

· 工艺与制剂 ·

白桦脂酸醇质体的制备及其体外经皮渗透试验

余丹妮¹, 李霞¹, 张骥¹, 李俊松^{2*}

(1. 中国药科大学理学院, 南京 211198; 2. 南京中医药大学江苏省中药炮制重点实验室, 南京 210046)

[摘要] **目的:** 优选白桦脂酸醇质体的处方工艺参数, 考察醇质体作为白桦脂酸经皮给药载体的可行性。**方法:** 采用乙醇注入法制备白桦脂酸醇质体, 以包封率为评价指标, 通过正交试验考察白桦脂酸和磷脂的质量比、磷酸盐缓冲液 pH 和乙醇体积分数对白桦脂酸醇质体处方工艺的影响。利用透射电镜和激光粒径分析仪考察白桦脂酸醇质体的形态及粒径分布, 采用 Franz 扩散池考察其体外经皮给药特性, 并与脂质体和 10% 异丙醇溶液比较。运用 HPLC 测定白桦脂酸含量, 检测波长 207 nm, 流动相乙腈-0.1% 冰乙酸 (70:30)。**结果:** 最佳处方工艺为磷脂与白桦脂酸的质量比 19:1, 磷酸盐缓冲液 pH 7.4, 乙醇体积分数 30%; 醇质体粒径 94.3 nm, 包封率 86.3%; 白桦脂酸醇质体 12 h 的累积经皮渗透量 (108.33 ± 10.26) $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$, 分别是脂质体和 10% 异丙醇饱和溶液 2.12 倍和 5.98 倍。**结论:** 醇质体作为经皮给药载体, 能明显促进白桦脂酸的经皮渗透, 效果优于脂质体, 为五环三萜类化合物的抗肿瘤及抗获得性免疫缺陷综合症治疗提供新思路。

[关键词] 白桦脂酸; 醇质体; 脂质体; 经皮给药系统; 体外透皮试验

[中图分类号] R283.6; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)17-0001-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014170001

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140715.1322.001.html>

[网络出版时间] 2014-07-15 13:22

Preparation and *in vitro* Transdermal Diffusion of Betulinic Acid Loaded Ethosomes

YU Dan-ni¹, LI Xia¹, ZHANG Ji¹, LI Jun-song^{2*}

(1. College of Science, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China; 2. Jiangsu Key Laboratory of Chinese Medicines Processing, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize formulation technology of betulinic acid ethosomes and investigate feasibility of ethosomes as a transdermal carrier for betulinic acid. **Method:** Betulinic acid ethosomes were prepared by ethanol injection method, taking entrapment efficiency as index, an orthogonal design was used to optimize formulation process of betulinic acid ethosomes with ratio of betulinic acid to phospholipid, phosphate buffer pH and ethanol concentration as factors. Shape and particle size of betulinic acid ethosomes were analyzed by transmission electron microscopy and laser particle size analyzer. *In vitro* transdermal delivery characteristics of betulinic acid were evaluated by using Franz diffusion cells, and compared with liposomes and 10% isopropanol solution of betulinic acid. HPLC was employed to determine the content of betulinic acid with mobile phase of acetonitrile-0.1% glacial acetic acid (70:30) and detection wavelength at 207 nm. **Result:** Optimal formulation process parameters for betulinic acid ethosomes were soybean lecithin-betulinic acid (19:1), pH of phosphate buffer 7.4 and ethanol concentration of 30%. Average particle size of ethosomes under these conditions was 94.3 nm, encapsulation efficiency was 86.3%. Accumulative permeation amount of betulinic acid ethosomes

[收稿日期] 20131224(007)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81202929)

[第一作者] 余丹妮, 在读博士, 讲师, 从事中药及纳米材料新型给药系统研究, Tel:025-86185151, E-mail: ydnaya@163.com

[通讯作者] * 李俊松, 博士, 教授, 从事中药炮制和中药药剂学研究, Tel:025-85811063, E-mail: lijunsong1964@163.com

within 12 h was $(108.33 \pm 10.26) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$, which was about 2.12 times of liposomes and 5.98 times of 10% isopropanol solution. **Conclusion:** Ethosomes, as a vector for transdermal drug delivery, could significantly promote transdermal penetration of betulinic acid better than liposomes. This study provided new ideas for anti-tumor and anti-acquired immunodeficiency syndrome treatment of pentacyclic triterpenoids.

