

醋酸泼尼松龙醇质体的制备及经皮渗透性研究

吕青志*, 刘德胜, 李洪娟(滨州医学院药学院药剂学教研室, 山东烟台 264003)

中图分类号 R965;R977.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)21-1947-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.21.10

摘要 目的:制备醋酸泼尼松龙(PA)醇质体并考察其对离体小鼠皮肤的渗透性。方法:采用乙醇注入法制备PA醇质体,采用高效液相色谱法测定PA醇质体和PA溶液在Franz扩散池中12 h透过离体小鼠皮肤的药物浓度,计算稳态渗透速率(J_s)和12 h单位面积累积渗透量(Q_n)。结果:制得PA醇质体混悬液;PA醇质体和PA溶液的 J_s 分别为5.637、2.487 $\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$,12 h Q_n 分别为(64.145 \pm 1.61)、(29.900 \pm 1.98) $\mu\text{g}/\text{cm}^2$,体外经皮渗透均符合零级动力学方程(r 分别为0.998、0.997)。结论:制备的PA醇质体具有较好的透皮性。

关键词 醋酸泼尼松龙;醇质体;经皮渗透性;高效液相色谱法;小鼠

Preparation and Percutaneous Permeation of Prednisolone Acetate Ethosome

Lü Qing-zhi, LIU De-sheng, LI Hong-juan (Dept. of Pharmacy, School of Pharmacy, Binzhou Medical College, Shandong Yantai 264003, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To prepare Prednisolone acetate (PA) ethosome and investigate its *in vitro* percutaneous permeation behavior in mice skin. METHODS: PA ethosome was prepared with ethanol injection method. The contents of PA were determined by HPLC method. The percutaneous permeation behavior of PA ethosome and PA solution were determined using Franz diffusion cell. Steady permeation rate (J_s) and 12 h accumulative permeation amount of unit area (Q_n) were determined. RESULTS: PA ethosome was prepared; J_s of PA ethosome and PA solution were 5.637 $\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$ and 2.487 $\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$, and 12 h Q_n of them were (64.145 \pm 1.61) $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ and (29.900 \pm 1.98) $\mu\text{g}/\text{cm}^2$; *in vitro* percutaneous penetration behavior was in line with zero-order equation ($r=0.998, 0.997$). CONCLUSIONS: PA ethosome of the preparation is of sound permeation behavior.

KEY WORDS Prednisolone acetate; Ethosome; Percutaneous permeation; HPLC; Mice

表6 各组大鼠给药不同时间后呼吸频率和呼吸深度比较
Tab 6 Comparison of frequency and depth of respiratory of rats in each group at different time

组别	检测项目	给药后 45 min	给药后 60 min
正常对照组	呼吸频率,次/min	104.20 \pm 6.40	109.00 \pm 5.90
	平均呼气峰压, cm H ₂ O	0.20 \pm 0.04	0.23 \pm 0.05
	平均吸气谷压, cm H ₂ O	0.26 \pm 0.07	0.31 \pm 0.06
Q7低剂量组	呼吸频率,次/min	102.50 \pm 11.20	107.00 \pm 7.60
	平均呼气峰压, cm H ₂ O	0.23 \pm 0.06	0.26 \pm 0.05
	平均吸气谷压, cm H ₂ O	0.29 \pm 0.06	0.32 \pm 0.08
Q7中剂量组	呼吸频率,次/min	104.00 \pm 7.60	108.00 \pm 12.30
	平均呼气峰压, cm H ₂ O	0.24 \pm 0.07	0.27 \pm 0.07
	平均吸气谷压, cm H ₂ O	0.31 \pm 0.04	0.34 \pm 0.09
Q7高剂量组	呼吸频率,次/min	107.20 \pm 10.70	109.20 \pm 6.90
	平均呼气峰压, cm H ₂ O	0.20 \pm 0.04	0.25 \pm 0.06
	平均吸气谷压, cm H ₂ O	0.28 \pm 0.06	0.30 \pm 0.05

