

冰片修饰根皮素醇质体凝胶的制备、表征及其离体皮肤渗透特性研究

柳超¹, 董亚楠¹, 李伟宏¹, 滑亚楠^{2,3}, 王风云^{1*}

1. 河南应用技术职业学院, 河南 郑州 450042

2. 河南省中医药研究院, 河南 郑州 450004

3. 河南省中西医结合医院, 河南 郑州 450003

摘要: 目的 制备冰片修饰根皮素醇质体 (borneol-modified phloretin ethosomes, Bor-Phl-ES), 考察其体外释药行为和经皮渗透性能。方法 薄膜分散法制备 Bor-Phl-ES; 选择磷脂与胆固醇用量比、脂药比和丙二醇体积分数为主要影响因素, 以 Bor-Phl-ES 包封率、载药量和粒径的总评归一值 (overall desirability, OD) 作为响应值, Box-Behnken 设计-效应面法优化 Bor-Phl-ES 处方; 采用卡波姆 940 作为基质将 Bor-Phl-ES 制备成凝胶, 透析法考察其体外释药行为, 透射电子显微镜观察微观外貌, 并对 Bor-Phl-ES 凝胶进行流变学研究; Franz 扩散池法考察 Bor-Phl-ES 凝胶透皮性能。结果 Bor-Phl-ES 最佳处方: 磷脂与胆固醇用量比为 13.6:1, 脂药比为 11.7:1, 丙二醇体积分数为 31%; Bor-Phl-ES 的平均包封率为 (81.92 ± 1.07)%, 载药量为 (6.16 ± 0.07)%, 粒径为 (179.44 ± 6.76) nm, ζ 电位为 (-10.89 ± 0.91) mV; Bor-Phl-ES 形态为球形或椭圆形; Bor-Phl-ES 凝胶 24 h 累积释药度为 77.96%, 释药行为符合 Higuchi 模型; 流变学研究显示, Bor-Phl-ES 凝胶具有固体弹性性质; 透皮试验研究表明, Bor-Phl-ES 凝胶将根皮素透皮速率、单位面积累积渗透量和皮肤滞留量分别提高至 4.32、4.17、3.35 倍。结论 Bor-Phl-ES 凝胶缓释特征明显, 药物透皮渗透速率高且稳定, 有效促进了根皮素透皮吸收。

关键词: 根皮素; 醇质体凝胶; 冰片; Box-Behnken 设计-效应面法; 透皮速率; 累积渗透量; 皮肤滞留量

中图分类号: R283.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2024)21-7288-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.21.010

Preparation, characteration and their *ex vivo* transdermal permeation properties of borneol-modified phloretin ethosomes gel

LIU Chao¹, DONG Yanan¹, LI Weihong¹, HUA Yanan^{2,3}, WANG Fengyun¹

1. Henan Technical Institute, Zhengzhou 450042, China

2. Henan Academy of Chinese Medicine, Zhengzhou 450004, China

3. Henan Integrative Medicine Hospital, Zhengzhou 450003, China

Abstract: Objective To prepare borneol-modified phloretin ethosomes (Bor-Phl-ES), and to study its drug release *in vitro* and transdermal permeation properties. **Methods** Bor-Phl-ES was prepared by film dispersion method. Phospholipid to cholesterol ratio, lipids to drug ratio, volume fraction of propylene glycol were selected as main influencing factors, overall desirability (OD) of entrapment efficiency, drug loading and particle size acted as response values, Box-Behnken design-response surface method was used to optimize preparations of Bor-Phl-ES. Bor-Phl-ES gel was prepared using carbomer 940 as matrix, and drug release *in vitro* was studied by dialysis method. Microscopic appearance of Bor-Phl-ES was observed by transmission electron microscopy (TEM), and rheology of Bor-Phl-ES gel was also studied. Franz diffusion cell method was used to study the transdermal properties of Bor-Phl-ES gels. **Results** The optimal formulation of Bor-Phl-ES: phospholipid to cholesterol ratio was 13.6:1, lipids to drug ratio was 11.7:1, volume fraction of propylene glycol was 31%. Average encapsulation efficiency, drug loading, particle size and ζ potential of Bor-Phl-ES were (81.92 ± 1.07)%, (6.16 ± 0.07)%, (179.44 ± 6.76) nm, and (-10.89 ± 0.91) mV, respectively. Shape of Bor-Phl-ES was

收稿日期: 2024-04-28

基金项目: 2023 年度河南省高等学校重点科研项目 (23B320013); 2024 年度河南省医学教育研究项目 (WJLX2024211); 2024 年度郑州市社科调研课题项目 (ZSKL20241285); 河南应用技术职业学院青年骨干教师资助项目 (2022-GGJS-Y003); 河南应用技术职业学院首席技师资助项目 (2023-SXJS-HL02)

作者简介: 柳超 (1985—), 男, 硕士, 讲师, 研究方向为临床药学及老年皮肤疾病护理。Tel: (0371)67592759 E-mail: liuchao860329@163.com

*通信作者: 王风云 (1973—), 女, 硕士, 教授, 从事临床药学开发研究。Tel: (0371)67673862 E-mail: wangfengyun1973@126.com

spherical or elliptical, cumulative release rate of Bor-Phl-ES gel at 24 h was 77.96%, which accorded with Higuchi model. Rheological properties of Bor-Phl-ES gels showed solid elastic properties. Transdermal test results showed that Bor-Phl-ES gel increased the permeation rate, cumulative penetration and skin retention of phloretin to 4.32, 4.17 and 3.35 times, respectively. **Conclusion** Bor-Phl-ES gel had obvious sustained-release characteristics, transdermal drug penetration rate was high and stable, and the transdermal permeation of phloretin was promoted effectively by Bor-Phl-ES gel.

Key words: phloretin; ethosomes gel; borneol; Box-Behnken design-response surface method; permeation rate; cumulative penetration; skin retention

根皮素 (phloretin) 是一种二氢查耳酮类多酚化合物, 在俄色叶、海棠叶、山荆子等植物中均可提取得到。临床研究表明, 根皮素可使受试者的丘疹、粉刺、皮脂分泌等显著降低^[1], 可用于痤疮等疾病治疗。根皮素通过降低皮肤炎症反应、改善皮肤血液循环等作用^[2-3], 进而降低紫外线诱导志愿者的皮肤损伤, 促进红斑消退, 加快皮肤修复速度, 表明其在功能性化妆品上具有较大的应用潜力。此外, 根皮素也可抑制络氨酸酶和环氧化酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 的活性^[3]、降低黑色素含量^[3]、诱导黑色素瘤 4A5 细胞凋亡^[4]、抑制皮肤乳头状瘤生长^[4]等, 因此根皮素在治疗皮肤疾病领域具有较高的开发价值。药物透皮渗透能力主要与其溶解度和油水分配系数有关, 一般认为油水分配系数在 2~3 时易透皮吸收^[6]。研究显示^[7], 根皮素溶解度仅 (72.13 ± 0.35) $\mu\text{g/mL}$, 油水分配系数为 1.22 ± 0.03 , 导致根皮素透皮渗透能力较差。化学促渗剂可增加药物的透皮吸收, 但长期使用化学促渗剂可能引起皮肤过敏、刺激等不良反应^[8-9]。因此, 构建一种安全、有效的新型经皮给药制剂显得非常必要, 以便更好地应用于临床。

脂质体通常使药物聚集在角质层, 透皮渗透能力较弱^[10]。醇质体 (ethosomes, ES) 是通过在脂质体处方中引入适量的醇类物质而制得的一种纳米囊泡, 具有良好的可变性和流动性, 透皮吸收效果优于脂质体^[10-11]。但由于皮肤角质层的屏障作用, 极大阻碍了醇质体经皮渗透^[12], 导致药物吸收速度和浓度达不到治疗要求。冰片 (borneol) 是一种脂溶性单萜类中药, 通过破坏角质层高度有序脂质结构而促进透皮吸收^[13], 本身刺激性低, 安全性高, 在医药领域应用较广。冰片与醇质体的脂质载体磷脂及胆固醇相容性良好^[14-15], 利于将冰片修饰至醇质体表面, 可协助醇质体克服角质层屏障, 进一步增加醇质体的经皮渗透能力^[15]。本研究在单因素考察的基础上, 采用 Box-Behnken 设计-效应面法 (Box-Behnken design-response surface method, BBD-RSM)

优化冰片修饰根皮素醇质体 (borneol-modified phloretin ethosomes, Bor-Phl-ES) 处方。Bor-Phl-ES 混悬液是一种纳米混悬液, 难以在皮肤上滞留, 为增加 Bor-Phl-ES 储存稳定性, 提高其成药性, 故进一步采用凝胶基质进行赋性, 制备 Bor-Phl-ES 凝胶, 同法制备无冰片修饰的根皮素醇质体 (phloretin ethosomes, Phl-ES) 凝胶。在 Phl-ES 混悬液中直接加 10% 冰片, 并制备成 Phl-ES+10% 冰片凝胶; 分别比较 Bor-Phl-ES 凝胶、Phl-ES 凝胶和 Phl-ES+10% 冰片凝胶的理化性质、体外释药行为、储存稳定性及透皮渗透性能, 为根皮素透皮制剂的研发提供新思路。

