

不同促渗剂对马钱子碱囊泡凝胶体外渗透性能的影响

张卫华¹, 胡杰², 吴珍珍^{2*}, 郑咏秋³

(1. 北京宝德润生医药科技发展有限公司, 北京 102209;

2. 北京因科瑞斯医药科技有限公司, 北京 102209; 3. 中国中医科学院西苑医院, 北京 100091)

[摘要] 目的:通过药效试验筛选马钱子抗炎镇痛的主要药效成分,优选马钱子碱囊泡凝胶的体外透皮促渗剂。方法:考察不同马钱子提取物对佐剂性关节炎大鼠关节肿胀度和屈关节疼痛的影响,确定抗炎镇痛的关键成分。采用pH梯度法制备马钱子碱囊泡凝胶,利用Franz扩散池进行体外透皮试验,扩散池透皮面积2.8 cm²,接受池体积6.5 mL,磁力搅拌速度500 r·min⁻¹,水浴温度(37±1)℃,接受液为pH 7.4磷酸盐缓冲液,考察不同种类和不同用量促渗剂对该制剂体外渗透性能的影响。结果:马钱子碱是马钱子抗炎镇痛的主要药效成分。不同促渗剂均能促进马钱子碱囊泡凝胶的体外渗透性能,不同促渗剂对马钱子碱体外渗透的作用强弱顺序为氮酮>聚山梨酯-20>油酸聚乙二醇甘油酯>月桂酸聚乙二醇甘油酯>肉豆蔻酸异丙酯>聚甘油脂肪酸酯>乙醇>1-甲基-2-吡咯烷酮>水,不同用量氮酮对马钱子碱的促渗作用强弱为10%>7.5%>5%>3%>4%>2%>1%>0.5%。结论:马钱子碱具有抗炎镇痛作用,加入3%氮酮的马钱子囊泡凝胶体外透皮效果较好。

[关键词] 马钱子碱囊泡凝胶;促渗剂;体外渗透性能;pH梯度法

[中图分类号] R283.6;S481+.9;R944.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)07-0014-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2015070014

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150211.1504.007.html>

[网络出版时间] 2015-02-11 15:04

Effects of Different Penetration Enhancers on *in vitro* Permeability of Brucine Vesicles Gels
ZHANG Wei-hua¹, HU Jie², WU Zhen-zhen^{2*}, ZHENG Yong-qiu³ (1. Beijing Body Revival Pharmaceutical Technology Development Co. Ltd., Beijing 102209, China; 2. Beijing Increase Pharmaceutical Technology Co. Ltd., Beijing 102209, China; 3. Xiyuan Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China)

[Abstract] **Objective:** To screen main effective composition of anti-inflammatory and analgesic in Strychni Semen by Pharmacodynamics test, to optimize *in vitro* penetration enhancers of brucine vesicles gels. **Method:** Key ingredients of anti-inflammatory and analgesic were determined by investigating effects of in different Strychni Semen extracts on articular swelling degree and flexion joint pain of adjuvants arthritis (AA) rats. Brucine vesicles gels was prepared by pH gradient method, transdermal experiment with Franz diffusion cell was employed to compare effects of different penetration enhancers on *in vitro* permeation of brucine vesicles gels. **Result:** Brucine was a major efficacy component of anti-inflammatory and analgesic in Strychni Semen. Different penetration enhancers all could promote *in vitro* permeation of brucine vesicles gels, which was in order of azone > polysorbate-20 > oleoyl polyoxyl-6 glycerides > gelucire 44-14 > isopropyl myristate > polyglycerol fatty acid esters > ethanol > 1-methyl-2-pyrrolidone > water. **Conclusion:** Brucine has anti-inflammatory and analgesic effect, optimal penetration enhancer of brucine vesicles gels is 3% azone.

