

秋水仙碱微乳的制备及体外经皮渗透研究

刘璇^{1,2}, 张振海¹, 陈彦^{1,2*}, 丁安伟^{2*}, 杜萌^{1,2}, 贾晓斌^{1,2}

1. 国家中医药管理局中药释药系统重点研究室, 江苏省中医药研究院中药新型给药系统重点实验室, 江苏 南京 210028

2. 南京中医药大学 江苏省方剂高技术研究重点实验室, 江苏 南京 210046

摘要: **目的** 制备水包油型秋水仙碱微乳, 并对其理化性质及体外经皮渗透性能进行考察。**方法** 以秋水仙碱、聚山梨醇酯、异丙醇、油酸和蒸馏水为主要成分, 制备秋水仙碱微乳, 考察其外观形态、粒径大小及分布。采用改良的 Franz 扩散池考察秋水仙碱微乳的体外透皮过程, HPLC 法测定秋水仙碱。**结果** 制得的秋水仙碱微乳为淡黄色透明液体, 平均粒径 60.2 nm, 外观圆整均匀, 渗透效果依次为水溶液 < 微乳 < 促渗剂氮酮, 其中氮酮 7 h 即达到释药平台期, 微乳在 12 h 才接近平台期。**结论** 制备的水包油型秋水仙碱微乳具有良好的透皮效果, 且较透皮促渗剂氮酮来说能够缓释药物, 为秋水仙碱的新型透皮给药系统提供前期研究基础。

关键词: 秋水仙碱; 微乳; 经皮渗透; 氮酮; HPLC; 缓释

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)10-1963-05

Preparation of colchicine microemulsion and its transdermal permeation *in vitro*

LIU Xuan^{1,2}, ZHANG Zhen-hai¹, CHEN Yan^{1,2}, DING An-wei², DU Meng^{1,2}, JIA Xiao-bin^{1,2}

1. Key Laboratory of New Drug Delivery System of Chinese Meteria Medica, Jiangsu Provincial Academy of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

2. Jiangsu Key Laboratory for High Technology Research of TCM Formulae, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China

Abstract: Objective To prepare oil in water (O/W) microemulsion and investigate its *in vitro* transdermal permeation ability.

Methods The O/W microemulsion was prepared with the formulation containing colchicine, polysorbate, isopropyl alcohol, oleic acid, and deionized water. The morphology and grain size distribution of microemulsion were studied. Using Franz cell to investigate the transdermal process of colchicine microemulsion. The content of colchicine was measured by HPLC. **Results** The microemulsion was transparent liquid in light yellow and its grains were round with mean grain size at 60.2 nm in diameter. Permeation sequence was aqueous solution < microemulsion < penetration enhancers, azone. Azone reached the drug delivery level in 7 h and microemulsion was in 12 h. **Conclusion** Microemulsion has good transdermal penetration which could release drugs slower than transdermal penetration enhancers, azone. This could provide the basis for preliminary studies of a new transdermal delivery system of colchicine.

Key words: colchicine; microemulsion; transdermal delivery; azone; HPLC; release

秋水仙碱 (colchicine) 一直以来被作为急性痛风性关节炎的首选药物^[1-2]。由于秋水仙碱的毒性很大, 将其制备成透皮制剂局部给药, 可以使患者局部达到较高的药物浓度, 有利于局部治疗作用的发挥, 同时可避免口服引起的严重胃肠道反应和肝、肾功能损害等。微乳是一种外观透明、各向同性、能够自发形成、粒径小于 100 nm 的热

力学稳定体系。其作为透皮给药载体具备很多独特的优势, 如含有表面活性剂, 可以显著增加脂溶性药物的溶解度, 从而增大药物在皮肤上的浓度梯度, 增加角质层脂质双层的流动性, 提高药物的透皮能力等^[3-8]。目前微乳透皮制剂引起了透皮给药载体领域的广泛关注和研究, 但仍未见有关秋水仙碱微乳透皮体系的报道, 因此本研究制

收稿日期: 2011-01-13

基金项目: 江苏省中医药领军人才项目 (LJ200913)

作者简介: 刘璇 (1987—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药制剂学。Tel: 13913033850 E-mail: liu_xuan1987@163.com