1 仪器与材料

1.1 仪器

MSE125P-CE 型电子天平, 德国 Sartorius 公司; Agilent 1200 型高效液相色谱仪, 美国 Agilent 公司; Mastersizer 3000 型粒度仪, 英国马尔文仪器有限公司; KQ-800DM 型超声仪, 昆山市超声仪器有限公司; TWS 型恒温水浴锅, 上海喆图科学仪器有限公司; XH-D 型旋涡混合器, 江苏天翎仪器有限公司; DV1400 型旋转黏度计, 荷兰 TQC 科学仪器公司; DIS 型磁力搅拌器, 上海小聪科技有限公司; 7890B 型气相色谱仪, 美国 Agilent 公司; UDT-818A-8 型溶出仪, 东南科仪科技有限公司; 120C 型透射电子显微镜 (TEM), 赛默飞世尔上海仪器有限公司; DH-1600 型高速离心机, 上海德洋意邦仪器有限公司; BH-2 型光学显微镜, 日本 Olympus 公司; TT-6D 型 Franz 扩散池, 上海玉研科学仪器有限公司; DV-10 型高剪切流变仪, 上海普利赛斯国际贸易有限公司。

1.2 材料

根皮素原料药, 批号 211206, 质量分数 98.0%, 上海万疆生物技术有限公司; 对照品根皮素 (批号 110366-202212, 质量分数 98.2%)、冰片 (批号 110743-201706, 质量分数 97.6%), 中国食品药品检定研究院; 大豆卵磷脂, 批号 202205, 上海辅必成医药科技有限公司; 冰片原料药, 批号 20230602,

安徽美和达生物科技有限公司；胆固醇，批号 P221001，西安晋湘药用辅料有限公司；卡波姆 940，批号 20210607，武汉德晟生化科技有限公司；聚乙二醇 400 (PEG 400)，批号 20221007，国药集团化学试剂有限公司；多聚甲醛固定液，批号 20211106，浓度为 4%，武汉卡诺斯科技有限公司；葡聚糖凝胶 G-50，批号 R24S11D65891，上海源叶生物科技有限公司。

1.3 动物

健康 ICR 小鼠，体质量 18~22 g，雌雄兼具，购自河南省动物实验中心，生产许可证号 SCXK(豫)2020-0001。动物实验遵循河南应用技术职业学院有关实验动物管理和使用的规定，均符合 3R(减少、替代和优化)原则，动物实验伦理批准号为 DWLL-2023-012。

2 方法与结果

2.1 Bor-Phl-ES 及其凝胶剂的制备

2.1.1 Bor-Phl-ES 的制备 取 25 mg 根皮素和处方量胆固醇、卵磷脂、冰片置于圆底烧瓶中，加入乙醇 30 mL，置于 40 °C 水浴中磁力搅拌至溶解澄清，40 °C 减压旋蒸除去有机溶剂，即得均匀、透明薄膜，置于 30 °C 真空干燥箱中过夜(至无醇味)。加入一定体积分数的丙二醇水溶液，密封后于 40 °C 水浴中并磁力搅拌(700 r/min) 45 min，使之充分水化，探头超声(频率 40 kHz、功率 250 W) 10 min，混悬液过 0.22 μm 微孔滤膜，即得 Bor-Phl-ES 混悬液。

2.1.2 Bor-Phl-ES 凝胶剂的制备 取卡波姆 940 粉末 0.5 g，逐步分散至 50 mL 蒸馏水(温度为 40 °C)中，并于 40 °C 水浴中磁力搅拌 2 h，静置过夜即得空白凝胶。加入 Bor-Phl-ES 混悬液 50 mL，采用三乙醇胺调节 pH 值至 6.5±0.1，静置后即得 Bor-Phl-ES 凝胶。

2.2 HPLC 法测定根皮素含量的方法学考察

2.2.1 HPLC 色谱条件^[16] 色谱柱为 Waters C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)；流动相为甲醇-水(50:50)；检测波长 380 nm；柱温 40 °C；进样量 10 μL；体积流量 1.0 mL/min。

2.2.2 线性关系考察 精密称定 14.80 mg 根皮素对照品转移至 50 mL 量瓶中，加入甲醇超声溶解，放冷后甲醇稀释定容，得 296.00 μg/mL 根皮素对照品储备液。采用甲醇稀释成 3.700、1.850、0.925、0.370、0.185、0.037 μg/mL 系列对照品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件测定各质量浓度(X)对照品溶液的峰

面积(Y)，进行线性回归，得回归方程为 $Y=18.866X+0.153$ ， $r=0.9998$ ，结果表明根皮素在 0.037~3.700 μg/mL 线性关系良好。

2.2.3 Bor-Phl-ES 凝胶供试品溶液的制备 取 Bor-Phl-ES 凝胶约 2 g，精密称定，放置 50 mL 量瓶中，加入 50%乙醇 40 mL 超声溶解(频率 40 kHz、功率 250 W)，放冷后加 50%乙醇稀释定容。精密取续滤液 1 mL 至 10 mL 量瓶中，50%乙醇稀释定容，摇匀即得 Bor-Phl-ES 凝胶供试品溶液。

2.2.4 专属性考察 取胆固醇、卵磷脂、冰片、卡波姆 940 等辅料制备阴性样品(不含根皮素)，按“2.2.3”项下方法制备阴性样品溶液，另取根皮素对照品溶液、Bor-Phl-ES 凝胶供试品溶液，分别按“2.2.1”项下色谱条件进样分析，结果见图 1。结果表明该色谱条件专属性良好，理论塔板数以根皮素计不低于 5 500。

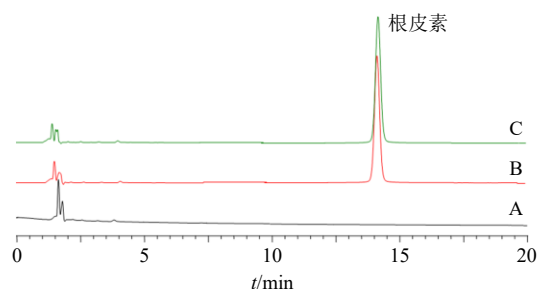


图 1 阴性样品(A)、根皮素对照品(B)、Bor-Phl-ES 凝胶样品(C)的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of negative sample (A), phloretin reference substance (B), Bor-Phl-ES gel sample (C)

2.2.5 精密度考察 取 3.700、0.925、0.037 μg/mL 根皮素对照品溶液各 6 份，按“2.2.1”项下色谱条件测定根皮素峰面积，计算得其峰面积的 RSD 分别为 0.55%、0.43%、1.19%，结果表明该仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性考察 取 Bor-Phl-ES 凝胶供试品溶液，分别于制备后 0、2、4、8、12、24 h，按“2.2.1”项下色谱条件测定，计算得根皮素峰面积的 RSD 为 0.96%，结果表明 Bor-Phl-ES 凝胶供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.7 重复性考察 取 Bor-Phl-ES 凝胶，按“2.2.3”项下方法，平行制备 6 份 Bor-Phl-ES 凝胶供试品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件进样测定，计算得根皮素质量分数的 RSD 分别为 1.56%，结果表明该实验重复性良好。

2.2.8 加样回收率考察 取 Bor-Phl-ES 凝胶约 1 g，

共 9 份, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 分为低、中、高 3 组, 每组各 3 份, 分别加入根皮素对照品溶液 (296 μg/mL) 0.4 mL (低)、0.7 mL (中) 和 1.0 mL (高), 按“2.2.3”项下方法处理, 测定根皮素含量, 计算得根皮素的平均加样回收率为 99.68%, RSD 为 0.94%, 结果表明该实验准确度高。

2.3 Bor-Phl-ES 包封率和载药量测定

取葡聚糖凝胶 G-50 适量, 纯化水充分溶胀后填柱 (2 mL 注射器)^[14], 即得微柱, 装入离心管中。精密量取 Bor-Phl-ES 混悬液 0.200 mL, 3 000 r/min 离心 (离心半径 6.8 cm) 2 min, 加入 0.2 mL 纯化水重复洗脱 4 次, 将洗脱液合并至 10 mL 量瓶中, 加入乙醇 3 mL, 探头超声 10 min 破乳 (频率 40 kHz、功率 250 W), 继续加乙醇稀释定容, 测定被包封药量 ($M_{\text{包封}}$), 计算 Bor-Phl-ES 中根皮素的包封率和载药量。

$$\text{包封率} = M_{\text{包封}} / M_{\text{总}}$$

$$\text{载药量} = M_{\text{包封}} / W_{\text{总}}$$

$M_{\text{总}}$ 为根皮素总量, $W_{\text{总}}$ 为根皮素、胆固醇、卵磷脂和冰片的总量

2.4 粒径和 ζ 电位测定

配制与 Bor-Phl-ES 处方中相同体积分数的丙二醇溶液作为稀释液。取 Bor-Phl-ES 混悬液 0.1 mL, 加入稀释液 4 mL, 混匀后于粒度仪上测定其粒径、多分散指数 (polydispersity index, PDI) 和 ζ 电位, 测定 ζ 电位时使用专用电槽。

