芍药苷 - 阿魏酸共载传递体的制备及其表征*

郑淇[1]，王孟琰[1]，邵梦迪[1]，常春辉[1]，李家豪[1]，贾孟晓[1]，费千[1]，祝侠丽[1]，朱艳慧[1]，贾永艳[1,2]

1. 河南中医药大学，河南 郑州 450046；2. 河南省中药特色炮制技术工程研究中心，河南 郑州 450046

摘要：目的：制备芍药苷 - 阿魏酸共载传递体，建立芍药苷 - 阿魏酸含量测定分析方法，优选共载传递体制备工艺，并对其药剂学性质进行评价。方法：采用薄膜 - 超声分散法制备芍药苷 - 阿魏酸共载传递体。以高效液相色谱法建立芍药苷与阿魏酸的含量测定分析方法，以粒径和药物的包封率为考察指标，通过单因素考察和 Box - Behnken Design（BBD）- 效应面法筛选最优处方，并分析芍药苷 - 阿魏酸共载传递体的形态、粒径、Zeta 电位、包封率、载药量与存储稳定性。结果：以优选处方制备的芍药苷 - 阿魏酸共载传递体在自然光下为淡黄色，流动性好。芍药苷 - 阿魏酸共载传递体的平均粒径为（287.1 ± 14.4）nm，Zeta 电位为（-44.3 ± 0.9）mV，芍药苷与阿魏酸平均包封率分别为（57.77 ± 3.82）%和（69.41 ± 4.06）%，平均载药量分别为（5.69 ± 0.46）%和（0.44 ± 0.03）%。结论：本实验制备出性质稳定且具备一定缓释性能的芍药苷 - 阿魏酸共载传递体，建立了芍药苷与阿魏酸的含量测定分析方法，优选了芍药苷 - 阿魏酸共载传递体的制备工艺，为后续芍药苷 - 阿魏酸制剂的进一步研制与开发奠定了基础。

关键词：芍药苷；阿魏酸；薄膜 - 超声分散法；共载传递体；含量测定；效应面法；体外释放
DOI：10.16368/j.issn.1674 - 8999.2025.01.038
中图分类号：R284　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1674 - 8999(2025)01 - 0216 - 11

Preparation and Characterization of Paeoniflorin - Ferulic Acid Co - loaded Transfersome

ZHENG Qi[1], WANG Mengyan[1], SHAO Mengdi[1], CHANG Chunhui[1], LI Jiahao[1], JIA Mengxiao[1], FEI Qian[1], ZHU Xiali[1], ZHU Yanhui[1], JIA Yongyan[1,2]

1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou Henan China 450046; 2. Henan Research Center for Special Processing Technology of Chinese Medicine, Zhengzhou Henan China 450046

Abstract: Objective: To prepare paeoniflorin - ferulic acid co - loaded transporter, to establish an analytical method for the determination of paeoniflorin - ferulic acid content, to optimize the preparation process of the co - loaded transporter, and to evaluate its pharmacological properties. Methods: The paeoniflorin - ferulic acid co - loaded transporter was prepared by film - ultrasonic dispersion method. A high performance liquid chromatography (HPLC) method was established for the determination of the content of paeoniflorin and ferulic acid, and the optimal prescription was screened by one - factor investigation and Box - Behnken Design (BBD) - effect surface method using particle size and encapsulation rate of the drug as the indexes, and the morphology, particle size, zeta potential, encapsulation rate, drug loading capacity, and storage stability of paeoniflorin - ferulic acid co - loading delivery vehicle were analyzed. Results: The paeoniflorin - ferulic acid co - loaded delivery vehicle prepared with the optimal prescription was light yellow in natural light and had good fluidity. The average particle size of the paeoniflorin - ferulic acid co - loaded deliverer was (287.1 ± 14.4) nm, the zeta potential was (-44.3 ± 0.9) mV, the average encapsulation rate of paeoniflorin and ferulic acid were (57.77 ± 3.82)% and (69.41 ± 4.06)%, respectively, and the average drug loading were (5.69 ± 0.46)% and (0.44 ± 0.03)%, respectively. Conclusion: In this ex-

* **基金项目**：国家自然科学基金项目（81803740）；河南省高等学校重点科研项目（20B360003）；河南中医药大学校级科研项目（2019KYCX019）

periment, a stable paeoniflorin – ferulic acid co – carrier deliverer with certain slow – release performance was prepared, an analytical method for the determination of the content of paeoniflorin and ferulic acid was established, and the preparation process of the paeoniflorin – ferulic acid co – carrier deliverer was preferred, which lays the foundation for the further development of the subsequent paeoniflorin – ferulic acid formulations.

Key words: paeoniflorin; ferulic acid; film – ultrasonic dispersion method; delivery body; content determination; effect surface method; in vitro release

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种慢性自身免疫性疾病,以持续性滑膜炎、关节损伤、轻度至重度残疾和平衡受损为特征[1],是一项重大的全球公共卫生挑战,全球发病率为 0.5% ~ 1.0%[2]。

目前,临床常用化学药物主要分为 4 类:非甾体抗炎药、慢作用抗风湿药、糖皮质激素、生物制剂,这些药物在一定程度上可减缓骨质破坏及关节畸形[3]。然而,长期使用上述化学药物会引起消化道反应、肝肾功能失调以及其他全身毒性等不良反应。与化学药物相比,中药药性温和,不良反应少,且对于 RA 的治疗具有整体性、多层次、多靶点的优势。

白芍具有养血柔肝、缓急止痛之效[4]。白芍用于治疗 RA 的较早记载见于《金匮要略·中风历节病脉证并治》[5]。现代药理研究表明,其主要药效成分芍药苷具有抗炎、抗氧化、镇痛、免疫调节活性[6],在治疗 RA 中表现出较大的潜力。

当归始载于《神农本草经》,赵国强等[7]研究发现,当归煎液可减少 CIA 大鼠关节肿胀,减轻组织水肿,减少人单核细胞趋化蛋白 – 1 以及基质金属蛋白酶 – 3(matrix metalloproteinase – 3, MMP – 3)的含量。阿魏酸是其主要有效成分,具有抗氧化、抗炎、免疫调节等作用[8-9]。

据 2020 年版《中华人民共和国药典》记载,附桂骨痛片、独活寄生丸、寄风追风酒等含白芍 – 当归药对的方剂均被用于治疗风寒湿痹、关节肿痛等疾病[10]。但由于药物的理化性质、肝首过效应及肠道转运体外排蛋白等因素,芍药苷胃肠吸收差、体内生物利用度低[11]。阿魏酸性质不稳定,易受光线、温度等因素影响,吸收快,代谢迅速,生物利用度低[12-13]。经皮给药系统的出现解决了以上难题,但皮肤角质层的屏障作用会限制药物的透皮递送,阻碍药效发挥。

传递体(transfersomes)一词最早由 Cevc 等提出[14],是由磷脂和边缘活化剂组成的第二代脂质体,可以提高药物的透皮效率,常用于亲脂性、亲水性及水溶性药物经皮制剂的研发[15-17]。

本研究采用 Box – Behnken Desgin(BBD) – 效应面法优化处方设计,期望得到制备简便、质量稳定的芍药苷 – 阿魏酸共载传递体,并对其药剂学性质进行评价,为今后芍药苷 – 阿魏酸制剂的进一步开发奠定基础。

