

双氯芬酸钠微乳的家兔皮肤刺激性及体外透皮吸收性能评价^Δ

魏 玉*, 苏成福(河南中医学院药学院, 郑州 450008)

中图分类号 R943 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)04-0490-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.04.16

摘要 目的:对双氯芬酸钠微乳(DS-ME)的性质、皮肤刺激性及体外透皮吸收进行考察,探讨其局部外用给药的可行性。方法:采用紫外分光光度法测定DS-ME中DS的含量;采用激光粒度仪测定DS-ME的粒径分布;家兔皮肤刺激性实验考察DS-ME和空白ME对单次给药正常皮肤、多次给药正常皮肤和单次给药破损皮肤的影响;Franz扩散池法比较DS-ME与市售DS凝胶经小鼠离体皮肤的透皮参数。结果:所制DS-ME为O/W型微乳,粒径为 (30.140 ± 9.020) nm;与空白ME比较,DS-ME对家兔皮肤的刺激评分无明显差异;DS-ME与市售DS凝胶的稳态渗透速率分别为 34.16 、 $18.62 \mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$,渗透系数分别为 1.029 、 0.561 cm/h ,滞后时间分别为 0.124 、 0.367 h。结论:DS-ME的粒径小,无皮肤刺激性,可提高DS的透皮吸收速率。

关键词 双氯芬酸钠;微乳;皮肤刺激性;透皮吸收

Evaluation of Rabbit Skin Irritation and *in vitro* Transdermal Absorption of Diclofenac Sodium Microemulsion

WEI Yu, SU Chengfu (College of Pharmacy, Henan University of TCM, Zhengzhou 450008, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the property, skin irritation and *in vitro* transdermal absorption of Diclofenac sodium microemulsion (DS-ME), and to explore the feasibility of local external use of it. METHODS: The content of DS in DS-ME was determined by ultraviolet spectrophotometry. The distribution of particle size was determined by laser particle size analyzer. The effects of DS-ME and blank micro-emulsion on normal skin of single administration, normal skin of multiple administration and damaged skin of single administration were investigated by rabbit skin irritation test. The transdermal parameters of DS-ME and commercially available DS gel through isolated skin of mice were compared by Franz diffusion cell. RESULTS: The prepared DS-ME was O/W microemulsion with particle size of (30.140 ± 9.020) nm. Compared with blank ME, DS-ME had no significant difference in rabbit skin irritation score. Steady permeation rates of DS-ME and commercially available DS gel were 34.16 and $18.62 \mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$, respectively; the permeation coefficient of them were 1.029 and 0.561 cm/h ; the delay time were 0.124 and 0.367 h. CONCLUSIONS: The particle size of DS-ME is small and not irritant to skin, and can improve transdermal absorption rate of DS.

KEYWORDS Diclofenac sodium; Microemulsion; Skin irritation; Transdermal absorption

双氯芬酸钠(Diclofenac sodium, DS)为苯乙酸类衍生物,在临床上主要用于治疗各类关节炎,但其水溶性较差,对胃肠道有很强的刺激性,患者耐受性差,致使药物疗效降低,限制了该药在治疗骨关节肿痛方面的广泛使用^[1-2]。因此,利用现代制剂技术,可将该药制成微乳(Microemulsion, ME)剂型进行局部外用给药,以减少胃肠道刺激,达到避免峰谷效应和提高生物利用度的目的。ME是由水相、油相和双亲性化合物按照一定比例制成的透明或半透明的热力学稳定的体系。该体系具有稳定性好、粒径小,可增加难溶性药物溶解性等优点^[3-6]。通过笔者前期研究^[7-8],确定了DS-ME的处方和制备方法,在此基础上,本文对DS-ME的性质、皮肤刺激性及其离体小鼠透皮吸收性能进行研究,以探讨DS-ME局部外用给药的可行性。

