姜黄素纳米乳温敏水凝胶的制备及其在慢性湿疹治疗中的应用

张 晨[1,2]，杨 雪[2]，李维达[2]，姜谦谦[2]，崔 腾[2*]
（1. 潍坊医学院药学院，山东潍坊 261053；2. 济宁医学院药学院，山东日照 276800）

摘要：首先以包封率为评价指标，采用单因素试验和 Box-Behnken 设计结合响应面法优化姜黄素纳米乳的处方和工艺，得到的优化姜黄素纳米乳包封率为（95.69±0.04）%，粒径为（109.7±0.5）nm，且透射电镜照片显示其外观为大小均一的类球形。然后将优化姜黄素纳米乳加至复合泊洛沙姆 188 和泊洛沙姆 407 凝胶基质中制备透皮用温敏水凝胶。结果表明，所得水凝胶的胶凝温度和胶凝时间分别为（34.3±0.3）℃和（54.2±10.2）s。以大鼠离体皮肤为模型，纳米乳温敏水凝胶中姜黄素的 24 h 累积透过量为（9.93±0.70）μg/cm^2，稳态透皮速率 J_s 为 0.71 μg·cm^{-2}·h^{-1}，分别是姜黄素溶液的 2.5 和 2.6 倍。最后采用 2,4- 二硝基氯苯建立慢性湿疹小鼠模型，以市售复方醋酸地塞米松乳膏为阳性对照，考察纳米乳温敏水凝胶的药效。结果与模型组相比，本品能使小鼠耳部的质量差和肿胀度显著下降（P<0.05），且与阳性药（复方醋酸地塞米松乳膏）对照组的药效无显著性差异（P>0.05）。此外，本品与姜黄素溶液的药效也存在显著性差异（P<0.05）。

关键词：姜黄素；纳米乳；温敏水凝胶；慢性湿疹
中图分类号：R944.9 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-8255(2023)06-0909-10
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2023.06.012

Preparation of Curcumin Nanoemulsion-based Thermosensitive Hydrogel and Its Application in Treatment of Chronic Eczema

ZHANG Chen[1,2], YANG Xue[2], LI Weida[2], JIANG Qianqian[2], CUI Teng[2*]
(*1. College of Pharmacy, Weifang Medical University, Weifang 261053; 2. College of Pharmacy, Jining Medical University, Rizhao 276800*)

ABSTRCT: Firstly, the formulation and process of curcumin nanoemulsion were optimized by single factor test and Box-Behnken design combined with response surface methodology with encapsulation efficiency as evaluation index, and the physicochemical properties of curcumin nanoemulsion prepared under the optimal conditions were investigated. The results showed that the encapsulation efficiency of curcumin nanoemulsion was (95.69±0.04)%, and the particle size was (109.7±0.5) nm. Transmission electron microscopy showed that curcumin nanoemulsion was homogeneous spherical. Then the optimal curcumin nanoemulsion was added to the composite matrix gel composed of poloxamer 188 and poloxamer 407 to prepare a transdermal thermosensitive hydrogel, and its quality was evaluated and its transdermal performance was studied. The results showed that the hydrogel had good temperature sensitivity, the gelation temperature and time were (34.3±0.3) ℃ and (54.2±10.2) s, respectively. The cumulative penetration amount $Q_{24\,h}$ of the hydrogel was (9.93±0.70) μg/cm^2 and the steady transdermal rate J_s was 0.71 μg·cm^{-2}·h^{-1}, which were 2.5 times and 2.6 times of those of the curcumin solution, respectively. Finally, 2,4-dinitrochlorobenzene was used to establish a mouse model of chronic eczema, and the efficacy of the title product was investigated with the commercial compound dexamethasone acetate cream as a positive control. The results showed that compared with the model group, the title product could significantly reduce the ear mass difference and swelling degree of mice (P<0.05), and there was no significant difference in efficacy between the positive control (compound dexamethasone acetate cream) group and the product (P>0.05). In addition, the efficacy of this product was significantly different from that of the curcumin solution (P<0.05).

Key Words: curcumin; nanoemulsion; thermosensitive hydrogel; chronic eczema

慢性湿疹是临床常见的特异免疫性、炎症性皮肤疾病，主要表现为皮肤红斑、丘疹、瘙痒、糜烂、渗出等[1]。该病具有病情顽固、反复发作、迁延不愈的特点，严重影响到患者的生活质量和身心健康[2]。流行病学调查[3]表明，全球范围内成人的慢性湿疹发病率为10%，儿童则高达15%～30%。据WHO统计，近10年来包括中国在内的东南亚国家的慢性湿疹患者人数呈现逐年攀升的趋势，这使得其发病机制及治疗手段的探索日益受到重视。慢性湿疹的发病原因是多方面的，包括皮肤屏障缺陷、免疫细胞浸润、病原微生物定植、基因多态性等[4]。但慢性湿疹的确切发病机制尚未完全明确，目前尚缺乏根治方法，临床实践中长期使用外用药物控制病情。临床上治疗慢性湿疹的主要药物为糖皮质激素，其控制病情的效果较好，但长期使用存在皮损创面易感染、皮肤萎缩、停药后病情易复发或加重等不良反应，所以患者依从性较差[5]。因此，寻找安全、有效并能长期使用的慢性湿疹治疗药物显得尤为必要。

我国中药资源丰富，是开发新型药物的重要来源。近年来，中药治疗慢性湿疹取得了一定疗效，并且与化学药相比具有疗效好、不良反应小的优点[6]。姜黄素（curcumin，**1**）是从姜科、天南星科植物的根茎中提取得到的一种含有酚基和醌基的化学成分。研究[7]表明，**1**具有多种药理活性，如抗炎、抗氧化应激、抗肿瘤、抗纤维化等，可用于治疗肿瘤、自身免疫性疾病、糖尿病并发症、心血管疾病等。目前，**1**在炎症免疫性疾病治疗中的应用是一个新兴的热点，并且在多种皮肤疾病的治疗中显示出较好效果[8—9]，这预示着其在慢性湿疹治疗中有良好的应用前景。然而，**1**属于生物药剂学分类系统Ⅳ类药物，水溶解度低且皮肤渗透性不佳，因此临床应用受到严重制约。

