

黄芩苷脂质纳米泡沫气雾剂的制备工艺优化[△]

余红芳^{1*}, 吴仁杰¹, 邹佳峰², 诸佳珍³, 姚文栋¹, 施政^{1#}(1. 浙江中医药大学附属第一医院药剂科, 杭州 310018; 2. 杭州领业医药科技有限公司, 杭州 310018; 3. 浙江中医药大学药学院, 杭州 311400)

中图分类号 R943;R283.6 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)08-0943-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.08.07



摘要 目的 优化黄芩苷脂质纳米泡沫气雾剂(BC-LN-FA)的制备工艺。方法 以黄芩苷(BC)为模型药物,采用薄膜分散法制备黄芩苷脂质纳米粒(BC-LN),采用均质乳化法制备BC-LN-FA;以粒径和包封率(EE)为指标,以投药量、乳化剂用量、助乳化剂用量、均质时间为考察因素,采用Box-Behnken设计-响应面法对其制备工艺进行优化,并对所得BC-LN-FA的形态、粒径、多分散系数(PDI)、EE、黏度、泡沫消解率和体外透皮释放等进行表征。结果 最优工艺为投药量25 mg、乳化剂(硬脂酸-大豆卵磷脂-甘油质量比1:1:1)用量40 mg、助乳化剂(十八醇-乳酸质量比1:1)用量30 mg、均质时间20 min。3次验证实验结果显示,所制BC-LN-FA的粒径为(151.70±2.40)nm、EE为(68.62±1.16)%(RSD均小于2%,n=3),与预测值(粒径150.80 nm、EE 67.02%)的偏差分别为0.60%、2.39%。按上述最优工艺所得BC-LN-FA乳液呈淡黄色,粒径均一且呈类圆形,黏度为(122.92±5.09)mPa·s,泡沫消解率为(65.32±3.22)%,BC含量为(7.01±0.12)%,PDI为(0.199±0.006);48 h时,其在pH7.4、6.8、5.0的磷酸盐缓冲液(PBS)中的累积释放百分率分别为(54.12±2.69)%、(57.85±4.25)%、(59.47±1.83)%,而游离BC在pH7.4的PBS中的累积释放百分率仅为(15.04±1.43)%。结论 所得最优工艺稳定、可行;所得BC-LN-FA粒度均匀,消泡快,具有一定黏度。

关键词 黄芩苷;脂质纳米泡沫气雾剂;Box-Behnken设计-响应面法;工艺优化;含量测定;体外透皮释放

Optimization of preparation technology of baicalin lipid nano foam aerosol

YU Hongfang¹, WU Renjie¹, ZOU Jiafeng², ZHU Jiazhen³, YAO Wendong¹, SHI Zheng¹(1. Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310018, China; 2. Hangzhou SoliPharma Limited Liability Company, Hangzhou 310018, China; 3. College of Pharmaceutical Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 311400, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To optimize the preparation technology of the baicalin lipid nano foam aerosol (BC-LN-FA). **METHODS** Baicalin lipid nanoparticle (BC-LN) and BC-LN-FA were prepared by the thin film dispersion method and homogeneous emulsification method, respectively, using baicalin (BC) as the model drug. The preparation technology was optimized by Box-Behnken design-response surface methodology using particle size and encapsulation efficiency (EE) as indexes, with dosage, emulsifier dosage, co-emulsifier dosage and homogenization time as factors. The morphology, particle size, polydispersity index (PDI), EE, the viscosity, the foam dissolution rate and *in vitro* transdermal release of BC-LN-FA were characterized. **RESULTS** The optimal technology included 25 mg BC, 40 mg emulsifier (mass ratio of stearic acid-soybean lecithin-glycerol was 1:1:1), 30 mg co-emulsifier (mass ratio of octadecanol-lactic acid was 1:1), homogenization time of 20 min. Results of 3 times of validation tests showed that particle size of prepared BC-LN-FA was (151.70 ± 2.40) nm, EE was (68.62 ± 1.16)%; the deviation of them from the predicted value (particle size of 150.80 nm, EE of 67.02%) were 0.60% and 2.39% respectively. The BC-LN-FA prepared by the optimal process was light yellow opalescence, uniform in particle size and round-like in shape. The viscosity, the foam dissolution rate, the content of BC and PDI were (122.92 ± 5.09) mPa·s, (65.32 ± 3.22)%, (7.01 ± 0.12)% and (0.199 ± 0.006), respectively. At 48 h, the cumulative release rates of BC-LN-FA in phosphate buffer saline (PBS) at pH7.4, 6.8, 5.0 were (54.12 ± 2.69)%, (57.85 ± 4.25)% and (59.47 ± 1.83)%, respectively; those of free BC in PBS at pH7.4 was only (15.04 ± 1.43)%. **CONCLUSIONS** The optimized technology is stable and feasible. Prepared BC-LN-FA has a uniform particle size, high digestion rate and certain viscosity.