1 材料

^Δ 基金项目:河南省科技攻关项目(No.162102310449);河南中医学院“科研苗圃工程”项目(No.MP2015-12)

* 实验师,硕士。研究方向:中药活性成分及其制剂。电话:0371-65962746。E-mail: lyixcz@163.com

1.1 仪器

Mastersize-2000型激光粒度测定仪(英国马尔文公司);RYJ-6A Franz型药物透皮扩散实验仪(上海黄海药检仪器厂);WFZ UV-2000型紫外-可见分光光度计[尤尼柯(上海)仪器有限公司];FA-1004型电子分析天平(上海恒乐科学仪器有限公司);HH.SY21-Ni型电热恒温水浴箱(北京市长风仪器仪表公司)。

1.2 药品与试剂

DS对照品(上海化学试剂有限公司,批号:100334-200302,纯度:99%);DS原料药(河南东泰制药有限公司,批号:H20055353,纯度:99%);双氯芬酸钠二乙胺凝胶(市售DS凝胶,黄石卫生材料药业有限公司,批号:H20040301,规格:每1g基质含DS 0.01g);聚氧乙烯氢化蓖麻油(RH40,上海运宏化工制剂辅料有限公司,批号:201309);聚山梨酯80(T80,天津市欧博凯化工有限公司,批号:20120922);单硬酸甘油酯(天津市四通化工厂,批号:20100423);十八醇(天津市科密欧化学试剂有限公司,批号:20110808);丙三醇(天津市风船化学试剂科技有限公司,批号:20121008);花生油(河南省星河油

脂有限公司)。

1.3 动物

昆明种小鼠, ♂, 体质量 20~25 g; 健康成年家兔, ♂, 体质量 2.5~3.0 kg。动物均购于河南省实验动物中心, 许可证号为 SCXK(豫)2005-0001。

2 方法与结果

2.1 DS-ME 处方与制备方法

参考文献[7-8]方法制备 DS-ME。DS-ME 的处方为油相[花生油-单硬脂酸甘油酯-十八醇(8:2:1)]占 12.14%, 乳化剂[T80-RH40(2:8)]占 72.86%, 助乳化剂(丙三醇)占 15%, 载药量为每 1 g 基质含 DS 0.05 g。按处方比例称取药物和辅料于蒸发皿中, 置于 80 °C 水浴上, 先将药物溶解于助乳化剂丙三醇中, 再将同条件下加热混合均匀的油相与乳化剂加入溶解好的药物中, 混合均匀后, 在室温下以 300 r/min 恒速搅拌, 再将水缓慢加到含药相中至澄清透明, 即得 DS-ME 溶液。

2.2 DS 含量的测定

2.2.1 检测波长的确定 分别取 DS 对照品溶液、DS-ME 溶液及空白 ME 溶液适量, 于 200~600 nm 波长范围内扫描。结果, 对照品和 DS-ME 溶液均在 276 nm 波长处有最大吸收, 空白 ME 对 DS 测定无干扰。因此确定 276 nm 波长为最适检测波长。

2.2.2 标准曲线的制备 精密称取 DS 对照品 50.6 mg, 加无水乙醇定容至 25 mL 量瓶中, 摇匀, 得 2.024 μg/mL DS 贮备液。精密量取 3 mL 贮备液, 置于 25 mL 量瓶中, 加无水乙醇稀释至刻度, 摇匀, 得到 242.88 μg/mL DS 对照品溶液。分别吸取 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8 mL DS 对照品溶液, 置于 10 mL 量瓶中, 用 0.9% 氯化钠溶液(生理盐水)稀释至刻度, 摇匀。以生理盐水作为参比溶液, 采用紫外分光光度法在 276 nm 波长处测定吸光度。以 DS 的质量浓度(x)为横坐标、吸光度(y)为纵坐标进行线性回归, 得回归方程为 $y=0.025x-0.0029$ ($r=0.9998, n=5$)。结果表明, DS 检测质量浓度线性范围为 2.428 8~19.430 4 μg/mL。

