油烯 (γ -terpinene)	136.12	0.23	0.20
18	11.18	萜品油烯 [cyclohexene,1-methyl-4-(1-methylethylidene)-]	136.12	0.29	0.23
19	12.32	<i>D</i> -2-樟脑 [(+)-2-bornanone]	152.12	4.53	3.54
20	12.85	龙脑 (endo-borneol)	154.14	7.46	6.88
21	13.27	α -松油烯 (α -terpinenol)	154.14	2.88	2.26
22	14.61	乙酸异龙脑酯 {acetic acid,1,7,7-trimethyl-bicyclo[2.2.1]hept-2-yl ester}	196.15	2.68	2.76
23	15.14	1,2,3,4-四氢-1,4,6-三甲基萘 (naphthalene,1,2,3,4-tetrahydro-1,4,6-trimethyl-)	174.14	0.03	0.03
24	15.79	α -依兰烯 (α -ylangene)	204.19	0.05	0.05
25	15.86	古巴烯 (copaene)	204.19	0.05	0.05
26	16.08	β -榄香烯(beta-elemene)	204.19	0.99	0.86
27	16.35	4-氟苯甲酸,炔丙基酯 (4-fluorobenzoic acid, propargyl ester)	178.04	0.40	0.35
28	16.50	石竹烯 (caryophyllene)	204.19	1.89	2.13
29	16.77	α -愈创木烯 (α -guaiene)	204.19	4.71	4.23
30	17.06	α -榄香烯 (α -elemene)	204.19	1.03	1.13
31	17.27	大根香叶烯 D (germacrene D)	204.19	0.43	0.39
32	17.35	β -瑟林烯 (β -selinene)	204.19	0.57	0.52
33	17.48	<i>cis</i> - β -愈创木烯 (aciphyllene)	204.19	1.33	1.45
34	17.62	δ -布黎烯 (δ -bulnesene)	204.19	3.32	3.60
35	17.75	δ -杜松烯 (δ -cadinene)	204.19	0.15	0.18
36	18.49	桉油烯醇 (spathulenol)	220.18	0.31	0.30

可对阴道黏膜产生一定的刺激性。CVOP、经过加速试验处理的 CVOP 与不含 CO 的水凝胶 B 3 种样品对于大鼠阴道组织基本无刺激性, 固有层均可见少

量炎性细胞散在浸润(黑色箭头), 与对照组比较未见显著差异。

综上, CO 在双骨架复合凝胶基质中形成纳米

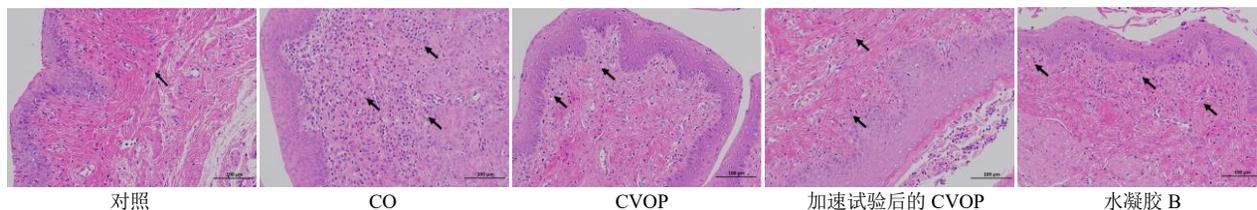


图 6 不同制剂处理的大鼠阴道组织切片图

Fig. 6 Sections of rats' vaginal tissue treated with different formulations

粒后，可有效避免单独 CO 可能对阴道黏膜造成的刺激，其可能的原因是以纳米粒的形式给药避免了 CO 由于局部浓度较高而产生的黏膜刺激性。

2.6 体外透黏膜给药研究

研究表明，猪阴道组织的药物渗透性与人阴道组织相似，是阴道给药研究的理想模型^[20]。本实验将新鲜的猪阴道剪开，小心剔除黏膜下附属的结缔组织与脂肪组织，用生理盐水洗净，切成适宜的小块，置于立式双室扩散池中间，内层朝向供给池、外层朝向接收池，扩散池置于磁力搅拌器上，以缓慢恒速搅拌接收液并保持温度 (37.0±0.5) °C。供给池中分别加入一定量的水凝胶 A 和 B 各 6 g，接收池中加入生理盐水 7 mL。每隔 1 h 取接收液 0.2 mL，并补加等量的新鲜接收液，共取 6 个样，样品经 0.45 μm 滤膜滤过后，取 20 μL 注入 HPLC 测定 AS 和 MAS 的质量浓度，并按公式计算药物的累积渗透量。