2.5 单因素考察 Bor-Phl-ES 处方

2.5.1 磷脂与胆固醇用量比的考察 磷脂和胆固醇作为 Bor-Phl-ES 脂质载体。固定脂药质量比为 12 : 1, 载体质量浓度为 5 mg/mL, 冰片占载体质量比为 8%, 丙二醇体积分数为 30% 条件下, 分别考察 Bor-Phl-ES 处方中磷脂与胆固醇用量比的影响, 结果见表 1。随着胆固醇用量比例的减少, Bor-Phl-ES 包封率和载药量呈先增加后下降趋势, 可能是由于胆

表 1 磷脂与胆固醇用量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effects of phospholipids to cholesterol ratio ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

磷脂与胆固醇用量比	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
10 : 1	64.81 ± 0.98	4.36 ± 0.25	180.11 ± 7.40
12 : 1	70.92 ± 0.92	5.02 ± 0.16	174.96 ± 8.14
14 : 1	80.03 ± 1.20	5.80 ± 0.12	177.57 ± 8.13
16 : 1	76.39 ± 1.06	5.49 ± 0.17	198.83 ± 7.89
18 : 1	72.54 ± 1.19	5.04 ± 0.14	238.42 ± 8.75

固醇比例较大时, Bor-Phl-ES 的磷脂双分子层载药空间下降^[6], 导致 Bor-Phl-ES 的包封率和载药量较低; 胆固醇比例过小时, Bor-Phl-ES 稳定性差, 药物易泄露^[12]。Bor-Phl-ES 粒径随着胆固醇用量比例的减小而增大, 当磷脂与胆固醇用量比为 18 : 1 时, 平均粒径大于 200 nm。由于磷脂与胆固醇用量比为 14 : 1 时, Bor-Phl-ES 的包封率和载药量相对较大, 平均粒径小于 180 nm。故以磷脂与胆固醇用量比 14 : 1 为中心, 选择 12 : 1~16 : 1 区间继续优化。

2.5.2 脂药质量比的考察 固定磷脂和胆固醇用量比为 14 : 1, 载体质量浓度为 5 mg/mL, 冰片占载体质量比为 8%, 丙二醇体积分数为 30% 的条件下, 分别考察脂药质量比对 Bor-Phl-ES 的影响, 结果见表 2。随着脂质比例的增加, Bor-Phl-ES 包封率逐渐增大, 当脂药质量比大于 14 : 1 时, 包封率不再明显增加, 但载药量下降明显。Bor-Phl-ES 粒径随着脂质载体增加而变大, 可能是脂质用量越大时, Bor-Phl-ES 之间发生融合或粘连几率越大^[17], 当脂药比超过 14 : 1 时, 粒径大于 200 nm。因此, 脂药比对 Bor-Phl-ES 影响较大, 后续以脂药比 12 : 1 为中心, 选择 10 : 1~14 : 1 区间继续优化。

2.5.3 载体质量浓度的考察 磷脂和胆固醇用量比为 14 : 1, 脂药质量比为 12 : 1, 冰片占载体质量比为 8%, 丙二醇体积分数为 30% 的条件下, 分别考察载体质量浓度对 Bor-Phl-ES 的影响, 结果见表 3。随着载体质量浓度的增加, Bor-Phl-ES 的包封率和

表 2 脂质量药比的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

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

脂药质量比	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
8 : 1	48.56 ± 1.21	5.19 ± 0.15	174.16 ± 6.11
10 : 1	69.12 ± 1.04	6.02 ± 0.19	179.53 ± 7.24
12 : 1	77.97 ± 0.99	5.81 ± 0.22	186.94 ± 6.89
14 : 1	80.24 ± 1.25	5.16 ± 0.14	204.71 ± 5.60
16 : 1	80.77 ± 1.07	4.69 ± 0.17	248.05 ± 8.91
18 : 1	80.81 ± 0.96	4.23 ± 0.18	266.03 ± 7.24

表 3 载体质量浓度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effects of carrier concentration ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

载体质量浓度/ (mg·mL ⁻¹)	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
3	74.89 ± 0.96	5.41 ± 0.17	178.93 ± 6.04
4	77.14 ± 1.22	5.64 ± 0.11	189.65 ± 8.67
5	80.22 ± 1.02	6.02 ± 0.19	187.04 ± 5.89
6	76.93 ± 1.38	5.67 ± 0.15	192.11 ± 6.72
7	73.08 ± 0.91	5.42 ± 0.20	206.19 ± 9.69

载药量呈先增加后下降趋势,粒径总体呈增大情况。可能是载体质量浓度较小时,水相用量较大,在磷脂增溶作用下药物易进入水相^[16],导致 Bor-Phl-ES 的包封率和载药量较低;载体质量浓度较大时,水相用量较少,从而影响了 Bor-Phl-ES 中磷脂的水化效果^[12],导致磷脂双分子层的载药空间不足,进而影响 Bor-Phl-ES 的载药量。根据《中国药典》2020 年版四部通则 9014 项下微粒制剂指导原则对包封率的要求(不低于 80%),当载体质量浓度为 5 mg/mL 时包封率大于 80%,故确定载体质量浓度为 5 mg/mL。

2.5.4 冰片占脂质载体质量百分比的考察 磷脂和胆固醇用量比为 14:1,脂药质量比为 12:1,载体质量浓度为 5 mg/mL,丙二醇体积分数为 30%的条件下,分别考察冰片占脂质载体比对 Bor-Phl-ES 的影响,结果见表 4。冰片占脂质载体质量比为 6%~14%时,对 Bor-Phl-ES 粒径的影响较小,但冰片占脂质载体百分比超过 12%时,Bor-Phl-ES 的包封率低于 80%,可能是因为冰片与药物竞争占据磷脂双分子层空间^[12,14],进而导致 Bor-Phl-ES 包封率下降。考虑到处方中需引入一定量的冰片,根据《中国药典》2020 年版四部通则 9014 项下微粒制剂指导原则对包封率的要求(不低于 80%),最终确定冰片占脂质载体的质量百分比为 10%。

表 4 冰片占脂质载体质量百分比的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 4 Effects of percentage of borneol in carrier ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

冰片占载体质量比/%	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
6	79.96 ± 1.14	5.94 ± 0.16	184.09 ± 6.65
8	80.04 ± 1.26	6.01 ± 0.19	180.11 ± 0.87
10	80.11 ± 0.87	5.97 ± 0.11	181.64 ± 7.89
12	74.87 ± 1.35	5.31 ± 0.15	187.96 ± 8.77
14	71.55 ± 1.60	5.09 ± 0.10	184.35 ± 6.92

2.5.5 丙二醇体积分数的考察 磷脂和胆固醇用量比为 14:1,脂药质量比为 12:1,载体质量浓度为 5 mg/mL,冰片占载体质量比为 10%的条件下,分别考察丙二醇体积分数对 Bor-Phl-ES 的影响,结果见表 5。Bor-Phl-ES 的包封率和载药量,随着丙二醇体积分数的增加呈先增大后下降趋势,可能是根皮素在丙二醇中溶解度良好,适量的丙二醇有利于增加 Bor-Phl-ES 的包封率;但丙二醇体积分数过高时,会因溶解磷脂、胆固醇等从而对 Bor-Phl-ES 结构产生破坏^[12],导致其包封率和载药量下降。Bor-Phl-ES 粒径随着丙二醇体积分数增加呈下降趋势。

表 5 丙二醇体积分数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effects of volume fraction of propylene glycol ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

丙二醇体积分数/%	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
20	69.01 ± 0.93	5.07 ± 0.18	201.78 ± 8.96
25	72.70 ± 1.34	5.34 ± 0.20	184.93 ± 7.52
30	80.71 ± 1.41	6.03 ± 0.15	178.32 ± 7.09
35	73.43 ± 0.95	5.47 ± 0.16	170.87 ± 6.81
40	72.56 ± 1.27	5.30 ± 0.13	167.79 ± 7.93

因此,丙二醇体积分数对 Bor-Phl-ES 影响较大,后续以丙二醇体积分数 30%为中心,选择 25%~35%继续优化。

2.6 BBD-RSM 优化 Bor-Phl-ES 处方

2.6.1 试验设计及结果 根据“2.5”项下考察结果,选择磷脂与胆固醇用量比、脂药质量比和丙二醇体积分数分别作为 Bor-Phl-ES 处方考察的自变量 X_1 、 X_2 、 X_3 (表 6),选择 Bor-Phl-ES 包封率、载药量和粒径分别作为因变量 Y_1 、 Y_2 、 Y_3 。为使包封率和载药量最大化,同时使粒径最小化,采用 3 指标总评归一值(overall desirability, OD)作为 BBD-RSM 的响应值。OD 值计算过程为①Bor-Phl-ES 包封率和载药量使用公式 $d_{max} = (M_i - M_{min}) / (M_{max} - M_{min})$ 计算;②Bor-Phl-ES 粒径使用公式 $d_{min} = (M_{max} - M_i) / (M_{max} - M_{min})$ 计算,①和②式中 M_i 、 M_{max} 和 M_{min} 分别为实测值、最大值和最小值;③ $OD = (d_{包封率} \cdot d_{载药量} \cdot d_{粒径})^{1/3}$,实验安排及结果见表 6。