1　材料

1.1　仪器　BSA224S – CW 型万分之一天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司);METTLERAE240 十万分之一天平(德国梅特勒公司);OSB – 2100 型旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司);KQ – 500DV 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);JY92 – IIN 超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司);22331 Hamburg 小型台式高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);高效液相色谱仪 2695、e2498 紫外检测器(Waters);Nano – ZS90 型电位及粒度分析仪(英国 Malvern 公司);JEM – 1400 透射电子显微镜(日本 JEOL 公司)。

1.2　试剂　芍药苷对照品(纯度≥98%,批号:wkq20041008)、阿魏酸对照品(纯度≥98%,批号:wkq19030705)均购自四川省维克奇生物科技有限公司;芍药苷原料药(批号:20200720)、阿魏酸原料药(批号:20200907)均购自苏州纳美特生物科技有限公司;大豆卵磷脂(批号:20210402,天津市光复精细化工研究所);胆固醇(批号:79P10120,北京索莱宝科技有限公司);吐温 – 80(天津市富宇精细化工有限公司);磷酸为分析纯;乙腈、甲醇均为色谱纯。

2　方法与结果

2.1　芍药苷与阿魏酸含量测定方法的建立

2.1.1　混合对照品储备液的制备　精密称取芍药苷对照品 5.00 mg 与阿魏酸对照品 5.00 mg,分别置于 5 mL 棕色容量瓶中,加入甲醇使其溶解并稀释定容至刻度,摇匀,即得芍药苷 1.00 g·L^{-1}对照品储备液、阿魏酸 1.00 g·L^{-1}对照品储备液。精密吸取芍药苷对照品储备液 2.5 mL 及阿魏酸对照品储备液 0.5 mL,共同置于同一 5 mL 棕色容量瓶中,加入

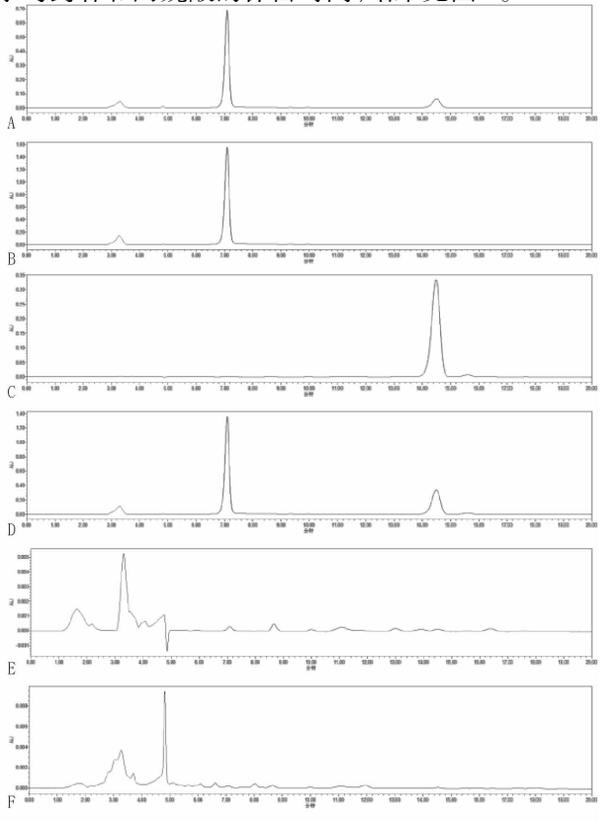
甲醇使其溶解并稀释定容至刻度，摇匀，即得芍药苷 500.00 mg·L^{-1}、阿魏酸 100.00 mg·L^{-1}的混合对照品储备液。

2.1.2　供试品溶液的制备　精密吸取芍药苷－阿魏酸共载传递体 0.10 mL，置于 2 mL 容量瓶中，加入甲醇并定容至刻度，摇匀，超声 5 min 破乳，即得供试品溶液。

2.1.3　阴性样品溶液的制备　精密吸取空白传递体（不含芍药苷与阿魏酸）0.10 mL，置于 2 mL 容量瓶中，加入甲醇并定容至刻度，摇匀，超声 5 min 破乳，即得阴性样品溶液。

2.1.4　色谱条件　色谱柱：Venusil MP C_{18}（4.6 mm×250.0 mm，5 μm）；流动相：乙腈－0.1%磷酸水（23∶77）；洗脱方式：等度洗脱；检测波长：230 nm；流速：0.8 mL·min^{-1}；柱温：30 ℃；进样体积：20 μL。

2.1.5　专属性考察　分别吸取芍药苷对照品溶液、阿魏酸对照品溶液、芍药苷－阿魏酸混合对照品溶液、供试品溶液、甲醇、阴性样品溶液，经 0.22 μm 微孔滤膜滤过，按照“2.1.4”项下色谱条件进样，记录芍药苷和阿魏酸的保留时间，结果见图 1。



注：A：芍药苷对照品；B：阿魏酸对照品；C：芍药苷－阿魏酸混合对照品溶液；D：供试品溶液；E：甲醇；F：阴性样品溶液。

图 1　样品 HPLC 图

由图 1 可知，芍药苷与阿魏酸的峰形及分离度良好，基线平稳，芍药苷与阿魏酸的保留时间分别为 7.089 min 和 14.487 min。甲醇及空白传递体在此处无色谱峰，表明溶剂及辅料对芍药苷与阿魏酸的测定均无干扰。

2.1.6　线性关系考察　分别精密吸取适量混合对照品储备液置于 1 mL 容量瓶中，用甲醇稀释并定容至刻度，摇匀，稀释成不同浓度的混合对照品溶液，0.22 μm 微孔滤膜滤过，按照“2.1.4”项下色谱条件进样测定，以峰面积（A）为纵坐标，质量浓度（C）为横坐标，进行线性回归，绘制标准曲线，芍药苷与阿魏酸的线性回归方程分别为 A＝37 421.950 7C＋97 262.182 4（R^2＝0.999 8）和 A＝89 333.051 9C＋4 349.975 9（R^2＝0.999 9）。说明芍药苷与阿魏酸分别在 5.00～500.00 mg·L^{-1}与 1.00～100.00 mg·L^{-1}范围内线性关系良好。

2.1.7　精密度考察　分别将低、中、高 3 种浓度的芍药苷－阿魏酸混合对照品溶液，经 0.22 μm 微孔滤膜滤过，按照“2.1.4”项下色谱条件连续进样 3 次，记录峰面积及其相对标准偏差（relative standard deviation，RSD）。低、中、高浓度的芍药苷与阿魏酸峰面积 RSD 值分别为 0.17%、0.36%、1.00%与 0.22%、0.35%、0.76%，均小于 1.00%，表明仪器精密度良好。

2.1.8　重复性考察　精密吸取芍药苷－阿魏酸共载传递体 6 份，按照“2.1.2”项下方法处理样品，经 0.22 μm 微孔滤膜滤过，按照“2.1.4”项下色谱条件分别进样，记录峰面积，计算芍药苷和阿魏酸的含量。芍药苷与阿魏酸含量 RSD 值分别为 2.26%与 2.55%，均小于 3.00%，表明方法重复性良好。