收稿日期：2022-10-19

作者简介：张　晨（1999—），女，硕士研究生，专业方向：新型透皮制剂。

通信作者：崔　腾（1987—），女，副教授，从事药物新剂型与新技术的研究与开发。

E-mail：cuitengsd@126.com

纳米乳具有增加药物溶解度、提高透皮速率、延长作用时间等优点[10]，为改善难溶性药物的经皮吸收提供了有效途径。但纳米乳流动性强，作为透皮给药载体存在黏附力弱、皮肤涂展性差、滞留时间短等问题。纳米乳凝胶作为一种新型的透皮给药系统可有效解决以上问题。纳米乳凝胶是在纳米乳中加入卡波姆、泊洛沙姆等水溶性高分子材料以形成透明、稳定的网状结构胶体，使药物能够被均匀涂抹于患处，延长药物滞留时间，从而持续发挥药效[11]。本研究制备了**1**纳米乳并采用单因素试验和Box-Behnken设计结合响应面法优化其处方和工艺，然后将优化的**1**纳米乳加至复合泊洛沙姆凝胶基质中，构建透皮用温敏水凝胶，最后以市售复方醋酸地塞米松乳膏为对照，以慢性湿疹模型小鼠为对象进行药效学评价，以期为慢性湿疹的治疗提供新的思路。

1　仪器与试药

LC-20AT型高效液相色谱仪（日本岛津公司）；JY92-Ⅱ型超声细胞粉碎机（宁波新芝生物科技股份有限公司）；Sorvall ST 8R型高速冷冻离心机［赛默飞世尔科技（中国）有限公司］；Nano ZS90型粒径电位分析仪（英国Malvern公司）；JEM-2100 PLUS型透射电镜（日本电子株式会社）；Sigma 300型扫描电镜（德国ZEISS公司）；PHS-25型pH计（上海仪电科学仪器股份有限公司）；KX-V/HDP型水平透皮扩散仪（大连科翔科技开发有限公司）；SC600型生物显微镜（意大利Optika公司）。

1原料药（含量≥95%，批号S19245）、**1**对照品（含量≥98%，批号B20614）、泊洛沙姆188（批号M11GS148056）和泊洛沙姆407（批号J24GS1155964）（上海源叶生物科技有限公司）；复方醋酸地塞米松乳膏（华润三九医药股份有限公司，规格20 g∶15 mg，批号2104019S）；大豆油（山东瑞生药用辅料有限公司，批号DD20210710）；亚甲基蓝（批号RH339484）和苏丹红Ⅲ（批号RH276492）（上海易恩信息科技发展有限公司）；2,4-二硝基氯苯［DNCB，西亚化学科技（山东）有限公司，含量≥99%，批号20220111］；无水乙醇（烟台远东精细化工有限公司，批号20220606）；Tween-80、甲醇（含量≥99.9%，批号20221113）（国药集团化学试剂有限公

司）；乙腈（北京百灵威科技有限公司，含量≥ 99.9%，批号 L6C0V46）。

BALB/c 小鼠（雄性，18 ～ 22 g）和 SD 大鼠（雄性，200 ～ 240 g）均由济南朋悦实验动物繁殖有限公司提供，实验动物生产许可证编号 SCXK（鲁）2019-0003。

2 方法与结果

2.1 1 含量分析方法的建立

2.1.1 色谱条件

色谱柱 Nucifera C_{18} 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相 乙腈和 0.3%冰乙酸溶液（体积比 60 ∶ 40）的混合溶液；检测波长 426 nm；柱温 30 ℃；流速 1 mL/min；进样量 10 μL。

2.1.2 专属性试验

精密移取适量 **1** 甲醇溶液、**1** 纳米乳溶液及空白纳米乳溶液，照“**2.1.1**”项下色谱条件进样测定。结果如图 1 所示，可见 **1** 在 5.6 min 附近出峰，此处辅料对 **1** 的测定无干扰，表明方法专属性良好。

2.1.3 线性试验和方法学验证结果

将 **1** 对照品用甲醇超声溶解，稀释后作为 **1** 质量浓度为 0.1 mg/mL 的贮备液，再用甲醇稀释成 0.5、1、2、4、6、12 μg/mL 的 **1** 系列标准溶液。照“**2.1.1**”项下色谱条件进样测定，记录峰面积。以 **1** 的质量浓度（c）为横坐标、峰面积（A）为纵坐标，绘制标准曲线，所得线性回归方程为 A=119 748c+6 514.5（r=0.999 9），表明 **1** 质量浓度在 0.5 ～ 12 μg/mL 与峰面积线性关系良好。

选取低、中、高质量浓度的 **1** 标准溶液，于 1 日内连续测定 6 次，连续 6 d 测定。本法日内和日间 RSD 均小于 2%；供试品溶液在室温放置 24 h，峰面积的 RSD<0.3%；并且，加样回收率试验结果为 99.46%～ 100.13%，符合定量分析试验的要求。

2.2 1 纳米乳的制备

精密称取 **1** 原料药 2.4 mg 置离心管中，加入无水乙醇 0.2 mL 和大豆油 0.14 mL，超声使 **1** 原料药充分溶解，制成油相。将 20% Tween-80 0.4 mL 缓缓加至油相中，继续加入超纯水 1.26 mL，涡旋混匀 15 min 后置超声细胞粉碎机中（300 W，工作 2 s，间歇 2 s）超声 4 min，即得 **1** 纳米乳。

2.3 1 纳米乳包封率的测定[12]

2.3.1 纳米乳透过能力的考察

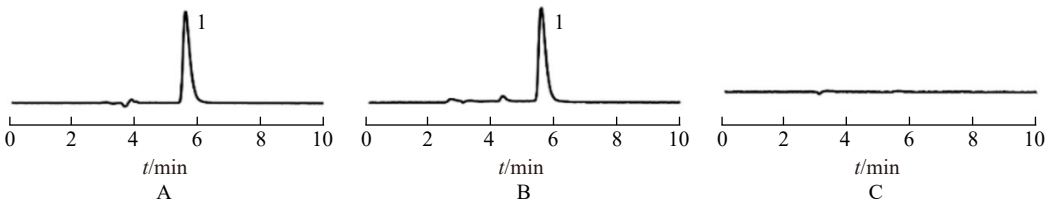
精密移取适量 **1** 纳米乳，加至超滤离心管（截留分子量为 10 000）中，离心（1 000×g）10 min，收集滤液后以粒径电位分析仪检测粒径。结果显示，滤液中未检出 **1** 纳米乳，表明该条件能达到完全截留 **1** 纳米乳的效果。

