

丹皮酚前非离子体的制备及其体外透皮渗透试验

江晓¹, 刘莉², 李沙沙², 张斌², 李雪玲², 刘志刚², 刘强^{2*}

(1. 广州市香雪制药股份有限公司, 广州 510530; 2. 南方医科大学中医药学院, 广州 510515)

[摘要] 目的: 优选丹皮酚前非离子体的制备工艺并考察其体外透皮性能。方法: 选取胆固醇、大豆卵磷脂和山梨醇酯肪酸酯-60(span-60)的质量为自变量, 平均粒径和包封率为因变量, 对自变量各水平进行二项式拟合, 通过效应面法优选丹皮酚前非离子体处方并进行预测分析。采用 Franz 扩散池试验, 以离体裸鼠皮肤为透过膜, 生理盐水为接收液, 采用 HPLC 测定丹皮酚含量, 比较丹皮酚前非离子体、丹皮酚前非离子体软膏及丹皮酚普通软膏单位面积累积经皮渗透量(Q)及稳态渗透速率(J_s)。结果: 最佳处方为胆固醇 7.53 mg, 大豆卵磷脂 107.86 mg, Span-60 74.49 mg, 丹皮酚 5 mg; 丹皮酚前非离子体包封率 64.16%, 平均粒径 11.15 μm , 二项式模型拟合良好。丹皮酚前非离子体软膏、普通软膏、前非离子体的 $Q_{12\text{h}}$ 分别为 (96.20 ± 5.87) , (75.83 ± 18.42) , (125.54 ± 8.87) $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$, J_s 分别为 7.826, 5.967, 10.327 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ 。结论: 星点设计-效应面法能准确反映多因素多水平交互影响, 适用于制剂处方工艺的优化。丹皮酚前非离子体及其软膏的经皮渗透能力高于丹皮酚普通软膏。

[关键词] 丹皮酚; 前非离子体; 星点设计-效应面法; 体外透皮渗透试验; 高效液相色谱

[中图分类号] R283.6; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)05-0022-05

[doi] 10.11653/syfy2014050022

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20131218.1407.005.html>

[网络出版时间] 2013-12-18 14:07

Optimization of Preparation Technology for Paeonol Proniosomes by Central Composite Design-Response Surface Methodology and Investigation of Its *in vitro* Percutaneous Permeability

JIANG Xiao¹, LIU Li², LI Sha-sha², ZHANG Bin², LI Xue-ling², LIU Zhi-gang², LIU Qiang^{2*}

(1. Guangzhou Xiangxue Pharmaceutical Co. Ltd, Guangzhou 510530, China;

2. School of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize formulation of paeonol proniosomes and investigate its transdermal performance. **Method:** Taking quality of cholesterol, soybean lecithin and span-60 as independent variables, average particle size and entrapment efficiency as dependent variable, various levels of independent variables were fitted by binomial equation, response surface methodology was used to optimize formulation, prediction was carried out through comparing the observed and predicted value. Franz diffusion cell test was adopted by taking physiological saline as acceptable liquid and nude mouse skin as membrane, HPLC was adopted to determine the content of paeonol, steady state permeation rate (J_s) and unit area cumulative percutaneous penetration amount (Q) of paeonol proniosomes, paeonol proniosomes ointments and ordinary ointments were compared. **Result:** Optimum formulation was as follows: cholesterol 7.53 mg, soybean lecithin 107.86 mg, span-60 74.49 mg, paeonol 5 mg; Encapsulation efficiency of these prepared paeonol proniosomes was 64.16%, average particle size

[收稿日期] 20130814(022)

[基金项目] 广东省高校中药化妆品工程中心建设项目(GCZX-A1007); 中药日化产品产学研结合创新平台, 广州市白云区科技计划项目(2012-KZ-28); 广州市白云区中药化妆品行业创新实验室, 广州白云区科技计划重点项目(2011-KQ-23)

[第一作者] 江晓, 硕士, 从事中药药剂学研究, Tel: 15017552210, E-mail: jiangxiaoliping@163.com

[通讯作者] * 刘强, 博士, 教授, 从事中药新制剂与新剂型研究, Tel: 020-61689408, E-mail: gzlq2002@163.com

was 11.15 μm , binomial model fitting was good. Q_{12} of paeonol proniosomes, paeonol proniosomes ointments and ordinary ointments were (125.54 \pm 8.87), (96.20 \pm 5.87), (75.83 \pm 18.42) $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$, J_s were 10.327, 7.826, 5.967 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$, respectively. **Conclusion:** Central composite design-response surface methodology could accurately reflect interaction of multiple factors and levels, which was suitable for optimizing formulation. Penetration capacity of paeonol proniosomes and paeonol proniosomes ointments were higher than ordinary ointments.

