

在体皮肤微透析技术评价苦参碱传递体的透皮释药性能

张亚军¹, 杨建宏², 韩娇娇¹, 戴贵东^{2*}

1. 西北大学生命科学学院, 陕西 西安 710069

2. 宁夏医科大学药学院, 宁夏 银川 750004

摘要: **目的** 考察苦参碱传递体对大鼠经皮给药后皮肤局部药物质量浓度经时变化, 评价其透皮释药性能。**方法** 大鼠腹部脱毛, 以非封闭方式经皮给予苦参碱传递体混悬液, 应用微透析采样技术, 结合 RP-HPLC 法, 测定皮肤透析液中的药物质量浓度; 比较苦参碱传递体及其脂质体、水溶液 (含 0.8% 去氧胆酸钠) 经皮给药后大鼠皮肤透析液中药物质量浓度经时曲线的差异。**结果** 苦参碱传递体给药后透析液中药物质量浓度达峰时间 (t_{\max}) 为 (4.200 ± 0.447) h, 最大药物浓度 (C_{\max}) 为 (0.927 ± 0.251) $\mu\text{g}/\text{mL}$, 药时曲线下面积 (AUC_{0-8}) 为 (5.033 ± 1.526) $\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。苦参碱传递体的 C_{\max} 和 AUC_{0-8} 显著高于其脂质体和水溶液 (含 0.8% 去氧胆酸钠), 而 t_{\max} 较后两者显著减小 ($P < 0.05$)。**结论** 在体皮肤微透析可用于苦参碱传递体的透皮释药性能评价; 苦参碱传递体具有透皮快、渗透量高等特点。

关键词: 苦参碱传递体; 透皮性能; 体内评价; 皮肤微透析; RP-HPLC

中图分类号: R969.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)23-3341-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.23.015

In vivo evaluation on transdermal delivery properties of matrine transfersomes by skin microdialysis method

ZHANG Ya-jun¹, YANG Jian-hong², HAN Jiao-jiao¹, DAI Gui-dong²

1. College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China

2. School of Pharmaceutical Sciences, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China

Abstract: Objective To investigate the changes of matrine concentration in rat local skin with time after transdermal administration of matrine transfersomes, and to evaluate the transdermal delivery properties. **Methods** The matrine transfersomes were applied non-occlusively onto rat skin *in vivo* with abdominal hair removal, and the concentration of drugs in microdialysate of skin was detected by microdialysis and reverse phase high performance liquid chromatography. Furthermore, the concentration-time curves of matrine in microdialysates of skin were compared among marine transfersomes, liposomes, and deoxysodium cholate solution. **Results** After the transfersomes were given to rats, the maximum peak time (t_{\max}) of matrine skin concentration appeared at (4.200 ± 0.447) h. The maximum skin concentration (C_{\max}) was (0.927 ± 0.251) $\mu\text{g}/\text{mL}$ and area under the curve (AUC_{0-8}) was (5.033 ± 1.526) $\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$, which were much higher than those of the liposomes and the solution (containing 0.8% sodium deoxycholate, $P < 0.05$), while t_{\max} shortened much more than that of them. **Conclusion** *In vivo* skin microdialysis could be used to assess the transdermal delivery properties of matrine transfersomes. And matrine transfersomes have the good transdermal permeability and efficacy.

Key words: matrine transfersomes; transdermal properties; *in vivo* evaluation; transdermal microdialysis; reverse phase high performance liquid chromatography

苦参碱 (matrine) 是豆科植物苦参、山豆根、苦豆子中的主要成分之一, 具有广泛的药理活性, 如抗炎、杀菌、抗心律失常、抗肿瘤等, 用于治疗多种皮肤病、慢性乙型肝炎、肿瘤等^[1-2]。近年来,

对苦参碱经皮给药制剂的研究方兴未艾, 研究者采用微乳、醇质体等新型递药系统来提高药物的经皮渗透率^[3-4]。传递体由常规脂质体经处方改进而得, 即在脂质体的处方中不加或少加胆固醇, 加入表面

收稿日期: 2013-05-24

基金项目: 宁夏回族自治区科技攻关计划项目 (201087)

作者简介: 张亚军 (1970—), 男, 副教授, 主要从事中药制剂及其体内过程研究。Tel: (029)88302686 E-mail: zyjlyj@163.com

*通信作者 戴贵东 Tel: (0951)6980193 E-mail: daiguiddong@126.com

活性剂如胆酸钠、去氧胆酸钠、聚山梨酯或司盘等作为膜软化剂,使其类脂膜具有高度的变形能力,能更有效地传输药物通过角质层,进入皮肤深层甚至血液循环^[5]。建立以传递体为载体的苦参碱经皮给药系统,是提高苦参碱皮肤渗透性的新探索。