2.3.2 超滤回收试验

精密移取适量 **1** 贮备液，置 25 mL 量瓶中，加入适量空白纳米乳，分别配制成低、中、高质量浓度（1、4、6 μg/mL）的 **1** 样品溶液（各水平平行配制 3 份）。分别精密移取适量加至超滤离心管（截留分子量为 10 000）中，离心（1 000×g）10 min，收集滤液，照“**2.1.1**”项下色谱条件进样测定，计算得高、中、低质量浓度样品溶液的回收率（n=3）分别为（98.99±0.18）%、（97.79±0.21）%、（99.64±0.19）%。

2.3.3 1 纳米乳包封率的测定

精密移取 **1** 纳米乳 1 mL，加至超滤离心管（截留分子量为 10 000）中，离心（1 000×g）10 min，收



A—**1** 甲醇溶液；B—**1** 纳米乳溶液；C—空白纳米乳溶液。

1—**1**。

图 1 专属性试验色谱图

Fig.1 Chromatograms for Specificity Test

集滤液，经适当稀释后照“**2.1.1**”项下色谱条件进样测定，计算 **1** 纳米乳中游离药物的质量。另精密移取 **1** 纳米乳 1 mL，加至离心管中，以甲醇超声破乳，适当稀释后照“**2.1.1**”项下色谱条件进样测定，计算 **1** 纳米乳中药物的总质量。最终计算得包封率。

2.4 单因素试验

单因素试验中，照如下顺序逐一改变考察因素：投药量分别为 2.0、2.4、2.8、3.2 mg；乳化剂（Tween-80）用量分别为 10%、15%、20%、25%；助乳化剂（无水乙醇）用量分别为 0.1、0.2、0.3、0.4 mL；超声功率分别为 100、200、300、400 W；超声时间分别为 1、2、3、4 min。各平行试验 3 次。试验过程中，除考察因素变化外，其他因素保持不变，照“**2.2**”项下方法制备 **1** 纳米乳，并按“**2.3.3**”项下方法测定包封率。结果如图 2 所示，可见制品包封率随着投药量和助乳化剂用量的增加呈现升高的趋势，并且分别在投药量为 2.4 mg 和助乳化剂用量为 0.2 mL 时达到峰值后基本不再改变；随着乳化剂用量、超声功率和的超声时间的增加，包封率呈现先升高后降低的趋势，并且分别在乳化剂用量为 20%、超声功率为 300 W 和超声时间为 2 min 时达到峰值。以下采用 Box-Behnken 设计结合响应面法继续优化处方。

2.5 Box-Behnken 设计结合响应面法优化处方

2.5.1 优化编码及水平

根据单因素试验结果，选择超声功率（X_1）、超声时间（X_2）和乳化剂用量（X_3）为主要影响因素，以包封率（Y）为评价指标，采用 Box-Behnken 设计结合响应面法对 **1** 纳米乳处方和工艺进行优化。因素水平如表 1 所示，试验安排和结果如表 2 所示。

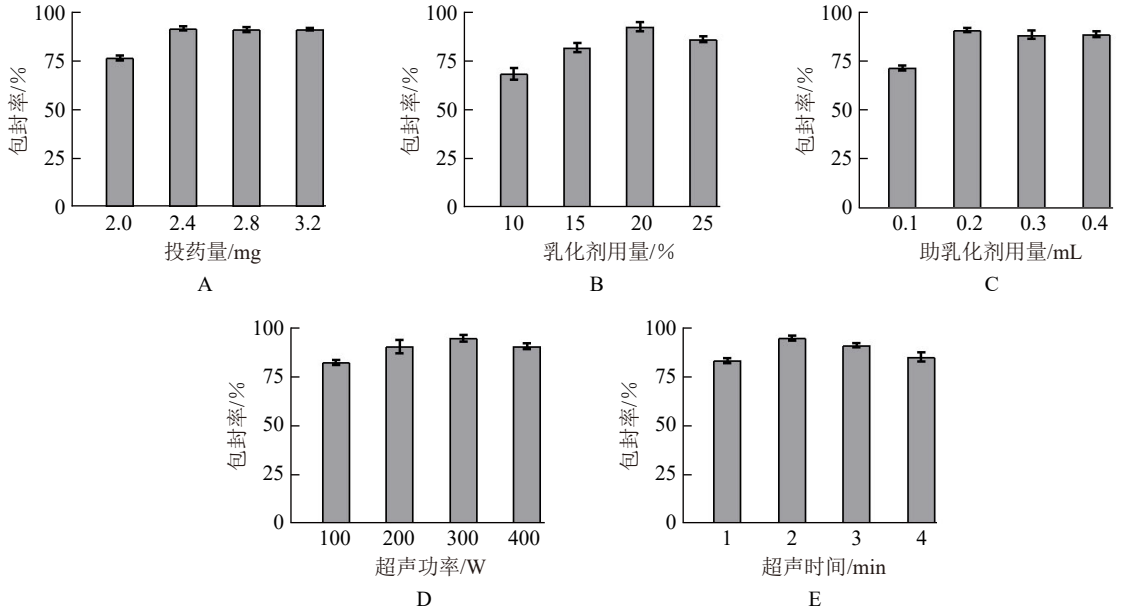
表 1　Box-Behnken 设计的因素及水平

Tab.1　Factors and Levels of Box-Behnken Design

因素	水平		
	－1	0	1
X_1/W	200	300	400
X_2/min	1	2	3
X_3/%	10	15	20

2.5.2 模型拟合

应用 Design Expert 8.0 软件对结果进行方差分析以及多元二次回归方程拟合。拟合得到的回归方



A—投药量；B—乳化剂用量；C—助乳化剂用量；D—超声功率；E—超声时间。

图 2　单因素试验结果（n=3）

Fig.2　Results of Single Factor Test（n=3）

表 2 Box-Behnken 设计的试验安排和结果

Tab.2 Scheme and Results of Box-Behnken Design

运行顺序	X_1/W	X_2/min	X_3/%	Y/%
1	400	1	15	79.71
2	400	1	15	90.23
3	200	3	15	83.41
4	400	3	15	82.67
5	200	2	10	61.30
6	400	2	10	72.25
7	200	2	20	90.77
8	400	2	20	87.81
9	300	1	10	69.43
10	300	3	10	57.10
11	300	1	20	84.55
12	300	3	20	95.44
13	300	2	15	85.42
14	300	2	15	81.60
15	300	2	15	82.98
16	300	2	15	81.44
17	300	2	15	82.35

