

离子的激活作用主要是由于金属离子在酶和底物之间起了桥梁作用,形成酶-金属离子-底物三元复合物,从而更有利于底物和酶活性中心的结合^[6]。实验考察了不同浓度(0.01-0.1 mol/L)金属离子对酶解反应的影响,结果表明不同浓度的钙离子、镁离子及锌离子对酶解反应均略有促进作用,铁离子对酶解反应有显著抑制作用,且随浓度增大抑制作用增强,在反应的过程中,二价铁离子可在受热状态下转化为三价铁离子,而三价铁离子一般对酶有抑制作用^[7],因此表现出对酶解反应的显著抑制作用。本实验未看到金属离子对酶解反应有显著促进作用,原因可能为:(1)与底物的性质有关,淫羊藿苷为黄酮类化合物,与金属离子形成络合物,可能会阻碍酶解反应的进行,这种阻碍作用可能与金属离子对酶解反应的促进作用相抵消。(2)与酶的种类有关,有些酶只需要一种金属离子作为激活剂,有些需要一个以上的金属离子作为激活剂,如 α -淀粉酶需要 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 3种离子作为激活剂^[6],本实验只尝试了某一种离子对酶解反应的影响,需要进一步实

验;另外,纤维素酶是一组十分复杂的混合酶,某些金属离子对一种酶有激活作用,而对另一种酶有抑制作用,这也可能是造成金属离子对酶解反应影响不显著一个因素。酶解反应时间较长,大约需要24~60 h,所以寻找酶解反应促进剂对工业化生产有积极意义。

参考文献:

- [1] 王丽芳,单保恩,刘丽华,等. 香加皮单体成分宝藿苷 I 对食管癌细胞增殖及凋亡的影响[J]. 肿瘤,2009,29(2):123-126.
- [2] Huang J, Yuan L, Wang X, et al. Icaritin and its glycosides enhance osteoblastic, but suppress osteoclastic, differentiation and activity *in vitro* [J]. *Life Sci*, 2007, 81 (10):832-840.
- [3] 刘铁汉,王毅,王本祥,等. 淫羊藿苷的肠菌代谢研究 I 肠内细菌对淫羊藿苷的代谢转化[J]. 中草药,2000,31(11):834-837.
- [4] 王敏,高锦明,王军,等. 苦苣茎叶中总黄酮酶法提取工艺研究[J]. 中草药,2006,37(11):1645-1648.
- [5] 李枫,刘永澹. 宝藿苷- , 和宝藿素的分离和结构研究[J]. 药学学报, 1988,23(10):739-748.
- [6] 陈启民,王金忠,耿运琪. 分子生物学[M]. 天津:南开大学出版社,2001.
- [7] 卢艳花. 天然药物的生物转化[M]. 北京:化学工业出版社,2006.

青藤碱水凝胶贴剂的微针经皮给药的研究

甄小龙,刘婷,杨文婧,程昊,郝保华

(西北大学生命科学学院,陕西西安 710069)

摘要:目的 在微针作用下,考察青藤碱水凝胶贴剂透皮给药的特点与规律。方法 制备不同长度的微针,并制备青藤碱水凝胶贴剂;离体小鼠皮肤经不同针形微针预处理相同时间、相同针形微针预处理不同时间后贴敷青藤碱水凝胶贴剂,用改进的 Franz 扩散池研究青藤碱的透过规律并与未处理皮肤的被动扩散进行比较;高效液相色谱法测定青藤碱的含量。结果 100 μm 微针、200 μm 微针预处理皮肤后青藤碱透皮速率分别是未经微针预处理的 40.7、52.4 倍;200 μm 微针预处理皮肤 7 min 后青藤碱的透皮速率是未经微针预处理的 142.0 倍。200 μm 微针经不同的力预处理后,青藤碱的透皮速率随着力的增大而增大,当力大于 5 N 时透皮速率趋于平衡。结论 微针与水凝胶贴剂结合经皮给药时,透皮速率显著提高,并且微针针形、预处理时间和所受的力对药物的经皮渗透具有重要影响。

关键词:青藤碱水凝胶贴剂;微针;经皮给药;

