

麻黄碱壳聚糖修饰脂质体凝胶剂的制备及体外透皮研究

仲 博, 张 岭, 张 莉*, 王嘉欢, 陈 莉

武警后勤学院 药剂学教研室, 天津 300162

摘要: 目的 制备麻黄碱壳聚糖修饰脂质体凝胶剂, 考察其粒径分布、包封率及体外透皮特性。方法 采用薄膜蒸发法制备麻黄碱脂质体混悬液, 在麻黄碱脂质体混悬液中缓慢滴加 pH 值为 5~6 的 0.35% 壳聚糖溶液, 制成麻黄碱壳聚糖修饰脂质体凝胶剂。激光粒度仪测定修饰脂质体的粒径分布, 反渗透法测定包封率, Franz 扩散装置考察其体外透皮特性。结果 麻黄碱壳聚糖修饰脂质体的平均粒径在 1 400~1 900 nm; 平均包封率达 $(41 \pm 0.94)\%$; 修饰脂质体中麻黄碱能缓慢透过大鼠皮肤, 与普通剂型相比累积透过量随时间变化差异较明显, 缓释效果显著。结论 该制剂制备工艺简单, 性质稳定, 药物包封率较高, 定量测定方法简便、准确; 药物透皮速率缓慢, 释药稳定。

关键词: 麻黄碱; 壳聚糖修饰脂质体; 凝胶剂; 薄膜蒸发法; 透皮特性; 缓释

中图分类号: R283.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2012)01-0070-04

Preparation and *in vitro* transdermal diffusion characteristics of ephedrine chitosan-modified liposomes gels

ZHONG Bo, ZHANG Ling, ZHANG Li, WANG Jia-huan, CHEN Li

Department of Pharmacy, Logistic College of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162, China

Abstract: **Objective** To prepare the ephedrine chitosan-modified liposomes gels, detect the particle diameter and the entrapment efficiency, and investigate the transdermal diffusion characteristics *in vitro*. **Methods** Ephedrine liposomes suspensions were prepared using thin film evaporation and slowly dropped by 0.35% chitosan solution with pH values 5—6 in order to prepare the chitosan-modified liposomes gels. The particle diameter of the modified liposomes was detected by Laser Scattering Particle Size Distribution Analyzer. The entrapment efficiency was determined by reverse dialysis method with HPLC. Using Franz Diffusion Cell to investigate transdermal diffusion characteristics of the modified liposomes gels *in vitro*. **Results** The mean particle diameter of the modified liposome prepared was from 1 400 to 1 900 nm. The average entrapment efficiency of the modified liposomes was up to $(41 \pm 0.94)\%$. Ephedrine in the modified liposomes could penetrate rat skin. The results of the transdermal diffusion test showed the cumulative penetration amount of the ephedrine chitosan-modified liposomes gels was lower than that in the ephedrine solutions with time variation. **Conclusion** This preparation is prepared with simple technology and stable character. The entrapment efficiency of the ephedrine is higher and the assay method is simple and accurate. The penetrating rate of ephedrine is slow and the drug releasing is stable.

Key words: ephedrine; chitosan-modified liposomes; gels; thin-film evaporation; transdermal characteristics; slow release

麻黄碱是麻黄科植物草麻黄 *Ephedra sinica* Stapf、中麻黄 *E. intermedia* Schrenk et C. A. Mey.、木贼麻黄 *E. equisetina* Bunge 的干燥草质茎中的主要活性成分, 具有松弛平滑肌、收缩血管、抗炎及中枢兴奋、抗菌、抗病毒等多种药理作用^[1-4]。使用传统溶液剂有轻微烧灼感和干燥感, 还会引起头痛、头晕、心率加快等不良反应, 而长期使用更会因麻

黄碱全身吸收, 导致心悸、焦虑不安、失眠等。

脂质体 (liposome) 用做经皮给药或腔道给药载体时, 可明显提高药物的稳定性, 提高难溶性药物的生物利用度, 降低全身性不良反应, 并具有缓控释作用^[5-8]。进一步用壳聚糖 (chitosan) 包覆脂质体, 阳离子型的壳聚糖与阴离子脂质体发生电荷作用, 使分子镶嵌在脂质体的表面, 形成壳聚糖脂

收稿日期: 2011-05-24

基金项目: 武警部队资助项目 (WYD-2006-18)

