

盐酸青藤碱醇质体的制备及其体外经皮渗透研究

姜素芳, 胡姣艳, 何丽华

湖南师范大学医学院, 湖南 长沙 410013

摘要: 目的 制备盐酸青藤碱醇质体并考察醇质体作为盐酸青藤碱经皮给药载体的渗透特性。方法 采用注入法制备盐酸青藤碱醇质体, 并对其形态、粒径及包封率进行分析; 采用透皮扩散仪, 以小鼠皮肤进行体外透皮试验, 比较盐酸青藤碱在水溶液、脂质体以及醇质体中的透皮行为。结果 制得的盐酸青藤碱醇质体外形圆整, 平均粒径为 88.7 nm, 包封率为 62.8%, 累积透皮量和透皮速率均明显高于盐酸青藤碱脂质体和水溶液。结论 醇质体能明显促进盐酸青藤碱的经皮渗透, 有望成为盐酸青藤碱透皮给药的新载体。

关键词: 盐酸青藤碱; 醇质体; 经皮渗透; 脂质体; 注入法

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)09-1738-04

Sinomenine hydrochloride ethosome preparation and its transdermal penetration

JIANG Su-fang, HU Jiao-yan, HE Li-hua

Medical College, Hunan Normal University, Changsha 410013, China

Abstract: Objective To prepare sinomenine hydrochloride ethosome and evaluate the transdermal penetration of sinomenine hydrochloride taking ethosome as carrier. **Methods** Sinomenine hydrochloride ethosome was prepared with injection method and its appearance, particle size, and entrapment efficiency (EE) were analyzed. In transdermal test of mice, the transdermal behavior and accumulated permeation amounts of sinomenine hydrochloride in ethosome, liposomes, and water solution were compared by using Franz diffusion device. **Results** The shape of the sinomenine hydrochloride ethosome was spherical in an average diameter of 88.7 nm and the EE was 62.8%. The accumulated permeation amounts and permeation rates were significantly higher than those in liposomes and water solution. **Conclusion** The ethosome could greatly improve the transdermal penetration of sinomenine hydrochloride and it may be a potential carrier for transdermal use.

Key words: sinomenine hydrochloride; ethosome; transdermal penetration; liposomes; injection method

盐酸青藤碱 (sinomenine hydrochloride) 具有抗炎、抗心律失常、镇痛、镇静、镇咳等药理作用, 主治类风湿性关节炎等各种风湿性疾病以及心律失常, 临床疗效确切^[1]。该药口服制剂的胃肠道不良反应较大, 生物利用度低, 注射剂半衰期短, 需频繁给药^[2]。因此, 透皮给药不失为一种较为理想的给药方式。醇质体是由磷脂、乙醇、水组成的新型的具有脂质体双分子层结构的囊泡给药载体, 近年来作为新型透皮给药载体的研究日益增多。相关研究发现醇质体可促进药物穿透皮肤并能增加药物在皮肤中的蓄积^[3-4]。本实验将盐酸青藤碱制成醇质体, 并通过体外经皮渗透试验,

比较了盐酸青藤碱在醇质体、脂质体和水溶液 3 种不同载体中的体外透皮行为差异, 旨在为盐酸青藤碱的临床给药寻求一种更为合理的新的给药系统。

1 仪器与材料

探针式超声仪 (美国 Branson 公司); 激光散射粒径分析仪 (美国 Brookhaven 公司); 78HW—1 型恒温磁力搅拌器 (江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司); 紫外可见分光光度计 (北京莱伯泰科仪器有限公司); Agilent 1101 型高效液相色谱仪 (美国安捷伦); RYJ—6A 型药物透皮扩散试验仪 (上海黄海药检仪器有限公司)。

收稿日期: 2012-03-01

基金项目: 湖南省科技厅项目 (2009SK3115)

作者简介: 姜素芳 (1972—), 女, 湖南邵阳人, 副教授, 硕士, 目前主要从事药物新型给药系统的研究。E-mail: sufang_jiang@sina.com