程模型如下。

$$Y=82.76+2.22X_1-0.66X_2+12.31X_3-2.82X_1X_2-3.48X_1X_3+5.81X_2X_3+1.32X_1^2-0.08X_2^2-6.05X_3^2$$

该拟合模型 $P<0.000\ 1$，表明有极显著差异；相关系数 $r=0.987\ 6$，表明该模型预测值与测定值的相关性良好。失拟项 $P=0.393\ 2>0.05$，不具有显著性，表明方程拟合度和可信度良好。

采用 ANOVA 法对试验数据进行分析，由各影响因素的显著性检验结果可知，模型方程中因素 X_1（$P=0.007\ 9$）对包封率有显著影响，因素 X_3（$P<0.000\ 1$）有极显著影响，其他项则均不显著。

2.5.3 响应面优化与优化参数预测

利用 Design Expert 8.0 软件绘制试验结果的等高线图和三维响应面图，结果如图 3 所示，当固定超声功率为 200 W 时，包封率随着超声时间的增加而升高，随着乳化剂用量的增加而降低。当固定超声时间为 2 min 时，包封率随着超声功率和乳化剂用量的增加而升高。当固定乳化剂用量为 15%时，包封率随着超声功率的增加而升高，随着超声时间的延长而降低。

拟合得到的优化参数为 $X_1=208$ W，$X_2=3$ min，$X_3=19$ %，此时 $Y=95.78$ %。按上述优化结果制备了 3 批 **1** 纳米乳，各 2 mL，测得其包封率为（95.69±0.04）%，与预期结果的偏差为 0.09%。以下试验均使用该优化条件制备的 **1** 纳米乳进行。

2.6 1 纳米乳的理化性质

2.6.1 外观性状

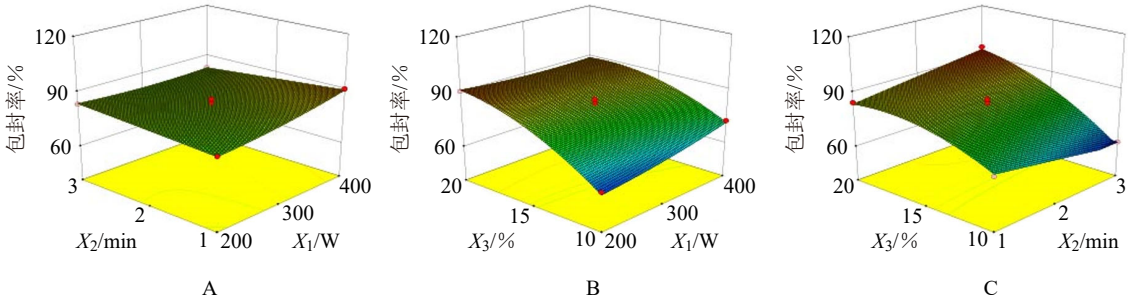
室温下 **1** 纳米乳为黄色、均一的液体。精密移取适量 **1** 纳米乳，适当稀释后以激光照射。结果如图 4 所示，可见 **1** 纳米乳可产生明显的丁达尔效应。

2.6.2 类型鉴别

精密移取适量 **1** 纳米乳，分别滴加亚甲基蓝和苏丹红，观察 2 种染料的扩散速度。结果如图 5 所示，可见加入苏丹红的样本仅在表层呈现深红色而加入亚甲基蓝的样本呈现均匀的蓝绿色，表明制备的 **1** 纳米乳为 O/W 型。

2.6.3 粒径测定

精密移取适量 **1** 纳米乳，适当稀释后以粒径电位分析仪测定其粒径。结果如图 6 所示，**1** 纳米乳的粒径为（109.7±0.5）nm，多分散性指数（PDI）为 0.19±0.05（$n=3$），表明粒度分布均一。



A—自变量 X_1 和 X_2 的影响，B—自变量 X_1 和 X_3 的影响，C—自变量 X_2 和 X_3 的影响。

图 3 3D 响应面图

Fig.3 3D Response Surface Plots



图 4　1 纳米乳的丁达尔效应

Fig.4　Tyndall Phenomenon of **1** Nanoemulsion



A—苏丹红；B—亚甲基蓝。

图 5　1 纳米乳的类型鉴别

Fig.5　Type Identification of **1** Nanoemulsion

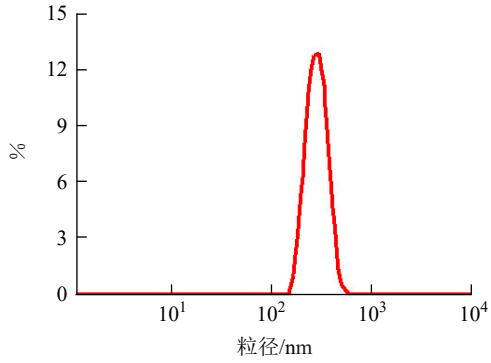


图 6　1 纳米乳的粒度分布

Fig.6　Particle Size Distribution of **1** Nanoemulsion

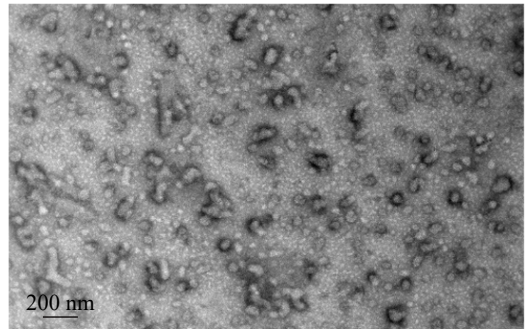


图 7　1 纳米乳的 TEM 照片（×20 000）

Fig.7　TEM Image of **1** Nanoemulsion (×20 000)

2.6.4　透射电镜（TEM）观察

将 **1** 纳米乳滴于碳膜铜网上，放置 5 min，用滤纸吸去铜网周围多余的乳液，然后用 1%磷钨酸溶液负染 5 min，用滤纸吸去多余的染液，待铜网干燥后置 TEM 下观察并拍照。结果如图 7 所示，可见 **1** 纳米乳为大小均一的类球形。

2.7　**1** 纳米乳温敏水凝胶的制备

分别精密称取泊洛沙姆 188 0.40 g 和泊洛沙姆 407 1.23 g，置 25 mL 烧杯中，加入超纯水 9 mL，搅匀。精密移取 **1** 纳米乳 1 mL，加至上述混合溶液中，搅匀后置 4 ℃冰箱中溶胀 24 h，即得 **1** 纳米乳温敏水凝胶。

