

## 延胡索乙素醇质体的制备及其离体皮肤渗透特性研究

费雅蓉, 徐 畅, 周丹婷, 刘秀秀, 文娇丽, 郑杭生\*

浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053

**摘要:** 目的 制备延胡索乙素 (*dl*-THP) 醇质体 (ETS), 并初步阐明制剂的经皮吸收特性。方法 采用乙醇注入-pH 梯度主动载药法制备 *dl*-THP ETS, 并对其形态、粒径、弹性与包封率等理化性质进行表征; 以脂质体 (LPS) 与酞剂作为参比, 采用 Franz 扩散池考察制剂的离体皮肤渗透特性。**结果** 按优选处方 [*dl*-THP 100 mg, 维生素 E 1.3 mg, 大豆卵磷脂 1 200 mg, 胆固醇 120 mg, 无水乙醇 9 mL, 柠檬酸缓冲液 (pH 3.0) 21 mL, 0.1 mol/L NaOH 溶液适量 (调 pH 值至 5.5)] 制得的 *dl*-THP ETS 弹性指数为  $(20.1 \pm 1.1)$  mL, 平均粒径为  $(85.8 \pm 0.9)$  nm, 多分散指数为  $0.082 \pm 0.003$ , 包封率为  $(81.7 \pm 3.2)\%$ 。*dl*-THP ETS 24 h 的单位面积皮肤累积渗透药物量 ( $Q_n$ ) 为  $(2\ 306.4 \pm 592.3)$   $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , 与参比制剂 LPS [ $(2\ 434.2 \pm 564.4)$   $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ] 无显著差异, 但约为酞剂 [ $(633.1 \pm 218.0)$   $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ] 的 4 倍 ( $P < 0.05$ ); ETS 与 LPS 各时间点样品间的  $Q_n$  RSD 的平均值分别为  $(28.4 \pm 10.9)\%$ 、 $(62.8 \pm 44.1)\%$  ( $P < 0.05$ ), 表明前者样品间的  $Q_n$  波动比后者小; ETS 与 LPS 的 24 h 渗透曲线线性拟合的相关系数平均值分别为  $0.968 \pm 0.033$  与  $0.882 \pm 0.078$  ( $P < 0.05$ ), 表明前者渗透过程更符合零级动力学。**结论** 所得的 *dl*-THP ETS 弹性高, 粒径大小适宜, 包封率高, 药物经皮渗透速率高且稳定, 并符合零级动力学。

**关键词:** 延胡索乙素; 醇质体; 乙醇注入法; pH 梯度主动载药; 透皮吸收

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)05-1088-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.05.010

## Preparation of *dl*-tetrahydropalmatine ethosomes and their *ex vivo* transdermal permeation properties

FEI Ya-rong, XU Chang, ZHOU Dan-ting, LIU Xiu-xiu, WEN Jiao-li, ZHENG Hang-sheng

Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

**Abstract: Objective** To prepare *dl*-tetrahydropalmatine (*dl*-THP) ethosomes (ETS) and elucidate their transdermal absorption properties. **Methods** *dl*-tetrahydropalmatine ethosomes (*dl*-THP ETS) were prepared by ethanol injection combined with pH-gradient active drug-loading method. Their physicochemical properties including elasticity, vesicle size, morphology and entrapment efficiency were characterized. Franz diffusion cells were used to investigate the *ex vivo* skin permeation characteristics of the formulation with liposomes (LPS) and tinctures being used as reference preparations. **Results** According to a preferred formulation of *dl*-THP ETS [*dl*-THP 100 mg, vitamin E 1.3 mg, soybean lecithin 1 200 mg, cholesterol 120 mg, absolute ethanol 9 mL and citrate buffered saline (pH 3.0) 21 mL, 0.1 mol/L NaOH solution suitable quantity (to adjust the pH value to 5.5)], the obtained *dl*-THP ETS had an elasticity index of  $(20.1 \pm 1.1)$  mL, an average size of  $(85.8 \pm 0.9)$  nm with a polydispersity index of  $(0.082 \pm 0.003)$  and an entrapment efficiency of  $(81.7 \pm 3.2)\%$ . The cumulative permeated drug quantity per unit area ( $Q_n$ ) of *dl*-THP ETS in 24 h was  $(2\ 306.4 \pm 592.3)$   $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  with no significant difference compared with the  $Q_n$  of the LPS [ $(2\ 434.2 \pm 564.4)$   $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ] ( $P > 0.05$ ) and about 4 times of that of the tincture [ $(633.1 \pm 218.0)$   $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ] ( $P < 0.05$ ). And the averages of RSD of the  $Q_n$  at each time point were  $(28.37 \pm 10.9)\%$  and  $(62.83 \pm 44.1)\%$  for the ETS and LPS, respectively, indicating that the  $Q_n$  fluctuation among samples of the ETS was smaller than that of the LPS ( $P < 0.05$ ). Average correlation coefficients of  $(0.968 \pm 0.033)$  and  $(0.882 \pm 0.078)$  ( $P < 0.05$ ) were obtained for the ETS and LPS respectively when their 24 h permeation curves were fitted to linear relationship, indicating the permeation of the former was closer to zero-order kinetics than that of the latter. **Conclusion** The *dl*-THP ETS have a high elasticity, a suitable size, a high entrapment efficiency, and enhanced and stable percutaneous absorption in line with zero-order kinetics.

