

蟾蜍毒素微乳的制备及体外透皮吸收考察

范永春^{*}, 戴薇, 李步阳
(江苏省中医药研究院, 南京 210028)

[摘要] **目的:** 制备蟾蜍毒素微乳并考察其理化性质及体外经皮给药特性。**方法:** 通过溶解度试验和伪三元相图筛选蟾蜍毒素微乳处方, 考察蟾蜍毒素微乳的外观形态、粒径分布、Zeta 电位及稳定性, 通过透皮扩散仪考察蟾蜍毒素微乳的体外透皮过程。采用 RP-HPLC 测定蟾蜍毒素含量, 色谱条件为 ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相甲醇-水(70:30), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, 检测波长 300 nm, 进样量 10 μL。**结果:** 优选的微乳处方为辛酸癸酸三甘油酯-聚氧乙烯氢化蓖麻油-乙二醇单乙基醚-水(10.47%:33.69%:11.23%:44.61%), 载药量(1.36 ± 0.12)%。制得的蟾蜍毒素微乳外观圆整, 平均粒径(31.33 ± 5.362) nm, 多分散指数(0.103 ± 0.025), Zeta 电位-(30.85 ± 3.25) mV。蟾蜍毒素微乳 12 h 的累积渗透量 1 339.32 μg·cm⁻², 皮肤滞留量 1 895.36 μg, 分别是蟾蜍毒素水溶液的 3.96, 4.89 倍。**结论:** 蟾蜍毒素微乳稳定性较好, 可显著促进蟾蜍毒素的透皮吸收。

[关键词] 蟾蜍毒素; 微乳; 经皮给药; 黑色素瘤; 伪三元相图; 稳定性考察

[中图分类号] R283.6; R284.1; R945 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)21-0049-05

[doi] 10.11653/syfy2013210049

Preparation and *in vitro* Percutaneous Absorption Investigation of Bufotoxin Microemulsion

FAN Yong-chun^{*}, DAI Wei, LI Bu-yang

(Jiangsu Province Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare bufotoxin microemulsion and investigate its physicochemical properties and *in vitro* penetration characteristics. **Method:** Bufotoxin microemulsion prescription was screened by solubility tests and pseudo-ternary phase diagrams; Morphology, particle size, Zeta potential and stability of microemulsion was investigated; *In vitro* transdermal process of bufotoxin microemulsion was investigated by transdermal diffusion instrument. The content of bufotoxin was determined by RP-HPLC, chromatographic conditions were as follows: ZORBAX SB-C₁₈ column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), mobile phase of methanol-water (70:30), flow rate 1.0 mL·min⁻¹, column temperature 30 °C, detection wavelength 300 nm, injection volume 10 μL. **Result:** Optimal microemulsion formulation consists of GTCC-Cremophor RH 40-Transcutol HP-water (10.47%:33.69%:11.23%:44.61%), drug loading of (1.36 ± 0.12)%. Appearance of bufotoxin microemulsion was round, average particle size, PDI and Zeta potential were (31.33 ± 5.362) nm, (0.103 ± 0.025) and-(30.85 ± 3.25) mV, respectively. Cumulative amount and skin retention amount of bufotoxin microemulsion in 12 h were 1 339.32 μg·cm⁻² and 1 895.36 μg, which was 3.96 and 4.89 folds higher than that of bufotoxin saturated solution, respectively. **Conclusion:** Bufotoxin microemulsion was stable, it could significantly promote transdermal absorption of bufotoxin.

[Key words] bufotoxin; microemulsion; transdermal delivery; melanoma; pseudo-ternary phase diagram; stability investigation

[收稿日期] 20130423(003)

[通讯作者] ^{*} 范永春, 学士, 副主任中药师, 从事医院制剂的检验和开发以及临床药学研究, Tel:025-85608675, E-mail: feeyc@163.com