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2010)06-0892-05

Transdermal drug delivery using microneedle array of sinomenine hydrogel patch

ZHEN Xiao-long, LIU Ting, YANG Wen-jing, CHEN G Hao, HAO Bao-hua

(College of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract: Objective Using the effect of microneedle array to investigate the feature and rule of trans-

收稿日期:2009-05-06

基金项目:陕西省中医管理局科研基金(200725-05);西北大学研究生重点课程建设项目(08YKC25);西北大学研究生创新基金资助项目(08YJC23)

作者简介:甄小龙(1984—),男,甘肃人,西北大学生命科学学院07级硕士研究生,研究方向:中药药剂方向、透皮给药。

E-mail: zhen_xiaolong@126.com

*通讯作者 郝保华 E-mail: baohuah@nwu.edu.cn

dermal drug delivery of sinomenine hydrogel patch. **Methods** The microneedles with different length and sinomenine hydrogel patch were prepared; The isolated rat skin was pretreated by different needle-shapes of microneedle array and different timepoints with the same needle-shape, and then stucked the sinomenine patch. The permeation rates of sinomenine were studied using a Franz diffusion cell and compared with passive diffusion of the rat skin untreated. Sinomenine content was measured by HPLC. **Results** The permeation rates of sinomenine via the skin pretreated with 100 and 200 μm microneedles were 40.7 and 52.4 times to those of the untreated. The permeation rates of sinomenine via the skin pretreated 7 min with 200 μm microneedles is 142.0 times to those of the untreated. When skins were pretreated using 200 μm microneedles with different force, the drug permeation rates were increased with the force increasing. When the force exceeded 5 N, the drug permeation rates were equilibrium. **Conclusion** When transdermal drug delivery by using microneedle array-hydrogel patch, the permeation rates increase significantly. The needle-shape, skin pretreating time, and force of the microneedles play the important roles in the transdermal drug delivery.

Key words: sinomenine hydrogel patch; microneedles; transdermal drug delivery

角质层的阻碍导致大多数药物分子无法通过以及给药量太少,而过于缓慢的释放速度很难达到治疗的目的,为此人们采取了各种措施来破坏角质层以增强皮肤对药物的渗透性。透皮给药系统是20世纪发展起来的第3代制剂。为增加药物的皮肤渗透性,离子导入^[1]、微针^[2]、超声导入^[3]、压力波^[4]、电致孔^[5]、促渗剂等不同的物理化学穿透促进方法被应用到经皮给药中。微针是近年发展的高新学科,概念是利用微机电技术制作的尺寸在微米级,材料可以为硅、聚合物、金属等呈针状的阵列结构。随着微机电系统和材料学的发展,微针作为一种相对较新的经皮给药途径已引起人们越来越多的关注,它不仅能够刺穿上层表皮角质层而创造出允许药物大分子或微粒通过的通道,又不致刺激神经产生疼痛及引起临床意义的损伤。同时水凝胶贴剂这种剂型恰恰能在一定程度上按一定的释药速率长时间释放药物使血药浓度维持在稳定的治疗水平,既可减少药物对肝脏的损伤,又可避免肝脏对药物的破坏。因此微针与水凝胶贴剂相结合能使药物更加安全有效地透过皮肤。目前,关于微针的研究主要集中在药效学及其力学特性上。本实验采用自制的100 μm 微针和200 μm 微针两种不同针形的微针阵列,考察了微针针形、微针预处理皮肤的滞留时间以及微针所受刺入力大小对模型药物青藤碱透皮速率的影响,并对相关机制进行了探讨。

1 材料

岛津高效液相色谱仪(包括一元泵,自动进样器,在线脱气机,柱温箱,SPD-10Avp检测器,2010色谱工作站);79-1型调温恒控磁力搅拌器(江苏

金坛医疗仪器厂)。

青藤碱对照品(质量分数99%,陕西赛德高科生物有限公司);甲醇、乙二胺(色谱纯);部分中和的聚丙烯酸钠(NP700)(美国国际特品公司);PVP K90、甘氨酸铝(上海化学试剂公司);酒石酸(西安化学试剂厂);甘油(天津市红岩华化学试剂厂)。

