

- [6] FU G, FANG Q, FENG B L, et al. Matrine-imprinted monolithic stationary phase for extraction and purification of matrine from *Sophorae flavescens* ait [J]. *J Chromatogr B*, 2011, 879(13/14): 894-900.
- [7] KAMEI J, XIAO P, OHSAWA M, et al. Antinociceptive effects of (+)-matrine in mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 1997, 337(2-3): 223-226.
- [8] LIU J Y, HU J H, ZHU Q G, et al. Effect of matrine on the expression of substance P receptor and inflammatory cytokines production in human skin keratinocytes and fibroblasts [J]. *Int Immunopharmacol*, 2007, 7(6): 816-823.
- [9] DAI Z J, GAO J, JI Z Z, et al. Matrine induces apoptosis in gastric carcinoma cells *via* alteration of Fas/FasL and activation of caspase-3 [J]. *J Ethnopharmacol*, 2009, 123(1): 91-96.
- [10] ZHANG L L, LI P, LI Y M, et al. Preparation and characterization of magnetic alginate-chitosan hydrogel beads loaded matrine [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2012, 38(7): 872-882.
- [11] HE X, WEI X C, TIAN Y C, et al. Advances in Synthesis and Biological Activity of Matrine and Its Derivatives [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2011, 28(9): 816-823
- [12] CHEN W Z, LIN Y, XIE W F. Research progress of matrine in the anti-tumor mechanism [J]. *J Oncol*(肿瘤学杂志), 2002, 8(1): 4-6.
- [13] WAN X Y, LUO M, LI X D, et al. Hepatoprotective and anti-hepatocarcinogenic effects of glycyrrhizin and matrine [J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2009, 181(1): 15-19.
- [14] LEI J H, JIANG H, CAI Y. Matrine inhibited proliferation of gastric cancer cells SGC-7901 [J]. *Clinical Engineering*(临床医学工程), 2011, 18(8): 1158-1160.
- [15] DAI Z J, GAO J, JI Z Z, et al. Matrine induces apoptosis in gastric carcinoma cells *via* alteration of fas/fasL and activation of caspase-3 [J]. *J Ethnopharmacol*, 2009, 123(1): 91-96.
- [16] LIU P. Researched the inhibitive mechanisms of growth and metastasis about matrine on human gastric carcinoma cell line SGC-7901 transplantation tumor in nude mice [D]. Chengdu: Zhongnan University, 2010.
- [17] WANG J X, WANG H, LV P T. Effect of matrine and oxymatrine on the drug resistance in human gastric cancer SGC7901/VCR cell line *in vitro* [J]. *Hebei Med J*(河北医药), 2012, 34(23): 3537-3539.
- [18] LI F E, ZHU L Q, YE H J, et al. Matrine-induced apoptosis and effect on telomerase activity in human gastric carcinoma cells SGC-7901 [J]. *Chin J Mod Med*(中国现代医学杂志), 2005, 15(12): 1809-1812.
- [19] GAO H. The clinical nurse how to prevent cytotoxic drugs [J]. *China Contem Med*(当代医学), 2010, 16(4): 106-107.
- [20] ZHU Z X, LIANG Q W. Preparation and release of matrine sustained-release tablets [J]. *Acad J Guangdong Coll Pharm*(广东药学院学报), 2008, 24(6): 569-571.
- [21] *Ch.P*(2010)Vol II(中国药典 2010 年版. 二部) [S]. 2010: 201-203.

收稿日期: 2013-01-21

## 甘草酸二铵脂质囊泡的体外经皮渗透研究

严俊, 王萍萍, 陈晓瑾\*, 任白鹭(杭州市儿童医院, 杭州 310014)

**摘要:** 目的 考察不同种类的甘草酸二铵(DG)脂质囊泡的体外经皮渗透情况, 并制备脂质囊泡凝胶剂。方法 分别采用非质子传递溶剂法制备磷脂复合物, 薄膜分散法制备柔性脂质体, 注入法制备醇质体, 并测定粒径; 采用改良的 Franz 扩散池, 以离体人皮进行经皮渗透实验; HPLC 测定接收液和皮肤组织中药物含量。最后, 将皮肤渗透性较好的囊泡处方制备成凝胶剂, 考察凝胶的经皮渗透情况。结果 DG 磷脂复合物 24 h 累计透过量为  $(8.07 \pm 5.42) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ , 其余处方透过量中均未检测到药物。24 h 药物在皮肤中的累积量大小顺序为磷脂复合物 > 醇质体 > 柔性脂质体 > 水溶液。DG 磷脂复合物凝胶透皮效果与卡波姆浓度有关, 0.5%卡波姆处方的皮肤中药物滞留量为 1%卡波姆处方的 2.2 倍, 降低卡波姆的浓度不但能提高 DG 在表皮层的含量, 而且还能使药物进一步渗透至真皮层。结论 磷脂复合物能显著促进 DG 在皮肤中的渗透, 并增加药物在皮肤中的蓄积。采用 0.5%卡波姆制备磷脂复合物凝胶具有较好的经皮渗透性。