[Key words] brucine vesicles gels; permeation enhancers; *in vitro* permeation; pH gradient method

马钱子具有通络止痛、散结消肿的功效,用于治疗风湿顽痹、跌扑损伤、痈疽肿痛、类风湿性关节炎等

证。马钱子的主要有效部位为生物碱类,主要成分为马钱子碱和土的宁。现代药理学研究发现马钱子碱

[收稿日期] 20140609(009)

[基金项目] 北京市科技新星计划项目(Z111102054511015);北京市西城区优秀人才项目

[第一作者] 张卫华, 硕士, 高级工程师, 从事中药新药及新剂型平台技术研究, Tel:010-81766817, E-mail:strong_zzz@163.com

[通讯作者] * 吴珍珍, 硕士, 助理研究员, 从事新型载体给药系统研究, Tel:010-82271685, E-mail:zhenzhu@163.com

是该药材主要的抗炎成分^[1]。囊泡是以非离子表面活性剂作为囊材,和胆固醇在亲水介质中自组装形成的具有闭合双分子层膜结构的封闭体系。其结构与脂质体十分相似,但其载体材料不含磷脂,比脂质体更稳定,同时兼容了脂质体的优点——缓释、靶向、减轻药物毒副作用,并且由于囊材由非离子表面活性剂组成,对皮肤和黏膜刺激性小而渗透性远优于脂质体^[2-3],已成为透皮给药中富有潜力的给药系统。本实验拟对不同组成的马钱子提取物进行药效试验筛选,以筛选出该药材的抗炎有效成分。为降低马钱子生物碱类成分的毒性和刺激性,同时保证制剂顺应性和稳定性,将该抗炎成分制成囊泡凝胶剂,通过体外渗透试验优选基质处方,为囊泡剂型的开发与应用提供参考。

1 材料

LC-2010AT 型高效液相色谱仪(日本岛津公司),RYJ-12B 型智能透皮试验仪(上海黄海药检仪器有限公司)。马钱子碱对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110706-200505,纯度 95.9%),马钱子碱(自制,质量分数 96.0%),马钱子总生物碱(自制,马钱子碱质量分数分别为 22.3%,42.8%),土的宁(自制,质量分数 89.6%),去水山梨醇单硬脂酸酯(span60,广州品秀精细化工有限公司),胆固醇(国药集团化学试剂有限公司),卡波姆 980(美国诺誉),弗氏完全佐剂(Freund's complete adjuvant, FCA)购自美国 Sigma 公司,扶他林软膏(北京诺华制药有限公司),其他试剂均为分析纯。

Wistar 大鼠,雄性,体重 180~220 g,清洁级,由北京华阜康生物科技股份有限公司提供,动物合格证号 SCXK(京)2009-0007。

2 方法与结果

2.1 药效试验筛选确定提取物

2.1.1 大鼠 AA 模型诱导^[4] 将卡介苗(Bacillus Calmette-Guérin, BCG) 80 ℃, 1 h 灭活后,用高压灭菌的液体石蜡配成 10 g·L⁻¹ 的乳剂,充分研磨、混匀,得 FCA,于每只大鼠左后足足趾内皮注射 FCA 0.1 mL 致炎,得大鼠佐剂性关节炎(adjuvant-induced arthritis, AA)模型。

2.1.2 动物分组及给药方案 大鼠随机分组 7 组,包括正常组、模型组、扶他林阳性组(50 mg·kg⁻¹)及 A 组(马钱子碱 96.0%),B 组(马钱子碱 42.8%,土的宁 20.6%),C 组(马钱子碱 22.3%,土的宁 43.8%),D 组(土的宁质量分数 >80%)。A,B,C,D 组均以凝胶形式给药,给药剂量均为 25 mg·kg⁻¹。除正常组外,其余各组均通过模型大鼠左后足足趾内皮

注射 FCA 0.1 mL 致炎,致炎后立即出现急性局部炎症,第 2 天给予油纸包裹药膏,敷于大鼠左后足部,用医用胶布包裹,防止药物脱落,正常组及模型组不给药。6 h 后去除胶布,洗净大鼠左足。

2.1.3 关节肿胀度测定 大鼠致炎前、后第 3 天分别在足容积仪上测定致炎侧足容积,某一时间致炎后与致炎前足容积的差值即为该时刻大鼠足肿胀度。结果正常组、模型组、阳性组及 A,B,C,D 组大鼠的足肿胀度分别为(0.02 ± 0.14), (0.95 ± 0.26), (0.76 ± 0.37), (0.45 ± 0.41), (0.49 ± 0.13), (1.01 ± 0.44), (0.88 ± 0.27) mL。模型组在免疫 1 d 后,原发侧足肿胀度与正常组比较明显增加;与模型组相比,A 组大鼠在第 3 天时原发侧足肿胀抑制作用明显;B 组亦可显著减轻 AA 大鼠原发性足肿胀,而 C,D 组对 AA 大鼠原发性足肿胀无抑制作用。