$$\text{累积渗透量} = \sum CV/A_c$$

V 为接收液体积 (mL)， C 为接收液中药物质量浓度 (μg·mL⁻¹)， A_c 为有效扩散面积 (cm²)

取样结束后，取适量黏膜组织，干燥，喷金，用 SEM 观察其组织形态与结构特征。另外，将黏膜组织上残留的凝胶样品用生理盐水冲洗干净，准确称定质量 (m)，再将其剪碎后加入等量生理盐水，进行匀浆，匀浆液经 13 000 r/min 离心 5 min 后取上清液，按照上述方法测定 AS 和 MAS 在黏膜组织中的滞留量。

$$\text{滞留量} = cV/m$$

c 为匀浆液中药物质量浓度 (μg·mL⁻¹)， V 为匀浆液体积

积雪草总苷中 AS 和 MAS 的比例约为 1 : 2.7，二者均易溶于水且相对分子质量分别为 959.12 和 975.13。机体生物黏膜是一种屏障组织，一般脂溶性的小分子药物易于通过，而水溶性与大分子药物不易通过^[21-22]，由此可知，AS 和 MAS 不易渗透进入黏膜组织。

由图 7 可知，在不含 CVOP 的水凝胶 B 中，AS 和 MAS 的黏膜渗透性始终低于含有 CVOP 的水凝胶 A 组，在 6.0 h 时，水凝胶 A 中 AS 和 MAS 的累积渗透量分别是水凝胶 B 中 AS 和 MAS 的 4.68 倍与 2.01 倍 ($P < 0.05$)；此外，在 6.0 h 时，水凝胶 B 中 MAS 是 AS 的 3.77 倍，水凝胶 A 中 MAS 是 AS 的 1.61 倍。结果表明，CVOP 能够显著提高 AS 和 MAS 的黏膜渗透性，但是可能由于引入双骨架复合凝胶基质中的羟基后，使 AS 和 MAS 的分子结构与相对分子质量等有所差异，因此二者并不按照在原料药中的比例而渗透进入黏膜组织。实验结束后，水凝胶 A 中 AS 和 MAS 在黏膜组织中的滞留量分别是水凝胶 B 中 AS 和 MAS 的 2.39 倍与 2.06 倍 ($P < 0.05$)，表明 CVOP 能够使 AS 和 MAS 在黏膜组织中形成良好的“药物储库”，从而有利于药物在局部的缓慢释放 (表 2)。

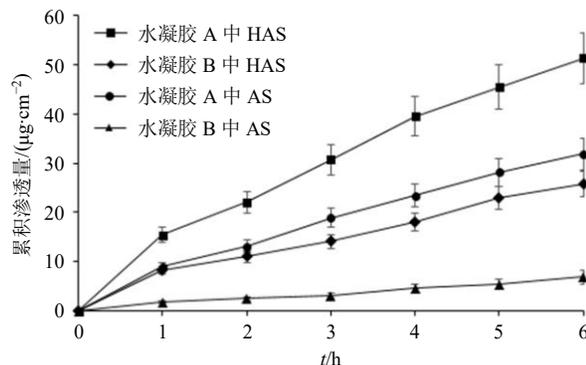


图 7 水凝胶 A、B 中 AS 和 MAS 的黏膜累积渗透量 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Transmucosal cumulative amount of AS and MAS in hydrogels A and B ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

由图 8 可知，正常的黏膜组织表面上皮组织结构致密有序，表面光滑，无细胞脱落；不含 CVOP 的水凝胶 B，在体外透黏膜给药结束后，黏膜表面可见有少量上皮组织脱落，出现部分无序结构。而含有 CVOP 的水凝胶 A，在实验结束后可明显看到黏膜表面上皮组织结构紊乱无序的程度增加，上皮