2.6.2 模型拟合与方差分析 使用 Design Expert V 12.0.3 软件对 OD 值进行拟合,得 OD 多元二次项方程 $OD = 0.940 - 0.094 X_1 - 0.070 X_2 + 0.140 X_3 + 8.036 \times 10^{-3} X_1 X_2 + 0.019 X_1 X_3 - 0.200 X_2 X_3 - 0.240 X_1^2 - 0.350 X_2^2 - 0.380 X_3^2$, $R^2 = 0.986 0$, $R_{adj}^2 = 0.967 9$,两者均大于 0.96,表明该模型可信度高。方差结果见表 7,OD 方程的 P 值 $< 0.000 1$,具极显著性差异;失拟项 P 值为 0.069 0 ($P > 0.05$),说明该模型可靠性强,对 Bor-Phl-ES 处方研究具有指导意义。OD 方程中, X_2 具有显著性差异 ($P < 0.05$),而 X_1 、 X_3 、 $X_2 X_3$ 、 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 均具有极显著差异 ($P < 0.01$)。

2.6.3 效应面结果、处方优化结果及最佳处方确定 使用 Design Expert V12.0.3 绘制三维曲面图,结果见图 2,随着其中两因素的增加,包封率、载药量和粒径 OD 值均呈先增加后下降趋势。设定 OD 为望大值,取值范围为 0~1,得到 Bor-Phl-ES 最佳处

表 6 试验设计及结果 (n = 3)

Table 6 Experimental design and results (n = 3)

试验号	X ₁	X ₂	X ₃ /%	Y ₁ /%	Y ₂ /%	Y ₃ /nm	OD	试验号	X ₁	X ₂	X ₃ /%	Y ₁ /%	Y ₂ /%	Y ₃ /nm	OD
1	16 (+1)	12 (0)	35 (+1)	72.43	5.23	224.16	0.398	10	14	10	35	73.66	5.43	189.30	0.609
2	14 (0)	12	30 (0)	80.62	5.91	176.98	0.926	11	16	14	30	74.22	4.69	223.62	0.233
3	14	12	30	79.81	6.04	182.75	0.913	12	14	14	30	75.35	4.82	207.41	0.375
4	14	12	30	81.47	5.92	188.44	0.893	13	14	14	35	72.92	4.59	211.94	0.000
5	14	12	30	80.92	6.13	175.63	0.988	14	16	10	30	66.47	5.76	208.15	0.291
6	14	10 (-1)	25 (-1)	65.56	5.63	207.87	0.000	15	12	10	30	67.94	5.89	190.87	0.464
7	14	12	30	80.72	6.11	180.66	0.956	16	12	12	35	73.12	5.44	194.72	0.580
8	12 (-1)	12	25	70.84	5.12	239.48	0.257	17	16	12	25	68.25	4.96	250.65	0.000
9	14	14 (+1)	25	76.66	4.89	246.72	0.192								

表 7 方差分析

Table 7 Analysis of variance

来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	1.98	9	0.22	54.67	<0.000 1	X ₁ ²	0.25	1	0.25	61.87	0.000 1
X ₁	0.07	1	0.07	17.68	0.004 0	X ₂ ²	0.52	1	0.52	129.27	<0.000 1
X ₂	0.04	1	0.04	9.88	0.016 3	X ₃ ²	0.62	1	0.62	154.02	<0.000 1
X ₃	0.16	1	0.16	40.26	0.000 4	残差	0.03	7	4.02 × 10 ⁻³		
X ₁ X ₂	2.58 × 10 ⁻⁴	1	2.58 × 10 ⁻⁴	0.06	0.807 2	失拟项	0.02	3	7.52 × 10 ⁻³	5.37	0.069 0
X ₁ X ₃	1.42 × 10 ⁻³	1	1.42 × 10 ⁻³	0.35	0.571 3	纯偏差	5.60 × 10 ⁻⁴	4	1.40 × 10 ⁻³		
X ₂ X ₃	0.16	1	0.16	39.93	0.000 4	总离差	2.01	16			

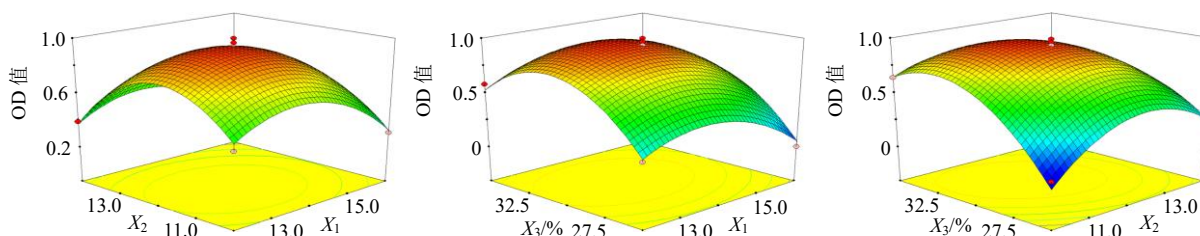


图 2 两因素交互作用的响应面图

Fig. 2 Response surface diagram of interaction between two factors

方为磷脂与胆固醇比 X₁ = 13.62 : 1, 脂药比 X₂ = 11.67 : 1, 丙二醇体积分数 X₃ = 31.12%, OD 值为 0.992。考虑到 Bor-Phl-ES 的制备便捷性, 将其处方略作调整: 磷脂与胆固醇用量比为 13.6 : 1, 脂药比调整为 11.7 : 1, 丙二醇体积分数调整为 31%。

2.7 Bor-Phl-ES 最佳处方验证

按“2.6.3”项下确定的最佳处方平行制备 3 批 Bor-Phl-ES, 测得 Bor-Phl-ES 的包封率、载药量和粒径分别为 (81.92 ± 1.07) %、(6.16 ± 0.07) % 和 (179.44 ± 6.76) nm, 按“2.6.1”项下计算方法, 得实际 OD 值为 0.990, 与预测的 OD 值 (0.992) 非常接近, 证明建立的 OD 值数学模型精确度高, 指导意义较强。Bor-Phl-ES 的 PDI 值为 0.092 ± 0.010, 表明粒径均一性良好。

2.8 Bor-Phl-ES 中冰片修饰率的测定

2.8.1 色谱条件 检测器为火焰离子检测器; 色谱柱为 DB-1701P (30 m × 0.320 mm × 0.15 μm); 检测器温度 250 °C; 柱温 130 °C, 载气为氮气; 分流比 50 : 1; 进样口温度 200 °C; 进样体积 1 μL。

2.8.2 线性关系考察 采用无水乙醇配制质量浓度为 6.00、3.00、1.50、0.50、0.25、0.05 mg/mL 的系列冰片对照品溶液, 按“2.8.1”项下色谱条件测定。以冰片质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y) 进行线性回归, 得线性回归方程为 Y = 1.804 X - 30.669, r = 0.999 9, 结果表明冰片在 0.05 ~ 6.00 mg/mL 线性关系良好。

2.8.3 专属性考察 参考 Bor-Phl-ES 最佳处方, 按照“2.1.1”项下方法制备 Phl-ES 混悬液 (不含冰片),

并按“2.2.3”项下方法制备其供试品溶液。取 Phl-ES、Bor-Phl-ES 供试品溶液和冰片对照品溶液各 1 μL ，按“2.8.1”项下色谱条件进样测定，色谱图见图 3。结果表明冰片未受杂质干扰，专属性高。

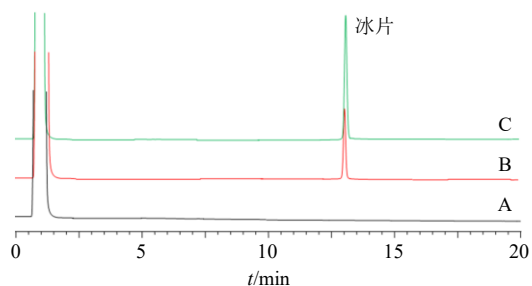


图3 Phl-ES (A)、冰片对照品 (B) 和 Bor-Phl-ES (C) 的 GC 图

Fig. 3 GC chromatograms of Phl-ES (A), borneol reference substance (B) and Bor-Phl-ES (C)

2.8.4 精密度考察 取 6.00、1.50、0.05 mg/mL 冰片对照品溶液，按“2.8.1”项下色谱条件测定冰片峰面积，计算得其峰面积的 RSD 分别为 0.10%、0.58%、1.22%，结果表明该仪器精密度良好。