2.8　**1** 纳米乳温敏水凝胶的质量评价

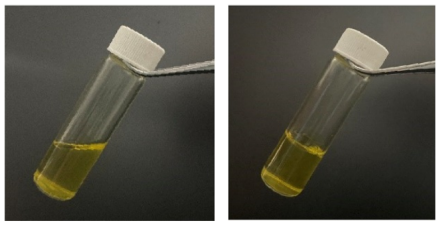
2.8.1　外观性状

1 纳米乳温敏水凝胶在 4 和 37 ℃时的外观性状如图 8 所示，**1** 纳米乳温敏水凝胶在 4 ℃时为淡黄色、均一的溶液，流动性好；在 37 ℃时为淡黄色、透明的半固体，无流动性，表明其具有良好的温度敏感性。

2.8.2　胶凝温度与时间的测定[13]

精密移取 **1** 纳米乳温敏水凝胶 1 mL 置 5 mL 西林瓶中，放置打孔橡胶塞后插入温度计（精度 0.1 ℃），并保证其感应端完全浸入凝胶溶液。将西林瓶含凝胶部分全部没入水中，从室温开始以 0.5 ℃/min 的速度逐渐升高水温，每间隔 1 min 将试管拿出，观察凝胶状态，直至将西林瓶倒置 15 s 而凝胶不再流动为止，记录此时温度，即为胶凝温度（平行测定 6 份），测得胶凝温度为 (34.3±0.3) ℃。

精密移取 **1** 纳米乳温敏水凝胶 1 mL 置 5 mL 西林瓶中，在 37 ℃恒温水浴中孵育（保证西林瓶含凝胶部分全部没入水中），每间隔 25 s 将试管拿出观察凝胶状态，直至将西林瓶倒置 15 s 而凝胶不再流动为止，记录时间，即为胶凝时间（平行测定 6 份），测得胶凝时间为 (54.2±10.2) s。



A B

A—4 ℃；B—37 ℃。

图 8 1 纳米乳温敏水凝胶在 4 和 37 ℃时的外观性状

Fig.8 Appearance Characteristics of **1** Nanoemulsion-based Thermosensitive Hydrogel at 4 and 37 ℃

2.8.3 pH 值的测定

精密移取适量 **1** 纳米乳温敏水凝胶，使用 pH 计测得其 pH 值为 6.65±0.10（n=6），符合经皮给药制剂 pH 值应为 5 ～ 7 的要求。

2.8.4 扫描电镜（SEM）观察

将 **1** 纳米乳温敏水凝胶冷冻干燥，取适量粉末进行喷金处理，在加速电压 10.0 kV 条件下采用 SEM 观察 **1** 纳米乳温敏水凝胶发生凝胶后的微观结构形态。结果如图 9 所示，可见凝胶后的样品显示出典型的三维网状结构，不规则的孔道相互连接且孔壁具有一定的厚度。

2.9 1 纳米乳温敏水凝胶的透皮性能研究[14]

2.9.1 离体皮肤的制备

雄性 SD 大鼠麻醉后剃除腹部毛发，快速分离腹部皮肤并除去皮下脂肪和黏液组织，用生理盐水洗净后密封于铝箔袋中，－20 ℃保存备用。

2.9.2 体外透皮试验

采用改良的 Franz 扩散池，面积为 1.767 cm^2，接收池容积为 10 mL，循环水浴温度控制为（37.0±0.5）℃，转速设定为 200 r/min。将离体皮肤置扩散池与接收池之间（角质层面向扩散池），接收池中注入接收液（含 30% 乙醇的生理盐水，使用前超声脱气，10 mL）。分别精密移取 **1** 溶液（溶剂为含 30% 乙醇的生理盐水）1 mL 和 **1** 纳米乳温敏水凝胶（**1** 含量均为 0.1 mg）1 mL，均匀涂抹于皮肤表面（平行测定 6 份），进行透皮试验。分别于 2、4、6、8、10 和 24 h 时取接收液 1 mL（同时补加同温等量空白接收液），离心（6 950×g）10 min，取上清液照“**2.2.1**”项下色谱条件测定，计算接收液中 **1** 的质量浓度及累积透过量（Q）。以 Q 对时间 t 作图，同时对曲线中的直线部分进行线性回归，求出的直线斜率即为稳态透皮速率（J_s）。结果如图 10 和表 3 所示，**1** 纳米乳温敏水凝胶中 **1** 的 24 h 累积透过量 $Q_{24\,h}$ 为（9.93±0.70）μg/cm^2，J_s 为 0.71 μg·cm^{-2}·h^{-1}，分别是 **1** 溶液的 2.5 和 2.6 倍，表明所制备的 **1** 纳米乳温敏水凝胶可以促进 **1** 的经皮渗透。

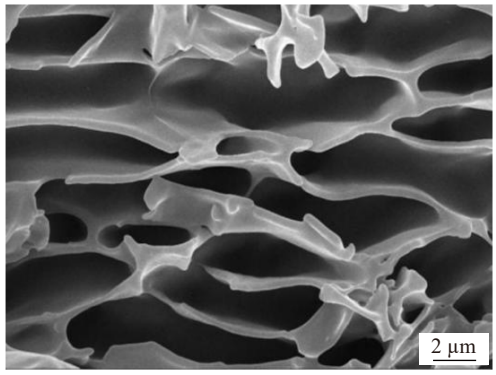


图 9 1 纳米乳温敏水凝胶的 SEM 照片（×5 000）

Fig.9 SEM Image of the**1** Nanoemulsion-based Thermosensitive Hydrogel（×5 000）

表 3 1 溶液和 1 纳米乳温敏水凝胶的体外渗透参数（$\bar{x}\pm s$，n=6）

Tab.3 *In vitro* Penetration Parameters of **1** Solution and **1** Nanoemulsion-based Thermosensitive Hydrogel（$\bar{x}\pm s$, n=6）

组别	Q-t方程	$Q_{24\,h}$/(μg·cm^{-2})	J_s/(μg·cm^{-2}·h^{-1})
1 溶液	Q=0.272t－0.167（r=0.994 1）	4.05±0.39	0.27
1 纳米乳温敏水凝胶	Q=0.707t－0.566（r=0.996 1）	9.93±0.70	0.71

2.10 1 纳米乳温敏水凝胶的药效学评价

2.10.1 分组和慢性湿疹小鼠模型的建立[15]

精密称取 DNCB 粉末 0.7 g 置离心管中，加入橄榄油 2 mL 和丙酮 8 mL，混匀即得 7% DNCB 溶液。同法制备 1% DNCB 溶液。

将 50 只雄性 BALB/c 小鼠随机分为 5 组（每组 10 只），分别为正常组、模型组、阳性药（复方醋酸地塞米松乳膏）治疗组、**1** 溶液组和 **1** 纳米乳温敏水凝胶治疗组。正常组小鼠正常饲养，模型组