蟾蜍毒素又称蟾毒配基-3-辛二酰精氨酸酯,存在于中华大蟾蜍、黑蟾蜍或同属其他种蟾蜍耳后及皮肤分泌的白色浆液中,是蟾皮的主要有效成分。蟾蜍毒素具有强心、麻醉、解毒、止痛、开窍、醒神等药理作用^[1],对恶性黑色素瘤、顽固性皮肤病、白血病等具有明显的治疗作用^[2-3],但毒性较强,极大地限制了其在口服制剂中推广应用^[4]。透皮给药具有避免肝脏首过效应、提高药物生物利用度等特点^[5]。微乳是一种由油相、水相、表面活性剂及助表面活性剂以适当比例自发形成的一种透明或半透明、低黏度、各向同性且热力学稳定的油水混合系统,可提高药物的溶解度^[6],促进经皮给药的渗透,提高药物的皮肤滞留量,延长药物与皮肤的作用时间,增加了给药的有效性与安全性^[7]。本实验采用 HPLC 测定蟾蜍毒素含量^[8],通过蟾蜍毒素在各种载体中溶解度试验,优选蟾蜍毒素微乳的处方工艺,并考察其外观形态、粒径分布及体外透皮过程,为蟾蜍毒素的新剂型及给药途径开发提供参考。

1 材料

2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司), Tecnai12 型透射电镜(荷兰飞利浦公司), BS-124S 型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司), HJ-3 型恒温磁力搅拌器(金坛市精达仪器制造厂), Nano-ZS 型激光散射粒径测定仪(英国马尔文公司), YB-P6 型药物透皮扩散试验仪(天津天光光学仪器有限公司)。

蟾蜍毒素对照品(纯度 $\geq 98\%$,中国食品药品检定研究院,批号 20110215),蟾蜍毒素(纯度 $\geq 95\%$,南京泽朗医药科技有限公司),油酸聚乙二醇甘油酯(Labrafil[®] M 1944CS)、二乙二醇单乙基醚(Transcutol HP)、辛酸癸酸聚乙二醇甘油酯(Labrasol[®])、丙二醇辛酸酯(Capryol 90)(法国嘉法狮公司),辛酸癸酸三甘油酯(GTCC,英国禾大公司),聚山梨酯 80(吐温 80,成都市科龙化工试剂厂),聚氧乙烯氢化蓖麻油

(Cremophor RH 40,德国巴斯夫公司),聚乙二醇 400(PEG400,国药集团化学试剂有限公司),甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

昆明种小鼠,雄性,体重(22 \pm 2)g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,许可证号 SCXK(沪)2007-0005。

2 方法和结果

2.1 蟾蜍毒素微乳的处方筛选及制备

2.1.1 溶解度试验 选择 Capryol 90, Labrafil M 1944 CS, GTCC 等作为油相, Labrasol[®]、聚山梨酯 80、Cremophor RH 40 等为表面活性剂, Transcutol HP, PEG400、无水乙醇等为助表面活性剂。于西林瓶中将过量蟾蜍毒素加至 1 mL 各种载体中,在磁力搅拌器下搅拌 12 h,于 11 000 r \cdot min⁻¹离心 15 min,取上清液,用甲醇稀释后过 0.45 μ m 微孔滤膜,测定,计算蟾蜍毒素在不同载体中溶解度($\bar{x} \pm s, n = 3$)依次为(13.25 \pm 3.21), (20.37 \pm 3.05), (34.26 \pm 2.69), (20.68 \pm 3.25), (25.36 \pm 4.32), (41.85 \pm 5.03), (45.35 \pm 4.57), (23.66 \pm 3.45), (24.56 \pm 4.12) g \cdot L⁻¹,表明在不同类别载体中,GTCC、Cremophor RH 40, Transcutol HP 对蟾蜍毒素的溶解度最大。

2.1.2 伪三元相图优化处方 在室温下采用水滴定法构建伪三元相图。按不同质量比(K_m 分别为 1:1, 2:1, 3:1)分别精密称取表面活性剂和助表面活性剂,混合均匀制成混合表面活性剂。按油相和混合表面活性剂质量比分别为 0.5:9.5, 1:9, 1.5:8.5, 2:8, 2.5:7.5, 3:7, 3.5:6.5, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2, 9:1 精密称取,于室温、磁力搅拌下滴加水,直至澄清透明的微乳形成。当外观不再澄清时,记录临界加水量。按油相、水相、混合表面活性剂在临界点的质量分数比,绘制伪三元相图(图 1),显示当 $K_m = 3:1$ 时,所形成的微乳区域面积最大。