昆明种小鼠,(20 \pm 2)g,第四军医大学实验动物中心提供。

2 方法与结果

2.1 青藤碱测定方法的建立

2.1.1 色谱条件:Diamondsil C₁₈色谱柱(200 mm \times 4.6 mm,5 μm);流动相为甲醇-水-乙二胺(300:1)(52:48);体积流量1.0 mL/min;检测波长262 nm;柱温25 $^{\circ}\text{C}$;进样量10 μL 。

2.1.2 标准曲线的制备:精密称取在105 $^{\circ}\text{C}$ 干燥至恒重的青藤碱14.28 mg置于100 mL量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀。精密吸取1.0、2.0、4.0、8.0、10.0 mL置于25 mL量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀。按照上述色谱条件进行测定,以青藤碱峰面积纵坐标,质量浓度为横坐标进行线性回归,得回归方程 $A = 15\ 091.96\ C + 31\ 586.52$, $r = 0.999\ 2$,线性范围为5.71~57.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.1.3 精密度试验:精密吸取青藤碱对照品溶液10 μL ,照上述色谱条件测定,重复进样6次,测定其峰面积,RSD为1.06%。

2.1.4 稳定性试验:精密吸取同一份青藤碱对照品溶液于0、2、4、6、8、12 h进样测定,青藤碱峰面积RSD为1.83%($n = 6$)。

2.1.5 回收率的测定:精密称取适量含药基质3

份,加少量水加热溶解,再加 5 mL 甲醇,涡旋 2 min,再以 4 000 r/min,离心 5 min,取上清液稀释后作回收率测定,结果平均回收率为 100.08%,RSD 为 1.26%。

2.2 微针的制作:硅材料具有良好的机电特性和传感特性,故采用电化学刻蚀技术制备硅微针,即先通过离子刻蚀技术制出模具,然后通过浇铸、电镀、离子刻蚀制出硅微针,制备出长度为 100、200 μm 的硅实心微针阵列。见图 1。

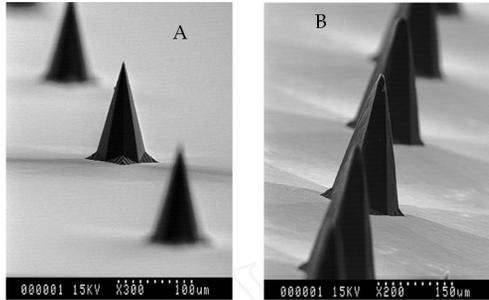


图 1 100 (A) 和 200 μm (B) 微针

Fig. 1 100 (A) and 200 μm (B) microneedles

2.3 青藤碱水凝胶贴剂的制备:准确称取 7 g 甘油,置于干燥的烧杯中,分别加入 1.5 g 部分中和的聚丙烯酸钠、0.07 g 甘氨酸铝、1.1 g 的 PVP k90、0.7 g 青藤碱粉末,分散均匀,作为 A 相。准确称取 0.07 g 酒石酸于 15 g 蒸馏水中溶解,作为 B 相。将 B 相分批加入 A 相中,匀速搅拌 20 min。将上述药膏均匀涂布于无纺布上,静置至凝胶化后盖上保护膜,即得青藤碱水凝胶贴剂。

2.4 皮肤预处理:离体小鼠皮肤的制取:取体重合格的健康小鼠,脱颈处死,剪净腹部的毛,然后剥离此处皮肤,剔除皮下脂肪组织,用双蒸水冲洗干净,当日即用。采用微针预处理离体小鼠皮肤时,保持微针针体与皮肤面垂直,沿微针阵列纵轴线施加压力并持续作用一定时间后移除,处理后的皮肤用于药物体外透皮实验。

2.5 微针用于青藤碱水凝胶贴剂的体外透皮:采用改进的 Franz 扩散装置进行体外透皮实验。已经微针预处理或未处理的小鼠皮肤,覆盖在 Franz 扩散池口,皮肤角质层朝外,有效渗透面积 (S) 为 2.3 cm²。将青藤碱水凝胶贴剂紧密贴敷在小鼠皮上,接收室加满 20 mL 生理盐水,开启电磁搅拌器以 500 r/min 的速度搅拌,恒温水浴 (37 ± 1) °C。于 1、2、3、4、5、6、7、8 h 分别从接受池中取液 0.5 mL (每次取样后均补加等量的生理盐水)。将该样品液连同之前的取样溶液用微孔滤膜 (0.45 μm) 滤过,