KEYWORDS baicalin; lipid nano foam aerosol; Box-Behnken design-response surface methodology; technology optimization; content determination; *in vitro* transdermal release

△ 基金项目:浙江省基础公益研究计划项目(No.LQ19H280004);浙江省药学会医院药学科专项资助项目(No.2019ZY22, No.2019ZY23)

* 药师,硕士研究生。研究方向:新型给药系统及靶向制剂。电话:0571-86008512。E-mail:806206771@qq.com

通信作者:副主任药师,博士研究生。研究方向:中药靶向递药系统。电话:0571-86008512。E-mail:frysz@163.com

黄芩苷(baicalin, BC)属于小分子黄酮糖苷类成分,是黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的主要有效成分之一,具有抗菌、抗炎、抗病毒、抗氧化、调节免疫等药理活性^[1-2],能保护皮肤免受紫外线的伤害^[3]。目前,我国已有BC片剂、胶囊等相关产品,但因该成分在胃肠道中不稳定且溶解度较低,因而存在吸收差、生物利用度低等

问题,使得其临床应用受限^[4-5]。有研究指出,BC可用于痤疮治疗及化妆品领域^[6],对痤疮丙酸杆菌的抑制作用极为显著,其药效约为相同浓度甲硝唑的2倍^[7],因此为扩大BC的应用范围,亟需寻找合适的给药策略^[8]。

经皮给药系统(transdermal drug delivery systems, TDDs)作为一种无创给药途径,具有药物吸收不受胃肠道影响、患者顺应性高等优点^[9]。虽然目前已有关于BC局部给药的研究^[10],但因BC水溶性差,使得其药效的发挥和在局部制剂中的实际应用受到限制^[11]。20世纪80年代以来,纳米递药系统因具有粒径小^[9]、可通过高渗透长滞留(enhanced permeability and retention, EPR)作用来实现药物的富集、减少毒副作用、提高生物安全性等特点而得到快速发展^[12],但仍存在以下不足:(1)滞留时间较短,难以持续发挥药效^[13];(2)治疗剂量和给药位置难以控制,易引发不良反应。泡沫气雾剂(foam aerosol, FA)是将药物溶液与抛射剂共同封装于具有特制阀门系统的耐压容器中,使用时借助抛射剂的压力将内容物以雾状喷出的一种外用剂型^[14]。该剂型除具有速效、方便、创面刺激性小、可准确控制剂量、可定位等优点外,还可有效改善药物的经皮吸收^[15]。Box-Behnken设计-响应面法是目前常用的工艺优化方法,可用于制剂工艺的筛选和优化,具有实验次数少、精密度高、预测性好等优点^[16]。基于此,本研究以BC为模型药物,采用薄膜分散法制备黄芩苷脂质纳米粒(baicalin lipid nanoparticle, BC-LN),并结合均质乳化法制备黄芩苷脂质纳米粒泡沫气雾剂(baicalin lipid nano foam aerosol, BC-LN-FA),采用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)法测定制剂中BC的含量,再通过Box-Behnken设计-响应面法优化其制备工艺,并对最优处方所制BC-LN-FA的形态、粒径、包封率(encapsulation efficiency, EE)、黏度、泡沫消解率和体外透皮释放等特性进行考察,旨在为BC经皮纳米制剂的开发提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有1260型HPLC仪及配备的G1314F型检测器、G1316A型柱温箱、G1329B型自动进样器(美国Agilent公司),ZETASIZER NANO ZS型激光粒度仪(英国Malvern公司),H-7650型透射电子显微镜(日本Hitachi公司),Mill-Q型超纯水器(美国Millipore公司),R-502型旋转蒸发器(上海申胜生物技术有限公司),KQ5200DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),JY92-IIN型超声细胞破碎仪(宁波新芝生物科技股份有限公司),CP225D型电子天平(德国Sartorius公司),DF-101S型集热式磁力搅拌器(上海越众仪器设备有限公司),DTBF型半自动微型药液罐装封口机、DTBQ型半自动微型抛射剂灌装机(上海戴服特包装机械有限公司),定制透明耐压检测试管(扬州爱瑞索专用设备有限公司),DV2TLV型黏度计(美国Brookfield

公司),DFA100型泡沫分析仪(德国KRÜSS公司),TT-8D型药物透皮吸收仪(天津市正通科技有限公司),ST76数码相机(韩国Samsung公司)等。

1.2 主要药品与试剂

BC原料药(批号21967-41-9,纯度 $\geq 98\%$)购自辰光生物科技集团股份有限公司;BC对照品(批号B65341,纯度 $\geq 99\%$)购自上海吉至生化科技有限公司;大豆卵磷脂(批号S30869)购自上海源叶生物科技有限公司;氯化钾(批号P816347)购自杭州邦易化工有限公司;氯化钠(批号1801062)、磷酸二氢钠(批号1609B1)均购自西陇科学股份有限公司;磷酸二氢钾(批号20160317)购自上海凌峰化学试剂有限公司;硬脂酸(批号S298767)购自上海腾准生物科技有限公司;甘油(批号G116206)购自苏州星科元信息科技有限公司;十八醇(批号105220170203)购自湖南尔康制药股份有限公司;丙丁烷(批号YY-0190314)购自中化近代环保化工(西安)有限公司;乳酸(批号20170124)购自常州市海拓实验仪器有限公司;二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO,批号D2650)购自杭州诺森德生物技术有限公司;三乙胺(triethylamine, TEA,批号R000899)购自上海众何化学科技有限公司;无水乙醇(批号20160908)购自天津科密欧化学试剂有限公司;二氯甲烷(批号D821466)购自厦门辉耀兴业科技有限公司;2.0%磷钨酸溶液(批号R23243)购自石家庄西默科技有限公司;其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

1.3 实验动物

本实验所用动物为清洁级Wistar大鼠8只,雄性,体质量为 (250.0 ± 20.0) g,由浙江中医药大学动物实验中心提供,动物使用许可证号为SYXK(浙)2018-0012。本动物实验方案均符合浙江中医药大学动物饲养和使用相关指南^[17]。

