

实验研究

苦豆子总碱二元醇脂质体制备及体外透皮特性研究^{*}

王慧^{1**} 邵青¹ 张燕¹ 王文杰¹ 杨苗苗¹ 胡婕雯¹ 张玲^{2***}

(1. 西安市精神卫生中心, 陕西 西安 710061; 2. 西安交通大学附属红会医院, 陕西 西安 710000)

摘要:目的 在制备苦豆子总碱脂质体的过程中,加入两种水相混溶渗透促进剂:乙醇和丙二醇,以获得新的、稳定的透皮给药系统,增强苦豆子总碱(SATA)的皮肤传递。**方法** 注入法制备二元醇脂质体,并对其形态、大小、Zeta 电位进行表征,包封率、囊泡稳定性和皮肤渗透特性为优化乙醇和丙二醇配比的重要考察因素,采用 Franz 扩散池对小鼠皮肤进行体外皮肤渗透实验,比较小鼠皮肤的累积渗透量。用激光共聚焦扫描电镜观察含有荧光素罗丹明 B 的苦豆子总碱二元醇脂质体在离体小鼠皮肤中的穿透深度及荧光强度。**结果** 当乙醇:丙二醇=7:3(w/w)时,二元醇脂质体的稳定性最好、包封率最高(89.13±0.42)%,粒径最小(103.00±16.15)nm,透皮深度(170 μm)最大和最强的荧光强度(Max_{FI}=160 AU)。**结论** 制备的苦豆子总碱二元醇脂质体(乙醇:丙二醇=7:3,w/w)是一种高效且稳定的经皮传递载体。

关键词:苦豆子总碱(SATA);二元醇脂质体;乙醇;丙二醇;经皮传递载体;共聚焦激光扫描电镜

中图分类号:R284

文献标识码:A

文章编号:2096-1340(2023)03-0071-05

DOI:10.13424/j.cnki.jstcm.2023.03.014

Preparation and in Vitro Transdermal Properties of Sophora Alopecuroides Total Alkaloid Diol Liposome

WANG Hui¹ SHAO Qing¹ ZHANG Yan¹ WANG Wenjie¹

YANG Miaomiao¹ HU Jiewen¹ ZHANG Ling²

(1. Xi'an Mental Health Center, Xi'an 710061, China;

2. Xi'an Jiaotong University Affiliated Red Society Hospital, Xi'an 710000, China)

Abstract: Objective In the process of preparing Sophora alopecuroides total alkaloids liposomes, two water-soluble permeation enhancers, ethanol and propylene glycol, were added to obtain a new and stable transdermal delivery system, enhancing the skin transmission of Sophora alopecuroides total alkaloids (SATA). **Methods** Injecting method was used to prepare diol liposomes, and their morphology, size, and Zeta potential were characterized. The encapsulation efficiency, vesicle stability, and skin permeation characteristics were important factors for optimizing the ratio of ethanol and propylene glycol. In vitro skin permeation experiments were conducted on mouse skin using Franz diffusion cell to compare the cumulative permeation amount of mouse skin. The penetration depth and fluorescence intensity of sophora alopecuroides total alkaloid diols liposomes containing fluorescein rhodamine B in isolated mouse skin were observed by laser confocal scanning electron microscopy. **Results** The results showed that when ethanol:propylene glycol = 7:3 (w/w), the stability of diol liposomes was the best, the encapsulation efficiency was the highest (89.13±0.42)%, the particle size was the smallest

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81202938);西安市科学技术局重点实验室(201805051ZD2CG35)

** 作者简介:王慧,女,副主任药师,研究方向:药物制剂。E-mail:yaoxuewanghui@163.com

*** 通讯作者:张玲,主管药师。E-mail:23906757@qq.com

(103.00 ± 16.15) nm, and the transdermal depth was ($170 \mu\text{m}$). Maximum and strongest fluorescence intensity (MaxFI = 160 AU). **Conclusion** The prepared bitter bean seed total alkaloid diol liposome (ethanol:propylene glycol = 7:3, w/w) is an efficient and stable transdermal delivery carrier.