*通讯作者 陈彦 Tel/Fax: (025)85637809 E-mail: yanchen202@hotmail.com

丁安伟 Tel: (025)85811523 E-mail: awding105@163.com

备秋水仙碱微乳透皮给药系统, 比较其与常规促渗剂氮酮的透皮特性。

1 仪器与材料

Agilent 1100 高效液相色谱仪, 包括柱温箱、在线脱气机、四元泵及二极管阵列检测器 (美国 Agilent 公司), TP—3 药物透皮扩散试验仪 (南京新联电子有限公司), Tecnai—12 型透射电子显微镜 (Philips 公司, 荷兰), Nano—ZS 型马尔文粒径测定仪 (英国马尔文公司)。秋水仙碱对照品 (质量分数 >98%, 批号 20091103, 贵州迪大科翔生物有限公司); 聚山梨醇酯 (批号 20100406)、油酸 (批号 10091226) 成都市科龙化工试剂厂提供, 异丙醇 (批号 200906222)、氮酮 (国药集团化学试剂有限公司), 其余试剂均为色谱纯或分析纯。

雄性昆明种小鼠, 体质量 (22±2) g, 购于上海斯莱克实验动物有限责任公司, 许可证号: SCXK (沪) 20070005。

2 方法和结果

2.1 秋水仙碱微乳的制备

2.1.1 伪三元相图的绘制 伪三元相图是进行处方筛选的重要依据。选择聚山梨醇酯为表面活性剂, 异丙醇为助表面活性剂, 油酸为油相, 蒸馏水为水相。表面活性剂和助表面活性剂的质量比 (K_m 值) 分别为 2:1、1:1、1:2 时, 按一定质量比精密称取表面活性剂和助表面活性剂异丙醇, 混合均匀制成混合表面活性剂。按质量比为 9:1、8:2、7:3、6:4、5:5、4:6、3:7、2:8、1:9 精密称取定量的油相和混合表面活性剂, 在室温、磁力搅拌下滴加水, 直至形成澄清透明的微乳。当外观不再澄清时, 记录临界加水量。按油、水、混合表面活性剂在临界点的质量百分比, 在伪三元相图中绘制曲线, 确定微乳区, 见图 1。

