

芍药苷凝胶剂与醇质体凝胶剂透皮性能比较

白洁，冯健男，杨畅，李鹏跃，杜守颖*
(北京中医药大学，北京 100102)

〔摘要〕 目的:比较芍药苷凝胶剂与芍药苷醇质体凝胶剂的体外透皮性能,判断芍药苷的透皮形式。方法:采用改良 Franz 扩散池法,以大鼠腹皮为体外模型,考察芍药苷凝胶剂与芍药苷醇质体凝胶剂中芍药苷的透皮速率及滞留量。运用 HPLC 测定透皮液中芍药苷含量,流动相乙腈-0.4% 冰乙酸溶液(14:86),检测波长 230 nm。结果:芍药苷醇质体凝胶剂中芍药苷的累计透过量(361.67 ± 69.98) $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$,14 h 累计透过率(17.42 ± 3.34)%,分别为芍药苷凝胶剂的 1.76 倍和 2.03 倍。芍药苷在凝胶剂和醇质体凝胶剂中的透过方式均符合零级方程;在透皮时部分醇质体以完整形式透过皮肤。结论:醇质体载药体系通过变形性及与皮肤的融合性提高了芍药苷的经皮渗透性。

〔关键词〕 芍药苷;醇质体;经皮渗透;透皮机制;凝胶剂

〔中图分类号〕 R283.6;R284.1;R945;R944 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903(2017)04-0012-04

〔doi〕 10.13422/j.cnki.syfx.2017040012

〔网络出版地址〕 <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161107.1454.012.html>

〔网络出版时间〕 2016-11-07 14:54

Comparison on Transdermal Delivery of Paeoniflorin Gel and Paeoniflorin-ethosome Gel

BAI Jie, FENG Jian-nan, YANG Chang, LI Peng-yue, DU Shou-ying*
(Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

〔Abstract〕 **Objective:** The aim of this study was to investigate the penetration difference between paeoniflorin gel and paeoniflorin-ethosome gel after dermal application, and then identify the penetration form of paeoniflorin. **Method:** Improved Franz diffusion cell method were used in the transdermal delivery experiment with rat abdominal skin as *in vitro* model; and penetration rates, retention amounts on the dermal surface of paeoniflorin in two formulations were investigated. The amount of paeoniflorin in percutaneous receptor fluid and residual drugs were determined by HPLC. **Result:** The cumulative amount of penetration in paeoniflorin-ethosome gel was 1.76 times bigger than that in paeoniflorin gel and the percutaneous percent was 2.03 times bigger. Both percutaneous results were consistent with zero-level model. Parts of the paeoniflorin-ethosome permeated the skin was in an integrity structure. **Conclusion:** Because of its deformability and cutaneous integration, ethosome can enhance the permeability of paeoniflorin.

〔Key words〕 paeoniflorin; ethosome; transdermal penetration; transdermal mechanism of permeation; gel

芍药苷为芍药的主要有效成分,具有抗自由基损伤、抗炎等作用;作为中成药帕夫林(白芍总苷)的主要成分,在治疗风湿性关节炎、类风湿性关节炎等方面效果明显。但由于芍药苷脂溶性差,不易直接透过生物膜,口服给药生物利用度很低,影响了药效的发挥^[1]。本课题组前期选择高渗透性的纳米醇质体为给药载体,将芍药苷制成醇质体^[2],通过外用给药增加药物在关节部位浓度,以期提高对关

〔收稿日期〕 20160602(006)

〔基金项目〕 国家“重大新药创制”科技重大专项(2014ZX09301306-009);北京中医药大学优秀青年骨干教师专项计划项目(2015-JYB-QNJSZX004)

〔第一作者〕 白洁,博士,讲师,从事中药新剂型新技术研究,Tel:010-847385657,E-mail:baijie22811@163.com

〔通讯作者〕 *杜守颖,博士,教授,从事中药新剂型新技术研究,Tel:010-84738615,E-mail:dusy@bucm.edu.cn

节炎的治疗效果。

外用给药时,皮肤渗透性是影响药效发挥的重要因素,药物只有渗透到真皮层的血管和淋巴才能被人体吸收。因此,本实验通过体外透皮试验比较芍药苷凝胶剂与芍药苷醇质体凝胶剂的体外透皮性能,可为芍药苷的新剂型研发提供理论依据。在皮肤渗透性试验研究中,以累积透过量、渗透速率为主要指标的 Franz 扩散池法是最常用的实验方法。但以往研究多是直接比较药物的透皮量和渗透速率^[3-4],并未关注药物的透皮形式对透皮结果的影响。研究药物的透皮形式,可更好地指导制剂处方设计。本实验从纳米制剂透皮形式的理论出发,设计不同的样品处理方法,判断药物的透皮形式。