[Key words] betulinic acid; ethosomes; liposomes; transdermal delivery system; *in vitro* transdermal test

获得性免疫缺陷综合征 (acquired immunodeficiency syndrome, AIDS) 及肿瘤是威胁人类生存健康的两大疾病,随着人们对疾病的靶点及其分子机制等研究的不断深入,新的药物不断涌现,药理活性高、毒副作用小的抗 AIDS 及抗肿瘤新药成为研究的热点。白桦脂酸属于五环三萜类化合物,来源于白桦树皮或夏枯草等天然植物。该类化合物具有突出的抗 AIDS 及抗肿瘤活性,其相对分子质量小、毒性低、抗肿瘤活性特异,对多药耐药性具有一定调节作用^[1]。美国癌症研究所已将白桦脂酸列入快速研发规划项目,是极具研发潜力的先导化合物。但该化合物在水中溶解度极低、口服吸收差、有效治疗剂量偏大,使得其开发仍处于临床前研究阶段^[2]。为改善药物生物利用度,提高使用效率,非口服给药是一条很好的尝试途径。

经皮给药系统是指药物通过皮肤吸收进入人体血液循环的制剂系统,可避免肝脏的首过效应,维持恒定血药浓度,延长药物作用时间,增强疗效并减小副作用。目前关于白桦脂酸的经皮给药研究尚未见报道,因为该化合物难以穿透角质屏障,包载的药物在皮肤或皮下液层溶出困难,血药浓度低,难以发挥全身治疗效果。醇质体是一种由磷脂、乙醇、水组成的具有脂质双分子层结构的新型微粒给药载体^[3],与另一载药量较高的透皮剂型——脂质体相比,醇质体粒径小、结构稳定、包封率高、透皮性能良好,能有效携带水溶或难溶性药物分子穿透角质层甚至到达皮肤更深层,在经皮给药领域具有突出优势^[4]。本实验拟制备白桦脂酸醇质体,研究其经皮促渗效果,为白桦脂酸经皮给药制剂的开发提供实验依据。

1 材料

1100 系列高效液相色谱仪 (美国 Agilent 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), M-2000EX 型透射电子显微镜 (日本日立公司), RYJ-6B 型 Franz 扩散池 (有效扩散面积 2.8 cm^2 , 接收池体积 7 mL, 上海黄海药检仪器厂), JY92-2D 型超声波细胞粉碎机 (宁波新芝生物科技有限公司), LS13 320 型激光散射粒径分析仪 (美国

Brookhaven 公司)。

白桦脂酸原料药 (纯度 $\geq 98\%$, 南京泽朗医药科技有限公司), 白桦脂酸对照品 (纯度 $> 98\%$, 批号 TB283601, 日本东京化成工业株式会社), 大豆卵磷脂 (PC, 上海太伟药业有限公司), 氯化钾葡聚糖凝胶 G-50 (上海伯奥生物科技有限公司), 甲醇、乙腈为色谱纯, 水为蒸馏水或去离子水, 其他试剂均为分析纯。

雄性昆明种小鼠, 体重 18 ~ 22 g, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司, 合格证号 SCXK (沪) 2012-0002。

2 方法与结果

2.1 样品的制备

2.1.1 白桦脂酸脂质体 分别称取白桦脂酸和大豆卵磷脂 10,190 mg, 加无水乙醇 2 mL 使溶解, 置于磁力搅拌器上, 在密闭条件下边搅拌边缓缓注入 pH 7.4 磷酸盐缓冲液 10 mL, 注完后继续搅拌至乙醇挥尽, 于冰水浴中探头式超声 30 s (每超声 3 s 停 2 s, 下同), 即得。