2.2.3 加样回收率试验 取已知含量的样品适量, 共 6 份, 按“2.1”项下方法加入一定质量的 DS 对照品, 依法制备成溶液, 进样测定, 计算样品含量和加样回收率, 结果见表 1。

表 1 加样回收率试验结果 (n=6)

Tab 1 Results of sample recovery test (n=6)

取样量, g	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
0.101 4	5.070	5.120	10.16	99.41		
0.101 0	5.050	5.120	10.19	100.40		
0.101 1	5.055	5.120	10.10	98.54	98.54	2.84
0.101 5	5.075	5.120	10.09	97.95		
0.102 1	5.105	5.120	10.02	96.00		
0.101 3	5.065	5.120	10.13	98.93		

2.2.4 精密度试验 取“2.2.2”项下 DS 对照品溶液适量, 连续进样测定 6 次, 记录吸光度。结果, DS 吸光度的 RSD=1.02% (n=6), 表明仪器精密度良好。

2.3 DS-ME 的类型鉴定与粒径检测

2.3.1 DS-ME 的类型鉴定 用染色法鉴定 DS-ME 的类型^[9]。根据红色的油溶性染料苏丹红和蓝色的水溶性染料亚甲基蓝在所制备的 DS-ME 中的扩散速度的快慢, 判定 ME 类型。结果显示, DS-ME 中蓝色扩散速度快于红色, 表明所制备的 DS-ME 为 O/W(水包油)型。

2.3.2 粒径检测 粒径的分布是判断所制备的 ME 是否稳定的重要指标之一^[10]。采用激光粒度测定仪对制备的 DS-ME 进行粒径检查。结果显示, DS-ME 的粒径范围为 (30.140 ± 9.020) nm, 粒径分布见图 1。

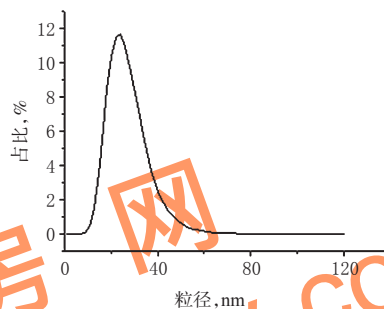


图 1 DS-ME 的粒径分布

Fig 1 Particle size distribution of DS-ME

2.4 家兔皮肤刺激性实验

根据文献[11-13]方法进行家兔皮肤刺激性实验。

2.4.1 单次给药正常皮肤刺激实验 取家兔 6 只, 于给药前 24 h 背部去毛(先用电动剃毛剪剪净, 再用脱毛膏脱毛而不损伤皮肤), 脱毛面积为 2.5 cm × 2.5 cm。以空白 ME 为对照, 采用同体积侧身对比法, 每只家兔脱毛区共 6 块, 每侧各 3 块。受试皮肤给予 DS-ME, 对照组给予空白 ME, 给药剂量为每只家兔 0.5 g(相当于 DS 25 mg, 人等效剂量)。观察给药后 72 h 内给药部位出现红斑和水肿的情况。

2.4.2 多次给药正常皮肤刺激实验 家兔处理与给药同“2.4.1”项, 每天给药 0.5 g, 分 4 次给药, 每次间隔 6 h, 连续给药 7 d。观察停药后 72 h 内给药部位出现红斑和水肿的情况。

2.4.3 单次给药破损皮肤刺激实验 家兔处理与给药同“2.4.1”项, 但在给药前用消毒针头在脱毛后的皮肤上划出“#”形擦痕, 直径 2 cm, 以刺激表皮、有轻度渗血为度。观察给药后 72 h 内给药部位出现红斑和水肿的情况。

2.4.4 皮肤刺激强度的判定 对给药部位有无红斑和水肿等情况按《皮肤刺激性反应评分标准》^[14]进行评分。根据皮肤刺激强度判定公式计算平均积分值, 并进行刺激强度评价。皮肤刺激强度判定公式: 每只动物平