2.1.2 秋水仙碱微乳的制备 最终载药处方取 300 mg 聚山梨醇酯、600 mg 异丙醇、40 mg 油酸、45 mg

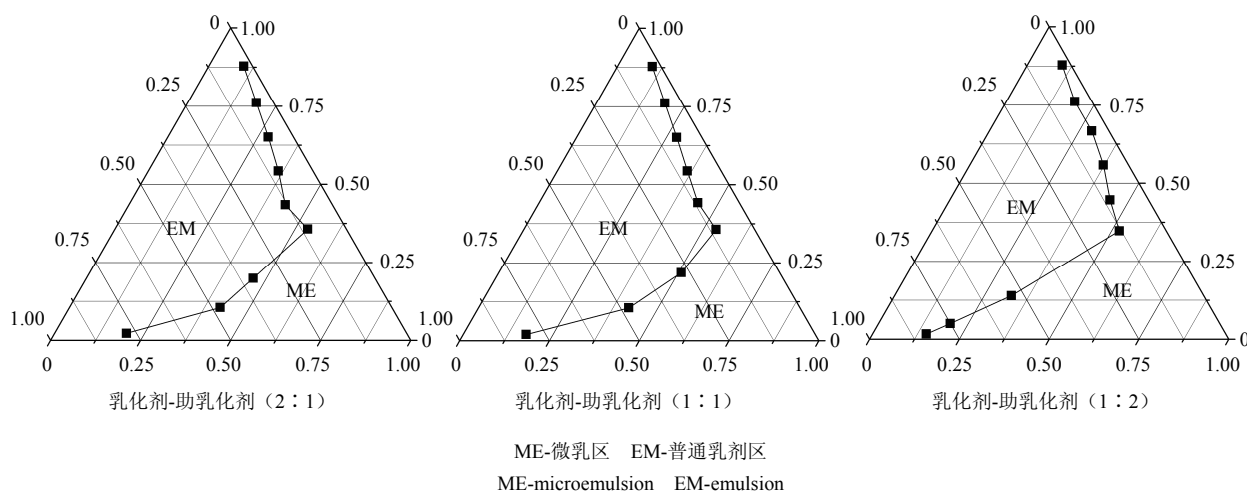


图1 微乳体系的伪三元相图

Fig. 1 Pseudo-ternary phase diagrams of microemulsion system

秋水仙碱, 在室温、磁力搅拌下滴加 8 mL 水, 制成含药量 0.5% 的秋水仙碱微乳, 备用。

2.2 微乳的理化性质和表征

2.2.1 粒径的考察 采用马尔文激光散射粒度测定仪, 在 20 °C 下测定秋水仙碱微乳的粒径。光散射度为 90°, 平均粒径为 60.2 nm, 多分散指数为 0.229。

2.2.2 微乳的稳定性 取适量秋水仙碱微乳于离心试管中, 以 13 000 r/min 离心 30 min。微乳澄清透明, 不分层。秋水仙碱微乳在 5 °C 和 40 °C 的条件下保存 3 个月后, 未见分层、絮凝、破坏现象, 含药量也无明显改变, 表明秋水仙碱微乳很稳定。

2.2.3 微乳的微观形态 将载有 Formvar 支持膜的铜网置于蜡板上, 在膜上分别滴加空白微乳和含药微乳液各 1 滴, 自然晾干 30 min, 再滴加 2% 磷钨酸 1 滴, 自然晾干 10 min, 用滤纸吸走多余的液体, 置于 Tecnai—12 型透射电子显微镜下观察微乳的形态。见图 2。

2.3 秋水仙碱的测定

2.3.1 色谱条件 色谱柱为 Zorbax SB-C₁₈ 柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈 (A)-水 (B), 梯度洗脱程序: 0~5 min, 20%~30% A; 5~7 min, 30%~40% A; 7~10 min, 40%~50% A; 体积流量

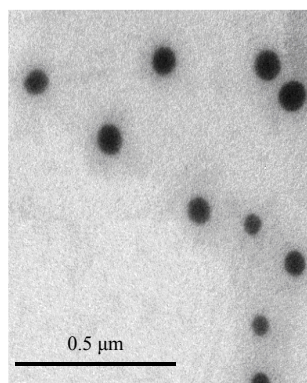


图2 秋水仙碱微乳电镜图片

Fig. 2 TEM photograph of colchicine-loaded microemulsion

0.8 mL/min, 检测波长 243 nm, 柱温 25 °C, 进样量 20 μL。在此色谱条件下, 秋水仙碱的保留时间约为 8.7 min。

2.3.2 线性关系考察 精密称取秋水仙碱对照品 2.50 mg, 置 50 mL 棕色量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度, 制成 50 μg/mL 储备液。精密量取储备液 10、40、80、120、160、400、500 μL 分置于 7 个

1 mL 棕色量瓶中, 用甲醇稀释定容至刻度, 得秋水仙碱对照品溶液。按“2.3.1”项下方法测定, 绘制标准曲线, 得回归方程: $Y=101.99X+9.6975$, $r=0.9996$, 表明秋水仙碱在 0.50~25.00 μg/mL 峰面积与质量浓度呈良好的线性关系。

2.3.3 溶液的配制

(1) 空白体系溶液的配制 精密量取不含秋水仙碱的空白微乳制剂 1 mL 于 10 mL 量瓶中, 加 5 mL 甲醇破乳, 用甲醇稀释至刻度, 超声 10 min, 再取 0.5 mL 破乳液于 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 即得空白体系溶液。

(2) 供试品溶液的配制 精密量取含 0.5%秋水仙碱的微乳 1 mL 于 10 mL 量瓶中, 加 5 mL 甲醇破乳, 用甲醇稀释至刻度, 超声 10 min, 再取 0.5 mL 破乳液于 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 即得供试品溶液。