2.1.2 白桦脂酸醇质体 分别称取白桦脂酸和大豆卵磷脂 10,190 mg, 加无水乙醇 3 mL 使溶解, 置于磁力搅拌器上, 在密闭条件下边搅拌边缓缓细流注入 pH 7.4 磷酸盐缓冲液 7 mL, 继续搅拌 10 min, 于冰水浴中探头式超声 30 s, 即得。

2.2 白桦脂酸的含量测定

2.2.1 色谱条件 Diamonsil ODS C_{18} 色谱柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm), 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 检测波长 207 nm, 流动相乙腈-0.1% 冰乙酸 (70:30), 流速 1.0 mL \cdot min⁻¹, 进样量 10 μL 。

2.2.2 线性关系考察 精密称取于 105 $^{\circ}\text{C}$ 干燥至恒重的白桦脂酸对照品 8.12 mg, 置于 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得 324.80 mg \cdot L⁻¹ 储备液。分别精密量取 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10 mL 置于 50 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 得系列对照品溶液, 按 2.2.1 项下方法测定, 以峰面积为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 得回归方程 $Y = 66.597X - 10.438$ ($r = 0.9997$), 线性范围

1. 299 2 ~ 64. 96 mg·L⁻¹。

2.2.3 精密度试验 精密吸取 2.2.2 项下白桦脂酸对照品溶液适量,按 2.2.1 项下方法连续进样 6 次,计算峰面积的 RSD 0.86%,表明仪器精密度良好。

2.2.4 稳定性试验 精密吸取 2.2.2 项下白桦脂酸对照品溶液适量,分别在 0,2,4,6,8,12,24 h 按 2.2.1 项下方法进样,计算白桦脂酸峰面积的 RSD 1.37%,表明对照品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.5 回收率试验 精密吸取空白醇质体 0.5 mL,共 9 份,分别置于 10 mL 量瓶中,等分为 3 组,分别加入白桦脂酸对照品储备液 1.1,1.4,1.7 mL,加甲醇稀释至刻度,按 2.2.1 项下方法测定,计算 3 种质量浓度的回收率分别为 99.38%,98.76%,101.43%,RSD 依次为 1.05%,1.12%,1.39%。

2.3 包封率测定 采用葡聚糖凝胶柱分离法测定^[5-6]。取醇质体、脂质体混悬液各 0.5 mL,分别加入已制备好的 Sephadex G-50 微柱凝胶顶端,于 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,加水 1 mL 洗脱 2 次,合并滤液,加甲醇定容至 50 mL,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,按 2.2.1 项下方法测定,得包封药物的质量。取醇质体、脂质体混悬液各 0.5 mL,不经微柱离心,直接用甲醇稀释至相同倍数,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,按 2.2.1 项下方法测定,得药物的总质量,计算包封率($\bar{x} \pm s, n = 3$)分别为(86.4 ± 2.3)%,(80.5 ± 3.0)%。结果发现与脂质体相比,醇质体包封率显著增加($P < 0.01$)。

2.4 粒径测定 分别取制备的醇质体和脂质体样品适量,加水稀释适当倍数,采用激光散射粒径测定仪测定样品粒径,结果平均粒径分别为(97.9 ± 10.3),(155.3 ± 13.2) nm,多分散系数依次为 0.217 ± 0.015,0.259 ± 0.020。表明与脂质体相比,醇质体平均粒径显著性减小($P < 0.01$),粒径分布更均匀。

2.5 正交试验筛选处方工艺 在预试验基础上,选择白桦脂酸和磷脂的质量比、磷酸盐缓冲液 pH 和乙醇体积分数为考察因素,各因素取 3 个水平,以包封率为评价指标,按 L₉(3⁴) 正交表进行试验,因素水平见表 1,试验安排及结果见表 2,方差分析见表 3。

由直观分析可知,各因素对醇质体包封率的影响顺序为 A > B > C。方差分析表明因素 A 对包封率具有极显著性影响,因素 B 具有显著性影响,因素 C 则无显著性影响,初步确定最佳处方工艺组合

