

DOI: 10.11830/ISSN.1000-5013.202001022



鞣花酸柔性纳米脂质体的制备 工艺优化与体外透皮实验

林琪¹, 张嘉颖¹, 吴振², 陈燕江³, 王立强¹

(1. 华侨大学 生物医学学院, 福建 泉州 362021;

2. 厦门大学 药学院, 福建 厦门 361102;

3. 晏容美业集团有限公司, 福建 厦门 361012)

摘要: 以包封率为指标,考察鞣花酸柔性纳米脂质体(EA-FNL)的最佳制备工艺,验证其透皮效果.采用薄膜分散法制备鞣花酸柔性纳米脂质体,采用高效液相色谱法检测鞣花酸柔性纳米脂质体的包封率,通过单因素实验考察表面活性剂的种类、卵磷脂与表面活性剂的质量比、卵磷脂与胆固醇的质量比、药物质量浓度、水化时间对包封率和粒径的影响.经 Box-Behnken 效应面法得到最优处方,测定其粒径,以大鼠腹部皮肤为材料,进行 24 h 透皮扩散实验.结果表明:在 Box-Behnken 响应面优化处方实验确定的最佳工艺中,卵磷脂与胆固醇的质量比为 7.83 : 1,脂质体制备水化时间为 2.1 h,卵磷脂与吐温-20 的质量比为 2 : 1,平均包封率为 75.66%,粒径为 (178.60 ± 4.59) nm,聚合物分散性指数(PDI)为 0.15 ± 0.01 ,电位为 (-30.60 ± 0.92) mV,EA-FNL 稳定性良好;EA-FNL 24 h 累积透过量为 $9.54 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$,24 h 后皮肤滞留量为 $13.77 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$;文中方法制备的鞣花酸柔性纳米脂质体包封率较高,粒径可控,在皮肤滞留量较高.

关键词: 鞣花酸; 纳米; 柔性脂质体; 包封率; 体外透皮

中图分类号: R 944.9

文献标志码: A

文章编号: 1000-5013(2020)05-0638-09

Preparation Optimization and *In Vitro* Percutaneous Permeability Experiment of Flexible Nanoliposomes of Ellagic Acid

LIN Qi¹, ZHANG Jiaying¹, WU Zhen²,
CHEN Yanjiang³, WANG Liqiang¹

(1. School of Biomedical Sciences, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China;

2. Department of Pharmacy, Xiamen University, Xiamen 361102, China;

3. Yanrong Beauty Industry Group Limited Company, Xiamen 361012, China)

Abstract: The optimum preparation technology of flexible nanoliposomes of ellagic acid (EA-FNL) was studied with encapsulation efficiency as index, and its transdermal effect was verified. EA-FNL was prepared by thin film dispersion, and the encapsulation efficiency of EA-FNL was determined by high performance liquid chromatography. The effects of the type of surfactant, the mass ratio of lecithin and surfactant, the mass ratio of lecithin and cholesterol, the concentration of medicine, and the hydration time on the encapsulation efficiency and the particle size were investigated by single factor test. The optimal prescription was obtained by the

收稿日期: 2020-01-18

通信作者: 王立强(1970-),男,教授,博士,主要从事药剂学和创新药物的研究. E-mail: wlq1599@163.com.

基金项目: 国家重点研发计划项目(2016YFE0101700);福建省高校产学研合作项目(2019Y4007);华侨大学研究生科研创新基金资助项目(18013071019)

Box-Behnken response surface method, and the particle size was measured. A 24 h transdermal diffusion experiment was performed using rat abdominal skin as a material. The result shows that optimal prescription was: a mass ratio of lecithin to cholesterol 7.83 : 1, the hydration time for liposome preparation 2.1 h, and the mass ratio of lecithin to Tween-20 2 : 1. Under the optimal prescription, the average encapsulation efficiency was 75.66%, particle size was (178.60 ± 4.59) nm, the polymer dispersity index (PDI) was 0.15 ± 0.01 , the potential was (-30.60 ± 0.92) mV, and the stability of EA-FNL was good. The cumulative transmittance of EA-FNL for 24 h was $9.54 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$, and the skin retention at 24 h was $13.77 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$. It reveals that EA-FNL prepared by this method has higher encapsulation efficiency, controllable particle size and high retention in skin.

Keywords: ellagic acid; nano; flexible liposomes; encapsulation efficiency; *in vitro* percutaneous permeability

鞣花酸(EA)是一类天然多酚二内酯,是没食子酸的二聚衍生物,存在于多种水果、坚果、蔬菜和中药材中.研究表明,鞣花酸具有多种药理活性,包括抗氧化^[1-2]、抗炎^[3-5]、抗病毒、抗肿瘤^[6]、抗纤维化^[7]和化学预防^[8]等作用,除此之外,鞣花酸还具有美白清除自由基、抗皱等活性^[9],因此,被广泛地应用于护肤品中^[10].然而,水溶性差、溶液稳定性差^[11]、透皮渗透性差^[12]等缺点使鞣花酸的应用受到了限制,这些缺点亟待解决.

角质层是皮肤的最外层,是透皮吸收需要克服的最重要的屏障^[13].目前,促进透皮吸收的方法有磁导入、电致孔、微针和纳米药物载体等^[14-15].近年来,纳米药物载药已成为极具前景的透皮给药方式.柔性纳米脂质体(FNL)是第二代脂质体,由磷脂和膜柔软剂(如胆酸钠、去氧胆酸钠、吐温-80、吐温-20等)组成,结构与生物膜相似.柔性纳米脂质体是一种多功能的靶向药物载体,与传统脂质体相比,其具有高度变形性,可促进药物进入皮肤表皮层和真皮层,将大部分的药物留在皮肤中,减少进入人体血液循环的药物量,在表皮和真皮形成药物库,形成缓释模型,使药物在局部持久治疗^[16-17].柔性纳米脂质体的透皮递送机制一般认为是以水合梯度为驱动力,借助自身的变形能力,穿过比自己粒径小得多的皮肤孔道,进入表皮层或真皮层^[18-19].本文运用 Box-Behnken 效应面法进行处方优化,利用 FNL 技术对 EA 进行药学修饰,提高 EA 的皮肤渗透率及药物稳定性.

