

薄荷素油鼻黏膜保湿微乳的制备及其黏膜黏附性和纤毛毒性研究^Δ

荀波娜^{1*}, 毕青玲², 谢茵¹, 李萍¹, 杨丽¹, 毕小平^{1#}(1.山西医科大学药学院,太原 030001;2.中日友好医院耳鼻喉科,北京 100029)

中图分类号 R917;R94;R96 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)12-1644-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.12.12

摘要 目的:制备薄荷素油鼻黏膜保湿微乳,并对其黏膜黏附性和纤毛毒性进行考察。方法:以聚氧乙烯氢化蓖麻油为乳化剂制备薄荷素油鼻黏膜保湿微乳,基于综合评分以正交设计法优化微乳的制备工艺;对所制微乳进行表征并采用气相色谱法测定薄荷醇含量;通过测定蟾蜍在体纤毛传输速率评价其黏膜黏附性,测定蟾蜍离体纤毛持续运动时间以评价其纤毛毒性。结果:自制微乳的优化制备工艺为先将薄荷素油与乳化剂分散,再加入无水乙醇、食用甘油、蒸馏水混合后,于1 200 r/min的转速下搅拌2 h。3批自制微乳中薄荷醇的平均含量为2.682、2.507、2.496 mg/mL,RSD为2.89%($n=3$)。自制微乳高、中、低剂量组(以薄荷醇计2.561、0.256、0.128 mg/mL)蟾蜍在体上颌纤毛传输速率分别为(0.65±0.01)、(0.78±0.03)、(0.92±0.04)cm/min,显著低于生理盐水组和复方薄荷脑滴鼻液组($P<0.05$);蟾蜍离体上颌纤毛运动时间分别为(206.7±4.9)、(226.0±13.5)、(269.3±12.9)min,显著长于去氧胆酸钠组($P<0.05$)。结论:自制微乳的制备工艺可行、质量可控,其黏膜黏附性较好,无纤毛毒性。

关键词 薄荷素油;鼻黏膜;保湿;微乳;工艺优化;黏附性;纤毛毒性

Preparation of Peppermint Oil Moisturizing Microemulsion for Nasal Mucosa and Study on Its Mucosal Adhesion and Cilia Toxicity

XUN Bona¹, BI Qingling², XIE Yin¹, LI Ping¹, YANG Li¹, BI Xiaoping¹(1. School of Pharmacy, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China; 2. Dept. of Otolaryngology, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To prepare the Peppermint oil moisturizing microemulsion for nasal mucosa and survey its mucosal adhesion and cilia toxicity. **METHODS:** The polyoxyethylene hydrogenated castor oil was used as emulsifier to prepare the Peppermint oil moisturizing microemulsion for nasal mucosa, and the preparation technology was optimized on the basis of comprehensive score by orthogonal design. The microemulsion was characterized and the menthol content was determined by GC.

- 97-98.
- [8] 倪力军,张立国,张超,等.挥发性成分精馏-萃取耦合的提取装置及其提取方法:中国,CN101979117A[P].2011-02-23.
- [9] 张金莲,刘明贵,钟凌云,等.枳壳挥发油提取工艺优选及其化学成分GC-MS分析[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(19):27-31.
- [10] 张跃飞,李鑫,孟宪生,等.香附挥发油的生物活性及其GC-MS分析[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(14):32-35.
- [11] 杨艳,韦余,王玉和,等.黔产毛茛挥发油的提取工艺优化及化学成分分析[J].中国药房,2016,27(31):4421-4424.
- [12] 陈斯玮,王芳,章卓,等.Box-Behnken响应面法优化川佛手挥发油的超临界CO₂萃取工艺[J].中国药房,2016,27(28):3973-3975.
- [13] 李静,熊维政,李磊,等.2种不同方法提取艾叶挥发油的效果比较[J].中国药房,2016,27(28):3982-3984.
- [14] 王晓影,杨宇杰,张立国,等.提取-共沸精馏耦合工艺提取川芎挥发油的研究[J].中国中药杂志,2009,34(21):2734-2737.
- [15] 药佩珍,邓凯,褚秀玲,等.精馏分离方法及其应用研究进展[J].山东化工,2009,38(12):24-27.
- [16] 何英杰,刘东波,唐其,等.酸橙类中药材枳实和枳壳化学成分研究进展[J].中药材,2017,40(6):1488-1494.
- [17] 徐燕,李大祥,凌铁军,等.香附化学成分研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(11):214-218.

