

紫苏醇软膏的制备及其体外经皮渗透研究

华海婴¹, 归振华^{1,2}, 乔淑会^{1,2}, 刘丹^{1,2}, 毛艳婷², 赵永星^{2*}

1. 郑州大学医药科学研究所, 河南 郑州 450052

2. 郑州大学药学院, 河南 郑州 450001

摘要: **目的** 制备紫苏醇软膏, 考察其性质并进行体外透皮研究。 **方法** 采用乳化法制备紫苏醇软膏并研究其形态、稳定性及体外释放特征, 用 Franz 扩散池考察其透皮吸收行为、HPLC 法测定紫苏醇的量。 **结果** 优选的紫苏醇软膏处方为紫苏醇-硬脂酸-单硬脂酸甘油酯-白凡士林-羊毛脂-液体石蜡-三乙醇胺-甘油-尼泊金乙酯, 外观为淡黄色半固体, 软膏中紫苏醇的有效量为 $(2.89 \pm 0.17)\%$, 12 h 体外释放达到 61.25%, 经皮渗透速率为 $9.42 \mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$, 3 500 r/min 离心 30 min 未分层, 在 0、40 °C 条件下放置 30 d 稳定。 **结论** 所制备的紫苏醇软膏可以显著增加药物在皮肤中的经皮渗透量, 为研发紫苏醇及其新型局部给药制剂提供依据。

关键词: 紫苏醇; 软膏; HPLC; 正交设计; 体外经皮渗透

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)14-1911-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.14.009

Preparation of perillyl alcohol ointment and investigation on its *in vitro* transdermal penetration

HUA Hai-ying¹, GUI Zhen-hua^{1,2}, QIAO Shu-hui^{1,2}, LIU Dan^{1,2}, MAO Yan-ting², ZHAO Yong-xing²

1. Academy of Medical and Pharmaceutical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

2. College of Pharmacy, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China

Abstract: **Objective** To prepare perillyl alcohol ointment (PAO) and to investigate its properties and transdermal absorption behavior. **Methods** The emulsion method was used to prepare PAO. The morphology, stability, and *in vitro* release were examined, respectively. The transdermal absorption of PAO was evaluated using Franz diffusion cells and the perillyl alcohol content was determined by HPLC. **Results** The optimal prescription of PAO was perillyl alcohol, stearic acid, glyceryl monostearate, white vaseline, lanolin, liquid paraffin, triethanolamine, glycerine, and ethylparaben. The product was a pale yellow semi-solid oil-in-water emulsion with a uniform appearance. The content of perillyl alcohol in ointment was $(2.89 \pm 0.17)\%$, the release accumulation *in vitro* achieved 61.25% in 12 h, and the percutaneous penetration rate was $9.42 \mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$. The ointment was not stratified after the centrifugation at 3 500 r/min for 30 min, and the product was fairly stable under the condition of storing at 0 and 40 °C for 30 d. **Conclusion** The prepared PAO with increased skin retention amount could be developed into a novel preparation of perillyl alcohol for focal administration.

Key words: perillyl alcohol; ointment; HPLC; orthogonal design; *in vitro* transdermal penetration

紫苏醇^[1], 又称二氢枯草醇, 化学名 (4-异丙烯基-1-环己烯) 甲醇, 是具有青草香, 稍有木香和花香, 类似芳樟醇和松油醇特殊气味的单环单萜烯醇^[2]。紫苏醇性质稳定, 耐热耐酸, 不易挥发, 溶于甲醇、乙醇、乙腈等有机溶剂中, 其用途十分广泛。紫苏醇主要存在于紫苏叶中, 柠檬、薰衣草、柑橘^[3]等植物中也存在。有报道紫苏醇作为一种抗

癌药物^[4]进行临床前研究, 到目前为止有关紫苏醇的制剂研究, 仅见有口服胶囊和作为皮肤癌的乳膏制剂^[5], 而且口服胶囊的 III 期临床试验显示出较大的胃肠刺激性, 有病人因无法耐受退出临床试验的报道^[6-7]。

本研究旨在延长紫苏醇对皮肤癌的作用时间, 提高药效, 达到缓释效果, 将紫苏醇制成外用软膏

收稿日期: 2013-01-29

基金项目: 河南省重点科技攻关计划项目 (092102310028); 河南省基础与前沿技术研究计划项目 (112102310022)

作者简介: 华海婴 (1957—), 女, 研究员, 硕士生导师, 研究方向为抗肿瘤药物新制剂研究及其药理学评价。

Tel: (0371)66658210 13014555210 E-mail: hua_haiying@hotmail.com

*通信作者 赵永星, 教授。Tel: (0371)67781901 E-mail: zhaoyx@zzu.edu.cn

网络出版时间: 2013-05-16 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20130516.0916.002.html>