1 实验部分

1.1 实验仪器

1200 型高效液相色谱仪(图像二极管阵列(DAD)检测器,美国安捷伦公司);紫外可见分光光度计(日本岛津公司);电子天平(德国赛多利斯科学仪器有限公司);恒温水浴锅(上海跃进医疗器械厂);磁力加热搅拌器(江苏省金坛市友联仪器研究所);NanoBrookomi 型多角度纳米粒度与高灵敏度 Zeta 电位分析仪(美国布鲁克海文仪器公司);JEM-1200EX 型透射电子显微镜(日本电子株式会社);旋转蒸发器、超声波清洗仪(河南省巩义市予华仪器有限责任公司);RYJ-6B 型药物透皮扩散试验仪(上海黄海药检仪器有限公司).

1.2 实验材料

SD 大鼠(雄性大鼠,体质量约 200 g,购自福建医科大学实验动物中心);PC-98T 型蛋黄卵磷脂(上海市艾伟拓医药科技有限公司)、鞣花酸(质量分数为 98%,上海市源叶生物科技有限公司)、胆固醇(质量分数 $\geq 95\%$,上海 Adamas-beta 公司)、甲醇(色谱级,广东省汕头市西陇化工股份有限公司),其余试剂均为市售分析纯.

2 实验方法与结果分析

2.1 鞣花酸的体外分析方法

2.1.1 紫外吸收波长的测定 以甲醇作为空白对照,对质量浓度为 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的鞣花酸溶液进行 200~400 nm 波长范围内的全波长扫描,记录扫描图谱,最大吸收波长为 255 nm.

2.1.2 高效液相色谱的条件 色谱柱为 Sino Chrom ODS-BP(4.6 mm \times 150.0 mm,5 μm);流动相为

甲醇-磷酸溶液($V(\text{甲醇}):V(\text{磷酸})=55:45$,磷酸的体积分数为 0.1%);检测波长为 255 nm ;流速为 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$;进样量为 $30\text{ }\mu\text{L}$.

2.1.3 系统适应性实验 取溶剂甲醇溶液(空白溶剂)、鞣花酸甲醇溶液($5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,鞣花酸对照品)及鞣花酸柔性纳米脂质体(EA-FNL)进样分析,其高效液相色谱(HPLC)图谱,如图 1~3 所示.图 1~3 中: S 为电信号; t 为色谱柱流出物的流出时间.

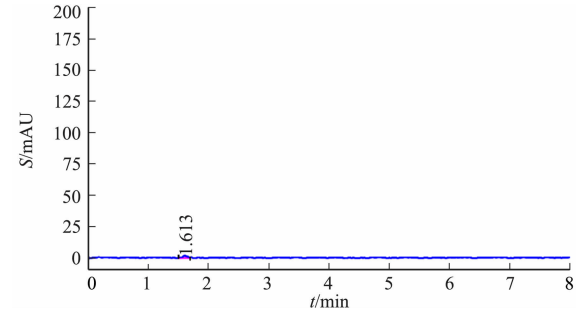


图 1 空白溶剂的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of blank solvent

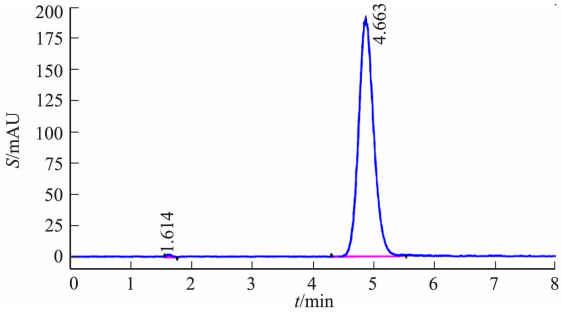


图 2 鞣花酸对照品的 HPLC 图谱

Fig. 2 HPLC chromatograms of ellagic acid reference

2.1.4 标准曲线的制备 精密称取 10.0 mg 鞣花酸,用甲醇溶液溶解并定容于 100 mL ,配制成 $0.1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的鞣花酸对照品储备母液.稀释母液,得到质量浓度分别为 $1,2,3,4,5,6,8,10,30\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的系列对照品溶液,并进样分析.测定鞣花酸的峰面积,作为纵坐标(y),以鞣花酸质量浓度为横坐标(x)进行线性回归,得到线性回归方程 $y=331.79x-186.34$,相关系数 $R^2=0.9991$,线性范围为 $1\sim30\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

2.1.5 精密度实验 制备质量浓度为 $5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的鞣花酸供试品溶液,并进样分析,连续进样 6 次,测定保留时间与峰面积,其相对标准偏差($\text{RSD},n=6$)分别为 0.19% , 0.17% ,精密度良好.

2.1.6 重复性实验 平行配制 6 份质量浓度为 $5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的鞣花酸供试品溶液,并进样分析,测定其峰面积, RSD 为 $1.64\%(n=6)$,重复性良好.

2.1.7 回收率实验 精密量取 1.0 mL 空白脂质体混悬液置于 10 mL 容量瓶中,加入适量鞣花酸样品储备液,配置成质量浓度分别为 $3,5,10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的低、中、高 3 组回收率供试品溶液,每组平行配置 3 份,分别用甲醇定容至刻度,混匀、过滤,并进样分析,根据回归方程计算出质量浓度,结果表明,回收率为 $98.75\%\sim102.34\%$, RSD 为 0.95% .

2.1.8 日内稳定性实验 制备质量浓度为 $5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的鞣花酸供试品溶液,分别于 $0,2,4,8,12\text{ h}$ 进样分析,无其他杂质产生, RSD 为 $1.87\%(n=5)$,供试品溶液的日内稳定性良好.

