

## • 药剂与工艺 •

## 去甲泽拉木醛醇质体凝胶的制备及其体外透皮研究

徐晓勇<sup>1</sup>, 马凤森<sup>1,2\*</sup>, 楼芳芳<sup>1</sup>, 梁宜<sup>2</sup>

1. 浙江工业大学药学院, 浙江 杭州 310014

2. 浙江中医药大学附属第三医院, 浙江 杭州 310009

**摘要:** 目的 制备去甲泽拉木醛(DMZ)醇质体及其凝胶剂,并考察其制剂性能和体外透皮特性。方法 采用注入法制备DMZ醇质体,并对其粒径、包封率、分析方法学及体外释放行为进行研究。采用改良的Franz扩散池进行醇质体凝胶的体外透皮试验。结果 DMZ醇质体外观为淡黄乳状液,平均粒径为(365.2±14.4)nm,包封率为(72.30±2.31)%。醇质体凝胶中DMZ的体外透皮行为符合Higuchi方程( $Q=80.198 t^{1/2}-71.641$ ,  $r=0.9868$ ),其24h的累积渗透量是普通凝胶的3.94倍。结论 醇质体凝胶可良好地改善DMZ的透皮行为,为雷公藤有效成分的局部透皮制剂的开发提供依据。

**关键词:** 去甲泽拉木醛;醇质体;体外透皮;凝胶剂;Higuchi方程;雷公藤;累积渗透量

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)12-1693-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.12.007

## Preparation of ethosomes-based gel of demethylzeylasteral and its transdermal behavior *in vitro*

XU Xiao-yong<sup>1</sup>, MA Feng-sen<sup>1,2</sup>, LOU Fang-fang<sup>1</sup>, LIANG Yi<sup>2</sup>

1. College of Pharmaceutics, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China

2. The Third Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310009, China

**Abstract: Objective** To prepare the ethosomes-based gel of demethylzeylasteral (DMZ) and to investigate its properties and transdermal absorption behavior. **Methods** The infusion method was used to prepare DMZ ethosomes. The particle size, entrapment efficiency (EE), analysis methodology, and *in vitro* release behavior were examined, respectively. The *in vitro* transdermal absorption of ethosomes-based gel of DMZ was evaluated by Franz diffusion cells. **Results** The DMZ ethosomes was yellowish emulsion. The average particle size of the ethosomes was (365.2 ± 14.4) nm and the EE was (72.30 ± 2.31)%. The cumulative permeation curve of DMZ in ethosomes-based gel was consistent with Higuchi equation ( $Q = 80.198 t^{1/2} - 71.641$ ,  $r = 0.9868$ ). Compared with common gel, the ethosomes-based gel had 3.94 times higher cumulative permeation amount in 24 h. **Conclusion** The prepared ethosomes-based gel of DMZ could enhance the transdermal permeation, which provides evidence for the development of transdermal drug delivery system of DMZ.

**Key words:** demethylzeylasteral; ethosomes; *in vitro* transdermal behavior; gel; Higuchi equation; *Tripterygium wilfordii* Hook. f.; cumulative permeation amount

雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f. 系卫矛科植物雷公藤的全株,有祛风活络、破瘀止痛等功效,临床常用于风湿性和类风湿性关节炎的治疗<sup>[1]</sup>。去甲泽拉木醛(demethylzeylasteral, DMZ)属于雷

公藤三萜类成分,DMZ有较强的免疫抑制作用<sup>[2]</sup>,LD<sub>50</sub>为1295 mg/kg<sup>[3]</sup>。与雷公藤其他三萜类成分相比,其毒性较低,且含量很高,可以作为雷公藤药材及其各类制剂中有效成分的质量控制指标之一。

收稿日期: 2013-12-24

基金项目: 浙江省重大科技专项重点社会发展项目(2010C13014);浙江省“重中之重”学科(针灸推拿学)开放基金项目(ZTK2010A13)