2.1.9　稳定性考察　精密吸取芍药苷－阿魏酸共载传递体 1 份，按照“2.1.2”项下方法处理样品，经 0.22 μm 微孔滤膜滤过，按照“2.1.4”项下色谱条件分别于 0 h、4 h、6 h、10 h、12 h、24 h 进样测定，记录峰面积，供试品溶液中芍药苷与阿魏酸在 24 h 内峰面积变化的 RSD 值分别为 0.32%与 0.42%，均小于 1.00%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.1.10　加样回收率考察　精密吸取空白传递体 100 μL，共 9 份，分别置于 2 mL 容量瓶中，加入相当于处方 50%、100%、150%的芍药苷与阿魏酸，加入甲醇并定容至刻度，超声 5 min，经 0.22 μm 微孔滤膜滤过，按照“2.1.4”项下色谱条件分别进样测定，每个浓度平行制备 3 份。记录峰面积，低、中、高浓度的芍药苷与阿魏酸的平均加样回收率分别为

98.57%、99.53%、101.56%与 100.56%、101.28%、98.32%。平均加样回收率为 95% ~105%，RSD 值均小于 3.00%，符合要求。

2.2　超滤离心法测定包封率与载药量　精密吸取芍药苷－阿魏酸共载传递体 0.5 mL，置于截留分子量为 30 kDa 的超滤管中，在转速 4 000 r·min^{-1}的条件下，离心 20 min。精密吸取离心管底部滤液 0.1 mL，置于 2 mL 容量瓶中，并用甲醇稀释定容至刻度，摇匀，经 0.22 μm 微孔滤膜滤过，按照“2.1.4”项下色谱条件进样，测定游离的芍药苷与阿魏酸的含量。精密移取芍药苷－阿魏酸共载传递体 0.1 mL，置于 2 mL 容量瓶中，加入甲醇并定容至刻度，摇匀，超声 5 min 破乳，经 0.22 μm 微孔滤膜滤过，按照“2.1.4”项下色谱条件进样，测定总的芍药苷与阿魏酸的含量。按照公式分别计算药物的包封率与载药量。

$$包封率(\%)=[(W_{总}-W_{游})/W_{总}]\times 100\%$$

$$载药量(\%)=[(W_{总}-W_{游})/(W_{总}+W_{载体})]\times 100\%$$

其中 $W_{游}$ 表示未包载入传递体的游离药量；$W_{总}$ 为总药量；$W_{载体}$为芍药苷－阿魏酸共载传递体的辅料总量。

2.3　芍药苷－阿魏酸共载传递体的制备

2.3.1　芍药苷－阿魏酸剂量比的考察　本实验参考附桂骨痛片、独活寄生丸、寄风追风酒等方剂中白芍与当归的质量比，将白芍与当归的质量比确定为 1∶1。参考芍药苷与阿魏酸的含量测定，估算芍药苷与阿魏酸的含量比大致为 16∶1[18-19]。故在制剂研究中，芍药苷与阿魏酸的用量比固定为 16∶1。

2.3.2　芍药苷－阿魏酸共载传递体的制备工艺　采用薄膜－超声分散法制备芍药苷－阿魏酸共载传递体。处方工艺暂定如下：称取大豆卵磷脂 250 mg、胆固醇 50 mg、吐温－80 50 mg，溶于 20 mL 氯仿中，将其转移至 250 mL 茄形瓶中，精密吸取 1.47 g·L^{-1}阿魏酸溶液 1 mL（溶于甲醇）置上述茄形瓶中，超声混匀，构成有机相。精密吸取 4.71 g·L^{-1}芍药苷溶液 5 mL（溶于 pH 5.0 磷酸盐缓冲液，phosphate buffered saline，PBS），作为水相。将含有机相的茄形瓶于 40 ℃减压旋转蒸发，除去有机溶剂在瓶壁上形成的薄膜。随后，将水相倒入茄形瓶中，置于摇床中，在 30 ℃、150 r·min^{-1}的条件下水化洗膜 2 h。超声脱落残留于瓶壁上的少许脂膜，将其全部转移至离心管中，于冰水浴中探头式超声 9 min（超声 3 s，停顿 3 s，功率 20%），即得分散均匀的芍药苷－阿魏酸共载传递体，于 4 ℃保存备用。

2.4　芍药苷－阿魏酸共载传递体的单因素考察　固定其余处方因素条件不变，仅改变其中一个因素，以粒径与包封率作为评价指标，筛选优化芍药苷－阿魏酸共载传递体的制备工艺。

2.4.1　脂醇比考察　固定其余处方因素不变，大豆卵磷脂与胆固醇的总量固定为 300 mg，当脂醇比为 2∶1、3∶1、4∶1、5∶1、6∶1、7∶1 时，分别制备芍药苷－阿魏酸共载传递体，其粒径与包封率结果见图 2。

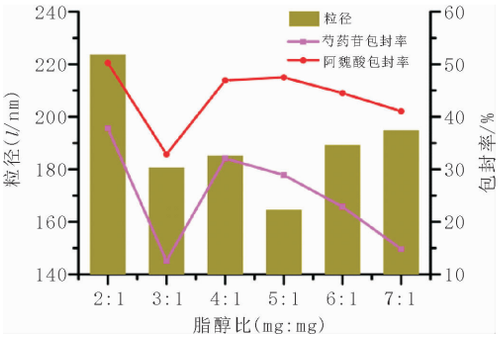


图 2　脂醇比对芍药苷－阿魏酸共载传递体粒径及包封率的影响

图 2 结果表明，脂醇比对芍药苷－阿魏酸共载传递体的粒径及药物包封率均有较大的影响。当其比例为 2∶1 时，虽包封率较高，但粒径过大。其比例为 4∶1 时，包封率略微下降，粒径显著减小，暂选定脂醇比 4∶1 进行后续的处方优化实验。

2.4.2　吐温－80 用量考察　固定其余处方因素条件不变，当吐温－80 为 25 mg、50 mg、75 mg、100 mg、125 mg、150 mg 时，分别制备芍药苷－阿魏酸共载传递体，其粒径与包封率结果见图 3。

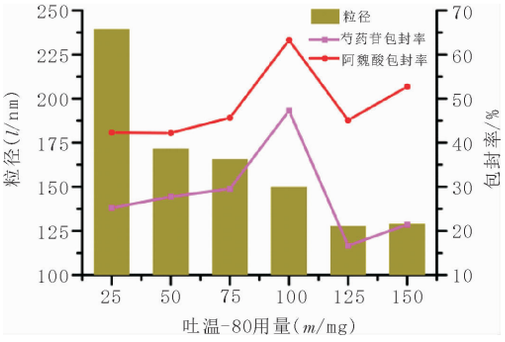


图 3　吐温－80 用量对芍药苷－阿魏酸共载传递体粒径及包封率的影响

吐温－80 可以镶嵌于脂膜中，提高脂膜的流动性以及变形性[20]。其用量是影响传递体变形性的主要因素，用量过低，则导致传递体变形性能低下，用量过高，则会破坏传递体结构[21]。

由图 3 可知，随着吐温 -80 含量增加，所制备的传递体粒径逐渐减小，包封率先增后降。其用量为 100 mg 时，芍药苷与阿魏酸包封率均最高，粒径大小适中。为此，选择吐温 -80 100 mg 进行后续的处方优化实验。

2.4.3　脂药比考察　固定其余处方因素条件不变，芍药苷与阿魏酸用量比保持为 16∶1，当大豆卵磷脂与总药物的比例为 1∶1、5∶1、10∶1、15∶1、20∶1、25∶1 时，分别制备芍药苷 - 阿魏酸共载传递体，其粒径与包封率结果见图 4。

