

离体皮肤渗透法测定三七总皂苷传递体经皮吸收特性

方 蓉, 郑杭生*, 陈思思

浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053

摘 要: **目的** 确立离体皮肤渗透法测定三七总皂苷(PNS)传递体中药物经皮吸收的主要条件并初步阐明载体中药物的经皮吸收特性。**方法** 采用薄膜分散法制备 PNS 传递体和脂质体, 并对其进行理化性质表征; 筛选离体皮肤渗透试验中 PNS 传递体的合适药物用量与上样量; 考察不同载体(传递体和脂质体)类型、传递体的粒径及处方中脱氧胆酸钠(DOC)的量对 PNS 经皮渗透的影响。**结果** PNS 传递体和脂质体均为近似球形的单层囊泡, 粒径分别为 (121.2 ± 4.5) 、 (113.9 ± 2.9) nm, 无聚集现象。根据药物皮肤累积透过量(Q_n)与稳态经皮渗透速率(J)的测定值, 将传递体药物用量确定为 500 mg, 上样体积定为 0.5 mL。PNS 中各被测成分(人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Re 和三七皂苷 R₁)的皮肤 Q_n 传递体均高于脂质体, 各被测成分的 J 前者为后者的 2~3 倍。粒径 120 nm 的 PNS 传递体与粒径 250 nm 的 PNS 传递体相比各被测成分在各取样点的皮肤 Q_n 与 J 均要高。与含 DOC 量低的传递体相比, 含 DOC 量高的传递体的皮肤 Q_n 与 J 均明显增大, 不同成分增大的倍数有一定差异。**结论** 离体皮肤渗透法可用于测定 PNS 传递体中药物的经皮吸收特性, 传递体促进药物经皮渗透的作用明显强于脂质体, 传递体粒径相对较小, 其中 DOC 用量适当增加均有利于药物经皮渗透。

关键词: 三七总皂苷; 传递体; 脂质体; 经皮渗透; 薄膜分散法; 脱氧胆酸钠

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)04-0513-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.04.010

Determination of percutaneous absorption characteristics of *Panax notoginseng* saponins transfersomes by *in vitro* skin permeation method

FANG Rong, ZHENG Hang-sheng, CHEN Si-si

Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

Abstract: Objective To establish the key conditions for the determination of percutaneous absorption of *Panax notoginseng* saponins (PNS) in transfersomes (TFS) by *in vitro* skin permeation method and clarify its percutaneous absorption characteristics. **Methods** The film hydration-dispersion method was used to prepare PNS TFS and liposomes (LPS). Their physico-chemical properties were characterized. The drug content and sample volume of PNS TFS for *in vitro* skin permeation experiments were screened. The effects of vesicle type (TFS or LPS), size of the TFS, and formulation amount of sodium deoxycholate (DOC) on percutaneous permeation of PNS were investigated. **Results** The TFS and LPS were mainly unilamellar vesicles with roundish shape and size of (121.2 ± 4.5) and (113.9 ± 2.9) nm, without gathering property. According to the cumulative permeated quantity (Q_n) and steady-state percutaneous permeation rate (J) of the assayed ingredients, the appropriate PNS content in the TFS was 500 mg and sample volume was 0.5 mL. Compared with those of the LPS, the Q_n values of each assayed component (ginseng saponin Rg₁, ginseng saponin Rb₁, ginseng saponin Re, PNS R₁) in PNS of the TFS were high, and the J values of the assayed components in TFS were about 2—3 times of those in the LPS. The Q_n and J values of the assayed components in the TFS with an average size of 120 nm were obviously higher than those of the assayed components in the TFS with an average size of 250 nm. The Q_n and J values of the assayed components in PNS TFS with large amount of DOC were prominently higher than those containing small amount of DOC, and the increase ratios of different assayed components were different. **Conclusion** *In vitro* skin permeation method is suitable for the determination of percutaneous absorption of PNS in TFS. The TFS promote drug percutaneous permeation stronger than the LPS and the promotion increases with an appropriate increase of the amount of DOC and decrease of vesicle size of the TFS.

收稿日期: 2014-10-08

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金(20123322120002); 浙江中医药大学校级科研基金人才专项项目(2012ZR06)

作者简介: 方 蓉(1989—), 女, 研究方向为经皮吸收新剂型及其体内过程。

Tel: (0571)86613173 18268146441 E-mail: Geminirong17@163.com

*通信作者 郑杭生, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为经皮吸收新剂型及其体内过程。Tel: (0571)86613524 E-mail: hs-zheng@163.com

Key words: *Panax notoginseng* saponins; transfersomes; liposomes; percutaneous permeation; sodium deoxycholate; film hydration-dispersion method