Δ 基金项目:山西省科学技术厅应用基础研究项目(No.201801D221070)

* 硕士研究生。研究方向:高分子材料在药学中的应用。电话:0351-3985190。E-mail:791285117@qq.com

通信作者:教授,硕士生导师。研究方向:高分子材料在药学中的应用。电话:0351-3985190。E-mail:bixping@163.com

(收稿日期:2018-11-07 修回日期:2019-02-20)

(编辑:余庆华)

The mucosal adhesion was evaluated by measuring the transport rate by cilia *in vivo*, and the cilia toxicity of microemulsion was evaluated by measuring the sustained movement time of cilia *in vitro*. RESULTS: The optimal preparation technology of self-made microemulsion was to firstly disperse the peppermint oil and the emulsifier, then add anhydrous ethanol, edible glycerin and distilled water, and stir at 1 200 r/min for 2 h. The average contents of menthol in the three batches of the microemulsion were 2.682, 2.507 and 2.496 mg/mL (RSD=2.89%, $n=3$), respectively. The cilia transport rates *in vivo* were (0.65 ± 0.01) , (0.78 ± 0.03) and (0.92 ± 0.04) cm/min in high-dose, medium-dose, and low-dose groups of self-made microemulsion (2.561, 0.256, 0.128 mg/mL of menthol) respectively, which were significantly lower than normal saline group and compound menthol nasal droups ($P<0.05$). The cilia movement time *in vitro* were (206.7 ± 4.9) , (226.0 ± 13.5) , (269.3 ± 12.9) min, which were significantly longer than sodium deoxycholate group ($P<0.05$). CONCLUSIONS: The preparation technology of self-made microemulsion is easy-to-handle and controllable in quality. The prepared microemulsion shows good mucosal adhesion without cilia toxicity.

KEYWORDS Peppermint oil; Nasal mucosa; Moisturizing; Microemulsion; Technology optimization; Adhesion; Cilia toxicity

近年来,因雾霾现象频发,空气质量下降,加之临床鼻腔收缩剂的滥用或长期吸氧等因素刺激,都可能引起鼻黏膜干燥,甚至造成鼻出血或干燥性鼻炎,导致相关疾病的发生率明显上升^[1-2]。鼻腔作为人体呼吸的第一道关口,当外界寒冷、干热、污染物或致病源入侵时,鼻黏膜局部会受到刺激,严重时可能导致肿胀、鼻道变窄、呼吸不畅、纤毛运动不规律等,甚至会引发上呼吸道感染、过敏等症状,诱发呼吸道疾病的发作^[3-4]。因此,鼻黏膜的保湿护理显得尤为重要。复方薄荷脑滴鼻液是治疗干燥性和萎缩性鼻炎的一种常用制剂,临床应用时发现其存在刺激性强、通透性差、用药顺应性差等问题^[5-7]。其中,薄荷素油为唇形科植物薄荷(*Mentha haplocalyx* Briq.)的新鲜茎和叶经加工得到的挥发油,具有特殊的清凉香气,具有润滑鼻黏膜、刺激神经末梢、促进鼻黏膜恢复分泌等功能^[8]。但薄荷素油直接作用于鼻腔会产生较大的刺激性。微乳因黏度低、生物利用度高、易于吸收及靶向释放等特点,被广泛用于医药、日用化学工业、食品工业等领域^[9-11]。本研究尝试采用微乳化技术将薄荷素油进行包裹以降低其挥发性与减轻其刺激性,佐以甘油为保湿剂,制备成水包油型(O/W)保湿微乳,并对该微乳的黏膜黏附性和纤毛毒性进行评价,以期为相应鼻黏膜保湿产品的开发与应用提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器

7890A型气相色谱仪(包括氢火焰离子化检测器,美国Agilent公司);Nano-ZS90型激光纳米粒度仪(英国Malvern公司);JEM-1011型透射电子显微镜(日本JEOL公司);IKAC-MAG HS4型加热磁力搅拌器(上海珂淮仪器有限公司);HH-2型数显恒温水浴锅(上海浦东物理光学仪器厂);WGZ-200型散射光浊度仪(上海昕瑞仪器仪表有限公司);AR323CN型电子天平[奥豪斯仪器(常州)有限公司];XS205型十万分之一天平(瑞士Mettler-Toledo公司);HJ-6B型数显多头磁力恒温搅拌器(金