剂,并通过体外经皮渗透实验,比较紫苏醇在不同基质类型软膏中的体外透皮行为差异,为紫苏醇作为创新药研发寻找一种更合理的新型给药方式。

1 仪器与试药

KQ—500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);DiamondsilTM C₁₈ 柱(美国 Agilent 公司);GL—20G—II 型离心机(上海安亭科学仪器厂);DV215CD 型电子天平(美国 Ohaus 公司);磁力加热搅拌器(上海南汇电讯器材厂);Lambda 35 型紫外可见分光光度计(美国 PerkinElmer 公司)。

紫苏醇对照品、原料药(美国 Sigma 公司,(S)-(-)-紫苏醇,质量分数≥96%);单硬脂酸甘油酯[GMS,中国医药(集团)上海化学试剂公司];液体石蜡(分析纯)、羊毛脂(药用)西安惠安化工厂;白凡士林(杭州恒润凡士林制造有限公司,药用);十二烷基硫酸钠(西安悦来医药科技有限公司,药用);尼泊金乙酯(武汉大华伟业医药化工有限公司,药用);三乙醇胺(分析纯)、甘油(分析纯)、硬脂酸(SA)天津市博迪化工有限公司;乙腈(色谱纯,天津四友精细化学品有限公司),其他试剂均为分析纯,水为纯化水。

SPF 级 SD 大鼠,体质量 200~220 g,雌雄各半,由河南省实验动物中心提供,许可证号:SCXK(豫)2012-0053。

2 方法与结果

2.1 软膏基质类型的选择^[8]

软膏剂是临床常用的外用制剂,除主药外,基质是软膏剂的主要组成部分。基质不仅是软膏的赋形剂,同时对药物的释放和吸收有重要的影响。通过制备乳剂型基质、油脂性基质和水溶性基质 3 种不同类型的紫苏醇软膏,分别进行温度和离心实验,观察各类型基质的稳定性来确定适宜的基质类型。(1)油脂性基质紫苏醇软膏:量取羊毛脂 0.12 g,白凡士林 0.85 g,在 55 ℃水浴上加热,搅拌溶解,再加入紫苏醇 30 mg,200 r/min 搅拌溶解至冷凝,即得。(2)水溶性基质紫苏醇软膏:量取聚乙二醇 400 5.5 g,聚乙二醇 4000 4.5 g,在 50 ℃水浴上加热融化,加入紫苏醇 30 mg,200 r/min 搅拌均匀至冷凝,即得。(3)乳剂型基质紫苏醇软膏:量取单硬脂酸甘油酯 0.35 g、硬脂酸 1.2 g、白凡士林 0.1 g、羊毛脂 0.5 g、液体石蜡 0.6 g,加热融化,保温 75~77 ℃,作为油相;取甘油 0.5 g、尼泊金乙酯 0.05 g、

三乙醇胺 0.04 g、蒸馏水 10 mL,加热溶解至 75~77 ℃,缓缓加入油相,200 r/min 搅拌均匀,待温度降至 55 ℃后,加入紫苏醇 30 mg 搅拌均匀至冷凝。经实验发现,由 3 种不同类型的软膏基质制备的制剂中,从软膏的外观、色泽、涂展性来看,油性基质软膏与水溶性基质软膏、乳剂型基质软膏比较有较大差异,结果见表 1。

表 1 不同基质软膏处方

Table 1 Different ointment bases formula

基质种类	外观	色泽	涂展性
油性基质	膏体粗糙	深黄色	黏性大不易涂布
水溶性基质	膏体细腻	淡黄色	易于涂布
乳剂型基质	膏体细腻	淡黄色	易于涂布

2.2 O/W 类基质处方的选择^[9]

根据表 1 可知,O/W 型基质更加易于清洗,O/W 型基质软膏中药物的释放和经皮渗透速率较快,又因基质中含有水分,增强了软膏的润滑性,易于给药,故采用 O/W 型乳剂型基质。O/W 型基质外相含多量水,在贮存的过程中可能霉变,常需加入防腐剂。同时水分也易蒸发失散而使软膏变硬,故常加入甘油、丙二醇等作为保湿剂^[8]。综上所述,处方组成一般包括主药、适宜的软膏基质、乳化剂、增溶剂、防腐剂等成分。

2.2.1 辅料选择 甘油除作为基质外,同时也作为保湿剂,防止因水分被蒸发而导致的膏体变硬。为防止细菌、真菌等微生物对软膏的侵袭破坏,应加入适当的防腐剂。尼泊金乙酯具有低毒、无味、无臭、不挥发、性质稳定的优点,且不会使皮肤变色,对皮肤无刺激性,三乙醇胺也可作为乳化剂,在制备软膏时常用于调节 pH 值。