2.1.9 日间稳定性实验 配制质量浓度为 $5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的鞣花酸供试品溶液,分别于 $0,1,2,3\text{ d}$ 进样分析,无其他杂质产生, RSD 为 $0.91\%(n=4)$,供试品溶液的日间精密度良好.

2.2 EA-FNL 的制备与包封率的计算

2.2.1 EA-FNL 的制备 取处方量的卵磷脂、胆固醇、鞣花酸置于茄形瓶内,用 10 mL 甲醇与三氯甲烷(体积比为 $4:1$)超声 1 min 溶解,于 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 下旋蒸 30 min ,除掉有机溶剂,直至瓶壁上形成薄膜,真空干燥箱 2 h ,除去残余有机溶剂,加 40 mL 磷酸缓冲液($\text{pH}=7.0$),水化 2 h ,过 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 针式滤膜,振摇混匀,即得 EA-FNL,于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 下保存备用.

2.2.2 包封率的计算 取制备好的 1 mL EA-FNL 置于 10 mL 容量瓶,加入甲醇破乳定容,超声 15 min 后,过 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜,测定鞣花酸总质量浓度(ρ_1).另取 1 mL EA-FNL 置于 30 ku 的超滤离心管,于 $4000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下离心 20 min ,取滤过液置于 10 mL 容量瓶,甲醇定容,超声 15 min 后,过 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 滤

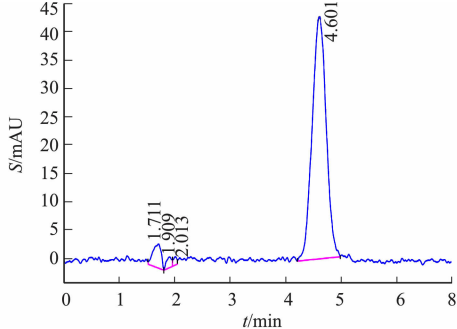


图 3 EA-FNL 的 HPLC 图谱

Fig. 3 HPLC chromatograms of EA-FNL

膜,测定鞣花酸质量浓度(ρ_y).

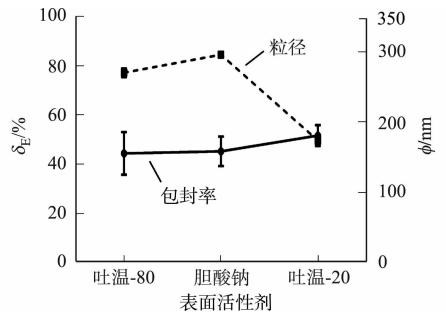
EA-FNL 包封率(δ_E)的计算公式为

$$\delta_E = \frac{\rho_t - \rho_y}{\rho_t} \times 100\%.$$

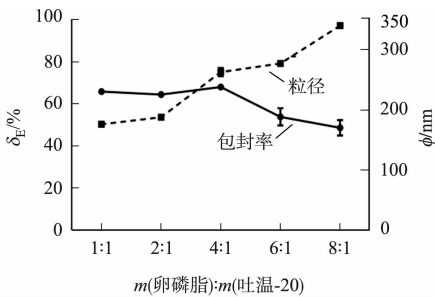
2.3 EA-FNL 制备的影响因素考察

通过单因素实验来考察表面活性剂的种类、卵磷脂与表面活性剂的质量比、卵磷脂与胆固醇的质量比、药物质量浓度、水化时间对包封率和粒径(ϕ)的影响,再通过 Box-Behnken 响应面法优化预测最佳处方. 5 种单因素对 EA-FNL 包封率和粒径的影响,如图 4 所示.

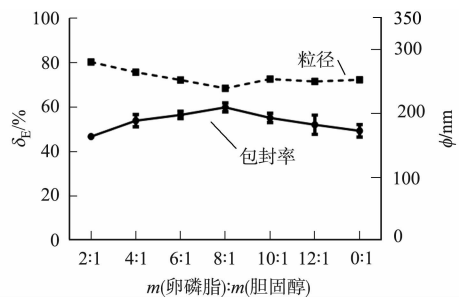
2.3.1 表面活性剂的种类 固定鞣花酸质量浓度为 $25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,水化时间为 3 h,卵磷脂与表面活性剂质量比为 4 : 1,卵磷脂与胆固醇的质量比为 4 : 1,设定表面活性剂种类分别为吐温-80、胆酸钠、吐温-20,按照节 2.2.1 方法制备脂质体,测定其包封率及粒径,结果如图 4(a)所示.由图 4(a)可知:使用吐温-20 制备脂质体的质量最佳,



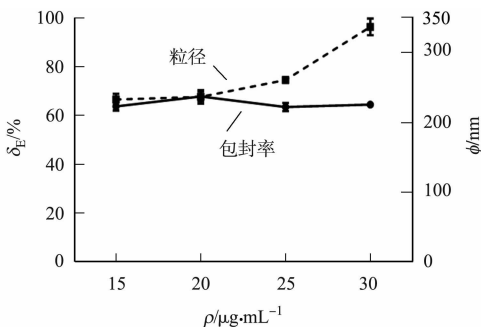
(a) 表面活性剂的种类



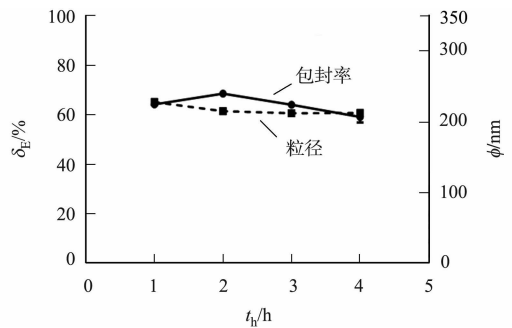
(b) 卵磷脂与表面活性剂的质量比



(c) 卵磷脂与胆固醇的质量比



(d) 药物质量浓度



(e) 水化时间

图 4 5 种单因素对 EA-FNL 包封率和粒径的影响

Fig. 4 Effects of five single factors on EA-FNL encapsulation efficiency and particle size

包封率最大,粒径最小. 这可能是由于吐温-20 具有丰富的亲水基团,使水化过程更加容易.

