



熊果酸醇质体的制备和体外透皮研究

陈彦^{1,2}, 吴青青¹, 张振海², 周蕾¹, 刘璇², 杜萌², 贾晓斌^{2*}

(1. 江苏大学药学院, 江苏镇江 212013; 2. 国家中医药管理局中药释药系统重点实验室, 江苏省中医药研究院 中药新型给药系统重点实验室, 江苏南京 210028)

[摘要] 目的: 制备熊果酸醇质体并考察醇质体作为熊果酸经皮给药载体的渗透特性。方法: 采用乙醇注入法制备熊果酸醇质体, 并对其形态及粒径进行分析; 采用 TP-3 型透皮扩散实验仪进行体外透皮吸收试验, 比较熊果酸 10% 异丙醇溶液、熊果酸醇质体、熊果酸脂质体的经皮累积渗透量和渗透速率。结果: 此法制得的醇质体平均包封率为 $(95.83 \pm 0.86)\%$, 平均粒径为 (87.5 ± 7.5) nm, Zeta 电位为 $-(38.4 \pm 3.6)$ mV。醇质体 12 h 的累积透过量为 $146.49 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$, 12 h 的渗透速率为 $12.17 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ 。结论: 醇质体包封率高, 稳定性好, 可显著促进熊果酸的透皮吸收。

[关键词] 熊果酸; 醇质体; 体外透皮

熊果酸是存在于天然植物中的一种五环三萜类化合物, 具有抗肿瘤、抗炎抑菌等作用^[1-2], 尤其抗肿瘤作用显著。熊果酸能通过线粒体途径抑制乳腺癌 MCF-7 细胞增殖, 通过上调凋亡促进因子 p53 的表达等途径来诱导乳腺癌细胞的凋亡^[3-6], 可用于乳腺癌的防治。但其为难溶性成分, 口服体内吸收差, 体外释放度小, 难于透皮吸收, 限制了它在制剂方面的应用, 影响其抗肿瘤方面的疗效发挥。

醇质体是一种由磷脂、乙醇、水组成的新型透皮给药载体, 它能促进难溶性药物的透皮吸收, 增加药物在皮肤中的蓄积, 并可增强药物进入细胞的能力^[7], 具有包封率高、稳定性好、刺激性小等优点^[8], 可以作为熊果酸的载体, 促进其透皮吸收, 且目前有关熊果酸经皮渗透的研究在国内外未有报道。因此本实验探索熊果酸醇质体的制备方法, 并与脂质体及其醇溶液对比研究其经皮渗透特性, 以经皮给药的方式使熊果酸直接作用于乳腺部位, 促进其吸收, 以充分发挥熊果酸治疗乳腺癌的作用。

1 材料

Agilent 1100 高效液相色谱仪, 包括柱温箱、在线脱气机、四元泵及二极管阵列检测器(美国 Agi-

lent 公司); JY92-IIN 超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司); 85-2 型恒温磁力搅拌器(上海司乐仪器厂); Tecnai 12 型透射电子显微镜(philips company, Holland); TP-3 药物透皮扩散试验仪(上海黄海仪器厂); Nano-ZS 型马尔文激光散射粒径测定仪(英国马尔文公司); AL-204 电子天平(梅特勒-托利多)。

熊果酸(纯度 $\geq 98\%$, 南京泽朗医药科技有限公司), 异丙醇(国药集团化学试剂有限公司), 大豆卵磷脂(江苏曼氏科技有限公司), 甲醇和乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

昆明种小鼠, 雄性, 体重 (22 ± 2) g, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。

2 方法

2.1 样品的制备

2.1.1 熊果酸醇质体的制备 称取熊果酸 20 mg 和大豆卵磷脂 400 mg, 6 mL 乙醇溶解, 置于磁力搅拌器上, 在密闭条件下边搅拌边缓慢细流注入 14 mL 水, 注完后继续搅拌 5 min, 然后在冰水浴条件下探头超声(200 W, 60 次), 将得到的样品冷藏、备用。

2.1.2 熊果酸脂质体的制备 称取熊果酸 20 mg 和大豆卵磷脂 400 mg, 2 mL 乙醇溶解, 置于磁力搅拌器上, 在密闭条件下边搅拌边缓慢细流注入 18 mL 水, 注完后继续搅拌至乙醇挥尽, 然后在冰水浴条件下探头超声(200 W, 60 次), 将得到的样品冷藏、备用。

[稿件编号] 20101014007

[基金项目] 江苏省中医药领军人才项目(LJ200913)

[通信作者] * 贾晓斌, 研究员, 主要从事中药新型给药系统研究, Tel: (025) 85637809, E-mail: jxiaobin2005@hotmail.com