2.2.2 基质种类的选择 油相常用硬脂酸、白凡士林、羊毛脂、单硬脂酸甘油酯、十六醇等。白凡士林可防止水分蒸发,并留下油膜,有利于角质层水合并具有良好的润滑作用,有适宜的黏稠度且易于涂布,白凡士林化学性质稳定,适用于遇水不稳定的药物,白凡士林仅能吸收约 5%的水,故需要和羊毛脂、胆固醇或某些高级醇类合用以提高其吸收性能。羊毛脂与油脂的组成接近,有良好的吸水性,故有利于药物的渗透。单硬脂酸甘油酯能增加油相吸水能力,且与较强的 O/W 型乳化剂合用时,制得的乳剂型基质稳定,且膏体细腻润滑。经实验选出适宜的基质为 O/W 型软膏剂,需选取合适的乳化

剂,用乳化法制备软膏。

实验主要集中在探索乳化剂的选择及油相基质的用量上。查阅文献后发现在 O/W 型乳膏剂基质中,选择十二烷基硫酸钠、三乙醇胺、聚山梨酯 80 作为乳化剂的较多,选择十二烷基硫酸钠或三乙醇胺或聚山梨酯 80 其中的 1 种或混合物作为乳化剂;油相基质(硬脂酸、白凡士林、羊毛脂、硬脂酸甘

油脂、十六醇)的比例、用量视具体情况决定。通过预试验,选择 4 种配方,采用软膏剂的常配置方法进行研究,结果见表 2。

以上结果表明,配方 1 所制得的基质外观性状良好,分层所需时间最长,稳定性优于配方 2、3、4 所制得的基质。制得的基质具有均匀、细腻、涂展性好、无皮肤刺激性等优点。

表 2 软膏基质筛选

Table 2 Screening of ointment bases

编号	组成	分层时间 / min	外观	稳定性*	
				4 ℃	40 ℃
1	硬脂酸、单硬脂酸甘油酯、液状石蜡、白凡士林、甘油、三乙醇胺、羊毛脂、纯化水	60	良好	无变化	无变化
2	硬脂酸、单硬脂酸甘油酯、液状石蜡、白凡士林、三乙醇胺、聚山梨酯 80、甘油、纯化水	30	差	变粗	分层
3	硬脂酸、单硬脂酸甘油酯、液体石蜡、白凡士林、三乙醇胺、甘油、十二烷基硫酸钠、纯化水	45	一般	无变化	变粗
4	硬脂酸、硬脂醇、白凡士林、液状石蜡、山梨酸、聚山梨酯 80、甘油、油酸山梨坦、纯化水	50	良好	变粗	无变化

*进行低温、高温稳定性实验的时间为 24 h

*Time of low and high temperatures for stability test is 24 h

2.3 正交试验设计优化处方比例

2.3.1 因素与水平的确定 由以上实验得出结论,配方 1:硬脂酸、单硬脂酸甘油酯、液状石蜡、白凡士林、甘油、三乙醇胺、羊毛脂、纯化水为最适宜软膏基质。根据参考文献和预试验结果^[9],确定考察因素为基质中单硬脂酸甘油酯(A)、硬脂酸(B)、三乙醇胺(C)的处方量,每个因素安排 3 水平进行优选,试验因素与水平安排见表 3。

2.3.2 正交试验筛选处方比例 以上确定的 3 因素 3 水平,按照 $L_9(3^4)$ 正交表的设计制备 9 份约 10 g 的软膏样品。依据乳剂型软膏的性状以及经验,选取考察软膏的几项指标,并设定各项的权重。指标分别为软膏的外观评分(占总评分的 40%),分层时间评分(占总评分的 20%),耐寒、耐热稳定性评分(即温度对软膏的影响,各占总评分的 20%);综合评分 10 分为满分,其中综合评分=外观评分×40%+分层时间评分×20%+耐寒稳定性评分×20%+耐热稳定性评分×20%。正交试验具体结果见表 3,方差分析结果见表 4。

极差(R)值的大小反映了考察的 3 个因素对基质质量的影响程度,由表 3、4 的结果可知,因素 A 对基质处方影响最明显,因素 C 次之,因素 B 再

表 3 $L_9(3^4)$ 正交试验设计与结果

Table 3 Design and results of $L_9(3^4)$ orthogonal test

试验号	A / g	B / g	C / mg	D (误差)	综合评分
1	0.35 (1)	1.2 (1)	40 (1)	(1)	8.09
2	0.35 (1)	1.3 (2)	45 (2)	(2)	7.65
3	0.35 (1)	1.4 (3)	50 (3)	(3)	7.94
4	0.40 (2)	1.2 (1)	45 (2)	(3)	7.43
5	0.40 (2)	1.3 (2)	50 (3)	(1)	7.77
6	0.40 (2)	1.4 (3)	40 (1)	(2)	7.59
7	0.45 (3)	1.2 (1)	50 (3)	(2)	7.99
8	0.45 (3)	1.3 (2)	40 (1)	(3)	7.91
9	0.45 (3)	1.4 (3)	45 (2)	(1)	7.90
K_1	23.68	23.51	23.59	23.76	
K_2	22.79	23.33	22.98	23.23	
K_3	23.80	23.43	23.70	23.28	
R	0.34	0.06	0.24	0.18	