上述溶液分别进样 20 μL, 将所得谱图进行比较, 见图 3。

2.3.4 精密度试验 取微乳样品, 按样品溶液的处理

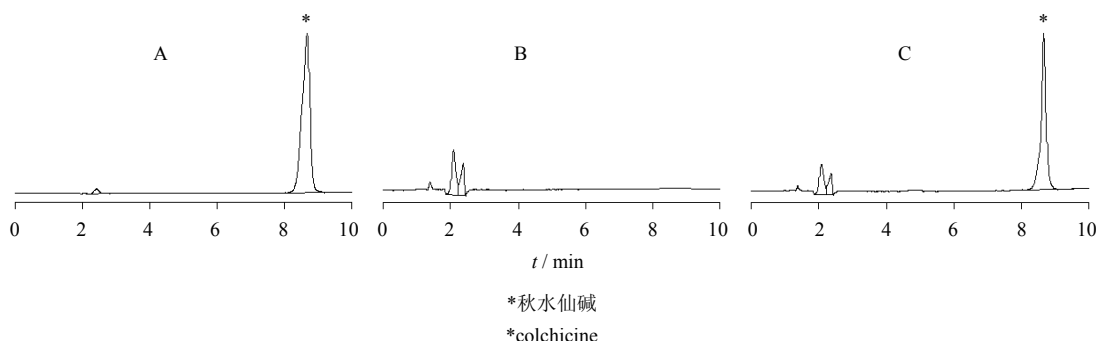


图3 对照品(A)、空白微乳(B)和秋水仙碱微乳(C)的HPLC色谱图

Fig. 3 HPLC chromatograms of reference substance (A), blank microemulsion (B), and colchicine-loaded microemulsion (C)

理方法制备成待测液后, 按“2.3.1”项下方法, 日内进样 6 次, 其 RSD 值为 0.34%; 日间连续 6 d 进样, 其 RSD 值为 0.93%。

2.3.5 重现性试验 取同一微乳样品 6 份, 按样品溶液的处理方法制备成待测液后, 按“2.3.1”项下方法测定, 其 RSD 值为 0.39%。

2.3.6 稳定性试验 取微乳样品, 按样品溶液的处理方法制备成待测液后, 按“2.3.1”项下方法, 在 0、2、4、6、8、12 h 进样, RSD 值为 0.69%, 表明秋水仙碱在 12 h 内稳定性良好。

2.3.7 回收率试验 分别精密称取秋水仙碱 15、30、45 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加入处方量的空白微乳, 用甲醇使其全部溶解并定容至刻度, 超声 10

min, 再精密量取 0.5 mL 破乳液于 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 进样测定, 计算回收率, 回收率分别为 (99.3±0.1)%、(100.9±0.5)%、(103.8±0.2)%, RSD 分别为 0.54%、0.75%、0.92%。

2.4 微乳与水溶液及 3%氮酮溶液的体外透皮比较

2.4.1 离体小鼠皮肤的制备 取健康雄性小鼠, 用小剪刀剪毛, 然后用电动剃须刀剃毛。剥离腹部皮肤, 用脱脂棉球沾生理盐水擦去皮下脂肪组织和结缔组织, 用蒸馏水和生理盐水冲洗干净, 置生理盐水中于 4 °C 冷冻保存待用, 1 周内用完。

2.4.2 秋水仙碱水溶液和秋水仙碱 3%氮酮溶液的制备 精密称取 5.0 mg 秋水仙碱, 溶解于 1 mL 蒸馏水中, 得到秋水仙碱水溶液, 备用。精密称取 5.0

mg 秋水仙碱, 溶解于 1 mL 蒸馏水中, 再向其中加入 30 μL 的氮酮, 得秋水仙碱 3% 氮酮溶液, 备用。

2.4.3 体外渗透试验 采用 TP—3 透皮扩散仪在 $(32 \pm 5)^\circ\text{C}$ 下进行透皮试验, 皮肤固定在供给室和接收室之间, 皮肤表皮层面向供给室, 扩散池的有效渗透面积 (S) 为 2.009 cm^2 , 接收液为生理盐水, 接收室体积为 20 mL。将 1 mL 的秋水仙碱微乳、1 mL 秋水仙碱水溶液、1 mL 的秋水仙碱 3% 氮酮溶液分别缓慢加入到供给室中的皮肤表面, 开启电磁搅拌器以 100 r/min 的速度搅拌。于 1、2、3、4、5、6、7、8、10、12 h 取出接收液 1 mL (每次取样后均补加等量的生理盐水)。将取得的样品离心后, 取上清液进样 20 μL , 用 HPLC 法测定秋水仙碱的量。