2.1.3 蟾蜍毒素微乳的制备 确定蟾蜍毒素微乳

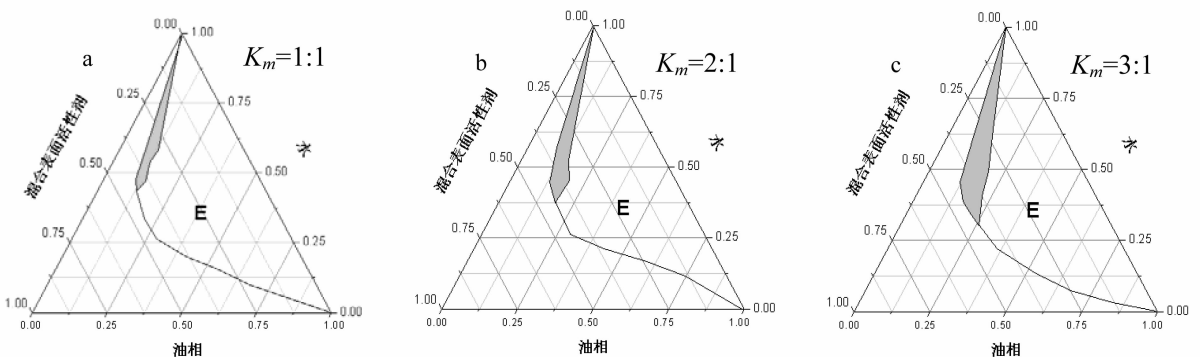


图 1 不同质量比蟾蜍毒素微乳的伪三元相(阴影区为微乳区,E 表示乳剂区)

的处方为 GTCC-Cremophor RH 40-Transcutol HP-水 (10.47%:33.69%:11.23%:44.61%)。将过量蟾蜍毒素加至处方量油相中,加处方量表面活性剂及助表面活性剂,通过磁力搅拌器混合均匀,加入处方量水,按 2.1.1 项下方法离心,取上清液,即得。

2.2 蟾蜍毒素微乳的表征

2.2.1 粒径、多分散系数(PDI)及 Zeta 电位考察 取蟾蜍毒素微乳适量,采用马尔文激光散射粒度仪测定,光散射度 90°,于 25 °C 测得蟾蜍毒素微乳的平均粒径(31.33 ± 5.362) nm, PDI = (0.103 ± 0.025), Zeta 电位 - (30.85 ± 3.25) mV, 粒径分布见图 2, Zeta 电位见图 3, 显示该微乳粒径较小, 分布均匀, 带负电荷量较大, 利于微乳稳定存在。

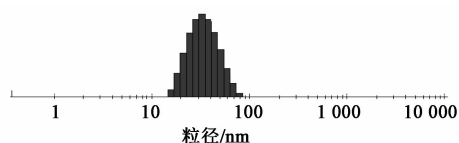


图 2 蟾蜍毒素微乳粒径分布

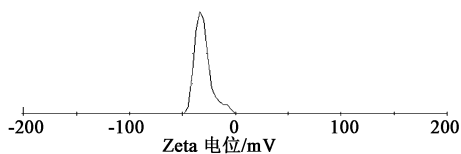


图 3 蟾蜍毒素微乳的 Zeta 电位

2.2.2 外观形态 将载有 Formvar 支持膜的铜网置于蜡板上,在膜上分别滴加蟾蜍毒素微乳 1 滴,自然晾干 30 min,滴加 2% 磷钨酸 1 滴,自然晾干 10 min,用滤纸吸走多余的液体,置于 Tecnai 12 型透射电子显微镜下观察微乳的形态,见图 4,说明该微乳外观圆整均匀。

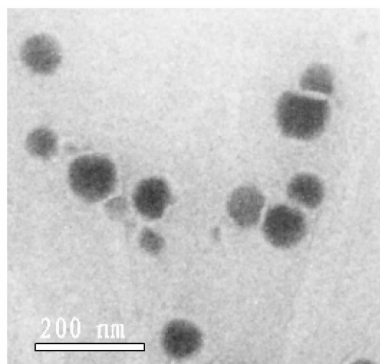


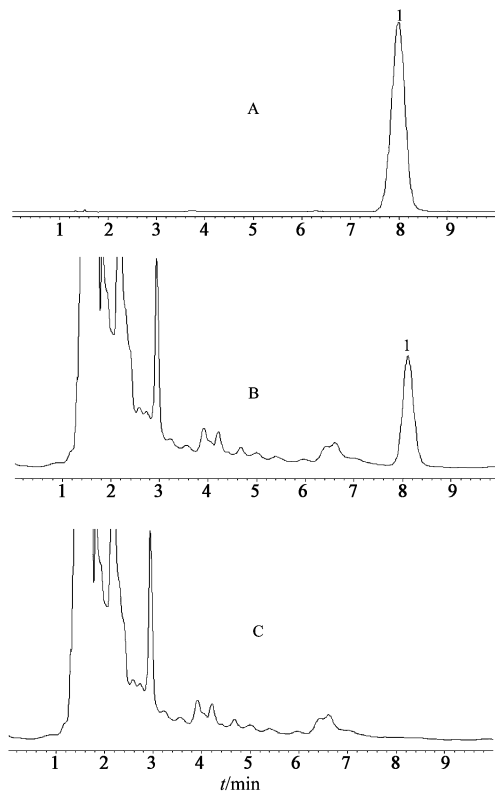
图 4 蟾蜍毒素微乳 TEM ($\times 97\ 000$)

