

3.4 对皮质酮致PC12细胞损伤的保护作用

PC12细胞经200 μmol/L皮质酮损伤48 h后,A值显著低于空白对照组;给予氯米帕明或芍药苷共孵育时,A值较模型组显著升高,差异显著。结果见表3。

表3 芍药苷对皮质酮损伤PC12细胞的保护作用

($\bar{x} \pm s$, n=6)

组别	浓度/(μmol·L ⁻¹)	A ₅₇₀	存活率/%
对照	—	1.58±0.15	100
模型	—	0.81±0.26 [#]	51.3
氯米帕明	1	1.50±0.17 ^{**}	94.9
芍药苷	2	1.12±0.22 [*]	82.4
	5	1.36±0.39 [*]	86.1
	10	1.43±0.26 ^{**}	90.5

与对照组比较:[#] P<0.01

与模型组比较:^{*} P<0.05 ^{**} P<0.01

4 讨论

开野实验显示,给小鼠芍药苷后,其自主活动无明显变化,说明此剂量范围内无中枢兴奋或抑制作用。

小鼠悬尾实验和小鼠强迫游泳实验是经典的抗抑郁药理实验,这些实验都是通过造成动物的行为绝望来观察药物的抗抑郁效果。芍药苷明显缩短2个模型的不动时间,显示出良好的抗抑郁作用。

PC12细胞膜上糖皮质激素受体表达丰富,活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性MTT还原为蓝紫色结晶物并沉积在细胞中,而死细胞无此功能,在570 nm处测定其吸光度值,可间接反映活细胞数量。

抑郁症患者血浆皮质酮水平升高^[6],且皮质酮水平与抑郁症严重程度有关^[7]。抗糖皮质激素治疗对重症抑郁症患者效果明显^[6],经抗抑郁剂治疗后

亦使血浆皮质酮水平下降^[8],因而可以推断血浆及脑脊液中的皮质酮水平的持续升高对抑郁症的发生可能起到至关重要的作用。研究表明,持续高浓度皮质酮可以导致皮层及海马神经细胞损伤,抑郁症的发生与此有关。在本实验中,高浓度皮质酮可诱导PC12神经细胞损伤与死亡,而芍药苷与氯米帕明可以防止这种损伤的发生,说明这种保护作用可能是芍药苷抗抑郁作用的机制之一。

参考文献

- [1] 孙丽荣,曹雄,侯凤青.芍药苷研究进展[J].中国中药杂志,2008,33(18):2028-2031.
- [2] Mao Q, Huang Z, IP S, et al. Antidepressant-like effect of ethanol extract from *Paeonia lactiflora* in mice [J]. Phytother Res, 2008, 22(11): 1496-1499.
- [3] 李树新,库宝善.3,4-二氯苯丙烯酰另丁胺抗抑郁作用的药理研究[J].中国药理学通报,1991,7(4):279-282.
- [4] Porsolt R D, Anton G, Blavet N, et al. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments [J]. Eur J Pharmacol, 1978, 47(4): 379-391.
- [5] Steru L, Chermat R, Thierry B, et al. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice [J]. Psychopharmacology, 1985, 85(3): 367-370.
- [6] Fitzsimons C P, Van Hooijdonk L W, Morrow J A, et al. Antiglucocorticoids, neurogenesis and depression [J]. Mini Rev Med Chem, 2009, 9(2): 249-264.
- [7] Heuser I. Anna-Monika-Prize paper. The hypothalamic-pituitary-adrenal system in depression [J]. Pharmacopsychiatry, 1998, 31(1): 10-13.
- [8] Murphy B E. Antiglucocorticoid therapies in major depression: a review [J]. Psychoneuroendocrinology, 1997, 22(Suppl 1): 125-132.