均积分=红斑和水肿积分/观察次数。平均积分在0~0.49时为无刺激,0.5~1.99时为轻度刺激,2.0~5.99时为中度刺激,大于6时为对皮肤有强烈刺激。

2.4.5 结果 单次给药12 h时内正常皮肤及破损皮肤均微可见红斑,各时段均无水肿现象,正常皮肤和破损皮肤在各时段的平均积分均为0.4,提示DS-ME及空白ME对正常皮肤及破损皮肤均无刺激性。多次给药停药后正常皮肤未出现红斑、水肿,仅有轻微色素沉着,且48 h后消失,皮肤情况未见异常,提示DS-ME长期使用对皮肤无刺激性。

2.5 体外透皮吸收研究

2.5.1 离体小鼠皮的制备 小鼠脱颈处死后,小心剪去腹部粗毛,涂上脱毛膏,等待5 min左右,刮去脱毛膏及腹部毛,用湿纱布将其擦净,然后剥取小鼠腹部皮肤,去除皮下脂肪组织,即得离体小鼠皮。用蒸馏水和生理盐水反复冲洗小鼠皮,直至无浑浊为止。用滤纸吸干水分,铝箔包裹后置于-20℃冰箱中保存备用。临用前解冻恢复至室温,用pH 7.4磷酸盐缓冲液漂洗至洗液澄清,用滤纸吸干后备用。

2.5.2 透皮吸收试验方法 采用Franz扩散池进行透皮试验。扩散池置于37℃恒温水浴中保温,以生理盐水作为接收液,取小鼠的完整皮肤固定于已注入接收液的接收室上,鼠皮内测朝向接收室,皮肤角质层朝向给药层,并紧密接触。接收池内分别加入DS-ME及市售DS凝胶(均含DS 18.75 mg),转速为600 r/min,接收液温度保持在(37±0.1)℃,接收室容积为17 mL,有效扩散面积为1.77 cm²。分别在给药后1、3、5、7、9、11、12 h吸取接收液1 mL,每次取样后补加等量等温的生理盐水。将取出的样品定容至10 mL量瓶中,测定DS含量,按照公式计算单位面积累积透皮量(Q)^[15]。 $Q=(c_n \times V + \sum_{i=1}^{n-1} c_i \times V_i) / A$,式中c_n:第n个时间点取样测得的质量浓度(μg/mL);V:接收室容积(mL);c_i:第i(i=n-1)个时间点取样测得的药物质量浓度(μg/mL);V_i为取样体积(mL);A为有效透皮面积(cm²),其中 $\sum_{i=1}^{n-1}$ 为取样时药物累积量之和。

2.5.3 数据处理与结果 DS-ME及市售DS凝胶经小鼠离体皮肤的透皮曲线见图2。

从图2可知,DS-ME及市售DS凝胶的Q随着时间的延长而逐渐增加,呈良好的线性关系。

以Q对透皮时间(t)进行回归分析,计算稳态渗透速率(J_s)、渗透系数(P_s)、滞后时间(T_{lag})。DS-ME及市售DS凝胶经小鼠离体皮肤的透皮参数测定结果见表1。

从表1可知,DS-ME的J_s为34.16 μg/(cm²·h),是市售DS-ME的1.8倍。此外,将DS制成DS-ME后,每1 g基质载药量由市售DS凝胶剂型的0.01 g提高到0.05 g,