4 讨论

Q7作为瓜环家族中的一份子,因其较好的溶解性受到研究者的关注,广泛地作为药物载体用于增加药物稳定性、控制药物释放、诱导药物生物活性等方面。但其作为新型药物载体是否具有药理作用还未明确。基于此,本研究在前期研究的基础上探讨Q7对哺乳动物中枢神经系统的影响,属于一般药理学研究的范畴。

一般药理学研究,又称安全药理学,是指观察药物主要药效学以外的其他药理作用,主要观察药物对神经系统、呼吸系

统、心血管系统3个方面的影响,亦属于新药安全性研究范畴,是新药临床前研究的重要内容之一^[9]。结合中枢神经系统一般药理学检测指标要求^[7],本研究观察了Q7高、中、低剂量(低剂量为前期研究中LD₅₀的1/10)对小鼠自主活动、睡眠时间、催眠时间、抗惊厥的影响,结果表明Q7在受试剂量下对小鼠神经系统无明显改变。同时,本研究亦考察了不同剂量的Q7对麻醉大鼠的呼吸系统和心血管系统的影响,结果发现其对大鼠各指标的影响与正常对照组相比无统计学差异($P>0.05$),提示新型药物辅料Q7安全性良好。

参考文献

- [1] 黄英,陶朱,薛赛凤,等.瓜环类超分子药物载体的研究进展[J].高等学校化学学报,2011,32(9):2 022.
- [2] Lagona J, Mukhopadhyay P, Chakrabarti S, et al. The cucurbit[n]uril family[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2005, 44(31):4 844.
- [3] 王娟,黄英,陶朱,等.七元瓜环与8-氮杂腺嘌呤的超分子相互作用研究[J].山地农业生物学报,2011,30(4):352.
- [4] 徐叔云,卞如濂,陈修.药理实验方法学[M].3版.北京:人民卫生出版社,2003:1 380.
- [5] 周则卫,沈秀,韩英,等.肿瘤辐射增敏剂尼可胺的一般药理学研究[J].中国药房,2012,23(5):400.
- [6] 袁伯俊,廖明阳,李波.药物毒理学实验方法与技术[M].北京:化学工业出版社,2007:438-466.
- [7] 傅晓钟,沈祥春,黄英,等.七元瓜环对小鼠的急性毒性实验研究[J].贵州大学学报:自然科学版,2007,24(6):650.

(收稿日期:2012-08-10 修回日期:2012-12-03)

* 讲师,硕士。研究方向:药物新剂型与新技术。电话:0535-6913409。E-mail:tidyno1@126.com

醇质体是 Godin B 等^[1]在 1996 年提出的一种由磷脂、乙醇、水组成的新型脂质双分子层结构的囊泡给药载体,即在普通脂质体的处方中添加高浓度醇制成。其工艺简单,适用于各种性质的药物。醋酸泼尼松龙(Prednisolone acetate, PA)为糖皮质激素类药物,具有抗炎、抗过敏和抑制免疫等多种药理作用,是治疗膝关节骨性关节炎的一种较传统的药物,主要给药方式是关节腔内注射。但是关节腔内注射的局部副作用有关节软骨破坏、感染和加重已存在的关节疾病等,而且长期注射会产生全身副作用,如库欣综合征、骨质疏松、并发感染等,患者顺应性较差^[2]。本文将 PA 制成醇质体经皮给药制剂,以提高其经皮渗透性,维持病变部位较高的药物浓度,提高疗效,减少不良反应,提高患者顺应性^[3-4]。本文采用 Franz 扩散池法和高效液相色谱(HPLC)法考察 PA 醇质体的经皮渗透性,为 PA 醇质体的开发提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