坛市白塔金昌实验仪器厂);KQ-50DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);SC-2554型低速离心机、HC-2064型高速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司);UB203i型正置生物显微镜(重庆澳浦光电技术有限公司);XW-80A型旋涡混合器(上海琪特分析仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

复方薄荷脑滴鼻液[民航总医院自制,批号:20170424,规格:10 mL(含薄荷脑0.1 g、樟脑0.1 g)];保湿微乳(批号:20180720-1、20180720-2、20180720-3、20180729-1、20180729-2、20180729-3)与空白微乳(批号:20180719)均由山西医科大学药学院药物分析研究室自制);薄荷醇对照品(北京索莱宝科技有限公司,批号:1025A022、1025A023,纯度: $\geq 98\%$);水杨酸乙酯(东京化成工业株式会社,批号:DPQEC RA);薄荷素油(吉安市国光香料厂,批号:20180112);聚氧乙烯氢化蓖麻油(CO-40,山东优索化工科技有限公司,批号:S12715135,纯度:99%);食用甘油(郑州特正商贸有限公司,批号:20150825);氯化钠注射液(石家庄四药有限公司,批号:20170117);去氧胆酸钠(上海金穗生物科技有限公司,批号:20180322);甲醇为色谱纯,无水乙醇、无水硫酸钠为分析纯,水为蒸馏水。

1.3 动物

健康中华大蟾蜍66只,普通级,雌雄不限,体质量为30~40 g,由山西医科大学实验动物中心提供[动物生产许可证号:SCXK(晋)2015-0001]。

2 方法与结果

2.1 鼻黏膜保湿微乳的制备

按处方设计比例精密量取薄荷素油、CO-40、无水乙醇、食用甘油、蒸馏水等各组分量,将CO-40于40℃水浴条件下熔融,在室温下滴加薄荷素油,磁力搅拌(转速:1 200 r/min)均匀,使薄荷素油均匀分散于乳化剂CO-40中;加入无水乙醇、食用甘油、蒸馏水,继续搅拌、

分散 2 h, 即得 O/W 型薄荷素油鼻黏膜保湿微乳。

2.2 微乳的表征

2.2.1 外观性状 在 20 ℃、非阳光直射的条件下观察自制微乳的外观, 重点观察其清澈度及均匀度。结果, 自制微乳为无色透明、均一的澄清微乳体系, 且具有一定的薄荷香味。

2.2.2 粒径、多分散指数(PDI)及 Zeta 电位 微乳的粒径在 10~100 nm 为宜; PDI 越小, 粒径分布越均一; 而 Zeta 电位绝对值越大, 体系越稳定。取自制微乳 200 μL, 置于 10 mL 具塞刻度试管中, 加水定容, 旋涡混合均匀。采用激光纳米粒度仪分别测定自制微乳的粒径、PDI 及 Zeta 电位。结果, 自制微乳平均粒径为 (16.62 ± 0.07) nm, 平均 PDI 为 (0.269 ± 0.06), 平均 Zeta 电位为 (-14.9 ± 0.18) mV。

2.2.3 微观形态 在 20 ℃ 条件下, 将自制微乳稀释适当倍数后, 采用 2% 磷钨酸负染法制备透射电镜样品并进行测定。透射电镜观察结果显示, 自制微乳粒子形态完整, 粒径在 10~100 nm 之间, 详见图 1。

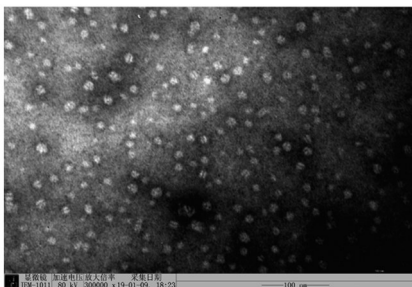


图 1 鼻黏膜保湿微乳透射电镜图

Fig 1 TEM micrograph of moisturizing microemulsion for nasal mucosa

2.2.4 稳定性 取自制微乳 1.0 mL, 置于 1.5 mL 离心管中, 以 10 000 r/min 离心 15 min。结果, 自制微乳未出现分层、絮凝、破乳油相析出等现象, 说明其稳定性良好。

2.2.5 浊度 取自制微乳适量, 按散射光浊度仪要求操作, 测定其浊度。结果, 自制微乳平均浊度为 (1.16 ± 0.09) NTU, 表明其体系澄清, 属于低浊度液体制剂。