2.1.4 屈关节疼痛评分^[5] 将大鼠装进特制鼠筒内,后腿及尾部伸出筒外,稳定几分钟后测定,向脚掌侧缓慢屈曲动物的一侧踝关节,每隔 5 s 进行 1 次,共 5 次。屈关节时,动物出现短促而明显的缩腿反应或嘶叫评 1 分,无反应 0 分,每侧踝关节的评分 0~5 分。结果各组疼痛评分分别为 0, (4.30 ± 0.82), (0.67 ± 0.87), (1.67 ± 1.94), (1.44 ± 1.74), (3.22 ± 2.17), (4.63 ± 0.74) 分。同一时间内,模型组与正常组的疼痛评分差异有极显著性;A 组可明显减轻疼痛反应,B 组也有相似作用,阳性组在同一时间内能明显降低屈关节评分指数;C,D 组对 AA 大鼠原发性炎症疼痛无明显作用。大鼠关节肿胀试验和屈关节疼痛试验结果显示 A,B 组和阳性组均可抑制由 FCA 引起的急性足趾肿胀和屈关节疼痛,提示马钱子碱具有明显抗炎镇痛作用。

2.2 马钱子碱囊泡凝胶的制备 采用 pH 梯度法制备马钱子碱囊泡^[6]。以卡波姆 980 为凝胶基质,丙二醇和甘油为润湿剂,尼泊金丙酯为抑菌剂,分别加入不同种类和不同用量的促渗剂搅拌均匀备用;称取适量囊泡溶液和卡波姆凝胶混合均匀,配成含不同促渗剂的马钱子碱囊泡凝胶,备用。

2.3 体外透皮试验 脊椎脱臼法处死大鼠,使用剃毛器剃除腹部皮肤上的毛后剥取腹部皮肤,除去皮下组织和脂肪,用生理盐水漂洗干净,泡于生理盐水中,4 h 内使用。Franz 扩散池透皮面积 2.8 cm²,接受池体积 6.5 mL,磁力搅拌速度 500 r·min⁻¹,水浴温度(37 ± 1) ℃,接受液为 pH 7.4 磷酸盐缓冲液,取样体积 6.5 mL。将预处理的大鼠皮肤固定在扩散池与接受池间,接受液液面恰与皮肤下层接触,无

气泡。给药池为马钱子碱囊泡凝胶 0.4 g, 分别于 0.5, 3, 6, 9, 20, 24 h 将接受液全部取出, 同时补充等体积同温度的新鲜接受液, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 采用 HPLC 测定马钱子碱含量, 色谱条件为流动相乙腈-0.01 mol·L⁻¹庚烷磺酸钠和 0.02 mol·L⁻¹磷酸二氢钾等量混合液(用 10% 磷酸调节 pH 2.8) (21: 79), 检测波长 260 nm, 柱温 40 ℃, 流速 1.0 mL·min⁻¹. 计算累积渗透量(Q)。

$$Q = \left(\sum_{i=1}^n \rho_n \times V \right) / A (n \leq 24)$$

式中 ρ_n 为第 n 个取样点的药物质量浓度, V 为取样体积, A 为渗透面积。以 Q 为纵坐标, 时间(t) 为横坐标, 绘制马钱子碱的累积透过量-时间曲线。

2.4 促渗剂对马钱子碱囊泡凝胶促渗作用的影响

2.4.1 促渗剂种类 分别加入乙醇、肉豆蔻酸异丙脂、月桂酸聚乙二醇甘油酯、油酸聚乙二醇甘油酯、聚甘油脂肪酸酯、氮酮、水、聚山梨酯-20(tween-20) 和 1-甲基-2-吡咯烷酮作为促渗剂, 按 2.2 项下方法制备马钱子碱囊泡凝胶, 每组样品处方中均含有 5% 丙二醇, 3% 甘油, 5% 促渗剂, 透皮涂抹量 0.4 g。按 2.3 项下方法进行体外透皮试验(n=3), 结果 Q 分别为 (2.82 ± 0.71), (13.55 ± 0.02), (15.35 ± 4.53), (22.10 ± 6.49), (11.36 ± 0.30), (83.04 ± 2.97), (1.71 ± 0.35), (23.50 ± 7.21), (1.58 ± 1.01) μg·cm⁻²; 透皮速率依次为 0.12, 0.56, 0.65, 0.93, 0.47, 3.91, 0.07, 0.98, 0.07 μg·cm⁻²·h⁻¹。说明不同促渗剂对马钱子碱体外渗透的作用强弱顺序为氮酮 > tween-20 > 油酸聚乙二醇甘油酯 > 月桂酸聚乙二醇甘油酯 > 肉豆蔻酸异丙脂 > 聚甘油脂肪酸酯 > 乙醇 > 1-甲基-2-吡咯烷酮 > 水。乙醇促渗效果一般, 而且由于加入乙醇对囊泡凝胶的黏稠度影响较大, 故处方中保湿剂只加入丙二醇和甘油, 不加入乙醇。