**Key words:** *dl*-tetrahydropalmatine; ethosomes; ethanol injection method; pH-gradient active drug loading; transdermal absorption

收稿日期: 2018-11-21

基金项目: 浙江省大学生科技创新活动计划资助 (2016R410023); 浙江省医药卫生科技计划项目基金 (2015111458)

作者简介: 费雅蓉 (1994—), 女, 硕士在读, 研究方向为经皮吸收新剂型及其体内过程。Tel: (0571)86633173 E-mail: fyr949778943@163.com

\*通信作者 郑杭生, 男, 博士, 硕士生导师, 主要从事经皮吸收新剂型及其体内过程研究。Tel: (0571)86613524 E-mail: hs-zheng@163.com

延胡索乙素 (*dl*-tetrahydropalmatine, *dl*-THP) 是从罂粟科紫堇属植物延胡索 *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang 的干燥块茎中提取的一种生物碱<sup>[1]</sup>, 有多重药理作用, 一直广泛用于临床<sup>[2-3]</sup>。其镇痛作用比一般解热镇痛药强, 可缓解头痛、胸痛、关节痛及外伤导致的疼痛<sup>[4]</sup>, 对慢性神经病理性疼痛效果较好<sup>[5]</sup>。*dl*-THP 目前临床上主要通过口服与肌注 2 种方式给药, 前者会有胃肠道反应与肝首关效应, 后者常有过敏反应发生。作为一种局部皮肤外用的给药途径, 可以维持较平稳的血药浓度, 避免不良反应, 从而提高患者的顺应性<sup>[6]</sup>。但是人类皮肤的低渗透性会影响经皮给药, 皮肤最表层的角质层是限制药物分子经皮扩散速率的阻隔层, 具有高度亲油性<sup>[7]</sup>。有研究制备并优化了 *dl*-THP 贴片处方, 发现其日透皮量约为 0.173 mg/cm<sup>2</sup>, 这与临床肌注有效剂量 (40~60 mg/d) 存在较大差距<sup>[6]</sup>。因此, 将 *dl*-THP 制备成外用制剂时, 首先要考虑的问题是如暂时性地降低角质层的屏障性、增强皮肤的渗透性, 使 *dl*-THP 的经皮吸收量增加, 达到预期的治疗效果。醇质体 (ethosomes, ETS) 是一种含有较高浓度醇 (一般为 25%~35%) 的经皮给药载体, 是新型脂质体 (liposomes, LPS) 之一, 具有药物包封率高、可变形性好、皮肤刺激性小、透皮效果佳等诸多优点<sup>[8-10]</sup>。乙醇是一种良好的透皮吸收促进剂, 可以改变角质层脂质分子的排列, 增加其流动性<sup>[11]</sup>; 同时它使 ETS 膜的柔性和流动性增强至可变形, 更易穿透皮肤。故 ETS 可提高药物经皮吸收的速率<sup>[12]</sup>。然而, 作为新型载体, 目前有关 ETS 的研究并不深入, 作用机制也未被完全阐明; 目前亦无延胡索乙素醇质体 (*dl*-THP ETS) 的研究报道。为增加与优化 *dl*-THP 的透皮吸收性能, 本实验将其制备成 ETS 混悬液, 表征其相关的理化性质, 并考察该制剂的透皮吸收特性。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

LC-2130 高效液相色谱仪、LC-2030 紫外检测器, 上海天美科学仪器有限公司; Xtimate C<sub>18</sub> 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 月旭科技股份有限公司; Nano-ZS90 动态激光散射粒度仪 (DLS), 英国 Malvern 公司; 85-2 数显恒温磁力搅拌器, 上海江星仪器有限公司; FG2 便携式 pH 计, 上海梅特勒-托利多仪器有限公司; JEM-1200EX 型透射电子显微镜 (TEM), 日本 Jeol 公司; HOMOEX-25 高压

膜挤出仪, 上海赫默仕机电科技有限公司; BS124S 电子天平, 德国赛多利斯公司; 5804R 冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司; XL2000 超声破碎仪, 美国 Misonix 公司; TT-8 型药物透皮吸收仪, 天津市正通科技有限公司; 超声波清洗器, 上海安谱实验科技股份有限公司。

### 1.2 试剂与材料

大豆卵磷脂 (sbPC, 注射级, 磷脂酰胆碱与磷脂酰乙醇胺总量≥70%, 批号 SY-SL-170103)、胆固醇 (CHO-HP, 批号 B40936), 上海艾伟特医药科技有限公司; 维生素 E (VE), 批号 MKCD4493, Sigma 公司; *dl*-THP, 批号 CAS10097-84-4 S<sub>1</sub>, 南京森贝伽生物科技有限公司; *dl*-THP 对照品, 质量分数 99.8%, 批号 110726-201617, 中国食品药品检定研究院; 无水乙醇, 批号 20160908, 天津科密欧化学试剂有限公司; 甲醇, 色谱纯, 美国 Honeywell 公司; HPLC 用水为超纯水; 其余试剂均为分析纯。Nanosep 离心浓缩管, 截留相对分子质量 10 000, 美国 Pall 公司; 聚碳酸酯径迹蚀刻膜 (0.1、0.05 μm), 英国 Whatman 公司。