表 1 白桦脂酸醇质体制备工艺正交试验因素水平

水平	A 磷脂:白桦脂酸	B 磷酸盐缓冲液 pH	C 乙醇体积分数/%
1	15:1	6.5	25
2	17:1	7.0	30
3	19:1	7.4	35

表 2 白桦脂酸醇质体制备工艺正交试验安排及直观分析

No.	A	B	C	D(空白)	包封率/%
1	1	1	1	1	41.7
2	1	2	2	2	55.4
3	1	3	3	3	52.6
4	2	1	2	3	73.9
5	2	2	3	1	77.5
6	2	3	1	2	76.8
7	3	1	3	2	75.2
8	3	2	1	3	81.3
9	3	3	2	1	85.6
K ₁	49.900	63.600	66.600	68.267	
K ₂	76.067	71.400	71.633	69.133	
K ₃	80.700	71.667	68.433	69.267	
R	30.800	8.067	5.033	1.000	

表 3 包封率方差分析

方差来源	SS	MS	F	P
A	1 645.802	935.445	467.723	<0.01
B	125.982	71.217	35.609	<0.05
C	38.936	22.010	11.005	>0.05
D(误差)	1.77			

注: $F_{0.05}(2,2) = 19, F_{0.01}(2,2) = 99$ 。

为 A₃B₃C₂,即磷脂与白桦脂酸的质量比 19:1,磷酸盐缓冲液 pH 7.4,乙醇体积分数 30%。按优化的工艺条件制备 3 批白桦脂酸醇质体,计算粒径、多分散指数、包封率的平均值分别为 94.3 nm,0.219,86.3%,RSD 依次为 0.099%,0.021%,0.039%。

2.6 形态观察 吸取制备的醇质体混悬液少许滴于有支持膜的铜网上,用滤纸吸铜网边缘多余液体,待稍干后,采用透射电镜观察样品形态,结果见图 1,发现白桦脂酸醇质体形状近似球形,粒径较均匀。

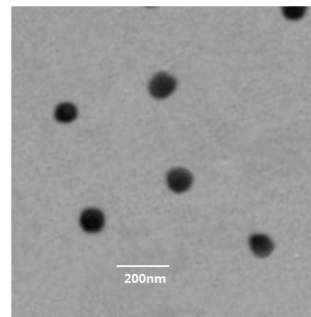


图 1 白桦脂酸醇质体 SEM(×97 000)

2.7 体外透皮试验 将小鼠颈部脱毛处死,剥离腹

部皮肤,小心去除皮肤上的短毛、皮下组织和筋膜,用生理盐水漂洗干净;将皮肤角质层面朝向供给池固定于 Franz 扩散池中,以 10% 异丙醇作为接收介质,扩散置于 37 °C 恒温水浴中,以 400 r·min⁻¹ 速度电磁搅拌;分别取白桦脂酸醇质体、白桦脂酸脂质体、白桦脂酸 10% 异丙醇溶液各 1 mL 均匀涂布于皮肤角质层上(药物质量均为 1 mg),密封;分别于 1,2,3,4,6,8,10,12 h 定时取样 1 mL,并立即补充同温等量接收液。样品蒸干,用甲醇定容至 1 mL,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,按 2.2.1 项下方法测定白桦脂酸含量,计算累积渗透量(Q),结果见图 2。

$$Q = (C_n V + \sum_{i=1}^{n-1} C_i V_i) / A$$

式中 C_n 和 C_i 分别为第 n, i 个取样点测得的药物质量浓度, V 和 V_i 分别为接收池体积和取样体积, A 为有效扩散面积。结果显示白桦脂酸醇质体 Q_{12h} 达 (108.33 ± 10.26) μg·cm⁻², 分别是脂质体和 10% 异丙醇溶液的 2.12 倍和 5.98 倍 (P < 0.05), 说明白桦脂酸制成醇质体后可显著提高其经皮渗透量, 效果明显优于脂质体。