三七总皂苷(*Panax notoginseng* saponins, PNS)是从三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的干燥根中提取的中药有效部位, 其中人参皂苷 Rg₁ (Rg₁)、人参皂苷 Rb₁ (Rb₁)、人参皂苷 Re (Re) 和三七皂苷 R₁ (R₁) 是 PNS 的主要活性成分。在临床上 PNS 广泛用于软组织损伤、骨折的愈合, 骨关节损伤、肢体功能的恢复及软化瘢痕等^[1]。目前临床应用及在研的 PNS 制剂大多为口服给药^[2-3], 口服给药后在局部病灶部位的药物浓度往往很低, 而该药物的大部分适应症的病灶都在局部, 故难以产生理想的疗效, 因此, PNS 用于治疗局部性病灶的疾病时宜采用经皮给药剂型。然而, 三七皂苷类成分由于油水分配系数小, 经皮吸收速率一般都较小, 故其普通外用制剂的经皮吸收量不足以产生所需要的具有治疗作用的药物浓度^[4]。

传递体 (transfersomes, TFS) 技术因其安全、高效, 且与皮肤相容性好而成为近年来经皮药物传输系统研究中的一大焦点^[5-7]。本实验将 PNS 制成传递体, 表征其理化性质, 并采用离体皮肤渗透试验, 以累计透过量为指标筛选了适合试验的载体药物用量、上样量, 进而考察不同载体 (传递体与脂质体)、传递体不同粒径和处方中 DOC 用量对药物经皮渗透的影响, 研究结果可为 PNS 皮肤用囊泡制剂的载体选择及处方工艺优化提供参考。

1 仪器和材料

LC-2130 高效液相色谱仪、LC-2030 紫外检测器, 上海天美公司; Xtimate C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), Welch Materials 公司; R 系列旋转蒸发器, 上海申生科技有限公司; Nano-ZS 型粒径分析仪, 英国 Malvern 公司; JEM-1200EX 型透射电镜, 日本 Jeol 公司; XL2000 超声破碎仪, 美国 Misonix 公司; 5804R 冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司; Microcon 离心超滤管, 截留相对分子质量为 100 000, Millipore 公司; RYJ-6A 型药物透皮扩散试验仪、竖式透皮扩散池 (直径 1.70 cm, 接受池体积 6.75 mL), 上海黄海药检仪器有限公司; 聚碳酸酯径迹蚀刻膜 (0.1、0.2 μm), 英国 Whatman 公司。

PNS, 注射级, 批号 HB20081103, 云南植物药业有限公司; 对照品 Rg₁ (批号 110703-200726, 质量分数 97.7%)、Re (批号 110754-200822, 质量分

数 88.8%)、R₁ (批号 110745-200415, 供定量测定用, 质量分数>98%)、Rb₁ (批号 110704-200921, 质量分数 92.6%), 中国食品药品检定研究院; 胆固醇 (CH), 分析纯, 批号 F20050815, 中国医药集团上海化学试剂公司; 蛋黄磷脂 (E80), 磷脂酰胆碱质量分数 80%, 批号 20050440, 德国 lipoid 公司; 维生素 E (VE), 批号 082K1382, Sigma 公司; 脱氧胆酸钠 (DOC), 批号 F20091228, 国药集团化学试剂有限公司; 乙腈, 色谱纯, 美国 Honeywell 公司; 0.9%生理盐水注射液, 批号 1012062C, 安徽双鹤药业有限责任公司。其余试剂均为分析纯。

清洁级 SD 大鼠, 体质量 (300±10) g, 雄性, 由浙江中医药大学动物实验中心提供, 合格证号 SCXK 沪 2012-0002。所有动物实验均按照浙江中医药大学动物饲养和使用指南进行。

2 方法与结果

2.1 传递体与脂质体的处方

经前期优化试验得最佳处方: E80 0.45 g、CH 0.05 g、VE 0.01 g、DOC 0.119 g、PNS 0.1 g, 水化液为 pH 4.6 柠檬酸-磷酸缓冲液 (0.1 mol/L 柠檬酸溶液与 0.2 mol/L 磷酸氢二钠溶液按合适比例混合, 对应离子强度为合适) 10 mL。其形态多为近似球形的单层囊泡, 无聚集现象, 平均粒径为 (126.5±3.6) nm, PDI 值为 0.147±0.009, Zeta 电位为 (1.79±0.34) mV, R₁、Rg₁、Re、Rb₁ 的包封率分别为 (38.7±0.9) %、(85.6±1.6) %、(64.7±1.4) %、(96.2±2.4) %。考虑到离体皮肤渗透量少及实验室现有检测设备灵敏度低, 实验中调整了用药量、脂质用量及比例。实验中采用的传递体与脂质体 (LPS) 的处方代码与处方见表 1。

表 1 PNS 传递体与脂质体的处方
Table 1 Formulas of PNS TFS and LPS

处方代码	PNS/ g	E80/ g	CH/ g	VE/ g	DOC/ g	CBS 4.6 [*] / mL
TFS100D4	0.1	1	0.2	0.01	0.4	10
TFS500D4	0.5	1	0.2	0.01	0.4	10
TFS500D2	0.5	1	0.2	0.01	0.2	10
LPS500D0	0.5	1	0.2	0.01	0	10