作者简介: 仲 博 (1985—), 男, 黑龙江省齐齐哈尔市人, 硕士研究生, 主要从事药物新制剂的研究与开发。

Tel/Fax: (022)60578196 E-mail: tjwjzb@yahoo.com.cn

*通讯作者 张 莉 Tel/Fax: (022)60578196 13612099282 E-mail: zhli62tianjin@yahoo.com.cn

质体复合物,可显著提高脂质体的稳定性和药物的生物利用度^[9-11]。本实验采用薄膜蒸发法制备麻黄碱壳聚糖修饰脂质体凝胶剂,并考察该制剂的长效缓释特性,从而避免麻黄碱普通溶液剂的不良反应及全身作用,也为其他壳聚糖修饰制剂的开发提供借鉴。

1 仪器与材料

Buchir—124 旋转蒸发仪(瑞士 Buchi 公司);TK—6A 型 Franz 扩散池(上海德华实业有限公司);Motic B series 生物显微镜(麦克奥迪实业集团有限公司);Motic Images Advanced 3.2 成像系统(Motic China Group Co., Ltd.);XSZ—H7 偏光显微镜(上海长方光学仪器有限公司);M75 型电子天平(百万分之一,瑞士梅特勒);Zetasizer HS3000 激光粒度仪(英国马尔文公司);Waters 高效液相色谱仪(1525Binary 泵、2996PAD 检测器、Empower 色谱工作站,美国 Waters 公司)。

麻黄碱(批号 990303,质量分数为 95%,北京中顺制药厂分装);大豆卵磷脂(SL,批号 20060418,北京奥博星生物技术有限责任公司);胆固醇(分析纯,上海化学试剂公司);壳聚糖(批号 020611,南京旋光科技有限公司);无水乙醇(分析纯,天津化学试剂有限公司);其余试剂均为分析纯。

雄性 Wistar 大鼠,鼠龄 3~4 个月,体质量 150~250 g,清洁级。由军事医学科学院实验动物中心提供,许可证号:SCXK-(军)2002-001。

2 方法与结果

2.1 麻黄碱壳聚糖修饰脂质体的制备

2.1.1 0.2%麻黄碱脂质体的制备 将质量比为 2:1 的卵磷脂和胆固醇共 0.45 g 溶解在 5 mL 无水乙醇中,在 70 °C 恒温水浴条件下摇动烧杯,蒸发除去乙醇。加入 0.1 g 麻黄碱和 50 mL 70 °C 的 PBS (pH 6.8) 缓冲液,70 °C 恒温水浴搅拌水化 10 min,随后室温磁力搅拌分散 1 h,得麻黄碱脂质体分散液。

2.1.2 0.2%麻黄碱壳聚糖修饰脂质体凝胶的制备 按“2.1.1”项方法制备脂质体分散液,随即向 4 mL 分散液中缓慢滴加 pH 值为 5~6 的 0.35%壳聚糖溶液 12 mL,室温搅拌 10~15 min,即得麻黄碱壳聚糖修饰脂质体凝胶。

2.2 麻黄碱的测定

2.2.1 HPLC 色谱条件^[12] 色谱柱为 Shim-pack VP-ODS 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-0.02 mol/L KH₂PO₄ 水溶液(2:3),柱温 35

°C,体积流量 1 mL/min,检测波长 257 nm,进样量 10 μL。

2.2.2 线性关系考察 精密称取盐酸麻黄碱 10.0 mg, PBS (pH 6.8) 缓冲液溶解并定容至 10 mL,摇匀;分别吸取 0.01、0.02、0.05、0.1、0.5、1.0 mL 置 10 mL 量瓶中, PBS 缓冲液稀释至刻度,摇匀,得到 1.0~100.0 μg/mL 的系列麻黄碱对照品溶液,进行 HPLC 检测。以色谱峰峰面积对麻黄碱质量浓度进行线性回归,得回归方程 $Y=476.19X+1170.48$, $r=0.9997$,表明麻黄碱在 1.0~100.0 μg/mL 峰面积与质量浓度线性关系良好。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密称取壳聚糖 350.0 mg,用 PBS (pH 6.8) 缓冲液溶解至 100 mL,得到 0.35%壳聚糖溶液。

精密称取盐酸麻黄碱 10.0 mg, PBS (pH 6.8) 缓冲液溶解并定容至 10 mL,摇匀,再取出 0.05 mL,置 10 mL 量瓶中稀释至刻度,摇匀,得到 50.0 μg/mL 麻黄碱溶液。

取按“2.1.2”项方法制备的麻黄碱壳聚糖修饰脂质体凝胶,用 5% Triton X-100 乙醇溶液破碎溶解脂质体后,高速(10 000 r/min)离心 10 min,取上清液,得到麻黄碱壳聚糖修饰脂质体凝胶溶液。