表2 水凝胶 A、B 中 AS 和 MAS 在黏膜组织中的滞留量
($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Retention amount of AS and MAS in mucosal tissues for hydrogels A and B ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	滞留量/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
水凝胶 A 中 MAS	446.06
水凝胶 B 中 MAS	216.15
水凝胶 A 中 AS	191.11
水凝胶 B 中 AS	81.35

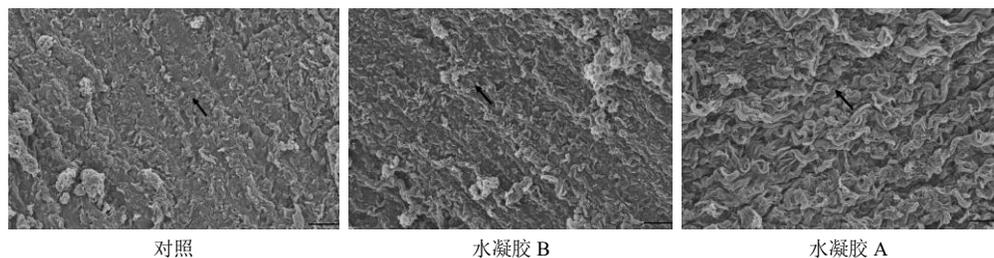


图8 各组黏膜组织的 SEM 图像

Fig. 8 SEM images of mucosal tissues in each group

发挥靶向治疗的组分配伍创新中药制剂^[23], 其药效成分为 CO、积雪草总苷和葡配甘露聚糖。其中, 葡配甘露聚糖具有“药辅合一”的特性^[24], 在该凝胶剂中可与卡波姆-934 形成稳定、流变学性质良好且具有网状结构的双骨架复合凝胶基质。该凝胶基质与 CO 具有较好的亲和性, 加之其具有空间网状结构特征, 因此, 其可在不使用乳化剂的条件下能够使 CO 形成粒径为 (185 ± 26) nm 的球形纳米粒 CVOP。此外, 双骨架复合凝胶基质可在 CVOP 周围形成机械性凝胶膜屏障而增强了 CVOP 的物理化学稳定性与分散的均一性, 因此有效避免了 CO 由于分散不均匀、局部浓度高或使用大量乳化剂而对阴道黏膜产生刺激性的弊端。CVOP 还可能通过扰乱黏膜组织表面上皮层的致密有序结构而降低黏膜吸收屏障, 提高积雪草总苷的黏膜渗透性与促进其在黏膜组织中药物储库的形成, 提高了生物利用度, 也表明中药复方不同成分间促进吸收是发挥协同作用的机制之一。

综上所述, 本实验阐明了 CO 能够在葡配甘露聚糖-卡波姆双骨架复合凝胶基质中形成稳定的 CVOP, 不仅提高了 CO 的稳定性, 也提高了水溶性药物积雪草总苷的黏膜渗透性, 为复方葡配甘露聚糖水凝胶剂的工业化制备工艺及其对 SUI 的靶向治疗提供了科学依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

细胞间的紧密连接减少、间隙增加。因此, CVOP 提高水溶性积雪草总苷中的 AS 和 MAS 的黏膜渗透性, 与促进“药物储库”形成的机制可能为通过扰乱黏膜上皮组织的致密有序结构与增加上皮细胞间隙而降低黏膜吸收屏障。