[作者简介] 陈彦, 研究员, 主要从事中药新型给药系统研究, E-mail: ychen202@hotmail.com



2.1.3 其他样品的制备 配制熊果酸10%异丙醇饱和溶液作为对照。

2.2 粒径的测定

取醇质体适量,用Zetasizer粒径测定仪测定醇质体的平均粒径及Zeta电位。

2.3 形态观察

吸取醇质体混悬液少许滴于有支持膜的通网上,稍干后用2%磷钨酸负染,滤纸吸铜网边缘多余液体,稍干后,用透射电镜观察其形貌并记录照片。

2.4 包封率的测定

2.4.1 色谱条件 Agilent HC-C₁₈柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm);柱温25℃;检测波长210 nm;流动相乙腈-0.1%磷酸溶液(85:15);流速1.0 mL · min⁻¹;进样量80 μL。

2.4.2 标准曲线 精密称取105℃干燥至恒重的熊果酸对照品5.01 mg至5 mL量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀。分别精密量取0.05, 0.2, 0.4, 0.8, 1.0, 1.2 mL至100 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀。分别精密吸取上述对照品溶液80 μL,注入液相色谱仪中按上述色谱条件测定,记录峰面积。以熊果酸浓度(C)为横坐标,峰面积(A)为纵坐标,绘制标准曲线,计算回归方程 $A = 35.645C + 1.4639$, $r = 0.9998$,线性范围0.501 ~ 12.024 mg · L⁻¹。

2.4.3 精密度考察 精密吸取2.4.2项下的熊果酸对照品溶液80 μL照上述色谱条件,重复进样6次,测定熊果酸的峰面积,RSD 0.97%,表明仪器精密度良好。

2.4.4 稳定性考察 精密吸取2.4.2项下的熊果酸对照品溶液,照上述色谱条件分别在0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h进样测定熊果酸的峰面积,RSD 0.83%,表明熊果酸标准溶液在24 h内稳定。

2.4.5 回收率测定 取2.4.2项下的熊果酸对照品溶液0.05, 0.4, 1.2 mL,分别加入0.5 mL空白醇质体中,加入甲醇定容至100 mL,配成0.501, 4.008, 12.024 mg · L⁻¹ 3个质量浓度的样品,进样检测计算回收率,测得其平均回收率为99.3%,RSD 0.91%。

2.4.6 醇质体包封率测定^[9] 取0.5 mL醇质体混悬液,从已制备好的Sephadex G-50微柱凝胶顶端加入,3 000 r · min⁻¹,离心6 min,用1 mL水洗脱2次,合并滤液,用甲醇定容至50 mL,过0.22 μm微

孔滤膜过滤,进样检测,即得包封药物的量(W_包)。

取熊果酸醇质体混悬液0.5 mL,不经微柱离心,直接用甲醇稀释至相同倍数,用0.22 μm微孔滤膜过滤,进样检测,即得醇质体中药物的总质量(W_总)。

$$\text{包封率} = W_{\text{包}} / W_{\text{总}} \times 100\%$$

2.5 体外透皮试验^[10]

取体重合格的健康昆明种小鼠,脱颈处死,剪净腹部的毛,然后剥离此处皮肤,剔除皮下脂肪组织和血管,用生理盐水冲洗干净后即用于;将皮肤夹于双室扩散池中间,角质层面面向供给池,真皮层面面向接收液;供给池分别注入1 mL熊果酸醇质体、熊果酸脂质体、熊果酸10%异丙醇饱和溶液,接收池中分别加入20 mL 10%异丙醇作为接收液,并在接收池中加入磁力搅拌子;双室扩散池固定在透皮仪上,以恒定的速度搅拌接收液,保持恒温在37℃;分别于0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 h在接收池取样1 mL,并补给等量空白接收液。接收液经蒸干,用甲醇定容至1 mL,用0.22 μm微孔滤膜过滤,进样检测,由标准曲线计算浓度,按下式计算累计渗透量和渗透速率:

$$\text{累积渗透量 } M = (C_n V + \sum_{i=1}^{n-1} C_i V_i) / A$$

$$\text{渗透速率 } J = M / \Delta t$$

式中C_n为不同取样点时的接收液中的浓度;C_i为各取样点时取样液的浓度;V, V_i分别为接收池体积(20 mL)和取样体积;A为透皮扩散面积(2.01 cm²);Δt为取样点的时间间隔。