### 1.3 动物

清洁级 SD 大鼠, 体质量 (180±20) g, 雄性, 由浙江中医药大学动物实验中心提供, 实验动物使用许可证号为 SYXK (浙) 2013-0184, 实验动物生产许可证号为 SCXK (沪) 2013-0016。所有动物实验均按浙江中医药大学动物饲养和使用指南进行。

## 2 方法与结果

### 2.1 制剂中药物的定量测定

**2.1.1 检测波长的选择** 用“2.1.2”项下流动相溶解 *dl*-THP 对照品, 并配制成一定质量浓度的溶液, 于 200~400 nm 波长范围内扫描。结果表明在 280 nm 处 *dl*-THP 有一最大吸收峰, 故选此波长为 HPLC 检测波长。

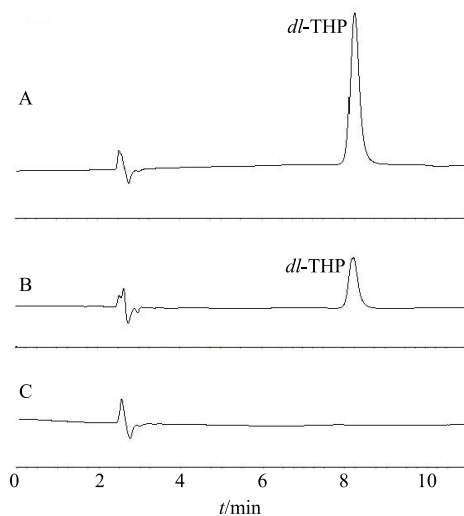
**2.1.2 色谱条件** Xtimate C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.1%磷酸水溶液 (7:3) 混合液 (用三乙胺调 pH 值至 6.5); 体积流量 1 mL/min; 检测波长 280 nm; 柱温 25 °C; 定量环定量进样 10 μL。

**2.1.3 对照品储备液的配制** 精密称取 *dl*-THP 对照品 10.9 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并定容, 得 109 μg/mL 的对照品储备液。

**2.1.4 供试品溶液的配制** 精密吸取 0.5 mL *dl*-THP ETS 样品, 置于 10 mL 量瓶中, 加入甲醇, 超

声溶解后用甲醇定容, 即得 ETS 供试品溶液。取空白 ETS 样品, 同法制备空白 ETS 供试品溶液。

**2.1.5 专属性试验** 取“2.1.3”项下对照品储备液, 稀释适当倍数, 另取“2.1.4”项下 ETS 供试品溶液与空白 ETS 供试品溶液, 分别按“2.1.2”项下色谱条件分析, 记录色谱图, 结果见图 1。在该色谱条件下, *dl*-THP 峰形良好, 保留时间约为 8.2 min, 辅料无干扰。



A-*dl*-THP 对照品溶液 B-*dl*-THP ETS C-空白 ETS  
A-*dl*-THP reference substance solution B-*dl*-THP ETS C-blank ETS

图 1 专属性试验色谱图

Fig. 1 Chromatograms for specificity test

**2.1.6 标准曲线绘制** 取“2.1.3”项下对照品储备液, 稀释成系列质量浓度对照品溶液, 按“2.1.2”项下色谱条件分别进行分析, 记录 *dl*-THP 对应色谱峰的峰面积。线性回归结果表明, *dl*-THP 在 2.75~109  $\mu\text{g}/\text{mL}$  峰面积 ( $A$ ) 与其质量浓度 ( $C$ ) 之间呈良好线性关系, 回归方程为  $A=10.107 C-3.325 4$ ,  $r=0.999 9$ ,  $n=6$ 。

**2.1.7 其他方法学验证项目** 经考察, 方法的日内精密度 ( $\text{RSD} \leq 1.8\%$ )、日间精密度 ( $\text{RSD} \leq 2.0\%$ )、准确度 ( $98.3\% \leq \text{回收率} \leq 101.2\%$ )、样品测定重复性 ( $\text{RSD} \leq 1.8\%$ ) 以及供试品溶液在 24 h 内的稳定性 ( $\text{RSD} \leq 1.0\%$ ) 均符合要求。

## 2.2 ETS、LPS 与酞剂的制备

**2.2.1 ETS 的制备** *dl*-THP 的临床日口服剂量为 0.2~0.6 g (用于镇痛), 但是其生物利用度较低, 大鼠体内的研究显示仅为 6.59%<sup>[13]</sup>, 可以推测, 透皮制剂若能实现日透皮量 10 mg 以上会发挥预期的药效。故本研究暂定 ETS 中的 *dl*-THP 质量浓度为

3.3 mg/mL, 若制剂透皮速率理想, 在可接受的范围调节给药量与给药皮肤面积将达到预期的日透皮量。但是 *dl*-THP 的溶解度受 pH 值影响较大<sup>[14]</sup>, 其  $\text{pK}_a$  值为  $6.49 \pm 0.07$ <sup>[15]</sup>, 作为一种生物碱, pH 值上升时, 它在水性介质中溶解度显著降低。同时, ETS 对药物的包封率有较高的要求, 有文献报道 ETS 中药物的经皮渗透速率与其包封率有相关性<sup>[16]</sup>。前期实验中本课题组尝试了 pH 梯度主动载药技术, 通过低 pH 水化液制备 ETS, 进而调高外水相的 pH 值, 可提高药物的包封率。然而, pH 值并不可以提高太多, 当 pH 值超过 6.0 时, 少量外水相中 *dl*-THP 亦会析出结晶, 故经过筛选, 采用 pH 值为 3.0 的柠檬酸盐缓冲液作为水化液, pH 梯度载药时将外水相 pH 值调至 5.5, 此条件下 ETS 的药物包封率可以达到 80%, 同时未见药物结晶。优选的处方工艺如下。