2.3 微乳制备工艺优化

2.3.1 正交试验设计 依据前期单因素试验考察结果, 以搅拌速度(A, r/min)、搅拌时间(B, h)和加料方式(C)为影响因素, 3 因素 3 水平设计见表 1 (注: 加料方式中 a 法是指将油分散于乳化剂中, 再加入其他成分; b 法是指将油分散于助乳化剂中, 再加入其他成分; c 法是指直接将各成分混匀)。

2.3.2 多指标综合评分法评价微乳制备工艺 根据正交设计的 $L_9(3^3)$ 方案进行试验, 采用“2.2”项下的粒径、PDI、Zeta 电位、浊度等指标, 运用多指标综合加权评分法^[2]对试验结果进行数据处理和评价分析。综合评分

表 1 正交试验设计因素与水平

Tab 1 Factors and levels of orthogonal design

水平	因素		
	A, r/min	B, h	C
1	800	1.0	a 法
2	1 200	1.5	b 法
3	1 600	2.0	c 法

计算公式^[13]:

$$\text{综合评分} = \frac{\text{Zeta 电位绝对值}}{\text{Zeta 电位绝对值最大值}} \times 40 + \frac{\text{PDI 最小值}}{\text{PDI 结果}} \times 30 + \frac{\text{浊度最小值}}{\text{浊度结果}} \times 30$$

综合评分越高工艺越好, 若综合评分大于 90 分以上, 则说明其工艺佳、稳定、可靠。每个方案平行试验 3 次, 结果见表 2。

表 2 正交试验设计方案与结果 (n=3)

Tab 2 Scheme and results of orthogonal design (n=3)

方案	因素			平均浊度, NTU	平均 PDI	平均 Zeta 电位, mV	平均粒径, nm	综合评分
	A	B	C					
1	1	1	1	1.48	0.172	-11.56	18.68	82.4
2	1	2	2	1.56	0.249	-8.62	16.32	65.2
3	1	3	3	1.82	0.231	-10.14	14.48	66.9
4	2	1	2	1.66	0.226	-6.62	14.52	60.4
5	2	2	3	1.58	0.154	-6.36	28.30	70.5
6	2	3	1	1.28	0.162	-15.70	15.78	98.5
7	3	1	3	1.60	0.214	-11.20	14.51	74.1
8	3	2	1	1.48	0.200	-8.36	14.42	70.4
9	3	3	2	1.62	0.214	-7.84	14.66	65.3
K_1	71.5	72.3	83.8					
K_2	76.5	68.7	63.6					
K_3	69.9	76.9	70.5					
R	6.6	8.2	20.2					

由表 2 可知, 3 个因素影响顺序为 C (加料方式) > B (搅拌时间) > A (搅拌速度)。通过直观分析, 得出优化的制备工艺为 $A_2B_3C_1$, 即采用油与乳化剂先均匀分散, 再加入其他成分的加料方式, 于 1 200 r/min 转速下搅拌 2 h。

2.3.3 工艺验证试验 按照“2.3.2”项下优化的制备工艺, 平行制备 3 批保湿微乳 (批号: 20180720-1、20180720-2、20180720-3), 按前述方法测定各项指标后进行综合评分, 结果见表 3。

表 3 验证试验结果 (n=3)

Tab 3 Results of validation test (n=3)

批号	外观与稳定性	平均粒径, nm	平均 PDI	平均 Zeta 电位, mV	平均浊度, NTU	综合评分
20180720-1	无色透明澄清, 离心不分层	14.12	0.185	-16.20	1.27	96.5
20180720-2	无色透明澄清, 离心不分层	14.03	0.187	-15.90	1.27	95.4
20180720-3	无色透明澄清, 离心不分层	14.10	0.198	-15.00	1.28	91.5
RSD, %		0.34	3.68	3.98	0.45	2.78

由表 3 可见, 按照优化工艺制备薄荷素油鼻黏膜保湿微乳, 不同批次间的粒径、PDI、Zeta 电位、浊度等指标

变化均很小,其RSD为0.34%~3.98% ($n=3$),综合评分为91.5~96.5,表明优化工艺稳定、可行。

2.4 微乳中薄荷醇的含量测定

2.4.1 色谱条件 色谱柱:TP-FFAP毛细管柱(30 m×0.32 mm,0.25 μm);升温程序:初始温度为60 ℃,保持2 min,以20 ℃/min的速度升至100 ℃,保持1 min,再以12 ℃/min的速度升至180 ℃,保持1 min;进样口温度:250 ℃;检测器:氢火焰离子化检测器(FID);检测器温度:250 ℃;载气:氮气(纯度:99.99%);流速:3 mL/min;进样量:1 μL;分流比:10:1。

