

• 制剂与质量 •

电致孔条件下不同电学参数对青藤碱透皮给药的影响

岳奇峰¹, 郝保华^{1*}, 邓周虎², 李伟泽¹, 郭耀武³, 张 寒¹, 王义潮¹, 刘 森¹(1. 西北大学生命科学学院, 陕西 西安 710069; 2. 西北大学信息科学与技术学院, 陕西 西安 710069;
3. 陕西省药品检验所, 陕西 西安 710061)

摘 要:目的 探索电致孔条件下不同电学参数(电压、波形、脉冲宽度、脉冲次数)对青藤碱透皮给药的影响。方法 用中药电致孔给药仪产生多种电学参数条件,并以双室扩散池法、HPLC 法检测青藤碱透过小鼠腹部皮肤的变化。结果 青藤碱的累积透过量与电参数密切相关,在单因素影响中,4 个最佳电学参数分别为:600 V 电压、正弦波+方波组合波形、500 μ s 的脉冲宽度、240 个脉冲次数。透过量有极显著的增大,与被动扩散相比增加幅度有 5~100 倍。结论 优化的电致孔条件应用于中药有效成分透皮给药有良好的前景。

关键词:青藤碱;电致孔;透皮给药

中图分类号:R284.2; R286.02

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2006)11-1639-03

Effect of different electrical parameters on transdermal delivery of sinomenine using eletroporationYUE Qi-feng¹, HAO Bao-hua¹, DENG Zhou-hu², LI Wei-ze¹, GUO Yao-wu³,
ZHANG Han¹, WANG Yi-chao¹, LIU Sen¹

(1. College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China; 2. College of Information Science and Technology, Northwest University, Xi'an 710069, China; 3. Shaanxi Institute for Drug Control, Xi'an 710061, China)

Abstract: Objective To observe the effects of different electrical parameters (voltage, shap of wave, pulse width, and number of pulses) on transdermal delivery of sinomenine using eletroporation. **Methods**

The transdermal penetration in Franz diffusion cell for isolated rat skin of sinomenine was studied by different electrical parameters of eletroporation equipment for Chinese materia medica, respectively. The content of sinomenine per-meated abdomen skin of mice was determined by HPLC. **Results** The accumulative permeation of sinomenine was correlated with electrical parameters, different electrical parameters showed the significant effect on sinomenine's transdermal delivery. The optimum electrical parameters were voltage: 600 V, shap of wave: the combination of square wave and sine wave, pulse width: 500 μ s, number of pulses: 240. The permeation increased significantly and the increasing extent was 5—100 times compared with the passive diffusion. **Conclusion** Optimum parameters of eletroporation have an favorable future for active constituents in Chinese materia medica to be transdermically delivered.

Key words: sinomenine; eletroporation; transdermal delivery

透皮给药可以避免药物在胃肠道中的降解和肝脏的首过作用,但是由于皮肤角质层的屏障作用,使可以良好应用该方法的药物很少。因此发展了许多促进透皮给药的方法,如促渗剂、激光、超声、离子导入和电致孔等。电致孔是应用瞬间高压脉冲电场使脂质双层膜产生暂时性的亲水通道从而使大分子物质进入细胞或膜内的方法。电致孔最先被应用于细胞生物学中的 DNA 导入,膜内大分子插入等。20 世纪 90 年代以来,应用电致孔技术促进药物的透皮给

药方面已有不少报道,如促进肝素、芬太尼、胰岛素等药物的透皮量,使这些药物有了体外给药的可能性^[1]。青藤碱(sinomenine)是从青风藤中提取的生物碱单体,现在已有口服片剂、缓释制剂和注射剂,临床上常用来治疗风湿、类风湿性关节炎,心率失常等疾病。青藤碱口服生物利用度低,不良反应多,需长期给药,而透皮给药可以减少肠胃反应,减少副作用^[2]。尤其是在电致孔条件下可以加大透皮给药量和透皮速率。本实验采用 HPLC 法测定青藤碱的透

收稿日期:2006-03-13

* 通讯作者 郝保华 Tel: (029)81970519

皮给药量,考察随电致孔条件下不同参数变化对青藤碱透皮量的影响,为以后进一步研究提供参考。

1 药品与仪器

青藤碱(质量分数 $\geq 99\%$,陕西赛德高科生物公司提供);林格氏液、甲醇、乙二胺(天津科密欧化学试剂有限公司);HL-2 型恒流泵、79-1 型磁力加热搅拌器(上海沪西分析仪器厂);自制改良 Franz 双室扩散池;电致孔仪(西北大学信息科学与技术学院制);高效液相色谱仪(Waters:1525 型泵,2487 型检测器)。

2 方法与结果

2.1 离体皮肤的制备:实验用昆明种小鼠(体重 20 g,健康、皮毛光泽,第四军医大学实验动物中心提供),将其脱颈处死,剥离腹部的皮肤,剃去腹部的毛,小心除去脂肪,用生理盐水冲洗干净,显微观察没有破损后即弃。