透皮释药性能是经皮制剂的研究重点之一。目前对苦参碱经皮制剂的相关研究主要有离体扩散实验和体内血药浓度测定等^[3-4,6]。然而离体皮肤的生理状况与在体皮肤存在很大差异,且缺乏主动转运过程,无法揭示药物透皮的速率和程度等真实状况;而全身药动学实验不能提供药物在皮肤局部的分布和代谢,因此不宜用其治疗皮肤疾病的外用制剂进行评价^[7]。微透析技术作为一种新的用于透皮研究的采样技术,具有实时、在体、微创等特点^[8-9]。该技术将微透析探针埋植于皮肤下,利用探针的半透膜与药物在膜两侧的浓度差,对组织液中的药物进行回收取样,测定实验动物或人体皮肤组织内的药物浓度,能真实地反映药物透皮吸收的动态过程。本实验采用在体皮肤微透析技术,对苦参碱传递体透皮给药后的皮肤药动学进行研究,考察其透皮释药特征,为苦参碱传递体的开发应用提供实验依据。

1 材料

1.1 药物与试剂

苦参碱,质量分数 $\geq 98\%$,西安小草植物科技有限责任公司;大豆卵磷脂,德国 Lipoid 公司;胆固醇,上海山浦化工有限公司;苦参碱对照品,质量分数 $\geq 98.0\%$,中国食品药品检定研究院,批号 110805-200508;去氧胆酸钠,质量分数 $\geq 99.0\%$,上海蓝季科技发展有限公司;乙腈为色谱纯;其他试剂均为分析纯。

1.2 动物

Wistar 大鼠,雄性,体质量 (200 ± 20) g, SPF 级,由西安交通大学实验动物中心提供,合格证号:医动字第 08-005 号。

1.3 仪器

Agilent 1100 Series 高效液相色谱仪、DAD 紫外检测器、色谱工作站,美国 Agilent 公司;微透析设备和系统 [包括 EFC-82 透析液采集器、ESP-64 微量注射泵(1 mL)、CMA20 微透析探针(膜长 10.0 mm,截留相对分子质量 20 000)],日本 Eicom 公司;NTI 脂质体挤出器,恩梯埃机械上海有限公司;微孔滤膜(0.2 μm),英国 Whatman 公司。

2 方法与结果

2.1 苦参碱传递体的制备

称取磷脂 0.5 g、去氧胆酸钠 0.1 g、胆固醇 0.1 g,置 1 000 mL 圆底烧瓶中,加 30 mL 甲醇-二氯甲烷(2:1)混合溶液溶解,40 $^{\circ}\text{C}$ 下减压旋转除去溶剂,得到干膜。室温下抽真空 1 h,500 mmol/L 柠檬酸缓冲液 10 mL (pH 值 4.0) 水化,振摇,使瓶壁上的膜溶散,过 0.2 μm 微孔滤膜 2 次,即得空白传递体混悬液。

取空白传递体混悬液 8.0 mL,加 10 mg/mL 苦参碱水溶液 2.0 mL,氢氧化钠溶液(1 mol/L)调外水相 pH 值为 8.0,于 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中孵化 1 h,取出后迅速冷却,即得载苦参碱的传递体混悬液。包封率为 $(64.53 \pm 3.02)\%$,粒径为 (175 ± 21) nm。

2.2 苦参碱 HPLC 法测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent TC C₁₈ 柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.2%磷酸水溶液(7:93);体积流量 0.8 mL/min;检测波长 220 nm;进样量 100 μL 。

2.2.2 对照品溶液制备 精密称取一定量的苦参碱对照品,用甲醇配制成 51.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的母液,取不同体积的母液进行稀释,配成质量浓度分别为 10.2、5.1、2.55、1.275、0.637 5、0.318 8、0.159 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的对照品溶液。

2.2.3 方法学考察

(1) 专属性试验:取在体微透析空白透析液、苦参碱对照品溶液和苦参碱传递体透析液,按“2.2.1”项下色谱条件测定。色谱图见图 1。苦参碱传递体透析液中苦参碱的保留时间与苦参碱对照品基本一致,透析液中其他物质不干扰苦参碱的测定。表明本法专属性良好。