(收稿日期 2009-05-22)

青蒿琥酯贴剂压敏胶处方的研究

邱琳,王乃婕,杜丰,梁秉文,叶祖光*

(中药复方新药开发国家工程研究中心,北京 100075)

摘要:目的 考察压敏胶基质处方对青蒿琥酯体外透皮吸收的影响。方法 以聚丙烯酸酯压敏胶为基质设计不同的处方,考察了各种添加剂对青蒿琥酯在聚丙烯酸酯压敏胶基质中结晶的影响;通过改良的Franz透皮扩散池测定青蒿琥酯贴剂中青蒿琥酯透过SD大鼠腹部皮肤的渗透速率,以研究不同压敏胶和不同添加剂对经皮渗透速率的影响。**结果**聚丙烯酸树脂Eudragit EPO和聚乙烯吡咯烷酮(PVP-K30)对青蒿琥酯结晶均有较强的抑制作用,能提高青蒿琥酯在压敏胶中的载药量。体外透皮试验结果显示,储存6周后,添加Eudragit EPO、PVP-K30

* 通讯作者 叶祖光,E-mail: yezuguang@vip.sina.com

的青蒿琥酯贴剂中的青蒿琥酯的累计透过量比无添加剂贴剂的高。结论 上述研究结果表明,提高青蒿琥酯在基质中的载药量有利于其开发成临床应用的贴剂。

关键词:青蒿琥酯;贴剂;经皮吸收;压敏胶;结晶抑制剂

中图分类号:R943

文献标识码:A

文章编号:1674-5515(2009)04-0233-05

Studies on the prescription of pressure sensitive adhesives of Artesunate Patch

QIU Lin, WANG Nai-jie, DU Feng, LIANG Bing-wen, YE Zu-guang

(State Research Center for Research and Development of Traditional Chinese medicine

Multi-ingredient Drugs, Beijing 100075, China)

Abstract; Objective To investigate the effect of prescription of pressure sensitive adhesives on the percutaneous absorption of artesunate. **Methods** Various polyacrylate pressure sensitive adhesive formulations were designed. The effects of various additives on the crystallization of artesunate in polyacrylate adhesive matrix were investigated. Modified Franz mothern method was used to study the effects of various additives and pressure-sensitive adhesives on the permeation of artesunate across SD rat abdominal skin.

Results Polymethacrylates Eudragit EPO and Polyvinyl pyrrolidone (PVP-K30) inhibited significantly the crystallization of artesunate in polyacrylate adhesive matrix, and increased the drug loading of artesunate in pressure sensitive adhesives. The addition of Eudragit EPO and PVP-K30 increased the flux of artesunate with the polyacrylate adhesive matrix after a storage period of 6 weeks. **Conclusion** These observations indicate that improvement of drug loading in the solubility of artesunate is necessary to fully realize the clinically applicable transdermal delivery system.

Key words:artesunate; patch; percutaneous absorption; pressure sensitive adhesive; crystallization inhibitor

青蒿琥酯(artesunate)为常用抗疟药,在临幊上用于抢救、治疗脑型疟和恶性疟等疗效显著,研究还发现其具平喘、治疗弓形虫病、抗肿瘤、免疫调节等作用。青蒿琥酯多采用口服、肌注、静注给药,但由于体内代谢迅速,消除半衰期很短,需要多次给药才能有效降低疟原虫的复燃率,给患者带来诸多不便。透皮贴剂可以避免这些不利因素,目前国内对储库型青蒿琥酯透皮贴剂进行了一些基础性研究^[1]。与储库型贴剂相比,骨架型压敏胶透皮贴剂的结构及制备工艺简单,制造成本低廉,使用方便。针对在压敏胶中青蒿琥酯容易结晶、基质载药量低等问题,研究高分子添加剂和压敏胶型号对青蒿琥酯载药量和其体外经皮吸收的影响。

1 材料与仪器

1.1 药品和试剂

青蒿琥酯(批号 061118),重庆华立武陵山制药有限公司生产,纯度 99.2%;聚丙烯酸酯压敏胶(国民淀粉 1~6 号,美国国民淀粉公司提供;罗门哈斯 1、2 号,美国罗门哈斯公司提供;江门 1、2 号,江门新时代胶粘科技有限公司提供);聚乙烯吡咯烷酮