网络出版时间: 2012-08-16 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20120816.1042.006.html>

盐酸青藤碱（湖南正清制药有限公司，质量分数 98.7%），卵磷脂（德国 Lipoid 公司），乙腈为色谱纯，其他试剂均为分析纯。昆明种小鼠（体质量 18~22 g），由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供，许可证号：SCXK（湘）2009—0004。

2 方法与结果

2.1 盐酸青藤碱醇质体的制备

采用注入法制备：称取处方量的盐酸青藤碱和卵磷脂，用无水乙醇溶解，置于磁力搅拌器上，在密闭条件下边搅拌边缓慢细流注入磷酸盐缓冲液（PBS），继续搅拌 30 min，于冰水浴中探头式超声 30 s（超声 3 s、停 2 s），以 0.22 μm 微孔滤膜滤过，即得盐酸青藤碱醇质体。

2.2 正交试验筛选处方和工艺

根据单因素考察结果，选择对醇质体制备影响较大的 3 个主要因素：卵磷脂与盐酸青藤碱的质量比（A）、PBS 的 pH 值（B）、乙醇体积分数（C）进行正交试验设计，每个因素取 3 个水平，以包封率为考察指标，按 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验。试验设计及结果见表 1，方差分析见表 2。

由表 1、2 可知，各因素的影响大小依次为 $A > B > C$ ，其中因素 A 具有极显著影响（ $P < 0.01$ ），因素 B、C 具有显著影响（ $P < 0.05$ ）；最佳工艺组合为 $A_3B_2C_1$ ，即卵磷脂与盐酸青藤碱的质量比为 10：1，PBS 的 pH 值为 6.8，乙醇体积分数为 30%。在此优化条件下制备 3 批盐酸青藤碱醇质体，测得其包封率分别为 61.2%、63.3%、63.8%。

表 1 $L_9(3^4)$ 正交试验设计及结果

试验号	A	B	C / %	D	包封率 / %
1	5 : 1 (1)	6.5 (1)	30 (1)	(1)	46.0
2	5 : 1 (1)	6.8 (2)	35 (2)	(2)	49.8
3	5 : 1 (1)	7.1 (3)	40 (3)	(3)	37.2
4	7.5 : 1 (2)	6.5 (1)	40 (3)	(2)	37.6
5	7.5 : 1 (2)	6.8 (2)	30 (1)	(3)	50.7
6	7.5 : 1 (2)	7.1 (3)	35 (2)	(1)	40.4
7	10 : 1 (3)	6.5 (1)	35 (2)	(3)	55.6
8	10 : 1 (3)	6.8 (2)	40 (3)	(1)	61.1
9	10 : 1 (3)	7.1 (3)	30 (1)	(2)	60.4
K_1	133.0	139.2	157.1	147.5	
K_2	128.7	161.6	145.8	147.8	
K_3	177.1	138.0	135.9	143.5	
R	48.4	23.6	21.2	4.0	

表 2 方差分析

方差来源	离均差平方和	自由度	F 值	显著性
A	478.429	2	124.526	$P < 0.01$
B	117.796	2	30.660	$P < 0.05$
D	75.016	2	19.525	$P < 0.05$
C (误差)	3.842	2		
$F_{0.05}(2, 2) = 19.00$ $F_{0.01}(2, 2) = 99.00$				

2.3 盐酸青藤碱脂质体的制备

采用逆相蒸发法^[5-6]制备：称取卵磷脂、胆固醇于圆底烧瓶中，加氯仿溶解，另取盐酸青藤碱溶于 PBS，再与上述氯仿溶液混合，探头式超声处理 10 s 使形成 W/O 型乳剂，45 °C 减压旋转蒸发除去氯仿，得半固体胶状物，再以适量 PBS 水合，于冰水浴中探头式超声 30 s（超声 3 s、停 2 s），以 0.22 μm 微孔滤膜滤过，即得盐酸青藤碱脂质体。

2.4 包封率和载药量的测定^[7]