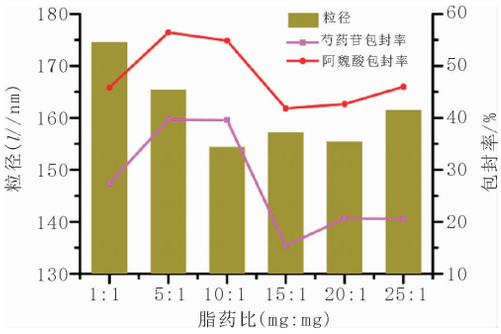


图 4　脂药比对芍药苷 - 阿魏酸共载传递体粒径及包封率的影响

由图 4 可知，当脂药比在 15∶1 及以上时，芍药苷包封率过低。当脂药比为 5∶1 及 10∶1 时，粒径与包封率相当。为使处方中芍药苷与阿魏酸的含量均相对较高，将处方中所需的脂药比初选为 5∶1。

2.4.4　探超时间考察　固定其余处方因素条件不变，当探超时间为 1 min、3 min、5 min、7 min、9 min、11 min 时，分别制备芍药苷 - 阿魏酸共载传递体，其粒径与包封率结果见图 5。

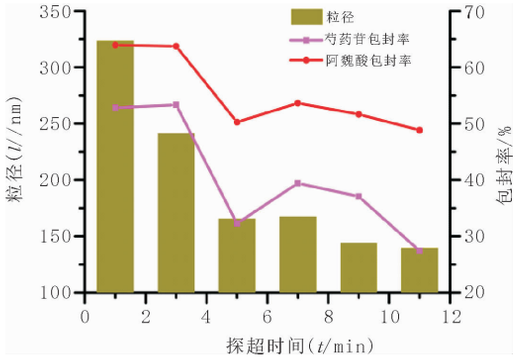


图 5　探超时间对芍药苷 - 阿魏酸共载传递体粒径及包封率的影响

由图 5 可知，探超 3 min，粒径大幅度降低，包封率与探超 1 min 时的结果基本一致，这说明探超有利于传递体分散更加均匀。然而，继续延长探超时间，粒径有所降低，但探超时间过长导致部分传递体结构破坏，造成包封率显著降低，需对其进一步优化。

2.5　BBD - 效应面法优化设计

2.5.1　BBD - 效应面法优化芍药苷 - 阿魏酸共载传递体处方　根据单因素考察结果，选择对芍药苷 - 阿魏酸共载传递体的粒径、药物包封率影响较大的 3 个因素，即脂醇比（A，3∶1 ~ 5∶1）、脂药比（B，5∶1 ~ 25∶1）、探超时间（C，1 ~ 5 min）为考察对象，以芍药苷 - 阿魏酸共载传递体的粒径（Y_1）、芍药苷包封率（Y_2）、阿魏酸包封率（Y_3）为评价指标，进行芍药苷 - 阿魏酸共载传递体的处方设计，考察因素及水平的取值见表 1，实验方案及结果见表 2。

表 1　因素与水平

自变量	水平		
	-1	0	1
A：脂醇比	3∶1	4∶1	5∶1
B：脂药比	5∶1	15∶1	25∶1
C：探超时间（t/min）	1	3	5

表 2　BBD - 效应面法设计方案及结果

编号	A	B	C	Y_1（l/nm）	Y_2/%	Y_3/%
1	0	0	0	190.3	35.47	50.75
2	1	0	1	196.4	34.64	55.83
3	0	0	0	213.9	39.50	57.16
4	1	1	0	230.6	37.65	56.30
5	0	0	0	212.2	35.08	50.24
6	1	0	-1	271.0	53.89	66.15
7	-1	-1	0	316.1	32.89	42.07
8	0	-1	1	196.1	30.42	41.80
9	1	-1	0	248.1	41.84	54.52
10	0	0	0	201.0	38.33	56.56
11	-1	0	1	247.2	36.63	48.02
12	-1	1	0	228.7	46.07	61.35
13	0	1	-1	302.1	45.82	57.97
14	0	1	1	179.5	34.39	52.41
15	-1	0	-1	360.4	56.67	62.10
16	0	0	0	211.9	40.60	55.22
17	0	-1	-1	310.1	55.08	63.03

2.5.2　模型的建立与显著性检验　以 *Design - Expert* 8.0.6 软件进行模型拟合及方差分析，以脂醇比（A）、脂药比（B）、探超时间（C）共 3 个因素为自变量，粒径、芍药苷包封率、阿魏酸包封率为因变量，采用二项式方程对实验数据进行拟合。拟合方程如下：$Y_1 = 205.86 - 25.79A - 16.19B - 53.05C + 17.48AB + 9.65AC - 2.15BC + 35.91A^2 + 14.11B^2 + 26.98C^2$，$R^2 = 0.950\ 1$；$Y_2 = 37.80 - 0.53A + 0.46B - 9.42C - 4.34AB + 0.20AC + 3.31BC +$

$2.92A^2-1.11B^2+4.74C^2$，$R^2=0.947\ 3$；$Y_3=53.99+2.41A+3.33B-6.40C-4.38AB+0.94AC+3.92BC+1.90A^2-2.32B^2+2.14C^2$，$R^2=0.896\ 6$，粒径、芍药苷包封率和阿魏酸包封率回归模型的拟合情况良好。对上述模型进行方差分析，结果见表 3、表 4、表 5。

表 3　粒径的方差分析结果

方差来源	平方和	自由度	均方	*F* 值	*P* 值	显著性
模型	41 803.81	9	4 644.87	14.80	0.000 9	* * *
A：脂醇比	5 319.96	1	5 319.96	16.95	0.004 5	* *
B：脂药比	2 096.28	1	2 096.28	6.68	0.036 2	*
C：探超时间（*t*/min）	2 2514.42	1	22 514.42	71.73	<0.000 1	* * *
AB	1 221.50	1	1 221.50	3.89	0.089 1	
AC	372.49	1	372.49	1.19	0.312 1	
BC	18.49	1	18.49	0.06	0.815 2	
A^2	5 428.84	1	5 428.84	17.30	0.004 2	* *
B^2	837.99	1	837.99	2.67	0.146 3	
C^2	3 065.50	1	3 065.50	9.77	0.016 7	*
残差	2 197.09	7	313.87			
失拟项	1 790.04	3	596.68	5.86	0.060 2	
纯误差	407.05	4	101.76			
总离差	44 000.91	16				

注：* $P<0.05$，* * $P<0.01$，* * * $P<0.001$。

表 4　芍药苷包封率的方差分析结果

方差来源	平方和	自由度	均方	*F* 值	*P* 值	显著性
模型	972.56	9	108.06	13.98	0.001 1	* *
A：脂醇比	2.25	1	2.25	0.29	0.606 5	
B：脂药比	1.71	1	1.71	0.22	0.652 3	
C：探超时间（*t*/min）	710.27	1	710.27	91.87	<0.000 1	* * *
AB	75.23	1	75.43	9.76	0.016 8	*
AC	0.16	1	0.16	0.02	0.891 0	
BC	43.76	1	43.76	5.66	0.049 0	*
A^2	35.98	1	35.98	4.65	0.067 9	
B^2	5.16	1	5.16	0.67	0.441 0	
C^2	94.53	1	94.53	12.23	0.010 0	*
残差	54.12	7	7.73			
失拟项	30.28	3	10.09	1.69	0.304 9	
纯误差	23.84	4	5.96			
总离差	1026.68	16				

