

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00763

甘草次酸醇质体水凝胶贴剂的制备与透皮给药研究

闫菁华¹, 豆婧婧¹, 徐坤¹, 陈贵¹, 惠先¹, 鞠大宏², 郝保华^{1*}

1. 西北大学生命科学学院中药学教研室, 西安 710069
2. 中国中医科学院中医基础理论研究所, 北京 100700

[摘要] **目的** 探讨甘草次酸醇质体水凝胶贴剂的制备方法, 并考察其体外透皮给药的规律与特点。**方法** 注入法制备甘草次酸醇质体, 考察其包封率、粒径与表面电位, 再制备成水凝胶贴剂; 采用改良 Franz 立式扩散池, HPLC 法测定甘草次酸含量, 评价甘草次酸醇质体水凝胶贴剂的体外透皮给药规律与特点。**结果** 甘草次酸醇质体外观为圆球形或椭球形, 具有层状结构; 其对于甘草次酸的包封率为 $(75.63 \pm 1.86)\%$, 粒径为 (106.2 ± 20.54) nm, 表面电位为 (-41.3 ± 2.8) mV。与甘草次酸水凝胶贴剂比较, 甘草次酸醇质体水凝胶贴剂的透皮给药速率与累积渗透量高于甘草次酸水凝胶贴剂, 24 h 时甘草次酸醇质体水凝胶贴剂的累积渗透量是甘草次酸水凝胶贴剂的 5.55 倍, 二者之间差异有统计学意义 (t -test, $P < 0.01$)。**结论** 甘草次酸制备成醇质体后能够显著提高水凝胶贴剂的透皮给药效果, 表明醇质体水凝胶贴剂是甘草次酸透皮给药的一个理想的载体。

[关键词] 甘草次酸; 醇质体; 水凝胶贴剂; 皮肤给药

[中图分类号] R 943.43 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)07-0763-04

Preparation and *in vitro* percutaneous permeation profile of glycyrrhetic acid ethosome hydrogel patch

YAN Jing-hua¹, DOU Jing-jing¹, XU Kun¹, CHEN Gui¹, HUI Xian¹, JU Da-hong², HAO Bao-hua^{1*}

1. Department of Traditional Chinese Herbs, School of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069, Shaanxi, China
2. Institute of Basic Theory of Traditional Chinese Medicine, China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700, China

[Abstract] **Objective** To explore the preparation method of glycyrrhetic acid ethosome (GAE) hydrogel patch and to evaluate its characteristics during *in vitro* transdermal drug delivery. **Methods** GAE was prepared by ethanol infusion method, and its entrapment efficiency, size and surface potential were investigated. Then GAE was used to prepare the hydrogel patch. The amount of penetrated glycyrrhetic acid was determined by HPLC on modified Franz diffusion cells, and then the *in vitro* transdermal drug delivery of the prepared hydrogel patch was evaluated. **Results** GAE had a spherical or ellipsoidal appearance and a layered structure, with an encapsulation efficiency of $(75.63 \pm 1.86)\%$, a particle size of (106.2 ± 20.54) nm, and a surface potential of (-41.3 ± 2.8) mV. The percutaneous delivery rate and accumulative infiltration quantity of GAE hydrogel patch were significantly higher than those of glycyrrhetic acid hydrogel patch. The 24 h accumulative infiltration quantity of GAE hydrogel patch was 5.55 times that of the glycyrrhetic acid hydrogel patch (t -test, $P < 0.01$). **Conclusion** Compared with glycyrrhetic acid, GAE can significantly improve the *in vitro* transdermal delivery of hydrogel patch, demonstrating that ethosome hydrogel patch might be an ideal vector for transdermal delivery of glycyrrhetic acid.

[Key words] glycyrrhetic acid; ethosome; hydrogel patch; cutaneous administration

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(7):763-766]

甘草(glycyrrhiza)是多年生草本植物, 属豆科甘草属, 具有益气健脾、清热解毒、止痛和调和诸药之功效。甘草次酸(glycyrrhetic acid, GA)为甘草的主要活性成分, 具有明显的抗炎、抗菌、抗病毒、保护肝细胞与免疫调节等多方面的药理活性^[1]。对于局

部炎症如静脉炎有较好效果, 还可以用于治疗慢性肝炎及肝癌等; 但其口服与肌注给药效果较差。

水凝胶贴剂是采用亲水性高分子材料、保湿剂、交联剂等与药物混合而形成的空间网状充水交联体结构, 具有载药量大、无刺激、无致敏、含液体量大、利

[收稿日期] 2011-04-02 **[接受日期]** 2011-05-13

[基金项目] 陕西省教育厅产业化中试项目(2010jc20), 国家重大新药创制科技重大专项(2009ZX09502-019)。Supported by the Industrialization Pilot Project of Education Department of Shaanxi Province(2010jc20) and Foundation for National Significant New Drug Innovation Program(2009ZX09502-019).