次之(A>C>B),确定最佳组成为 $A_3B_1C_1$,即基质的最佳配比为单硬脂酸甘油酯 0.45 g,硬脂酸 1.2 g,三乙醇胺 0.04 g。按照正交试验优选基质处方,确定紫苏醇软膏的处方为单硬脂酸甘油酯 0.45 g,白凡士林 0.1 g、羊毛脂 0.5 g,液体石蜡 0.6 g、硬脂酸 1.2 g、三乙醇胺 0.04 g,尼泊金乙酯 0.05 g,

表4 方差分析

Table 4 Analysis of variance

方差来源	离均差平方和	自由度	F 值	显著性
A	0.227	2	2.609	无
B	0.016	2	0.184	无
C	0.117	2	1.345	无
D (误差)	0.087	2	1.000	

$$F_{0.05(2, 2)} = 19.00$$

甘油 0.5 g, 紫苏醇按 0.3% 含药量投药, 处方总量为 9.943 1 g。

2.4 紫苏醇软膏的制备工艺及其质量评价

2.4.1 紫苏醇软膏的制备工艺 按处方量称取各成分, 将单硬脂酸甘油酯、羊毛脂、液体石蜡、硬脂酸和白凡士林的混合物在 70~75 °C 下水浴加热熔融, 作为油相。取甘油、三乙醇胺与蒸馏水加热溶解至 75~77 °C, 缓缓加入油相, 200 r/min 搅拌均匀, 待温度降至 55 °C 后, 加入紫苏醇搅拌均匀至室温, 即得成品。

2.4.2 外观及性状 紫苏醇软膏外观为淡黄色, 膏体细腻, 具有适当的黏稠性, 易于涂布。

2.4.3 离心实验 称取紫苏醇软膏 1 g, 置于离心管中, 以 3 500 r/min 离心 30 min, 无油水分层破乳现象。

2.4.4 低温稳定性实验 取紫苏醇软膏均匀装入西林瓶中, 于 0 °C 放置 30 d, 分别于 0、10、30 d 取样观察, 未出现分层、析晶等现象, 表明紫苏醇软膏在 0 °C 条件下稳定。

2.4.5 高温稳定性实验 取紫苏醇软膏均匀装入西林瓶中, 于 40 °C 恒温箱中放置 30 d, 分别于 0、10、30 d 取样观察, 未出现油水分层破乳、酸败、异臭等现象, 表明紫苏醇软膏在 40 °C 条件下稳定。

2.5 紫苏醇的测定

2.5.1 色谱条件 色谱柱为 Diamonsil™ C₁₈ 柱

(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水 (40:60); 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 210 nm; 柱温 30 °C; 进样量 20 μL; 检测器为紫外检测器。

2.5.2 溶液的配制 精密称取紫苏醇对照品 100 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 以乙腈溶解后稀释至刻度摇匀, 作为对照品储备液, 质量浓度为 1 mg/mL。

2.5.3 线性关系考察 精密吸取紫苏醇对照品储备液适量分别用乙腈稀释成质量浓度为 200、100、20、10、5、2、1 μg/mL 的紫苏醇对照品溶液, 各吸取 20 μL 进样, 记录峰面积。以峰面积积分值为纵坐标 (Y), 进样质量浓度为横坐标 (X) 进行线性回归, 得回归方程 $Y = 14.3X + 1.3433$, $r = 0.9999$, 结果表明紫苏醇在 1~200 μg/mL 与峰面积积分值具有良好的线性关系。

2.5.4 软膏样品的处理^[10] 精密称取软膏 1.0 g, 置于 10 mL 具塞离心管中, 加入乙腈 5 mL, 60 °C 水浴加热溶解, 振荡 1 min, 室温冷却后离心 (3500 r/min, 10 min), 吸取上清液, 离心管内沉淀物再次用 4 mL 乙腈用上述方法溶解提取, 合并 2 次提取液于 10 mL 量瓶中, 乙腈定容。

2.5.5 方法专属性考察 按“2.4.1”项下操作制备成空白软膏、紫苏醇软膏; 按照“2.5.4”项下方法操作, 取紫苏醇溶液作为溶液 1, 空白软膏提取液作为溶液 2, 紫苏醇软膏提取液作为溶液 3, 各进样 20 μL, HPLC 色谱见图 1。由结果可知, 辅料对紫苏醇的测定无干扰, 该检测方法的专属性符合要求。由图 1-D 可知, 空白接收液对紫苏醇的测定没有影响。