2.2 青藤碱的 HPLC 法测定^[2]

2.2.1 色谱条件:色谱柱:Hypersil C₁₈(250 mm $\times$ 4.6 mm,10 μ m),流动相:甲醇-水-乙二胺[52:48(300:10)];体积流量:1 mL/min;检测波长:262 nm;进样量:10 μ L。

2.2.2 标准曲线的绘制:精密称取青藤碱 40 mg,置于 100 mL 量瓶中,加双蒸水溶解,并加至刻度,摇匀。分别取出 0.25、0.50、1.00、1.50、2.00、2.50 mL 放入 10 mL 量瓶内,加双蒸水至刻度,摇匀备用。分别取 10 μ L 进样(每个水平重复 3 次),以峰面积(A)对质量浓度(C)回归的标准曲线方程为 $A = 1\,213.21\,C - 24\,083$, $r = 0.999\,6$ 。

2.2.3 接收液中青藤碱的测定:在线性范围内配青藤碱对照品溶液,进样 10.0 μ L(3 次);接收液经微孔滤膜滤过后进样 10.0 μ L(3 次),采用外标法计算。

2.3 透皮给药试验:取体重为 20 g 的小鼠,脱颈处死,剥离腹部的皮肤,剪净腹部的毛,仔细除去皮下脂肪,用生理盐水反复冲洗干净,然后加于双室扩散池中,角质层面面向供给池,真皮层面面向接收池,扩散池固定在磁力搅拌器上,均匀搅拌,同时保持接收池的温度在 32 $^{\circ}\text{C}$ 。供给池中加入青藤碱溶液(6 mg/mL),接收池中加入 25 mL 林格氏溶液,供给池中接正极,接收池中接负极(接收池内以星状磁珠不断缓慢搅拌以保持药物质量浓度的均匀),分别进行被动扩散和电致孔条件下不同参数电致给药试验,定时取出接收液补加等量接收液,取出的接收液采用 HPLC 法测定青藤碱的质量浓度,计算总的累积透过量。

2.4 被动扩散:不加电压,做被动扩散 1 h,取样测

定青藤碱的质量浓度,计算得被动扩散 1 h 末累积透过量为 57.12 μg 。

2.5 电致孔电压的影响:固定脉冲宽度 1 ms、脉冲次数 120 次、波形为方波,使用 100、200、300、400、500、600、700、800、900、1 000 V 电压分别进行电致孔试验 2 min,60 次/min,共 120 个脉冲,然后 10 min 后取样,测定青藤碱的质量浓度,计算青藤碱的累积透过量,结果见表 1。可以看出,电致孔脉冲电压因素对青藤碱累积透过量有一定影响,电压从 10 V 到 1 000 V 累积透过量最高电压是 600 V,其次是 100 V。600 V 后电压越往高累积透过量越小,但相对被动扩散都有了很大的增长。脉冲电压 600 V,10 min 末累积透过量为被动扩散 1 h 末累积透过量的 5 倍。

表 1 不同脉冲电压 10 min 末累积透过量

Table 1 Accumulative permeation of sinomenine in various pulse voltages at 10 min

电压/V	累积透过量/ μg	电压/V	累积透过量/ μg
100	196.931	600	219.317
200	161.943	700	88.025
300	142.471	800	53.551
400	147.016	900	87.241
500	144.367	1 000	64.835

2.6 不同波形的影响:固定脉冲宽度 1 ms、脉冲次数 120 次、电压 200 V,分别使用正弦波、三角波、锯齿波、方波、正弦波+方波、正弦波+三角波、正弦波+锯齿波、方波+三角波、方波+锯齿波、三角波+锯齿波进行电致孔试验 2 min,60 次/min,共 120 个脉冲,然后 10 min 后取样,测定青藤碱的质量浓度,计算青藤碱的累积透过量,结果见表 2。可以看出,电致孔波形因素对青藤碱累积透过量亦有很大影响。与被动扩散相比,最佳波形为正弦+方波的组合复合波,在该条件下 10 min 末的累积透过量约为被动扩散 1 h 末累积透过量的 50 倍。本实验考察了复合波电致孔条件下对青藤碱累积透过量的影响,结果表明特定复合波的效果远远超过单纯使用某一波形的效果。

表 2 不同波形 10 min 末累积透过量

Table 2 Accumulative permeation of sinomenine in various shapes of wave at 10 min

波 形	累积透过量/ μg	波 形	累积透过量/ μg
正弦波	865.375	正弦波+三角波	419.733
方波	446.250	正弦波+锯齿波	318.873
三角波	375.215	方波+三角波	2 736.340
锯齿波	463.218	方波+锯齿波	2 230.308
正弦波+方波	4 598.869	三角波+锯齿波	3 324.033