注：* $P<0.05$，* * $P<0.01$，* * * $P<0.001$。

表 5　阿魏酸包封率的方差分析结果

方差来源	平方和	自由度	均方	*F* 值	*P* 值	显著性
模型	658.96	9	73.22	6.74	0.009 9	* *
A：脂醇比	46.37	1	46.37	4.27	0.077 6	
B：脂药比	88.51	1	88.51	8.15	0.024 5	*
C：探超时间（*t*/min）	327.55	1	327.55	30.17	0.000 9	* * *
AB	76.56	1	76.56	7.05	0.032 7	*
AC	3.53	1	3.53	0.33	0.586 1	
BC	61.39	1	61.39	5.65	0.049 0	*
A^2	15.17	1	15.17	1.40	0.275 7	
B^2	22.75	1	22.75	2.10	0.191 0	
C^2	19.30	1	19.30	1.78	0.224 2	
残差	76.00	7	10.86			
失拟项	33.27	3	11.09	1.04	0.466 1	
纯误差	42.73	4	10.68			
总离差	734.96	16				

注：* $P<0.05$，* * $P<0.01$，* * * $P<0.001$。

由表 3、表 4、表 5 可知，粒径回归模型的 P 值为 0.000 9 < 0.001，说明因素与响应值之间存在显著性差异；芍药苷包封率回归模型、阿魏酸包封率回归模型的 P 值分别为 0.001 1 与 0.009 9，均小于 0.01，说明因素与响应值之间存在显著性差异，三者实验结果均具有统计学意义。粒径、芍药苷包封率、阿魏酸包封率失拟项 P 值分别为 0.060 2、0.304 9、0.466 1，均大于 0.05，说明粒径与包封率模型没有失拟现象，可用于传递体处方的分析和预测。

由表 3 可知，C 对粒径有显著性影响，A、A^2 对粒径有显著性影响，B、C^2 对粒径有显著性影响，其他项不显著。由表 4 可知，C 对芍药苷包封率有显著性影响，AB、BC、C^2 对芍药苷包封率有显著性影响，其他项不显著。由表 5 可知，C 对阿魏酸包封率有显著性影响，B、AB、BC 对阿魏酸包封率有显著性影响，其他项不显著。

2.5.3　效应面优化与预测处方　分别固定影响因素 A、B、C 其中之一，考察其余 2 个因素对粒径、芍药苷包封率、阿魏酸包封率的影响，绘制二维等高线图与三维响应面图，结果见图 6、图 7。

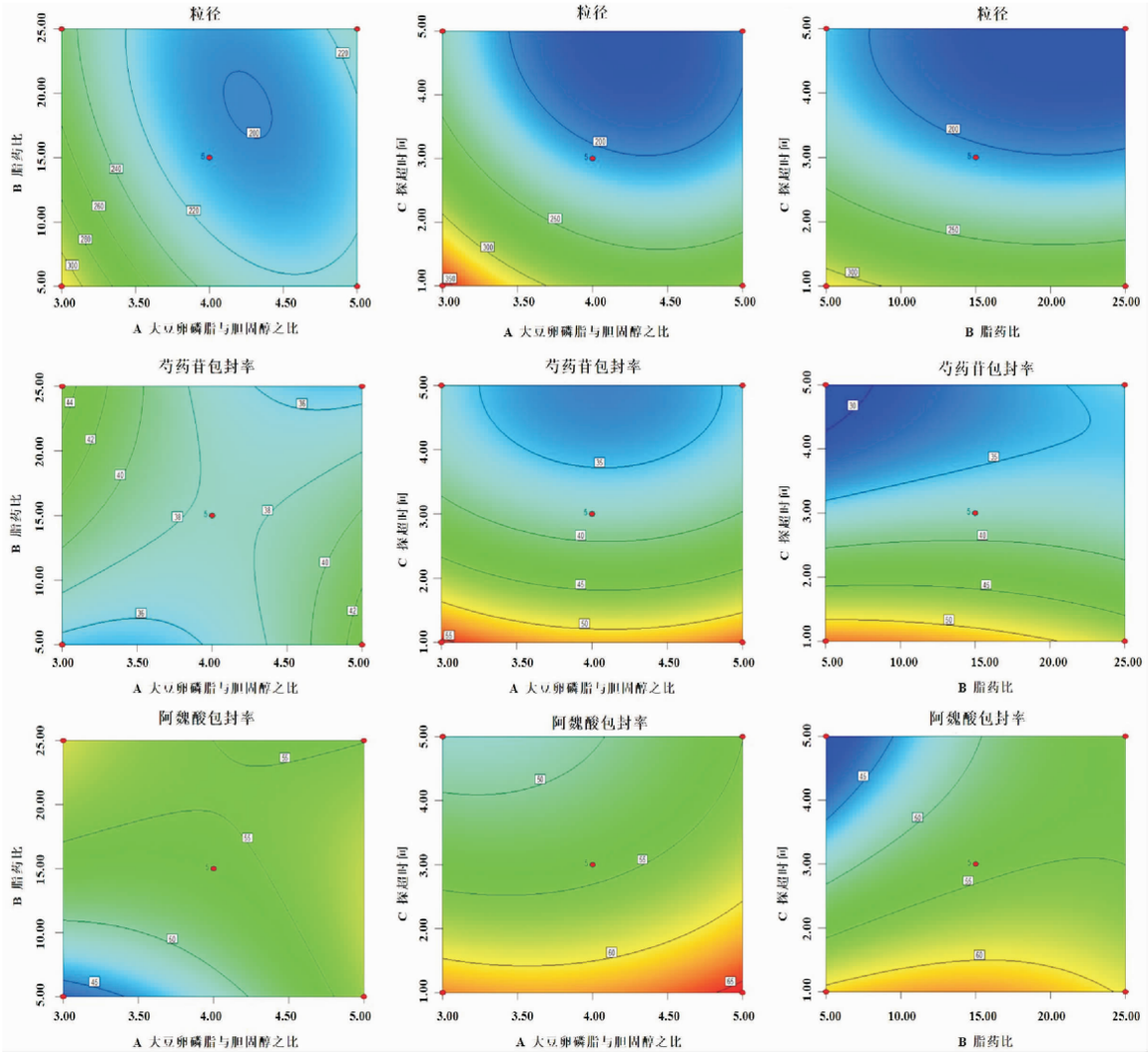


图 6　A、B、C 因素对粒径和包封率影响的二维等高线图

根据 BBD－效应面优化实验设计结果，以小粒径、高包封率为筛选条件，得最优处方为脂醇比 5∶1、脂药比 5∶1、探超时间 1 min。

2.6　最优处方验证　按照最优处方制备 5 份芍药苷－阿魏酸共载传递体，测定其粒径、包封率、载药量，并将实际粒径、包封率与预测值对比。结果显示：芍药苷与阿魏酸的平均载药量分别为（5.69 ± 0.46）%、（0.44 ± 0.03）%。5 份样品的平均粒径为（287.1 ± 14.4）nm，预测值为 297.0 nm，与预测值的相对偏差为 －0.33%。样品中芍药苷与阿魏酸的平均包封率分别为（57.77 ± 3.82）%、（69.41 ± 4.06）%，预测值分别为 60.23%、68.53%，与预测值的相对偏差分别为 －4.08%、1.29%。实际数值与模型的预测值接近，表明模型预测性良好。