^{*}pH 值等于 4.6 的柠檬酸-磷酸缓冲液

^{*}citrate-phosphate buffer solution with pH value at 4.6

2.2 水化液的制备

将 0.1 mol/L 柠檬酸溶液与 0.2 mol/L 磷酸氢二钠溶液按一定比例混合, pH 值控制在 4.6, 即得柠檬酸-磷酸缓冲液 (CBS 4.6), 作为水化液。

2.3 传递体与脂质体的制备

参考相关文献报道^[8]与预试验, 本实验采用薄膜分散法制备传递体与脂质体, 并确定以下制备工艺。称取处方量的 E80、CH、VE、PNS 与 DOC, 置于 50 mL 烧杯中, 用甲醇-二氯甲烷 (3:4) 混合溶剂溶解, 转移至 250 mL 茄形瓶中, 在 45 ℃、50 r/min 下减压旋转蒸发除去溶剂, 得到干膜, 继续减压旋转蒸发 2 h, 再以氮气吹干膜 15 min, 加入 CBS 4.6, 振摇使水化, 探针式超声处理 (实际输出功率 16 W, 每次持续 5 s, 重复操作 6 次, 连续 2 次之间间隔 10 s), 再挤压通过 0.1 μm 聚碳酸酯径迹蚀刻膜, 即得 PNS 传递体, 置冰箱中冷藏, 备用。处方中不加 DOC, 同法制备, 即得脂质体混悬液。

2.4 传递体与脂质体理化性质的表征

2.4.1 显微形态 分别取“2.3”项下传递体与脂质体样品少量, 以透射电子显微镜 (TEM) 观察样品的形态, 结果见图 1。结果表明 PNS 传递体 (图 1-A) 和脂质体 (图 1-B) 均以形态近似球形的单层囊泡为主, 无聚集现象。

2.4.2 粒径与 Zeta 电位 分别取“2.3”项下 PNS

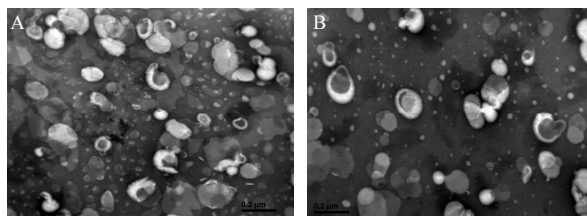


图1 PNS传递体 (TFS500D4, A) 与脂质体 (B) 的TEM图
Fig. 1 TEM photographs of PNS TFS (TFS500D4, A) and LPS (B)

传递体与脂质体样品, 用水化液 (CBS 4.6) 稀释适当倍数, 以粒径分析仪测定粒径及 Zeta 电位。结果见表 2。

2.4.3 包封率 (EE) 分别取“2.3”项下 PNS 传递体或脂质体混悬液, 摇匀, 精密量取混悬液 200 μL, 置于离心超滤管内, 进行冷冻离心 (离心力 3 000×g, 温度 4 ℃), 收集全部外水相, 转移至 5 mL 量瓶中, 以乙腈-水 (82:18) 定容, 摇匀, 按“2.5.1”项下色谱条件测定其中 R_{g1}、Re、R₁ 和 R_{b1} 的峰面积, 代入标准曲线方程, 求算质量浓度, 计算 EE。结果见表 2。

$$EE_i = (W_{Si} - W_{Eai}) / W_{Si}$$

其中 EE_i 为 i 成分 (R_{g1}、Re、R₁ 和 R_{b1}) 的 EE; W_{Si} 为 200 μL 取样量中 i 成分的质量 (μg); W_{Eai} 为外水相中 i 成分的质量 (μg)

表 2 传递体与脂质体中的质量评价结果 ($\bar{x} \pm s$, n=3)

Table 2 Quality assessment results of TFS and LPS ($\bar{x} \pm s$, n=3)

样品	粒径/nm	多分散指数	Zeta 电位/mV	EE/%			
				R ₁	R _{g1}	Re	R _{b1}
TFS100D4	128.3±5.7	0.189±0.036	2.57±0.54	37.4±0.7	54.4±1.1	59.4±1.2	93.7±2.1
TFS500D4	112.6±3.6	0.213±0.042	3.86±0.76	35.7±0.6	50.6±1.0	57.5±1.1	83.6±1.8
TFS500D2	122.7±4.2	0.224±0.049	2.76±0.57	38.9±0.8	48.1±0.9	60.6±1.4	77.4±1.5
LPS500D0	113.9±2.9	0.147±0.026	3.46±0.68	44.7±0.8	60.6±1.3	65.8±1.5	89.6±1.9