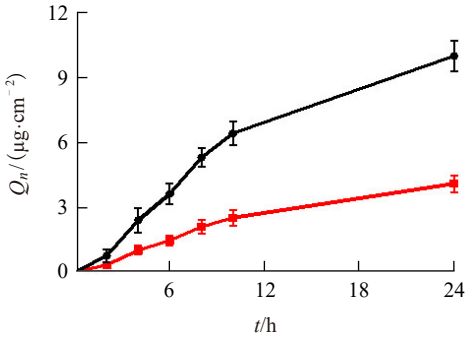


图 10　1 溶液和 1 纳米乳温敏水凝胶中 1 对 SD 大鼠皮肤的透皮特性（n=6）

Fig.10　Transdermal Profiles of **1** from **1** Solution and **1** Nanoemulsion-based Thermosensitive Hydrogel through SD Rat Skin（n=6）

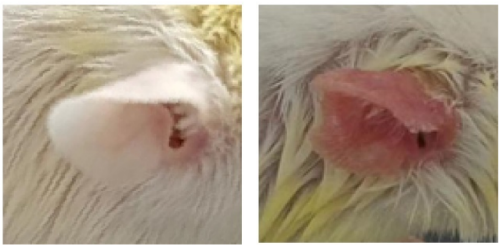
小鼠造模结束后正常饲养，阳性药组、**1** 溶液组和 **1** 纳米乳温敏水凝胶组小鼠造模结束后分别精密给予复方醋酸地塞米松乳膏 0.1 g（给药剂量 3.75 mg/kg）、**1** 溶液 0.1 mL（给药剂量 0.5 mg/kg）和 **1** 纳米乳温敏水凝胶 0.1 mL（给药剂量 0.5 mg/kg），将各药物均匀涂抹于右耳，每日 1 次，连续给药 10 d。

除正常组外，其余各组小鼠试验前 1 d 进行腹部脱毛处理（脱毛面积 2 cm×2 cm）。试验 d1 精密移取 7% DNCB 溶液 100 μL 涂抹在脱毛区，d2、d3 采取同样的方法进行致敏。d7，除正常组外，精密移取 1% DNCB 溶液 100 μL 涂抹于其余各组小鼠右耳内侧，每 3 d 涂抹 1 次，连续强化 3 次。正常组和模型组小鼠耳组织外观如图 11 所示，可见模型小鼠耳部明显红肿、卷曲且有皮屑出现，正常组小鼠则未出现此现象。

随机选取正常组和模型组小鼠，颈椎脱臼处死后沿耳部轮廓剪下右耳，用生理盐水洗净后以 4% 多聚甲醛溶液固定，逐级脱水、石蜡包埋、切片、苏木精 - 伊红（HE）染色，最后置 400 倍光镜下观察耳组织病理学变化。结果如图 12 所示，模型组与正常组相比，表皮增厚且角质层高度角化，真皮内水肿且出现大量中性粒细胞浸润。

2.10.2　外观评价

慢性湿疹小鼠模型建立后的药物治疗期间，应定期观察小鼠右耳红肿、结痂程度，评价疗效。药物治疗终止时，各组小鼠右耳外观如图 13 所示，与正常组相比，模型组小鼠右耳呈卷曲状，皮肤明显增厚且有皮屑脱落；**1** 溶液治疗组小鼠右耳肿胀程度减轻但仍有部分皮屑存在；阳性药治疗组和 **1** 纳米乳温敏水凝胶治疗组小鼠右耳肿胀程度减轻，且未见皮屑。



A—正常组；B—模型组。

图 11　小鼠耳部外观照片

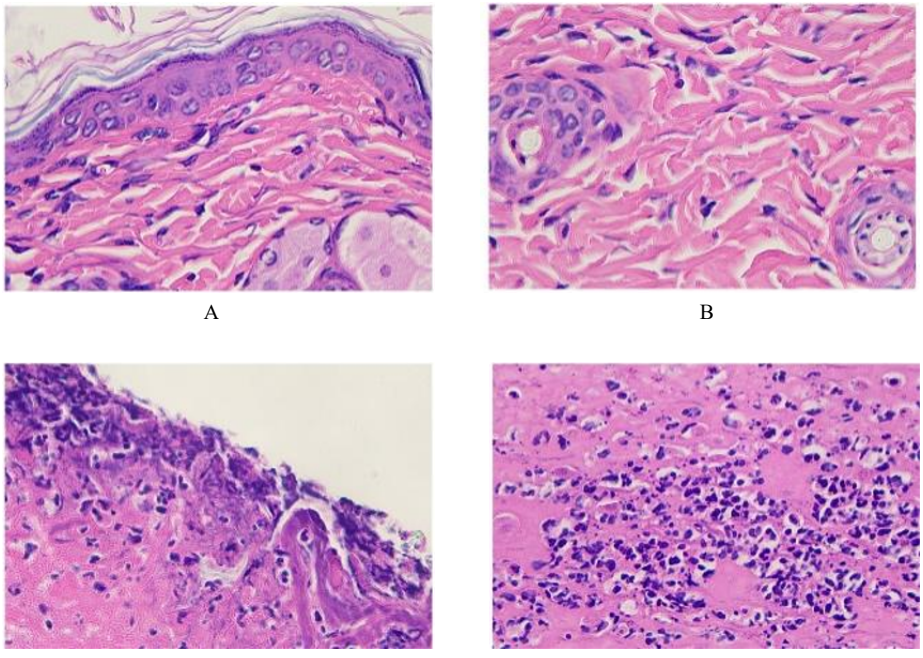
Fig.11　Appearance Photos of Mouse Ear

2.10.3　耳质量差和肿胀度

药物治疗终止时，每组随机选取 3 只小鼠，颈椎脱臼处死后沿耳部轮廓剪下左右耳，用直径 0.5 cm 打孔器剪切下相同孔径的耳组织圆片。称定左右耳的质量（m），计算耳质量差（$m_{右耳} - m_{左耳}$）；用游标卡尺测量左右耳厚度（D），计算耳肿胀度（$D_{右耳} - D_{左耳}$）。结果如图 14 所示，与正常组相比，模型组小鼠的耳质量差显著升高（P<0.01）；与模型组相比，**1** 纳米乳温敏水凝胶治疗组小鼠两耳质量差显著降低（P<0.05）；与阳性药治疗组相比，**1** 纳米乳温敏水凝胶治疗组小鼠耳质量差更低，但二者没有显著性差异（P>0.05）；与 **1** 溶液治疗组相比，**1** 纳米乳温敏水凝胶治疗组小鼠耳质量差显著降低（P<0.05）。与正常组相比，模型组小鼠耳肿胀度显著升高（P<0.01）；与模型组相比，**1** 纳米乳温敏水凝胶治疗组小鼠耳肿胀度显著降低（P<0.01）；与阳性药治疗组相比，**1** 纳米乳温敏水凝胶治疗组小鼠耳肿胀度降低，但二者没有显著性差异（P>0.05）；与 **1** 溶液治疗组相比，**1** 纳米乳温敏水凝胶治疗组小鼠耳肿胀度显著降低（P<0.05）。