2.4.2 溶液的制备 ①对照品溶液。精密称取薄荷醇对照品73.20 mg,置于20 mL量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制成质量浓度为3.660 mg/mL的薄荷醇对照品溶液。②内标溶液。取水杨酸乙酯2.024 g,置于20 mL量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得质量浓度为0.101 2 g/mL的内标溶液,备用。③供试品溶液。精密量取自制微乳(批号:20180729-1)2 mL,加入无水硫酸钠1.0 g,摇匀,超声(功率:50 W,频率:40 kHz)处理20 min,50 ℃水浴,约20 min后油水分层破裂;取上层,加甲醇溶解,以4 000 r/min离心20 min,取上清液,加内标溶液(水杨酸乙酯)100 μL,用甲醇定容至3 mL,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。④空白对照溶液。精密量取空白微乳2 mL,按本项下“③供试品溶液”方法处理,即得。

2.4.3 系统适用性试验 精密量取“2.4.2”项下对照品溶液、供试品溶液、空白对照溶液各适量,按“2.4.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,详见图2。结果显示,色谱峰峰形对称,薄荷醇峰与样品中的各组分达到基线分离,其他组分对待测组分的测定无干扰;以薄荷醇峰计理论板数为62 643,薄荷醇与相邻两峰分离度分别为3.189和12.80。

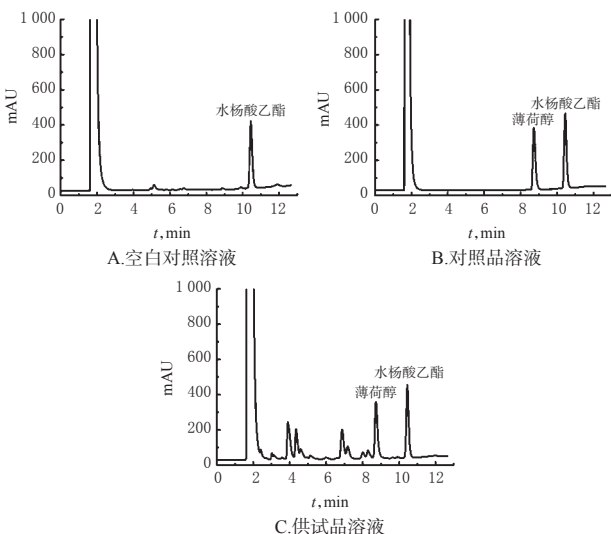


图2 气相色谱图

Fig 2 GC chromatograms

2.4.4 线性关系考察 精密吸取薄荷醇对照品溶液75、150、225、300、375、750、1 125 μL,均精密加入内标溶液50 μL,再分别精密加入甲醇1 375、1 300、1 225、1 150、1 075、700、325 μL至1.5 mL,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,按“2.4.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以薄荷醇质量浓度(x)为横坐标、薄荷醇峰面积与内标峰面积之比(y)为纵坐标进行线性回归,得薄荷醇回归方程为 $y=0.482 6x-0.018 1$ ($r=0.999 5$)。结果表明,薄荷醇检测质量浓度在0.183~2.745 mg/mL范围内与其峰面积和内标峰面积之比呈良好的线性关系。

2.4.5 定量限与检测限考察 精密量取“2.4.2”项下对照品溶液适量,以甲醇逐步稀释,按“2.4.1”项下色谱条件进样测定6次,记录峰面积。当信噪比为3:1时,得检测限为0.048 8 mg/mL;当信噪比为10:1时,得定量限为0.162 7 mg/mL。

2.4.6 精密度试验 取“2.4.4”项下高、中、低质量浓度(1.830、0.915、0.366 mg/mL)的薄荷醇对照品溶液各适量,于同日内早、中、晚3个时间点分别取样,并连续3 d于同一时间点分别取样,按“2.4.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,高、中、低质量浓度日内精密度RSD分别为2.85%、2.21%、1.34% ($n=3$),日间精密度RSD分别为2.50%、2.96%、1.19% ($n=3$)。

2.4.7 稳定性试验 取“2.4.2”项下供试品溶液(批号:20180729-1)适量,分别在室温下放置0、0.5、1、2、4、6、10、12、24 h时取样,按“2.4.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,平行测定3次。结果,薄荷醇峰面积的RSD为2.99% ($n=9$),说明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。