作者简介: 徐晓勇(1991—),男,硕士在读,研究方向为透皮新剂型。Tel: 15068857772 E-mail: xuxiaoyongjq@163.com

\*通信作者 马凤森,男,教授,硕士生导师,主要从事药物剂型开发研究。Tel: 13306502993 E-mail: merrigen@126.com

目前已上市的雷公藤制剂主要有雷公藤多苷片、雷公藤片、雷公藤双层片和雷公藤总萜片等<sup>[4]</sup>，而雷公藤的经皮给药制剂却极少被研究。醇质体是一种含有高体积分数乙醇的新型脂质体，具有较好的柔韧性、较强的穿透能力及良好的载药量<sup>[5]</sup>。将 DMZ 制备成局部应用的醇质体凝胶可以使 DMZ 易于透过皮肤角质层并降低不良反应，达到局部给药的目的。目前，尚未见有关 DMZ 经皮给药的研究报道。

## 1 仪器与试剂

Agilent 1200 高效液相色谱仪：G1312A 二元泵，G1316A 柱温箱，G1314B VWD 可变波长紫外检测器，LC 系统的安捷伦化学工作站，美国 Agilent 公司；XS205 电子微量天平，瑞士 Mettler Toledo 公司；JY92 超声波细胞粉碎机，宁波新芝生物科技股份有限公司；pH S-3C pH 计，上海雷磁仪器厂；85—2 恒温磁力搅拌器，常州国华电器有限公司；Z36HK 高速冷冻离心机，德国 Hermle 公司；RYJ—12B 型药物透皮试验仪，上海黄海药检仪器有限公司；Delsa<sup>TM</sup> Nano C 粒径分析仪，美国 Beckman Coulter Inc.。

DMZ 对照品，成都瑞芬思生物科技有限公司，批号为 201202，质量分数 >98%；DMZ 纯品，南通飞宇生物技术有限公司，批号为 FY18540803，质量分数为 99%；Lipoid S100 大豆卵磷脂，德国 Lipoid 公司，批号为 201210；卡波姆 934，南京威尔化工有限公司，批号为 20120903；月桂氮卓酮，天门科捷制药有限公司，批号为 111001；聚乙二醇 400，上海浦东高南化工厂，批号为 111156；甲醇、乙腈为色谱纯；水为超纯水；其他试剂均为分析纯。

雄性昆明种小鼠，体质量 (20±2) g，清洁级，浙江省医学科学院，动物使用许可证号：SCXK (浙)-20080033。

## 2 方法与结果

### 2.1 空白醇质体的制备工艺研究及结果

采用注入法制备<sup>[6]</sup>。以单因素试验考察纯化水滴加速度、搅拌速度及超声处理对醇质体的影响。称取处方量的卵磷脂，加入无水乙醇溶解卵磷脂，置于磁力搅拌器上，保持全过程环境温度 30 ℃，于不同的搅拌速度 (1 500、1 000、500 r/min) 下以不同体积流量 (0.25、0.70、1.35 mL/min) 滴加 3.5 mL 蒸馏水，滴加完毕后继续高速搅拌 5 min，静置，放至室温，超声处理 (200 W，每超声 3 s，停 2 s，重复 6 次)，过 0.45 μm 滤膜，制得 5 mL 醇质体溶

液。密封保存。12 h 后观察性状并测定粒径。结果显示，在纯化水滴加速度为 0.70 mL/min，搅拌速度 1 500 r/min，冰浴超声时，粒径最小。

### 2.2 DMZ 测定方法的建立

#### 2.2.1 溶液的制备

(1) 对照品溶液的制备：精密称取 DMZ 对照品 5.0 mg，加甲醇制成含 DMZ 200 μg/mL 的溶液，过 0.45 μm 滤膜，即得。

(2) 空白体系溶液的制备：精密量取空白醇质体 0.5 mL，加甲醇破乳并定容至 5 mL，过 0.45 μm 滤膜，即得。

(3) 供试品溶液的制备：精密量取 DMZ 醇质体 0.5 mL，加甲醇破乳并定容至 5 mL，过 0.45 μm 滤膜，即得。

2.2.2 检测波长的确定 取对照品溶液，在紫外-可见分光光度计上于波长 200~300 nm 进行全波长扫描，根据扫描结果选择 245 nm 作为检测波长。

2.2.3 色谱条件 色谱柱为 Hypersil ODS2 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)；检测波长为 245 nm；柱温为 32 ℃；流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液 (55:45)；体积流量为 1.0 mL/min，进样量 20 μL。