2.8.5 稳定性考察 取 Bor-Phl-ES 供试品溶液，分别于制备后 0、1、2、3、4、6 h，按“2.8.1”项下色谱条件进样测定，计算得冰片峰面积的 RSD 为 1.73%，结果表明供试品溶液在 6 h 内稳定性良好。

2.8.6 重复性考察 取 Bor-Phl-ES 混悬液，按“2.3”项下操作方法，平行制备 6 份 Bor-Phl-ES 供试品溶液，按“2.8.1”项下色谱条件进样测定，计算得冰片质量分数的 RSD 为 1.80%，结果表明该实验重复性良好。

2.8.7 加样回收率考察 精密量取 9 份 Bor-Phl-ES 混悬液 0.100 mL，按“2.3”项下方法操作，分别得到洗脱液，分成低、中、高质量浓度 3 组，分别加入冰片对照品溶液 (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 1.0 mL (低)、1.5 mL (中) 和 2.0 mL (高)，分别制备供试品溶液，按“2.8.1”项下色谱条件测定。结果显示，冰片的平均加样回收率为 100.24%，RSD 为 0.85%，结果表明该实验准确度较高。

2.8.8 Bor-Phl-ES 中冰片修饰率的测定 取“2.3”项下无水乙醇破乳后的洗脱液，精密量取 1 μL 洗脱液，按“2.8.1”项下色谱条件测定冰片含量，计算 Bor-Phl-ES 中冰片的修饰率。结果显示，3 批 Bor-Phl-ES 中冰片的修饰率为 (9.57 \pm 0.10)%，略低于理论值 (10%)。

修饰率 = 洗脱液中冰片总量/脂质载体总量

2.9 Phl-ES 和 Phl-ES+10%冰片混悬液的制备及各项指标比较

参考“2.6.3”项下方法确定的 Bor-Phl-ES 最佳处方制备 Phl-ES (不加冰片)，在 Phl-ES 混悬液中直接加入 10%冰片，震荡后即得 Phl-ES+10%冰片混悬液。测得 Phl-ES 混悬液的包封率、载药量、粒径和 PDI 值分别为 (86.11 \pm 0.95)%、(6.71 \pm 0.19)%、(153.49 \pm 6.74) nm 和 0.102 \pm 0.011；Phl-ES+10%冰片的包封率、载药量、粒径和 PDI 值分别为 (67.14 \pm 1.90)%、(5.12 \pm 0.36)%、(206.56 \pm 14.50) nm 和 0.312 \pm 0.038。Phl-ES 的平均粒径小于 Bor-Phl-ES，Phl-ES+10%冰片的平均粒径大于 200 nm，且 PDI 值大于 0.3，粒径分布见图 4-A。另测得 Phl-ES、Bor-Phl-ES 和 Phl-ES+10%冰片的 ζ 电位分别为 (-17.13 \pm 1.20)、(-10.89 \pm 0.91)、(-5.02 \pm 1.12) mV， ζ 电位见图 4-B。结果表明在 Phl-ES 混悬液中加入 10%冰片 (即 Phl-ES+10%冰片) 对 Phl-ES 的包封率、载药量、粒径、PDI 值及 ζ 电位均有较大影响。

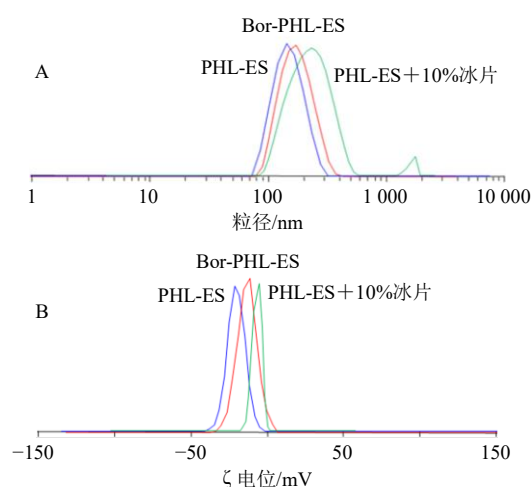


图4 粒径分布 (A) 和 ζ 电位 (B)

Fig. 4 Particle size distribution (A) and ζ potential (B)

2.10 TEM 观察外貌

取 Phl-ES 混悬液 0.1 mL，加入 5 mL 体积分数为 31%的丙二醇水溶液，震荡混匀后滴加至铜网上，1%磷钨酸钠负染，置 30 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥箱中 30 min，取出进行 TEM 测试，取 Bor-Phl-ES 和 Phl-ES+10%冰片混悬液同法操作，结果见图 5。Phl-ES 和 Bor-Phl-ES 外貌呈类球形，Phl-ES+10%冰片的 TEM 图可观察到部分 Phl-ES 被破坏 (图 5-C 中箭头所示)，这可能是 Phl-ES+10%冰片包封率和载药量较低的原因。

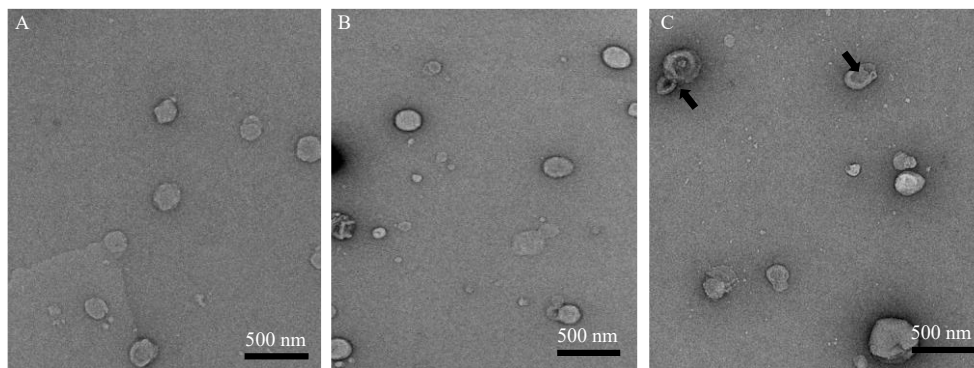


图 5 Phl-ES (A)、Bor-Phl-ES (B) 和 Phl-ES+10%冰片 (C) 的 TEM 图 (×15 000)

Fig. 5 TEM of Phl-ES (A), Bor-Phl-ES (B) and Phl-ES + 10% borneol (C) (× 15 000)

2.11 凝胶的制备

分别取 Bor-Phl-ES、Phl-ES 和 Phl-ES+10%冰片混悬液，按“2.1.2”项下方法操作，分别制备成凝胶。外观见图 6，Phl-ES 和 Bor-Phl-ES 混悬液乳光特征明显，但 Phl-ES+10%冰片混悬液有一定的浑浊。3 个样品凝胶倒置后均未发生流淌现象，黏度适中，易于涂展。

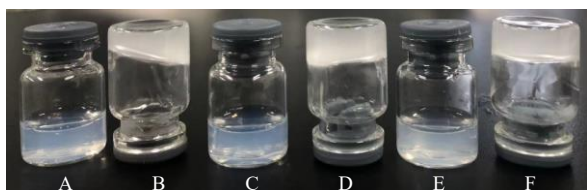


图 6 Phl-ES (A) 及其凝胶 (B)、Bor-Phl-ES (C) 及其凝胶 (D)、Phl-ES+10%冰片 (E) 及其凝胶 (F) 的外观

Fig. 6 Appearance of Phl-ES (A) and its gel (B), Bor-Phl-ES (C) and its gel (D), Phl-ES + 10% borneol (E) and its gel (F)

2.12 体外释药行为比较

取根皮素原料药分散至 31% 的丙二醇水溶液中，并按“2.1.2”项下方法制备根皮素凝胶。取根皮素凝胶、Phl-ES 凝胶、Phl-ES+10%冰片凝胶和 Bor-Phl-ES 凝胶适量（根皮素含量均为 2 mg），加入 pH 6.8 磷酸盐缓冲液（PBS，含 0.5% 聚山梨酯 80）2 mL 制备混悬液，并密封于透析袋（截留相对分子质量 8 000~14 000）中。采用 pH 6.8 PBS（含 0.5% 聚山梨酯 80）48 mL 作为介质，介质温度为 37 °C 后，转速为 75 r/min。0.25、0.50、1.00、1.50、2.00、3.00、4.00、6.00、8.00、10.00、12.00、18.00、24.00 h 分别取透析介质 2 mL，同时补充 2 mL 空白介质，进样测定根皮素质量浓度，计算各时间点累积释放率。

$$\text{累积释放率} = \sum_{i=1}^n VC_i/M$$

V 为释放介质体积 48 mL， C_i 为各时间点测得根皮素质量浓度， M 为药物总量

结果见图 7，根皮素凝胶 24 h 累积释放率仅为 34.16%，可能是由于原料药粒度大、溶解度较差所致^[18]。Phl-ES 凝胶、Bor-Phl-ES 凝胶和 Phl-ES+10%冰片凝胶 24 h 累积释放率分别提高至 77.96%、72.74%、71.18%。Phl-ES+10%冰片凝胶在 0~4 h 表现出一定的突释现象，可能是冰片破坏了部分 Phl-ES 结构，从而导致药物快速释放。Phl-ES 凝胶、Bor-Phl-ES 凝胶和 Phl-ES+10%冰片凝胶释药行为的模拟结果见表 8，均与 Higuchi 模型拟合度最高。