2.4.2 促渗剂用量 分别加入不同量(0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 7.5%, 10%) 氮酮作为促渗剂, 按 2.2 项下方法制备囊泡凝胶, 每组样品均含有 5% 丙二醇, 3% 甘油, 透皮涂抹量 0.4 g。按 2.3 项下方法进行体外透皮试验(n=3), 见图 1。结果显示不同用量氮酮对马钱子碱的促渗作用强弱为 10% > 7.5% > 5% > 3% > 4% > 2% > 1% > 0.5%, 马钱子碱体外 Q 随氮酮用量增加而增加, 但当用量达 3% 后, 透过率有下降趋势, 考虑到促渗剂用量宜量少的原则, 确定采用 3% 氮酮为促渗剂。

3 讨论
本文证实马钱子碱是马钱子中抗炎镇痛的有效

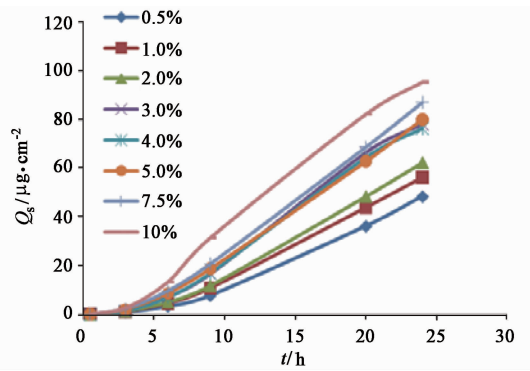


图 1 不同浓度氮酮对马钱子碱囊泡凝胶体外促渗作用曲线
Fig. 1 *In vitro* penetration curves of brucine vesicles gels with different concentrations of azone as enhancers

成分, 而士的宁无显著的抗炎镇痛作用。不同促渗剂均对马钱子碱透过表皮具有不同程度的促进作用, 其中氮酮作用最为显著。分析氮酮促透的机制可能为 ①与角质层间质的脂质发生作用, 增加其流动性, 减小了药物的扩散阻力; ②增加角质层的含水量, 使角质层膨大, 细胞间隙增大; ③增大拓宽毛囊口外径, 利于药物的透过^[7]。为保证马钱子碱的有效性, 同时减少毒性、皮肤黏膜刺激性, 为更好地在关节炎等口服给药不易达到的部位充分发挥作用, 本文选择制备囊泡凝胶剂型, 可充分发挥治疗作用, 但马钱子碱囊泡凝胶在体外透皮试验中并未显示出优势。

[参考文献]

[1] 徐丽君, 魏世超, 陆付耳, 等. 马钱子若干组分治疗实验性关节炎的比较研究[J]. 同济医科大学学报, 2001, 30(6): 564-565.
[2] Fang J Y, Hong C T, Chiu W T. Effect of liposomes and niosomes on skin permeation of enoxacin [J]. Int J Pharm, 2001, 219(1/2): 61-72.
[3] Manconi M, Sinico C, Valenti D, et al. Niosomes as carriers for tretinoin. III. A study into the *in vitro* cutaneous delivery of vesicle-incorporated tretinoin [J]. Int J Pharm, 2006, 311(1/2): 11-19.
[4] 徐叔云, 卞如濂, 陈修, 等. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 920-921.
[5] 刘红香, 熊亮, 罗非, 等. 大鼠踝关节疼痛试验评分指标的改进[J]. 中国疼痛医学杂志, 1998, 4(3): 173-178.
[6] 吴珍珍, 胡杰, 胡克菲, 等. 马钱子总碱囊泡凝胶的体外透皮扩散和抗炎作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(13): 1-4.
[7] 朱复南, 殷尧瑾. 氮酮透皮促进作用面面观[J]. 中医外治杂志, 1996, 23(4): 33.

[责任编辑 刘德文]