2.3.2 卵磷脂与表面活性剂的质量比 固定鞣花酸的质量浓度为 $25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,水化时间为 3 h,表面活性剂为吐温-20,卵磷脂与胆固醇的质量比为 4 : 1,设定卵磷脂与表面活性剂的质量比($m(\text{卵磷脂}) : m(\text{吐温-20})$)分别为 1 : 1, 2 : 1, 4 : 1, 6 : 1, 8 : 1,按照节 2.2.1 方法制备脂质体,测定其包封率及粒径,结果如图 4(b)所示.由图 4(b)可知:当卵磷脂与吐温-20 的质量比为 1 : 1 时,所得粒径最小;当卵磷脂与吐温-20 的质量比为 1 : 1, 2 : 1, 4 : 1 时,包封率无显著性变化.考虑到表面活性剂过多会形成胶束^[20],故后续实验卵磷脂与吐温-20 的质量比采用 4 : 1.

2.3.3 卵磷脂与胆固醇的质量比 固定鞣花酸质量浓度为 $25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,水化时间为 3 h,表面活性剂为吐温-20,卵磷脂与吐温-20 的质量比为 1 : 1,设定卵磷脂与胆固醇的质量比($m(\text{卵磷脂}) : m(\text{胆固醇})$)分别为 2 : 1, 4 : 1, 6 : 1, 8 : 1, 10 : 1, 12 : 1, 0 : 1,按照节 2.2.1 方法制备脂质体,测定其包封率及粒径,结果如图 4(c)所示.由图 4(c)可知:当卵磷脂与胆固醇的质量比为 8 : 1 时,所得包封率最大,

粒径最小;随着胆固醇比例的增加,粒径逐渐减小,但超过一定质量比,包封率下降,这可能是由于胆固醇的增加导致膜的通透性增加,使包裹的鞣花酸渗出^[21]。

2.3.4 药物质量浓度 固定水化时间为 3 h,表面活性剂为吐温-20,卵磷脂与吐温-20 的质量比为 1 : 1,卵磷脂与胆固醇的质量比为 8 : 1,同时,设定鞣花酸的质量浓度(ρ)分别为 15,20,25,30,35,40,45 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,按照节 2.2.1 方法制备脂质体,测定其包封率及粒径。当鞣花酸质量浓度大于 35 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,第二天溶液会发生聚沉现象,故对 15,20,25,30 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 4 个质量浓度进行整理,结果如图 4(d) 所示。为保证所得包封率最大,载药最多,选择鞣花酸质量浓度为 25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.3.5 水化时间 固定其他因素不变,考察水化时间(t_h)分别为 1,2,3,4 h 时,包封率和粒径的变化情况,如图 4(e)所示。由图 4(e)可知:当水化时间为 2 h 时,包封率最大。考虑到水化为 1 h 时,茄形瓶上的薄膜未被完全水化为脂质体;当水化时间为 3,4 h 时,脂质体的结构被破坏,导致鞣花酸泄露;水化时间超过 2 h 后,粒径未有明显变化,故选择 2 h 为最优水化时间。

2.4 Box-Behnken 响应面法优化试验设计

单因素考察实验选取卵磷脂与胆固醇的质量比(A)、脂质体制备水化时间(B)、卵磷脂与吐温-20 的质量比(C)作为对 EA-FNL 包封率影响较大的 3 个因素,并以鞣花酸的包封率(Y)为响应值,采用 Box-Behnken 响应面优化制备工艺。每个因素设置 3 个水平分别为低(−1)、中(0)、高(+1),各因素水平,如表 1 所示。

表 1 Box-Behnken 实验设计的因素与水平

Tab.1 Factors and levels of Box-Behnken experiment design

| 因素 | 名称 | 低(−1) | 中(0) | 高(+1) |
|----|---------------------------------|-------|-------|--------|
| A | $m(\text{卵磷脂}):m(\text{胆固醇})$ | 4 : 1 | 8 : 1 | 12 : 1 |
| B | t_h/h | 1 | 2 | 3 |
| C | $m(\text{卵磷脂}):m(\text{吐温-20})$ | 2 : 1 | 4 : 1 | 6 : 1 |

2.4.1 回归模型的建立与方差分析 以包封率为指标,采用软件 Design-Expert 8.0.6 对数据(表 2)进行方程拟合,由此得 $Y=(72.00-0.34A+1.51B-5.84C-2.84AB-0.067AC-1.13BC-6.56A^2-13.31B^2-2.04C^2)/100,R^2=0.982\ 5,P<0.05$,拟合度良好。

对模型进行回归分析与显著性分析,结果如表 3 所示。失拟合 F 值为 0.21,失拟合 F 值相对于纯误差不具有统计学意义,说明实验结果可靠。方程中 C 项具有高度统计学意义,说明影响脂质体包封率的最主要因素是卵磷脂与吐温-20 的质量比。