处方: *dl*-THP 100 mg, VE 1.3 mg, sbPC 1 200 mg, CHO-HP 120 mg, 无水乙醇 9 mL, 柠檬酸盐缓冲液 [CBS, pH 3.0, 0.2 mol/L 的磷酸氢二钾溶液-0.1 mol/L 的柠檬酸溶液 (8.22 : 31.78) 混合液, 稀释 10 倍] 21 mL, 0.1 mol/L NaOH 溶液适量 (调 pH 值至 5.5)。

采用乙醇注入-pH 梯度主动载药法进行制备。精密称取 sbPC、CHO-HP、VE, 置于小烧杯中, 室温下用无水乙醇溶解, 得到澄清溶液 (有机相); 另取 CBS (水相), 置于小烧杯中, 在磁力搅拌下, 用 2.5 mL 注射器将有机相以 0.9 mL/min 的体积流量注入水相中, 待有机相注射完毕后继续搅拌 5 min, 得空白 ETS 中间体混悬液。将所得混悬液挤压通过聚碳酸酯径迹蚀刻膜 (0.1、0.05  $\mu\text{m}$ , 各 3 次), 即得空白 ETS 混悬液。取空白 ETS 混悬液, 在磁力搅拌下加入 *dl*-THP, 待药物溶解后, 用 0.1 mol/L NaOH 溶液调节 ETS 混悬液的 pH 值至 5.5, 在 40  $^{\circ}\text{C}$  下孵育 1 h, 即得 *dl*-THP ETS。

**2.2.2 LPS 的制备** 处方: *dl*-THP 100 mg, VE 1.3 mg, sbPC 1 200 mg, CHO-HP 120 mg, CBS (pH 3.0) 30 mL, 0.1 mol/L NaOH 溶液适量。

采用薄膜分散-pH 梯度主动载药法进行制备。精密称取 *dl*-THP、VE、sbPC、CHO-HP, 置于烧杯中, 加入 30 mL 二氯甲烷, 振摇使溶解。将所得溶液转移至 500 mL 茄形瓶内, 旋转蒸发 (40  $^{\circ}\text{C}$ , 50 r/min) 2 h 以除尽溶剂, 加入 CBS 并缓慢振摇茄形瓶, 水化完全后用超声细胞破碎仪超声处理 (固定探头位置在液体的中心, 功率 22 W, 每次 5 s, 间

隔 20 s, 共 6 次), 处理后的混悬液挤压通过聚碳酸酯径迹蚀刻膜 (0.1、0.05 μm, 各 3 次), 用 0.1 mol/L NaOH 溶液调节混悬液的 pH 值至 5.5, 在 40 °C 下孵育 1 h, 即得。

**2.2.3 酊剂 (tincture, TCT) 的制备** 处方: *dl*-THP 100 mg, 无水乙醇 9 mL, CBS (pH 3.0) 21 mL。精密量取无水乙醇与 CBS, 置于烧杯中, 加入 *dl*-THP, 在磁力搅拌下溶解, 即得。

**2.3 ETS 与 LPS 理化性质的表征**

**2.3.1 显微形态** 吸取少量经适当倍数稀释后的样品滴于铜网正面, 多余样品液用滤纸吸去, 用 2% 磷钨酸溶液负染 2 min 后, 多余染液用滤纸吸去, 将其正面朝上置于玻璃皿中, 自然晾干, 在 TEM 下观察并摄制照片。

**2.3.2 弹性测定** 采用恒定压力挤出法进行测定。取“2.2.1”项下未经挤出的空白 ETS 混悬液, 置于高压膜挤出器中, 在 0.50 MPa 氮气压下挤压通过 0.1 μm 孔径的聚碳酸酯径迹蚀刻膜, 记录 2 min 的挤出体积, 并采用 DLS 测定过膜后囊泡的粒径, 按以下公式计算弹性指数 (elasticity index, EI) 以示其弹性大小。

$$EI = F \times (r_v/r_p)^2$$

$r_v$  为挤出后囊泡的粒径,  $r_p$  为聚碳酸酯径迹蚀刻膜的孔径,  $F$  为 2 min 内挤出的混悬液体积

取“2.2.2”项下未经挤出的 LPS 混悬液, 按上述步骤测定 LPS 的弹性。每个样品均平行测定 3 次。

**2.3.3 粒径测定** 将一定体积的样品液以纯水稀释 10 倍, 用 DLS 测定其平均粒径与多分散指数 (PDI), 每个样品重复测定 3 次。

**2.3.4 包封率测定** 以 HPLC 法结合离心超滤法进行测定<sup>[17]</sup>。精密量取待测样品 200 μL, 置于超滤离心管内, 进行冷冻离心 (相对离心力 13 000 ×  $g$ , 温度 4 °C), 收集全部外水相, 转移至 10 mL 量瓶中, 以流动相定容; 精密量取 200 μL 样品, 置于 10 mL 量瓶中, 用少量甲醇破乳, 以流动相定容。按“2.1.2”项下色谱条件测定 *dl*-THP 的峰面积, 代入标准曲线, 计算外水相与取样量样品中药物量, 按下式计算包封率。