600-2489 型 HPLC 仪(美国 Waters 公司);EL-204 型高精度电子分析天平[梅特勒-托利多(中国)仪器有限公司];SH23-2 型恒温磁力搅拌器(上海梅颖浦仪器仪表制造公司);KQ5200DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);YB-P6 智能透皮试验仪(天津富兰斯电子科贸有限公司)。

1.2 药品与试剂

PA 原料药(河南利华制药有限公司,批号:K07A20091003,纯度:99.4%);PA 对照品(中国食品药品检定研究院,批号:130555-200602,纯度:99.6%);豆磷脂(上海市太伟药业有限公司,批号:090415);胆固醇(天津市大茂化学试剂厂,批号:20100519);聚乙二醇 400(PEG 400,天津市大茂化学试剂厂,批号:20100608);甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

1.3 动物

昆明种小鼠,♂,体质量(22±2)g,由滨州医学院实验动物中心提供,动物合格证号:SYXK(鲁)20030020。

2 方法与结果

2.1 醇质体混悬液的制备

采用乙醇注入法制备 PA 醇质体^[5]。称取 PA 原料药 10 mg、豆磷脂 200 mg、胆固醇 33.3 mg,溶于 3.0 ml 的无水乙醇中,置于磁力搅拌器上,在 35℃、700 r/min 的密闭条件下,边搅拌边缓慢细流注入 6.8 ml 磷酸盐缓冲液(pH 6.8),注完后继续搅拌 30 min,经 0.45 μm 微孔滤膜整粒,即得 PA 醇质体混悬液。

2.2 离体小鼠皮肤的制备^[6]

取小鼠,用 8% 硫化钠溶液(8 mg/100 ml)腹部脱毛,温水洗净皮肤,24 h 后断颈处死,剥离腹部皮肤,去除皮下组织,用生理盐水洗净,于解剖镜下检查无损伤,置-80℃超低温冰箱冷藏,备用。

2.3 溶液的制备

2.3.1 对照品溶液。精密称取 PA 对照品 10 mg,置于 100 ml 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.3.2 空白皮肤接受液。取离体小鼠皮肤,用水洗净,置于 20

ml 空白溶出介质(20% PEG400)中,在 37℃、600 r/min 条件下孵化 12 h,即得。

2.4 色谱条件

色谱柱:Hypersil ODS-2 C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-水(65:35, V/V),流速:1.0 ml/min;检测波长:243 nm;进样量:20 μl;柱温:室温。

2.5 系统适用性试验

分别制备 50.0 μg/ml 的 PA 对照品溶液、空白皮肤接受液和供试品接受液(透过 12 h),按“2.4”项下色谱条件进样测定,记录色谱。结果表明,各组间分离良好,PA 的保留时间约为 7.06 min,空白皮肤接受液只在 4 min 之前有色谱峰,对 PA 的测定无干扰。色谱见图 1。

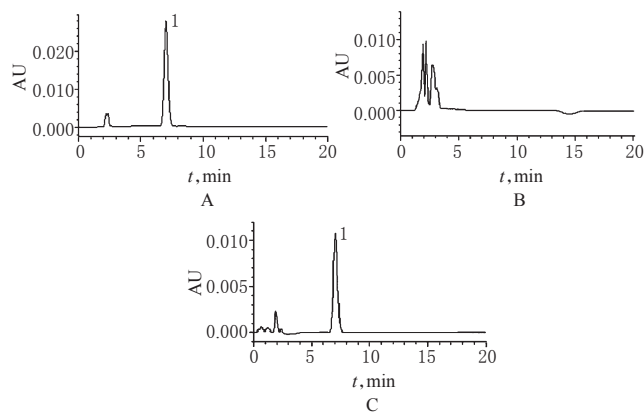


图 1 高效液相色谱图

A. 对照品溶液; B. 空白皮肤接受液; C. 供试品接受液; 1. 醋酸泼尼松龙

Fig 1 HPLC chromatograms

A. substance control solution; B. blank skin receptor solution; C. test receptor solution; 1. prednisolone acetate

2.6 线性关系考察

取“2.3.1”项下对照品溶液,加空白皮肤接受液稀释制成 1.0、2.0、4.0、5.0、10.0、20.0、50.0 μg/ml 的溶液,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后,按“2.4”项下色谱条件进样测定,以质量浓度(c)为横坐标、峰面积(A)为纵坐标,进行线性回归。得回归方程为 $A=42\ 501c+9\ 630.9$ ($r=0.999\ 6$),结果表明 PA 检测质量浓度的线性范围为 1.0~50.0 μg/ml。