1 材料

LC-20AT 型高效液相色谱仪(日本岛津公司),BS110S 型电子分析天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司),YQD-370 型气体减压器(上海减压器厂有限公司),TK-20B 型透皮扩散试验仪(上海锴凯科技贸易有限公司)。纯氮气(氧立来有限公司),芍药苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110736-201438),芍药苷提取物(南京泽朗生物科技有限公司,质量分数≥98%),大豆磷脂酰胆碱 S-100(Lipoid S 100,德国 Lipoid 公司,批号 F20090050),胆固醇(美国 Amresco 公司),水为娃哈哈纯净水,试剂均为分析纯。

雄性 SD 大鼠,体重 180~200 g,由维通利华实验动物中心提供,合格证号 SCXK(京)2015-0001。

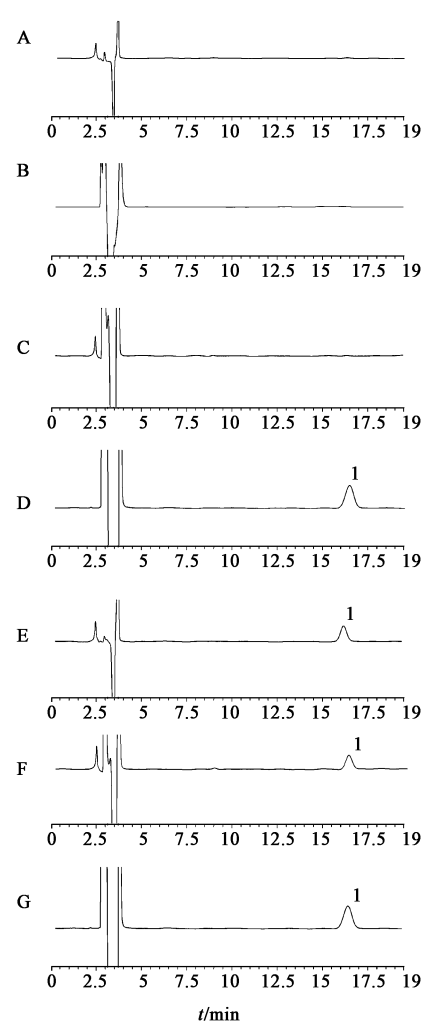
2 方法与结果

2.1 芍药苷的含量测定

2.1.1 色谱条件 Merck C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相乙腈-0.4% 冰乙酸溶液(14:86),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30℃,检测波长 230 nm,进样量 10 μL。见图 1。

2.1.2 标准曲线的制备 精密称取芍药苷对照品 5.12 mg,置于 5 mL 量瓶中,用甲醇溶解并定容,得储备液。精密量取该储备液适量,用甲醇逐级稀释,制成质量浓度分别为 1.638,2.56,12.8,25.6,51.2,102.4,204.8 mg·L⁻¹对照品溶液。按 2.1.1 项下色谱条件测定,以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,得回归方程 $Y = 26\,732X - 3\,332$ ($R^2 = 0.999\,1$),线性范围 1.638~204.8 mg·L⁻¹。

2.1.3 精密度考察 取 25.6 mg·L⁻¹芍药苷对照品溶液 10 μL,按 2.1.1 项下条件重复进样 6 次,计算峰面积的 RSD 2.9%,表明仪器精密度良好。



A. 空白接收液;B. 供试品 1 阴性样品;C. 供试品 2 阴性样品;D. 对照品;E. 芍药苷凝胶剂透皮接收液;F. 供试品 2;G. 供试品 1;1. 芍药苷
图 1 芍药苷凝胶剂和芍药苷醇质体凝胶剂 HPLC
Fig. 1 HPLC chromatograms of paeoniflorin gel and paeoniflorin-ethosome gel

2.1.4 供试品溶液的制备 精密称取芍药苷凝胶剂 0.4 g 至 25 mL 量瓶中,精密加入甲醇 10 mL,超声 10 min,加甲醇定容至 25 mL,摇匀,作为供试品溶液 1。精密吸取 14 h 芍药苷醇质体凝胶剂透皮接收液 0.1 mL,加入 25 倍量甲醇超声 10 min,30℃水浴氮气吹干,加甲醇 100 μL 复溶,于 1 万 r·min⁻¹离心 10 min,作为供试品溶液 2。