**关键词:** 甘草酸二铵; 磷脂复合物; 醇质体; 柔性脂质体; 凝胶; 经皮渗透

中图分类号: R944.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2013)09-0977-04

## Study on Transdermal Permeation and Skin Accumulation of Diammonium Glycyrrhizinate Vesicular Carriers

YAN Jun, WANG Pingping, CHEN Xiaojin\*, REN Bailu(*Hangzhou Children's Hospital, Hangzhou 310014, China*)

基金项目: 杭州市卫生局项目(2009B021)

作者简介: 严俊, 女, 副主任药师 Tel: (0571)85463980 E-mail: yanjun@hz.cn \*通信作者: 陈晓瑾, 女, 硕士, 主管药师 Tel: (0571)85463948 E-mail: xiaojinchen@163.com

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To investigate the skin permeability of diammonium glycyrrhizinate from different vesicular carriers, and prepare vesicles gel. **METHODS** The phospholipid complex, entosome and elastic liposome of diammonium glycyrrhizinate were prepared by aprotic solvent method, film dispersing and ethanol injection method, respectively. Particle sizes of the vesicles were determined. Skin permeation experiments were carried out on modified Franz diffusion cells, using excised human skin. The concentrations of diammonium glycyrrhizinate in the receptor compartment and skin were determined by HPLC. Finally, vesicle with good skin permeability was prepared as a gel agent, and its skin permeation was also determined. **RESULTS** The quantity of diammonium glycyrrhizinate from phospholipid complex in the receptor was  $(8.07 \pm 5.42) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ , while others were negligible. The cumulative amounts of drug in the skin after 24 h were in the order of that: phospholipid complex > entosome > elastic liposome > water solution. Skin permeability of diammonium glycyrrhizinate phospholipid complex gel was affected by the concentrations of carbomer. The accumulation of diammonium glycyrrhizinate from phospholipid complex gel with 0.5% carbomer was 2.2 times higher than gel with 1% carbomer. Reduce the concentration of carbomer not only can improve glycyrrhizic acid content in the epidermis, but also make the drug to further penetrate into the dermis. **CONCLUSIONS** Phospholipid complex can significantly increase percutaneous penetration and skin cummulation of diammonium glycyrrhizinate. Phospholipid complex gel with 0.5% carbomer has a good percutaneous penetration. **KEY WORDS:** diammonium glycyrrhizinate; phospholipid complex; entosome; elastic liposome; gel; skin permeation

皮炎湿疹为临床常见的皮肤病之一，主要的病理改变表现为表皮明显增厚，真皮上部血管周围的淋巴细胞、组织细胞炎性浸润<sup>[1]</sup>。减轻真皮的炎症反应是治疗湿疹的有效措施。临床治疗上多采用糖皮质激素类药物，长期使用副作用大。经广泛的临床研究证实甘草酸二铵(diammonium glycyrrhizinate, DG)具有较强的抗炎作用，保护肝细胞膜，改善肝功能<sup>[2]</sup>，以及用于治疗皮炎、湿疹等皮肤疾病，疗效确切<sup>[3]</sup>。目前市售的甘草酸类制剂多为口服或静脉注射，全身给药既增加了不良反应的风险，对于慢性皮炎湿疹的长期治疗也带来不利影响。因此研制甘草酸局部皮肤用药制剂对于皮炎湿疹的治疗意义重大。

皮肤为人体天然的屏障，这种屏障性也造成局部/经皮(topical/transdermal, TT)给药中许多药物不能达到有效剂量。提高药物在皮肤中渗透性的方法有化学方法如采用促渗剂，物理方法如离子导入、电穿孔，也有药剂学手段如载体技术，制备成脂质体、传递体、醇质体等。载体技术是一种非入侵性(non-invasive)的提高物质通过皮肤的促渗透方法，始终在经皮给药系统的研究领域占有重要地位。本实验主要考察多种DG脂质囊泡的经皮渗透情况，筛选渗透性能最佳的囊泡处方。通过研制DG柔性脂质体、醇质体和磷脂复合物，并进行经皮渗透性能比较，最后将渗透性能最佳的囊泡处方制备成凝胶剂，为DG经皮制剂的开发提供实验参考。