2.4.1 线性关系考察 精密称取干燥盐酸青藤碱 100.0 mg，置 250 mL 量瓶中，用蒸馏水定容，得 400 μg/mL 对照品储备液。分别精密移取储备液 1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 mL 于 50 mL 量瓶中，蒸馏水定容。在紫外分光光度计 272 nm 波长处测定吸光度（A）值。结果表明，盐酸青藤碱质量浓度（C）与 A 值在 8.0~80.0 μg/mL 线性关系良好，回归方程 $C = 66.0789A + 3.9073$ ， $r = 0.9998$ ，日内和日间精密度的 RSD 分别为 1.32%、2.18%（ $n = 5$ ），平均回收率为 99.7%，RSD 为 1.56%（ $n = 5$ ）。

2.4.2 盐酸青藤碱醇质体和脂质体的包封率和载药量的测定 采用透析法。分别精密吸取 1.0 mL 醇质体和脂质体混悬液置透析袋中，封口，将透析袋浸入 20 mL pH 6.8 的 PBS 中，置 25 °C 恒温水浴中振荡，每 2 h 更换 1 次透析介质，在紫外分光光度计 272 nm 处测定 A 值，代入回归方程，计算盐酸青藤碱游离药物累积透出量 $W_{游}$ 。另取相同质量浓度盐酸青藤碱的 PBS 1.0 mL 于透析袋，同上平行操作，结果 8 h 已全部透出。按 8 h 透析完全，根据下列公式计算盐酸青藤碱醇质体和脂质体的包封率和载药量。

$$\text{包封率} = (W_{总} - W_{游}) / W_{总}$$

$$\text{载药量} = (W_{总} - W_{游}) / W_{类脂}$$

$W_{总}$ 为投药量， $W_{游}$ 为未包入脂质体的游离药物的量， $W_{类脂}$ 为处方中固体脂质材料的总质量

测得盐酸青藤碱醇质体和脂质体的平均包封率

分别为 62.8%、54.2%，载药量分别为 6.28%、4.34%。

2.5 盐酸青藤碱醇质体的外观形态及粒径

将制备得到的盐酸青藤碱醇质体样品稀释适当倍数，用磷钨酸负染色后，置于电子显微镜下观察样品的大小及形态。结果显示盐酸青藤碱醇质体形状规则，近似球形，大小较均匀，见图 1。激光散射粒径分析仪测得盐酸青藤碱醇质体的粒径大小及分布见图 2，平均粒径为 88.7 nm。

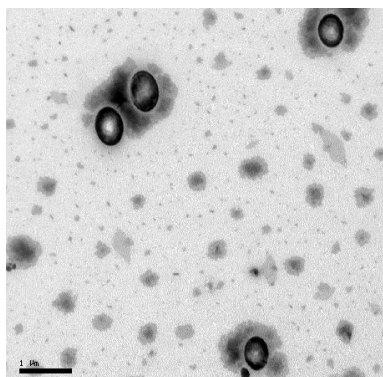


图 1 盐酸青藤碱醇质体电镜照片

Fig. 1 Electron micrographs of sinomenine hydrochloride ethosome

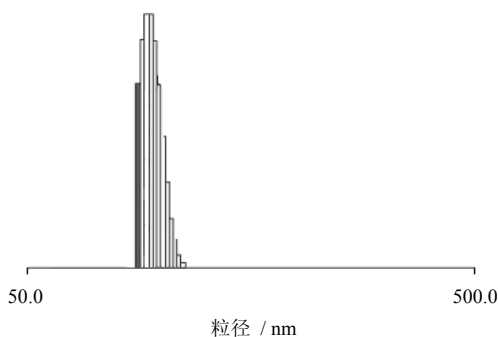


图 2 盐酸青藤碱醇质体的粒径分布图

Fig. 2 Particle size distribution of sinomenine hydrochloride ethosome

2.6 体外透皮试验

2.6.1 色谱条件 色谱柱为 Hypersil GOLD C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)，流动相为乙腈-0.01 mol/L NaH₂PO₄ (15:85)，柱温为 30 ℃，体积流量为 1 mL/min，检测波长为 266 nm，进样量为 20 μL。在此色谱条件下，辅料和试剂对盐酸青藤碱测定无干扰，盐酸青藤碱的保留时间约为 5.7 min^[5]。