[Key words] paeonol; proniosomes; central composite design-response surface methodology; *in vitro* percutaneous penetration test; HPLC

丹皮酚是牡丹皮和徐长卿的主要活性成分,具有镇静、催眠、解热、镇痛、抗炎、抗过敏和抗菌等药理活性^[1-3]。近几年研究发现丹皮酚还能抑制黑色素细胞内酪氨酸酶活性及黑色素生成,临床用于治疗色斑、皮肤瘙痒、牛皮癣等症疗效较好^[4],但其存在水溶性及稳定性差、熔点低等缺点。前非离子体^[5]是以非离子表面活性剂为辅料制成的囊体,是一种新型的药物储库型剂型,使用前加水水合即可产生非离子表面活性剂囊泡的水合分散体,可有效解决非离子表面活性剂囊泡溶液状态时囊泡易聚集、融合、药物易泄露等问题^[6]。本实验在单因素试验基础上,采用星点设计-效应面法优化丹皮酚前非离子体处方,考察经前非离子体水化后形成的非离子体表面活性剂囊泡的形态特征,同时通过体外经皮渗透试验研究丹皮酚前非离子体及其软膏的透皮性能。

1 材料

1100 系列高效液相色谱仪(G1316A 型紫外检测器,G1313A 型自动进样器,美国安捷伦公司),BP 110S 型电子天平(德国赛多利斯公司),HC-3018R 型高速冷冻离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司),H-7650 型透射电子显微镜(日本日立公司),2000G 型激光衍射粒度分布仪(英国马尔文公司),HY-2 型超声波振荡器(金坛市富华仪器有限公司)。

丹皮酚对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110708-200506),丹皮酚(西安金绿生物工程技术有限公司,纯度 98%),大豆卵磷脂(德国德固赛集团),胆固醇(河南利伟生物药业股份有限公司),山梨醇脂肪酸酯-60(span-60,天津市科密欧化学试剂有限公司),磷钨酸(国药集团化学试剂有限公司),甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

雄性 BACB/C-WW 裸鼠,6~8 周,由南方医科大学实验动物中心提供,许可证号 SCXK(粤)2011-0015。

2 方法与结果

2.1 丹皮酚前非离子体的制备 精密称取处方丹皮酚、非离子表面活性剂、大豆卵磷脂、胆固醇于具塞试管中,加入无水乙醇 125 μL ,于(65 \pm 3) $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热 5 min,直至所有成分完全溶解呈透明状态,加入 pH 7.4 磷酸盐(PBS)缓冲液 80 μL ,水浴加热约 2 min 至溶液澄清,取出,冷却至室温,即得。

2.2 丹皮酚的含量测定

2.2.1 色谱条件^[7-8] Synchronis C₁₈ 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm,5 μm),流动相甲醇-水(60:40),流速 1.0 mL \cdot min⁻¹,柱温 25 $^{\circ}\text{C}$,检测波长 276 nm,进样量 10 μL 。

2.2.2 标准曲线的制备 精密称取丹皮酚对照品 2.19 mg 置 50 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,得储备液。精密吸取该储备液 1,2,3,4,5 mL,分别置于 5 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,配成系列对照品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件进样,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程 $Y = 36\,501X + 7.39$ ($r = 0.999\,9$),线性范围 0.008 76 ~ 0.043 8 g \cdot L⁻¹。

2.2.3 回收率试验 分别精密称取丹皮酚原料药 0.5,1,1.5 mg,各 3 份,分别置于 10 mL 量瓶中,加空白非离子体溶液溶解并稀释至刻度,超声(300 W,40 kHz)使完全溶解,精密量取 1 mL,于 14 000 r \cdot min⁻¹ 冷冻(4 $^{\circ}\text{C}$)离心 45 min,取出,吸取上清液至 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,按 2.2.1 项下色谱条件测定,计算平均回收率 99.27%,RSD 1.61%。