2.5.6 精密度试验^[11] 分别精密吸取质量浓度为 5、10、20 μg/mL 的对照品溶液 20 μL 进样, 测定峰面积。每隔 2 h 进样 1 次, 共测定 5 次, 计算日内精密度; 精密吸取上述对照品溶液 20 μL 进样,

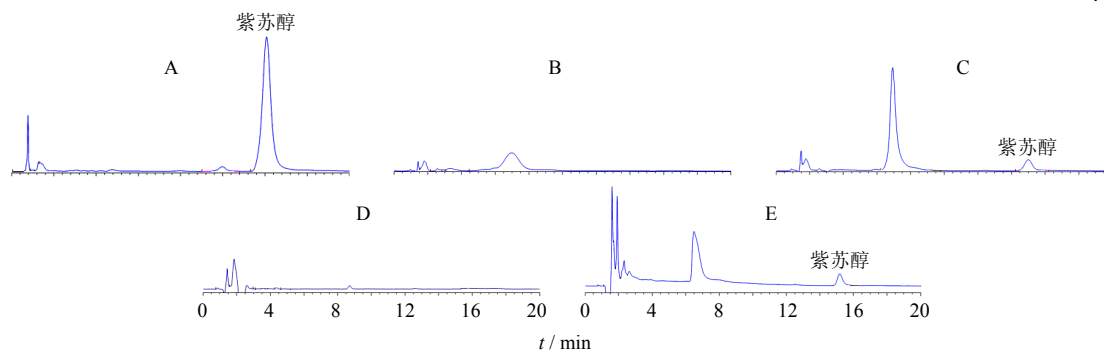


图1 紫苏醇对照品 (A)、空白软膏基质 (B)、含药软膏 (C)、空白接收液 (D)、含药软膏接收液 (E) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of perillyl alcohol reference substance (A), blank ointment bases (B), and perillyl alcohol-loaded ointment (C), blank receiving liquid (D), perillyl alcohol-loaded ointment receiving liquid (E)

每日测定1次,连续测5 d,计算日间精密度,结果日内精密度RSD分别为1.15%、1.32%、1.67%,日间精密度RSD分别为2.51%、2.29%、2.35%。由结果可知,各质量浓度组精密度RSD均小于3%,精密度良好,符合方法学要求。

2.5.7 回收率试验 取空白软膏基质1 g,按照“2.5.4”项下方法操作,得空白软膏溶液,分别精密加入紫苏醇储备液适量,制备成质量浓度分别为5、10、20 $\mu\text{g/mL}$ 的供试品溶液,按“2.5.1”项下色谱条件检测,进行回收率测定,每个质量浓度平行3份。结果3个质量浓度的样品平均回收率分别为99.5%、100.6%、101.3%,RSD分别为1.41%、1.22%、0.95%。

2.5.8 加样回收率试验^[11] 制备3批紫苏醇软膏,分别按照“2.5.4”项下方法操作,按“2.5.1”项下色谱条件检测,分别量取1 mL软膏样品溶液,加入质量浓度为5、10、20 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液,20 μL 进样,测定峰面积。按回归方程求得实际的药物质量浓度,则该实际质量浓度与相应理论质量浓度的比值即为回收率,结果平均回收率分别为99.65%、93.87%、99.21%,RSD分别为0.76%、0.48%、0.81% ($n=3$)。由结果可知,各质量浓度组回收率RSD均小于1.0%,符合方法学要求。

2.5.9 重复性试验 按照“2.5.4”项下方法平行制备供试品溶液各6份,按“2.5.1”项下色谱条件检测,记录峰面积,计算紫苏醇质量分数的RSD。结果6次检测的RSD为1.79%,说明重复性良好。

2.5.10 稳定性试验 按照“2.5.4”项下方法制备供试品溶液,按“2.5.1”项下色谱条件分别于制备后0、1、2、4、6、8 h进样检测,结果测定样品中紫苏醇质量分数的RSD为0.94%,表明样品溶液在8 h内稳定。

2.5.11 软膏样品的测定 制备紫苏醇软膏,分别按照“2.5.4”项下方法操作,按“2.5.1”项下色谱条件检测,0.22 μm 微孔滤膜滤过,20 μL 进样,测定峰面积。根据回归方程计算药物的量,平行测定3次,结果软膏中紫苏醇平均质量浓度为2.89 mg/g,RSD为0.87% ($n=3$)。

2.6 紫苏醇软膏的体外释药研究

2.6.1 体外释药性质研究 采用半透膜扩散法进行体外释放的研究,在已选定的接收液中放入多个透析袋,透析袋内含有定量的相同接收液,37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,确保实验前透析袋内外渗透扩散达到平衡。由于软