由此表明,将DS制成ME体系后载药量有较大的提高,这可能是由于ME中的双亲性化合物增加了DS的表观油水分配系数,使DS的平衡溶解度增加。

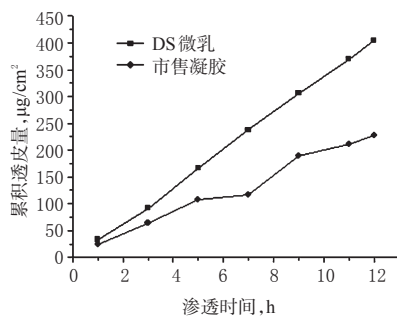


图2 DS-ME及市售DS凝胶经小鼠离体皮肤的透皮曲线

Fig 2 Permeation curves between DS-ME and commercially available DS gel through isolated skin of mice

表1 DS-ME及市售DS凝胶经小鼠离体皮肤的透皮参数测定结果

Tab 1 Results of permeation parameters between DS-ME and commercially available DS gel through isolated skin of mice

组别	回归方程	r ²	J _s , μg/(cm ² ·h)	P _s , cm/h	T _{lag} , h
DS-ME	y=34.163x-4.244 3	0.999 4	34.16	1.029	0.124 2
市售DS-ME	y=18.62x+6.837 7	0.980 9	18.62	0.561	0.367 2

3 讨论

在ME的形成过程中,随着水相的加入,ME体系发生转相,即从开始透明的W/O型ME,然后经历透明黏稠的液晶区,最后形成透明的O/W型ME^[15]。染色法证明了DS-ME所形成的ME类型为O/W型。对DS-ME进行单次正常皮肤、多次正常皮肤及单次破损皮肤刺激性实验,均未见明显刺激反应,说明DS-ME外用无明显的皮肤刺激性。而DS-ME的载药量较市售DS凝胶有较大提高,说明ME体系可以增加难溶性药物的溶解度。在体外经皮渗透试验中,制备的DS-ME累积透皮量较市售DS凝胶增加、J_s增快,这可能与ME的表面活性剂和助表面活性剂作为透皮吸收促进剂可减轻角质层的屏障作用、形成高浓度梯度,从而促进扩散的进行、提高了J_s有关^[16]。综上所述,本研究为制备刺激性小、载药量大、生物利用度高的DS新剂型提供了一定的依据。

参考文献

- [1] 乔明艳.国内双氯芬酸钠制剂开发状况[J].实用药物与临床,2010,13(5):379-380.
- [2] 苏娜,徐娜,唐尧.双氯芬酸钠致不良反应的文献分析[J].中国药业,2008,17(17):44-45.
- [3] Mahmoud DB, Shukr MH, Bendas ER. In vitro and in vivo evaluation of self-nanoemulsifying drug delivery systems of cilostazol for oral and parenteral administration

何首乌乙酸乙酯提取物对秀丽线虫的抗衰老作用研究^Δ

唐进法^{1*}, 张帆², 李宇辉², 吴宿慧², 李寒冰², 李伟霞¹, 李学林^{1#} (1.河南中医药大学第一附属医院药学部, 郑州 450000; 2.河南中医药大学药学院, 郑州 450000)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)04-0493-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.04.17

摘要 目的:研究何首乌乙酸乙酯提取物(EPM)对秀丽线虫(简称“线虫”)寿命的影响,考察EPM抗衰老作用。方法:设立EPM低、中、高浓度组(25、37.5、50 mg/L,以生药计)和空白组(0 mg/L),考察EPM对线虫寿命的影响;设立EPM组(37.5 mg/L)和空白组(0 mg/L),分别进行线虫的生殖实验、急性热应激实验和急性氧化应激实验,考察EPM对线虫生殖能力以及压力应激的影响。结果:在寿命实验中,EPM低、中、高浓度组线虫的平均寿命较空白组均显著延长($P<0.05$ 或 $P<0.01$),以中浓度EPM作用最为明显;增殖实验中,EPM组线虫在第2、3天中的子代数量较空白组显著增加($P<0.05$);在急性热应激实验和急性氧化应激实验中,EPM组线虫的平均生存时间较空白组明显延长($P<0.05$)。结论:37.5 mg/L的EPM能延缓线虫衰老且不损害其生殖能力。
关键词 何首乌;乙酸乙酯提取物;抗衰老;秀丽线虫;寿命;氧化应激;热应激