2.2.4 专属性试验 取壳聚糖溶液、麻黄碱溶液以及麻黄碱壳聚糖修饰脂质体凝胶溶液各 10 μL,按上述色谱条件进行 HPLC 检测,结果表明壳聚糖对麻黄碱的测定无干扰,色谱图见图 1。

2.2.5 精密度试验 取低、中、高(10.0、50.0、100.0 μg/mL) 3 个质量浓度的麻黄碱溶液,分别于 1 d 内重复进样 4 次,连续测定 4 d,日内精密度 RSD 分别为 1.96%、1.42%、1.03%,日间精密度 RSD 分别为 2.87%、0.98%、1.02%。

2.2.6 稳定性试验 取滤过后的麻黄碱壳聚糖修饰脂质体凝胶溶液 10 μL,分别于室温下 0、1、2、4、6 h 进样,测定麻黄碱色谱峰面积,结果其色谱峰面积的 RSD 为 1.57%,表明供试品溶液在室温放置 6 h 内稳定。

2.2.7 重现性试验 按供试品溶液的制备方法制备 5 份麻黄碱壳聚糖修饰脂质体凝胶溶液,每份测定 3 次,记录色谱峰面积,计算得麻黄碱质量分数的 RSD 为 0.94%。

2.2.8 加样回收率试验 取按“2.1.2”项方法制备的麻黄碱壳聚糖修饰脂质体凝胶溶液 9 份,分别加入高、中、低(100、10、1 μg/mL) 3 个质量浓度

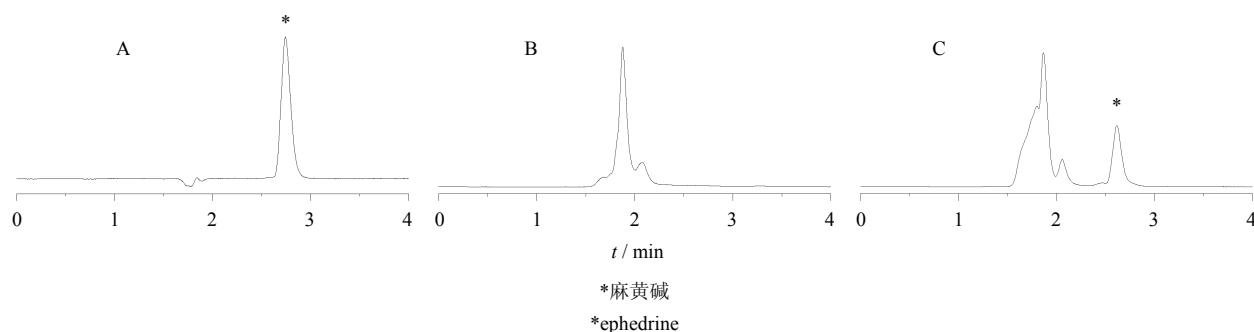


图 1 麻黄碱对照品 (A)、壳聚糖 (B)、麻黄碱壳聚糖修饰脂质体凝胶样品 (C) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of ephedrine reference substance (A), chitosan (B), and ephedrine chitosan-modified liposomes gels (C)

的麻黄碱溶液，混匀即得，各进样 10 μL ，测定峰面积，计算得高、中、低 3 种质量浓度的麻黄碱的平均回收率分别为 101.2%、103.5%、102.7% ($n=3$)，RSD 分别为 1.28%、1.59%、2.57% ($n=3$)。

2.3 麻黄碱壳聚糖修饰脂质体形态观察及粒度分布

用光学显微镜观察制备的麻黄碱壳聚糖修饰脂质体，发现脂质体数目多，形状较规则；采用激光粒度仪扫描，发现麻黄碱壳聚糖修饰脂质体的粒度分布均匀，粒径在 1 400~1 900 nm。结果见图 2。

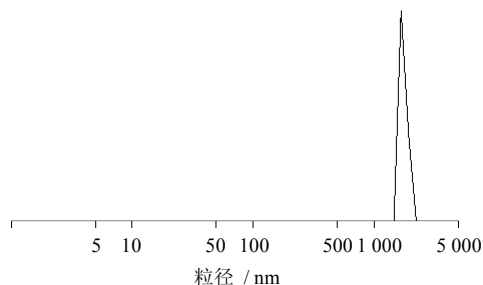


图 2 麻黄碱壳聚糖修饰脂质体粒径分布

Fig. 2 Diameter distribution of ephedrine chitosan-modified liposomes

2.4 封装率测定

取一定量麻黄碱壳聚糖修饰脂质体凝胶，装入截留相对分子质量为 7 000 的透析袋中作为内相；取 1 个 200 mL 烧杯，加入 pH 6.8 的 PBS 缓冲液作为外相，置于磁力搅拌器上搅拌计时，分别于 1、2、3、4、5、6、7 h 取外相溶液，滤过，HPLC 测定透析平衡液中麻黄碱质量浓度，结果见图 3。