$$\text{包封率} = (W_s - W_{EA}) / W_s$$

$W_s$  为 200 μL 样品中 *dl*-THP 的量,  $W_{EA}$  为外水相中 *dl*-THP 的量

**2.4 理化性质表征结果**

**2.4.1 显微形态** TEM 结果见图 2, *dl*-THP ETS 与

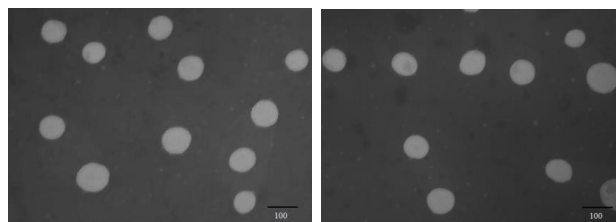


图 2 *dl*-THP ETS (左) 与 *dl*-THP LPS (右) 的 TEM 图  
Fig. 2 TEM photographs of *dl*-THP ETS (left) and *dl*-THP LPS (right)

LPS 均以近似圆形的单层囊泡为主, 大小分布均匀, 且无聚集现象。

**2.4.2 囊泡弹性** ETS 与 LPS 的弹性测定结果见表 1, 两组间均数比较结果表明, ETS 的弹性大于 LPS, 差异极显著 ( $P < 0.01$ )。

**2.4.3 包封率、平均粒径与 PDI** ETS 与 LPS 包封率、平均粒径与 PDI 的测定结果见表 2, 包封率均较高, 粒径分布均较窄, 粒径分布图见图 3。

**2.5 离体皮肤渗透特性考察**

**2.5.1 离体皮肤的制备** 取 SD 大鼠, 吸入过量乙醚使麻醉, 颈椎脱臼处死后, 用剃毛器剃除其胸骨

表 1 *dl*-THP ETS 与 LPS 的弹性测定结果 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Table 1 Elasticity measurement of *dl*-THP ETS and LPS ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

处方	挤出粒径/nm	$(r_v/r_p)^2$	挤出体积/mL	EI/mL
ETS	145.6 ± 2.1	2.1 ± 0.1	9.5 ± 0.5	20.1 ± 1.1**
LPS	111.2 ± 0.8	1.2 ± 0.2	8.3 ± 0.3	10.2 ± 0.3

与 LPS 比较: \*\* $P < 0.01$

\*\* $P < 0.01$  vs LPS

表 2 *dl*-THP ETS 与 LPS 的包封率、平均粒径与 PDI ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Table 2 Entrapment efficiency, average size and PDI of *dl*-THP ETS and LPS ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

处方	包封率/%	平均粒径/nm	平均 PDI
ETS	81.7 ± 3.2	85.8 ± 0.9	0.082 ± 0.003
LPS	79.8 ± 2.2	83.1 ± 0.6	0.089 ± 0.005

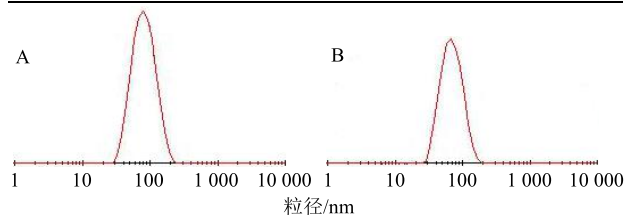


图 3 *dl*-THP ETS (A) 与 *dl*-THP LPS (B) 的粒径分布  
Fig. 3 Size distribution of *dl*-THP ETS (A) and *dl*-THP LPS (B)

至腹部范围的毛发，并用手术剪刀剪去未被剃除的短毛，将大鼠腹部皮肤剪下，小心剔除皮下的脂肪组织，确保皮肤角质层不受损，用生理盐水冲洗干净，然后用滤纸吸干表面后展平，包裹于铝箔纸中，-80 °C 冷冻，备用。

**2.5.2 溶液配制** 将 0.9% 生理盐水与乙醇以 80 : 20 的比例混合均匀，即得渗透试验用接收液（符合漏槽条件）。精密称取 *dl*-THP 对照品 10.00 mg，置于 100 mL 量瓶中，加适量空白接收液溶解并定容，摇匀，得到 100.0 μg/mL 的对照品储备液。

**2.5.3 渗透试验样品测定** 采用 HPLC 测定，色谱条件同“2.1”项下。

取“2.5.2”项下对照品储备液，以空白接收液稀释不同倍数，得到系列质量浓度（*C*）对照品溶液，分别进行色谱分析，记录 *dl*-THP 的峰面积（*A*）。经线性回归分析得接收液中药物含量测定的标准曲线方程为  $A = 5.8254C + 2.0685$ ， $r = 0.9998$ ， $n = 5$ ，表明 *dl*-THP 在 2.5~100 μg/mL 与其峰面积呈良好的线性关系。其他方法学验证项目经考察均符合要求。