2 方法与结果

2.1 BC-LN-FA的制备

2.1.1 BC-LN 称取BC原料药适量,置于圆底烧瓶中,用含有TEA的DMSO(TEA-BC摩尔比3:1)溶解并避光搅拌过夜。另称取处方量的乳化剂(硬脂酸-大豆卵磷脂-甘油质量比1:1:1),置于上述圆底烧瓶中,加入二氯甲烷25 mL溶解,于50℃减压旋转蒸发除去有机溶剂,形成薄膜后,再加入同等温度pH6.8的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS,由氯化钠、磷酸二氢钾等配制)适量,于25℃下溶胀约1 h后,超声处理3 min,制得初乳。取初乳,于超声细胞破碎仪中超声(超声间隔3 s)处理2 min,制得BC-LN。另取含有TEA的DMSO,参照上述方法制备空白脂质纳米粒(lipid nanoparticle, LN)。将BC-LN、空白LN于4℃中保存。

2.1.2 BC-LN-FA 称取“2.1.1”项下处方量的BC-LN或空白LN,置于烧杯中,加入助乳化剂(十八醇-乳酸质量比1:1)适量,于50℃下加热搅拌20 min,再于40℃下以

1 500 r/min均质一定时间后停止加热,即得BC-LN-FA或空白脂质纳米泡沫气雾剂(lipid nano foam aerosol, LN-FA)乳液。取BC-LN-FA或空白LN-FA乳液罐装于透明耐压检测试管中,使用半自动微型抛射剂灌装机灌入丙丁烷25 mg,即得BC-LN-FA或空白LN-FA。

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件 以CNW Athena C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm)为色谱柱,以甲醇-0.1%磷酸溶液(38:62, V/V)为流动相;流速为1.0 mL/min;柱温为25.0 ℃;检测波长为280 nm;进样量为10 μL^[5]。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取减压干燥至恒定质量的BC对照品适量,用90% DMSO溶液定容至10 mL,制成质量浓度为100 μg/mL的对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液和空白LN-FA溶液的制备 取“2.1.2”项下BC-LN-FA和空白LN-FA适量,用90% DMSO溶液定容至10 mL,即得供试品溶液和空白LN-FA溶液。

2.2.4 专属性试验 取上述对照品溶液、供试品溶液、空白LN-FA溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,详见图1。由图1可知,对照品和供试品在280 nm波长处均有色谱峰出现,空白LN-FA溶液在280 nm波长下无吸收;BC色谱峰与相邻色谱峰间的分离度大于1.5,理论板数按BC计不低于3 000。

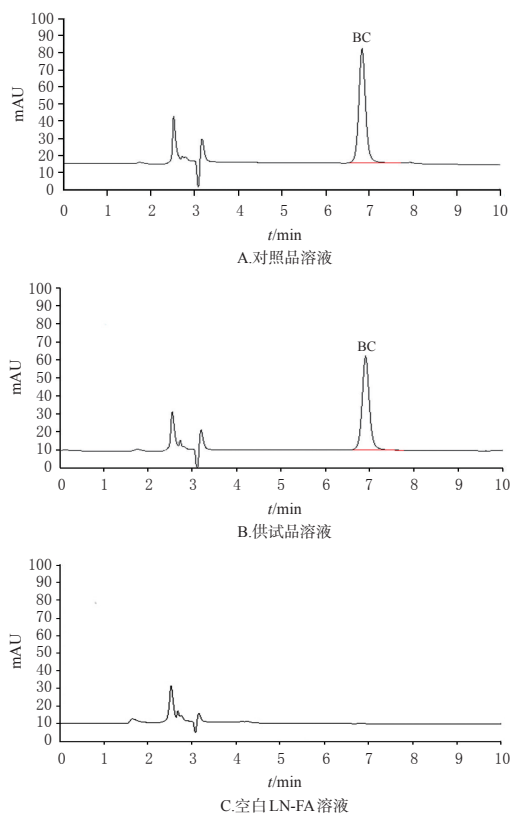


图1 BC对照品溶液、供试品溶液和空白LN-FA溶液的HPLC图

2.2.5 线性关系考察 称取减压干燥至恒定质量的BC对照品适量,用90% DMSO溶液定容至10 mL。取上述

溶液适量,分别用90% DMSO溶液稀释,制成质量浓度分别为0.50、1.00、5.00、10.00、50.00 μg/mL的系列标准曲线溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。以BC质量浓度(X)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程为 $Y=29.305X-2.021$ ($r=0.9998$),表明BC检测质量浓度的线性范围为0.50~50.00 μg/mL。

2.2.6 精密度的试验 取“2.2.2”项下对照品溶液,用90% DMSO溶液稀释,制成低、中、高质量浓度(10、25、50 μg/mL)的BC对照品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件在同日内分别于早、中、晚测定3次,考察日内精密度的;于每天中午同一时间点测定1次,连续测定3 d,考察日间精密度的。结果显示,日内、日间精密度的RSD均小于2%($n=3$),表明仪器精密度的良好。

2.2.7 重复性的试验 取“2.1.2”项下BC-LN-FA适量,共6份,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并按标准曲线法计算样品含量。结果显示,BC含量的RSD均小于2%($n=6$),表明方法重复性的良好。

2.2.8 稳定性的试验 取“2.2.3”项下供试品溶液,分别于室温下放置0、2、4、6、8 h时按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果显示,BC峰面积的RSD均小于2%($n=5$),表明供试品溶液于室温下放置8 h内稳定性的良好。

2.2.9 回收率的试验 分别取“2.2.2”项下对照品溶液2.0、2.5、3.0 mL,置于10 mL量瓶中,加入“2.1.2”项下空白LN-FA 1 mL,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算回收率。每体积平行操作3次,结果见表1。