表 2 Box-Behnken 设计与试验结果

Tab.2 Experimental results and Box-Behnken design

| 试验号 | A | B | C | Y/% | 试验号 | A | B | C | Y/% |
|-----|-------|------|------|----------|-----|-------|------|------|----------|
| 1 | 12.00 | 2.00 | 2.00 | 68.602 4 | 10 | 8.00 | 3.00 | 6.00 | 50.762 1 |
| 2 | 8.00 | 1.00 | 2.00 | 60.276 2 | 11 | 8.00 | 2.00 | 4.00 | 72.801 7 |
| 3 | 4.00 | 1.00 | 4.00 | 47.233 1 | 12 | 8.00 | 2.00 | 4.00 | 72.633 5 |
| 4 | 12.00 | 3.00 | 4.00 | 51.339 3 | 13 | 8.00 | 2.00 | 4.00 | 74.938 9 |
| 5 | 4.00 | 3.00 | 4.00 | 56.900 4 | 14 | 8.00 | 2.00 | 4.00 | 69.188 4 |
| 6 | 12.00 | 1.00 | 4.00 | 53.050 8 | 15 | 4.00 | 2.00 | 6.00 | 58.316 7 |
| 7 | 8.00 | 1.00 | 6.00 | 50.955 0 | 16 | 12.00 | 2.00 | 6.00 | 56.682 8 |
| 8 | 8.00 | 3.00 | 2.00 | 64.592 9 | 17 | 4.00 | 2.00 | 2.00 | 69.968 5 |
| 9 | 8.00 | 2.00 | 4.00 | 70.425 8 | | | | | |

表 3 包封率回归模型方差分析

Tab.3 Regression model analysis of variance for encapsulation efficiency

| 方差来源 | 平方和 | 自由度 | 均方 | F | P | 方差来源 | 平方和 | 自由度 | 均方 | F | P |
|----------------|----------|-----|--------|--------|----------|----------------|----------|-----|--------|----------|----------|
| 模型 | 1 339.62 | 9 | 148.85 | 44.82 | <0.000 1 | A | 0.94 | 1 | 0.94 | 0.28 | 0.611 0 |
| B | 18.24 | 1 | 18.24 | 5.49 | 0.051 6 | C | 272.88 | 1 | 272.88 | 82.17 | <0.000 1 |
| AB | 32.37 | 1 | 32.37 | 9.75 | 0.016 8 | AC | 0.018 | 1 | 0.02 | 0.005 40 | 0.943 5 |
| BC | 5.08 | 1 | 5.08 | 1.53 | 0.255 9 | A ² | 181.21 | 1 | 181.21 | 54.56 | 0.000 2 |
| B ² | 745.52 | 1 | 745.52 | 224.48 | <0.000 1 | C ² | 17.60 | 1 | 17.60 | 5.30 | 0.054 8 |
| 残差 | 23.25 | 7 | 3.32 | — | — | 失拟项 | 3.18 | 3 | 1.06 | 0.21 | 0.883 7 |
| 纯误差 | 20.06 | 4 | 5.02 | — | — | 总和 | 1 362.87 | 16 | — | — | — |

2.4.2 响应面优化与预测 运用软件绘制三因素对评价指标的三维响应面图,结果如图 5 所示. 由图 5 可知:等高线趋于椭圆,三维图的曲线较陡,说明两因素交互作用的显著性越好;A 与 B 的响应面的曲面较陡,B 与 C,A 与 C 的响应面的曲面较平坦,说明卵磷脂与胆固醇的质量比与脂质体制备水化时间的交互作用对脂质体包封率的影响最大,欲使包封率最大化,应选择曲面最高点对应的水平最佳处方工艺,即卵磷脂与胆固醇的质量比为 7.83 : 1,脂质体制备水化时间为 2.1 h,卵磷脂与吐温-20 的质量比为 2 : 1,预测包封率为 75.93%.