(2) 线性关系考察:取不同质量浓度的苦参碱对照品溶液 10.2、5.1、2.55、1.275、0.637 5、0.318 8、0.159 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$,按“2.2.1”项下色谱条件进样分析。以苦参碱质量浓度(X)对峰面积(Y)进行线性回归,得回归方程 $Y=50.63 X+3.55$ ($r=0.999 2$),表明苦参碱在 0.159 4~10.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 线性关系良好。按信噪比(S/N)=3 确定苦参碱的检测限为 18.93 ng/mL;按 S/N=10 确定其定量限为 63.1 ng/mL。

(3) 精密度试验:用空白透析液配制质量浓度分别为 0.215 3、1.076、5.382 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件测定,重复进样 3 次,测

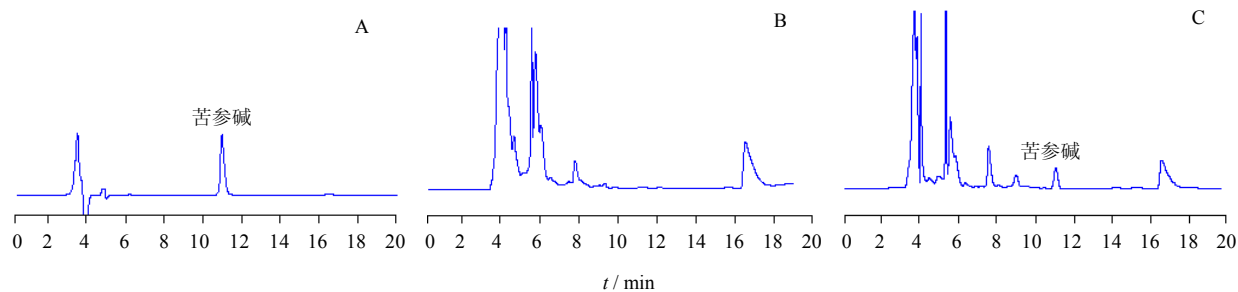


图 1 苦参碱对照品溶液 (A)、空白透析液 (B) 和苦参碱传递体透析液 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference solution (A), blank microdialysate (B), and matrine transfersome microdialysate (C)

定苦参碱的峰面积。结果低、中、高质量浓度的苦参碱溶液峰面积的 RSD 分别为 2.20%、1.26%、1.32%。

(4) 稳定性试验：取“精密度试验”项下供试品溶液 (1.076 $\mu\text{g/mL}$)，分别于 0、2、4、6、8、12 h 进样，测定其峰面积。结果 RSD 为 1.15%，表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

(5) 探针的体外回收率实验^[10] 将探针的透析膜完全浸没在含苦参碱 0.637 5 $\mu\text{g/mL}$ 的生理盐水中，水温保持在 38 $^{\circ}\text{C}$ ，分别用质量浓度为 0.159 4、0.318 8、0.637 5、0.926 2、1.215 $\mu\text{g/mL}$ 的苦参碱生理盐水溶液进行灌注，体积流量 2.5 $\mu\text{L/min}$ ，每 1 小时收集 1 份透析液，每个质量浓度收集 3 份，按“2.2.1”项下色谱条件测定。改变灌注液时，用待灌注溶液灌流冲洗 20 min。

以透析液与灌注液的质量浓度差 ($C_d - C_p$) 和灌注液的质量浓度 (C_p) 作图，进行线性回归，得回归方程为 $C_d - C_p = -0.590 9 C_p + 0.375 7$ ($r = 0.995 4$)。直线的斜率为探针的回收率 59.09%。该直线的线性相关系数大于 0.99，表明横坐标上、下两部分直线的斜率基本相等，即本实验中苦参碱的回收率和传递率基本相等。因此，可以应用反向透析法测定探针的在体回收率。

(6) 探针的在体回收率实验 Wistar 大鼠腹部脱毛，24 h 后 ip 1%戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 溶液麻醉并固定，将探针埋入大鼠腹部真皮层中，以生理盐水为灌注液进行微透析，体积流量为 2.5 $\mu\text{L/min}$ ，透析灌流 1.5 h，恢复大鼠探针植入局部血流量水平。平衡后分别用 0.318 8、0.637 5、0.926 2 $\mu\text{g/mL}$ 的苦参碱生理盐水溶液为灌注液，每 1 小时收集 1 份透析样品，收集 3 份。改变灌注液时，用待灌注溶液灌流冲洗 20 min。各样品注入高效液相色谱仪

进行分析，计算各质量浓度溶液的在体回收率。结果见表 1 和 2。可见灌注液的质量浓度对上述反向透析法测定探针的在体回收率无显著影响。

表 1 探针的在体回收率 ($n = 3$)

Table 1 *In vivo* recovery rate of probe ($n = 3$)