表1 BC含量测定的回收率试验结果($n=9$)

加入量/μg	测得量/μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
200.0	200.8	100.4		
200.0	200.6	100.3		
200.0	201.4	100.7		
250.0	253.2	101.3		
250.0	249.4	99.8	100.0	0.93
250.0	245.1	98.0		
300.0	299.5	99.8		
300.0	301.5	100.5		
300.0	298.3	99.4		

2.2.10 样品含量测定 取“2.1.2”项下BC-LN-FA,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并按标准曲线法计算样品含量。

2.3 性能表征

2.3.1 粒径和多分散系数 取“2.1.2”项下BC-LN-FA适量,均匀分散于水中,采用激光粒度仪于25 ℃下测定其粒径及多分散系数(polymer dispersion index, PDI)^[18]。

2.3.2 EE 取“2.1.2”项下BC-LN-FA 1 mL,采用超速离心法以下述公式计算EE: $EE(\%) = (\text{投入总药量} - \text{游离})$

药物量)/投入总药量×100%^[19]。

2.3.3 外观形态 取“2.1.2”项下BC-LN-FA适量,置于透明耐压检测试管中,拍照后,将BC-LN-FA喷出,并拍摄泡沫性状。

2.3.4 微观形态 取“2.1.2”项下BC-LN-FA适量,消泡后,滴于喷碳铜网上,以2.0%磷钨酸溶液染色3 min,挥干,采用透射电子显微镜观察微观形态。

2.3.5 黏度 采用黏度计测定黏度。选择1号转子浸入“2.2.3”项下供试品溶液100 mL中,使转子以50 r/min旋转,测定黏度^[16]。

2.3.6 泡沫消解率 取“2.1.2”项下BC-LN-FA 100 mL,采用泡沫分析仪于25 ℃下测定其在1 min内的消解率:消解率(%)=BC-LN-FA 泡沫消解的体积/100 mL×100%^[20]。

2.4 BC-LN-FA的工艺优化

2.4.1 实验设计方案 在前期预实验的基础上,选择对BC-LN-FA 粒度影响较大的投药量(A)、乳化剂用量(B)、助乳化剂用量(C)和均质时间(D)为考察因素,以粒径(Y_1)、EE(Y_2)为指标,采用Box-Behnken设计-响应面法优化BC-LN-FA的工艺^[15]。BC-LN-FA工艺优化的因素与水平见表2,其实验设计方案与结果见表3。

表2 BC-LN-FA工艺优化的因素与水平

水平	A/mg	B/mg	C/mg	D/min
1	40	50	40	40
0	25	40	30	30
-1	10	30	20	20

2.4.2 模型拟合与方差分析 采用Design-Expert 8.0.5b软件对各因素进行多元线性回归和二项式拟合,并选择有较大相关系数的拟合方程,以 $P < 0.01$ 为标准进行优化^[15]。结果显示,模型相关系数(r)均大于0.8,失拟项均大于0.05,表明模型拟合较好。由于误差导致模型拟合程度不佳的可能性较小,得拟合方程为 $Y_1 = 344.16 + 48.21A - 39.32B - 39.13C - 5.32D + 7.22AB + 25.60AC + 1.00AD + 15.05BC - 0.15BD + 0.49CD - 109.65A^2 - 35.21B^2 - 92.47C^2 - 0.59D^2$ ($r = 0.8261, P < 0.01$)。 $Y_2 = 81.85 + 8.45A - 3.61B - 4.38C - 0.58D + 2.03AB + 4.37AC + 0.20AD + 1.89BC - 0.15BD - 0.17CD - 14.34A^2 - 4.83B^2 - 7.91C^2 - 0.08D^2$ ($r = 0.8408, P < 0.01$)。

在其他因素不变的情况下,选取2个交互因素对BC-LN-FA的粒度和EE进行响应面分析,采用Design-Expert 8.0.5b软件绘制响应面图,结果见图2。由图2可知,各响应面图均为开口向下的凸形曲面,随着投药量、乳化剂用量、助乳化剂用量、均质时间的增加或延长,粒度和EE均先呈上升趋势,当各因素到达最佳临界点后,粒度和EE均呈下降趋势^[21]。粒度受投药量、乳化剂用量、助乳化剂用量、均质时间的影响均较显著;EE受投药量、助乳化剂用量、均质时间的影响均较显著,

表3 BC-LN-FA工艺优化的实验设计方案与结果

实验号	A	B	C	D	Y_1/nm	$Y_2/\%$
1	0	0	0	0	411.50	80.34
2	1	-1	0	0	315.40	68.84
3	0	1	0	1	161.60	44.14
4	-1	0	1	0	396.20	82.06
5	-1	1	0	0	248.40	51.34
6	1	0	1	0	257.50	50.87
7	0	0	-1	1	232.20	54.37
8	0	0	-1	-1	171.90	41.92
9	-1	-1	0	0	160.50	42.84
10	0	-1	-1	0	167.20	40.31
11	0	0	0	0	406.40	80.13
12	0	0	0	0	222.70	53.26
13	-1	0	0	-1	409.90	82.84
14	0	-1	0	1	342.90	61.82
15	0	1	1	0	286.40	54.49
16	0	0	0	0	190.90	50.84
17	-1	0	-1	0	354.50	64.42
18	0	1	0	1	237.10	51.87
19	1	1	0	0	396.80	81.87
20	1	0	0	1	126.40	32.87
21	0	-1	1	0	228.70	51.95
22	0	0	0	0	321.50	65.92
23	0	1	-1	0	107.30	31.29
24	-1	0	0	1	256.70	53.26
25	1	0	-1	0	242.20	56.66
26	0	0	1	1	311.40	62.87
27	1	0	0	-1	366.10	70.65
28	0	-1	0	-1	357.40	63.15
29	0	0	1	-1	468.80	85.65