2.2.4 系统适用性试验 取 DMZ 对照品溶液、空白体系溶液和供试品溶液分别注入液相色谱仪，记录色谱图，结果 DMZ 的分离度大于 1.5，理论塔板数大于 10 000。对照品、空白体系和供试品溶液的色谱图见图 1。

2.2.5 精密度试验 另取对照品溶液，在上述色谱条件下连续测定 6 次，考察仪器的精密度。结果以峰面积计算其 RSD 为 0.18%。

2.2.6 线性关系考察 分别将不同体积的 DMZ 对

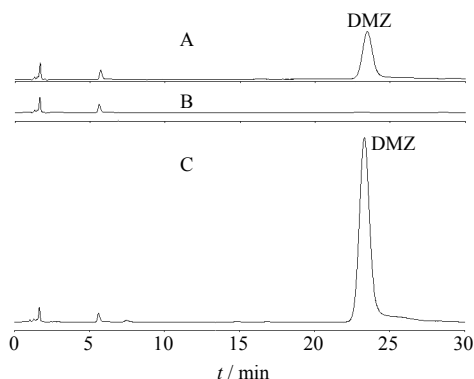


图 1 DMZ 对照品 (A)、空白体系 (B) 和供试品 (C) 溶液的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of DMZ reference substance (A), blank ethosomes (B), and DMZ ethosomes sample (C)

照品溶液注入液相色谱仪,在上述色谱条件下进行测定。以注入液相色谱仪的对照品质量为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),得回归方程为  $Y=1\ 200.9X-0.089\ 4$  ( $n=7$ ),  $r=0.999\ 7$ 。DMZ 的线性范围为  $0.1\sim 1.3\ \mu\text{g}$ 。

**2.2.7 回收率试验** 精密量取 DMZ 醇质体 0.25 mL,加入等质量对照品溶液,摇匀,加甲醇破乳并定容至 5 mL,过  $0.45\ \mu\text{m}$  滤膜。平行制备 6 份,分别注入液相色谱仪,测定,计算得 DMZ 的平均回收率为 95%,RSD 为 1.12%。

**2.2.8 重复性试验** 取同一份 DMZ 醇质体,按照供试品溶液的制备方法平行制备 6 份,分别注入液相色谱仪,验证方法的精密度,测定得其 RSD 为 1.07%。

**2.2.9 稳定性试验** 取供试品溶液分别于 0、2、4、6、8、10、12 h 注入液相色谱仪,测定,以峰面积计算 RSD 为 1.2%,说明供试品溶液在 12 h 内稳定。

**2.3 DMZ 醇质体的处方研究及结果**

**2.3.1 DMZ 醇质体的处方优选** 根据文献报道<sup>[7]</sup>与预试验结果,选取对醇质体包封率影响较大的 3 个考察因素:卵磷脂用量(A, g)、乙醇体积分数(B, %)、投药量[C, mL,以室温常压下 DMZ 的饱和乙醇溶液(38 mg/mL)计算加药量]进行正交试验设计,试验设计及结果见表 1,方差分析见表 2<sup>[6]</sup>。实验过程中每个样品共制备 5 mL。制备过程及参数设定参照“2.1”项下实验结果。

表 1  $L_9(3^4)$  正交试验设计及结果

序号	A/g	B/%	C/mL	D(误差)	包封率/%
1	0.150 (1)	30 (1)	0.60 (2)	(1)	72.3
2	0.150 (1)	35 (2)	0.75 (3)	(2)	59.3
3	0.150 (1)	40 (3)	0.45 (1)	(3)	60.0
4	0.175 (2)	30 (1)	0.75 (3)	(2)	68.7
5	0.175 (2)	35 (2)	0.45 (1)	(1)	59.3
6	0.175 (2)	40 (3)	0.60 (2)	(3)	63.3
7	0.200 (3)	30 (1)	0.45 (1)	(2)	46.5
8	0.200 (3)	35 (2)	0.60 (2)	(3)	51.2
9	0.200 (3)	40 (3)	0.75 (3)	(1)	44.3
$K_1$	191.6	187.5	165.8	175.9	
$K_2$	191.3	169.8	186.8	174.5	
$K_3$	142.0	167.6	172.3	174.5	
R	49.6	19.9	21.0	1.4	