2.7 脉冲宽度的影响:固定波形为方波、脉冲次数 120 次、电压 200 V,分别使用 500、600、700、800、

1 000、2 000 μs 脉冲时间进行电致孔试验 2 min, 60 次/min, 共 120 个脉冲, 10 min 取样, 测定青藤碱的质量浓度, 计算青藤碱的累积透过量, 结果见表 3。可以看出, 电致孔脉冲宽度因素对青藤碱累积透过量亦有影响, 并且电致孔脉冲宽度对累积透过量的影响很大, 500 μs 条件下 10 min 末的累积透过量为被动扩散 1 h 末累积透过量的 13 倍, 并且随着脉冲宽度的延长, 累积透过量下降很快, 超过 1 ms 以后累积透过量几乎已经不再增加。根据趋势来看, 如果脉冲时间更短, 累积透过量应该还有增大的趋势, 进一步的实验有待于进行。

表 3 不同脉冲宽度 10 min 末累积透过量

Table 3 Accumulative permeation of sinomenine in various pulse widths at 10 min

脉冲宽度/ μs	累积透过量/ μg	脉冲宽度/ μs	累积透过量/ μg
500	792.250	800	625.522
600	696.575	1 000	33.395
700	698.251	2 000	118.374

2.8 脉冲次数的影响: 固定波形为方波、脉冲宽度 1 ms、电压 200 V, 分别使用 60、120、180、240、300、360、420、480 脉冲次数进行电致孔试验 2 min, 10 min 后取样, 测定青藤碱的质量浓度, 计算青藤碱的累积透过量, 结果见表 4。由结果可知, 电致孔脉冲次数因素对青藤碱累积透过量的影响很大。青藤碱累积透过量没有随着脉冲次数的增加而增加, 而是达到一定的次数之后累积透过量下降。最佳脉冲次数为 240

个脉冲, 该脉冲条件下 10 min 末青藤碱的累积透过量约是被动扩散 1 h 末累积透过量的 91.4 倍。

表 4 不同脉冲次数 10 min 末累积透过量

Table 4 Accumulative permeation of sinomenine in various numbers of pulses at 10 min

脉冲次数/个	累积透过量/ μg	脉冲次数/个	累积透过量/ μg
60	1 049.000	300	4 007.115
120	4 700.993	360	3 490.995
180	4 447.515	420	3 000.000
240	5 220.682	480	2 725.236

3 讨论

电致孔条件下的电学参数因素对青藤碱透皮给药有很大影响, 各种参数影响程度各有不同, 脉冲宽度和脉冲波形影响最大, 脉冲时间和脉冲电压影响次之。本实验初步说明优化的电致孔条件应用于中药透皮给药将会有良好的前景。当然目前只进行了体外实验, 活体动物实验还未进行, 体外实验是否和体内实验密切相关, 还有待于进一步的证实。

References:

- [1] Murthy S N, Sen S A, Hui S. Surfactant-enhanced transdermal delivery by electroporation [J]. *J Controlled Release*, 2004, 98: 307-315.
- [2] Zhang X Z. Penetration of transdermal enhancers on percutaneous permeation of Sinomenine Gels *in vitro* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(10):1115.
- [3] Mao X J. Determination of sinomenine in Bike Granuls by HPLC [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2003, 28 (2): 117.

仙人掌多糖的分离、纯化及性质研究

陶美华^{1,2}, 曾富华^{1,3*}, 章卫民², 梁伊丽¹, 卢向阳³

(1. 湛江师范学院 生物系, 广东 湛江 524048; 2. 广东省微生物研究所, 广东 广州 510070;

3. 湖南农业大学 生物技术系, 湖南 长沙 410128)

摘要:目的 分离、纯化具有降血糖作用的仙人掌多糖组分。方法 经热水提取、乙醇沉淀、DEAE Sepharose fast flow 离子交换色谱和 Sephadex G 系列凝胶过滤色谱纯化得到 5 种仙人掌多糖组分。醋酸纤维薄膜电泳检测多糖纯度, 凝胶色谱测定相对分子质量, 高效液相色谱测定糖的组成。结果 5 种多糖都已达到电泳纯。它们的相对分子质量依次为 2.0×10^3 、 1.0×10^6 、 4.0×10^3 、 9.2×10^5 、 5.0×10^3 。ODP1 由鼠李糖组成, ODP2 可能由鼠李糖和葡萄糖组成, ODP4 可能由鼠李糖和 D-半乳糖组成。ODP3 和 ODP5 分别由鼠李糖和一未知糖组分组成。结论 仙人掌多糖的提取没有必要采用脱蛋白、脱色素步骤, 本实验所提取的仙人掌多糖是均一的。

关键词:仙人掌; 多糖; 纯化; 性质

收稿日期: 2006-03-10

基金项目: 广东省高校自然科学基金资助项目(Z03062); 湛江市科技招标计划项目(湛财企[2004]98号)

作者简介: 陶美华(1978—), 女, 湖南长沙人, 硕士, 从事天然产物开发与利用研究, 现在广东省微生物研究所工作。

Tel: (020)31319860 E-mail: taomeihua@yahoo.com.cn

* 通讯作者 曾富华 Tel: (0759) 3183622 E-mail: zengfuhua@tom.com