2.6.2 线性关系考察 精密称取盐酸青藤碱对照品 10 mg，置 50 mL 量瓶中，用 pH 6.8 的 PBS 溶解并稀释至刻度，得质量浓度为 200 μg/mL 的对照品储

备液。分别精密吸取储备液 0.25、0.5、1.0、1.5、2.0、3.0、4.0 mL 于 10 mL 量瓶中，加 PBS 至刻度，摇匀，得质量浓度为 5.0、10.0、20.0、30.0、40.0、60.0、80.0 μg/mL 的系列对照品溶液，分别取 20 μL 进样，以峰面积积分值 (Y) 为纵坐标，质量浓度 (X) 为横坐标，进行线性回归，得回归方程 $Y=16.12X+4.38$ ， $r=0.9995$ ，线性范围 5.0~80.0 μg/mL；精密度 RSD 为 2.31% ($n=5$)；平均回收率为 99.7%，RSD 为 1.82% ($n=5$)。

2.6.3 体外透皮试验^[8-9] 取昆明种小鼠，颈椎脱臼处死，剪毛，剪下小鼠腹部皮肤，小心去除皮肤上的短毛、皮下组织和筋膜，保证皮肤角质层的完整，用生理盐水漂洗干净，浸泡，备用。将皮肤外层朝上平铺固定在扩散池和接收池之间（透皮扩散面积 2.8 cm²，接收池体积 6.5 mL），通过取样管在接收池内注满接收介质 PBS (pH 6.8)，使液面与皮肤内层接触，排除接收池中的气泡。精密吸取 0.2 mL 盐酸青藤碱醇质体、脂质体、水溶液（3 种溶液中盐酸青藤碱质量浓度均为 3.5 mg/mL）涂布于皮肤表面，自然干燥，在 37 ℃保持恒速搅拌，转速为 600 r/min，于试验开始后的 2、4、6、8、12、16、20、24 h 定时取样 1 mL，以 0.45 μm 微孔滤膜滤过，并及时补充相同体积的新鲜接收介质，排除接收室中的气泡。取续滤液注入高效液相色谱仪中，测定盐酸青藤碱峰面积，代入回归方程求出相应盐酸青藤碱质量浓度，计算其累积透过量 (Q_n)^[10-11]。

$$Q_n = (6.5 C_n + \sum_{i=1}^{n-1} C_i \times 1) / 2.8$$

2.8 为透皮扩散面积 (cm²)，6.5 为接收池体积 (mL)， C_n 为第 n 个取样点测得的盐酸青藤碱质量浓度， C_i 为该取样点前各取样点测定的盐酸青藤碱质量浓度

以时间 t 为横坐标， Q_n 为纵坐标，绘制经皮渗透曲线 (图 3)，以盐酸青藤碱 Q_n 对 t 进行线性回归，所得回归方程的斜率即为透皮速率 (J_s)。盐酸青藤碱醇质体、脂质体和水溶液的 J_s 分别为 2.403、0.878、0.416 μg/(cm²·h)。结果表明，3 种不同载体的盐酸青藤碱经皮渗透吸收有显著区别，醇质体的皮肤 Q_n 和 J_s 均明显高于其脂质体和水溶液。

3 讨论

在盐酸青藤碱醇质体的制备过程中发现，采用注入法制备醇质体时，将盐酸青藤碱溶于无水乙醇可显著提高其包封率，同时乙醇体积分数以及卵磷脂的质量浓度对所形成醇质体的粒径及包封率都有