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	543.4	2	1 358.5	$P<0.01$
B	79.3	2	198.3	$P<0.01$
C	77.0	2	192.5	$P<0.01$
D(误差)	0.4	2		

$F_{0.05}(2, 2)=19.00$   $F_{0.01}(2, 2)=99.00$

由表 1、2 可知,各影响因素的大小依次为  $A>C>B$ ,其中卵磷脂用量、乙醇体积分数、投药量的极差大于误差列的 2 倍以上<sup>[8]</sup>,具有显著影响。最佳的工艺组合为  $A_1B_1C_2$ 。

**2.3.2 DMZ 醇质体粒径考察** 室温条件下,取 DMZ 醇质体适量,以同体积分数乙醇溶液稀释 1 倍。用 Delsa<sup>TM</sup> Nano C 粒径分析仪测定粒径及粒径分布。

**2.3.3 包封率的测定** 本研究采用低温超速离心法分离醇质体和游离药物,用 HPLC 法测定游离药物量及药物总量,计算包封率 [包封率=下层沉淀中 DMZ 的总量 / (上层清液中 DMZ 的总量+下层沉淀中 DMZ 的总量)]。

精密量取 DMZ 醇质体 1.0 mL,以高速冷冻离心机 16 000 r/min 离心 2 次,每次 30 min,静置,分别将上层清液与下层沉淀用甲醇破乳并定容,过  $0.45\ \mu\text{m}$  滤膜,按照 DMZ 的色谱条件进行定量测定。

**2.3.4 DMZ 醇质体的处方研究实验结果** 根据“2.3.1”项下的正交试验设计,依据外观形态、粒径、包封率作为指标,得到  $A_1B_1C_2$  为 DMZ 醇质体的最优处方,即卵磷脂 0.150 g,30%乙醇,DMZ 投药量 0.60 mL,纯化水适量,共制得 5 mL。

按照最优处方制备的 DMZ 醇质体外观均匀、淡黄、有乳光。根据“2.3.2”、“2.3.3”项下的粒径、包封率测定方法测得所制备醇质体的平均粒径为  $(365.2\pm 14.4)\text{nm}$ ,多分散指数(polydispersity index, PDI)为  $0.322\pm 0.031$ ;包封率为  $(72.30\pm 2.31)\%$  ( $n=3$ )。

**2.4 DMZ 醇质体凝胶及普通凝胶的制备**

由于溶液剂的局限性,为了提高醇质体的稳定性及提高其应用性能,根据预试验与文献报道<sup>[9]</sup>的结果,拟定 DMZ 醇质体凝胶的处方,并将 DMZ 醇质体溶液制成相应的凝胶剂,作为给药剂型。

DMZ 醇质体凝胶的处方为卡波姆 934 1%、甘油 1%、氮酮 2%、DMZ 醇质体-DMZ 溶液(V/V, 80%)、三乙醇胺适量、超纯水适量,总量 10 mL。

采用直接溶胀法制备凝胶：取 2 mL 超纯水分散卡波姆 934，静置 12 h 使完全溶胀，加入处方量的甘油、氮酮与 DMZ 醇质体(或 2 mg/mL DMZ 30% 乙醇溶液)，搅拌均匀后用三乙醇胺调节 pH 值至 9 左右，充分搅拌后超声处理 15 min，静置 12 h 使溶胀均匀，即得。

制得的 DMZ 醇质体凝胶与普通凝胶均为橙黄色，均匀、细腻，pH 值为 8.85。

### 2.5 体外透皮实验

**2.5.1 接受液的配制** 称取 NaCl 0.9 g 以纯化水定容到 100 mL，配制生理盐水。

量取 40 mL 无水乙醇并加入 10 mL 聚乙二醇 400，生理盐水定容到 100 mL。制得含 40%乙醇和 10%聚乙二醇 400 的生理盐水接受液。

取含 DMZ 54 μg/mL 的接收液，分别于 0、2、4、6、8、10、12、24 h 注入液相色谱仪，测定，以峰面积计算其 RSD 为 1.7%。说明接收液中 DMZ 在 24 h 内的稳定性良好。