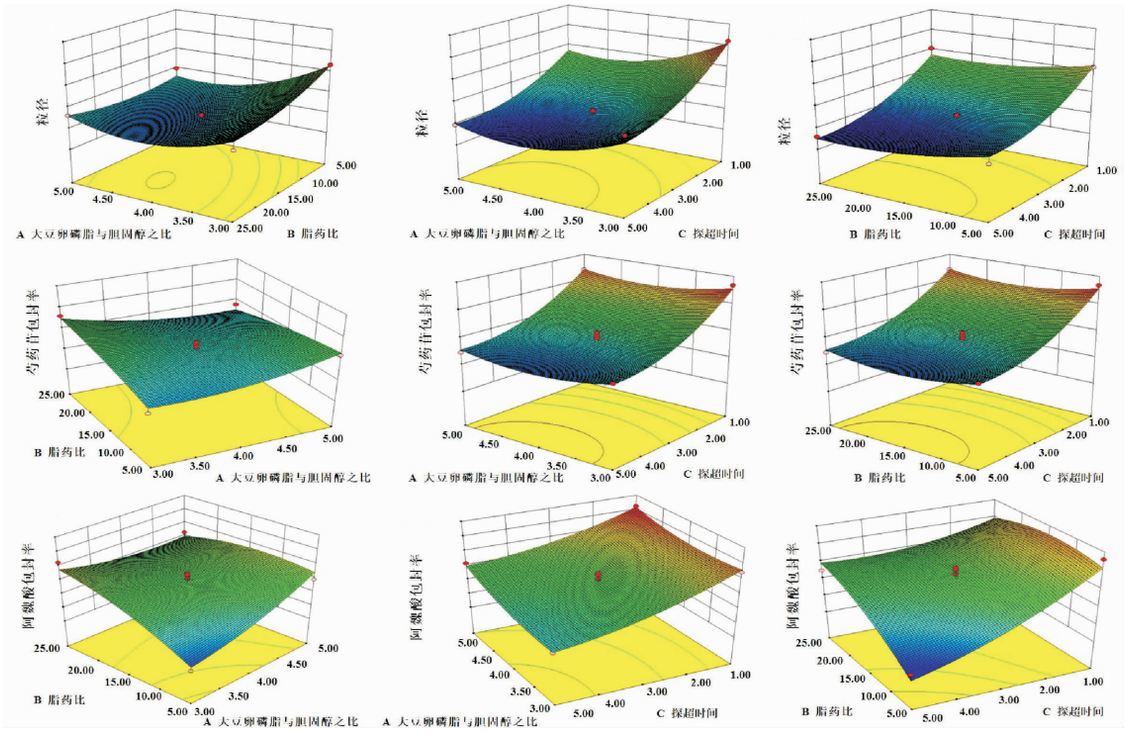
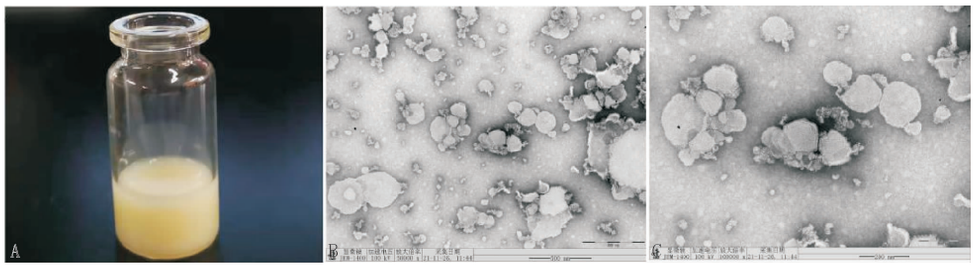


图 7　A、B、C 因素对粒径和包封率影响的三维效应面图

2.7　芍药苷 – 阿魏酸共载传递体药剂学性质的考察

2.7.1　外观及显微形态观察　按照最优处方制备芍药苷 – 阿魏酸共载传递体，于自然光下观察其形态。另取适量传递体混悬液，用超纯水稀释 20 倍，将其滴于覆有碳膜的铜网上，使用 2% 磷钨酸溶液负染 2 min，用滤纸吸去多余的试剂，自然晾干，使用透射电子显微镜观察其形态。结果见图 8。



注：A：芍药苷 – 阿魏酸共载传递体外观图；B：透射电子显微镜下芍药苷 – 阿魏酸共载传递体微观图（×50 000）；C：透射电子显微镜下芍药苷 – 阿魏酸共载传递体微观图（×100 000）。

图 8　芍药苷 – 阿魏酸共载传递体形态图

如图 8 所示，芍药苷 – 阿魏酸共载传递体在自然光下显为淡黄色，流动性好。在透射电子显微镜下，传递体呈类圆球形，见图 8B。同一视野下可观察到磷脂双分子层膜结构，微观结构更明显，表明样品制备成功，见图 8C。

2.7.2　粒径及 Zeta 电位　取适量芍药苷 – 阿魏酸共载传递体，用蒸馏水稀释至一定倍数，摇匀，置于 Nano – ZS90 型电位及粒度分析仪中，采用激光动态散射法测定其粒径、Zeta 电位，每个样品平行测定 3 次，结果见图 9、图 10。结果显示，芍药苷 – 阿魏酸共载传递体的平均粒径为（287.1 ± 14.4）nm，Zeta 电位为（–44.3 ± 0.9）mV。

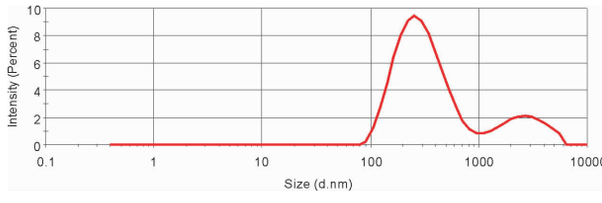


图 9　芍药苷 – 阿魏酸共载传递体粒径分布图

2.7.3　稳定性实验　按照最优处方平行制备 5 份芍药苷 – 阿魏酸共载传递体，将其置于 4 ℃储存。分别于 0 d、7 d、14 d 测量其粒径、电位、包封率等指标，并观察外观性状，分析其稳定性。结果见表 6。

表 6　芍药苷－阿魏酸共载传递体储存稳定性实验结果　($\bar{x} \pm s$)

时间(t/d)	n	粒径(l/nm)	Zeta 电位(U/mV)	芍药苷包封率/%	阿魏酸包封率/%
0	5	287.1 ± 14.4	−44.3 ± 0.9	57.77 ± 3.82	69.41 ± 4.06
7	5	294.6 ± 6.0	−44.6 ± 1.7	53.36 ± 1.79	67.65 ± 1.08
14	5	280.7 ± 9.9	−46.4 ± 1.0	52.42 ± 1.81	67.22 ± 1.31

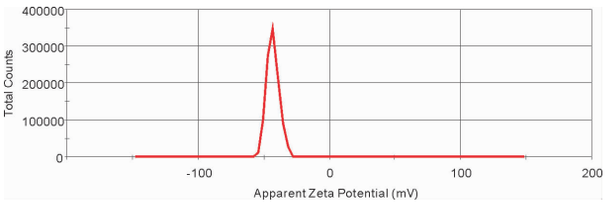


图 10　芍药苷－阿魏酸共载传递体电位分布图

由表 6 可知，芍药苷－阿魏酸共载传递体在 4 ℃ 保存 14 d 后，其粒径、电位波动较小，包封率略微降低。外观均为黄色混悬液，放置一段时间后底部有少量沉淀，轻轻摇晃可使沉淀消失，恢复均匀形态，表明芍药苷－阿魏酸共载传递体在 4 ℃ 条件下稳定性较好。