2.4.8 重复性试验 取自制微乳(批号:20180729-1)适量,共6份,按“2.4.2”项下“③供试品溶液”方法配制溶液,按“2.4.1”项下色谱条件进样测定,并按标准曲线法计算样品含量,平行测定3次。结果,样品中薄荷醇的平均含量为2.535 mg/mL,RSD为2.25% ($n=6$),说明该方法重复性良好。

2.4.9 加样回收率试验 精密量取同一批次(批号:20180729-1)的自制微乳1.0 mL,按“2.4.2”项下“③供试品溶液”方法对微乳进行前处理制备得样品溶液,分别加入高、中、低浓度(120%、100%、80%)的薄荷醇对照品溶液,加甲醇定容至3 mL,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,按“2.4.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算加样回收率。结果,加样回收率在94.44%~104.14%之间,平均加样回收率为98.73%,RSD为3.26% ($n=9$),说明该方法准确可靠,结果见表4。

表4 加样回收率试验结果(n=9)

Tab 4 Results of recovery tests(n=9)

样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
2.559 9	2.049 6	4.547 1	96.96		
2.559 9	2.049 6	4.590 4	99.07		
2.559 9	2.049 6	4.558 2	97.50		
2.559 9	2.562 0	4.979 5	94.44		
2.559 9	2.562 0	5.201 2	103.09	98.73	3.26
2.559 9	2.562 0	5.017 6	95.93		
2.559 9	3.074 4	5.636 9	100.08		
2.559 9	3.074 4	5.554 1	97.39		
2.559 9	3.074 4	5.761 6	104.14		

2.4.10 样品含量测定 取3批自制微乳(批号:20180729-1、20180729-2、20180729-3)各适量,共6份,按“2.4.2”项下“③供试品溶液”方法配制溶液,按“2.4.1”项下色谱条件进样测定并计算样品含量。结果,3批自制微乳中薄荷油的含量(以薄荷醇计)分别为2.682、2.507、2.496 mg/mL, RSD为2.89% (n=3),说明自制微乳的质量稳定、可控。

2.5 微乳对蟾蜍黏膜的黏附性试验

取健康中华大蟾蜍30只,随机分为阴性组、阳性组和自制微乳高、中、低剂量组,每组6只。探针破坏蟾蜍脊髓后使其仰卧固定,止血钳拉伸口腔裸上颚,阴性组蟾蜍上腭部位给予生理盐水,阳性组蟾蜍上腭部位给予复方薄荷脑滴鼻液,自制微乳高、中、低剂量组蟾蜍上腭部位给予自制微乳(以薄荷醇计2.561、0.256、0.128 mg/mL),给药体积均为0.5 mL,使上腭部位完全被浸没。5 min后,吸干受试液,用镊子将约0.1~0.3 cm长的铅笔芯置于蟾蜍上腭两眼窝前缘间的黏膜上,观察铅笔芯沿黏膜纤毛缓慢向咽部移动的情况,用秒表记录铅笔芯移动1 cm所需时间作为纤毛传输时间,计算黏膜纤毛传输速率及相对传输速率(相对传输速率=受试组纤毛传输速率/阴性组纤毛传输速率)^[14-17],纤毛传输速率越慢或相对传输速率越小,则受试物可较长滞留在鼻腔内部,黏膜黏附性越强,以此评价不同受试物的黏膜黏附性差异,结果见表5。

表5 蟾蜍黏膜在体纤毛的传输时间与传输速率(n=6)

Tab 5 Results of cilia transport time and rate of mucosa in vivo of toad(n=6)

组别	纤毛传输时间,s	纤毛传输速率,cm/min	相对传输速率
阴性组	50.67±1.53	1.18±0.04	1.00
阳性组	52.33±1.53	1.15±0.03	0.97
自制微乳高剂量组	91.67±1.53 ^a	0.65±0.01 ^a	0.55 ^a
自制微乳中剂量组	77.33±2.52 ^a	0.78±0.03 ^a	0.66 ^a
自制微乳低剂量组	62.33±3.06 ^a	0.92±0.04 ^a	0.78 ^a