平行 3 组实验，透析平衡时间 7 h^[13]。测定透析平衡前后外相中麻黄碱质量浓度，计算麻黄碱壳聚糖修饰脂质体的封装率为 $(41 \pm 0.94)\%$ 。

$$\text{封装率} = \rho_{\text{lipo}} / \rho_{\text{tot}}$$

ρ_{lipo} 为麻黄碱壳聚糖修饰脂质体中麻黄碱的质量浓度 ($\mu\text{g/mL}$)， ρ_{tot} 为总麻黄碱的质量浓度 ($\mu\text{g/mL}$)

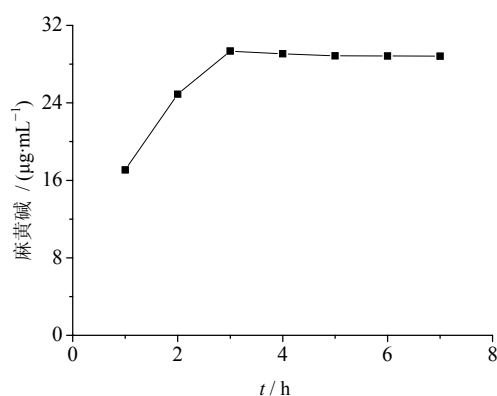


图 3 麻黄碱壳聚糖修饰脂质体反向透析平衡曲线

Fig. 3 Curve of reverse dialysis equilibrium for ephedrine chitosan-modified liposomes

2.5 体外透皮试验

采用 Franz 扩散装置进行体外透皮试验，分别取 2 mL 0.2% 麻黄碱壳聚糖修饰脂质体凝胶和麻黄碱溶液，置于供给池中并将其顶部密封。选用体质量 200 g 左右的雄性大鼠，腹部去毛取皮肤，将处理过的大鼠皮肤固定于供给池和接收池之间，接收池中注入 pH 6.8 的 PBS 缓冲液，水浴温度为 37 $^{\circ}\text{C}$ ，在设定时间点 (0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、12.0、24.0 h) 取出全部接收池中的接收液待测，并立即补充同温同体积接收液。取出的接收液滤过，用 HPLC 法检测麻黄碱质量浓度，计算累积透过量 (Q)^[14]，结果见图 4。随着时间的延长，麻黄碱壳聚糖修饰脂质体中麻黄碱的 Q 远小于普通麻黄碱溶液，并持续释药，表明麻黄碱壳聚糖修饰脂质体凝胶剂具有较好的缓释作用。

$$Q = (VC_n + \sum_{i=1}^{n-1} V_i C_i) / A$$

V 为接收池体积 (mL)， C_n 为麻黄碱初始质量浓度 (mg/mL)， V_i 为取样体积 (mL)， C_i 为某一时间点接收液中麻黄碱质量浓度 (mg/mL)， A 为扩散池面积 (cm^2)

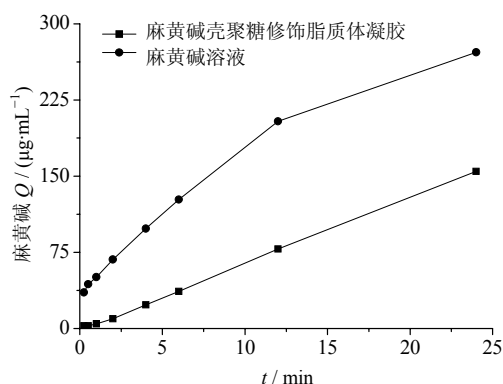


图4 麻黄碱制剂累计透过量对比图

Fig. 4 Comparison on cumulative penetration amount of two ephedrine preparations

3 讨论

通过对麻黄碱壳聚糖修饰脂质体进行体外透皮研究发现该制剂能透过大鼠皮肤,并在较长的时间内持续稳定释药。若进一步改进试验,可将大鼠皮肤改为鼻黏膜作为透过屏障,以考察制备的麻黄碱壳聚糖修饰脂质体经鼻黏膜透过情况。