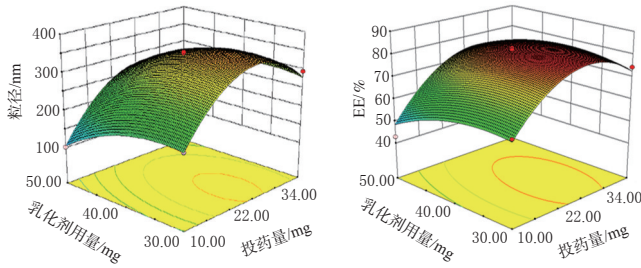
受乳化剂用量的影响较小;各因素间的交互作用均不显著^[21]。

自变量对粒度影响整体模型的 F 值为4.75($P < 0.05$),表明自变量对粒度的拟合程度较高。4个因素对粒度均具有显著影响($P < 0.05$),影响由大到小依次为 $D > A > B > C$ 。结果见表4。

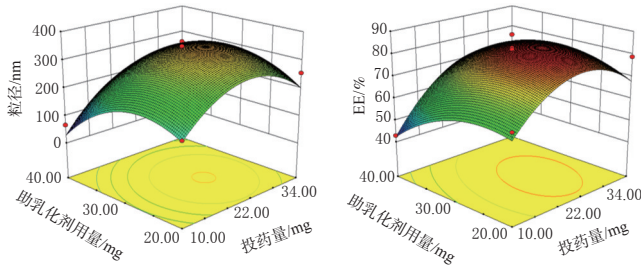
自变量对EE影响整体模型的 F 值为5.28($P < 0.05$),表明自变量对EE的拟合程度较高。除因素 B 外,其余因素对EE均具有显著影响($P < 0.05$),影响由大到小依次为 $A > D > C > B$ 。结果见表5。

采用Design-Expert 8.0.5b软件预测得到最优工艺为 $A_2B_2C_2D_3$,即投药量25 mg、乳化剂用量40 mg、助乳化剂用量30 mg、均质时间20 min。

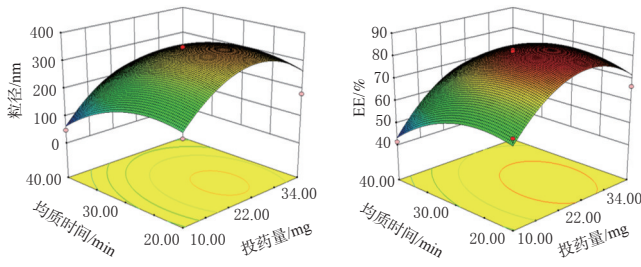
2.4.3 验证实验 按“2.4.2”项下预测的最优工艺制备BC-LN-FA,平行操作3次,并按“2.3”项下方法进行表征。结果显示,所得BC-LN-FA乳液呈淡黄色乳光,粒径均一,整体呈类圆形,粒径为 (151.70 ± 2.40) nm,EE为 $(68.62 \pm 1.16)\%$ (RSD均小于2%, $n=3$),PDI为 (0.199 ± 0.006) ;与预测值(粒径150.80 nm、EE 67.02%)比较,实测平均粒径、EE的偏差[偏差=(预测值-实测值)/预测值×100%]分别为0.60%、2.39%,表明所得模型合理,所选最优工艺可行。将按上述最优工艺制得的BC-LN-FA装封于透明耐压检测试管中,可见乳液呈淡



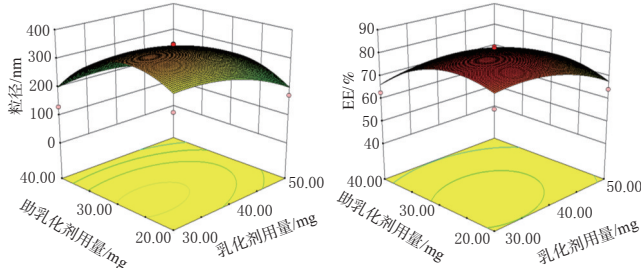
A.因素A与因素B



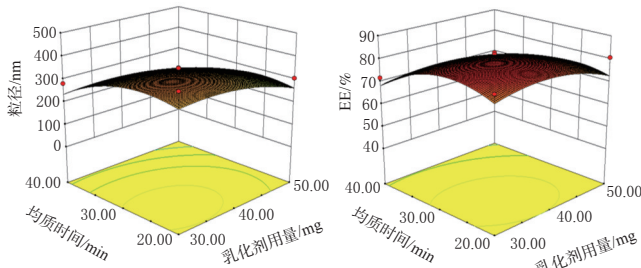
B.因素A与因素C



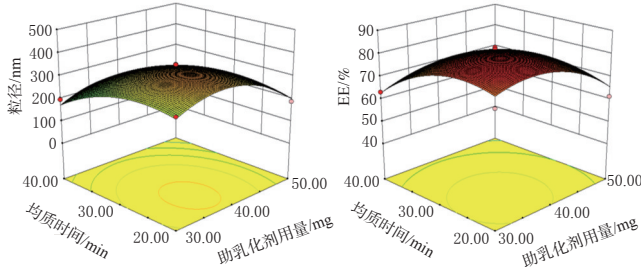
C.因素A与因素D



D.因素B与因素C



E.因素B与因素D



F.因素C与因素D

图2 各交互因素对BC-LN-FA粒径、EE影响的响应面图

表4 各因素对粒径影响的方差分析结果

差异来源	偏差平方和	自由度	F	P
A	27 888.52	1	8.40	0.011 7(<0.05)
B	18 549.60	1	5.59	0.033 1(<0.05)
C	18 369.19	1	5.53	0.033 8(<0.05)
D	34 005.45	1	10.24	0.006 4(<0.01)