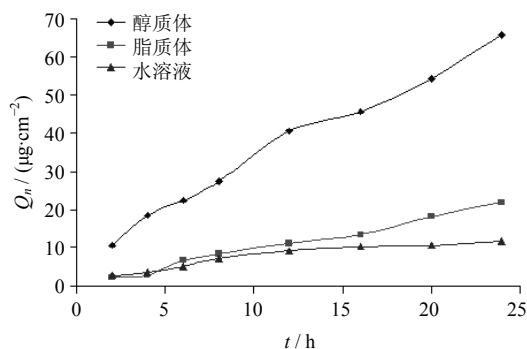


图 3 盐酸青藤碱醇质体、脂质体和水溶液的经皮渗透曲线 ($n=5$)

Fig. 3 Transdermal penetration curves of sinomenine hydrochloride in ethosome, liposome, and water solution ($n=5$)

较大的影响,乙醇体积分数越高,醇质体粒径越小;卵磷脂质量浓度越大,醇质体粒径越大,包封率越高。因此综合考虑醇质体的粒径和包封率,最终处方确定乙醇体积分数为 30%,卵磷脂质量浓度为 35 mg/mL,卵磷脂和盐酸青藤碱的质量比为 10:1。

皮肤角质层是外源性物质如药物经皮透入体内的主要屏障。角质层细胞间隙孔径约为 30 nm。脂质体具有刚性,无法直接穿过比其自身小的角质层细胞间隙,因此在经皮转运过程中易沉积于皮肤表层,不易进入皮肤深部^[8]。水溶液与皮肤的生物相容性差,药物呈游离状态,不利于细胞渗透和靶向分布。而醇质体由于乙醇的加入使得双分子层膜具有良好的柔韧性和流动性,在经皮传递过程中易于变形,因而更容易穿过皮肤屏障进入皮肤深部甚至体循环,促进药物的经皮转运^[12],本实验也再次验证了这一点。

参考文献

[1] 蔡颖,邱赛红,孙必强. 盐酸青藤碱治疗风湿类疾病

研究概况 [J]. 中医药导报, 2006, 12(12): 84-86.

[2] 李乐,张彩玲,宋必卫. 青藤碱的药理研究与临床应用 [J]. 中药新药与临床药理, 2006, 17(4): 310-313.

[3] Fang Y P, Tsai Y H, Wu P C, *et al.* Comparison of 5-aminolevulinic acid-encapsulated liposome versus ethosome for skin delivery for photodynamic therapy [J]. *Int J Pharm*, 2008, 356(1/2): 144-152.

[4] Maghraby G M M E I, Willims A C, Barry B W. Interactions of surfactants (edge activators) and skin penetration enhancers with liposomes [J]. *Int J Pharm*, 2004, 276(1/2): 143-161.

[5] 姜素芳,姚瑶,陶昱斐,等. 盐酸青藤碱传递体的制备及质量评价 [J]. 中草药, 2007, 38(3): 362-365.

[6] 姜素芳,姚瑶,丁燕飞,等. 反相高效液相色谱法测定盐酸青藤碱纳米脂质体药物含量及包封率 [J]. 中南药学, 2005, 3(4): 213-215.

[7] 仲博,张岭,张莉,等. 麻黄碱壳聚糖修饰脂质体凝胶剂的制备及体外透皮研究 [J]. 中草药, 2012, 43(1): 70-73.

[8] 陆晓红,刘建平,赵华,等. 丹参酮脂质传递体的制备及体外经皮渗透研究 [J]. 中成药, 2005, 27(9): 1000-1003.

[9] 郭健新,平其能,孙国庆,等. 柔性纳米脂质体作为环孢素经皮渗透载体的体外研究 [J]. 中国药理学杂志, 2000, 35(9): 595-597.

[10] Cevc G, Blume G. New, highly efficient formulation of diclofenac for the topical, transdermal administration in ultradeformable drug carriers, transfersomes [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1514(2): 191-205.

[11] Cevc G. Transdermal drug delivery of insulin with ultradeformable carriers [J]. *Clin Pharmacokinet*, 2003, 42(5): 461-474.

[12] 周建平. 药剂学进展 [M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 2008.