膏基质为O/W型基质,透析袋内外易产生质量浓度差,药物从基质中释放,再渗透出袋外,从而达到平衡。不同时间透析袋内药物质量浓度反映了溶液中药物的累积释放率,该方法使释放出的药物与软膏辅料成分分离,更易于进行定量测定。

2.6.2 透析袋对药物的影响 取紫苏醇软膏1 g加入100 mL释放介质(生理盐水pH 7.4)搅匀,取样20 μL 进样,HPLC法测定3次,得知1 g软膏中含有2.89 mg药量,将透析袋(截留量为3 500)浸泡6 h后,取出透析袋,控干,使接收液的体积仍保持不变,维持漏槽条件,再取样20 μL ,测定,含药量不变,因此认为透析膜本身对药物无吸附。

2.6.3 测定方法 采用反相透析法^[12],取接收液(生理盐水pH 7.4)100 mL于烧杯中,将内含1.0 mL生理盐水的透析袋置于接收液中,37 $^{\circ}\text{C}$ 平衡过夜,在实验前透析袋内外渗透扩散达到平衡。精取被测软膏1 g,磁力搅拌下加入释放介质中,分别2、4、6、8、12、18、24、28、30 h各取出1 mL,在取样过后补加1 mL接收液,HPLC测定袋内药物质量浓度。另取一含有软膏的透析袋在接收液中浸泡36 h后测定袋内药物质量浓度,即药物完全释放的总质量浓度。以每个时间点所测得的药物质量浓度与接收液中药物总质量浓度之比计算释放率,用HPLC法测定药物质量浓度。

2.6.4 软膏的释药 配制与软膏相同质量浓度的紫苏醇过饱和水溶液(S)和不同基质类型的紫苏醇软膏(M1:乳剂型,M2:水溶性,M3:油性),按“2.5.1”项下色谱条件测定紫苏醇的量,计算游离药物的累积释放率,采用Origin 8.0软件将实验结果处理后作图,结果见图2。由图可知紫苏醇制成软膏后,乳剂型软膏中药物的释放速率均比紫苏醇过饱和水溶液、油性软膏和水溶性软膏慢。紫苏醇的3种不同基质软膏中的药物释放规律呈两相过程,无突释现象。在刚开始的12 h内释放药物较快,紫苏醇乳剂型软膏累积释放率达到61.25%,随后缓慢持续释放,在30 h累积释放量达到74.82%,具有良好的缓释性。紫苏醇油性软膏在12 h内释药速率缓慢,累积释放量为21.9%,30 h时累积释放量达到28.7%,释放速率过于缓慢,而紫苏醇水溶性软膏的释放速率较慢,30 h内尚有40%的药物不能释放,紫苏醇的过饱和水溶液在前6 h已释放90%,基本完全释放,由此可知,紫苏醇乳剂型软膏具有较好的缓释作用。

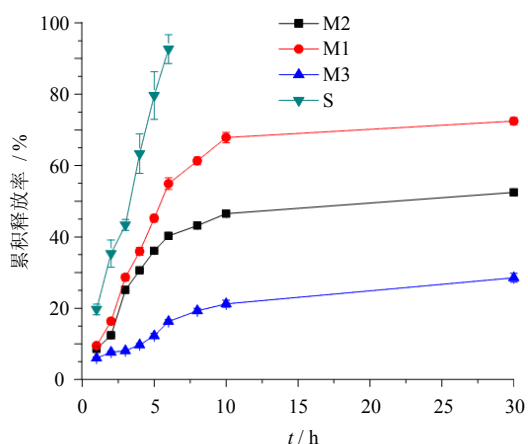


图2 不同基质类型软膏和紫苏醇过饱和水溶液的体外释放结果 ($n=3$)

Fig. 2 *In vitro* release curves of different base types of ointment and perillyl alcohol supersaturated solution ($n=3$)

2.7 体外经皮渗透性实验

2.7.1 色谱条件 同“2.5.1”项。

2.7.2 线性关系考察 精密吸取对照品 10 mg, 置于 50 mL 量瓶中, 用含有 30%乙醇的生理盐水溶解并稀释至刻度, 得到质量浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品储备液。分别精密吸取储备液 0.05、0.1、0.25、0.5、1.0、3.0、5.0 mL 置 10 mL 量瓶中, 加生理盐水至刻度, 摇匀, 得到质量浓度为 1.0、2.0、5.0、10、20、60、100 $\mu\text{g/mL}$ 的系列对照品溶液, 各吸取 20 μL 进样, 记录峰面积。以峰面积积分值为纵坐标 (Y), 进样质量浓度为横坐标 (X) 进行线性回归, 得回归方程 $Y=15.815X-4.3235$, $r=0.9995$, 结果表明紫苏醇在 1~100 $\mu\text{g/mL}$ 与峰面积积分值具有良好的线性关系; 精密度 RSD 为 1.98% ($n=5$); 平均回收率为 98.6%, RSD 为 2.03%, 由图 1-D、E 可知, 空白接收液对紫苏醇的量测定没有影响, 该检测方法的专属性符合要求。