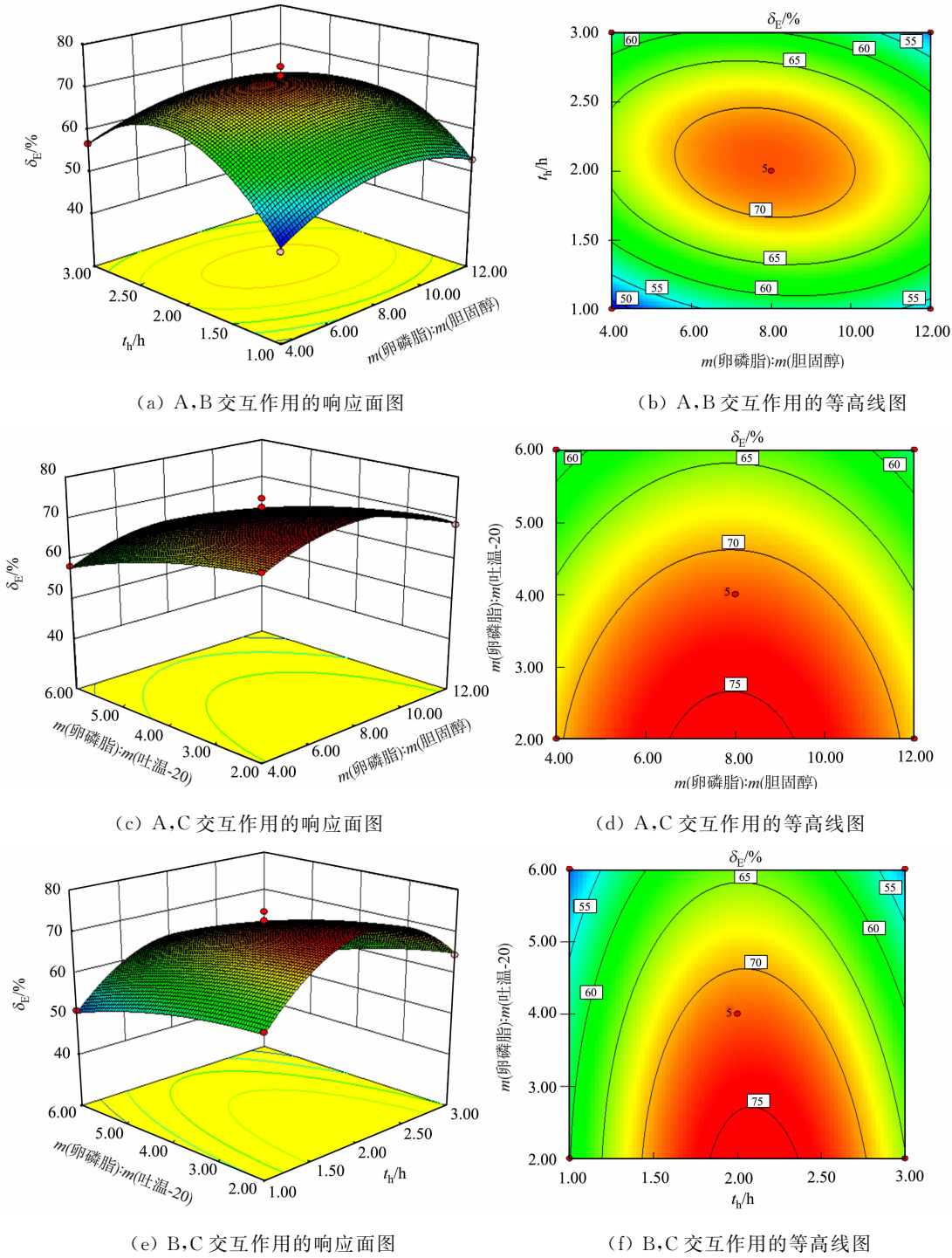


图 5 因素 A~C 对应包封率的三维曲面图

Fig. 5 Three dimension surface charts of encapsulation efficiency corresponding to factors A to C

2.5 EA-FNL 的粒径与 Zeta 电位

根据最终处方平行制备 3 组 EA-FNL,测定其脂质体包封率、粒径与电位,测得柔性纳米脂质体包

封率为 $(75.66\pm0.40)\%$,粒径为 (178.60 ± 4.59) nm,聚合物分散性指数(PDI)为 0.15 ± 0.01 ,电位为 (-30.60 ± 0.92) mV. 根据透射电镜图可知脂质体呈球形,其粒径大小与激光测定仪测定结果相符. EA-FNL 的粒径分布图及电镜照片,如图 6,7 所示. 图 6 中: I 为强度.

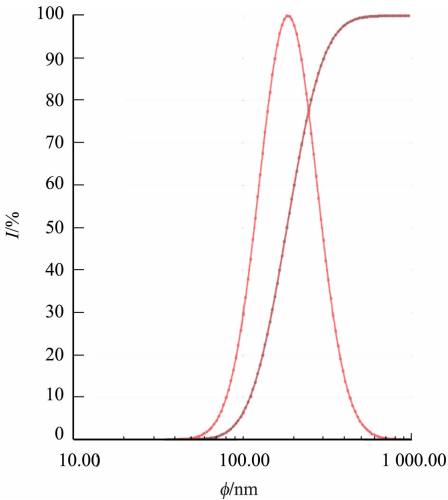


图 6 EA-FNL 的粒径分布图

Fig. 6 Particle size distribution of EA-FNL

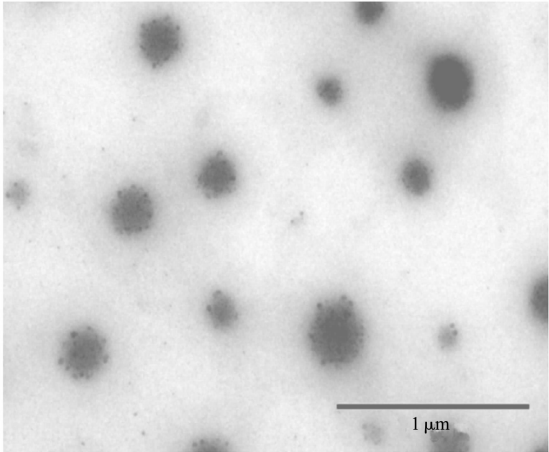


图 7 EA-FNL 的电镜照片

Fig. 7 Electron micrographs of EA-FNL

2.6 初步稳定性考察

按最优工艺制备 EA-FNL,对存储温度进行考察,将脂质体混悬液分别置于 4,25 ℃ 保存,于 0,1,2,3,4,10 d 取样,测定其包封率,观察其状态. 脂质体在 4,25 ℃ 环境中保存无明显差异,EA-FNL 的稳定性,如图 8 所示. 图 8 中: θ 为温度; t_s 为采样时间. 由图 8 可知:在第 10 d,脂质体的包封率略微下降,粒径稍有变大.

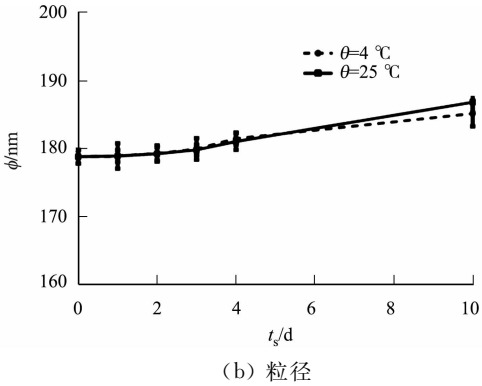
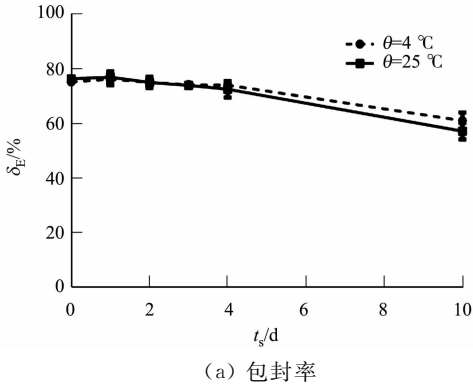


图 8 EA-FNL 的稳定性

Fig. 8 Stability of EA-FNL

2.7 体外透皮实验

2.7.1 离体鼠皮的制备 用水合氯醛将 SD 雄性大鼠麻醉并断颈处死,取腹部完整皮肤,将毛发用刀片刮净. 然后,用刀片、镊子剔除皮肤下脂肪组织,将处理好的皮肤,用生理盐水清洗干净,浸泡 30 min,用滤纸吸干水分,铺皮,用锡纸包裹,置于-80 ℃ 冰箱保存,临用 24 h 前用生理盐水解冻.