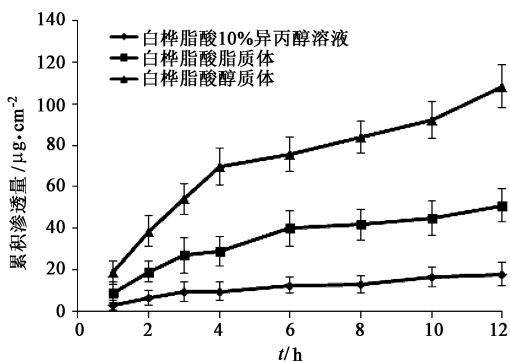


图 2 白桦脂酸醇质体、脂质体和 10% 异丙醇溶液的经皮渗透曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3 讨论

本文采用乙醇注入法制备醇质体作为白桦脂酸经皮给药的载体。通过正交试验筛选处方工艺, 结果发现磷脂用量、乙醇体积分数和磷酸盐缓冲液 pH 对包封率均影响显著或极显著。醇质体包封率随卵磷脂用量的增加而增大, 随乙醇体积分数的增加在一定限度增大。适当体积分数乙醇可提高白桦脂酸的包封率。因为乙醇增加了白桦脂酸的溶解度, 另一方面可能改变了药物的增溶模式, 使药物由包载于磷脂双分子层疏水部分的单一模式转变为同时包载于囊核内、囊双分子层或吸附于囊膜的多种药物承载模式^[7]; 但乙醇体积分数不能过高, 否则乙醇

将溶解醇质体中磷脂, 导致醇脂质体失去囊泡结构或使囊泡膜易漏, 致使包封率降低。

体外透皮试验比较白桦脂酸在醇质体、脂质体和 10% 异丙醇溶液 3 种不同载体中的经皮渗透性, 结果表明醇质体作为经皮给药载体能显著提高白桦脂酸的经皮渗透量, 效果优于脂质体和异丙醇溶液。与脂质体相比, 醇质体系统中含有较高体积分数乙醇溶液, SEM 显示白桦脂酸醇脂质体粒径较小, 呈类球形, 说明乙醇使醇质体具备良好的流动性和柔韧性。当载体通过皮肤角质层时, 囊中富含的乙醇可改变皮肤角质层脂质的相变温度^[8], 促使脂质层流动, 形成微小孔隙^[9], 醇质体较小的粒径和良好变形性, 使其更容易通过比自身半径小的皮肤通路而进入皮肤深层, 最终促进白桦脂酸的渗透。而脂质体由于变形性差, 对皮肤脂质亲和力高, 致使包载的药物仅停留于皮肤表层。因此, 白桦脂酸醇质体显示出比脂质体及异丙醇溶液更高的经皮促渗效果, 更易发挥全身治疗作用。

[参考文献]

- [1] 徐军, 王晋萍, 钱辰旭, 等. 白桦脂酸的研究进展[J]. 生命科学, 2011, 23(5): 503.
- [2] 许慧君, 任晓华, 杜英峰, 等. 白桦脂酸在大鼠体肠吸收动力学的研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(3): 377.
- [3] 闫沁远, 李凌云. 尼美舒利醇质体的体外经皮渗透特性及皮肤刺激性[J]. 中国医院药学杂志, 2011, 31(21): 1780.
- [4] 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.
- [5] Fry D W, White J C, Goldman I D. Rapid separation of low molecular weight solutes from liposomes without dilution[J]. Anal Biochem, 1978, 90(2): 809.
- [6] Sorensen E N, Weisman G, Vidaver G A. A sephadex column procedure for measuring uptake and loss of low molecular weight solutes from small, lipid-rich vesicles[J]. Anal Biochem, 1977, 82(2): 376.
- [7] Ainbinder D, Paolino D, Fresta M, et al. Drug delivery applications with ethosomes[J]. J Biomed Nanotechnol, 2010, 6(5): 558.
- [8] Jain S, Tiwary A K, Sapra B, et al. Formulation and evaluation of ethosomes for transdermal delivery of lamivudine[J]. AAPS Pharm Sci Tech, 2007, 8(4): 249.
- [9] 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.

[责任编辑 刘德文]