2.1.5 稳定性考察 取上述供试品溶液及芍药苷凝胶剂透皮接收液,分别在 0,4,8,12,16,24 h 按 2.1.1 项下色谱条件测定,结果 3 种供试品溶液中芍药苷峰面积的 RSD 分别为 1.8%,2.3% 和 0.9%,表明各供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.1.6 重复性试验 按 2.1.4 项下方法制备供试品溶液各 6 份,按 2.1.1 项下色谱条件测定,计算芍药苷峰面积的 RSD 分别为 2.1% 和 1.7%。

2.1.7 加样回收率试验 精密称取芍药苷凝胶剂 0.2 g 至 25 mL 量瓶中,精密加入 $32.0\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 芍药苷甲醇溶液 10 mL,超声 10 min,加甲醇定容至 25 mL,摇匀,经 $0.22\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,计算芍药苷的平均回收率 98.14%,RSD 2.3%。吸取芍药苷醇质体凝胶剂透皮接收液 0.05 mL,加 $15.0\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 芍药苷甲醇溶液 2.5 mL,超声 10 min,30 ℃ 水浴氮气吹干,加甲醇 100 μL 复溶,于 $1\ \text{万}\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液进行 HPLC 分析,计算芍药苷的平均回收率 98.06%,RSD 2.6%。

2.2 芍药苷凝胶剂和醇质体凝胶剂的制备

2.2.1 芍药苷醇质体的制备 将磷脂和胆固醇的无水乙醚溶液作为油相,于室温下将芍药苷的乙醇溶液加入油相中,摇匀后冰水浴探头式超声,使形成油包水型乳剂。将上述乳剂快速转移至 250 mL 旋转蒸发瓶中,室温减压蒸发至凝胶状;涡旋使凝胶部分塌陷,减压蒸发残留乙醚,得醇质体混悬液,探头式超声,即得。4 ℃ 遮光密闭保存^[2]。

2.2.2 芍药苷凝胶剂的制备 称取羧甲基纤维素钠 100 mg,置于 2.0 mL 水中,称定质量,70 ℃ 溶胀 50 min;精密加入 $5.2\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 芍药苷水溶液 2 mL,搅拌研磨;混匀后加入丙三醇 1.5 g,继续研磨直至充分混合,加水补足质量,得芍药苷凝胶剂。采用棕色瓶密封,于 4 ℃ 贮存。

2.2.3 醇质体凝胶剂的制备 称取羧甲基纤维素钠 100 mg,置于 2.0 mL 水中,称定质量,70 ℃ 溶胀 50 min;精密加入醇质体(含芍药苷 10.4 mg)2 mL 并搅拌研磨均匀;加入丙三醇 1.5 g,继续研磨,混匀后加冷水补足质量,即得,置于棕色瓶密封,4 ℃ 贮存。

2.3 体外透皮试验

2.3.1 离体皮肤的制备^[5] 取雄性 SD 大鼠,断颈椎处死,除去腹部鼠毛,确保角质层完好,分离腹部皮肤,用脱脂棉擦去脂肪组织和结缔组织,用生理盐水冲洗干净。用铝箔包裹后 -20 ℃ 冷冻保存,1 周内用完。

2.3.2 透皮吸收试验^[6] 为了模拟体内环境,选择生理盐水为接收液,将接收液煮沸并冷却至室温;将离体皮肤置于生理盐水中自然解冻,备用。分别按照方法 1 和方法 2 进行透皮试验。

方法 1:将鼠皮固定在渗透扩散装置的供给室与接收室之间,将角质层朝向供给室(总共有效扩散面积 $1.77\ \text{cm}^2$,下同),加入生理盐水 8 mL 作为接收液,池内置磁力搅拌子,转速 $300\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$,于 $(37\pm0.5)\ \text{℃}$ 平衡 30 min,排尽皮肤下的空气,滤纸吸干皮肤表

面的液体。在供给室内分别加入芍药苷凝胶剂 2.0 g 和芍药苷醇质体凝胶剂 2.0 g,使其与皮肤紧密接触。分别于 1,3,4,6,9,12,14 h 时间点用注射器吸取接收液 0.4 mL,同时补加等体积同温度的新鲜接收液。所取接收液经 $0.22\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,测定。