3 结果

3.1 熊果酸醇质体的外观形态

透射电镜测得的熊果酸醇质体形状规则,近似球形,见图1。

3.2 熊果酸醇质体的粒径分布和Zeta电位

用Zetasizer光子相关光谱仪测得熊果酸醇质体的平均粒径为(87.5 ± 7.5) nm,测得Zeta电位为-(38.4 ± 3.6) mV。

3.3 熊果酸醇质体的包封率测定

醇质体的平均包封率为(95.83 ± 0.86)%。

3.4 体外透皮结果

熊果酸醇质体、熊果酸脂质体、熊果酸10%异丙醇饱和溶液的累积渗透量和渗透速率见图2,3。醇质体12 h的累积透量为146.49 μg · cm⁻²,

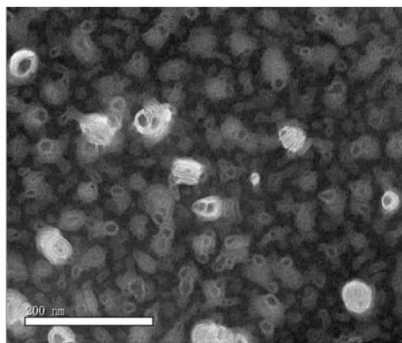


图1 熊果酸醇质体电镜照片($\times 97\ 000$)

12 h 的渗透速率为 $12.17\ \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$, 分别是脂质体和熊果酸 10% 异丙醇饱和溶液的 3.79, 6.26 倍, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。

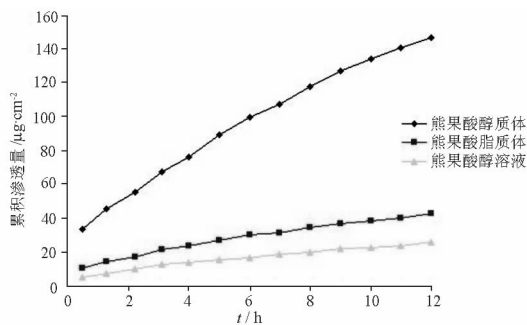


图2 不同剂型熊果酸的累积渗透量

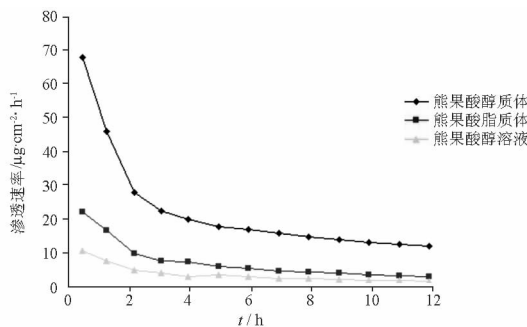


图3 不同剂型熊果酸的渗透速率

4 讨论

本实验通过对熊果酸醇质体的研制, 显示处方工艺可行。制得的醇质体通过电镜观察, 其形状规则, 近似球形, 粒径理想。Zeta 电位为 $-(38.4 \pm 3.6)\ \text{mV}$, 表明醇质体粒子表面荷负电, 这在一定程度上阻止了醇质体粒子的聚集, 保证了混悬液的物理稳定性。

在体外透皮试验中, 为了更好的模拟药物在体内的渗透条件, 透皮接收介质必须对药物有足够的溶解性。熊果酸为脂溶性药物, 不溶于水, 因此常规接收液生理盐水无法满足条件, 且通过试验, 综合考虑熊果酸的溶解度和介质对皮肤的影响, 故选择 10% 异丙醇溶液作为接受介质。

醇质体作为一种新型的经皮渗透载体, 与脂质体相比最大的特点是醇质体系统中含有较高浓度的乙醇, 一方面由于乙醇的存在使得醇质体的脂质双分子层柔韧性增加, 另一方面由于乙醇与角质层的脂质相互作用, 降低了后者的相变温度, 增加其流动性, 促进了药物的渗透。在本次实验中, 熊果酸醇质体的累积渗透量明显高于脂质体及其醇溶液, 可提高熊果酸体外透皮速率, 有利于药物吸收进入乳腺及体循环而发挥治疗作用, 为乳腺癌的防治提供了新的思路, 为采用经皮给药方式防治乳腺癌奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Tapondjou L A, Lontsi D, Sondengam B L, et al. *In vivo* anti-nociceptive and anti-inflammatory effect of the two triterpenes, ursolic acid and 23-hydroxyursolic acid, from *Cussonia bancoensis* [J]. Arch Pharm Res, 2003, 26(2): 143.
- [2] Chen G, Lu H, Wang C, et al. Effect of five triterpenoid compounds isolated from leaves of *Diospyros kakion* stimulus-induced superoxide generation and tyrosylphorylation in human polymorphonuclear leukocytes [J]. Clin Chim Acta, 2002, 320(1/2): 11.
- [3] 张维文, 黎银燕, 张贵平, 等. 熊果酸诱导人乳腺癌细胞 MCF-7 凋亡的实验研究 [J]. 中药材, 2005, 28(4): 297.
- [4] Kassi E, Papoutsi Z, Pratsinis H, et al. Ursolic acid, a naturally occurring triterpenoid, demonstrates anticancer activity on human prostate cancer cells [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2007, 133(7): 493.
- [5] 吴其年, 黄炜, 黄敏珊, 等. 熊果酸对人乳腺癌细胞增殖、凋亡和细胞内游离 Ca^{2+} 的影响 [J]. 肿瘤学杂志, 2004, 10(3): 145.
- [6] Kim D K, Baek J H, Kang C M, et al. Apoptotic activity of ursolic acid may correlate with the inhibition of initiation of DNA replication [J]. Int J Cancer, 2000, 87(5): 629.
- [7] Paolino D, Lucania G, Mardente D, et al. Ethosomes for skin delivery of ammonium glycyrrhizinate: *in vitro* percutaneous permeation through human skin and *in vivo* anti-inflammatory activity on human volunteers [J]. J Control Release, 2005, 106: 99.
- [8] Toutitou E, Godin B, Dayan N, et al. Intracellular delivery mediated by an ethosomal carrier [J]. Biomaterials, 2001, 22: 3053.
- [9] 王娜, 邓英杰, 王敏, 等. 洛莫斯汀脂质体封装率的测定 [J]. 沈阳药科大学学报, 2009, 26(6): 447.