**2.5.2 小鼠离体皮肤的制备** 取健康雄性小鼠 12 只，用 7%硫化钠溶液(含 5%甘油)活体脱去其背部毛发后用生理盐水洗净皮肤，擦干后饲养 12 h。处死后剥离背部皮肤，剔除皮下脂肪和粘连物，用生理盐水洗净，待用。

**2.5.3 透皮实验<sup>[10]</sup>** 采用改良的 Franz 扩散池，上室为扩散室，下室为接收室，接收室的容积为 7 mL，有效扩散面积为 2.3 cm<sup>2</sup>，(37.0±1.0) °C 恒温水浴加热，并以 600 r/min 磁力恒速搅拌。实验时，在接收室内加满接收液，将鼠皮固定在两室之间，角质层朝上，使真皮层与接收液充分接触，排除气泡，将 DMZ 醇质体凝胶/DMZ 普通凝胶 0.5 g(含 DMZ 800 μg) 均匀涂布于皮肤角质层上。分别于时间点 2、4、6、8、10、12、24 h 取出 5 mL 接收液，同时补加同体积同温新鲜接收液。接收液过 0.45 μm 滤膜，用 HPLC 法测定 DMZ 的量，并计算累积渗透量 ( $Q_n$ )。

$$Q_n = V_0 C_n + \sum_{i=1}^{n-1} V C_i$$

$Q_n$  为第  $n$  个取样点的累积渗透量 (μg)， $C_n$ 、 $C_i$  为第  $n$  个和第  $i$  ( $i \leq n-1$ ) 个取样点的 DMZ 质量浓度 (μg/mL)， $V_0$  为接收液的体积 ( $V_0=6.5$  mL)， $V$  为取样的体积 ( $V=5$  mL)

**2.5.4 实验结果与方程拟合** 醇质体凝胶与普通凝胶中 DMZ 的透皮实验结果见表 3， $Q_n-t$  曲线方程拟合结果见表 4， $Q_n-t$  变化曲线见图 2。透皮试验结果

表 3 透皮试验结果 ( $n=3$ )

Table 3 Results of *in vitro* transdermal experiment ( $n=3$ )

$t/h$	$Q_n/\mu\text{g}$		$t/h$	$Q_n/\mu\text{g}$	
	醇质体凝胶	普通凝胶		醇质体凝胶	普通凝胶
2	33.26	5.17	10	192.42	36.54
4	84.17	7.71	12	221.31	45.46
6	123.05	17.12	24	306.94	77.96
8	158.76	29.04			

表 4 醇质体凝胶和普通凝胶中 DMZ 平均  $Q_n-t$  曲线拟合方程

Table 4 Regression analysis of average  $Q_n-t$  curve of DMZ in ethosomes-based gel and common gel

剂型	释放模型	模型拟合方程	$r$
醇质体凝胶	零级方程	$Q_n = 11.957 t + 47.25$	0.916 1
	Higuchi 方程	$Q_n = 80.198 t^{1/2} - 71.641$	0.986 8
	Peppas 方程	$\ln Q_n = 0.900 8 \ln t + 3.095 4$	0.956 9
普通凝胶	零级方程	$Q_n = 3.441 1 t - 1.160 9$	0.977 1
	Higuchi 方程	$Q_n = 22.245 t^{1/2} - 32.965$	0.977 7
	Peppas 方程	$\ln Q_n = 1.197 2 \ln t + 0.715 1$	0.964 0

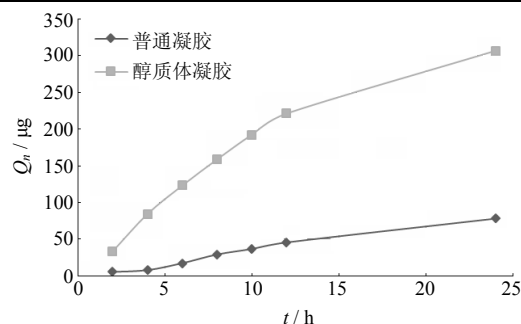


图 2 DMZ 的体外透皮  $Q_n-t$  曲线比较

Fig. 2 Comparison on  $Q_n-t$  curve of DMZ

表明：在 24 h 内，普通凝胶和醇质体凝胶中 DMZ 的  $Q_n-t$  关系均符合 Higuchi 方程。24 h 时，醇质体凝胶中 DMZ 的  $Q_n$  是普通凝胶中 DMZ 的 3.94 倍。表明 DMZ 醇质体的皮肤透过性能良好；12 h 内醇质体凝胶中 DMZ 的透皮速率 [ $8.08 \mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$ ] 大于普通凝胶中 DMZ 的透皮速率 [ $1.50 \mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$ ]。