HPLC 测定。根据测定结果计算皮肤单位面积的累积渗透量。

$$M_e = CV/A_e$$

式中 M_e 为累积渗透量; A_e 为有效扩散面积; V 为接收室中接收液体积; C 为接收液中药物质量浓度

2.5.1 不同微针针形对药物透皮的影响:对 100 μm 微针、200 μm 微针阵列分别施以 5 N 的力预处理离体小鼠皮肤 3 min,每种针形微针重复处理 3 个皮肤样。将预处理后的皮肤用于青藤碱水凝胶贴剂体外透皮实验,以药物透过未经微针预处理的皮肤作为对照组。结果见图 2。可知,100 μm 微针、200 μm 微针对药物的促渗能力依次增强,它们对应的青藤碱透皮速率分别为 (70.07 ± 3.12)、(90.21 ± 5.27) μg/(cm² · h),显著高于对照组的透皮速率 (1.72 ± 0.085) μg/(cm² · h),2 种微针所引起的药物透皮速率分别为对照的 40.7、52.4 倍。这表明两个不同长度的微针均具有显著的促渗能力,但其促渗能力并无显著差异。

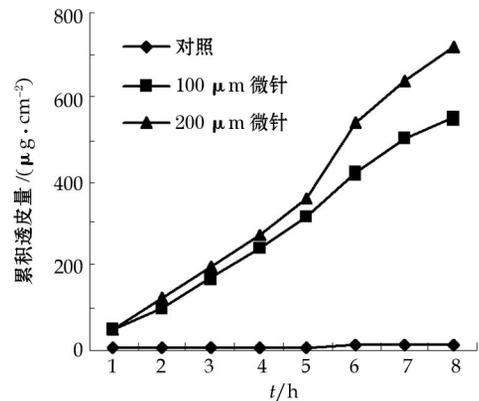


图 2 不同针形微针阵列预处理小鼠皮肤后青藤碱的累积透皮量 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 Cumulative amount of sinomenine transdermal by prefrecting rat skin using different shapas of microneedles ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.5.2 不同滞留时间对微针透皮给药的影响:采用 200 μm 微针阵列分别施以 5 N 的力预处理小鼠皮肤不同时间,每个时间点重复处理 3 个皮肤样。以离体透皮实验评价青藤碱的透皮速率,结果见图 3。可知随着 200 μm 微针对皮肤预处理时间增加,药物的透皮速率也增大。200 μm 微针对皮肤预处理 1、3、5、7 min 所引起的青藤碱的透皮速率分别为 (28.57 ± 1.04)、(90.21 ± 5.27)、(95.05 ± 5.34)、(130.60 ± 5.41) μg/(cm² · h),分别为对照组透皮速率的 16.6、52.4、55.3、142.0 倍。当滞留时间超过 1 min 就能极大地增加累积渗透量,但是当滞留