注:与阴性组比较,*P<0.05;与阳性组比较:^aP<0.05

Note: vs. negative group, *P<0.05; vs. positive group, ^aP<0.05

由表5可见,自制微乳高、中、低剂量组的相对传输速率是阴性组的0.55、0.66、0.78倍,差异均有统计学意

义(P<0.05);且剂量越大,其对黏膜的黏附性越强(即传输速率越低)。自制微乳各剂量组与阳性组比较,差异均具有统计学意义(P<0.05)。而阳性组与阴性组比较,差异无统计学意义(P>0.05)。结果表明,自制微乳在黏膜表面的滞留时间明显延长,具有较强的黏膜黏附性,且优于复方薄荷脑滴鼻液。

2.6 微乳对蟾蜍纤毛的毒性试验

取健康中华大蟾蜍36只,随机分为阴性组、阳性组、毒性组和自制微乳高、中、低剂量组,每组6只。按照“2.5”项下“探针破坏蟾蜍脊髓……,使上腭部位完全被浸没”同法操作新增毒性组给予1%去氧胆酸溶液),30 min后,用生理盐水洗净药物,用眼科手术剪分离蟾蜍两眼之间的黏膜(3 mm×3 mm),用生理盐水洗净血块及杂物,黏膜面向上平铺于载玻片上,于黏膜表面滴加0.2 mL生理盐水,轻轻盖上盖玻片,于400倍光学显微镜下观察纤毛运动情况,记录从给药至纤毛停止运动所持续的时间,即纤毛持续运动时间(PVD);以各给药组的PVD除以阴性组的PVD,计算纤毛持续运动百分率(PPV)^[14-17],详见表6。

表6 蟾蜍离体纤毛的PVD和PPV(n=6)

Tab 6 Duration and percentage of cilia sustained movement in vitro(n=6)

组别	PVD,min	PPV,%
阴性组	230.7±5.0 ^a	100
阳性组	211.7±16.6 ^a	91.8
毒性组	69.0±5.6	29.9
自制微乳高剂量组	206.7±4.9 ^a	89.6
自制微乳中剂量组	226.0±13.5 ^a	98.0
自制微乳低剂量组	269.3±12.9 ^a	116.8

注:与毒性组比较,*P<0.05

Note: vs. toxicity group, *P<0.05

由表6可见,各组的PVD及PPV由高到低排序均为自制微乳低剂量组>阴性组>自制微乳中剂量组>阳性组>自制微乳高剂量组>毒性组。PPV越长或PVD越大,受试物对纤毛运动的影响越小,对纤毛毒性也越小。与毒性组比较,其余各组的PVD均显著延长,差异均有统计学意义(P<0.05),其中自制微乳高、中、低剂量组表现出剂量依赖趋势,剂量越低,毒性越小,自制微乳低剂量组纤毛毒性最小且优于阴性组;与阴性组比较,自制微乳各剂量组及阳性组的PVD差异均无统计学意义(P>0.05)。显微镜下可见,毒性组纤毛很快停止摆动,排列杂乱,受损严重,部分脱落,出现裸露基部,对蟾蜍纤毛毒性最大;阴性组纤毛清晰完整,运动活跃,整体呈波浪状摆动;阳性组和自制微乳各剂量组纤毛较清晰完整,运动活跃,排列较整齐,无脱落等异常现象。这提示除毒性组外,其他各组药物对纤毛运动影响相对较小,表明自制微乳基本无纤毛毒性。

3 讨论

本试验自制微乳是以薄荷素油为油相和主药、CO-40为乳化剂、无水乙醇为助乳化剂、甘油为保湿剂制备而成的O/W型鼻黏膜保湿微乳。其中,乙醇作为助乳化剂,既增溶又防腐;甘油作为理想的保湿剂,又兼有助乳化剂的增溶作用。

复方薄荷脑滴鼻液是经典常规使用的鼻黏膜保湿制剂^[18],故选用其作为阳性组药物,用于考察自制微乳的黏膜黏附性。去氧胆酸钠是公认的具有纤毛毒性的药物^[19],以其为毒性组药物可验证实验动物纤毛的敏感性。

本课题组提出并制备了基于薄荷素油的鼻黏膜保湿微乳,且通过蟾蜍在体黏膜黏附性试验和蟾蜍离体纤毛毒性试验,对其黏膜黏附性和纤毛毒性进行了评价。结果表明,自制微乳具有较强的黏膜黏附性,且优于复方薄荷脑滴鼻液,且剂量越大,黏膜黏附性越强;在试验剂量下,自制微乳无纤毛毒性作用。