表5 各因素对EE影响的方差分析结果

差异来源	偏差平方和	自由度	F	P
A	856.66	1	18.40	0.000 7(<0.01)
B	156.46	1	3.36	0.088 1(>0.05)
C	230.13	1	4.94	0.043 2(<0.05)
D	404.96	1	8.70	0.010 6(<0.01)

黄色,泡沫细腻均匀呈白色,且有一定的蓬松感,黏度为(122.92 ± 5.09)mPa·s,泡沫消解率为(65.32 ± 3.22)%,BC含量为(7.01 ± 0.12)%。结果见表6、图3~图5。

表6 验证实验结果(n=3)

序号	粒径/nm	EE/%	PDI	黏度/(mPa·s)	泡沫消解率/%	BC含量/%
1	150.50	69.82	0.206	117.77	65.37	7.02
2	154.50	68.53	0.198	123.04	68.52	7.12
3	150.20	67.50	0.194	127.95	62.08	6.89
平均值	151.70	68.62	0.199	122.92	65.32	7.01
RSD/%	1.58	1.69	3.065	4.14	4.93	1.65

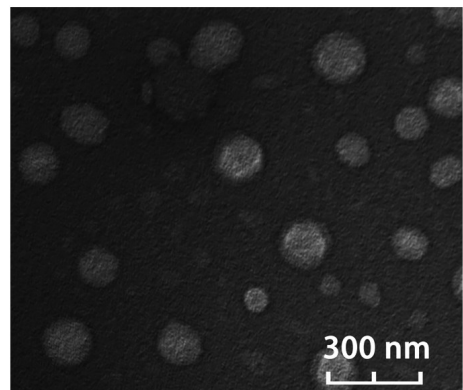


图3 BC-LN-FA的透射电镜图

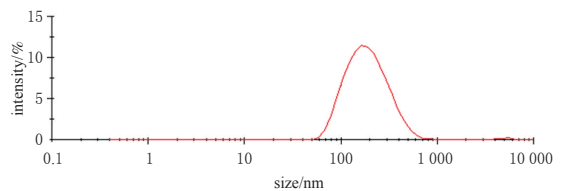
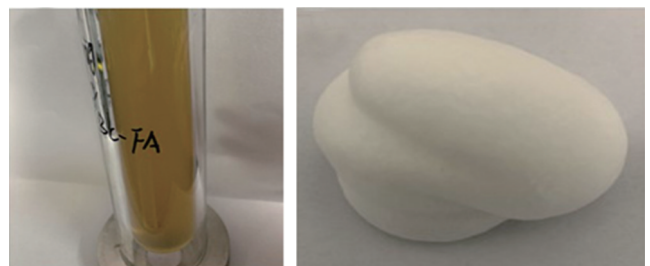


图4 BC-LN-FA的粒径分布图



A.乳液

B.泡沫

图5 BC-LN-FA的乳液、泡沫外观

2.5 体外透皮释放实验

2.5.1 释放介质的配制 按2020年版《中国药典》(四部)方法配制pH分别为7.4、6.8、5.0的PBS,备用^[22]。

2.5.2 离体皮肤的制备 取8只雄性Wistar大鼠,脱颈处死后固定于鼠板上,剔除皮肤毛发并剪下其腹部皮肤,去除皮下脂肪后漂洗,展平并吸去多余水分后用锡箔纸包裹,置于-80℃冰箱中冷藏,备用^[23]。

2.5.3 离体皮肤渗透实验 采用Franz扩散池考察含BC的PBS(pH7.4)及BC-LN-FA的离体皮肤渗透性。将“2.5.2”项下皮肤取出解冻,固定于Franz扩散池中,使角质层面面向供给室,平衡30 min后,在扩散池下层分别加入pH为7.4、6.8、5.0的PBS(含0.5%乙醇)作为接收液,上层加入BC-LN-FA(含药量约为56 μg)800 μL,此刻记为0 h,分别于32.0℃下扩散0.25、0.5、1、2、4、8、12、24、48 h时取样500 μL,并及时补加等体积的新鲜接收液。每次取样后将样品滤过,取续滤液300 μL,按“2.2.10”项下方法测定并计算BC含量。

2.5.4 药物累积释放百分率 按下式计算不同时间点单位面积的药物累积释放百分率(Q_t): $Q_t = Q/W \times 100\%$, $Q_t = (5C_n + \sum_{i=1}^{n-1} C_i \times 0.5) / 0.785$ 。式中,0.785为透皮扩散面积(cm^2),5为接受池体积(mL),0.5为取样体积(mL), C_n 为第n个取样点测得的药物质量浓度($\mu\text{g/mL}$), C_i 为第n个取样点之前某时间点测得的药物质量浓度($\mu\text{g/mL}$), Q_t 为第i个取样点的药物累积透过量(μg), W 为上样体积中的含药量(μg)^[17]。以各取样点的 Q_t 为纵坐标、 t 为横坐标,采用GraphPad Prism 7软件绘制体外释放曲线,详见图6。由图6可见,BC-LN-FA在不同pH接收液中均有良好的缓释效果,48 h时,BC-LN-FA在pH7.4、6.8、5.0的PBS中的 Q_t 分别为(54.12 ± 2.69)%、(57.85 ± 4.25)%、(59.47 ± 1.83)%,而游离BC在pH7.4的PBS中的 Q_t 仅为(15.04 ± 1.43)%;相较于游离BC,BC-LN-FA虽在初始阶段释药较快,但随后释药逐渐放缓,提示该剂型可实现BC的缓慢释放^[20]。