Key words: Total alkaloids of *Sophora alopecuroides* (SATA); Diol liposomes; Ethanol; Propylene glycol; Transdermal delivery carrier; Confocal laser scanning electron microscopy

苦豆子^[1]为豆科植物苦豆子的种子,是西北很普遍的一种很重要的药植资源。该品具有清热去火,抑菌消炎等功效^[2],常用于胃痛,宫颈糜烂,湿疹,顽癣等疾病。由于其不易透过皮肤一定程度制约了其外用制剂的开发与应用。

乙醇脂质体^[3]含有较高浓度乙醇,在传递过程中使脂质体易变形,较易携带药物进入皮肤深层,显著增加药物的渗透性,但由于乙醇易挥发,长期放置药物容易泄漏,很大程度上限制了其在药物研发中的应用。如果在乙醇脂质体制备过程中加入丙二醇^[4-5],可能会因为粘度增大,从而增加乙醇脂质体的稳定性,鉴于此,本实验在制备乙醇脂质体显著提高苦豆子总碱的透皮量的基础上,在处方中加入了丙二醇,制备二元醇脂质体,并对其包封率、体外透皮率、囊泡进入皮肤的深度及稳定性进行考察,筛选出乙醇与丙二醇的最佳配比。

1 仪器与材料

1.1 仪器 LCZA 型高效液相色谱仪系统(日本岛津);Leica Tcs Sp II 型激光共聚焦显微镜(德国徕卡有限公司);RC-3B 型药物溶出仪(天津市精拓仪器科技有限公司);TG20M 型高速离心机(湖南郝西仪器设备有限公司),TK-12B 型透皮扩散实验仪(上海罗中科技发展有限公司)。

1.2 试药 苦豆子总生物碱原料药(批号:040228,含量 99.8%,宁夏紫荆花药业);槐定碱标准品(批号:040228,食品药品研究所);卵磷脂(PC 上海爱康精细化工有限公司,含量 90%);罗丹明 B (Sigma 公司);透析袋(截留分子量 5000 ~ 8000,北京鹏成生物所分装);甲醇是色谱纯(Dima 公司)。

1.3 动物 昆明种小鼠,体重(20 ± 4)g(许可证号 SCXK(甘)14-006,合格证:医动字第 14-006 号,兰州大学动物实验中心)。

2 方法

2.1 制备二元醇脂质体 精密称取 3% (W/V) 的

苦豆子总碱、3% (W/V) PC 和 0.03% (W/V) 罗丹明 B 溶于 4.5 mL 醇溶液中(乙醇:丙二醇为 10:0, 9:1, 7:3, 5:5, 3:7, 1:9 和 0:10, w/w), 将 PBS (pH 6.5) 5.5 mL 缓慢注入,整个过程在密闭恒温容器中以 $700 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的转速不断搅拌 20 min,制备过程中保持体系在(30 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,室温冷却 30 min,过滤^[6],得不同比例乙醇与丙二醇的醇脂质体。

2.2 苦豆子总碱中槐定碱的含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱:Kromasil C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm);流动相:三乙胺-甲醇-0.05 mol · L⁻¹ 磷酸二氢钠(0.1:20:80);检测波长:210 nm;柱温:30 $^{\circ}\text{C}$,进样量:10 μL 。

2.2.2 标准曲线及线性范围 精密称取 6 mg 的槐定碱标准品,置于 10 mL 容量瓶中,加甲醇溶液并定容,得对照品。精密量取该对照品,用甲醇将其稀释成不同浓度的溶液(0.625、1.25、2.5、5、10 和 20 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)。按“2.2.1”项下色谱条件,进样分析,以峰面积(A)对浓度(C)进行回归,线性回归方程 $A = 19448C + 9811$, $r = 0.9999$,表明槐定碱在 20 ~ 0.625 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 内与峰面积呈良好的线性关系。

2.2.3 精密度及回收率试验 精密量取槐定碱上述对照品,用甲醇将其稀释成高、中、低(20、10、5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)的质量浓度的对照品溶液,测日内精密度(同日测定 5 次);测日间精密度(连续测定 5 d)^[7-8]。结果,平均日内及平均日间均小于 5% ($n = 5$),表明该方法精密度良好。计算样品溶液的平均回收率为: (99.37 ± 2.31)%, RSD 小于 2.62%,表明该方法回收率良好。