本自制微乳能使黏膜有效保湿,可能是由于:(1)自制微乳本身的小尺寸效应^[19]以及黏附效应,使其可以较长时间地滞留在纤毛缝隙中,不易被纤毛快速传输出去,有助于鼻腔黏膜保湿作用的发挥;同时微乳载体良好的渗透性,有助于水通道蛋白双向转运水、甘油等物质进出皮肤^[20],有效改善鼻腔内部微环境缺水的状态,快速恢复原有的生理功能;(2)被纳米化的薄荷素油因其亲脂性可附着于脂质层,形成局部封闭的薄膜屏障,使角质细胞维持水合状态,从而发挥保湿作用。但该自制微乳的具体保湿机制究竟如何,还有待于进一步研究。

参考文献

[1] 孔雪,赵华,唐颖.皮肤模型在化妆品功效评价中的应用研究进展[J].日用化学工业,2017,47(4):228-231,236.

[2] 张晓彤,李宝树,孙斌,等.干燥性与萎缩性鼻炎鼻黏液纤毛传输功能的比较[J].临床耳鼻咽喉科杂志,2003,17(11):646-647,649.

[3] 曾卫东,骆文龙.鼻腔鼻窦黏膜黏液纤毛系统研究进展[J].重庆医学,2004,33(12):1886-1888.

[4] 哈宝君.鼻腔护理的临床意义[J].中国煤炭工业医学杂志,2009,12(9):1447-1449.

[5] LANDIS BN, BEGHETTI M, MOREL DR, et al. Somato-sympathetic vasoconstriction to intranasal fluid adminis-

tration with consecutive decrease in nasal nitric oxide[J]. *Acta Physiologica Scandinavica*, 2003, 177(4):507-515.

[6] TANJA H, RAINER KW, DETLEF B. Rhinitis sicca, dry nose and atrophic rhinitis: a review of the literature[J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2011, 268(1):17-26.

[7] 杨贺,李巍.慢性干燥性鼻炎的诊治[J].中国实用乡村医生杂志,2008,15(12):4-5.

[8] 张荣发,杨宗发,江尚飞.薄荷油的药理毒理作用研究进展[J].中国药业,2012,21(19):1-3.

[9] ELITEZ Y, EKINCI M, ILEM-OZDEMIR D, et al. Tc-99m radiolabeled alendronate sodium microemulsion: characterization and permeability studies across caco-2 cells[J]. *Curr Drug Deliv*, 2018, 15(3):342-350.

[10] 杨晓艳,易蕾.佐米曲普坦-双氯芬酸微乳的制备及体外透皮研究[J].中国药房,2017,28(13):1841-1844.

[11] 谢明华,蔡鑫君,封玲,等.利多卡因微乳凝胶剂的制备及初步药效学研究[J].中国现代应用药学,2015,32(4):442-446.

[12] 王玮,肖颖.头孢丙烯掩味微丸的制备及其丸芯的工艺优化[J].中国药房,2018,29(19):2622-2625.

[13] 马聪,包永睿,孟宪生,等.基于层次分析和量效对比法优选荆芥总黄酮提取工艺[J].中药材,2015,38(2):381-385.

[14] 曹东,金凤丽,方芳,等.润燥护鼻乳膏部分药效学及安全性实验研究[J].成都中医药大学学报,2010,33(3):51-53.

[15] 王爱娟,李昕,王晖.复方川芎嗪对动物鼻黏膜及纤毛的毒性研究[J].中药药理与临床,2016,32(1):141-145.

[16] 王晓丹,王晖,吴江锋,等.复方地西洋对蟾蜍鼻黏膜纤毛毒性作用的研究[J].中药新药与临床药理,2012,23(3):255-258.

[17] 刘剑云,史亚军,施俊辉,等.贝加灵喷雾剂的纤毛毒性作用及黏膜刺激性实验研究[J].时珍国医国药,2012,23(4):881-882.

[18] 高婷,赵玉娜,何艳萍.复方薄荷脑滴鼻剂的稳定性研究[J].西北药学杂志,2018,33(5):642-645.

[19] 赵洛艺,张凯,谢茵,等.微乳碘的抗菌效果及安全性评价[J].中国消毒学杂志,2017,34(4):309-312,315.

[20] 王春晓,赵华.化妆品功效评价(II):保湿功效宣称的科学支持[J].日用化学工业,2018,48(2):67-72.

(收稿日期:2018-12-03 修回日期:2019-05-09)

(编辑:余庆华)