2.5 PNS 中 4 种皂苷成分的定量测定

2.5.1 色谱条件 色谱柱为 CNWSIL C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈 (A)-水 (B), 采用梯度洗脱: 0~12 min, 19%乙腈; 12~60 min, 19%~36%乙腈; 体积流量为 1.0 mL/min; 检测波长 203 nm; 进样量 20 μL; 柱温 30 ℃。

2.5.2 对照品溶液的制备 精密称取对照品 R_{g1} 8.48 mg、Re 2.10 mg、R₁ 2.19 mg、R_{b1} 7.75 mg, 置于 25 mL 量瓶中, 加入甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成混合对照品储备液。其中 R_{g1}、Re、R₁、

R_{b1} 的质量浓度分别为 339.2、84.0、87.6、310.0 μg/mL。

2.5.3 供试品溶液的制备 精密量取“2.3”项下 PNS 传递体或脂质体混悬液 1 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 用一定量甲醇超声溶解, 再加入乙腈-水 (36:64) 混合溶剂稀释至刻度, 即得供试品溶液。

2.5.4 线性关系考察 分别吸取“2.5.2”项下混合对照品储备液 1、2、4、6、8 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 用一定量甲醇溶解, 再加入乙腈-水 (36:64) 混合溶剂稀释至刻度, 摇匀, 制成一系列质量浓度

的混合对照品溶液。分别吸取各质量浓度混合对照品溶液及储备液,按“2.5.1”项下方法进行分析。以 R_{g1} 、 R_e 、 R_1 、 R_{b1} 峰面积为纵坐标 (Y),以各成分的质量浓度为横坐标 (X),分别进行线性回归得到各成分定量测定的标准曲线。 R_{g1} 、 R_e 、 R_1 、 R_{b1} 的线性回归方程分别为 $Y=7\ 731.603\ 9\ X+3.139\ 1$, $r=0.999\ 9$; $Y=7\ 582.391\ 7\ X+1.400\ 3$, $r=0.999\ 9$; $Y=7\ 181.593\ 8\ X-8.487\ 4$, $r=0.999\ 8$; $Y=6\ 315.713\ 4\ X-3.799\ 4$, $r=0.999\ 9$ 。 R_{g1} 、 R_e 、 R_1 、 R_{b1} 分别在 $33.92\sim 339.2$ 、 $8.40\sim 84.0$ 、 $8.76\sim 87.6$ 、 $31.00\sim 310.0\ \mu\text{g/mL}$ 呈良好线性关系。

不同样品(脂质体、传递体与离体皮肤渗透接收液)中测定时方法的专属性、回收率与供试品溶液的稳定性经考察均符合要求。基质(空白脂质体、空白传递体及空白接收液)均无干扰,说明方法专属性良好。取供试品溶液,分别在 0、1、2、4、8、12 h,按“2.5.1”项下进行分析,测定各成分峰面积,脂质体中 R_{g1} 、 R_e 、 R_1 、 R_{b1} 的峰面积 RSD 分别为 1.7%、1.4%、1.3%、1.8%,传递体中 R_{g1} 、 R_e 、 R_1 、 R_{b1} 的峰面积 RSD 分别为 1.5%、1.3%、1.2%、1.7%,离体渗透样品中 R_{g1} 、 R_e 、 R_1 、 R_{b1} 的峰面积 RSD 分别为 1.5%、1.1%、1.3%、1.6%,表明脂质体、传递体及离体渗透供试品溶液在 12 h 内均稳定。脂质体中 R_{g1} 、 R_e 、 R_1 、 R_{b1} 的平均回收率分别为 101.6%、98.9%、99.7%、100.7%,传递体中 R_{g1} 、 R_e 、 R_1 、 R_{b1} 的平均回收率分别为 100.8%、99.8%、101.2%、101.7%,RSD 分别为 1.4%、1.2%、1.5%、1.7%,离体皮肤渗透接收液中 R_{g1} 、 R_e 、 R_1 、 R_{b1} 的平均回收率分别为 99.9%、100.3%、101.1%、101.4%,RSD 分别为 1.2%、1.3%、1.6%、1.1%,可见回收率均符合要求,方法准确性良好。

2.6 PNS 传递体离体皮肤渗透特性考察

2.6.1 离体皮肤渗透实验 取 SD 大鼠,颈椎脱臼处死后固定于鼠板上,用剃须刀与弯头剪去除大鼠锁骨至腹部的毛,剪下大鼠腹部皮肤,小心去除皮下组织,确保皮肤角质层的完整性,用生理盐水漂洗干净,展平并润湿后置于两玻璃板之间,冷冻,备用。实验前首先将皮肤在室温下解冻,剪取合适大小(有效皮肤面积为 $2.269\ \text{cm}^2$),固定于供给池和接收池之间,使角质层面向供给池,放入接收液[0.9%生理盐水-乙醇(80:20)混合液],排尽接收池中的气泡使接收液液面与皮肤内层完全接触,接收池水浴温度控制在 $32\ ^\circ\text{C}$,池内磁力搅拌转速为