**2.5.4 离体皮肤渗透试验** 以 LPS 与 TCT 作为参比，采用 Franz 扩散池考察 *dl*-THP ETS 的离体皮肤渗透性<sup>[18]</sup>。将冷冻的大鼠皮肤于室温下解冻后，剪取合适大小并固定于供给池与接收池之间，皮肤表皮面朝向供给池。将接收液加入接收池后，排尽接收液的气泡并使其液面与皮肤真皮侧完全接触，水浴温度控制在 32 °C，池内的磁力搅拌转速为 400 r/min。平衡 30 min 后，精密量取待测制剂 0.2 mL，上样，同时记下时间为 0 h。于 0.5、1、2、4、8、12、24 h 数个时间点取样 0.2 mL，并及时补加等体积的新鲜接收液。将各点取出的样品离心（10 000 r/min，10 min）后，取 10 μL 上清液进行 HPLC 分析，记录峰面积，根据标准曲线计算药物质量浓度。

**2.5.5 单位面积累积渗透药物量（ $Q_n$ ）的计算及  $Q_n-t$  曲线的绘制** 第 *n* 个时间点  $Q_n$ （μg/cm<sup>2</sup>）按公

式计算。

$$Q_n = (5C_n + \sum_{i=1}^{n-1} C_i \times 0.2) / 0.785$$

0.785 为渗透有效皮肤面积（cm<sup>2</sup>），5 为接收池的体积（mL），0.2 为取样体积（mL）， $C_n$  为第 *n* 个时间点接收池中药物质量浓度（μg/mL）， $C_i$  为第 *n* 个时间点之前的某个时间点的药物质量浓度（μg/mL）

以各时间点的  $Q_n$  为纵坐标，时间 *t* 为横坐标，绘制不同制剂的  $Q_n-t$  曲线，结果见图 4。制剂在 12 h 与 24 h 时间点的  $Q_n$  分别记为  $Q_{n12}$  与  $Q_{n24}$ ，数据见表 3，*dl*-THP ETS 的  $Q_{n24}$  与参比制剂 LPS 无显著差异（ $P > 0.05$ ），但是约为 TCT 的 4 倍（ $P < 0.05$ ）；*dl*-THP ETS 的  $Q_{n12}$  小于 LPS（ $P < 0.01$ ），但是大于 TCT（ $P < 0.05$ ）。为比较评价 ETS 与 LPS 制剂中药物皮肤渗透的零级动力学特性，分别对其  $Q_n-t$  曲线前 12 h 与 24 h 区间的  $Q_n$  对 *t* 进行线性回归，得到线性拟合的相关系数  $r_{12}$  与  $r_{24}$ ，结果见表 3，ETS 的  $r_{24}$  显著大于 LPS（ $P < 0.05$ ），而  $r_{12}$  与 LPS 无显著差异（ $P > 0.05$ ）。对各制剂各个时间点的  $Q_n$  计算 RSD，并分别计算各制剂所有时间点的平均 RSD 及其标准偏差（SD），用于比较评价各制剂样品间  $Q_n$  的波动情况。结果表明，ETS、LPS 与 TCT 各时间点样品间  $Q_n$  RSD 的平均值分别为（28.4 ± 10.9）%、（62.8 ± 44.1）% 与（57.7 ± 23.5）%，表明 ETS 样品

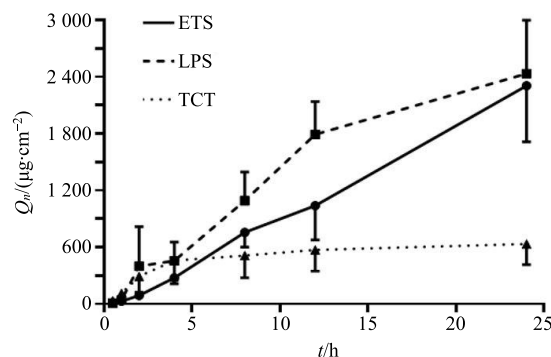


图 4 ETS、LPS 与 TCT 的  $Q_n-t$  曲线  
Fig. 4  $Q_n-t$  curves of ETS, LPS and TCT

表 3 ETS、LPS 与 TCT 在 12 h 与 24 h 的药物离体皮肤渗透参数（ $\bar{x} \pm s, n = 4$ ）

Table 3 *Ex vivo* skin permeation parameters of *dl*-THP in ETS, LPS and TCT at 12 h and 24 h ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

处方	$Q_{n24}/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2})$	$Q_{c24}/\%$	$r_{24}$	$Q_{n12}/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2})$	$r_{12}$
ETS	2 306.4 ± 592.3*	64.7 ± 21.2*	0.968 ± 0.033#	1 039.2 ± 363.6*##	0.892 ± 0.111
LPS	2 434.2 ± 564.4*	63.7 ± 18.8*	0.882 ± 0.078	1 790.3 ± 347.4	0.874 ± 0.137
TCT	633.1 ± 218.0	17.8 ± 7.8	—	571.6 ± 633.1	—

与 TCT 比较：\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$ ；与 LPS 比较：# $P < 0.05$  ## $P < 0.01$   
\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs TCT；# $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  vs LPS