2.7.3 体外透皮试验 取雄性大鼠腹部脱毛, 禁食 12 h 后, 脱颈椎处死, 剥离腹部皮肤, 小心刮去脂肪组织和粘连物, 用蒸馏水和生理盐水冲洗干净, 于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。试验前将离体大鼠皮肤用生理盐水解冻, 并检查皮肤有无破损。

采用直立式 Franz 扩散池^[13]均匀涂布在离体大鼠皮肤角质层面, 角质层面向供给池, 真皮层面向接收液; 供给池分别装入紫苏醇过饱和水溶液 1 mL (2.89 mg/mL), 不同基质类型的紫苏醇软膏 (M1: 乳剂型, M2: 水溶性, M3: 油溶性) 1 g (2.89 mg/g),

接收池中加入 2 mL 含有 30%乙醇的接收液, 并在接收池中加入磁力搅拌转子; Franz 池固定在透皮仪上, 未给药前先在 $(32\pm0.5)\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴恒温 1 h, 以 200 r/min 的速率进行磁力搅拌。分别于 0.25、0.5、1、2、4、6、8、10 h 取接收液 1 mL, 立即补加等量的新鲜接收介质, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, HPLC 检测接收液中药物的浓度, 并计算各处方 (M1、M2、M3、S) 的累积渗透量 (Q_n , $\mu\text{g/cm}^2$), 结果见图 3。

$$Q_n = (C_n V_0 + \sum_{i=1}^{n-1} C_i V_i) / A$$

C_n 为 t 时紫苏醇质量浓度, C_i 为 t 之前紫苏醇质量浓度, V_0 为接收液的总体积 (2 mL), V_i 为每次取样的体积 (1 mL), A 为有效扩散面积 (0.785 cm^2)

以 Q_n 对时间 t 进行线性回归^[14], 所得到的斜率即透皮速率常数 (J_s , $\mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$), 结果见表 2。因为紫苏醇是用于治疗皮肤癌的抗肿瘤药物, 临床上的给药方式大部分为局部给药, 所以一般常用 J_s , 即透皮速率作为指标来衡量不同制剂的经皮渗透效果。紫苏醇乳剂型软膏、紫苏醇水溶性软膏、紫苏醇油溶性软膏和紫苏醇过饱和水溶液的 J_s 分别为 9.42、5.60、1.18、0.74 $\mu\text{g}/(\text{h}\cdot\text{cm}^2)$ 。结果表明, 3 种不同基质的紫苏醇软膏经皮渗透吸收有显著区别, 乳剂型软膏的 Q_n 和 J_s 均明显高于水溶性软膏、油溶性软膏和紫苏醇过饱和水溶液。

3 讨论

在制备紫苏醇软膏时, 硬脂酸、单硬脂酸甘油

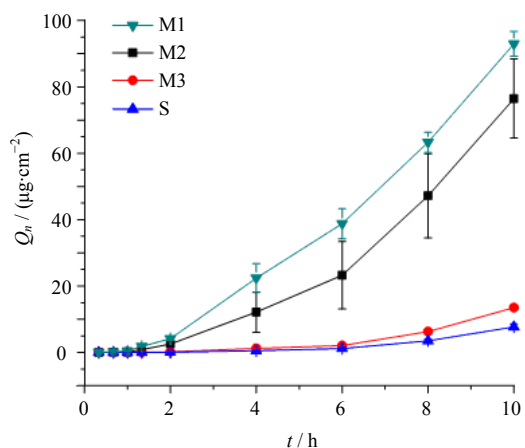


图3 紫苏醇不同基质软膏及紫苏醇过饱和水溶液的经皮渗透曲线 ($n=3$)

Fig. 3 Transdermal permeation curves of perillyl alcohol in different types of ointment base and perillyl alcohol supersaturated solution ($n=3$)

表2 紫苏醇溶液与其不同处方软膏的渗透动力学方程及透皮参数比较 ($n=3$)Table 2 Transdermal dynamic equations and permeability parameters of perillyl alcohol solution and perillyl alcohol ointment with different formula ($n=3$)

组别	Q_n - t 方程	$J_s /$ ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$)	$Q_{10} /$ ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)
S	$Q_n=0.741\ 4\ t-1.124\ 4$	0.74	8.57
M1	$Q_n=9.423\ 1\ t-10.264$	9.42	92.85
M2	$Q_n=5.601\ 5\ t-7.842$	5.60	62.90
M3	$Q_n=1.175\ 3\ t-1.734\ 5$	1.18	13.68

酯等的用量应考虑季节、气候等因素适当调整。当温度低于 75 ℃ 时, 单硬脂酸甘油酯不易溶解, 但温度过高时紫苏醇易挥发, 造成损失, 所以当乳化温度降至 55 ℃ 时加入紫苏醇为宜。