2.3 包封率的测定 精密称取丹皮酚前非离子体约 0.2 g,置 10 mL 量瓶中,加 pH 7.4 的 PBS 缓冲液溶解并稀释至刻度,超声 10 min,摇匀,精密量取 1 mL 按 2.2.3 项下方法冷冻离心,取上清液置于 5 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,作为游离药物供试品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件测定,计算包封率^[9]。

2.4 粒径的测定 称取丹皮酚前非离子体 0.2 g, 加 pH 7.4 的 PBS 缓冲液 10 mL 超声溶解, 利用马尔文激光散射粒径测定仪检测粒径大小及分布情况, 记录 100 个囊泡粒径, 经统计学处理得平均粒径。

2.5 星点设计-效应面法优化处方^[10] 在单因素试验基础上, 选取胆固醇、大豆卵磷脂及 Span-60 的质量为自变量, 3 个自变量取值范围依次为 5 ~ 15, 45 ~ 135, 45 ~ 135 mg, 预试验确定称取丹皮酚 5 mg, 以平均粒径 (Y_1) 和包封率 (Y_2) 为因变量, 每个因素设 5 个水平, 因素水平见表 1, 试验安排及结果见表 2。

表 1 丹皮酚前非离子体处方星点试验因素水平 mg

水平	X_1 胆固醇	X_2 大豆卵磷脂	X_3 Span-60
-1.682	5.01	45.01	45.01
-1	7.03	63.25	63.25
0	10.00	90.00	90.00
1	12.97	116.75	116.75
1.682	14.99	134.99	134.99

表 2 丹皮酚前非离子体处方星点试验安排

No.	X_1	X_2	X_3	平均粒径/ μm	包封率/%
1	-1	-1	-1	9.366	54.95
2	1	-1	-1	9.765	48.82
3	-1	1	-1	11.391	61.62
4	1	1	-1	9.834	52.12
5	-1	-1	1	7.977	37.15
6	1	-1	1	9.329	33.62
7	-1	1	1	9.545	53.48
8	1	1	1	10.432	30.44
9	-1.682	0	0	10.033	48.42
10	1.682	0	0	8.806	58.36
11	0	-1.682	0	5.527	34.39
12	0	1.682	0	9.351	55.39
13	0	0	-1.682	7.022	60.12
14	0	0	1.682	5.023	12.73
15	0	0	0	12.516	51.86
16	0	0	0	11.690	59.6
17	0	0	0	11.222	66.45
18	0	0	0	14.298	63.44
19	0	0	0	11.203	57.97
20	0	0	0	11.977	60.65

采用 Design-Expert 8.0 软件分别对各自变量的各水平进行二项式方程拟合, 消除不显著的影响系

数, 确定拟合方程为 $Y_1 = -24.94 + 0.9017X_1 + 0.3629X_2 + 0.3491X_3 - 3.809 \times 10^{-3}X_1X_2 + 5.345 \times 10^{-3}X_1X_3 - 0.05321X_1^2 - 1.634 \times 10^{-3}X_2^2 - 2.334 \times 10^{-3}X_3^2$ ($R^2 = 0.7240, P = 0.0264$), $Y_2 = -119.5 + 8.241X_1 + 1.679X_2 + 1.693X_3 - 0.0360X_1X_2 - 0.01721X_1X_3 + 5.555 \times 10^{-4}X_2X_3 - 0.204X_1^2 - 6.715 \times 10^{-3}X_2^2 - 0.0109X_3^2$ ($R^2 = 0.8401, P = 0.0054$), 表明方程均具有显著性差异, 考察的两项指标均可采用多元二次方程拟合。

根据各指标的拟合方程, 固定一个因素水平值为中值, 分别绘制各因变量与另 2 个自变量的三维效应面, 见图 1。根据拟合的响应曲面形状, 结合已建立的数学模型, 确定最佳处方为丹皮酚 5 mg, 胆固醇 7.53 mg, 大豆卵磷脂 107.86 mg, span-60 74.49 mg, 处方预测的效应值 $Y_1 = 11.92 \mu\text{m}$, $Y_2 = 65\%$ 。按最优处方进行 6 次验证试验, 结果平均包封率 64.16%, 平均粒径 11.15 μm , 与预测值偏差率分别为 6.5%, 1.3%, 表明建立的数学模型可用于预测丹皮酚前非离子体评价指标与影响因素的关系且预测性良好。