400 r/min,平衡 15 min 后,更换新的接收液,上样,记下此时间为 0 h,于 2、4、6、8、12、24 h 时间点取样 200 μL ,并及时补加等体积的新鲜接收液,按“2.5.1”项下色谱条件分析样品液,测定峰面积,按“2.5.4”项下标准曲线进行定量,求得相应药物浓度。

2.6.2 药物累积透过量(Q_n) 按以下公式计算 Q_n 。

$$Q_n = (6.75 C_n + \sum_{i=1}^{n-1} C_i \times 0.2) / 2.269$$

其中,2.269 为透皮扩散面积 (cm^2),6.75 为接收池体积 (mL),0.2 为取样体积 (mL), C_n 为第 n 个取样点测得的药物质量浓度 (mg/mL), C_i 为第 n 个取样点之前各点的测定质量浓度 (mg/mL)

2.6.3 稳态经皮渗透速率(J) 以各取样点的药物 Q_n 为纵坐标,时间 (t) 为横坐标,绘制经皮渗透曲线,对曲线中稳态渗透段(直线部分)进行线性回归,所得直线的斜率即为 $J\ [\text{mg}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})]$ 。

2.6.4 实验用传递体含药量的确定 取 PNS 传递体样品(TFS100D4 和 TFS500D4),上样量均为 1 mL,按“2.6.1”项下进行离体皮肤渗透实验,按“2.6.3”项下方法求得 J 。结果见表 3 和图 2,结果表明 TFS100D4 在各取样点的各成分皮肤 Q_n 均较小, J 亦较小。

表3 不同含药量的 PNS 传递体中 4 种皂苷成分的 J 值 ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

Table 3 J values of four saponins in PNS TFS containing different quantities of PNS ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

样品	$J/(\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1})$			
	R_1	R_{g1}	R_e	R_{b1}
TFS100D4	2.90 ± 0.62	13.30 ± 0.35	1.70 ± 0.36	1.30 ± 0.25
TFS500D4	13.80 ± 2.30	68.40 ± 3.38	6.60 ± 0.54	5.30 ± 1.54

2.6.5 不同上样体积对 PNS 传递体离体皮肤渗透的影响 取 PNS 传递体样品(TFS500D4),分别上样 0.5、1 mL,按“2.6.1”项下进行离体皮肤渗透实验,按“2.6.3”项下方法求得 J 。结果见表 4 和图 3,结果表明上样量为 1.0 mL 的 TFS500D4 中各个成分在各取样点的皮肤 Q_n 均明显低于上样量为 0.5 mL 时的皮肤 Q_n ,且 1.0 mL 的 TFS500D4 中各个成分的 J 均小于后者,其中成分 R_{b1} 的 J 相差最为明显。

2.6.6 PNS 传递体与脂质体的离体皮肤渗透特性比较 分别取 PNS 传递体(TFS500D4)和脂质体样

品 (LPS500D0), 上样量为 0.5 mL, 按“2.6.1”项下进行离体皮肤渗透实验, 按“2.6.3”项下方法求得 J 。结果见表 4 和图 3, 结果表明脂质体 LPS500D0 与相同上样量的传递体 TFS500D4 相比各个成分在各取样点的皮肤 Q_n 均要低, 前者中各个成分的 J 亦小于后者 (后者为前者的 2~3 倍)。

2.6.7 PNS 传递体的粒径对药物离体皮肤渗透的影响

分别取粒径为 120 nm 和 250 nm 的 PNS 传递体 TFS500D4 (250 nm 的样品按“2.3”项下制备, 但是最后挤压通过 0.2 μm 聚碳酸酯径迹蚀刻膜), 上样量为 0.5 mL, 按“2.6.1”项下进行离体皮肤渗透实验, 按“2.6.3”项下方法求得 J 。结果见表 5 和图 4, 结果表明粒径 120 nm 的 PNS 传递体与粒径 250 nm 的 PNS 传递体相比各个成分在各取样点的