2.3 醇脂质体形态的测定 将制得的二元醇脂质体样品稀释后,滴至有支持膜的铜网上,磷钼酸染色后,室温挥干,透射电镜下观察醇脂质体形态。

2.4 粒径及 Zeta 电位 将制得的二元醇脂质体以 0.45 μm 微孔滤膜过滤,激光动态光散射仪检测样品的粒径大小及 Zeta 电位。

2.5 包封率的测定 精密量取 1 mL 苦豆子总碱

醇脂质体,加无水乙醇,超声 5 min,使醇脂质体完全破乳,无水乙醇稀释到合适浓度,微孔滤膜过滤,HPLC 法测定滤液,所测的药物总浓度为 C,将精密量取的等比例的醇相缓冲盐体系溶液 2 mL 放于透析袋内作为内相,将精密量取的苦豆子总碱醇脂质体 10 mL 放于透析袋外作为外相,以 $500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, $(35\pm2)^{\circ}\text{C}$ 透析 6 h^[9-10]。精密量取 1 mL 透析袋内透析液,用等比例的醇相缓冲盐溶液稀释,微孔滤膜过滤,HPLC 法测定滤液,所测的游离药物浓度为 C_1 ,计算不同比例乙醇与丙二醇的醇脂质体的包封率(EE%)为: $\text{EE}\% = (C - C_1) / C \times 100\%$ 。

2.6 不同比例乙醇与丙二醇的醇脂质体的体外经皮渗透实验的比较 采用 Franz 扩散池进行小鼠皮肤的渗透研究,取昆明小鼠,用剃刀小心地刮去背部毛发,从每只被处死的小鼠背部区域切除一块皮肤,清洗,浸泡于生理盐水,4℃ 保存,备用。给药室上固定小鼠皮肤,在接收池中加入一定量的磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.4),使得小鼠皮肤与接收液完全接触。取醇脂质体各 0.5 mL,滴于给药室上的小鼠皮肤,以 $500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速度搅拌恒温水浴池 $(35\pm2)^{\circ}\text{C}$,分别在 0,1,2,3,6,7,10,12,24 h 时间点取 0.1 mL 接收液,并在接收池中加入 0.1 mL 磷酸盐缓冲液。将取得的接收液(0.1 mL)离心($10000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$)5 min,取 1 μL 进样,测定含量^[11-12]。

2.7 观察小鼠皮肤中醇脂质体分布

2.7.1 给药方法 制备含有 1% 罗丹明 B 的不同比例乙醇与丙二醇的醇脂质体,将醇脂质体涂抹于去毛的小鼠皮肤,12 h 后,处死小鼠,剥离小鼠皮肤,放于载玻片,备用^[13]。

2.7.2 共聚焦激光扫描显微镜观测 共聚焦激光扫描显微镜对载玻片上的备用皮肤进行断层扫描。结果见图 3。

2.8 醇脂质体稳定性考察 分别将制备的醇脂质体置于冰箱(4℃)及室温下,每月测定其包封率,不间断测定 3 个月,考察醇脂质体的稳定性^[14-16]。

3 结果

3.1 处方筛选 确定处方中乙醇与丙二醇的最佳比例。预实验优化处方,当苦豆子总碱、醇相和磷脂分别为 1%、45% 和 3% 时,苦豆子总碱醇脂质体包封率相对最高,通过预实验发现乙醇与丙二

醇的对比对粒径大小及包封率有很大的影响^[17-18],对此,本实验考察乙醇与丙二醇不同比例时粒径大小及包封率的变化,结果见表 1 和表 2。

表 1 不同比例的乙醇与丙二醇制备苦豆子总碱醇脂质体($\bar{x}\pm s,n=3$)

样品	苦豆子总碱 (%,W/V)	磷脂 (%,W/V)	二元醇(45%,W/V)	
			乙醇 (%,W/V)	二元醇 (%,W/V)
ETOH/PG 10/0	3	3	45.0	0
ETOH/PG 9/1	3	3	40.5	4.5
ETOH/PG 7/3	3	3	31.5	13.5
ETOH/PG 5/5	3	3	22.5	22.5
ETOH/PG 3/7	3	3	13.5	31.5
ETOH/PG 1/9	3	3	4.5	40.5
ETOH/PG 0/10	3	3	0	45.0

表 2 不同比例乙醇与丙二醇的苦豆子总碱醇脂质体的粒径、PI、Zeta 电位和包封率($\bar{x}\pm s,n=3$)

样品	粒径(nm)	PI	Zeta 电位(mV)	包封率(%)
ETOH/PG 10/0	105.00±24.03	0.12±0.21	-46.00±24.00	82.13±0.24
ETOH/PG 9/1	104.00±15.81	0.16±1.31	-48.00±11.00	80.40±0.13
ETOH/PG 7/3	103.00±16.15	0.19±0.51	-50.00±6.00	89.13±0.42
ETOH/PG 5/5	115.00±11.00	0.23±1.33	-49.00±8.00	80.22±0.31
ETOH/PG 3/7	174.00±13.92	0.33±1.92	-47.00±12.00	71.30±0.15
ETOH/PG 1/9	320.00±26.61	0.42±0.17	-46.00±11.00	50.91±0.02
ETOH/PG 0/10	463.00±27.84	0.57±0.46	-47.00±20.00	50.14±0.56