2.6 非离子表面活性剂囊泡的形态观察 室温称取制备的丹皮酚前非离子体 0.2 g, 加 pH 7.4 的 PBS 缓冲液 10 mL 超声溶解, 得丹皮酚非离子表面活性剂囊泡混悬液样品, 取一滴滴至覆盖碳膜的铜网上, 用 1% 磷钨酸负染, 用滤纸吸取过多染液, 自然晾干后置 TEM 下观察并拍摄照片, 结果见图 2 (参照尺度 1 μm), 表明非离子表面活性剂囊泡为类球形实体粒子, 粒径 1 ~ 20 μm 。

2.7 丹皮酚前非离子体软膏的制备 分别称取硬脂酸、单硬脂酸甘油酯 11.25 g, 于 70 $^{\circ}\text{C}$ 加热溶解, 将碳酸钾 0.9 g, 三乙醇胺 0.3 mL, 甘油 10 g, 水 72 mL 加热至 70 $^{\circ}\text{C}$, 缓缓倒入油相中, 边加边搅拌至乳化完全, 得软膏基质。将丹皮酚前非离子体与软膏基质按 1:1 比例混合搅拌均匀, 即得, 丹皮酚质量分数 0.34%。

2.8 丹皮酚软膏的制备 按 2.7 项下方法制备软膏基质, 乳化完全后加入丹皮酚 0.3 g, 混匀, 即得, 丹皮酚质量分数 0.3%。

2.9 体外经皮渗透试验 裸鼠脱颈椎处死, 取下鼠皮, 小心分离皮下组织与脂肪, 用生理盐水反复冲洗, 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 生理盐水中保存时间 ≤ 24 h。Franz 扩散池保持 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴, 将处理好的裸鼠皮肤固定在加入搅拌子的供给池和接收池之间, 真皮面面向接受

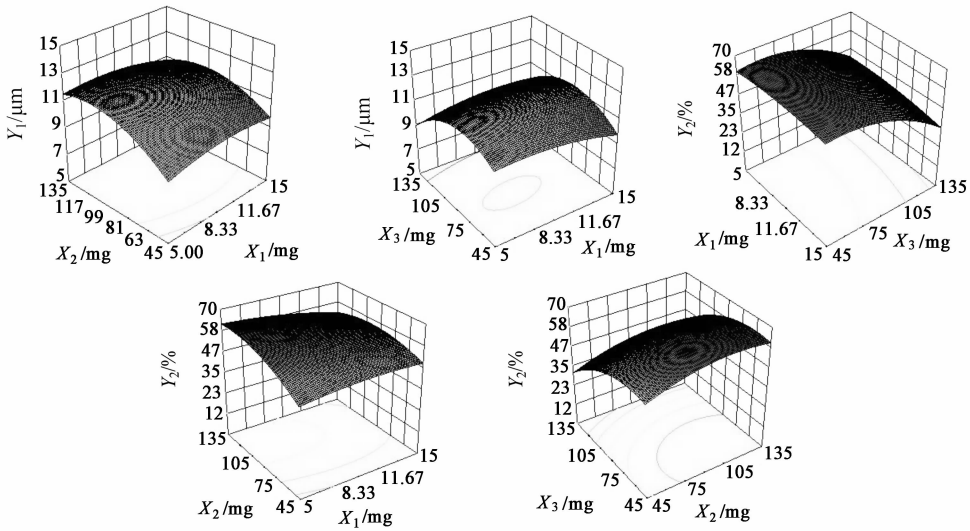


图1 胆固醇、山梨醇脂脂肪酸酯-60及大豆卵磷脂质量对丹皮酚前非离子体粒径及包封率的三维效应面

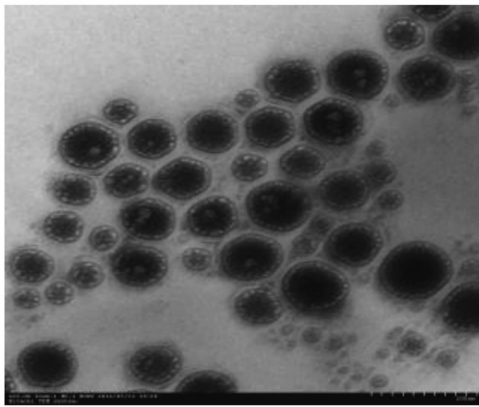


图2 丹皮酚前非离子体水化形成的非离子表面活性剂囊泡 TEM ($\times 20\ 000$)