间的  $Q_n$  波动比 LPS 与 TCT 的小 ( $P < 0.05$ )。

**2.5.6 药物累积渗透率 ( $Q_e$ ) 的计算及  $Q_e-t$  曲线的绘制** 为衡量制剂中药物皮肤渗透的程度, 按公式计算各时间点的  $Q_e$ 。

$$Q_e = 0.785 Q_n / W$$

0.785 为渗透有效皮肤面积 ( $\text{cm}^2$ ),  $W$  为各制剂上样体积中的含药量

以各时间点的  $Q_e$  为纵坐标, 时间  $t$  为横坐标, 绘制不同制剂的  $Q_e-t$  曲线, 结果见图 5。24 h 时间点的  $Q_e$  记为  $Q_{e24}$ , 不同制剂的数据见表 3。结果表明,  $dl$ -THP ETS 的  $Q_{e24}$  与 LPS 的无显著差异 ( $P > 0.05$ ), 且约为 TCT 的 4 倍 ( $P < 0.05$ ),  $Q_{e24}$  比 TCT 有显著提高, 分别达到  $(64.7 \pm 21.2)\%$ 、 $(63.7 \pm 18.8)\%$ 。

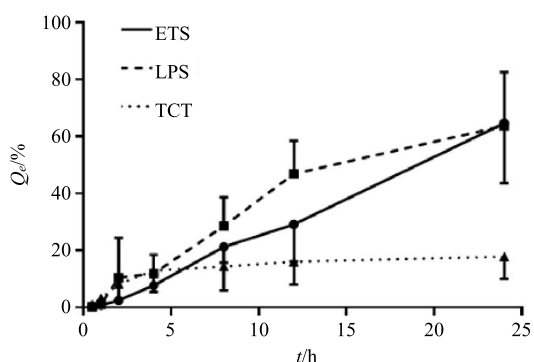


图 5 ETS、LPS 与 TCT 的  $Q_e-t$  曲线  
Fig. 5  $Q_e-t$  curves of ETS, LPS and TCT

**2.5.7 统计方法** 所有测定数值以  $\bar{x} \pm s$  表示, 均数比较采用 SPSS 22.0 软件对所有数据进行单因素方差分析或  $t$  检验。

### 3 讨论

ETS 在概念、组成与结构上较 LPS 复杂, 但它的制备方法容易, 安全性与有效性高, 是一种良好的非侵入性经皮给药载体, 能够使药物到达皮肤深处, 关于 ETS 的透皮机制目前较多的假说, 包括渗透促进机制、皮肤脂质融合机制与囊泡穿透皮肤等<sup>[19]</sup>。

本实验采用乙醇注入-pH 梯度主动载药法制备的 ETS, 工艺简单, 显微形态良好, EI 为  $(20.1 \pm 1.1)$  mL, 平均粒径为  $(85.8 \pm 0.9)$  nm, 平均包封率为  $(81.7 \pm 3.2)\%$ 。弹性是影响 ETS 皮肤穿透性能的关键因素, 本实验中 ETS 的弹性大于 LPS, 有极显著性差异 ( $P < 0.01$ ), 对比两者的处方可以推断乙醇的加入可以显著提高脂质囊泡的弹性, 这可能与乙醇插入脂质双分子层, 扰乱其中脂肪酰基链

的整齐排列有关<sup>[19]</sup>。ETS 中的含醇量一般控制在 30%~40%, 有研究表明相比于乙醇直接作为促渗透剂, 皮肤对 ETS 耐受性更好<sup>[20]</sup>。本实验中 ETS 较高的药物包封率归因于 pH 主动载药技术的使用。此外,  $dl$ -THP ETS 合适的粒径亦为其穿透皮肤的重要前提。

通过离体皮肤渗透试验, 本实验初步阐明  $dl$ -THP ETS 的皮肤渗透特性。(1)  $dl$ -THP ETS 的  $Q_{n24}$  为  $(2\ 306.4 \pm 592.3)$   $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , 与参比制剂 LPS  $[(2\ 434.2 \pm 564.4)$   $\mu\text{g}/\text{cm}^2]$  无显著差异 ( $P > 0.05$ ), 但约为 TCT  $[(633.1 \pm 218.0)$   $\mu\text{g}/\text{cm}^2]$  的 4 倍 ( $P < 0.05$ ), 故 ETS 显著提高了  $dl$ -THP 的经皮渗透量, 且在合适的皮肤施用面积下即可满足预期的  $dl$ -THP 日透皮量。(2)  $dl$ -THP ETS 与 LPS 所有时间点  $Q_n$  RSD 的平均值分别为  $(28.4 \pm 10.9)\%$ 、 $(62.8 \pm 44.1)\%$ , 故 ETS 样品间的渗透量波动比 LPS 小 ( $P < 0.05$ ), 具有较稳定的皮肤渗透速率。(3) ETS 的  $r_{24}$  显著大于 LPS ( $P < 0.05$ ), 表明与 LPS 相比, ETS 的皮肤渗透更符合零级动力学, 药物经皮渗透速率更平稳。(4)  $dl$ -THP ETS 的  $Q_{e24}$  约为 TCT 的 4 倍 ( $P < 0.05$ ), 即 24 h 的药物皮肤渗透率比 TCT 有显著提高, 并达到制剂总药量的  $(64.7 \pm 21.2)\%$ , 显示了较高的皮肤药物利用率。因此,  $dl$ -THP ETS 在 24 h 总渗透量上尽管与 LPS 无显著差异, 但是比 TCT 有显著提高, 此外, 它在皮肤渗透速率上的平稳性、样品间一致性以及皮肤药物利用率高的优势使其在  $dl$ -THP 临床长效镇痛方面有良好的应用前景。一项已报道的研究亦表明, 相较于 LPS 与 TCT, ETS 皮肤渗透持续时间长使其特别适合镇痛药物<sup>[21]</sup>。