透析法是目前最常用的一种测定脂质体包封率的方法,它利用半透膜分子大小差别,通过及时更换外相达到分离的目的。该法简单、准确、重复性好,是目前广泛应用的方法,缺点是耗时较长,所耗介质较多,易造成药物渗漏^[15]。利用透析法考察麻黄碱壳聚糖修饰脂质体包封率为 $(41 \pm 0.94)\%$,分析原因可能是由于测定包封率的平衡透析法容易造成药物渗漏,所以测得包封率相对偏低。但是,麻黄碱壳聚糖修饰脂质体制剂可明显提高生物利用度,低浓度药物制剂可能更加安全有效^[16],另为了考察是否发生渗漏,排除3 h前的渗漏,需要延长一定的平衡时间,以得到更准确的包封率结果,同时也可以间接评价脂质体是否稳定,故本实验平衡时间采用7 h。从实验结果看,平衡时间取5 h完全满足测定需要^[17]。

通过制备壳聚糖修饰脂质体,一方面可以提高脂质体制剂的黏度,提高局部药物浓度,减少药物的全身吸收,延长药物透过时间,减少给药频率,从而达到长效缓释的效果。另一方面还能提高脂质体的稳定性。所以壳聚糖修饰脂质体是一种极具市场前景的制剂新技术。

本研究制备的麻黄碱壳聚糖修饰脂质体包封率虽然略低,但是制备鼻用凝胶剂时是将包裹和未包裹的麻黄碱共同使用,游离在外的麻黄碱能达到迅

速起效的作用;而脂质体包裹的麻黄碱则起到缓释作用,有利于药物治疗作用的发挥。

参考文献

- [1] 查丽杭, 苏志国, 张国政, 等. 麻黄资源的利用与研究开发进展 [J]. 植物学通报, 2002, 19(4): 396-405.
- [2] 刘 赧, 石 倩, 杨 洋, 等. 麻黄碱与伪麻黄碱平喘效果及机制比较研究 [J]. 中草药, 2009, 40(5): 771-774.
- [3] 任晓玲, 张建春. 麻黄碱的生物活性及测定方法研究进展 [J]. 临床军医杂志, 2010, 38 (4): 666-668.
- [4] 王 鑫, 肖 农, 周江堡. 麻黄碱的副作用及相关研究现状 [J]. 国外医学: 中医中药分册, 2005, 27(3): 155-157.
- [5] 刘晓谦, 王锦玉, 全 燕, 等. 脂质体制备技术及其研究进展 [J]. 中国药学杂志, 2011, 46(14): 1084-1088.
- [6] 韩文霞, 李伟泽, 汪兴军, 等. 盐酸青藤碱纳米柔性脂质体的制备及其性质研究 [J]. 中草药, 2011, 42(4): 671-675.
- [7] Samad A, Ullah Z, Alam M I, et al. Transdermal drug delivery system: patent reviews [J]. Recent Pat Drug Deliv Formul, 2009, 3(2): 143-152.
- [8] 许海玉, 张铁军, 赵 平, 等. 中药缓控释制剂的研究现状及研发思路 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(1): 30-35.
- [9] 曾 敏, 谢兴亮, 杨 明, 等. 壳聚糖游离膜在不同溶出介质中的降解性能研究 [J]. 中草药, 2009, 40(7): 1050-1052.
- [10] 帅武平, 张幸国, 陈金亮, 等. 壳聚糖修饰脂质体的制备和性质研究 [J]. 中国药学杂志, 2007, 42(15): 1159-1163.
- [11] 周闻舞, 顾海铮. 壳聚糖微/纳米粒在定向给药系统中的应用研究 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(4): 290-295.
- [12] 刘智军, 仲 博, 欧阳健财, 等. HPLC 法测定体外透皮接收液中盐酸麻黄碱 [J]. 遵义医学院学报, 2009, 32(1): 624-626.
- [13] 王健松, 朱家壁. 阿奇霉素脂质体的制备及其包封率测定 [J]. 中国药科大学学报, 2004, 35(6): 499-502.
- [14] 张 枚, 张 莉, 陈 莉, 等. 滞留时间法评价羧甲基纤维素钠水凝胶经皮释药特性 [J]. 武警医学院学报, 2008, 17(8): 672-674.
- [15] 叶兆伟, 承 伟. 脂质体包封率测定方法及影响因素 [J]. 中国生物制品学杂志, 2007, 20(10): 789-792.
- [16] 张 立, 何凤田, 高会广, 等. PDP-PEG2000-DSPE 修饰的长春新碱脂质体的制备及其包封率测定 [J]. 实用预防医学, 2006, 13(3): 480-482.
- [17] 黄汉昌, 朱宏吉, 张明贤, 等. β -榄香烯脂质体的制备工艺研究 [J]. 中草药, 2006, 37(12): 1799-1802.