方法 2:将皮肤固定在接收池,角质层朝向供给池,加入生理盐水 18 mL 作为接收液,池内置磁力搅拌子,按方法 1 操作,分别于 1,3,4,6,9,12,14 h 时间点吸取接收液 1.0 mL,同时补加等体积同温度的新鲜接收液。芍药苷凝胶剂透皮接收液经 $0.22\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,测定;取芍药苷醇质体凝胶剂透皮接收液 1 mL,精密量取 100 μL ,按 2.1.4 项下方法处理,测定,计算累计渗透量。

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

式中 Q_n 为第 n 个时间点的单位面积累计透过量, V 为接收室中接收液的体积, C_n 为第 n 个取样点测得的药物质量浓度, V 为取样体积。体外透皮试验结束后,取皮肤表面残留凝胶 0.4 g 至 25 mL 量瓶中,按供试品溶液 1 的制备方法等比例加入甲醇,制备样品,经 $0.22\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,计算芍药苷的残留率。以 Q_n 对 t 进行线性回归,方程斜率为稳态渗透速率常数(J_s),见图 2,3。结果显示经破乳后芍药苷醇质体凝胶剂的 J_s 和 Q_n 均有所增加,提示在接收液中有完整形态的醇质体存在。

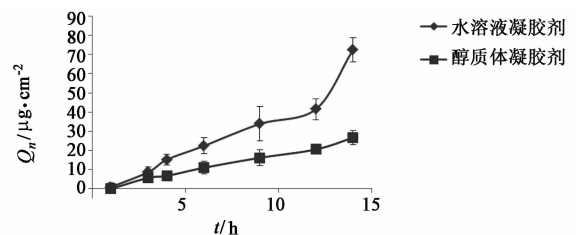


图 2 芍药苷凝胶剂和醇质体凝胶剂的体外经皮渗透曲线(方法 1) ($\bar{x}\pm s,n=5$)

Fig. 2 *In vitro* percutaneous penetration curves of paeoniflorin gel and paeoniflorin-ethosome gel by method 1($\bar{x}\pm s,n=5$)

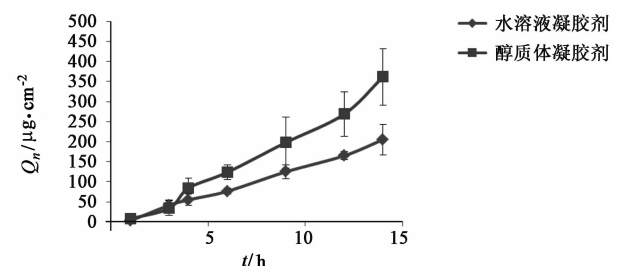


图 3 芍药苷凝胶剂和醇质体凝胶剂的体外经皮渗透曲线(方法 2) ($\bar{x}\pm s,n=5$)

Fig. 3 *In vitro* percutaneous penetration curves of paeoniflorin gel and paeoniflorin-ethosome gel by method 2($\bar{x}\pm s,n=5$)

2.3.3 体外透皮数据拟合 对方法 2 的各组透皮数据进行模型拟合,见表 1。结果发现芍药苷凝胶剂零级拟合的相关性更高,说明透皮过程与给药浓度无关,皮肤角质层起到了限速作用;Higuchi 方程拟合的相关系数(r)0.984 9,Hixson-Crowell 方程拟合的 r =0.932 8,说明药物透皮主要是扩散作用造

成的。芍药苷醇质体凝胶剂零级拟合的相关性更高,说明药物透皮与药物的浓度无关;Higuchi 方程拟合的 r = 0.969 6,Hixson-Crowell 方程拟合的 r = 0.965 7,二者的 r 较为接近,提示药物透皮过程中基质的溶蚀作用与药物的扩散作用可能并存;将芍药苷制成醇质体后药物的扩散作用降低。

表 1 芍药苷的体外透皮量-时间模型拟合方程

Table 1 *In vitro* transdermal delivery-time model fitting equations of paeoniflorin