(PVP-K30),美国国际特品公司提供;丙烯酸树脂(Eudragit EPO),德国 RöHM 公司提供;甲醇为色谱纯,水为自制超纯水,其他试剂均为分析纯。

1.2 动物

雄性 SD 大鼠,体质量约 200 g,北京维通利华实验动物技术有限公司,动物合格证号 SCXK(京)2006-2008。

1.3 仪器

T2000L 涂布机,清华大学研制;远红外恒温干燥箱,天津市中环实验电炉有限公司;TK-20A 改良 Franz 扩散池,上海楷凯科技贸易有限公司;Agilent 1100 安捷伦高效液相色谱仪,美国 Agilent 公司。

2 方法与结果

2.1 贴剂的制备

称取处方量丙烯酸酯类压敏胶、青蒿琥酯及促渗剂,混匀搅拌,真空脱气。控制涂布厚度为 0.7 mm,使含药压敏胶均匀涂布在保护膜上,在 50 °C 下干燥 60 min,冷却后压覆背衬膜,备用。

2.2 贴剂的体外经皮渗透实验

2.2.1 离体皮肤的制备

SD大鼠脱颈椎处死,剃除腹部皮毛,剥取腹部皮肤,去除皮下组织。用生理盐水清洗皮肤后,用保鲜膜包好置冰箱冷冻保存,备用。

2.2.2 透皮实验

将预处理的皮肤置于扩散室与接收室之间(角质层面向扩散室),在角质层表面贴上药贴,固定好。向接收室中加入20%乙醇生理盐水溶液约6mL,液面恰与皮肤内层接触,于恒温[(37±0.5)℃]搅拌(约400r/min)。在设定时间(2、4、6、8、24h)取得的接收液样品用0.45μm微孔滤膜滤过,每次取完,补充相同体积的新鲜接收液。样品用0.45μm微孔滤膜滤过,用HPLC法检测青蒿琥酯浓度,通过下式计算累计透过量,并绘制Q-t曲线。

$$Q = (C_n \times V + \sum C_{(n-1)} \times V) / A \quad (1)$$

式中Q为单位面积累计释放量;V为接收液体积;A为扩散池口面积;C_n为第n次取样的浓度。

以药物稳定透过皮肤时的累计透过量Q对时间t进行线性回归所拟合直线的斜率即为经皮渗透速率(dQ/dt)_s(μg·cm⁻²·h⁻¹)。

2.3 接收液样品处理和检测方法的建立^[1-2]

2.3.1 色谱条件

色谱柱:Kromasil C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,5μm);流动相:乙腈-0.01 mol/L磷酸钾(48:52,稀磷酸调pH值至3.0);体积流量:1.0 mL/min;检测波长:210 nm;柱温:25℃。在该条件下青蒿琥酯与其他成分能达到基线分离,色谱图见图1(A)。

2.3.2 对照品溶液的制备

取青蒿琥酯对照品50 mg,精密称定,置50 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,得对照品溶液I(青蒿琥酯1.04 mg/mL)。精密吸取1.0 mL对照品溶液I于10 mL量瓶中,加乙醇稀释至刻度,摇匀,得对照品溶液II(青蒿琥酯1.04 μg/mL)。

2.3.3 供试品溶液的制备

取青蒿琥酯贴剂,按“2.2.2”项下方法进行体外透皮实验,取接收液,用0.45 μm微孔滤膜滤过,即得供试品溶液。

2.3.4 阴性对照试验

取不含青蒿琥酯的空白贴片按“2.3.3”项下方法操作,得阴性对照溶液。对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液在“2.3.1”色谱条件下进样分析。结果表明,阴性对照液在青蒿琥酯色谱峰位置无相应峰出现。HPLC图见图1。