[10] 饶跃峰, 郇锋, 梁文权. 非那甾胺醇质体的体外经皮渗透研究

[J]. 中国药理学杂志, 2004, 39(12): 923.

Preparation and transdermal diffusion of ursolic acid ethosomes

CHEN Yan^{1,2}, WU Qingqing¹, ZHANG Zhenhai², ZHOU Lei¹, LIU Xuan², DU Meng², JIA Xiaobin^{2*}

(1. Department of Pharmaceutics, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China; 2. Key Laboratory of New Drug Delivery System of Chinese Materia Medica, Jiangsu Provincial Academy of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare ursolic acid ethosomes and investigate the penetration characteristics of ursolic acid ethosomes as a transdermal vehicle. **Method:** Ursolic acid ethosomes were prepared by injection method, and the shape and particle size of the ethosomes were analyzed. Ursolic acid permeation tests *in vitro* through the skin of rats were performed in TP-3 diffusion cell. The accumulated permeation amounts of ursolic acid 10% isopropanol solution, ursolic acid liposomes, ursolic acid ethosomes were compared. **Result:** The average encapsulation percentage, particle size, and Zeta potential of the ethosomes were $(95.83 \pm 0.86)\%$, (87.5 ± 7.5) nm and $-(38.4 \pm 3.6)$ mV, respectively. The accumulated permeation amount of the ethosomes in 12 h was $146.49 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$, and its transdermal permeability in 12 h was $12.17 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$. **Conclusion:** The encapsulation percentage of the ethosomes is good, and the stability of the ursolic acid ethosomes is fine. Ethosomes can significantly enhance the diffusion rate of ursolic acid through the skin of rats.

[Key words] ursolic acid; ethosomes; transdermal diffusion *in vitro*

doi:10.4268/cjmm20110808

[责任编辑 马超一]

欢迎订购《当代药用植物典》丛书

《当代药用植物典》由香港浸会大学中医药学院赵中振教授及中国工程院肖培根院士主编。全书分为3篇共4册,分别为东方篇(第一及第二册)、西方篇(第三册)与岭南篇(第四册),涵盖800多种国际上常用药用植物,系统地收载了植物基原主要成分及其化学结构、药理、毒理、原植物及药材图片和临床资料。收集的资料信息量极大,不仅仅涉及到了生长于中国的草本植物,同时也涉及到许多生长在日本、韩国乃至欧美国家的草本植物,堪称国际天然药用草本植物之大成,融汇中西,与时俱进。

全书图文并茂,深入浅出,内容独到。书中药用草本植物的照片(实物照片)质量优良,不少是深入其原产地拍摄获得,十分珍贵,便于与药用草本植物实物进行鉴别比较。特别附有的中国、日本、韩国药典中的同名异物情况中英文对照表对在国际上规范药用草本植物名称及功用说明更是具有开创性的意义。书中药用植物名采用中英文对照的形式,加上药用草本植物的化学结构分析,用国际化的语言阐述草本植物的各个特性,可谓中西合璧,便于草本植物和中医药精神的进一步国际化。全书版式简洁,分类清楚,除为从事教育、医药、科研等方面的人士提供最新的参考资料外,亦可培养民众对中医药的兴趣及认识,普及中医知识和应用,是一套值得收藏的参考工具书。

丛书作者在行业内具有权威性,经验丰富,出版过多部中医药学等方面的中英文著作,在国际上具有广泛的影响力,其实力得到专业人士的认同。

《当代药用植物典》(简体版)荣获中国第七届(2007年度)输出版、引进版优秀图书奖。

定价:368.00元/册,全套定价1472元,订阅方式:邮局汇款。

汇款地址:北京市东城区东直门内南小街16号中国中药杂志社收,请注明书名(册)及订购数量,电话:010-64048925,联系人:程志铭。