3.2 醇脂质体透射电镜图 透射电镜扫描苦豆子总碱醇脂质体(乙醇:丙二醇=7:3),见图 1。

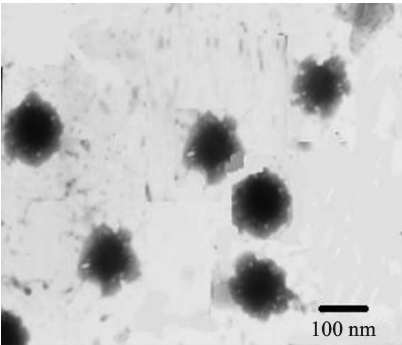


图 1 醇脂质体(乙醇:丙二醇=7:3)透射电镜扫描图($\times 100000$)

图 1 可见:醇脂质体(乙醇:丙二醇=7:3)均呈类球形或球形的囊泡。

表 1、表 2 可见:当乙醇:丙二醇=7:3 时,醇脂质体粒径最小(103.00 ± 16.15) nm,包封率最高(89.13 ± 0.42)%,Zeta 电位最大(-50.00 ± 6.00) mV。醇脂质体粒径越小,包封率越高,越易携带药

物透皮吸收^[19],而 Zeta 电位越大,表明电荷之间排斥越强,囊泡间凝聚力^[20-23]降低,从而使醇脂质体更稳定,筛选出乙醇与丙二醇的最佳配比为 7:3。

3.3 体外经皮渗透实验 本实验选用制备的苦豆子总碱醇脂质体进行体外经皮渗透实验,其 24 h 离体皮肤累积渗透曲线见图 2。

从图 2 可知,24 h 后苦豆子总碱二元醇脂质体(乙醇:丙二醇 = 7:3)累计渗透百分数最高,结果表明:二元醇脂质体(乙醇:丙二醇 = 7:3)中药物的渗透性均大于其他乙醇与丙二醇的配比。

3.4 共聚焦激光扫描电镜观察醇脂质体在小鼠皮肤分布 对涂有罗丹明 B 的不同乙醇与丙二醇的醇脂质体小鼠皮肤进行断层扫描,不同比例的乙醇和丙二醇都可以携带药物进入皮肤,但图 C 较其他图而言皮肤深层的荧光强度最强,这表明醇脂质体(乙醇:丙二醇 = 7:3)可以增加药物的透皮量及皮内滞留量。结果见图 3。

3.5 苦豆子总碱醇脂质体稳定性考察 考察乙醇与丙二醇(7:3)的醇脂质体在室温下 3 个月的

稳定性,并观察外观,粒径大小和包封率的变化^[24]。结果表明:在室温下依次于 0、1、2、3 月末取样,包封率分别为:89.13%、87.21%、85.06%;粒径分别为:103.00 nm、109.00 nm、111.00 nm,表明苦豆子总碱醇脂质体(乙醇:丙二醇 = 7:3)的外观、包封率及粒径未发生较大变化,表面醇脂质体的稳定性良好,无统计学差异。