3 讨论

阴道给药系统是治疗 SUI 的有效手段, 可将药物直接递送至病灶而发挥局部靶向治疗作用。复方葡配甘露聚糖水凝胶是一款通过阴道给药而对 SUI

参考文献

- [1] Li W Z, Hao X L, Zhao N, *et al.* Propylene glycol-embodying deformable liposomes as a novel drug delivery carrier for vaginal fibrauretin delivery applications [J]. *J Control Release*, 2016, 226: 107-114.
- [2] Li W Z, Zhao N, Zhou Y Q, *et al.* Post-expansile hydrogel foam aerosol of PG-liposomes: A novel delivery system for vaginal drug delivery applications [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2012, 47(1): 162-169.
- [3] 王艳红, 林守清. 胶原蛋白与压力性尿失禁 [J]. *实用医院临床杂志*, 2010, 7(4): 155-157.
- [4] 马丹, 马巧媛. 产后尿失禁的发生现状及影响因素分析 [J]. *中国临床医生杂志*, 2021, 49(7): 853-856.
- [5] 张润涛, 刘聪, 李佳, 等. 葡甘露聚糖凝胶对宫颈炎大鼠 Collagen I、Collagen III 表达的影响 [J]. *山西中医*, 2022, 38(6): 65-67.
- [6] 苏晓渝, 李彪, 陈水燕, 等. 多孔材料吸附技术改善中药挥发油稳定性的研究与应用 [J]. *药学学报*, 2022, 57(11): 3301-3309.
- [7] 李伟泽, 韩文霞, 赵宁, 等. 中药挥发油对盐酸巴马汀纳米柔性脂质体药剂学性能的影响 [J]. *药学学报*, 2017, 52(6): 992-997.
- [8] 邹准, 闵建国, 吴敏菊, 等. HPLC-CAD 法分离测定三金片中同分异构体积雪草苷 B 和羟基积雪草苷 [J]. *中草药*, 2021, 52(14): 4217-4220.
- [9] 马子豪, 马婕, 吕金盈, 等. 白及多糖在新型递药系统和生物材料中的应用进展 [J]. *中国中药杂志*, 2021,

- 46(18): 4666-4673.
- [10] 王坤堂, 王逸伦, 崔元璐, 等. 白及多糖药理作用及在中药现代制剂领域的研究进展 [J]. 中成药, 2023, 45(7): 2281-2287.
- [11] Hamidi M, Azadi A, Rafiei P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, 60(15): 1638-1649.
- [12] 冯星星, 谢琪, 杨丛莲, 等. 基于中药活性成分自组装的无载体纳米制剂 [J]. 药科学报, 2021, 56(12): 3203-3211.
- [13] 曾萍, 彭明利, 徐溢. PLGA 微粒/纳米粒基因载体的研究进展 [J]. 药科学报, 2010, 45(11): 1346-1354.
- [14] 王勇, 胡坪, 刘清飞, 等. 纳米技术在载药系统及中药研究中的应用 [J]. 中成药, 2007, 29(1): 112-117.
- [15] 赵富春, 廖双泉, 梁志群, 等. 蛇床子挥发性成分的 GC/MS 分析 [J]. 质谱学报, 2008, 29(6): 361-366.
- [16] 朱丽, 张倬, 卢金清. HS-SPME-GC-MS 分析蛇床子与其伪品的挥发性成分 [J]. 中国药师, 2019, 22(9): 1649-1651.
- [17] 赵陆华, 单臻, 李晓晶, 等. 蛇床子挥发油 GC 和 GC-MS 指纹图谱的研究 [J]. 中国药学杂志, 2007, 42(12): 889-891.
- [18] Antimisiaris S G, Mourtas S. Recent advances on anti-HIV vaginal delivery systems development [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2015, 92: 123-145.
- [19] 李修琴, 赵键铤, 孙敏哲, 等. Ento-F 栓的大鼠阴道黏膜刺激性与豚鼠过敏性实验 [J]. 毒理学杂志, 2019, 33(6): 499-503.
- [20] van Eyk A D, van der Bijl P. Porcine vaginal mucosa as an *in vitro* permeability model for human vaginal mucosa [J]. *Int J Pharm*, 2005, 305(1/2): 105-111.
- [21] Hussain A, Ahsan F. The vagina as a route for systemic drug delivery [J]. *J Control Release*, 2005, 103(2): 301-313.
- [22] Antimisiaris S G, Mourtas S. Recent advances on anti-HIV vaginal delivery systems development [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2015, 92: 123-145.
- [23] 刘斯琪, 王如峰. 左金丸组分中药配伍组分制备工艺研究 [J]. 中草药, 2022, 53(19): 6001-6011.
- [24] 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.

[责任编辑 郑礼胜]