2.7 精密度试验

取“2.6”项下制备的 1.0、5.0、50.0 μg/ml 的溶液,分别于当日重复测定 5 次,考察日内精密度;连续测定 5 d,考察日间精密度。结果,日内 RSD 分别为 0.99%、1.17%、1.82% ($n=5$),日间 RSD 分别为 0.88%、1.17%、1.89% ($n=5$),表明该方法精密度良好。

2.8 稳定性试验

取“2.6”项下制备的 5.0 μg/ml 的溶液,室温放置 0、2、4、6、8、12、24 h,按“2.4”项下色谱条件进样测定,记录色谱。结果, RSD=1.22%,表明室温放置 24 h 内溶液的稳定性良好。

2.9 回收率试验

精密量取“2.3.1”项下对照品溶液 0.8、1.0、1.2 ml,分别置于 10 ml 量瓶中,加空白皮肤接受液定容至刻度,制成低、中、高水平的样品溶液,每种样品 3 份,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后,进

样测定,并计算回收率。结果表明,低、中、高水平样品的平均回收率分别为98.2%、99.4%、99.8%($n=3$),符合方法学要求。

2.10 体外经皮渗透试验

2.10.1 经皮渗透试验^[6]。将离体小鼠皮肤固定于Franz扩散池,角质层面向供给池,真皮层面向接受池,有效渗透面积约为1.77 cm²。接受池中加入16 ml 20% PEG400,37 °C恒温水浴、600 r/min恒速搅拌,平衡30 min后,分别取PA质量浓度均为1 mg/ml的PA醇质体及PA溶液(含30% PA的乙醇溶液)1 ml加至供给池,分别于0.5、1、2、4、6、8、10、12 h取接受液1 ml,立即补充1 ml空白溶出介质。将所取接受液经0.22 μm微孔滤膜过滤,HPLC法测定其中PA的浓度。

2.10.2 数据处理。在经皮渗透试验中,一般认为药物通过皮肤的渗透是一个被动扩散的过程,常用Fick's扩散定律描述,按公式计算稳态渗透速率($J_s=dQ/dt$)和单位面积累积渗透量

$$Q_n = \frac{c_n \times V_0 + \sum_{i=1}^{n-1} c_i \times V_i}{A} \quad [7]$$

其中, c_n 为第 n 次实测的药物浓度, c_i

为第 n 次前每次测得的药物浓度, V_0 和 V_i 分别代表接受液体积和样品体积, A 代表有效扩散面积。以 Q_n 为纵坐标,相应时间(t)为横坐标,绘制经皮渗透曲线。对曲线的直线部分进行回归,求得药物的 J_s 。结果表明,PA醇质体和PA溶液的体外经皮渗透均符合零级动力学方程。PA醇质体的 J_s 和 Q_n 均优于PA溶液。PA醇质体和PA溶液的经皮渗透试验结果见表1,经皮渗透曲线见图2。

表1 PA醇质体和PA溶液的经皮渗透试验结果($n=5$)

Tab 1 Percutaneous permeation results of PA ethosome and PA solution ($n=5$)

样品	渗透方程	$J_s, \mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$	12 h $Q_n, \mu\text{g}/\text{cm}^2$	r
PA醇质体	$Q_n=5.6373t-1.4103$	5.637	64.145 ± 1.61	0.998
PA溶液	$Q_n=2.4869t-1.3449$	2.487	29.900 ± 1.98	0.997