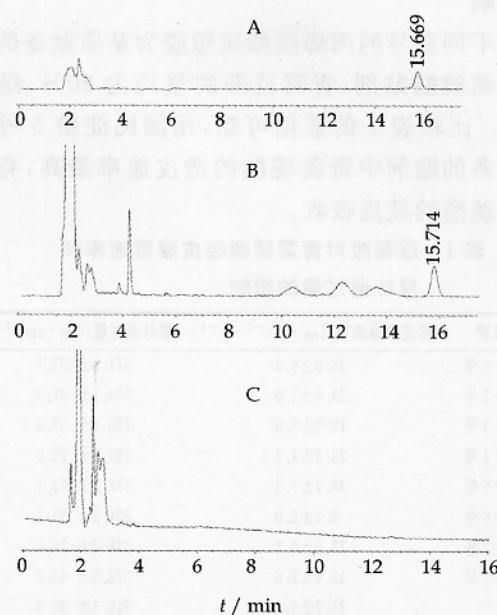


图1 青蒿琥酯对照品溶液(A)、供试品溶液(B)、阴性对照溶液(C)的HPLC图

2.3.5 线性关系考察

精密吸取对照品溶液Ⅱ于量瓶中,用接收液定容,配置一系列不同质量浓度的溶液(20.8、41.6、62.4、83.2、104 μg/mL)。分别吸取上述溶液各20 μL,按“2.3.1”项色谱条件进样分析,记录峰面积。以青蒿琥酯峰面积为纵坐标Y,质量浓度为横坐标X,绘制标准曲线,得回归方程为Y=0.9212 X-0.28(r=0.9999,n=3),表明青蒿琥酯在20.8~104 μg/mL线性关系良好。

2.3.6 精密度试验

精密吸取供试品溶液20 μL,注入液相色谱仪,重复进样6次,测定青蒿琥酯峰面积值。结果RSD为0.54%。

2.3.7 稳定性试验

取同一供试品溶液,分别于0、4、8、12、24 h进样测定。结果RSD为1.17%,表明样品供试液在24 h内稳定。

2.3.8 回收率试验

用阴性对照溶液配制质量浓度分别为41.6、62.4、83.2 μg/mL 3种青蒿琥酯溶液,每种各做3个样品。精密吸取配制好的溶液20 μL,注入液相色谱仪,测定青蒿琥酯峰面积值。结果9份被测溶液平均回收率为98.59%,RSD 3.53%,表明本法回收率符合规定。

2.4 压敏胶对青蒿琥酯累计透过量和经皮渗透速

率的影响

用不同型号的丙烯酸酯压敏胶为基质制备的一系列青蒿琥酯贴剂,青蒿琥酯的量均为20%,结果见表1。比较表1的数据可知,用国民淀粉5号压敏胶制备的贴剂中青蒿琥酯的透皮速率最高,有利于青蒿琥酯的经皮吸收。

表1 压敏胶对青蒿琥酯经皮渗透速率和
累计透过量的影响

压敏胶	经皮渗透速率/($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$)	累计透过量/($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$)
国民淀粉1号	26.0±6.8	571.3±127.7
国民淀粉2号	25.6±1.6	524.1±37.9
国民淀粉3号	10.0±2.9	220.0±57.4
国民淀粉4号	26.8±4.3	537.1±92.0
国民淀粉5号	36.7±7.3	776.6±171.7
国民淀粉6号	8.3±2.0	234.2±34.2
罗门哈斯1号	13.0±4.2	328.0±76.6
罗门哈斯2号	12.4±2.6	323.2±43.2
江门1号	31.7±1.3	646.1±24.9
江门2号	30.2±7.8	622.4±160.2
自制水溶胶	20.5±4.5	405.2±86.0

2.5 载药量、储存时间及高分子添加剂对青蒿琥酯结晶及体外透皮吸收的影响

2.5.1 载药量对青蒿琥酯在聚丙烯酸酯压敏胶基质中结晶的影响

考察青蒿琥酯在压敏胶基质中的溶解度,实验中所有处方的各组分均为质量分数。几组贴剂的处方及结晶情况见表2。结果显示,含药量>10%的青蒿琥酯贴剂在常温下保持6周,期间都产生了结晶,推断青蒿琥酯在压敏胶中的溶解度在5%~10%。

表2 载药量对青蒿琥酯在聚丙烯酸酯压敏胶基质中结晶的影响

处方序号	青蒿琥酯载药量/%	压敏胶国民淀粉5号/%	外观	
			1周	6周
1	5	95	—	—
2	10	90	—	+
3	15	85	—	+
4	20	80	—	++
5	25	75	+	++
6	30	70	+	++