## 1 仪器和材料

### 1.1 仪器

Agilent 1200高效液相色谱仪(美国Agilent公

司); DAD紫外检测器(美国Agilent公司); RE-2000旋转蒸发器(上海亚荣生化); SHZ-DIII循环水式真空泵(河南巩义市予华仪器); Nano-S90粒径测定仪(美国马尔文); 3000HS电位测定仪(美国马尔文); TT-6透皮扩散仪(天津正通科技有限公司)。

### 1.2 材料

DG(西安富捷药业有限公司); 注射用大豆磷脂(上海金伴药业有限公司); 人离体腹部皮肤(浙江医学高等专科学校解剖教研室提供); 乙醇、氯仿、二氧六环均为分析纯，甲醇、乙腈为色谱纯。

## 2 方法

### 2.1 DG脂质囊泡的制备

**2.1.1 DG磷脂复合物的制备** 通过前期课题研究已建立了成熟的磷脂复合物制备技术。将DG和磷脂按1:1比例分散在一定量的四氢呋喃溶媒中，持续搅拌加热，保持温度在50℃，反应至溶液澄清，减压挥干溶剂即得淡黄色DG磷脂复合物，加入PBS溶液后即得DG磷脂复合物悬液。

**2.1.2 DG柔性脂质体的制备** 采用薄膜分散法制备脂质体。将0.5 g磷脂溶解在5 mL氯仿中，旋转挥发使烧瓶底部呈一薄膜。精密称取0.25 g DG，加到25 mL PBS溶液中溶解，溶液倒入烧瓶中，50℃水化20 min，再超声10 min，即得DG柔性脂质体悬液。

**2.1.3 DG醇质体的制备** 采用注入法制备醇质体。将0.5 g磷脂溶解在7.5 mL乙醇中，密闭。精密称取0.25 g DG，溶解在17.5 mL水中。密闭条件下将DG水溶液以 $250 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度缓缓注入到含有磷脂的乙醇中，不断搅拌。注入完毕后继续搅拌30 min，得DG醇质体悬液。

## 2.2 粒径测定

将DG磷脂复合物、DG柔性脂质体、DG醇质体悬液分别用水稀释后测定粒径。

## 2.3 DG脂质囊泡凝胶剂的制备

将筛选得到的渗透性能好的囊泡处方制备成凝胶剂，以卡波姆940为凝胶基质。步骤：称取适量卡波姆940放入烧杯中，加水溶胀过夜。精密移取一定量DG囊泡悬液，加入到卡波姆中，加水至20 g，持续搅拌成凝胶。卡波姆940浓度为1%和0.5%。

## 2.4 体外经皮渗透试验

进行体外经皮渗透实验的DG脂质囊泡悬液和凝胶中DG含量均为1%。透皮实验具体步骤如下：取冷冻人体皮肤置于生理盐水中解冻，剪取合适大小固定在扩散池上，角质层面向上，真皮层面向下。接受室和供应室中均先加满生理盐水，电动搅拌速度为800 r·min<sup>-1</sup>，温度为37℃，每30 min更换一次生理盐水，2 h后接受室改用接受介质。在供应室中加入事先制备的样品，于2, 4, 8, 20, 22, 24 h取样1 mL，并立即补充等量新鲜接收液。24 h后取下皮肤，先用50%乙醇棉球擦拭皮肤表面5次，再用水清洗擦干。分离皮肤的表皮层和真皮层，分别剪碎，用10 mL 50%乙醇提取药物，于恒温振荡箱中振荡4 h，微孔滤膜过滤后用HPLC测定药物含量。

## 2.5 DG的测定

**2.5.1 HPLC 条件** 色谱柱：ODS HYPERSIL (4.60 mm×250 mm, 5 μm)；流动相：乙腈-水(0.5%冰醋酸)(55:45)；流速：0.8 mL·min<sup>-1</sup>；检测波长：250 nm；柱温：25℃；进样量：100 μL。在此条件下，DG的保留时间为7.5 min。

**2.5.2 标准曲线的绘制** 精密称取一定量DG对照品，流动相配制0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 μg·mL<sup>-1</sup>系列对照品溶液。在色谱条件下，依次进样，以X代表浓度(C)，Y代表峰面积(A)，进行线性回归，得标准曲线为： $Y=78.316X-4.0458$ ， $r=0.9995$ ，线性范围是0.25~8 μg·mL<sup>-1</sup>。回收率为99.3%，日内RSD为1.1%，日间RSD为2.3%。