3　讨论

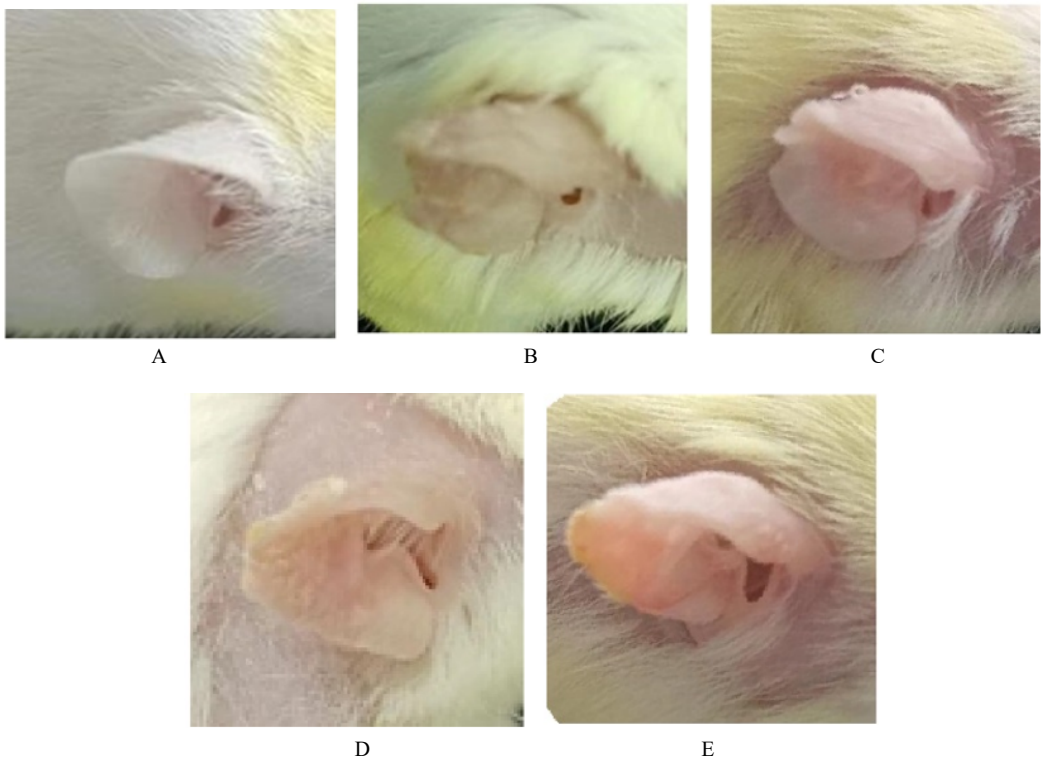
本研究首先将 **1** 制备成纳米乳以解决其溶解度低和皮肤渗透性不佳的问题。优化 **1** 纳米乳具有粒



A 和 B—分别为正常组小鼠耳部的表皮层和真皮层；C 和 D—分别为模型组小鼠耳部的表皮层和真皮层。

图 12　小鼠耳组织病理切片照片（×400）

Fig.12　Pathological Sections of Mouse Ear Tissue (×400)



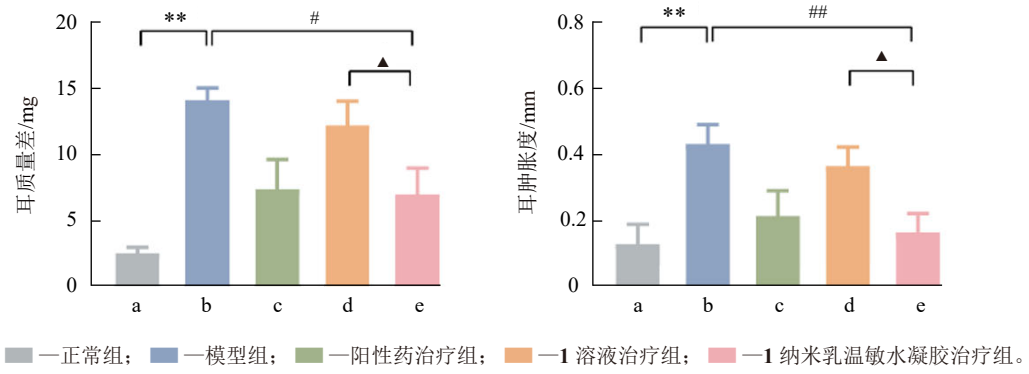
A—正常组；B—模型组；C—阳性药治疗组；D—**1** 溶液治疗组；E—**1** 纳米乳温敏水凝胶治疗组。

图 13　不同药物处理组小鼠的耳组织外观

Fig.13　Appearance Photos of Mouse Ear with Different Drug Treatments

径（109.7±0.5）nm 且分布均匀的类球形乳滴，包封率高达（95.69±0.04）%，这为 **1** 纳米乳温敏水凝胶的制备和药效的充分发挥奠定了良好的基础。然后将优化 **1** 纳米乳分散于复合泊洛沙姆 188 和泊洛沙姆 407 的凝胶基质中，构建透皮用温敏水凝胶。该水胶凝胶具有良好的温敏性，涂抹于皮肤表面后可快速形成凝胶，有利于增强对皮肤的附着而充分发挥药效；并且体外透皮性能研究结果表明，**1** 纳米乳温敏水凝胶可促进 **1** 的经皮渗透，这可能是纳米乳和水凝胶双重作用的结果，该性质有利于慢性湿疹的治疗。药效学评价结果表明，**1** 纳米乳温敏水凝胶的治疗效果与市售复方醋酸地塞米松乳膏无显著性差异。但是值得注意的是，复方醋酸地塞米松乳膏为激素类药物，长期使用的不良反应较严重；而 **1** 作为天然成分，长期使用时不良反应较少，因而可提高湿疹患者的依从性。综上所述，本研究制备的 **1** 纳米乳温敏水凝胶具有良好的临床转化价值和广阔的应用前景。