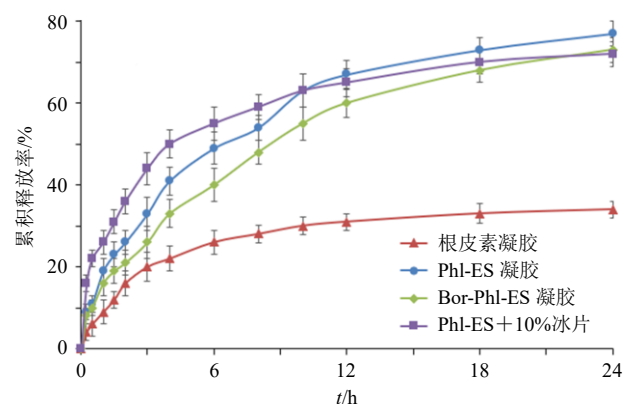


图 7 体外释药比较结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Comparison results of drug release ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.13 流变学研究

取 Phl-ES 凝胶、Bor-Phl-ES 凝胶和 Phl-ES+10%冰片凝胶作为单次应变扫描，测试温度为 37 °C，应变范围为 1.16%~211.56%，模式为震荡模式，频率为 5 Hz，平板直径为 35 mm，角频率 10 rad/s，结果见图 8，Phl-ES 凝胶、Bor-Phl-ES 凝胶和 Phl-ES+10%冰片凝胶的储能模量 (G') 均大于各自的损耗模量 (G'')，表明在应变范围内 (1.16%~211.56%) 可保持凝胶的稳定状态，具有固体弹性性质。

表 8 药物释放模型和相关系数

Table 8 Drug release fitting model and correlation coefficient

模型	Bor-Phl-ES 凝胶		Phl-ES 凝胶		Phl-ES+10%冰片凝胶	
	拟合方程	R ²	拟合方程	R ²	拟合方程	R ²
一级	$\ln(1-M_t/M_\infty)=-0.053 t-0.147$	0.908 5	$\ln(1-M_t/M_\infty)=-0.059 t-0.213$	0.909 3	$\ln(1-M_t/M_\infty)=-0.045 t-0.356$	0.756 0
Higuchi	$M_t/M_\infty=0.156 t^{1/2}+0.011$	0.975 9	$M_t/M_\infty=0.165 t^{1/2}+0.043$	0.977 6	$M_t/M_\infty=0.144 t^{1/2}+0.127$	0.875 9
Weibull	$\ln\ln[1-(1-M_t/M_\infty)]=0.676 \ln t-1.831$	0.992 5	$\ln\ln[1-(1-M_t/M_\infty)]=0.655 \ln t-1.585$	0.995 0	$\ln\ln[1-(1-M_t/M_\infty)]=0.488 \ln t-1.139$	0.987 4

M_t 为 t 时累积释放率, M_∞ 为 ∞ 时累积释放率, M_t/M_∞ 为 t 时间累积释放百分率。

M_t is accumulative drug-release at time t, M_∞ is accumulative drug-release at time ∞, M_t/M_∞ is accumulative release rate at time t.

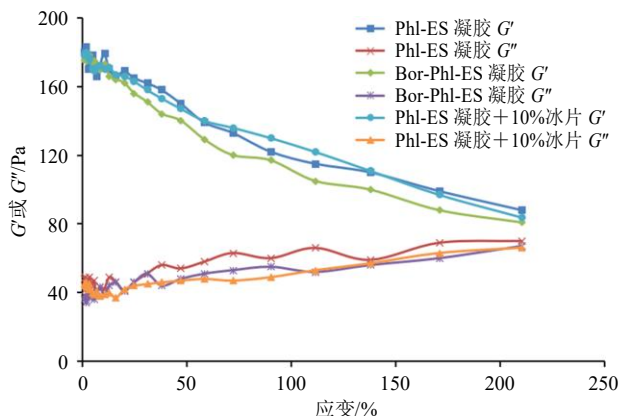


图 8 凝胶的模量-应变关系曲线

Fig. 8 Modulus-strain curve

2.14 稳定性研究

由于在 Phl-ES 混悬液中加入 10%冰片时不能形成澄清透明溶液,且冰片晶体会对 Phl-ES 结构造成较大破坏,稳定性较差,故 Phl-ES+10%冰片凝胶不再进行稳定性考察。取 Phl-ES 凝胶和 Bor-Phl-ES 凝胶密封置于 4 °C 冰箱中,分别于 0、10、20、30、45、60、90 d 取样观察外观,并测试粒径及黏度。结果显示,Phl-ES 凝胶和 Bor-Phl-ES 凝胶 90 d 时外观未发生变化,倒置后均未发生流淌现象,易于涂展,结果见图 9。粒径及黏度变化情况见表 9,

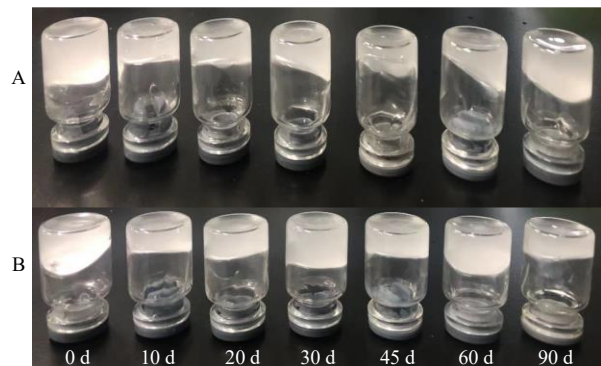


图 9 Phl-ES 凝胶 (A) 和 Bor-Phl-ES 凝胶 (B) 在 90 d 内外观

Fig. 9 Appearance of Phl-ES gel (A) and Bor-Phl-ES gel (B) in 90 d

表 9 稳定性结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 9 Results of stability ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

取样时间/d	Phl-ES凝胶		Bor-Phl-ES凝胶	
	粒径/nm	黏度/(Pa·s)	粒径/nm	黏度/(Pa·s)
0	151.77 ± 7.14	17.2 ± 1.7	183.67 ± 8.16	17.9 ± 1.6
10	149.24 ± 8.33	17.6 ± 1.1	178.84 ± 9.38	17.5 ± 1.3
20	157.65 ± 5.98	16.8 ± 0.9	186.41 ± 8.79	17.8 ± 0.9
30	155.81 ± 6.38	16.4 ± 0.8	177.79 ± 7.45	17.5 ± 1.1
45	171.04 ± 7.05	16.1 ± 1.3	188.04 ± 9.04	17.2 ± 1.5
60	199.14 ± 6.94	15.5 ± 1.0	205.33 ± 11.87	16.3 ± 0.8
90	224.75 ± 8.36	15.2 ± 1.5	239.68 ± 13.19	16.0 ± 0.9

粒径总体均呈增长趋势,但 90 d 后粒径仍小于 250 nm,黏度总体呈下降趋势,表明 Phl-ES 凝胶和 Bor-Phl-ES 凝胶密封储存于 4 °C 冰箱时稳定性良好。

2.15 体外透皮研究

2.15.1 实验方案 取健康 ICR 小鼠剔除腹部鼠毛,麻醉后颈部脱臼处死,立即剥离皮肤,除去皮下脂肪、筋膜等,生理盐水洗涤 5 次。取完整皮肤固定于 Franz 扩散池,并使角质层朝上。取根皮素凝胶、Phl-ES 凝胶、Phl-ES+10%冰片凝胶和 Bor-Phl-ES 凝胶,分别涂抹于角质层(使根皮素含量均为 1 mg),采用 pH 6.8 PBS (含 30% PEG 400) 作为接收液并排净气泡,磁力搅拌速率为 200 r/min,温度为 (37.0 ± 0.5) °C,于 0、2、4、6、8、10、12、24 h 取 0.5 mL 透皮样品,并补进同温度 0.5 mL 空白接收液。透皮样品经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定根皮素含量。

2.15.2 体外透皮结果 根据下式计算单位面积累积渗透量 (Q_n) 和透皮速率 (J) [19]。

$$Q_n = (C_n V_1 + \sum_{i=0}^{n-1} C_i V_2) / S$$

$$J = Q_n / \Delta t$$

C_n 代表 n 点根皮素质量浓度, V₁ 和 V₂ 分别代表接收池体积 12 mL 和取样体积 0.5 mL, S 为渗透面积 1 cm², C_i 为 i 处根皮素质量浓度, Δt 为时间间隔