## 3 结果

### 3.1 粒径测定结果

本实验制得的DG脂质囊泡均为纳米级别，其中磷脂复合物粒径最小，其次为柔性脂质体，醇质体粒径最大，约为磷脂复合物4.8倍。由PDI可知，

三种囊泡粒度分布都较为均匀，结果见表1。

表1 不同类型甘草酸二胺脂质囊泡的平均粒径

Tab 1 Mean particle sizes of lipid vesicles

囊泡类型	粒径/nm	多聚分散系数/PDI
柔性脂质体	126±13	0.202±0.029
醇质体	246±21	0.153±0.024
磷脂复合物	51±10	0.062±0.024

### 3.2 DG脂质囊泡透皮结果

以DG的水溶液为对照，比较柔性脂质体、醇质体和磷脂复合物的经皮渗透差异，从表1中可知，柔性脂质体和醇质体均能在一定程度上促进DG的经皮渗透，醇质体的促渗效果略佳。但是两者与磷脂复合物相比，后者的促渗效果更为明显。磷脂复合物处方可穿透皮肤进入透过液中，而其他3组均未能在透过液中检测到DG。磷脂复合物处方在皮肤中的含量是水溶液的18倍，柔性脂质体的5.5倍，醇质体的2.8倍。表皮中的药物含量醇质体处方最高，是磷脂复合物的3.7倍；真皮中则为磷脂复合物处方最高，为醇质体的11.5倍，有利于皮炎湿疹的治疗，结果见表2。

表2 DG在接收液和皮肤中的累积透过量(n=4)

Tab 2 Skin permeation and accumulation from different formulations of DG(n=4)

处方	累计透过量/ μg·cm <sup>-2</sup>	表皮层/ μg·cm <sup>-2</sup>	真皮层/ μg·cm <sup>-2</sup>	全皮/ μg·cm <sup>-2</sup>
水溶液	忽略	21.15±4.36	11.11±2.87	28.53±9.50
柔性脂质体	忽略	53.44±21.25	36.90±22.45	94.07±23.27
醇质体	忽略	148.56±16.74	33.49±7.13	182.05±14.83
磷脂复合物	8.07±5.42	40.11±10.63	384.84±255.09	514.31±189.83

### 3.3 凝胶剂透皮结果

甘草酸二胺磷脂复合物制备成凝胶后，渗透性能降低，0.5%卡波姆处方的皮肤中药物滞留量为1%卡波姆处方的2.2倍。降低卡波姆的浓度不但能提高DG在表皮层的含量，而且还能使药物进一步渗透至真皮层，结果见表3。

表3 DG磷脂复合物凝胶的透皮实验结果(n=4)

Tab 3 Skin permeation and accumulation from gels(n=4)

处方	累计透过量/ μg·cm <sup>-2</sup>	表皮层/ μg·cm <sup>-2</sup>	真皮层/ μg·cm <sup>-2</sup>	全皮/ μg·cm <sup>-2</sup>
1%卡波姆	忽略	50.08±4.95	忽略	50.08±4.95
0.5%卡波姆	忽略	69.29±33.84	15.38±2.58	107.89±35.24

#### 4 讨论

脂质体是应用最早的经皮给药微粒载体。众多研究显示,脂质体只能增加药物在角质层或上层皮肤的蓄积,难以进入皮肤深部和血液循环。柔性脂质体是在脂质体基础上加入了一种能增加脂质双分子层流动性的“边缘活性剂”,如胆酸钠、吐温等表面活性剂。柔性脂质体具有高度柔韧性和变形性,可以完整地穿过角质层中比自身小数倍的孔道进入皮肤深处,提高药物在皮肤中的含量<sup>[4-5]</sup>。本实验中柔性脂质体处方不仅提高了DG在表皮层中的含量,真皮中的蓄积量也明显提高,皮肤中总含量为水溶液的3.3倍。在本实验中,DG既是为边缘活性剂,又是治疗药物。

醇质体是乙醇和磷脂组成的具有脂质双分子层结构的纳米囊泡,醇质体不同于脂质体之处在于囊泡中含有较高浓度的乙醇。高浓度的乙醇使得囊泡的脂质双分子层柔韧性增加,并且相变温度降低,从而存储于角质层脂质中,破坏脂质双分子层,促进药物渗透进入皮肤深部或血液循环<sup>[6-7]</sup>。本实验中,醇质体处方表皮层的含量最高,提示高浓度乙醇使得DG在角质层储存显著增加,为水溶液的7.0倍,真皮层中的含量与柔性脂质体接近。