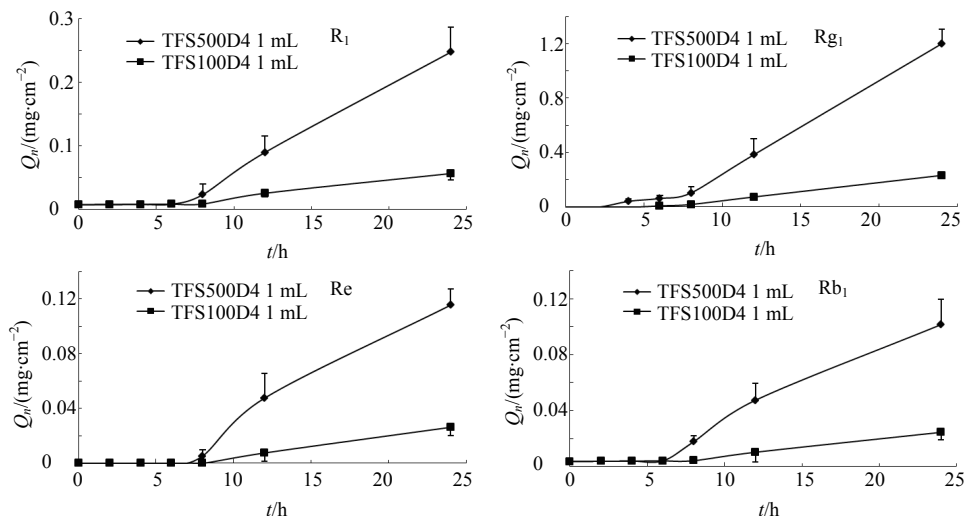


图 2 不同含药量的 PNS 传递体中 4 种皂苷成分的经皮渗透曲线

Fig. 2 Percutaneous permeation curves of four saponins in PNS TFS containing different quantities of PNS

表 4 不同体积上样量的 PNS 传递体与脂质体中 4 种皂苷成分的 J 值 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 4 J values for PNS TFS in different sample volume and LPS ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

样品	上样量/mL	$J/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1})$			
		R ₁	Rg ₁	Re	Rb ₁
TFS500D4	1.0	13.80 ± 2.30	68.40 ± 3.38	6.60 ± 0.54	5.30 ± 1.54
	0.5	16.40 ± 3.18	96.70 ± 14.28	8.90 ± 1.28	15.40 ± 4.68
LPS500D0	0.5	6.30 ± 1.26	28.40 ± 5.84	2.60 ± 0.46	7.80 ± 1.14

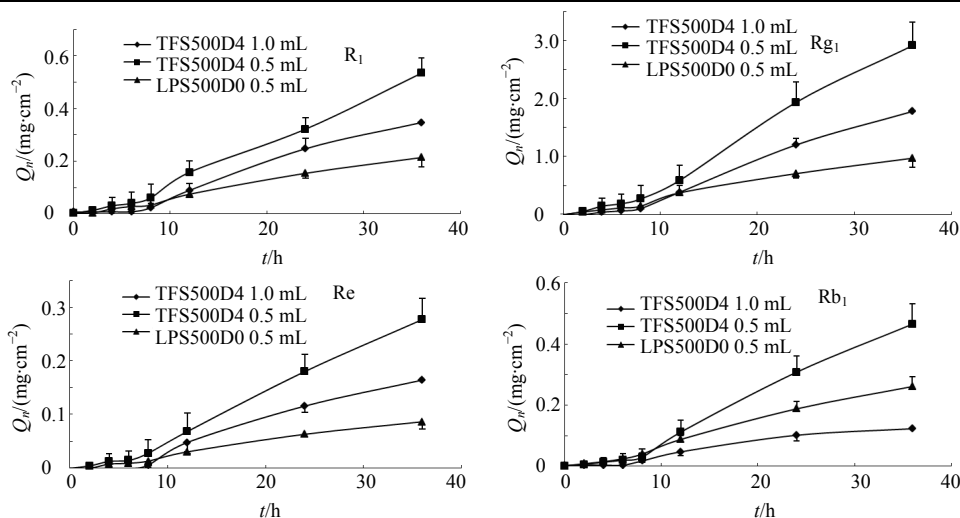


图 3 不同体积上样量的 PNS 传递体与脂质体中 4 种皂苷成分的经皮渗透曲线

Fig. 3 Percutaneous permeation curves for PNS TFS of different sample volume and LPS

表5 不同粒径的PNS传递体(TFS500D4)的 J 值($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

Table 5 J values for PNS TFS (TFS500D4) of different vesicle sizes ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

粒径/nm	$J/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1})$			
	R_1	R_{g1}	R_e	R_{b1}
120	16.40 ± 3.18	96.70 ± 14.28	8.90 ± 1.28	15.40 ± 4.68
250	6.80 ± 0.78	32.10 ± 4.60	3.90 ± 0.54	3.50 ± 0.47