各样品的 Q_n-t 曲线见图 10, 渗透参数见表 10。根皮素凝胶、Phl-ES 凝胶、Phl-ES+10%冰片凝胶和 Bor-Phl-ES 凝胶皮肤渗透均符合零级动力学特性。与根皮素凝胶相比, Phl-ES 凝胶、Phl-ES+10%冰片凝胶和 Bor-Phl-ES 凝胶的 J 分别提高至 2.69、3.38、4.32 倍; 24 h 单位面积累积渗透量分别提高至 2.63、3.47、4.17 倍, 均具有极显著性差异 ($P < 0.01$)。表明 Phl-ES 凝胶、Phl-ES+10%冰片凝胶和 Bor-Phl-ES 凝胶均具有较高的透皮能力, 且 Bor-Phl-ES 凝胶促透皮效果最佳。

2.15.3 皮肤滞留量 (Q_m) 测定 取下皮肤, 生理盐水洗 5 次, 剪碎后加入生理盐水 5 mL 匀浆, 加入

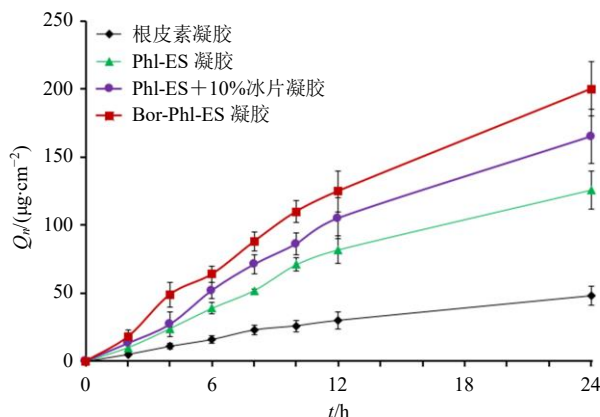


图 10 Q_n-t 曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Fig. 10 Q_n-t curves ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

表 10 渗透参数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 10 Permeation parameters ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

样品	拟合方程	r	$J/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1})$	$Q_{24}/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2})$	$Q_m/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2})$
根皮素凝胶	$Q_n = 2.103t + 2.504$	0.964 3	2.103	48.04 ± 5.79	67.10 ± 6.38
Phl-ES凝胶	$Q_n = 5.661t + 5.201$	0.963 9	5.661	$126.18 \pm 16.07^{**}$	$180.82 \pm 22.77^{**}$
Phl-ES+10%冰片凝胶	$Q_n = 7.111t + 6.213$	0.967 7	7.111	$166.57 \pm 17.12^{***\#}$	$191.89 \pm 16.13^{**}$
Bor-Phl-ES凝胶	$Q_n = 9.084t + 13.662$	0.972 8	9.084	$200.43 \pm 20.68^{***\#\Delta}$	$224.56 \pm 27.19^{**\#\Delta}$

与根皮素凝胶比较: $^{**}P < 0.01$; 与 Phl-ES 凝胶比较: $^{\#}P < 0.05$ $^{###}P < 0.01$; 与 Phl-ES+10%冰片凝胶比较: $^{\Delta}P < 0.05$ 。
 $^{**}P < 0.01$ vs phloretin gel; $^{\#}P < 0.05$ $^{###}P < 0.01$ vs Phl-ES gel; $^{\Delta}P < 0.05$ vs Phl-ES + 10% borneol gel.

5 mL 无水乙醇涡旋 1 min, 超声 25 min。再重复提取 1 次, 合并提取液, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 测定根皮素质量浓度 (C_m), 计算 Q_m , 结果见表 10。Phl-ES 凝胶、Phl-ES+10%冰片凝胶和 Bor-Phl-ES 凝胶 Q_m 分别提高至 2.69、2.86、3.35 倍, 均具有极显著性提高 ($P < 0.01$)。与 Phl-ES 凝胶相比, Phl-ES 凝胶+10%冰片 Q_m 虽有一定程度增加, 但无统计学意义 ($P > 0.05$)。与 Phl-ES 凝胶+10%冰片相比, Bor-Phl-ES 凝胶 Q_m 具有显著性增加 ($P < 0.05$)。

$$Q_m = C_m V / A$$

V 为体积, A 代表渗透面积

2.16 组织病理学检查

将离体皮肤固定于 Franz 扩散池, 使角质层朝上。分别将根皮素凝胶、Phl-ES 凝胶、Phl-ES+10%

冰片凝胶和 Bor-Phl-ES 凝胶涂布于皮肤角质层, 24 h 后取下皮肤, 生理盐水冲洗 3 遍, 采用 4% 多聚甲醛固定, 石蜡包埋, 制备纵向切片, 苏木精-伊红 (HE) 染色后镜检 (放大倍数为 200)。根皮素凝胶处理后皮肤角质层完整, 见图 11-A, 但 Phl-ES 凝胶、Phl-ES 凝胶+10%冰片和 Bor-Phl-ES 凝胶处理后皮肤结构发生较大变化, 分别见图 11-B~D, 角质层变薄甚至脱落。Phl-ES+10%冰片凝胶和 Bor-Phl-ES 凝胶对皮肤结构破坏作用大于 Phl-ES 凝胶, 真皮层胶原纤维排列疏松紊乱, 间隙变大, 更利于药物经皮渗透^[20-21]。

3 讨论

前期曾考虑采用超滤离心法测定 Bor-Phl-ES 包封率、载药量及冰片修饰率, 发现离心时可能破坏

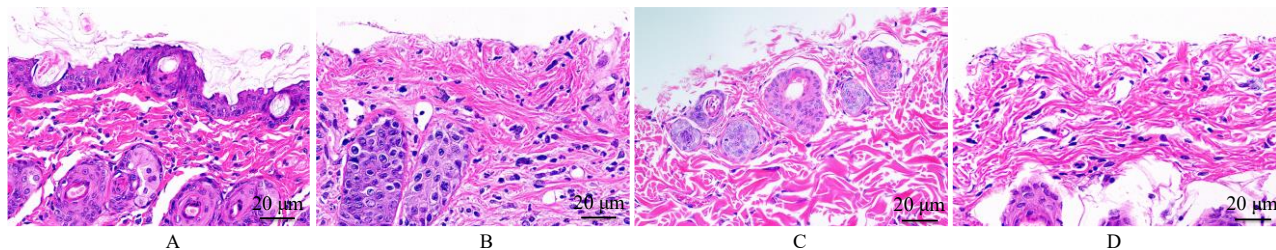


图 11 根皮素凝胶 (A)、Phl-ES 凝胶 (B)、Phl-ES+10%冰片凝胶 (C) 和 Bor-Phl-ES 凝胶 (D) 的 HE 染色结果
Fig. 11 HE staining results of phloretin gel (A), Phl-ES gel (B), Phl-ES + 10% borneol gel (C) and Bor-Phl-ES gel (D)

Bor-Phl-ES 结构, 进而影响测定结果。葡聚糖凝胶柱是基于分子筛原理实现对 Bor-Phl-ES 有效分离, 推测分离过程为^[22]Bor-Phl-ES 比游离药物分子大, 难以进入凝胶内部, 故先被洗脱出来; 游离药物(或冰片)分子小, 极易进入凝胶内部而后被洗脱出来, 最终使得 Bor-Phl-ES 和游离药物(或冰片)实现有效分离, 为准确测定包封率及冰片修饰率奠定基础。在测定 Phl-ES 和 Bor-Phl-ES 的粒径、 ζ 电位及 TEM 观察时, 配制与其处方中相同体积分数的丙二醇溶液作为稀释液, 可以避免因丙二醇迁移造成的测定误差^[5]。

在频率 40 kHz 的条件下, 超声功率超过 350 W 或超声时间超过 12 min 时, 可能破坏 Bor-Phl-ES 结构, 故确定超声功率和超声时间分别为 300 W 和 10 min。Phl-ES 包封率和载药量均高于 Bor-Phl-ES, 可能是 Bor-Phl-ES 处方中冰片与根皮素共同竞争磷脂双分子层空间, 导致载药能力下降。Bor-Phl-ES 粒径大于 Phl-ES, 可能与冰片包覆在 Bor-Phl-ES 表面有关^[17]。在 Phl-ES 混悬液中加入 10%冰片, 不能形成澄清透明的体系, 且包封率大幅下降, 可能是由于冰片水溶性较差, 直接加至 Phl-ES 混悬液时冰片的结晶容易对 Phl-ES 囊泡结构造成物理损伤^[12]; 另一方面冰片具有较强的脂溶性, 可能“入侵”Phl-ES 囊泡结构, 导致磷脂、胆固醇排列遭到破坏, 最终使药物泄露。卡波姆是凝胶剂常用基质材料, 卡波姆分子上羧基会因三乙醇胺加入而发生解离, 引起卡波姆分子间的排斥作用, 从而产生黏性^[23-24], 便于皮肤局部外用。

pH 值对凝胶状态影响较大, 采用三乙醇胺调节 pH 值为 7 时凝胶均匀性差, 结块现象明显; 调节 pH 值为 6 时凝胶虽易涂展, 但黏附性差, 倒置后易发生流淌现象; 调节 pH 值为 6.5 时所得凝胶状态较为理想, 倒置后无流淌现象, 涂抹于皮肤后无刺激性, 故确定 pH 值为 6.5。本研究采用挥发性低的丙二醇代替易挥发的乙醇来制备 Bor-Phl-ES, 利于增加 Bor-Phl-ES 凝胶贮存稳定性。考虑到 Bor-Phl-ES 凝胶处方中含有一定量的冰片, 故最终选择低温(4 °C)储存稳定性进行了考察, 结果显示 Phl-ES 凝胶和 Bor-Phl-ES 凝胶在低温环境中稳定性良好。