本研究对  $dl$ -THP ETS 从形态、弹性、粒径、包封率及离体皮肤渗透性等方面进行了初步评价, 在后续研究中进行药动学与药效学的验证十分必要。

#### 参考文献

[1] Cao F L, Shang G W, Wang Y, et al. Antinociceptive effects of intragastric  $dl$ -tetrahydropalmatine on visceral and somatic persistent nociception and pain hypersensitivity in rats [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2011, 100(1): 199-204.  
[2] Liu T T, Qu Z W, Qiu C Y, et al. Inhibition of acid-sensing ion channels by levo-tetrahydropalmatine in rat dorsal root ganglion neurons [J]. *J Neurosci Res*, 2015, 93(2): 333-339.  
[3] 江维宁, 吴纯启, 陈 瑛, 等. 延胡索甲素与左旋延胡

- 索乙素抗吗啡躯体依赖和精神依赖的作用研究 [J]. 药物评价研究, 2016, 39(2): 187-192.
- [4] Zhang M Y, Liu Y P, Zhang L Y, *et al.* Levo-tetrahydropalmatine attenuates bone cancer pain by inhibiting microglial cells activation [J]. *Mediators Inflamm*, 2015, 2015: 1-9.
- [5] Kang D W, Moon J Y, Choi J G, *et al.* Antinociceptive profile of levo-tetrahydropalmatine in acute and chronic pain mice models: Role of spinal sigma-1 receptor [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 37850.
- [6] 汤 湛, 尹丽娜, 王 俏. 左旋延胡索乙素贴片及其体外经皮渗透研究 [J]. 中国新药杂志, 2014, 23(19): 2316-2319.
- [7] 陈 军, 刘 培, 蒋秋冬, 等. 中药挥发油作为透皮吸收促进剂的现状与展望 [J]. 中草药, 2014, 45(24): 3651-3655.
- [8] Ashtikar M, Nagarsekar K, Fahr A. Transdermal delivery from liposomal formulations-evolution of the technology over the last three decades [J]. *J Control Release*, 2016, 242(11): 126-140.
- [9] 叶 菲, 许东航. 肉桂提取物醇质体透皮吸收研究 [J]. 药物评价研究, 2013, 36(2): 119-122.
- [10] 何良飞, 陶 玲, 管咏梅, 等. 雷公藤甲素阿魏酸醇质体的制备与评价 [J]. 中草药, 2018, 49(12): 2817-2825.
- [11] Elka T. Compositions for applying active substances to or through the skin: EU, EP19950925756 [P]. 1997-11-05.
- [12] Touitou E, Dayan N, Bergelson L, *et al.* Ethosomes-novel vesicular carriers for enhanced delivery: Characterization and skin penetration properties [J]. *J Control Release*, 2000, 65(3): 403-418.
- [13] 刘雪赞. 延胡索乙素大鼠体内药动学研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2012, 28(6): 555-557.
- [14] 吴 芸, 陈志鹏, 肖 璐, 等. 延胡索乙素平衡溶解度及表观油水分配系数的测定 [J]. 南京中医药大学学报, 2012, 28(2): 178-180.
- [15] 方海红, 朱圣生, 张 洁, 等. 延胡索乙素解离常数的测定及其对分离检测影响的考察 [J]. 江西中医药大学学报, 2008, 20(1): 91-93.
- [16] Elsayed M M, Abdallah O Y, Naggar V F, *et al.* Deformable liposomes and ethosomes: Mechanism of enhanced skin delivery [J]. *Int J Pharm*, 2006, 322(1): 60-66.
- [17] 郑杭生, 佐拉·沙肯迪克, 王湘林, 等. 离心沉淀-离心超滤法测定盐酸青藤碱脂质体的包封率 [J]. 中草药, 2011, 42(8): 1523-1527.
- [18] Zhang H, Zhu X, Shen J, *et al.* Characterization of a liposome-based artificial skin membrane for *in vitro* permeation studies using Franz diffusion cell device [J]. *J Lip Res*, 2016, 28(4): 1-10.
- [19] Pandey V, Golhani D, Shukla R. Ethosomes: Versatile vesicular carriers for efficient transdermal delivery of therapeutic agents [J]. *Drug Deliv*, 2014, 22(8): 988-1002.
- [20] 于燕燕, 赵继会, 冯年平, 等. 鬼臼毒素醇质体的体外经皮渗透特性研究 [J]. 中草药, 2012, 43(1): 74-77.
- [21] Yang L, Wu L F, Wu D Z, *et al.* Mechanism of transdermal permeation promotion of lipophilic drugs by ethosomes [J]. *Int J Nanomed*, 2017, 12: 3357-3364.