“—”未结晶;“+”少量结晶;“++”多量结晶

2.5.2 载药量及储存时间对青蒿琥酯体外透皮吸收的影响

在该项实验中所用贴剂处方为表2中3~6号贴剂。从表3可以看出,增加载药量是增加药物透皮速率的有效方法,药物浓度从15%提高到20%,青蒿琥酯的透皮速率从28.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 提高到36.7

$\mu\text{g}/\text{mL}$;但载药量从20%提高到25%,青蒿琥酯的透皮速率却无明显增加;载药量从25%提高30%,青蒿琥酯的透皮速率则显著下降,这是因为过量的药物是以结晶的形式存在于压敏胶基质中,结晶的增加使压敏胶中游离药物水平下降,从而导致透皮速率下降。透皮试验结果还表明,6周后青蒿琥酯和国民淀粉5号压敏胶共混制得的青蒿琥酯25%的贴剂是不稳定体系,随着体系中药物结晶的析出,药物的透皮速率也明显下降。抑制基质中药物的结晶,提高基质中游离药物的浓度,是提高药物透皮速率最直接的手段。

表3 载药量及储存时间对青蒿琥酯经皮渗透速率和累计透过量的影响

青蒿琥酯载药量/%	经皮渗透速率/($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$)	累计透过量/($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$)	
		1周	6周
15	28.1±0.8	605.7±14.4	
20	36.7±7.3	776.6±171.7	
25	38.0±4.5	793.7±80.2	481.3±50.0
30	19.6±2.5	455.9±43.4	

2.5.3 高分子添加剂对青蒿琥酯在聚丙烯酸酯压敏胶基质中结晶的影响

考察Eudragit EPO和PVP-K30 2种添加剂对青蒿琥酯结晶的抑制作用,实验中所有处方各组分均为质量分数。几组贴剂的处方及结晶情况见表4。在6周观察期内,贴剂基质中5% PVP-K30仅延缓青蒿琥酯结晶,但PVP-K30的量>10%时,能显著抑制25%青蒿琥酯贴剂中的结晶。10% Eudragit EPO也有同样的效果。

表4 高分子添加剂对青蒿琥酯在聚丙烯酸酯压敏胶基质中结晶的影响

处方序号	青蒿琥酯载药量/%	高分子添加剂		压敏胶国民淀粉5号/%	外观	
		Eudragit EPO/%	PVP-K30/%		1周	6周
1	25	0	0	75	+	++
2	25	10	0	65	—	—
3	25	0	5	70	—	+
4	25	0	10	65	—	—
5	25	0	15	60	—	—

“—”未结晶;“+”少量结晶;“++”多量结晶

2.5.4 高分子添加剂对青蒿琥酯体外透皮吸收的影响

有研究显示,Eudragit EPO、PVP-K30对压敏胶基质中药物结晶有一定的抑制作用,但会影响药物的透皮速率^[3~6]。因此考察了上述2种高分子添加剂及添加剂浓度对载药青蒿琥酯25%贴剂透皮

速率的影响,所用贴剂的处方为表4中1~5号贴剂。从表5可见,含有添加剂的青蒿琥酯贴剂的透皮速率和累计透过量均较已结晶的、未加添加剂的贴剂高。这是因为在基质中的高分子添加剂能抑制药物的结晶,提高基质中游离药物的浓度,从而提高药物的透皮速率。由该结果可知,PVP-K30有很好的抑晶效果,且以PVP-K30为添加剂制备的青蒿琥酯贴剂透皮速率最高,PVP-K30抑晶的合适浓度为10%。

表5 高分子添加剂对青蒿琥酯经皮渗透速率和累计透过量的影响

处方序号	国民淀粉5号/%	高分子添加剂	经皮渗透速率/ ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$)	累计透过量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$)
1	75	0	20.3±1.0	481.3±50.0
2	65	Eudragit EPO 10%	31.8±9.3	676.0±171.8
3	70	PVP-K30 5%	34.0±4.2	723.1±65.9
4	65	PVP-K30 10%	34.2±5.9	745.7±107.2
5	60	PVP-K30 15%	26.8±2.9	585.4±65.0