2.4.4 数据处理 累积渗透量 (Q) 按下面公式计算。

$$Q = [C_n \times V + \sum_{i=1}^{n-1} C_i \times 1.0] / S$$

V 为接收室中接收液体积 (20 mL), C_i 为第 i 次取样时接收液中秋水仙碱质量浓度, C_n 为该次取样时接收液中秋水仙碱质量浓度

以秋水仙碱的 Q 对渗透时间 (t) 进行线性回归, 所得方程即为渗透动力学方程^[9], 所得斜率即为秋水仙碱的透皮速率常数 (J_s , $\mu\text{g} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$), 结果见表 1。直线与 X 轴的交点为滞后时间 t_{lag} (h)。透皮曲线见图 4。表 1 显示微乳的 t_{lag} 比水溶液短, 比 3% 氮酮溶液长, 微乳的 J_s 比水溶液大, 比 3% 氮酮溶液小。图 4 表明, 3% 氮酮促渗效果最好, 但很快就达到了释药平台期, 而微乳的渗透效果明显比水溶液的好并且能够以一定的速率持续释放。

表 1 渗透动力学方程及渗透参数

Table 1 Permeation kinetics equation and permeability parameters

供试液	$Q / (\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2})$	渗透动力学方程	r	$J_s / (\mu\text{g} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2})$	$t_{\text{lag}} / \text{h}$
水溶液	73.337 ± 1.312	$Q = 7.702 t - 12.597$	0.990 2	7.702	1.636
微乳	190.872 ± 3.154	$Q = 21.857 t - 20.331$	0.994 5	21.857	0.930
3% 氮酮	270.690 ± 5.826	$Q = 35.997 t - 16.972$	0.988 5	35.997	0.471

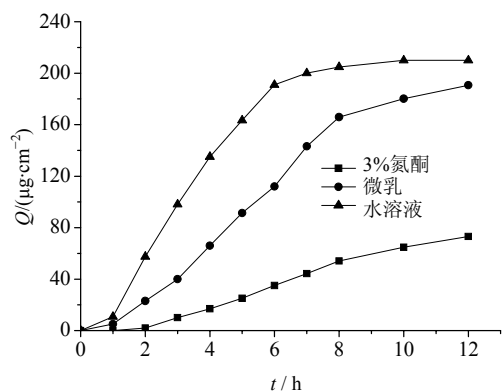


图 4 体外透皮曲线

Fig. 4 In vitro permeation curves

3 讨论

乳化剂是微乳剂的关键组分, 聚山梨醇酯对皮肤和黏膜的刺激性小、溶血性小^[10], 被选为微乳体系的表面活性剂。异丙醇毒性和刺激性较小, 能溶胀和提取角质层中的类脂, 增加药物的溶解度, 改变角质层的通透性, 减低药物经皮渗透的阻力, 从而提高药物的透皮吸收率, 被选作助表面活性剂。油酸在透皮制剂中应用广泛, 可以作为穿透促进剂, 预实验考察了秋水仙碱在油酸、肉豆蔻酸异丙酯、油酸乙酯的溶解度, 结果秋水仙碱在三者溶解度大

小依次为: 油酸 > 肉豆蔻酸异丙酯 > 油酸乙酯, 因此选择了油酸作为油相。在做微乳伪三元相图时, 考察了 K_m 值分别为 2:1、1:1、1:2 的三元相图, 其中 $K_m=1:2$ 时, 微乳区域最大, 因此处方的 K_m 选择 1:2。文献报道 1%~5% 氮酮作为促渗剂促渗效果较好^[11-13], 预试验中 1%~2% 氮酮的促渗效果不明显, 3%~5% 的氮酮促渗效果较好, 考虑到氮酮具有一定的皮肤刺激性, 因此选用了 3% 氮酮作为对比。