池,有效渗透面积 $3.14\ \text{cm}^2$,接收池容积 $15\ \text{mL}$,以生理盐水为接收液,分别将制备的丹皮酚前非离子体软膏($0.5\ \text{g}$)、普通软膏($0.5\ \text{g}$)、前非离子体($0.25\ \text{g}$)各3份均匀涂布于皮肤上,于 $(37 \pm 1)\ ^\circ\text{C}$, $300\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 开始试验,分别于0.5,1,2,4,6,8,10,12 h从接收液中取样1 mL(同时补充等体积等温生理盐水),经 $0.22\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,按2.2.1项下色谱条件测定丹皮酚含量,计算累积经皮渗透量(Q)和稳态渗透速率(J_s)。

采用 GraphPad Prism 5.0 软件对3种制剂的 Q 与 t 作图,见图3。利用 SPSS 13.0 统计软件分别对3种制剂的 Q 对 t 进行线性回归,得方程依次为 $Q = -2.396 + 7.826t$ ($R^2 = 0.997, P = 0.000$), $Q = -2.956 + 5.967t$ ($R^2 = 0.998, P = 0.000$), $Q = -8.434 + 10.327t$ ($R^2 = 0.995, P = 0.000$),线性方程的斜率为该条件下丹皮酚的 J_s 。计算3种制剂的 $Q_{12\ \text{h}}$ 分别为 (96.20 ± 5.87) , (75.83 ± 18.42) ,

$(125.54 \pm 8.87)\ \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$,相应 J_s 分别为 7.826 , $5.967, 10.327\ \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$,表明丹皮酚前非离子体及其软膏的 J_s 和 $Q_{12\ \text{h}}$ 显著高于丹皮酚普通软膏,提示丹皮酚前非离子体及其软膏透过皮肤角质层的能力较强,能在短时间内渗入皮肤深层发挥药效,且药物作用时间可持续12 h,提高了丹皮酚生物利用度。

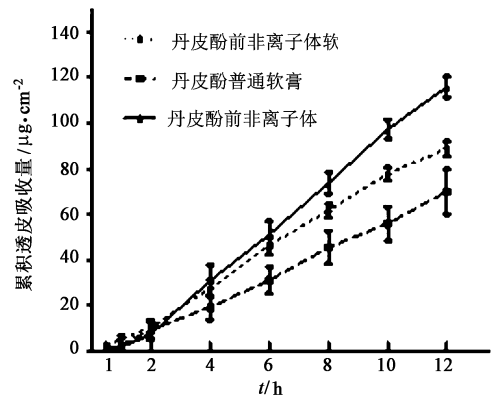


图3 丹皮酚前非离子体、前非离子体软膏及普通软膏的累积透过量随时间变化曲线

3 讨论

前非离子体的制备方法主要包括悬浮法^[11-12]、缓慢喷雾包衣法和凝胶相分离法^[13]。在前期研究基础上,确定凝胶相分离法制备前非离子体的主要影响因素有胆固醇和 大豆卵磷脂含量、非离子表面活性剂种类及用量、药物用量。

由图2可知,当胆固醇质量在 $5.01 \sim 14.99\ \text{mg}$ 变动时,包封率先增加后减少的趋势。Shoukry O 等^[14]考察了不同胆固醇含量对药物包封率的影响,将胆固醇质量由 $10\ \text{mg}$ 增至 $20\ \text{mg}$,药物包封率明显