2.2.3 稳定性考察 取蟾蜍毒素微乳溶液 1.0 mL,分别将其稀释 10,100 倍,结果发现微乳澄清透明,粒径均无明显变化,表明稀释对微乳溶液无明显影响。取蟾蜍毒素微乳溶液 1.0 mL 于 1.5 mL 离心管

中,以 $13\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 30 min,微乳溶液澄清透明,不分层,说明高速离心对微乳溶液无明显影响。将蟾蜍毒素微乳溶液分别置于 4,40 °C 条件下保存 1 个月,未见分层、絮凝等现象,表明微乳较稳定。取蟾蜍毒素微乳溶液 10 份,分别调 pH 2.0,3.0,4.0,5.0,5.5,6.0,6.5,7.0,7.4,8.0,观察微乳澄清透明,测得粒径无明显变化,表明蟾蜍毒素微乳在人体 pH 范围内基本稳定。用生理盐水分别将蟾蜍毒素微乳溶液稀释 10,100 倍,观察微乳保持澄清透明状态,测得粒径无明显变化,表明微乳溶液在生理盐水状态下基本稳定。

2.3 蟾蜍毒素的含量测定

2.3.1 色谱条件 ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm \times 150 mm, 5 μm), 流动相 甲醇-水 (70:30), 流速 1.0 mL \cdot min⁻¹, 柱温 30 °C, 检测波长 300 nm, 进样量 10 μL , 见图 5。



A. 对照品;B. 供试品;C. 空白微乳;I. 蟾蜍毒素

图 5 蟾蜍毒素微乳 HPLC

2.3.2 线性关系的考察 精密称取蟾蜍毒素对照品 1.0 mg,置 10 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得 1.0 g \cdot L⁻¹ 对照品溶液。精密吸取该溶液适量,分别配成 0.50,0.20,0.10,0.05,0.02,0.01,0.001 g \cdot L⁻¹ 的系列溶液,按 2.3.1 项下方法进样,以蟾蜍毒素质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐

标,得回归方程 $Y = 1\ 632.2X + 3.251$ ($r = 0.999\ 6$),表明蟾蜍毒素在 $0.001 \sim 0.5\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 与峰面积呈良好线性关系。

2.3.3 供试品溶液的制备 精密量取蟾蜍毒素微乳 $1.0\ \text{mL}$,置于 $10\ \text{mL}$ 量瓶中,加水溶解至刻度,超声 $10\ \text{min}$,于 $11\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 $15\ \text{min}$,取上清液,即得。

2.3.4 精密度试验 取同一供试品溶液,按 **2.3.1** 项下色谱条件于日内进样 6 次,结果峰面积的 RSD 0.51% ;日间连续 $6\ \text{d}$ 进样,结果峰面积的 RSD 0.86% ,表明仪器精密度良好。

2.3.5 重复性试验 取同一供试品溶液,按 **2.3.1** 项下方法测定,结果峰面积的 RSD 0.42% ,表明该方法重复性良好。

2.3.6 稳定性试验 取同一供试品溶液,按 **2.3.1** 项下方法于 $0, 2, 4, 6, 8, 12\ \text{h}$ 进样,结果峰面积的 RSD 0.62% ,表明供试品溶液在 $12\ \text{h}$ 内稳定性良好。

2.3.7 加样回收率试验 分别精密量取蟾蜍毒素微乳 $1\ \text{mL}$,置于 $10\ \text{mL}$ 量瓶中,共 9 份,等分为 3 组,依次精密加入蟾蜍毒素对照品 $0.5, 1.0, 1.5\ \text{mg}$,按 **2.3.3** 项下方法制备供试品溶液,按 **2.3.1** 项下方法测定,计算平均回收率分别为 $99.42\%, 99.69\%, 99.86\%$,RSD 分别为 $1.72\%, 1.55\%, 1.89\%$,表明本法回收率较好。