### 3 讨论

通过对 DMZ 醇质体处方工艺的正交试验设计结果可知，大豆卵磷脂在一定用量内对包封率影响不太显著；但当卵磷脂用量超过一定水平时，包封率出现显著下降。无水乙醇和药物会对包封率产生一定影响。当无水乙醇用量增加时，虽然粒径有所减小，但是包封率也随之下降。由于醇质体的透皮

效果与粒径没有显著关系<sup>[10]</sup>,所以处方筛选时以包封率为参考指标。

DMZ 醇质体的体外释放研究表明,DMZ 在 12 h 内接近零级释放,与 DMZ 溶液相比,醇质体的释药行为更为持续、稳定,更易于达到起效浓度。醇质体可以显著增加皮肤渗透量及增加药物在深层皮肤的贮存已经得到广泛的证实<sup>[10-12]</sup>。醇质体的透皮行为可由以下 2 种行为共同作用:①醇质体的透皮机制类似于促渗剂,可以破坏角质层的有序排列;②因为醇质体的可变形性使其能以小泡形式完整的透过皮肤角质层间隙<sup>[11-12]</sup>。醇质体的透皮过程使药物跨越了透皮吸收的最大障碍,提高了药物透过量。

本实验建立的醇质体处方工艺综合考虑了多种因素的影响,制备了一种产品外观形态良好,有合适粒径与包封率的醇质体凝胶制剂,后续研究尚需进一步研究其稳定性、药效学、药动力学、制剂多样性及释药机制。

#### 参考文献

- [1] 王超. 雷公藤叶的化学成分及生物活性研究 [D]. 北京:北京协和医学院研究生院,2013.
- [2] 许文平. 去甲泽拉木醛的免疫抑制作用及药代动力学研究 [D]. 上海:复旦大学,2012.
- [3] 苗抗立,徐雪华,魏朝晖,等. 活性成分 demethylzeylasteral 的研究 [J]. 中国现代临床医学,

2005, 4(10): 7-10.

- [4] 国家食品药品监督管理局. 药品不良反应信息通报(第 46 期)关注雷公藤制剂的用药安全 [R]. 2012-04-01.
- [5] 郑俊民. 经皮给药新剂型 [M]. 北京:人民卫生出版社,2006.
- [6] 姜素芳,胡娇艳,何丽华. 盐酸青藤碱醇质体的制备及其体外经皮渗透研究 [J]. 中草药, 2012, 43(9): 1738-1741.
- [7] 杨飞,李芳,焦海胜,等. 秋水仙碱醇质体的制备及体外经皮渗透研究 [J]. 中国药学杂志, 2009, 44(5): 349-352.
- [8] 徐吉民. 正交法在医药科研中的应用 [M]. 北京:中国医药科技出版社,1987.
- [9] 刘晓昱,饶跃峰,梁文权. 炔雌醇醇质体凝胶的经皮渗透研究 [J]. 中国药学杂志, 2006, 41(4): 284-286.
- [10] Simonsson C, Madsen J T, Graneli A, et al. A study of the enhanced sensitizing capacity of a contact allergen in lipid vesicle formulations [J]. *Toxicol Appl Pharm*, 2011, 252(3): 221-227.
- [11] Chourasia M K, Kang L F, Chan S Y. Nanosized ethosomes bearing ketoprofen for improved transdermal delivery [J]. *Results Pharm Sci*, 2011, 1(1): 60-67.
- [12] Maheshwari R G S, Tekade R K, Sharma P A, et al. Ethosomes and ultradeformable liposomes for transdermal delivery of clotrimazole: A comparative assessment [J]. *Saudi Pharm J*, 2012, 20(2): 161-170.