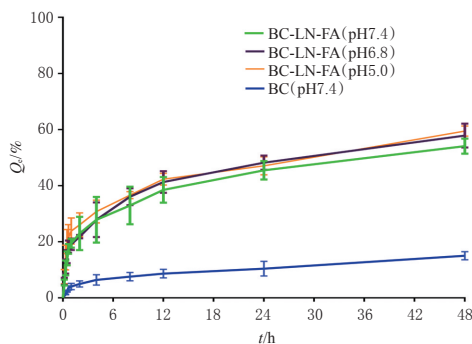


图6 BC及BC-LN-FA体外释放曲线

3 讨论

本研究通过Box-Behnken设计-响应面法构建了BC-LN-FA的参数模型,得到最优工艺为投药量25 mg、乳化剂用量40 mg、助乳化剂用量30 mg、均质时间20

min。按此工艺制得BC-LN-FA的EE为(68.62 ± 1.16)%,含量为(7.01 ± 0.12)%,泡沫外观均一,无塌陷,粒径、EE与预测值的偏差较小,符合相关要求^[14]。同时,本研究建立了测定BC含量的HPLC法,经方法学考察证实,该方法快速、便捷。

本研究初步探讨了各因素间的交互作用。结果显示,均质时间对粒径与EE均有显著影响,尤以对粒径的影响较为明显。研究表明,高压均质可使物料细化为微米级至纳米级,高压均质压力越大,均质循环次数越多,所得药物粒径越小^[24]。但本研究结果显示,随着均质时间的延长,粒径呈先增加后降低的趋势。其粒径增加的原因可能为随着均质时间的延长,纳米粒破碎,形成更小的粒子,在静电作用下相互吸引,从而发生团聚现象,这一破碎过程可能会进一步导致粒径和EE的降低,而团聚过程会导致粒径的增加^[25]。本研究还发现,投药量对粒径、EE均有显著影响,尤以对EE的影响较强。随着投药量的增加,EE呈增加趋势^[26],但在本研究中,EE呈先增加后降低的趋势。这可能是由于初期随着载药量的增加,黏度增大,使得EE提高;后期由于投药量过大,部分BC未被包裹而导致EE降低^[27]。此外,助乳化剂对粒径、EE也具有显著影响,随着助乳化剂用量的增加,粒径、EE均呈先增加后降低的趋势。前期增加趋势可能是由于少量使用的十八醇等辅料在乳化过程中增加了黏度,进而导致粒子聚集,从而影响粒径和EE。随着助乳化剂用量的增多,一方面由于其中的乳酸成分增加,降低了黏度,减弱了粒子聚集倾向;另一方面,乳液的形成和稳定与制备过程中乳液体系的能量密度有关,乳化成分含量的增加,可帮助BC-LN-FA乳液体系获得较高的能量密度,进而获得较小的液滴,因此高浓度助乳化剂使粒径、EE降低的原因也可能与更多的乳化成分提供了更高的能量密度有关^[28]。

本研究结果显示,所制BC-LN-FA呈类圆形,大小均一,分散均匀,其黏度为(122.92 ± 5.09) mPa·s,表明BC-LN-FA具有一定的黏附性,能避免液体制剂滑落等问题,可在实现局部定位给药的同时,延长药物作用时间。泡沫消解率为(65.32 ± 3.22)%,表明泡沫消解率高,可快速消泡,这不仅可减少泡沫滞留于患者局部皮肤引起的观感问题,而且可通过按摩进一步调节给药部位,促进其局部吸收。

体外透皮释放实验结果显示,48 h时,BC-LN-FA在pH7.4、6.8、5.0的PBS中的 Q_t 分别为(54.12 ± 2.69)%、(57.85 ± 4.25)%、(59.47 ± 1.83)%,而游离BC在pH7.4的PBS中的 Q_t 仅为(15.04 ± 1.43)%,表明BC-LN-FA具有显著的促渗透作用,其原因可能为处方中的乳化成分(如硬脂酸,十八醇、乳酸等)破坏了角质层细胞,使角质层细胞流动性增强,从而导致药物的渗透能力增强^[29-30]。