紫苏醇过饱和水溶液药物释放较快, 2 h 基本释放完全, 制成软膏后药物显然释放缓慢, 说明紫苏醇制成软膏可以作为紫苏醇一个理想的载体。本课题组在处方中加入了液体石蜡、三乙醇胺、羊毛脂等脂质材料和表面活性剂, 它们具有良好的组织相容性和体内可降解性, 可作为药物载体。实验证明这些脂质材料和表面活性剂具有很好的生物黏附特性, 使紫苏醇软膏具有缓释性, 通过软膏基质将药物包含于其中, 从而减少给药剂量, 避免副作用。

在体外经皮渗透试验中, 由于紫苏醇不溶于水, 在检测了紫苏醇在 20%、30% 乙醇溶液、磷酸盐缓冲液、0.5% 十二烷基硫酸钠溶液、1% 十二烷基硫酸钠溶液中溶解度的基础上, 综合考虑紫苏醇的溶解度、漏槽条件和介质对皮肤的影响, 选择了 30% 乙醇溶液作为透皮接收介质。

软膏基质类型也影响药物的经皮渗透, O/W 型基质软膏中药物的经皮渗透速率较快, 同时由于基质中含有水分, 增强了软膏的润滑性, 易于给药。本研究也证实 O/W 型紫苏醇软膏中紫苏醇的 Q_{10} 大于油性、水溶性型软膏, 皮肤 Q_n 的增加还可能与 O/W 型软膏的乳化剂种类用量, 原料药紫苏醇为单萜类物质自身具有的协同促渗透作用有关。

本制剂制备工艺简单, 基质中大多为脂溶性基质: 白凡士林是软膏的主要基质, 是一种良好的保湿剂; 单硬脂酸甘油酯作为乳化剂使膏体细腻, 液体石蜡在此作为软膏的润滑剂, 使软膏具有良好的

涂展性。由于处方中各物质密度不一致, 软膏容易在高温条件下出现高密度物质沉降到底部的现象, 因此在储藏过程中应避免使软膏长期处于 60 ℃ 以上条件。迄今为止, 国内尚无上市的紫苏醇外用制剂及相关临床研究, 本实验制备的紫苏醇乳剂型软膏无须添加促渗剂即可达到很好的透皮吸收效果, 为进一步开发紫苏醇透皮吸收制剂奠定了基础。

参考文献

- [1] 胡东, 陈燕. 食物来源单萜类物质紫苏醇的抗癌作用 [J]. 临床血液学杂志, 2001, 14(3): 141-143.
- [2] 韩丽, 李福臣, 刘洪富, 等. 紫苏的综合开发利用 [J]. 食品研究与开发, 2004, 25(3): 24-26.
- [3] 韦保耀, 黄丽, 滕建文. 紫苏属植物研究进展 [J]. 食品科学, 2005, 26(4): 274-276.
- [4] Wagner J E, Huff J L, Rust W L, et al. Perillyl alcohol inhibits breast cell migration without affecting cell adhesion [J]. *J Biomed Biotechnol*, 2002, 2(3): 136-140.
- [5] Belanger J T. Perillyl alcohol applications in oncology [J]. *Altern Med Rev*, 1998, 3(6): 448-457.
- [6] Xu M, Floyd H S, Greth S M, et al. Perillyl alcohol-mediated inhibition of lung cancer cell line proliferation: Potential mechanisms for its chemotherapeutic effects [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2004, 195(2): 232-246.
- [7] Bailey H H, Levy D, Harris L S, et al. A phase II trial of daily perillyl alcohol in patients with advanced ovarian cancer: Eastern cooperative oncology group study E2E96 [J]. *Gynecol Oncol*, 2002, 85(1): 464-468.
- [8] 崔福德. 药剂学 [M]. 第6版. 北京: 人民卫生出版社, 2008.
- [9] 边海疆. 莪术残油软膏剂的制备工艺及质量研究标准 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2010.
- [10] 李云霞. CA 软膏的研制 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2007.
- [11] 于莲, 杜妍, 田丽华, 等. 叶酸修饰水飞蓟宾固体脂质纳米粒的制备及其对 A549 细胞抑制作用研究 [J]. 中草药, 2013, 44(2): 158-164.
- [12] Sahin M B, Perman S M, Jenkins G, et al. Perillyl alcohol selectively induces G₀/G₁ arrest and apoptosis in Bcr/Ab transformed myeloid cell lines [J]. *Leukemia*, 1999, 13(10): 1581-1591.
- [13] 刘婷, 甄小龙, 程昊, 等. 银杏内酯 B 柔性纳米脂质体的制备及体外透皮研究 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(17): 2181-2184.
- [14] 李华. 长春西汀透皮给药系统的设计与评价 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2004.