提高,继续增加胆固醇质量,药物包封率下降。原因是由于胆固醇作为膜稳定剂,插入到已形成的双分子层中,填满分子层空间,从而降低囊泡的药物渗透率,提高药物包封率;但当胆固醇用量增加至一定量时,胆固醇分子会同药物竞争空间,使药物的包封率降低。Mokhtar M^[15]等研究表明胆固醇对药物包封率的影响主要是与其同用的非离子表面活性剂引起的,当 span-20, span-80 与胆固醇(达 10%) 同用时,会明显降低药物包封率。

目前对前非离子体的研究相对较少,仅停留在制剂处方筛选及药效学研究,主要因为含药囊泡的透皮机制尚不明确,但存在多种渗透机制假设:①囊泡被吸收和融合在皮肤表面,导致药物在界面形成活性热动力学的梯度,产生驱动亲脂性药物的渗透力^[16];②囊泡的渗透增强剂作用降低了角质层的屏障功能^[17];③非离子表面活性剂囊泡的双分子层膜作为药物限速释放的屏障^[18]。Fang J Y 等^[19]研究了雌二醇前非离子体制剂的体外透皮吸收情况,结果表明其主要作用机制与药物直接从囊泡迁移到皮肤、表面活性剂的穿透促进作用有关。

[参考文献]

[1] 张旃,李明昌. 丹皮酚的药理作用及机制[J]. 中医药信息,2006,23(2):21.
[2] 孙盲才,沈玉先,孙国平. 丹皮酚的主要药理活性研究进展[J]. 中成药,2004,26(7):579.
[3] 邢国胜,房德敏. 丹皮酚的制备及药理作用研究进展[J]. 中草药,2006,37(11):2.
[4] 戴敏,刘青云,顾承刚,等. 丹皮酚对脂质过氧化反应及低密度脂蛋白氧化修饰的抑制作用[J]. 中国中药杂志,2000,25(10):625.
[5] Hu C J, Rhodes D G. Proniosomes: A novel drug carrier preparation[J]. Int J Pharm,1999,185(1):23.
[6] Sudhamani T, Priyadarisini N, Radhakrishnan M. Proniosomes—a promising drug carriers [J]. Int J Pharm Tech Res,2010,2(2):1446.
[7] 陈光宇,毛晓丽,何群,等. HPLC 测定湿疹纳米乳喷雾剂中丹皮酚的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,

2012,18(24):97.
[8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:160.
[9] Mohamed N. *In vitro* and *in vivo* evaluation of proniosomes containing celecoxib for oral administration [J]. AAPS Pharm Sci Tech,2010,11(1):85.
[10] 吴伟,崔光华. 星点设计-效应面优化法及其在药学中的应用[J]. 国外医学·药学分册,2000,27(5):292.
[11] Blazek-Welsh A I, Rhodes D G. SEM imaging predicts quality of niosomes from maltodextrin-based proniosomes [J]. Pharm Res,2001,18(5):656.
[12] Blazek-Welsh A I, Rhodes D G. Maltodextrin-based proniosomes[J]. AAPS Pharm Sci,2001,3(1):1.
[13] Perrett S, Golding M, Williams W P. A simple method for the preparation of liposomes for pharmaceutical application: Characterization of the liposomes [J]. J Pharm Pharmacol,1991,43(3):154.
[14] El-Laithy H M, Shoukry O, Mahran L G. Novel sugar esters proniosomes for transdermal delivery of vinpocetine: Preclinical and clinical studies [J]. Eur J Pharm Biopharm,2011,77(1):43.
[15] Mokhtar M, Sammour O A, Hammad M A, et al. Effect of some formulation parameters on flurbiprofen encapsulation and release rates of niosomes prepared from proniosomes [J]. Int J Pharm, 2008, 361 (1/2):104.
[16] Barry B W. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery [J]. Eur J Pharm Sci,2001,14(2):101.
[17] Ogiso T, Niinaka N, Iwaki M. Mechanism for enhancement effect of lipid disperse system on percutaneous absorption [J]. J Pharm Sci, 1996, 85 (1):57.
[18] Park E S, Chang S Y, Hahn M, et al. Enhancing effect of polyoxyethylene alkyl ethers on the skin permeation of ibuprofen [J]. Int J Pharm,2000,209(1/2):109.
[19] Fang J Y, Yu S Y, Wu P C, et al. *In vitro* skin permeation of estradiol from various proniosome formulations [J]. Int J Pharm,2001,215(1/2):91.

[责任编辑 全燕]