致谢：李琳和崔俊蓝参与目录插图绘制的部分工作，林希尧承担了姜黄素纳米乳处方优化的部分工作，耿一雲完成了小鼠湿疹模型建立的部分工作。



A—耳质量差；B—耳肿胀度。

图 14　不同药物对小鼠耳片质量与肿胀度的影响（与正常组相比，** 表示 P<0.01；与模型组相比，$^{\#}$ 表示 P<0.05，$^{\#\#}$ 表示 P<0.01；与 **1** 溶液治疗组相比，▲ 表示 P<0.05；n=3）

Fig.14　Effects of Different Drugs on Mass Difference and Swelling Degree of Mouse Ear

(Compared with the normal group, ** represents P<0.01; compared with the model group, $^{\#}$ represents P<0.05, $^{\#\#}$ represents P<0.01; compared with the **1** solution treat group, ▲ represents P<0.05; n=3)

参考文献：

[1] ENDRE K M A, LANDRØ L, LEBLANC M, *et al*. Eczema distribution in girls and boys during infancy: a cohort study on atopic dermatitis [J]. *J Allergy Clin Immunol Pract*, 2021, **9**(9): 3513-3516.

[2] SILVERBERG J I, HANIFIN J M. Adult eczema prevalence and associations with asthma and other health and demographic factors: a US population-based study [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2013, **132**(5): 1132-1138.

[3] BROWN S J. Molecular mechanisms in atopic eczema: insights gained from genetic studies [J]. *J Pathol*, 2017, **241**(2): 140-145.

[4] SIMON D, HÖSLI S, KOSTYLINA G, *et al*. Anti-CD20 (rituximab) treatment improves atopic eczema [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2008, **121**(1): 122-128.

[5] WOLLENBERG A, ORANJE A, DELEURAN M, *et al*. ETFAD/EADV Eczema task force 2015 position paper on diagnosis and treatment of atopic dermatitis in adult and paediatric patients [J]. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2016, **30**(5): 729-747.

[6] GITTLER J K, SHEMER A, SUÁREZ-FARIÑAS M, *et al*. Progressive activation of T_H2/T_H22 cytokines and selective epidermal proteins characterizes acute and chronic atopic dermatitis [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2012, **130**(6): 1344-1354.

（下转第926页）

neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy based on network pharmacology and molecular simulation technology [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, **2022**: 4904325.

[15] 刘　媛, 解宇环, 何　丹, 等. 神经酰胺代谢途径对皮肤屏障功能影响研究进展[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2017, **33**(10): 619-623.

[16] ISHIDA-YAMAMOTO A, IGAWA S, KISHIBE M. Molecular basis of the skin barrier structures revealed by electron microscopy [J]. *Exp Dermatol*, 2018, **27**(8): 841-846.

[17] XI H, CUN D, XIANG R, *et al*. Intra-articular drug delivery from an optimized topical patch containing teriflunomide and lornoxicam for rheumatoid arthritis treatment: does the topical patch really enhance a local treatment? [J]. *J Control Release*, 2013, **169**(1/2): 73-81.

[18] 程晓红, 鞠秀萍, HOEGER S. 官能团化刚性大环的超分子化学[J]. 有机化学,2006, **26**(5): 733-743.

[19] 户新宇. 基于刚性大环分子和笼状分子的人工跨膜通道研究[D]. 长春: 吉林大学博士学位论文, 2016.

[20] 王海燕, 曾艳丽, 孟令鹏, 等. 有关氢键理论研究的现状及前景[J]. 河北师范大学学报(自然科学版), 2005, **29**(2): 177-181.

[21] 侯彦君, 蔡开聪. Discovery Studio 软件在生物化学教学中的应用——分子的刚性对接[J]. 化学教育(中英文), 2019, **40**(2): 73-77.

[22] POPHRISTIC V, GOODMAN L. Hyperconjugation not steric repulsion leads to the staggered structure of ethane [J]. *Nature*, 2001, **411**(6837): 565-568.

[23] ZHAO K, DUAN L, XU S, 等. 扭转张力促进的铜催化环状高碘盐不对称开环反应[J]. 科学新闻, 2019, (2): 106.

[24] 梁　庆. 薄荷醇的促透作用及其机制研究[D]. 广州: 广东药学院硕士学位论文, 2009.

(上接第918页)

[7] GANJALI S, BLESSO C N, BANACH M, *et al*. Effects of curcumin on HDL functionality [J]. *Pharmacol Res*, 2017, **119**: 208-218.

[8] PANAHI Y, FAZLOLAHZADEH O, ATKIN S L, *et al*. Evidence of curcumin and curcumin analogue effects in skin diseases: a narrative review [J]. *J Cell Physiol*, 2019, **234**(2): 1165-1178.

[9] VOLLONO L, FALCONI M, GAZIANO R, *et al*. Potential of curcumin in skin disorders [J]. *Nutrients*, 2019, **11**(9): 2169.

[10] RAI V K, MISHRA N, YADAV K S, *et al*. Nanoemulsion as pharmaceutical carrier for dermal and transdermal drug delivery: formulation development, stability issues, basic considerations and applications [J]. *J Control Release*, 2018, **270**: 203-225.

[11] ROY A, NISHCHAYA K, RAI V K. Nanoemulsion-based dosage forms for the transdermal drug delivery applications: a review of recent advances [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2022, **19**(3): 303-319.

[12] 马秋燕. 地奈德纳米乳凝胶的制备与质量评价及药效学研究[D]. 广州: 广东药科大学硕士学位论文, 2021.

[13] 周　欣, 王　颖, 张馨欣. 间充质干细胞外泌体-温敏水凝胶的制备及其在表皮创伤修复中的应用[J]. 中国医药工业杂志, 2021, **52**(9): 1199-1207.

[14] 管咏梅, 胡育森, 刘　佳, 等. 混合组分挥发油纳米乳的处方筛选与体外透皮性能研究[J]. 中国医药工业杂志, 2020, **51**(11): 1410-1417.

[15] 朱思庆, 庞璐璐, 马金秋, 等. 苦参凝胶对小鼠慢性湿疹的治疗作用[J]. 国际药学研究杂志, 2020, **47**(9): 731-737.