2.7.2 透皮实验 采用 Franz 扩散池法,将鼠皮角质层向上,固定于接收室与供给室之间,扩散池面积为 2.2 cm²,体积为 6 mL,为了便于直接进行高效液相色谱的测定,以甲醇-生理盐水为接收液($V(\text{甲醇}):V(\text{生理盐水})=50:50$),将 2 mL EA-FNL 加入供给室,控制温度为 (37.0 ± 0.5) ℃,转速为 400 r·min⁻¹,分别于 1,2,3,4,6,8,10,12,24 h 取出 0.7 mL 接收液,并加入 0.7 mL 新的接收液,取出的接收液过 0.22 μm 滤膜,按照节 2.1.2 进行色谱分析,计算累积透皮量 Q_n 并记录结果(图 9), Q_n 的计算公式为

$$Q_n = \frac{V_t \rho_n + \sum \rho_{n-1} V_s}{S_0}.$$

上式中: V_t 为接收池体积; ρ_n 为 n 次取样点质量浓度; ρ_{n-1} 为 $n-1$ 次取样点质量浓度; V_s 为每次的取样体积; S_0 为渗透面积。

实验结束后,取下鼠皮,将表面残留药物擦拭干净,取透皮处皮肤,剪碎,加入 1.0 mL 甲醇匀浆,匀浆液转移至离心管中,涡旋混匀,12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,残渣用 0.5 mL 甲醇重提一次,合并两次上清液,混匀,定容至 2 mL^[22]. 进行色谱分析,24 h 后 EA-FNL 的皮肤滞留量为 $13.77 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$.

3 讨论

以胆固醇、卵磷脂等为原料,通过薄膜分散法制备 EA-FNL,并以包封率为考察指标,研究柔性纳米脂质体的最佳制备工艺. 由于鞣花酸溶解度低等问题,导致 EA-FNL 的制备难度较高. 脂质体包封率有以下 3 个影响因素. 1) 卵磷脂与胆固醇的质量比. 卵磷脂与胆固醇的质量比对脂质体结构及稳定具有重要影响,胆固醇是脂质体膜的重要组成部分,对脂质体的流动性及膜的稳定性具有双向调节作用,合适的比例有利于增加膜的刚性,提高脂质体包封率^[23-24]. 2) 水化时间. 水化时间过短,会导致水化不完全,不能很好地将药物嵌入脂质体的双分子层中;水化时间过长,又可能破坏脂质体的结构. 3) 卵磷脂与吐温-20 的质量比. 卵磷脂与吐温-20 的质量比直接影响脂质体的形成,过多的表面活性剂可形成胶束,合适比例的表面活性剂可以减小脂质体粒径,但表面活性剂成膜性较差,其用量直接影响脂质体的稳定性^[25].

经过单因素实验和 Box-Behnken 响应面优化最终确定的 EA-FNL 最佳处方:卵磷脂与胆固醇的质量比为 7.83 : 1,脂质体制备水化时间为 2.1 h,卵磷脂与吐温-20 的质量比为 2 : 1. 按最佳处方制备 EA-FNL,其稳定性仍有待提高,可增加影响因素的考察,例如,水化温度、搅拌速度、表面活性种类,以及聚乙二醇类等稳定剂^[26].

脂质体是一种优秀的药物载体,具有良好的生物亲和性,普通的脂质体不适用于皮肤给药,难以透过皮肤角质层到达皮肤深层,FNL 通过降低双分子层的界面张力,增加角质层中双分子层的流动性,从而提高被包裹药物进入皮肤的通透性^[27]. 通过体外渗透实验考察 EA-FNL 的累积透皮量,EA-FNL 的透皮率较好,皮肤滞留量较高. 今后的工作将进一步考察 EA-FNL 的稳定性与复配性的问题,并开展动物实验进行验证,未来期望将鞣花酸柔性纳米脂质体应用于化妆品中,同时,也为柔性纳米脂质体作为药物载体在经皮给药的应用提供研究思路.

参考文献:

[1] BACCARIN T, LEMOS-SENNA E. Potential application of nanoemulsions for skin delivery of pomegranate peel polyphenols[J]. AAPS Pharm Sci Tech, 2017, 18(8): 3307-3314. DOI: 10. 1208/s12249-017-0818-x.

[2] ZEB A. Ellagic acid in suppressing *in vivo* and *in vitro* oxidative stresses[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2018, 448(1/2): 27-41.

[3] KUBA-MIYARA M, AGARIE K, SAKIMA R, *et al.* Inhibitory effects of an ellagic acid glucoside, okicamelliaside, on antigen-mediated degranulation in rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells and passive cutaneous anaphylaxis reaction in mice[J]. Int Immunopharmacol, 2012, 12(4): 675-681. DOI: 10. 1016/j. intimp. 2012. 01. 013.

[4] BENSAAD L, KIM K H, QUAH T C C, *et al.* Anti-inflammatory potential of ellagic acid, gallic acid and punicalagin A & B isolated from punicagranatum[J]. BMC Complement Altern Med, 2017, 17(1): 47-57. DOI: 10. 1186/s12906-017-1555-0.

[5] 韩奇亨, 张春红, 龚雪, 等. 鞣花酸类化合物在野牡丹科植物中的分布与药理活性研究[J]. 中药材, 2018, 41(12): 2962-2967.

[6] LIM S C, HWANG H, HAN S L. Ellagic acid inhibits extracellular acidity-induced invasiveness and expression of COX1, COX2, snail, twist 1, and c-myc in gastric carcinoma cells[J]. Nutrients, 2019, 11(12): 3023. DOI: 10. 3390/nu11123023.