实验结果表明, (1) 秋水仙碱微乳具有促吸收的作用。渗透效果依次为水溶液 < 微乳 < 促渗剂氮酮, 秋水仙碱微乳较水溶液的透皮优势显著, 其 12 h 的 Q 是秋水仙碱水溶液体系的 2.6 倍。(2) 秋水仙碱微乳具有缓释的作用。促渗剂氮酮的促渗效果很好, 在 7 h 即到达释药平台期, 微乳在 12 h 才接近释药平台期。(3) 微乳体系可以起到药物储库的作用。作用机制可能是微乳体系中的油滴对药物具有储存的作用, 促进了秋水仙碱的透皮吸收, 并且显示出持续、延时的转运特点, 延长了秋水仙碱的作用时间。微乳体系适合秋水仙碱这种毒性大的药物的释放, 避免药物在体内聚集, 能够达到长效低毒的效果。

参考文献

- [1] 李军霞. 风湿病的现代诊断与治疗 [M]. 北京: 中国医药科技出版, 2001.
- [2] 何红平, 刘复初. 秋水仙碱的研究进展 [J]. 中草药, 1998, 29(10): 712-714.
- [3] 张晓峰, 韦 玮, 陆皞然, 等. 自微乳化释药系统 (SMEDDS) 的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2009, 24(5): 261-264.
- [4] 赵永哲, 胡晋红, 刘继勇. 透皮给药载体微乳的研究进展 [J]. 中国药学杂志, 2008, 43(24): 1841-1844.
- [5] 吴晓辉, 刘玉玲. 微乳作为经皮给药载体的研究进展 [J]. 中国药学杂志, 2006, 41(22): 1681-1685.
- [6] 熊 阳, 张 悦. 丹参酮 II_A 自微乳化给药系统的研究 [J]. 中草药, 2010, 41(4): 559-564.
- [7] Biruss B, Kählig H, Valenta C. Evaluation of an eucalyptus oil containing topical drug delivery system for selected steroid hormones [J]. *Int J Pharm*, 2007, 328(2): 142-151.
- [8] Yilmaz E, Borchert H H. Effect of lipid-containing, positively charged nanoemulsions on skin hydration, elasticity and erythema—an *in vivo* study [J]. *Int J Pharm*, 2006, 307(2): 232-238.
- [9] 王 丽, 郑 妮, 方 亮, 等. 渗透促进剂对芦荟提取物中胡椒碱体外经皮吸收的影响 [J]. 沈阳药科大学学报, 2010, 27(1): 20-22.
- [10] Chen H B, Mou D S, Du D R, *et al.* Hydrogel-thickened microemulsion for topical administration of drug molecule at an extremely low concentration [J]. *Int J Pharm*, 2007, 341(1/2): 78-84.
- [11] 符棘玉, 周本宏, 陈 明, 等. 氮酮对布洛芬乳膏体外透皮吸收的影响 [J]. 湖北中医学院学报, 2010, 12(4): 45-47.
- [12] 林桂涛, 刘 新. 氮酮对痹舒巴布剂体外透皮吸收影响的研究 [J]. 山东中医药大学学报, 2007, 31(4): 327-328.
- [13] 张先洲, 周 健, 何 文, 等. 促透剂对青藤碱凝胶经皮渗透作用的研究 [J]. 中草药, 2004, 35(10): 1115-1117.

《中草药》杂志最新佳绩

《中国科技期刊引证报告》2010 年 11 月 26 日发布:《中草药》杂志 2009 年总被引频次 5 631, 名列我国科技期刊第 16 名, 中医中药类期刊第 1 名; 影响因子 0.627, 基金论文比 0.620, 他引率 0.890, 权威因子 2 202.980; 连续 6 年 (2005—2010 年) 荣获“百种中国杰出学术期刊”称号。

《中草药》杂志 2009 年 12 月荣获“新中国 60 年有影响力的期刊”, 执行主编陈常青研究员荣获“新中国 60 年有影响力的期刊人”。

《中草药》杂志荣获第二届中国出版政府奖 (中国出版政府奖是中国出版界的最高奖, 此次评选是在全国约 5 000 种科技期刊中评选出前 10 名为中国出版政府奖, 11~30 名为中国出版政府奖提名奖), 2011 年 3 月 18 日于北京举行盛大的颁奖典礼。

水 油 水 油 水 油 水 油 水 油