2.3.8 蟾蜍毒素微乳载药量的测定 取蟾蜍毒素微乳 3 份,每份 $1.0\ \text{mL}$,分别置于 $10\ \text{mL}$ 量瓶中,加甲醇 $5.0\ \text{mL}$ 破乳,用甲醇定容至刻度,超声 $3\ \text{min}$,取破乳液 $0.5\ \text{mL}$ 于 $10\ \text{mL}$ 量瓶中,用甲醇定容至刻度,取适量过 $0.45\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜,按 **2.3.1** 项下方法进样,测得蟾蜍毒素微乳的载药量 (1.36 ± 0.12)%。

2.4 离体小鼠皮肤的制备 取健康雄性小鼠 (22 ± 2) g,处死,剃净腹部的毛,剥离腹部皮肤,用脱脂棉球沾生理盐水擦去皮下脂肪组织和黏连物,用生理盐水冲洗干净,备用^[9]。

2.5 蟾蜍毒素水溶液的制备 精密称取蟾蜍毒素(根据微乳的载药量计算) $68\ \text{mg}$,溶解于 $5.0\ \text{mL}$ 含有 2% 吐温 80 的水中,即得。

2.6 体外渗透试验 采用 TP-3 型透皮扩散仪于 $37\ ^\circ\text{C}$ 进行透皮试验,皮肤固定在供给室和接收室之间,皮肤表皮层面向供给室,有效渗透面积 $1.7\ \text{cm}^2$,接收液为 2% 吐温 80 水溶液,接收室体积 $10\ \text{mL}$ 。将蟾蜍毒素微乳、蟾蜍毒素水溶液各 $1.0\ \text{mL}$ 加至供

给室,以 $400\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 搅拌,分别于 $0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12\ \text{h}$ 取出接收液 $1.0\ \text{mL}$ (每次取样后均补加等量等温接受液)。将取得的样品于 $11\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 $15\ \text{min}$,取上清液进样 $20\ \mu\text{L}$,测定蟾蜍毒素浓度,计算累积渗透量(Q),见图 6。试验结束后将有效渗透面积皮肤剪下,用 2% 吐温 80 水溶液冲洗干净,剪碎,置于离心管中,用 $1.0\ \text{mL}$ 甲醇超声处理 $30\ \text{min}$,于 $11\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 $15\ \text{min}$,取上清液过 $0.45\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜,进样 $20\ \mu\text{L}$,测定蟾蜍毒素含量,计算蟾蜍毒素的皮肤滞留量 ($\bar{x} \pm s, n = 6$) 分别为 ($1\ 895.36 \pm 72.36$), (387.60 ± 55.25) μg 。

$$Q_s = \frac{V}{S} \times C_n + \sum_{i=1}^{n-1} \frac{V_i}{S} C_i$$

式中 S 为有效扩散面积, V 为接收液体积, C_i 为第 i 次至上次取样时接收液中药物质量浓度, C_n 为该次取样时接收液中药物质量浓度^[10]。结果表明蟾蜍毒素微乳中蟾蜍毒素 $12\ \text{h}$ 的 Q 及皮肤滞留量分别是蟾蜍毒素水溶液的 $3.96, 4.89$ 倍,且具有极显著差异 ($P < 0.01$)。

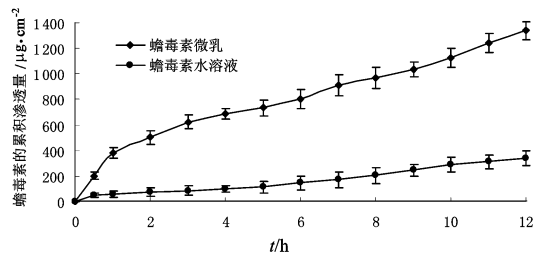


图 6 蟾蜍毒素微乳与蟾蜍毒素水溶液的累积渗透量 ($n = 6$)

3 讨论

蟾蜍毒素的作用类似洋地黄,对心脏具有毒性作用,过量摄入蟾蜍毒素可致中毒,出现剧烈呕吐、腹痛、腹泻、心律失常、房室传导阻滞,严重者多在发病后数小时死亡,透皮给药是一种适合于蟾蜍毒素的给药途径。蟾蜍毒素的经皮给药渗透率较低,皮肤滞留量较少,限制了其治疗恶性黑色素瘤等皮肤病的效果,故使用微乳作为蟾蜍毒素透皮给药载体,显著提高了其体外透皮渗透速率和皮肤滞留量,为蟾蜍毒素的临床推广提供实验依据。

[参考文献]

[1] 李艳荣. 蟾蜍毒素的抗肿瘤作用[J]. 国外医学: 中医中药分册, 2002, 24(3): 152.
[2] 吴纪霞. 抗肿瘤新星蟾蜍毒素的临床应用及其机制的研究进展[J]. 中国医药指南, 2011, 9(28): 235.