2.6 最佳处方的验证

用表4中处方4贴剂工艺进行最佳处方验证。制备3批贴剂样品,以表5中的4号贴剂为参比贴剂,比较其外观(结晶情况)和体外透皮速率,考察工艺的重现性。结果见表6。

表6 3批贴剂样品的外观、经皮渗透速率和累积透过量

贴剂批号	外 观		经皮渗透速率/ ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$)	累计透过量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$)
	1周	6周		
1	—	—	31.0±2.9	692.4±65.1
2	—	—	37.4±6.9	798.9±126.4
3	—	—	35.1±2.1	795.7±41.3
参比贴剂	—	—	34.2±5.9	745.7±107.2

“—”未结晶;“+”少量结晶;“++”多量结晶

从表6可知,3批贴剂的外观和体外透皮速率的平均数据与参比贴剂数据基本一致。

3 结论

在青蒿琥酯压敏胶贴剂中加入Eudragit EPO、PVP-K30可有效抑制药物结晶,提高青蒿琥酯在基质中的载药量。10% Eudragit EPO和10% PVP-K30均能使青蒿琥酯在基质中的结晶浓度从约10%提高至大于25%。体外透皮试验的结果表明,添加Eudragit EPO、PVP-K30的青蒿琥酯贴剂和未加高分子添加剂的贴剂储存6周后,含添加剂贴剂的青蒿琥酯的累计透过量比无添加剂贴剂的要高。这些研究结果表明提高青蒿琥酯在基质中的载药量将有利于其开发成临床应用的贴剂。

参考文献

- [1] 侯海霞,周莉玲,李锐.经皮给药系统对青蒿琥酯吸收的影响研究[D].广州:广州中医药大学,2000.
- [2] 谢蓓.青蒿琥酯及注射用青蒿琥酯中有关物质的HPLC测定[J].中国医药工业杂志,2004,35(9):540-542.
- [3] Wang Q, Tomohiro H, Kakuji T. Skin penetration enhancement by the synergistic effect of supersaturated dissolution and enhancers [J]. J Chem Eng Jap, 2003, 36(1): 92-97.
- [4] Kim J H, Chio H K. Effect of additives on the crystallization and the permeation of ketoprofen from adhesive matrix [J]. Int J Pharm, 2002, 236(1/2): 81-85.
- [5] Karing K, Sophie-Dorothee C. Crystallization inhibition in solid dispersions of MK-0591 and poly(vinylpyrrolidone) polymers [J]. J Pharm Sci, 2000, 89(10): 1325-1334.
- [6] Ma X H, Taw J, Chinan C M. Control of drug crystallization in transdermal matrix system [J]. Int J Pharm, 1996, (142): 115-119.

(收稿日期 2009-01-16)

RP-HPLC法测定金银花及金芪降糖片中的绿原酸

杨 茉¹,周 晶^{1*},宁 娜¹,张金红¹,王 欣²

(1.天津医科大学药学院,天津,300070; 2.天津中新药业集团股份有限公司隆顺榕制药厂,天津 300457)

摘要:目的 建立同时测定金银花及金芪降糖片中绿原酸的反相高效液相色谱法。方法 色谱柱为Diamondsil C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),以乙腈-0.4%磷酸溶液(13:87)为流动相,检测波长为327 nm,体积流量为1.0 mL/min。结果 在上述条件下测定金银花中绿原酸为2.49%,金芪降糖片中绿原酸为每片8.776 mg。结论 本方法操作简单、结果准确、回收率高、重现性好,可用于金银花及金芪降糖片的质量控制。

基金项目 天津市科技攻关项目(06YFGPSH02900)

作者简介 杨 茉(1983—),女,天津医科大学2006级硕士,研究方向:天然药物化学。

Tel: 13612034453, E-mail: yangmo0304@tom.com

*通讯作者 周 晶, Tel: 13920680193, E-mail: zhouding@tjmu.edu.cn