灌注液中苦参碱 / ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	在体回收率 / %
0.318 8	43.16~46.53
0.637 5	44.92~48.55
0.926 2	42.81~47.59

表 2 方差分析

Table 2 Analysis of variance

方差来源	离均差平方和	自由度	F 值	显著性
组间	5.759×10^{-3}	2	4.03	—
组内	4.287×10^{-3}	6		

$F_{0.05}(2, 6) = 5.14$

2.3 苦参碱传递体透皮吸收在体实验

实验用动物及其处理方法同“探针的在体回收率实验”。探针植入后，以 2.5 $\mu\text{L/min}$ 体积流量灌流生理盐水，平衡 1.5 h，收集空白透析液。剪取面积 1.5 cm \times 3 cm 的双层纱块，覆盖于透析膜上方的大鼠腹部皮肤脱毛区，滴加苦参碱传递体混悬液、苦参碱脂质体混悬液（制法同苦参碱传递体，处方中不含去氧胆酸钠）、相同质量浓度的苦参碱水溶液（含 0.8% 去氧胆酸钠），并在整个实验过程中间隔补加供试品溶液，使纱块网眼内保持湿润。每 1 小时收集 1 份透析液，注入高效液相色谱仪，测定透析液中的苦参碱质量浓度，按体内探针在体回收率的结果校正，求得皮肤组织中的实际苦参碱质量浓度 ($\rho = \rho_{\text{透析液}} / \text{在体回收率}$)，以皮肤组织中的 ρ 对时间作图，结果见图 2。采用统计矩法经 DAS 2.0 软件

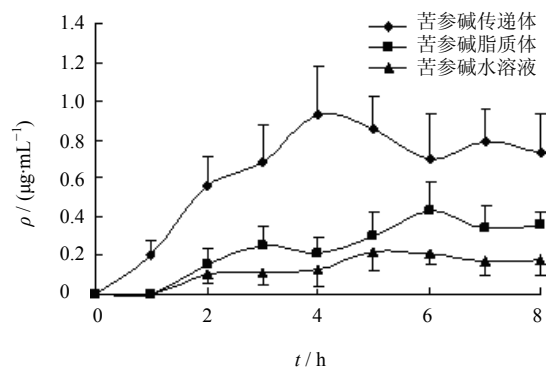


图2 不同透析液中苦参碱的质量浓度-时间曲线
($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 2 Concentration-time profile of matrine in various microdialysates ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

表3 苦参碱传递体经皮给药苦参碱吸收的主要药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 3 Pharmacokinetic parameters of matrine in transdermal delivery of matrine transfersomes ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

参数	单位	苦参碱传递体	苦参碱脂质体	苦参碱水溶液
C_{\max}	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$0.927 \pm 0.251^*$	0.429 ± 0.153	0.223 ± 0.108
t_{\max}	h	$4.200 \pm 0.447^*$	6.000 ± 0.707	5.400 ± 0.548
AUC_{0-8}	$\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$	$5.033 \pm 1.526^*$	1.948 ± 0.671	1.094 ± 0.485

与苦参碱脂质体、苦参碱水溶液比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs liposomes and water solution of marine

比较二者结果,证实回收率和传递率相等^[11]。本实验通过质量浓度差法测定苦参碱体外回收率,达到同样目的。有研究表明,灌注液的体积流量与回收率呈负相关,体积流量在2~10 $\mu\text{L}/\text{min}$ 时,回收率保持相对稳定^[12]。曾比较以1.5、2.0、2.5、3.0 $\mu\text{L}/\text{min}$ 灌注对苦参碱回收率的影响,结果以2.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的体积流量灌注的回收率较高,进而选择采样时间为1 h,进样量为100 μL ,提高了检测灵敏度,增强透析液的可测性。虽然探针埋植入皮下仅造成轻微创伤,但植入位置的组织中小分子物质浓度和组织血液灌注量的改变可能会影响研究结果,故在探针植入大鼠皮肤后应平衡1.5 h,以减轻血管反应^[13]。对于探针位置的表皮脱毛处理,应注意避免损伤角质层,并在大鼠脱毛后饲养24 h再用于实验,以减少实验误差。此外,实验动物个体皮肤差异、探针皮下植入深度等因素也会影响结果的重现性,因此实验中采用同批次动物、相同植入位置和同一人员进行植入操作等措施加以改善。