Anti-aging Effect Study of Ethyl Acetate Extract from *Folygonum multiflorum* on *Caenorhabditis Elegans*

TANG Jinfa¹, ZHANG Fan², LI Yuhui², WU Suhui², LI Hanbing², LI Weixia¹, LI Xuelin¹ (1.Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Henan University of TCM, Zhengzhou 450000, China; 2.College of Pharmacy, Henan University of TCM, Zhengzhou 450000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the lifespan effect of ethyl acetate extract from *Polygonum multiflorum* (EPM) on caenorhabditis elegans, and to investigate its anti-aging effect. METHODS: EPM low-concentration, medium-concentration and high-concentration groups (25, 37.5, 50 mg/L, calculated by crude drug) and blank group (0 mg/L) were established to investigate the effects of EPM on the lifespan of caenorhabditis elegans. EPM group (37.5 mg/L) and blank group (0 mg/L) were established to perform reproductive test, acute heat stress test and acute oxidative stress test of caenorhabditis elegans. The effects of EPM on reproductive capacity and pressure stress of caenorhabditis elegans were investigated. RESULTS: The lifespan test, average lifespan of cae-

- [J]. *Int J Pharm*, 2014, 476(1/2): 60-69.
- [4] Sriamornsak P, Limmatvapirat S, Piriayprasarth S, et al. A new self-emulsifying formulation of mefenamic acid with enhanced drug dissolution[J]. *Asian J Pharm Sci*, 2014, 10(2): 121-127.
- [5] 应娜,林高通.微乳的研究进展及应用[J]. *海峡药学*, 2008, 20(9): 126-128.
- [6] 王金铃,孙进,何仲贵.微乳及其在药学中应用[J]. *中国药剂学杂志*, 2009, 7(4): 356-364.
- [7] 魏玉,娄玉琴,刘雅敏,等.一种双氯芬酸钠自乳化软膏,中国:201210126343.3[P]. 2016-08-01.
- [8] 刘雅敏,魏玉,娄玉琴,等.一种自乳化基质及其应用,中国:201210126344.8[P]. 2012-04-26.
- [9] 秦金淼,李引乾,薛琴,等.多潘立酮微乳的制备及质量评价[J]. *西北农业学报*, 2009, 18(3): 33-37.
- [10] 曹璐.白藜芦醇自微乳的研制[D].石家庄:河北医科大学, 2014.
- [11] 魏伟,吴希美,李元建. *药理实验方法学*[M]. 4版.北京:人民卫生出版社, 2010: 770-774.
- [12] 陈奇. *中药药理研究方法学*[M]. 3版.北京:人民卫生出版社, 2011: 159-160.
- [13] 王锋,李文娜,但家立,等.蒙药消肿散涂膜剂皮肤刺激和皮肤过敏实验研究[J]. *遵义医学院学报*, 2008, 31(3): 243-244.
- [14] 国家食品药品监督管理局. *化学药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则*[S]. 2005.
- [15] 赵晶,金凯,宋光杰,等.水杨酸微乳的制备及其体外透皮吸收研究[J]. *中国药房*, 2015, 26(1): 112-114.
- [16] 刘晨,王文苹,戴贵东.不同方法制备枸杞籽油微乳的比较研究[J]. *中国药房*, 2012, 23(19): 1749-1752.

Δ 基金项目:2015年度河南省中医药科学研究专项课题(No.2015ZY02101)

* 副主任药师,硕士生导师。研究方向:中药药动学。电话:0371-66233562。E-mail: a0519@163.com

通信作者:主任药师,博士生导师。研究方向:中药的合理应用及中药的应用形式。电话:0371-66245342。E-mail: lixuelin450000@163.com

(收稿日期:2016-03-29 修回日期:2016-05-19)

(编辑:邹丽娟)