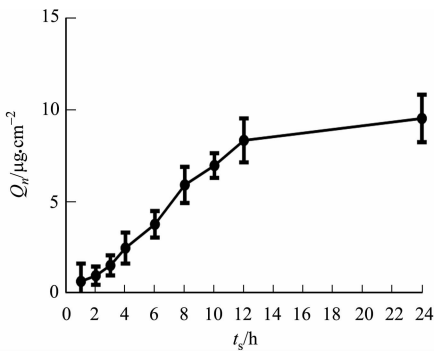


图 9 EA-FNL 的累积透皮量

Fig. 9 Cumulative release of EA-FNL

- [7] ZAAZAA A, LOKMAN M S, SHALBY A B, *et al.* Ellagic acid holds promise against hepatocellular carcinoma in an experimental model: Mechanisms of action[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2018, 19(2): 387-393. DOI: 10. 22034/APJCP. 2018. 19. 2. 387.
- [8] DEROSA G, MAFFIOLI P, SAHEBKAR A. Ellagic acid and its role in chronic diseases[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2016, 928: 473-479. DOI: 10. 1007/978-3-319-41334-1_20.
- [9] ORTIZ-RUIZ C V, BERNA J, TUDELA J, *et al.* Action of ellagic acid on the melanin biosynthesis pathway[J]. *J Dermatol Sci*, 2016, 82(2): 115-122. DOI: 10. 1016/j. jdermsci. 2016. 02. 004.
- [10] WANG Yi, ZENG Yang, FU Wensheng, *et al.* Seed-mediated growth of Au@Ag core-shell nanorods for the detection of ellagic acid in whitening cosmetics[J]. *Anal Chim Acta*, 2018, 1002: 97-104. DOI: 10. 1016/j. aca. 2017. 11. 067.
- [11] PANICHAYUPAKARANANT P, ITSURIYA A, SIRIKATITHAM A. Preparation method and stability of ellagic acid-rich pomegranate fruit peel extract[J]. *Pharm Biol*, 2010, 48(2): 201-205. DOI: 10. 3109/13880200903078503.
- [12] MO J, KAEWNOPPARAT N, SONGKRO S, *et al.* Physicochemical properties, *in vitro* release and skin permeation studies of a topical formulation of standardized pomegranate rind extract[J]. *Pak J Pharm Sci*, 2015, 28(1): 29-36.
- [13] JIANG Tianyue, WANG Tong, LI Teng, *et al.* Enhanced transdermal drug delivery by transfersome-embedded oligopeptide hydrogel for topical chemotherapy of melanoma[J]. *ACS Nano*, 2018, 12(10): 9693-9701. DOI: 10. 1021/acsnano. 8b03800.
- [14] 刘基, 王媚, 王露, 等. 经皮给药系统研究进展[J]. *现代中医药*, 2018, 38(6): 156-159.
- [15] HAO Ying, LI Wei, ZHOU Xingli, *et al.* Microneedles-based transdermal drug delivery systems: A review[J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2017, 13(12): 1581-1597. DOI: 10. 1166/jbn. 2017. 2474.
- [16] 陈桐楷, 林华庆, 李园. 柔性纳米脂质体经皮给药新载体的研究进展[J]. *中国药师*, 2009, 12(6): 732-734.
- [17] LI Chong, ZHANG Xiaolin, HUANG Xinliang, *et al.* Preparation and characterization of flexible nanoliposomes loaded with daptomycin, a novel antibiotic, for topical skin therapy[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2013, 8: 1285-1292. DOI: 10. 2147/IJN. S41695.
- [18] 陈华兵. 促进药物透皮和皮肤靶向的纳米载药系统研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2008.
- [19] KUMAR A, PATHAK K, BALI V. Ultra-adaptable nanovesicular systems: A carrier for systemic delivery of therapeutic agents[J]. *Drug Discov Today*, 2012, 17(21/22): 1233-1241. DOI: 10. 1016/j. drudis. 2012. 06. 013.
- [20] BNYAN R, KHAN I, EHTEZAZI T, *et al.* Surfactant effects on lipid-based vesicles properties[J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2018, 107(5): 1237-1246. DOI: 10. 1016/j. xphs. 2018. 01. 005.
- [21] 孙盟璐. 薄膜法中胆固醇的比例对维生素 C 脂质体性质的影响[J]. *现代化农业*, 2017(8): 41-42.
- [22] 刘广, 齐娜, 孙考祥, 等. 延胡索乙素柔性脂质体的制备与透皮吸收[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(8): 37-39.
- [23] 刘剑敏, 唐静宜, 程路, 等. 正交设计优化磷酸川芎嗪-冰片脂质体的制备工艺[J]. *中国药业*, 2019, 28(11): 44-47.
- [24] KULKARNI S B, SINGH M, BETAGERI G V. Encapsulation, stability and *in-vitro* liposomal formulations release characteristics of colchicine[J]. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 1997, 49(5): 491-495. DOI: 10. 1111/j. 2042-7158. 1997. tb06829. x.
- [25] 张小滨, 侯新朴. 不同表面活性剂对伊文思蓝脂质体体内外性质的影响[J]. *中国药物与临床*, 2003(1): 5-8.
- [26] GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ M L, BARROS L B, PALMA J, *et al.* Application of statistical experimental design to study the formulation variables influencing the coating process of lidocaine liposomes[J]. *Int J Pharm*, 2007, 337(1/2): 336-345. DOI: 10. 1016/j. ijpharm. 2007. 01. 024.
- [27] FANG Zhao, JIA Lu, XIN Jin, *et al.* Comparison of response surface methodology and artificial neural network to optimize novel ophthalmic flexible nano-liposomes: Characterization, evaluation, *in vivo* pharmacokinetics and molecular dynamics simulation[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2018, 172: 288-297. DOI: 10. 1016/j. colsurf. 2018. 08. 046.

(责任编辑: 钱筠 英文审校: 刘源岗)