磷脂复合物中磷脂与药物是通过氢键或范德华力结合而成,分散在水中类似于脂质体的多层囊泡,而体积比脂质体小很多。相对于脂质体中药物的物理包含,磷脂复合物形成的载药体系更为稳定<sup>[8-9]</sup>。已有研究显示,磷脂复合物可促进葛根素、黄芩苷、白藜芦醇等多种天然药物的经皮渗透<sup>[10-12]</sup>。DG磷脂复合物经皮渗透性能优于柔性脂质体和醇质体,特别是在真皮层和接收液中。磷脂复合物处方中DG在真皮层中的滞留量分别是柔性脂质体和醇质体的10.4倍和11.5倍,而且仅磷脂复合物处方DG可以在皮肤接收液中测得。分析原因可能有两点:①本实验所得的磷脂复合物粒径仅为50 nm,有利于穿过角质层脂质间隙<sup>[13]</sup>。②一般药物形成磷脂复合物后脂溶性明显增强,熔点、吸收系数、光谱特征等会明显变化<sup>[14]</sup>。因此本实验中磷脂复合物很大程度上改善了DG极性大的缺点,使其脂溶性增加,有助于透过脂性细胞

膜。磷脂复合物制成凝胶后渗透性降低,主要由于凝胶中药物进入皮肤还需要经过药物从凝胶中溶出、扩散等过程。凝胶中药物的渗透性与凝胶强度有关,实验结果显示凝胶强度降低有利于药物从凝胶中的释放。

#### REFERENCES

- [1] HUA W X, WANG J B, ZHANG Y L. Comparative study on pathological and clinical diagnosis of dermatitis(eczema) [J]. China Pract Med(中国实用医药), 2007, 2(4): 80-81.
- [2] CHEN N X, CHEN X J. Preliminary stability study of diammonium glycyrrhizinate phospholipid complex injection [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2012, 29(6): 520-523.
- [3] LIU P, CHEN X M, WANG D Y, et al. The observation on the effect of diammonium glycyrrhizinate injection in the treatment of psoriasis vulgaris, eczema and dermatitis [J]. Chin J Derm Venereol(中国皮肤性病学杂志), 2003, 17(2): 106-107.
- [4] BOUWSTRA J A, GRAAFF A, GROENINK W, et al. Elastic vesicles: interaction with human skin and drug transport [J]. Cell Mol Biol Lett, 2002, 7(2): 222-223.
- [5] JAIN S K, GUPTA Y, JAIN A, et al. Enhanced transdermal delivery of acyclovir sodium via elastic liposomes [J]. Drug Deliv, 2008, 15(3): 141-147.
- [6] ELASYED M M, ABDALLAH O Y, NAGGAR V F, et al. Deformable liposomes and ethosomes: mechanism of enhanced skin delivery [J]. Int J Pharm, 2006, 322(1-2): 60-66.
- [7] DUBEY V, MISHRA D, DUTTA T, et al. Dermal and transdermal delivery of an anti-psoriatic agent via ethanolic liposomes [J]. J Control Release, 2007, 123(2): 148-154.
- [8] SHI Y J, WU P J, XU R C, et al. Basic property of baicalin-phospholipid complex [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2012, 43(1): 78-80.
- [9] SONG Y, ZHUANG J, GUO J, et al. Preparation and properties of a silybin-phospholipid complex [J]. Pharmazie, 2008, 63(1): 35-42.
- [10] TIAN H, WANG Y J, PENG S J, et al. Study on the permeation properties of resveratrol phospholipid complex through rat skin *in vitro* [J]. West China J Pharm Sci(华西药理学杂志), 2011, 3: 261-263.
- [11] LIN Y N, ZHAO H R, CAI X C. Preparation and skin permeation of baicalin in different carrier systems [J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2010, 30(21): 1855-1857.
- [12] CHEN X, ZHANG N, DONG X D, et al. Study on the time-effect relationship of phytosomes of baicalin in anti-inflammatory effect [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2007, 24(5): 359-362.
- [13] VERMA D D, VERMA S, BLUME G, et al. Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin [J]. Int J Pharm, 2003, 258(1/2): 141-151.
- [14] LIN P X, SHANG X, WANG F S, et al. Recent research on phospholipid complex [J]. Chin Pharm J(中国药理学杂志), 2005, 40(6): 401-402.

收稿日期: 2013-03-05