2.7.4　体外释放实验　采用透析袋扩散法进行体外药物释放研究。分别取芍药苷－阿魏酸溶液、共载传递体 1 mL，放入预处理过的透析袋(M = 3 000)中，夹紧两侧，放入 60 mL 释放介质(20% 乙醇生理盐水)中，将其放于水浴振荡器中，于 37 ℃、100 r · min^{-1} 动态透析，分别于 0.25 h、0.5 h、1 h、1.5 h、2 h、3 h、4 h、6 h、8 h、10 h、12 h、24 h 各取样 2 mL，同时补加新鲜的等温等体积的释放介质。样品经 0.22 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液按“2.1.4”项下色谱条件进样分析，测定药物含量。按公式计算药物各时间点的累积释放度(Q)。

$$Q = (C_n V_n + \sum C_i V_i)/M$$

其中 C_n 为第 n 个取样时间点的药物浓度(mg · L^{-1})，C_i 为第 i 个取样时间点的药物浓度(mg · L^{-1})，V_n 为释放介质总体积(60 mL)，V_i 为第 i 次取样体积(2 mL)，M 为总药量(μg)。

以时间(h)为 X 轴，以药物累积释放度(%)为 Y 轴绘制体外释放曲线，结果见图 11。用零级释药动力学方程、一级释药动力学方程、Higuchi 方程、Ritger－Peppas 方程拟合共载传递体的体外释放曲线结果。拟合结果见表 7、表 8。

由图 10、表 7、表 8 结果可知，溶液剂、共载传递体中芍药苷与阿魏酸的体外释放曲线均以一级释药动力学方程的拟合度最高。溶液释药迅速，3 h 内药物已基本释放完全，而传递体则在 4 h 内累积释放出了 95.33% 的芍药苷、87.61% 的阿魏酸，相较于溶液具备一定的缓释性能。

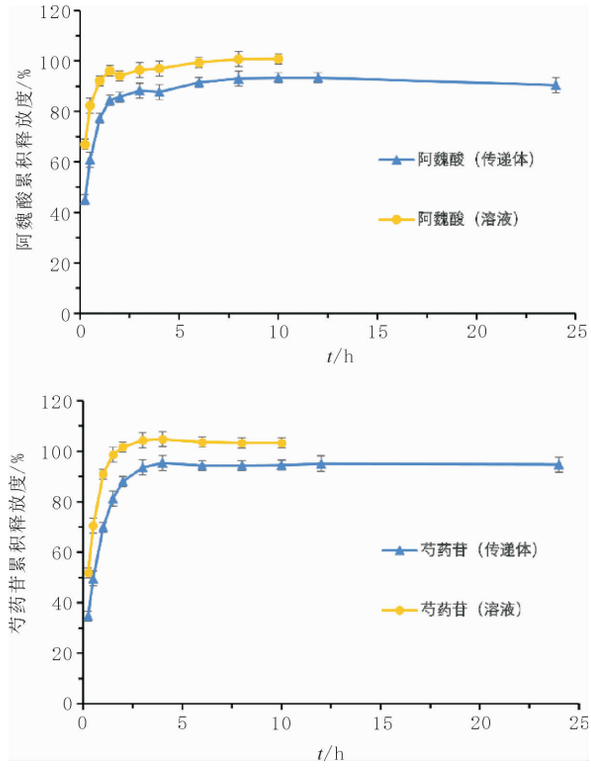


图 11　不同制剂的体外释放曲线(n = 3)

表 7　芍药苷体外释放曲线模型拟合结果

药物	模型	模型拟合方程	R^2
溶液	零级方程	$Q = 3.180\,4t + 81.794\,5$	0.271 4
	一级方程	$Q = 103.040\,7(1 - 1 \times 10^{-2.441\,6t})$	0.982 5
	Higuchi 方程	$Q = 14.616\,0t^{1/2} + 68.449\,4$	0.478 1
	Ritger－Peppas 方程	$Q = 83.450\,7t^{0.132\,4}$	0.673 1
共载传递体	零级方程	$Q = 1.568\,4t + 72.670\,5$	0.205 9
	一级方程	$Q = 94.274\,4(1 - 1 \times 10^{-1.466\,7t})$	0.987 5
	Higuchi 方程	$Q = 11.053\,8t^{1/2} + 58.733\,1$	0.445 2
	Ritger－Peppas 方程	$Q = 68.631\,8t^{0.147\,2}$	0.669 2

表 8　阿魏酸体外释放曲线模型拟合结果

药物	模型	模型拟合方程	R^2
溶液	零级方程	$Q = 2.112\,9t + 84.912\,5$	0.387 2
	一级方程	$Q = 97.117\,4(1 - 1 \times 10^{-4.294\,8t})$	0.911 6
	Higuchi 方程	$Q = 9.195\,0t^{1/2} + 76.923\,5$	0.573 9
	Ritger－Peppas 方程	$Q = 86.452\,7t^{0.083\,5}$	0.764 5
共载传递体	零级方程	$Q = 1.125\,5t + 75.187\,5$	0.193 2
	一级方程	$Q = 89.929\,8(1 - 1 \times 10^{-2.332\,8t})$	0.952 8
	Higuchi 方程	$Q = 7.991\,2t^{1/2} + 65.655\,7$	0.430 2
	Ritger－Peppas 方程	$Q = 72.453\,3t^{0.109\,3}$	0.680 7

3　讨论

本实验建立了芍药苷－阿魏酸共载传递体中芍药苷与阿魏酸的含量测定方法。考察了乙腈 -0.1%磷酸水（17% ：83%、18% ：82%、20% ：80%、23% ：77%等）流动相比例，发现提高乙腈的比例，可缩短样品分离时间。为了节省时间，延长色谱柱的使用寿命，确定分离条件为乙腈 -0.1%磷酸水（23% ：77%）。

包封率是控制传递体质量、进行处方配比筛选优化的一项重要评价指标。目前，包封率的测定方法有微柱离心法、葡聚糖凝胶法、透析法、低温超速离心法、超滤离心法等[22]。微柱离心法操作复杂繁琐，影响因素多，测定周期长。葡聚糖凝胶法分离载药传递体与游离药物需用大量的洗脱液，洗脱液会对传递体进行稀释，可能会破坏传递体结构，不能准确测定药物的包封率。透析法需要数小时的搅拌使游离药物完全透过透析袋，且制剂被大量稀释，造成药物浓度过小，无法准确测定药物的含量。低温超速离心法操作简单，用时较短，但是转速过高时可能会破坏传递体结构。预实验采用低温超速离心法分离传递体与游离药物，转速 12 000 r·min^{-1}，离心 30 min 后不能将传递体与游离药物完全分离，上层水相仍含有粒径较小的传递体，仅能将粒径较大的传递体沉淀在底部。考察超滤离心法时发现转速 4 000 r·min^{-1}，离心 20 min 即可同时使芍药苷和阿魏酸较完全地透过超滤管，载体与游离药物无吸附作用，超滤管可完全截留传递体，仅允许滤过游离药物，方法回收率为 95% ～105%，表明超滤离心法适用于芍药苷－阿魏酸共载传递体药物包封率的测定。

本实验对制备工艺进行单因素考察，结果显示脂醇比、脂药比、探超时间这 3 个因素对芍药苷－阿魏酸共载传递体的粒径和包封率有较大的影响。因此，以粒径和包封率为评价指标，采用 BBD－效应面法进一步优化，筛选出最优处方脂醇比 5 ：1、脂药比 5 ：1、探超时间 1 min。