传递体的透皮机制目前尚未完全明确,推测有两种可能,一是完整的传递体携带药物透过角质层,二是传递体的脂质双层进入角质层,改变细胞间性

质,从而使游离药物易于透过皮肤^[14]。本实验结果表明,苦参碱传递体与具有一定促渗作用的脂质载体^[15]、去氧胆酸钠溶液相比,透皮速率度较快、渗透量较大,表明传递体作为药物载体在帮助药物穿透角质层、进入皮肤深层的过程中起重要作用,而并非磷脂对角质层细胞的融合作用及去氧胆酸钠促渗作用的简单加和。另外,传递体的透皮动力主要来自渗透梯度和水合力的作用,传递体溶液在皮肤表面随水分蒸发,有向含水量丰富的真皮层进入的趋势。因此,本实验采用非封闭给药方式,在大鼠腹部皮肤表面滴加苦参碱传递体混悬液,发挥传递体透皮的水合力作用。

进行分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用SPSS 14.0统计软件进行 t 检验,主要药动学参数见表3。结果显示,苦参碱传递体给药后,皮肤中的药物浓度较快达到峰值,且 C_{\max} 和AUC明显高于苦参碱脂质体和苦参碱水溶液,表明传递体能提高苦参碱的透皮渗透性能,具有更好的透皮效果。

3 讨论

在皮肤微透析实验中有许多因素可对研究结果产生影响,如探针的回收率、探针的植入和实验动物的皮肤差异等。探针回收率的校正多采用反向透析法,但并非所有药物都可以用此法校正,使用该法的前提是探针对药物的相对回收率和传递率相等。有研究者用增量法和减量法分别测定回收率,

为获得药物透皮累积效应,在本实验中用纱块在大鼠皮肤表面形成“药液贮库”。但随着实验时间推移,传递体在大鼠皮肤表面沉积可能会影响药物的渗透,同时,其在皮肤表面失水的过程或在透皮时,泡囊可能发生融合而使传递体达不到相应快速、大量透皮效果,这些问题有待进一步深入探索。

参考文献

参考文献

- [1] 张丽华,陈邦恩,潘明佳.苦参碱药理作用研究进展[J].中草药,2009,40(6):1000-1003.

- [2] 鲍娇琳, 陆金健, 陈修平, 等. 苦参碱与氧化苦参碱抗肿瘤作用及其机制的研究进展 [J]. 中药新药与临床药理, 2012, 23(3): 369-373.
- [3] 魏 红, 付 正, 陈龙华, 等. 微乳基质对苦参碱经皮渗透的影响 [J]. 中国医药工业杂志, 2010, 41(7): 513-517.
- [4] 刘星言, 刘 宏, 张阳德, 等. 苦参碱醇质体的制备及其体外透皮性能 [J]. 中国组织工程研究及与临床康复, 2009, 13(25): 4857-4860.
- [5] 郑俊民. 经皮给药新剂型 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006.
- [6] 魏 红, 张 振, 牛晓方. 苦参碱微乳经皮给药在小鼠体内的药动学及组织分布研究 [J]. 中国药学杂志, 2010, 15(21): 1939-1943.
- [7] 陈 芳, 胡晋红, 朱 全. 微透析技术在皮肤药动学研究中的应用 [J]. 药学服务与研究, 2012, 12(1): 30-33.
- [8] 徐月红, 叶 卉, 郭秀彩, 等. 微透析联用反相高效液相色谱研究白芥子涂方皮肤药动学 [J]. 中草药, 2012, 43(2): 336-340.
- [9] 王 丹, 刘春生, 刘艳霞, 等. 微透析与高效液相色谱在线联用技术校正大鼠皮下阿魏酸线性探针 [J]. 分析化学, 2012, 40(1): 164-168.
- [10] Wang X M, He H B, Leng W, *et al.* Evaluation of brain-targeting for the nasal delivery of estradiol by the microdialysis method [J]. *Int J Pharm*, 2006, 317(1): 40-46.
- [11] 刘继勇, 韩 盈, 胡晋红, 等. 基于微乳凝胶新载体的丹皮酚经皮给药系统的构建及药代动力学研究 [J]. 药学学报, 2012, 47(2): 244-249.
- [12] Kreilgaard M. Assessment of cutaneous drug delivery using microdialysis [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2002, 54(Supp11): S99-S121.
- [13] Groth L, Serup J. Cutaneous microdialysis in man: effects of needle insertion trauma and anaesthesia on skin perfusion, erythema and skin thickness [J]. *Acta Derm Venereol*, 1998, 78(1): 5-9.
- [14] Sinico C, Fadda A M. Vesicular carriers for dermal drug delivery [J]. *Expert Opin Deliv*, 2009, 6(8): 813-825.
- [15] Abraham W, Downing D T. Interaction between corneocytes and stratum corneum lipid liposomes *in vitro* [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1990, 1021(2): 119-125.