时间超过 3 min,青藤碱的累积渗透量增加程度不再显著。

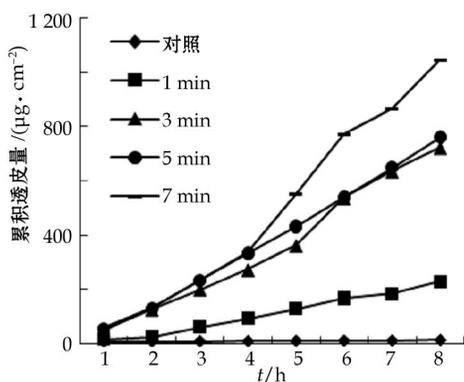


图 3 200 µm 微针预处理小鼠皮肤不同时间后青藤碱的累积透皮量 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 3 Cumulative amount of sinomenine transdermal by pretreating rat skin using 200 µm microneedle with different times ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.5.3 不同刺入力对微针透皮给药的影响:采用 200 µm 微针阵列施以不同大小的刺入力预处理皮肤 3 min,每个刺入力重复处理 3 个皮肤样。以离体透皮实验评价青藤碱的透皮速率,结果见图 4。可知,随着 200 µm 微针对皮肤预处理所施加刺入力的增加,药物的透皮速率也增大,但当压力 > 5 N 时药物透皮速率变化不明显,达到稳定的透皮速率。200 µm 微针对皮肤预处理施加 1、3、5 N 的力所引起的青藤碱的透皮速率分别为 (19.24 ± 0.82)、(49.11 ± 1.39)、(90.21 ± 5.27) µg/(·cm²·h),分别为对照组透皮速率的 11.1、28.6、52.4 倍。

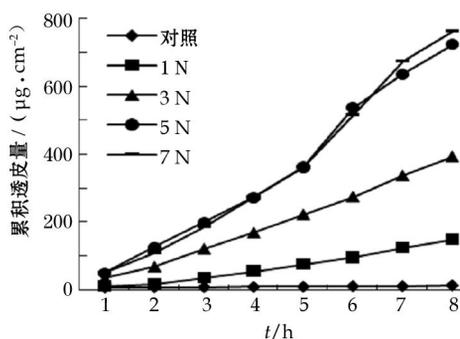


图 4 200 µm 微针施加不同的力预处理皮肤后青藤碱的累积透皮量 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 Cumulative amount of sinomenine transdermal by pretreating rat skin using 200 µm microneedle with different forces ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3 讨论

微针透皮给药的机制,是在很小的面积上,同时覆盖数百根微针刺穿皮肤角质层,打开给药通路,允

许药物通过这个重要的屏障。由本实验结果可知,微针的使用提高了药物的经皮渗透速率。在本实验中所涉及两种微针中,200 µm 微针和 100 µm 具有显著的促渗能力,但其促渗能力并无显著差异。在 1~3 min,微针对皮肤预处理时间越长,药物的渗透速率越大。在 1~5 N,微针对皮肤预处理所加的力越大,药物的渗透速率越大,且在力大于 5 N 的时候药物的渗透速率趋于平稳,说明给予微针 5 N 的力时候,透皮效果最佳。因此由实验可知采用 200 µm 微针以 5 N 的刺入力预处理皮肤且微针的滞留时间为 3 min 时透皮效果最好。

微针的长度对药物的渗透速率并无显著影响。人的正常皮肤包括 3 层组织:角质层、活性表皮层和真皮层,最外层的角质层厚度为 10~40 µm,由致密的角质细胞组成,是药物经皮输送的主要障碍。角质层以下是表皮层,厚度为 50~100 µm,含有活性细胞和少量的神经组织,但没有血管。表皮层以下是真皮层,是皮肤的主要组成部分,含有大量的活细胞、神经组织和血管组织^[6]。由于为了保证高的渗透性,并且在微针刺入时不产生疼痛感,所以微针只需要刺透皮肤角质层,到达角质层,而不能进入真皮层。微针处理皮肤时并非完全能刺入,因为皮肤是一个弹性体,在受力结束后将沿受力方向产生逆向移动,实际刺入的深度将减小,故本次实验中的 200 µm 微针不会刺入真皮层。

微针预处理皮肤的时间对药物的渗透有显著影响,究其原因,应主要与微孔周围皮肤组织的弹性回缩程度有关,微针刺入皮肤后所形成的通路是暂时性的,移去微针后在一定时间内关闭,不至于引起皮肤感染。微针刺入皮肤较长时间再移除,微孔周围皮肤弹性回缩减慢,为药物透过提供了有利的条件。若微针刺入皮肤作用时间较短就移除,则所形成的通路较快关闭,药物渗透速率减小。

微针预处理皮肤所施加力的大小对药物的渗透也有显著影响。当施加的力较小时,不足以刺透角质层或刺入的深度比较浅,微针所形成的孔径和深度相对较小,从而药物渗透速率较小。只有微针受到足够的力时候,才能使所形成的孔径和深度达到最大,但当施加的力达到一定程度后,药物的渗透速率达到平衡。

总之,微针用于经皮给药时,针形、对皮肤的预处理时间和微针所受的力是影响药物渗透的 3 个重要因素,此三者的差异对药物的渗透速率均具有显著影响。

参考文献:

[1] Kalia Y N, Naik A, Garrison J, et al. Iontophoretic drug delivery [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004, 56(5): 619-658.