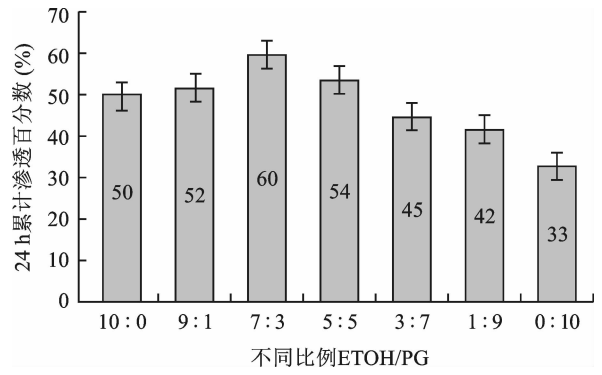
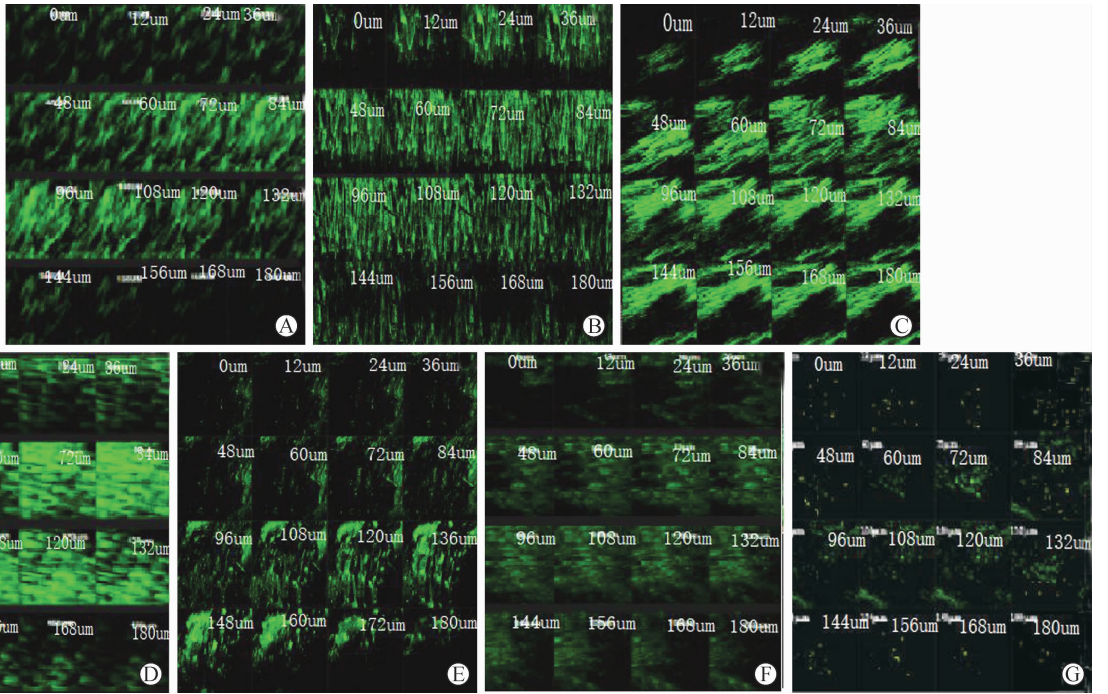


图 2 苦豆子总碱 24 小时离体皮肤累计渗透百分率($n=3, \bar{x} \pm s$)



注:A. 乙醇:丙二醇10:0;B. 乙醇:丙二醇9:1;C. 乙醇:丙二醇7:3;D. 乙醇:丙二醇5:5;E. 乙醇:丙二醇3:7;F. 乙醇:丙二醇1:9;G. 乙醇:丙二醇0:10

图 3 罗丹明 B 荧光素共聚焦激光扫描图

4 讨论

本实验为获得含 3% 的稳定的苦豆子总碱醇脂质体,减少包封后的渗漏,在乙醇脂质体中加入不同比例的丙二醇,考察其体外稳定性和透皮试

验。最后选择乙醇与丙二醇的比例为 7:3,因为它具有最高的包封率(89.13 ± 0.42)%、较小的粒径(103.00 ± 16.15) nm、较小的 PI(0.19 ± 0.51) 和最高的 Zeta 电位(-50.00 ± 6.00) mV。囊泡越

小,包被率越高,包被的药物越容易通过皮肤。苦豆子总碱醇脂质体具有缓释作用,这可能是因为苦豆子总碱在通过透析袋进入PBS之前要先穿透磷脂双分子层,使苦豆子总碱缓慢而持续地释放。为了研究醇脂质体在皮肤中的分布,目前有关醇脂质体的透皮机制研究主要采用荧光标记法,所用的磷脂荧光标记物为罗丹明B,其中荧光团通过化学键合与磷脂直接键合,通过观察罗丹明B在小鼠体内的渗透情况,可以推测二元醇脂质体对皮肤的渗透程度^[25],在激光共聚焦显微镜下观察了小鼠皮肤外用罗丹明B醇脂质体24后皮肤各层荧光强度,从而对二元醇脂质体的透皮情况进行客观评价,实验表明,乙醇:丙二醇7:3时,罗丹明B透皮量和透皮深度最大。因此,考虑到含醇脂质体(乙醇:丙二醇7:3)的稳定性、较高的包封率、药物的透皮百分比和穿透深度,乙醇与丙二醇7:3的比例为醇脂质体处方的最佳配比。

参考文献

[1] 刘伟,张扬星,杨新洲,等.苦豆子总碱降血糖作用及其机制研究[J].天然产物研究与开发,2021,12(10):1991-1997.