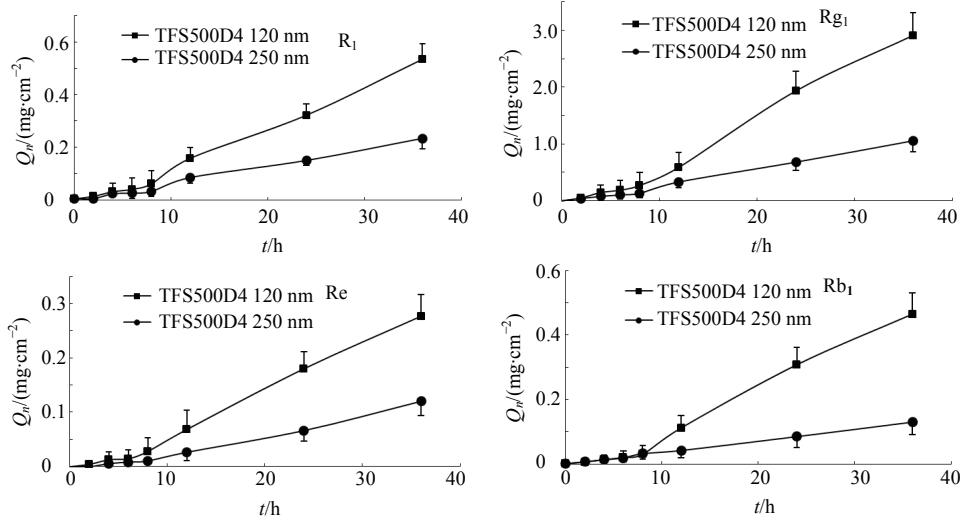


图4 不同粒径的PNS传递体的经皮渗透曲线

Fig. 4 Percutaneous permeation curves for PNS TFS of different vesicle sizes

表6 不同DOC处方量的PNS传递体中4种皂苷成分的 J 值($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

Table 6 J values of four saponins in PNS TFS containing different quantities of DOC ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

样品	$J/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1})$			
	R_1	R_{g1}	R_e	R_{b1}
TFS500D4	15.70 ± 4.55	105.90 ± 16.93	9.50 ± 1.89	17.10 ± 5.47
TFS500D2	5.50 ± 1.98	26.60 ± 10.01	4.00 ± 1.56	3.70 ± 0.38

综上所述研究结果表明,从测定方便与处方评价考虑,宜选择500 mg含药量的传递体进行离体皮肤渗透实验,并将上样体积定为0.5 mL。离体皮肤渗透法可用于测定PNS传递体中药物的经皮吸收特性,传递体促进药物经皮渗透的作用明显强于脂质体,传递体粒径相对较小,其中DOC用量适当增加均有利于药物经皮渗透。

3 讨论

含药量为100 mg的处方(TFS100D4)在各取样点的各成分皮肤 Q_n 均较小, J 亦较小,对后续的皮肤渗透特性考察不利,故宜选择500 mg含药量的传递体进行离体皮肤渗透实验。

皮肤 Q_n 与 J 均要高。

2.6.8 PNS传递体中DOC的量对药物离体皮肤渗透的影响 取PNS传递体样品(TFS500D4和TFS500D2),上样量均为0.5 mL,按“2.6.1”项下进行离体皮肤渗透实验,按“2.6.3”项下方法求得 J 。结果见表6和图5,结果表明TFS500D4在各取样点的各成分皮肤 Q_n 与 J 均明显大于TFS500D2,且不同的成分增大的倍数有一定差异。

传递体透皮的动力是皮肤的水化梯度,且通过皮肤水性通道透过皮肤^[9]。Cevc^[9]明确提出不宜采用Franz-体外透皮扩散池的方法进行传递体的体外透皮实验。郭健新等^[10]则认为在离体实验中将动物皮肤剥离,会改变皮肤某些理化性质,且皮肤与接收液直接接触,使皮肤产生溶胀而破坏皮肤由角质层到真皮层水分的浓度梯度。然而,本课题组的观察表明,剥离的皮肤在适当条件下保存,上样前使皮肤内表面接触接收液平衡一段时间不仅不会使皮肤溶胀,反而可以看到皮肤角质层面仍然保持干燥(可能仍保持着皮肤正常的水分梯度),同时,通过适当减少上样量使样品中水分在较短时间内挥散以维持皮肤的水分梯度,因此离体皮肤渗透法适用于传递体药物经皮渗透研究。但是在实验研究中,为缩小实验误差、便于测定,上样体积也不宜太小,同时,上样体积太小可能无法完全覆盖实验皮肤表面,故在本研究中传递体的上样量体积定为0.5 mL。