栀子超微粉与细粉中栀子苷的体外溶出度比较

熊慧^{1,2}, 郭舟², 赵静文², 王金辉^{1*}

(1. 沈阳药科大学, 沈阳 110016; 2. 襄阳市食品药品检验所, 湖北 襄阳 441021)

[摘要] 目的: 比较栀子超微粉和细粉中栀子苷的体外溶出度。方法: 建立 HPLC 测定栀子超微粉和细粉中栀子苷在不同时间点的溶出量, 计算累积溶出率, 采用桨法进行体外溶出试验, 色谱条件为 Wondasil C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-水 (15:85), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 238 nm, 柱温 30 °C, 进样量 10 μL。结果: 栀子超微粉和细粉 45 min 时累计溶出率分别为 92.82%, 83.36%, T_{0.8} 分别为 9.92, 26.35 min, 超微粉中栀子苷的溶出度和溶出速率均优于细粉。结论: 栀子微粉化有利于有效成分的快速溶出。

[关键词] 栀子; 栀子苷; 溶出度; 超微粉; 细粉; 高效液相色谱

[中图分类号] R283.6; R282.6; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)21-0053-03

[doi] 10.11653/syfyj2013210053

Comparison of *in vitro* Dissolution of Jasminoidin from Ultrafine Powder and Fine Powder of Gardeniae Fructus

XIONG Hui^{1,2}, GUO Zhou², ZHAO Jing-wen², WANG Jin-hui^{1*}

(1. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China;

2. Xiangyang Institute for Food and Drug Control, Xiangyang 441021, China)

[Abstract] **Objective:** To compare *in vitro* dissolution of jasminoidin between ultrafine powder and fine powder of Gardeniae Fructus. **Method:** Paddle method was adopted *in vitro* dissolution test. HPLC was developed for determining dissolution of jasminoidin from ultrafine powder and fine powder of Gardeniae Fructus in different

[收稿日期] 20130402(008)

[第一作者] 熊慧, 硕士, 中药师, 从事药物分析与药品检验方面研究, Tel:0710-3511219, E-mail:23869735@qq.com

[通讯作者] * 王金辉, 博士, 教授, 从事中药和天然药物中的生物活性成分的发现与优化、中药饮片炮制及其质量规范化研究, Tel:024-23986479, E-mail:wangjh1972@vip.sina.com

[3] 朱树宽, 郭新. 干蟾皮在顽固性皮肤病中的应用[J]. 浙江中医杂志, 2005, 40(10):457.

[4] 张磊, 张莉, 白雪, 等. 华蟾蜍毒素在大鼠体内的组织分布研究[J]. 中草药, 2009, 40(5):722.

[5] 袁久荣, 王爱武, 荆淑红, 等. 中医经皮给药与中药透皮吸收研究进展[J]. 中国医药学报, 2003, 18(4):52.

[6] HU L D, WU H Y, NIU F, et al. Design of fenofibrate microemulsion for improved bioavailability [J]. Int J Pharm, 2011, 420(2):251.

[7] 崔晶, 翟光喜, 邹满. 微乳给药系统的研究与应用[J]. 食品与药品, 2005, 7(1):23.

[8] 张莉, 白雪, 齐刚, 等. RP-HPLC 法测定大鼠血清中蟾蜍灵浓度[J]. 药物分析杂志, 2004, 4(5):523.

[9] CHEN Y, WU Q Q, ZHANG Z H, et al. Preparation of curcumin-loaded liposomes and evaluation of their skin permeation and pharmacodynamics [J]. Molecules, 2012, 17(5):5972.

[10] ZHANG Y T, ZHAO J H, ZHANG S J, et al. Enhanced transdermal delivery of evodiamine and rutaecarpine using microemulsion [J]. Int J Nanomedicine, 2011(6):2469.

[责任编辑 仝燕]