体外释放结果表明，共载传递体在 4 h 内累积释放出了 95.33% 的芍药苷、87.61% 的阿魏酸，相较于溶液具备一定的缓释性能。

本实验以相似因子法（f^2 法）选取 0.25 h、1 h、1.5 h、4 h、8 h、10 h 共 6 个时间点对共载传递体进行同步释放研究，结果显示 f^2 值为 55.92 ＞50，即芍药苷与阿魏酸两种药物成分达到了同步释放。

稳定性实验中，共载传递体于 4 ℃放置 2 周后，其粒径、Zeta 电位波动小，包封率下降较少，4 ℃环境中储存稳定性较好。

然而芍药苷－阿魏酸共载传递体虽具有优良的药物递送能力，但其作为一种液体制剂，不便于涂抹保留在皮肤表面，而且在储存过程中容易发生聚集、融合等现象[23]。水凝胶是一种三维网络结构，由于其高吸水性、柔软性、黏弹性、亲水性、生物相容性和生物降解性，是各种生物医学应用的潜在候选材料，包括药物输送和组织工程[24]。将传递体与水凝胶两种载体相结合，既能增强制剂稳定性[25]，又能延长药物在患处的滞留时间，提升药物的治疗指数[26]。后期可考虑将传递体与凝胶制剂联合作用制备成传递体凝胶，研究联合传递体与凝胶是否可改善单一制剂的不足。

参考文献：

[1] GAINO J Z, BERTOLO M B, NUNES C S, et al. The effect of foot orthoses on balance, foot function, and mobility in rheumatoid arthritis: a randomized controlled clinical trial [J]. Clin Rehabil, 2021, 35(7): 1011－1020.

[2] BAO Y, PENG J, YANG K L, et al. Therapeutic effects of Chinese medicine Di－Long (Pheretima vulgaris) on rheumatoid arthritis through inhibiting NF－κB activation and regulating Th1/Th2 balance [J]. Biomedecine Pharmacother, 2022, 147: 112643.

[3] 王新强，吴良邦，章月红，等. 獐牙菜苦苷通过抑制 NF－κB、NLRP3 炎症小体信号通路发挥对佐剂性关节炎大鼠的保护作用[J]. 药物生物技术，2021，7(2)：123－128.

[4] 陈谱，阮安民，周俊，等. 白芍总苷对骨关节炎软骨细胞炎症及退变的影响[J]. 中国组织工程研究，2021，25(29)：4614－4618.

[5] 李兵，符永驰，张伟娜. 白芍治疗类风湿性关节炎配伍应用古代文献分析[J]. 辽宁中医药大学学报，2014，16(1)：132－133.

[6] ZHOU Y X, GONG X H, ZHANG H, et al. A review on the pharmacokinetics of paeoniflorin and its anti－inflammatory and immunomodulatory effects [J]. Biomedecine Pharmacother, 2020, 130: 110505.

[7] 赵国强，刘建方. 当归对大鼠胶原性关节炎滑膜 MCP－1、MMP－3 影响及病理改变[J]. 中医药临床杂志，2017，29(3)：446－450.

[8]WU J Z,XUE X Y,FAN G F,et al. Ferulic acid ameliorates hepatic inflammation and fibrotic liver injury by inhibiting PTP1B activity and subsequent promoting AMPK phosphorylation[J]. Front Pharmacol,2021,12:754976.
[9]YIN P,ZHANG Z C,LI J D,et al. Ferulic acid inhibits bovine endometrial epithelial cells against LPS - induced inflammation via suppressing NK - κB and MAPK pathway [J]. Res Vet Sci,2019,126:164 - 169.
[10]张昆,熊磊,李禀烨,等. 苍艾油传递体贴剂的制备及其体外评价[J]. 中国中药杂志,2020,45(4):854 - 860.
[11]国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020.
[12]钱佳佳,王蓓蕾,查丽琼,等. 中空玉米醇溶蛋白 - 芍药苷纳米粒的制备及其体外释药研究[J]. 中国药学杂志,2019,54(4):297 - 302.
[13]赵玉玺,梅雪,陈珍,等. 阿魏酸脂质体的处方筛选及体外释放实验[J]. 广东化工,2017,44(11):60 - 61.
[14]高艺敏,张震,陈佩敏,等. 乳化挥发法和薄膜 - 超声法制备阿魏酸固体脂质纳米粒工艺比较[J]. 食品与发酵工业,2019,45(6):127 - 132.
[15]CEVC G,BLUME G. Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force[J]. Biochim Biophys Acta,1992,1104(1):226 - 232.
[16]张昆,熊磊,程欣,等. 苍艾油传递体凝胶的制备及其体外释药研究[J]. 中国医院药学杂志,2021,41(14):1385 - 1389.
[17]DUDHIPALA N,PHASHA M R,ADEL A Y A,et al. Effect of lipid and edge activator concentration on development of aceclofenac - loaded transfersomes gel for transdermal application:in vitro and ex vivo skin permeation[J]. Drug Dev Ind Pharm,2020,46(8):1334 - 1344.
[18]张钰彬,蒙静雯,赵永恒,等. 星点设计 - 效应面法优化武当山白芍中芍药苷的提取工艺研究[J]. 湖北医药学院学报,2020,39(5):463 - 466.
[19]何元,顾崇梅,郭华荣. 不同产地当归药材 HPLC 指纹图谱的建立及 2 种主成分含量测定[J]. 中兽医医药杂志,2019,38(6):30 - 35.
[20]雷伟,余楚钦,林华庆,等. Box - Behnken 响应面法优化他克莫司传递体制备工艺[J]. 医药导报,2014,33(3):355 - 360.
[21]马丽娜,吴智敏,杨畅,等. 广藿香酮传递体的制备及质量评价[J]. 中国药房,2019,30(1):50 - 54.
[22]张艺,杭太俊,宋敏. 载药脂质体包封率测定方法的研究进展[J]. 中国药科大学学报,2021,52(2):245 - 252.
[23]李家豪,王孟琰,常春辉,等. 芍药苷 - 阿魏酸共载传递体凝胶对佐剂性关节炎大鼠的治疗作用及机制研究[J]. 中国医院药学杂志,2023,43(2):127 - 133.
[24]SUHAIL M,WU P C,MINHAS M U. Using carbomer - based hydrogels for control the release rate of diclofenac sodium:preparation and in vitro evaluation[J]. Pharmaceuticals,2020,13(11):399.
[25]骆慧婷,欧阳威,高司琪,等. 新型中药凝胶剂的研究进展[J]. 华西药学杂志,2022,37(5):573 - 578.
[26]刘慧,刘国龙,毕成龙,等. 木质素基水凝胶的制备及其潜在应用研究进展[J/OL]. 中国造纸,1 - 12(2024 - 11 - 25)[2024 - 11 - 07]. https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=Oa1N_PzK0nSzXn4axT2qncTEuoA1mI0vAS0LjaZ.

收稿日期:2024 - 09 - 07

作者简介:郑淇(2000 -),女,河南新野人,硕士研究生,研究方向:中药制剂新剂型、新技术与评价。
通信作者:贾永艳(1965 -),女,河北涞水人,教授,研究方向:药物制剂新剂型、新技术与评价。Email:hnzyjyy@126.com

编辑:纪彬