根皮素凝胶释放度较低, 可能与原料药溶解度较低、粒度大等有关^[5], 而 Phl-ES 凝胶和 Bor-Phl-ES 凝胶均提高了根皮素的累积释放率。Phl-ES 凝胶和 Bor-Phl-ES 凝胶在释药后期均表现出明显的持

续、缓释特点, 这与醇质体的脂质载体对根皮素的阻滞作用有关^[12]。Bor-Phl-ES 凝胶缓释效果优于 Phl-ES 凝胶, 可能是在 Bor-Phl-ES 处方中引入脂溶性的冰片与磷脂等脂质载体相容性良好, 利于在醇质体表面形成致密的包覆层, 对药物释放的阻滞作用大于无冰片修饰的 Phl-ES, 因而更利于形成药物储库, 发挥长效作用。Phl-ES+10%冰片凝胶在前期表现出一定的突释现象, 缓释作用低于 Bor-Phl-ES 凝胶。

由于聚山梨酯 80 具有促渗透作用, 为消除对透皮试验的影响, 在离体皮肤透皮试验接收液中加入 30% PEG 400。测得根皮素 pH 6.8 PBS(含 30% PEG 400)中溶解度为(527.86±2.11) μg/mL, 可达漏槽条件。与根皮素凝胶相比, Phl-ES 凝胶、Phl-ES+10%冰片凝胶和 Bor-Phl-ES 凝胶透皮速率、 Q_n 及 Q_m 均得到明显增加, 可能是醇质体中的醇类增加了根皮素的溶解度, 解决了经皮渗透瓶颈; 醇质体在一定程度上可影响角质层的脂质屏障, 利于增加药物经皮渗透; 醇质体处方中磷脂、丙二醇等辅料本身具有促透皮渗透作用^[14]; 醇质体粒径较小, 可携带药物穿过脂质间隙; 醇质体的磷脂双分子层结构与生物膜类似, 利于两者之间脂质融合, 促进药物经皮渗透^[6-7]。

Phl-ES+10%冰片凝胶和 Bor-Phl-ES 凝胶促渗透效果优于 Phl-ES 凝胶, 可能是由于冰片可破坏角质层有序结构及脂质的氢键网络, 真皮层组织间隙变大, 进一步减弱了皮肤的屏障作用^[8,12-13], 使药物更易透过, 提高了药物渗透效率; 冰片可扩张皮下毛细血管、降低组织中 P-糖蛋白表达水平^[25], 最终进一步促进药物经皮渗透, 证明在处方中引入冰片来进一步促进药物经皮渗透是可行的^[15,26]。Bor-Phl-ES 凝胶促渗透效果优于 Phl-ES+10%冰片凝胶, 可能是由于将冰片直接分散于 Phl-ES 混悬液时, 冰片并未充分包覆在醇质体表面, 影响了协同促渗透效果^[26], 且冰片对醇质体结构造成较大破坏, 因而影响了渗透作用。综上, 本研究完成了 Bor-Phl-ES 混悬液及其凝胶制剂的制备、体外释药行为、皮肤渗透性评价及稳定性评价等, 为评价其成药性提供了数据支持, 也为后续研究其药动学、药效学等奠定了实验基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Kum H, Roh K B, Shin S, *et al.* Evaluation of anti-acne

- properties of phloretin *in vitro* and *in vivo* [J]. *Int J Cosmet Sci*, 2016, 38(1): 85-92.
- [2] Oresajo C, Stephens T, Hino P D, *et al.* Protective effects of a topical antioxidant mixture containing vitamin C, ferulic acid, and phloretin against ultraviolet-induced photodamage in human skin [J]. *J Cosmet Dermatol*, 2008, 7(4): 290-297.
- [3] Anunciato Casarini T P, Frank L A, Pohlmann A R, *et al.* Dermatological applications of the flavonoid phloretin [J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 889: 173593.
- [4] Abkin S V, Ostroumova O S, Komarova E Y, *et al.* Phloretin increases the anti-tumor efficacy of intratumorally delivered heat-shock protein 70kDa (HSP70) in a murine model of melanoma [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2016, 65(1): 83-92.
- [5] 荆玲, 范炎峰, 范金点, 等. 根皮素醇质体的制备、表征及对外透皮吸收的影响 [J]. 中国医院药学杂志, 2021, 41(16): 1653-1657.
- [6] 熊传爽, 田黎明, 洪怡, 等. 橙皮苷脂质体凝胶的制备及其透皮吸收研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2022, 42(5): 511-518.
- [7] 黄珊, 翟秉涛, 杨洁, 等. 根皮素磷脂复合物的制备、表征及体内外溶出行为评价 [J]. 中草药, 2021, 52(18): 5543-5551.
- [8] Phatale V, Vaiphei K K, Jha S, *et al.* Overcoming skin barriers through advanced transdermal drug delivery approaches [J]. *J Control Release*, 2022, 351: 361-380.
- [9] 甘怀欣, 李利. 皮肤给药的经皮吸收与测量技术研究进展 [J]. 药物评价研究, 2023, 46(11): 2457-2466.
- [10] Yücel Ç, Şeker Karatoprak G, Değim İ T. Anti-aging formulation of rosmarinic acid-loaded ethosomes and liposomes [J]. *J Microencapsul*, 2019, 36(2): 180-191.
- [11] Abd El-Alim S H, Kassem A A, Basha M, *et al.* Comparative study of liposomes, ethosomes and transfersomes as carriers for enhancing the transdermal delivery of diflunisal: *In vitro* and *in vivo* evaluation [J]. *Int J Pharm*, 2019, 563: 293-303.
- [12] 霍雨佳, 谷娟, 呼胜楠, 等. 冰片修饰的胡椒碱醇质体的制备、表征及透皮吸收研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2024, 44(6): 663-670.
- [13] 许沅瑜, 陈渝旭, 张婧卿, 等. 冰片作为促渗剂在功效化妆品中的应用进展 [J]. 日用化妆品科学, 2023, 46(10): 57-60.
- [14] 张楠, 宋辉, 汪志强, 等. 冰片修饰的秋水仙碱醇质体的制备及体外扩散性评价 [J]. 中国药房, 2018, 29(7): 902-906.
- [15] Kuznetsov D M, Kuznetsova D A, Zakharova L Y. Liposomes modified with borneol-containing surfactants for transdermal delivery of hydrophilic substrates [J]. *Russ Chem Bull*, 2022, 71(9): 1887-1896.
- [16] 禹瑞, 杨璞, 崔晓鸽, 等. 根皮素前体脂质体制备及其体内药动学研究 [J]. 中成药, 2023, 45(10): 3173-3179.
- [17] 张体鹏, 决利利. 白屈菜红碱 2 种脂质体的制备和口服生物利用度比较 [J]. 中草药, 2023, 54(17): 5568-5579.
- [18] 王柯静, 决利利, 常宝珠, 等. 柠檬苦素纳米混悬剂和冻干粉的制备及体外评价 [J]. 中国医院药学杂志, 2023, 43(13): 1471-1478.
- [19] 曹凤媚, 胡等慧. 丹酚酸 B-丹参酮 II_A-甘草次酸微乳凝胶微针透皮给药的评价 [J]. 药物评价研究, 2022, 45(10): 2039-2048.
- [20] 颜红, 高司琪, 骆慧婷, 等. 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 [J]. 中草药, 2023, 54(18): 5867-5879.
- [21] 王萌萌. 盐酸小檗碱脂质体凝胶的制备及其对湿疹的初步药效学评价 [D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2023.
- [22] 武晨思, 耿丹丹, 王春艳, 等. 阿瑞吡坦磷脂复合物静注亚微乳的制备及质量评价 [J]. 沈阳药科大学学报, 2022, 39(10): 1165-1173.
- [23] 卢玉洁, 周珊珊, 单钰君, 等. 全缘千里光碱脂质体及其凝胶剂的皮肤渗透研究与机制探讨 [J]. 中草药, 2023, 54(11): 3459-3467.
- [24] 李喻. 夫西地酸微乳凝胶的制备与体外抗菌活性研究 [J]. 药物评价研究, 2022, 45(11): 2269-2275.
- [25] Li J X, Xie Q, Ma R, *et al.* Recent progress on the synergistic antitumor effect of a borneol-modified nanocarrier drug delivery system [J]. *Front Med*, 2021, 8: 750170.
- [26] Zhang YJ, Zhang N, Song H, *et al.* Design, characterization and comparison of transdermal delivery of colchicine via borneol chemically-modified and borneol-physically modified ethosome [J]. *Drug Deliv*, 2019, 26(1): 70-77.

[责任编辑 郑礼胜]