综上所述,本研究所得最优工艺稳定、可行,所制BC-LN-FA粒度均匀,消泡快,具有一定黏度。

参考文献

- [1] LEE W, KU S K, BAE J S. Antiplatelet, anticoagulant, and profibrinolytic activities of baicalin[J]. Arch Pharm Res, 2015, 38(5): 893-903.
- [2] JU X N, MU W N, LIU Y T, et al. Baicalin protects against thrombin induced cell injury in SH-SY5Y cells[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(11): 14021-14027.
- [3] MIR-PALOMO S, NÁCHER A, DÍEZ-SALES O, et al. Inhibition of skin inflammation by baicalin ultradeformable vesicles[J]. Int J Pharm, 2016, 511(1): 23-29.
- [4] 黄婷, 向东, 刘东, 等. 提高黄芩苷生物利用度的研究进展[J]. 现代中药研究与实践, 2018, 32(4): 82-86.
- [5] 王佳辉, 陈麟, 孙平, 等. 黄芩苷脂质凝胶制备、质量评价及其对痤疮的药效学评价[J]. 中草药, 2021, 52(16): 4860-4872.
- [6] 张萌, 陈士林. 中药化妆品的研发现况与发展前景[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(23): 2457-2460.
- [7] HAMZA M, TOHID H, MAIBACH H. Shaving effects on percutaneous penetration: clinical implications[J]. Cutan Ocul Toxicol, 2015, 34(4): 335-343.
- [8] 王欢, 蔡宇, 韩海, 等. 黄芩苷聚糖微粒的构建及与乳膏体外经皮扩散行为的比较[J]. 中药材, 2012, 35(5): 800-803.
- [9] KOVÁČIK A, KOPEČNÁ M, VÁVROVÁ K. Permeation enhancers in transdermal drug delivery: benefits and limitations[J]. Expert Opin Drug Deliv, 2020, 17(2): 145-155.
- [10] N' DA D D. Prodrug strategies for enhancing the percutaneous absorption of drugs[J]. Molecules, 2014, 19(12): 20780-20807.
- [11] ZHANG Y T, ZHANG K, GUO T, et al. Transdermal baicalin delivery using diethylene glycol monoethyl ether-mediated cubic phase gel[J]. Int J Pharm, 2015, 479(1): 219-226.
- [12] 王丽丽, 祝美华, 刘正平, 等. 纳米混悬剂给药系统的研究进展[J]. 中国药房, 2017, 28(10): 1415-1418.
- [13] 朱煜, 马云淑. 醇质体及其二次制剂在经皮给药中的应用研究进展[J]. 西北药学杂志, 2021, 36(2): 324-329.
- [14] 张星贤, 侯玉婷, 曹杰, 等. 两性霉素B阴道用纳米泡沫剂的制备及评价[J]. 中国药学杂志, 2019, 54(13): 1078-1085.
- [15] AZIZI S N, CHAICHI M, SHAKERI P. Optimization of chemiluminescence based on hydrogen peroxide-sodium hydrogen carbonate-CdS quantum dots system using Box-Behnken design[J]. Luminescence, 2012, 27(2): 107.
- [16] VOZZA G, DANISH M, BYRNE H J, et al. Application of Box-Behnken experimental design for the formulation and optimisation of selenomethionine-loaded chitosan nanoparticles coated with zein for oral delivery[J]. Int J Pharm, 2018, 551(1/2): 257-269.
- [17] 王娟, 郑杭生, 魏燕, 等. 盐酸青藤碱挥发油边缘活化PEG修饰传递体的离体皮肤渗透研究[J]. 中草药, 2016, 47(20): 3602-3609.
- [18] QUEILLE-ROUSSEL C, BANG B, CLONIER F, et al. Enhanced vasoconstrictor potency of the fixed combination calcipotriol plus betamethasone dipropionate in an innovative aerosol foam formulation vs. other corticosteroid psoriasis treatments[J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2016, 30(11): 1951-1956.
- [19] 李翔, 陈颖, 王雅晖, 等. 多西紫杉醇纳米结构脂质载体中主药含量及包封率测定[J]. 中国药房, 2008, 19(22): 1743-1745.
- [20] BEWLEY A P, SHEAR N H, CALZAVARA-PINTON P G, et al. Calcipotriol plus betamethasone dipropionate aerosol foam vs. apremilast, methotrexate, acitretin or fumaric acid esters for the treatment of plaque psoriasis: a matching-adjusted indirect comparison[J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2019, 33(6): 1107-1115.
- [21] 郑淑晶, 王佳, 胡德, 等. 桂枝芍药知母汤提取工艺的优化[J]. 中国药房, 2022, 33(2): 179-184.
- [22] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 四部[S]. 2020年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 424.
- [23] ABD EL-ALIM S H, KASSEM A A, BASHA M N, 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.
- [24] 李莹莹, 孙冰冰, 张廷廷, 等. 苦参碱固体脂质纳米粒的制备和处方优化[J]. 中成药, 2020, 42(1): 12-15.
- [25] MCCARTHY N A, KENNEDY D, HOGAN S A, et al. Emulsification properties of pea protein isolate using homogenization, microfluidization and ultrasonication[J]. Food Res Int, 2016, 89(Pt 1): 415-421.
- [26] 郭杰, 乔瑾, 闫明明, 等. 诺氟沙星-固体脂质纳米粒的制备及体外释药特性研究[J]. 中国药房, 2018, 29(22): 3068-3073.
- [27] 王利苹, 奉建芳, 胡凯莉. 芳香开窍中药对血脑屏障通透性的调节作用及其机制研究进展[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(6): 949-954.
- [28] CALLIGARIS S, PLAZZOTTA S, VALOPPI F, et al. Combined high-power ultrasound and high-pressure homogenization nanoemulsification: the effect of energy density, oil content and emulsifier type and content[J]. Food Res Int, 2018, 107: 700-707.
- [29] CHENG Z L, ELIAS D R, KAMAT N P, et al. Improved tumor targeting of polymer-based nanovesicles using polymer-lipid blends[J]. Bioconjug Chem, 2011, 22(10): 2021-2029.
- [30] MORALES J O, VALDES K, MORALES J, et al. Lipid nanoparticles for the topical delivery of retinoids and derivatives[J]. Nanomedicine, 2015, 10(2): 253-269.

(收稿日期: 2021-11-07 修回日期: 2022-03-07)
(编辑: 陈宏)