[2] Prausnitz M R. Microneedles for transdermal drug delivery [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004, 56(5): 581-587.

[3] Mitragotri S, Kost J. Low-frequency sonophoresis: a review [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004, 56(5): 589-601.

[4] Doukas A G, Kollias N. Transdermal drug delivery with a pressure wave [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004, 56(5): 559-579.

[5] 李凡, 郝保华, 李伟泽, 等. 电致孔条件下巴布剂中青藤碱透皮吸收的药动学研究[J]. *中草药*, 2008, 29(9): 1096.

[6] 姜建芳, 高建青. 微针在经皮给药及经皮疫苗转运中的应用[J]. *医药导报*, 2006, 25(10): 1083.

大孔吸附树脂法对固公果根中鞣质的吸附解吸研究

朱珊^{1,2}, 刘岱琳¹, 王淑萍¹, 邱峰², 陈虹¹

(1. 中国人民武装警察部队医学院 生药教研室, 天津市职业与环境危害生物标志物重点实验室 天津 300162;

2. 沈阳药科大学中药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要:目的 探讨大孔吸附树脂富集、纯化固公果中总鞣质的工艺条件参数。方法 比较了 8 种大孔吸附树脂的静态吸附量、静态解吸率, 筛选出最佳的吸附树脂。以静态、动态吸附实验相结合, 确定了最佳的吸附分离工艺。采用干酪素法进行鞣质的测定。结果 在考察的 8 种树脂中, HP20 型树脂具有最佳的吸附参数, 并确定了工艺条件。结论 本实验筛选出 HP20 型树脂对固公果根中总鞣质类成分吸附解吸性能较好。

关键词: 固公果根; 鞣质; 大孔吸附树脂; 干酪素法

中图分类号: R284.2; R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)06-0896-05

Adsorption and desorption of total tannins from root of *Rosa odorata* var. *gigantea* by macroporous resin

ZHU Shan^{1,2}, LIU Dai-lin¹, WANG Shu-ping¹, QIU Feng², CHEN Hong¹

(1. Department of Pharmacognosy, Medical College of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin Key Laboratory of Biomarkers of Occupational and Environmental Hazard, Tianjin 300162, China; 2. School of Chinese

Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: Objective To study the technological parameters in the purification process of total tannins from the root of *Rosa odorata* var. *gigantea* by macroporous resin. **Methods** Using adsorptive quantity as the guideline, the adsorptive capabilities and static desorption ratio of eight kinds of resins were compared, and the optimum macroporous resins were selected. The influence factors of total tannins purification from the root of *R. odorata* var. *gigantea* with the optimum macroporous resin were tested and screened by the adsorption and desorption ratio of total tannins. The content of tannins was determined by casein method. **Results** The HP20 type macroporous resin had the optimum adsorption and desorption parameters, and the optimum purification conditions were determined. **Conclusion** The HP20 type macroporous resin shows better comprehensive property and could be used to isolate and purify the total tannins from the root of *R. odorata* var. *gigantea*.

Key words: the root of *Rosa odorata* Sweet var. *gigantea* (Coll. et Hemsl.) Rehd. et Wils.; tannins; macroporous adsorption resin; casein method

固公果根是彝族民间用药,为蔷薇科植物固公果 *Rosa odorata* Sweet var. *gigantea* (Coll. et

Hemsl.) Rehd. et Wils. 的根入药。固公果根性平、味酸,具有涩肠止泻的功效,常用于治疗腹泻、菌

收稿日期: 2010-01-08

基金项目: 天津市应用基础及前沿技术研究计划项目(10JC YBJ C14600); 武警医学院博士启动金项目(WBS200804)

作者简介: 朱珊(1983—),女(满族),辽宁兴城人,沈阳药科大学硕士在读,研究方向为天然药物化学。

*通讯作者 刘岱琳 Tel: (022)60578194 E-mail: daiilinch@163.com