[2] 施晓莹,谈文盼,宋丽军,等.HPLC-MS 检识苦豆子总碱双层包衣微丸入血成分[J].辽宁中医药大学学报,2019,21(4):65-69.

[3] 王慧,张晓红,张燕,等.乙醇脂质体、二元醇脂质体及传递体对多奈哌齐经皮转运的对比性研究[J].中国医院药学杂志,2018,38(3):219-222.

[4] 邢文善,路芳,徐阳.经皮给药新型脂质体——二元醇脂质体的研究进展[J].中国医药导刊,2018,20(4):221-224.

[5] 宋娟,于绪东,张振宇,等.茶多酚二元醇脂质体的制备及质量评价[J].中国麻风皮肤病杂志,2018,34(7):407-410.

[6] 陈积,赵小倩,马彦巧,等.复方莪术油脂质体凝胶的制备及体外透皮作用[J].中国新药杂志,2018,27(7):830-838.

[7] 靖会,赵惠茹,张宇洁,等.RP-HPLC 法测定雷公藤甲素脂质体中雷公藤甲素的含量[J].陕西中医学院学报,2006,29(1):57-58.

[8] 张建平,魏玉辉,张建强,等.苦豆子总碱温度敏感性凝胶的质量控制和稳定性研究[J].中国医院药学杂志,2016,36(4):632-635.

[9] Touitou E, Dayan N, Bergelson L, et al. Ethosomes - novel vesicular carriers for enhanced delivery: characterization and skin penetration properties [J]. J Control Release, 2000,65(2):403-418.

[10] Zhang Y, Ng W, Hu J, et al. Formulation and in vitro stability evaluation of ethosomal carbomer hydrogel for transdermal vaccine delivery [J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2018,163(21):184-191.

[11] 杨丽.醇脂质体促进脂溶性药物经皮渗透的机制研究[D].广州:南方医科大学,2017.

[12] 王慧,邵青,张燕,等.尼古丁二元醇脂质体温敏凝胶的制备及体外评价[J].西北药学杂志,2022,37(6):100-104.

[13] 袁海玲,胡继民,魏玉辉,等.布洛芬二元醇脂质体的制备与评价[J].中国医院药学杂志,2012,32(14):1111-1114.

[14] 徐东伟,刘同样.乙醇注入法制备柚皮素脂质体及其质量评价[J].中南药学,2015,12(13):1266-1269.

[15] 王慧,张玲,邵青,等.二元醇脂质体对多奈哌齐经皮转运的协同促进作用[J].中国新药杂志,2022,31(20):2051-2055.

[16] Zhang JP, Wei YH, Zhou Y, et al. Ethosomes, binary ethosomes and transfersomes of terbinafine hydrochloride: a comparative study [J]. Archives of pharmacol research, 2012,35(12):109-117.

[17] 邢宇,李雄,于颖.银杏内酯B脂质体的处方与制备工艺研究[J].中国现代应用药学,2021,38(6):697-703.

[18] 翁金燕,刘瑶,丁佳圣,等.3种不同溶媒介质脂质体的制备及其初步稳定性考察[J].中国药师,2018,21(5):824-827.

[19] 袁海玲,杨焯,张双金,等.布洛芬二元醇脂质体温敏凝胶的处方筛选与体外释放研究[J].中国药房,2015,26(10):1389-1392.

[20] 黄永佳,刘娟,赵静,等.负载氢醌的甘油-丙二醇二元醇脂质体的制备及体外经皮渗透研究[J].重庆医科大学学报,2020,45(6):824-827.

[21] 杨丽华,马春,李淑玲,等.和厚朴酚注射用冻干脂质体治疗血管性痴呆大鼠的神经保护作用机制[J].陕西中医药大学学报,2017,40(4):114-119.

[22] Smith MC, Crist RM, Clogston JD, et al. Zeta potential: a case study of cationic, anionic, and neutral liposomes. Anal Bioanal Chem [J]. 2017,409(24):5779-5787.

[23] 芑叶婷,许妍,高洁,等.磷脂组成对荧光修饰环糊精脂质体皮肤递送效果的影响[J].中国药学杂志,2020,55(13):1094-1097.

[24] 牛小倩.盐酸多奈哌齐脂质体的制备、表征及其经皮机制研究[D].杭州:浙江大学,2019.

[25] Joakim K, Eneko L. In vivo studies investigating biodistribution of nanoparticle encapsulated rhodamine B delivered via dissolving microneedles [J]. J Controlled Release, 2017,265(10):57.