药物	模型	模型拟合方程	r
芍药苷凝胶剂	零级方程	$Q = 14.903t - 8.474$	0.997 9
	一级方程	$\ln(1 - Q) = 0.108t + 0.007$	0.834 3
	Higuchi 方程	$Q = 72.190t^{1/2} - 83.465$	0.984 9
	Hixson-Crowell 方程	$(1 - Q)^{1/3} = 0.290t + 2.156$	0.932 8
芍药苷醇质体凝胶剂	零级方程	$Q = 26.512t - 31.547$	0.993 2
	一级方程	$\ln(1 - Q) = 0.110t + 1.192$	0.905 3
	Higuchi 方程	$Q = 127.040t^{1/2} - 161.530$	0.969 6
	Hixson-Crowell 方程	$(1 - Q)^{1/3} = 0.363t + 2.310$	0.965 7

2.3.4 透皮效果比较 对方法 2 的各组透皮数据进行分析,计算芍药苷凝胶剂和醇质体凝胶剂中芍药苷的 J_s 分别为 (14.90 ± 2.71) 、 $(26.51 \pm 5.00) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$, $Q_{14\text{h}}$ 分别为 (205.28 ± 37.88) 、 $(361.67 \pm 69.98) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$,14 h 累计透皮率分别为 $(8.60 \pm 1.67)\%$ 、 $(17.42 \pm 3.34)\%$,皮肤的药物滞留率分别为 $(83.93 \pm 1.70)\%$ 、 $(75.59 \pm 2.47)\%$ 。说明药物在皮肤内的滞留率相当,将芍药苷制成醇质体后并没有显著增加药物的皮肤滞留量,而是促进药物向皮下组织的渗透。

3 讨论

本实验结果表明将芍药苷醇质化后可提高芍药苷的 J_s 和累计透皮率。说明醇质体能促使药物向皮肤深层的渗透。但从皮肤滞留结果可知,醇质化后芍药苷在皮肤内的滞留量并没有显著增加。透皮数据拟合结果表明,透皮过程遵循零级动力学方程,说明皮肤仍为透皮过程的主要限制,并没有因为醇质体的促渗作用使透皮机制发生改变。但由于醇质体囊泡形的结构特点,药物从基质中的溶出机制由扩散转变为溶蚀与扩散的双重作用。

文献研究表明醇质体可有效促进药物的透皮吸收^[7-8],其作用机制主要表现为 2 种形式^[9]:①利用脂质膜与皮肤的融合性促进药物的透皮吸收;②含有的高体积分数(20% ~ 45%)乙醇使角质细胞的流动性增强,同时利用自身的变形性渗透至皮肤深层。本实验通过设计 2 种透皮接收液的处理方法,比较了透皮结果的差异,可以判断芍药苷醇质体在透皮过程中的透皮形式。方法 2 由于对接收液进行

了破乳处理,可使透过皮肤的完整醇质体中芍药苷游离出来,由结果可知,将透皮接收液进行甲醇破乳处理后,药物的透皮量明显增加,说明在透皮过程中部分醇质体以完整结构通过变形的形式透过皮肤。

【参考文献】

[1] 项琪,程刚,汤洁,等. 白芍煎剂在大鼠体内的药物动力学[J]. 沈阳药科大学学报,1999,15(4):54-57.
[2] 冯健男,杜守颖,白洁,等. 星点-效应面法优化芍药苷醇质体制备工艺[J]. 环球中医药,2016,9(4):409-413.
[3] 汪小根,张英丰,周莉玲. 跌打止痛巴布膏体外皮肤局部药物动力学[J]. 中国药师,2006,9(10):886-888.
[4] 王建新,李令媛,郭力. 如意金黄巴布剂中小檗碱经皮渗透研究[J]. 中草药,1999,30(9):677-679.
[5] Trauer S, Lademann J, Knorr F, et al. Development of an *in vitro* modified skin absorption test for the investigation of the follicular penetration pathway of caffeine[J]. Skin Pharmacol Physiol,2010,23(6):320-327.
[6] Leveque N, Makki S, Hadgraft J, et al. Comparison of Franz cells and microdialysis for assessing salicylic acid penetration through human skin[J]. Int J Pharm,2004,269(2):323-328.
[7] SHEN L N, ZHANG Y T, WANG Q, et al. Enhanced *in vitro* and *in vivo* skin deposition of apigenin delivered using ethosomes [J]. Int J Pharm, 2014, 460 (1/2): 280-288.
[8] 施晓琴,赵继会,王志东,等. 醇质体在经皮给药方面的应用[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(12):352-355.
[9] Toutitou E, Godin B, Dayan N, et al. Intracellular delivery mediated by an ethosomal carrier[J]. Biomaterials,2001,22(22):3053-3059.

【责任编辑 刘德文】