Cevc^[9]认为传递体必须具有足够大的变形性才使其经皮肤中的水性通道穿透皮肤。本实验发现当传递体中DOC量较大时,传递体中药物能较快、

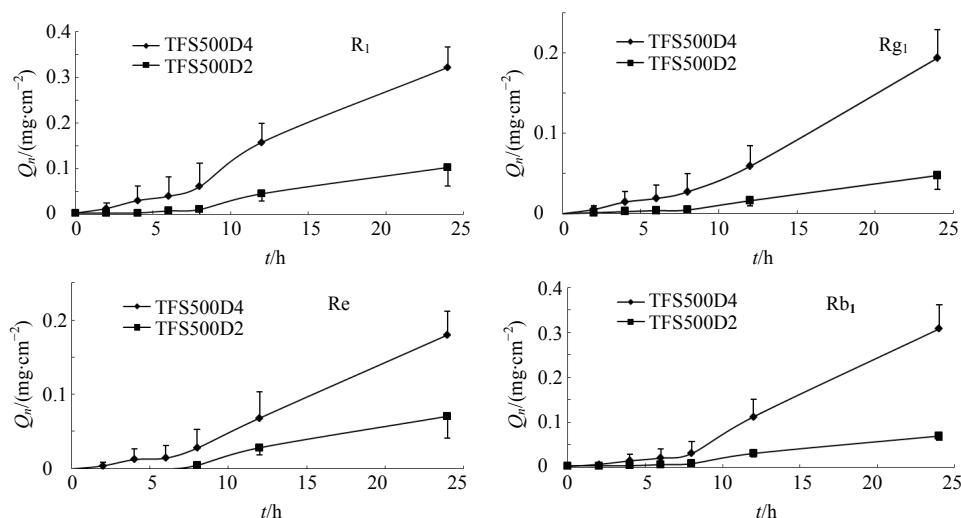


图5 不同DOC处方量的PNS传递体中4种皂苷成分的经皮渗透曲线

Fig. 5 Percutaneous permeation curves of four saponins in PNS TFS containing different quantities of DOC

较多地渗透,可能是因为传递体中含较多DOC时使其具有较大的变形性所致,故这一结果验证了Gevc的上述论点。

此外,本研究发现与粒径大的传递体相比,粒径小的传递体的皮肤 Q_n 与 J 均明显增大。这可能是因为皮肤屏障层中的水性通道在正常生理状态下孔径很小(约0.4 nm),在传递体的诱导下可扩张至约为30 nm^[9],所以粒径较小的传递体可通过其自身的变形性而实现穿透,而粒径大的传递体尽管具有高度的变形性,却仍然被限制在皮肤表面。

包封率测定中的4个指标成分在传递体或脂质体中的平均包封率不同是因为这些成分与脂质双分子层的相互作用不同。因为这些成分的糖基的不同、糖基取代位置的差异以及甾环上羟基个数的不同,所以其极性大小关系很难判断,所以单纯从分子极性的角度很难解释包封率的差异。此外,从这些指标成分的亲水官能团与脂质双分子层亲水部分的相互作用也无法解释该问题。所以要阐明这些指标成分的载药规律,必须进一步深入探讨分子间的相互作用,不仅要考虑亲水基团之间的相互作用,还要考虑疏水部分的相互作用以及分子大小的适应性,故本实验运用ACD/Labs(Advanced Chemistry Development Inc.)开发的3D Viewer 10.0软件预测最优构象,并计算这些皂苷分子与磷脂分子的原子间距离。Rb₁分子为线型,整个分子长度为3.0 nm,亲脂链长2.0 nm,两端的亲水基团各1.0 nm,嵌入磷脂双分子层时,亲脂部分大小合适,在内侧的2个糖基可彼此结合,降低体系的能量;对于Rg₁、

Re、R₁,亲脂和亲水部分均呈U形,2个亲水端距离2.0 nm,亲脂链长1.5 nm,嵌入磷脂双分子层能量很高。因此Rb₁的包封率远高于其他成分,至于其他3种成分的包封率,其大小趋势基本与分子亲脂性一致。

参考文献

- [1] 付开礼. 三七总皂苷在骨科的药理与临床研究进展[J]. 云南中医中药杂志, 2006, 27(2): 49-51.
- [2] 文丽, 刘华钢, 赖玲, 等. 三七总皂苷制剂的研究进展[J]. 广西医科大学学报, 2012, 29(2): 320-322.
- [3] 赖玲, 刘华钢, 文丽, 等. 三七总皂苷口服制剂的处方前研究[J]. 中国新药杂志, 2012, 21(9): 1050-1053.
- [4] 赖玲, 刘华钢, 陈明, 等. 三七总皂苷非注射途径给药剂型研究进展[J]. 中国新药杂志, 2011, 20(3): 235-241.
- [5] Duanqjit S, Obata Y, Sano H, et al. Comparative study of novel ultradeformable liposomes: menthosomes, transfersomes and liposomes for enhancing skin permeation of meloxicam[J]. Biol Pharm Bull, 2014, 37(2): 239-247.
- [6] Priyanka K, Singh S. A review on skin targeted delivery of bioactives as ultradeformable vesicles: overcoming the penetration problem[J]. Curr Drug Targets, 2014, 15(2): 184-198.
- [7] Chaudhary H, Kohli K, Kumar V. Nano-TFS as a novel carrier for transdermal delivery[J]. Int J Pharm, 2013, 454(1): 367-380.
- [8] 郑杭生, 黄绳武, 李范珠, 等. 盐酸青藤碱脂质体的制备工艺研究[J]. 中草药, 2013, 44(4): 408-413.
- [9] Ceve G. Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2004, 56(5): 675-711.
- [10] 郭健新, 平其能. 环孢素脂质微粒经小鼠皮肤给药的渗透机理研究[J]. 药学学报, 2000, 35(10): 782-785.