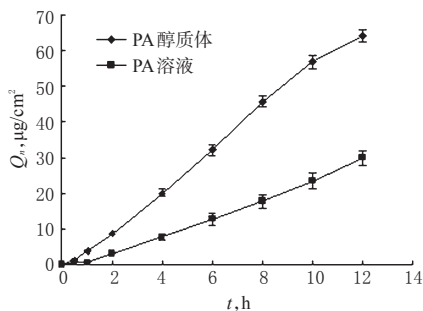


图2 PA醇质体和PA溶液的经皮渗透曲线($n=5$)

Fig 2 Percutaneous permeation profiles of PA ethosome and PA solution ($n=5$)

3 讨论

醇质体与一般脂质体的制备工艺相似,经典制备方法主要有注入法、注入-超声结合法和薄膜分散法。本实验采用乙

醇注入法制备PA醇质体,所用设备简单、易于操作、重现性好,便于推广使用。

经试验发现,采用紫外分光光度法测定经皮渗透液中的药物浓度时,皮肤渗出物及醇质体成分卵磷脂和胆固醇在PA的最大吸收波长243 nm处均有吸收,干扰PA浓度的测定。因此本文采用HPLC法测定,结果表明PA与皮肤渗出物杂质峰、辅料及溶剂均得到了良好地分离。该方法具有灵敏度高、专属性强、简单快速、准确可靠的特点,适用于PA醇质体的体外经皮渗透液中PA浓度的测定。

醇质体作为一种新的经皮给药载体,具有高变形性、高包封率特点,能够显著提高药物的透皮速率和经皮渗透量^[8]。PA醇质体的 J_s 为5.637 μg/(cm²·h),12 h Q_n 达到(64.145 ± 1.61) μg/cm²,分别是PA溶液的2.3倍和2.1倍,具有较好的经皮渗透性;而且将PA制成醇质体后,对PA具有遮蔽作用,防止PA见光分解,提高了其稳定性。

参考文献

- [1] Godin B, Touitou E. Mechanism of bacitracin permeation enhancement through the skin and cellular membranes from an ethosomal carrier[J]. *J Control Release*, 2004, 94 (2/3):365.
- [2] 王馨, 黄华. 醋酸泼尼松龙固体脂质纳米粒的试制[J]. *中国医药工业杂志*, 2007, 38(7):499.
- [3] Jain S, Tiwary AK, Sapra B, et al. Formulation and evaluation of ethosomes for transdermal delivery of lamivudine[J]. *AAPS PharmSciTech*, 2007, 8(4):E111.
- [4] Fang YP, Tsai YH, Wu PC, et al. Comparison of 5-aminolevulinic acid-encapsulated liposome versus ethosomes for skin delivery for photodynamic therapy[J]. *Int J Pharm*, 2008, 356(1/2):144.
- [5] 刘凤涛, 贺蓉, 赵远党, 等. 5-氟尿嘧啶乙醇脂质体的改性及其透皮吸收研究[J]. *中国药房*, 2008, 19(25):1938.
- [6] Lv Q, Yu A, Xi Y, et al. Development and evaluation of penciclovir-loaded solid lipid nanoparticles for topical delivery[J]. *Int J Pharm*, 2009, 372(1/2):191.
- [7] 望开鹏, 房志刚, 宋玉玲, 等. 不同透皮促进剂对环孢素A纳米粒丝素蛋白膜剂经皮渗透的影响研究[J]. *中国药房*, 2011, 22(9):802.
- [8] Godin B, Touitou E, Rubinstein E, et al. A new approach for treatment of deep skin infections by an ethosomal antibiotic preparation: an in vivo study[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2005, 55(6):989.

(收稿日期:2012-08-07 修回日期:2012-09-28)

《中国药房》杂志——中国科技核心期刊, 欢迎投稿、订阅