[作者简介] 闫菁华, 硕士生。E-mail: vooca@163.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 029-81970519, E-mail: haobaohua@126.com

于药物释放和透皮吸收等优点。醇质体具有药物包封率高、稳定性好、脂质体膜变形性高以及易于携带药物穿过皮肤黏膜的特性,成为近年来透皮给药的一个新技术^[2]。但其作为局部给药制剂时,常因液体制剂临床给药不便而被限制利用。本实验将甘草次酸制备成醇质体水凝胶贴剂,并考察了其体外透皮给药特性。

1 仪器和试剂

1.1 仪器 JEM-2000EX 透射电子显微镜(日本电子公司);激光动态散射仪 Zetasizer nanos ZEN3600(英国 Malvern 公司);78-1 型磁力加热搅拌器(江苏省金坛市正基仪器有限公司);岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪;YP-5001 电子精密天平(上海良平仪器仪表有限公司);TK-6A 型扩散池(嘉定偕凯科技贸易公司);TGL-16B 离心机(上海安亭科学仪器有限公司);RE-52AA 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);FY200 高速分散匀质机(上海仪器厂)。

1.2 药品和试剂 GA(纯度≥98%,西安小草植物科技有限责任公司);大豆卵磷脂(天津市博迪化工有限公司);维生素 E (Vit E,浙江医药股份有限公司新昌制药厂);小鼠购自西安交通大学医学院;甲醇(Sigma,色谱醇),其他试剂均为分析纯;0.22 μm 的微孔滤膜(上海新亚药业有限公司)。

2 方法和结果

2.1 醇质体的制备 采用注入法制备 GA 醇质体。称取磷脂 3.0 g、GA 500 mg 和 Vit E 30 mg 溶于 16 ml 的无水乙醇,置于密封锥形瓶中,置于磁力搅拌器上持续搅拌,缓慢加入 34 ml 蒸馏水,继续搅拌 10 min,通过 0.22 μm 聚四氟乙烯滤膜过滤即得,4℃ 保存^[3]。

2.2 醇质体的理化性质

2.2.1 外观形态 将 GA 醇质体稀释至适当的倍数,用磷钨酸复染色法复染,置于透射电子显微镜下观察样品的大小及形态,结果见图 1。甘草次酸醇质体外观为球形或椭球形,内部具有层状结构。

2.2.2 粒径分布与表面电位 取 GA 醇质体 5 ml,经蒸馏水适当稀释,用激光动态散射仪测定粒径与 Zeta 电位。结果(图 2)显示,醇质体的粒径峰为一对称的单峰,大小分布均匀,其粒径为(106.2±20.54) nm,与透射电镜观察的结果基本吻合。甘草次酸醇质体荷电性为负电荷,电位为(-41.3±2.8) mV(图 3)。

2.2.3 稳定性测定 (1) 酸值(AV):分别取 4℃、25℃、40℃ 贮存条件下醇质体 1.0 g 于碘瓶中,加入无水乙醇 10 ml,摇匀,加入酚酞指示剂 2 滴,用标准 NaOH 溶液滴定至溶液为粉红色,按下式计算酸值:

$AV = N \times F \times V \times 56.1 / G$ 。其中, N 为 NaOH 的浓度($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); F 为 NaOH 的校正系数($F = 1.0008$); V 为消耗的 NaOH 体积(ml); G 为样品的质量(g); 56.1 为 NaOH 与磷脂水解产生的酸性物质的换算因子。

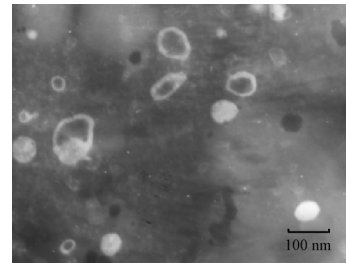


图 1 甘草次酸醇质体在电镜下的形态

Fig 1 Morphology of glycyrrhetic acid ethosomes under transmission electron microscope

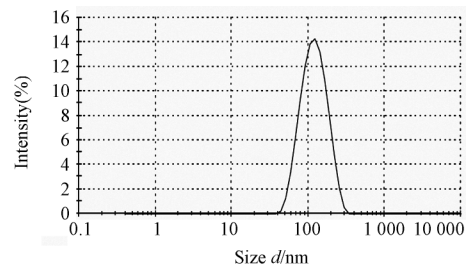


图 2 粒径分布图

Fig 2 Particle size distribution

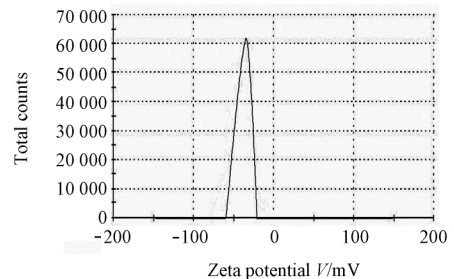


图 3 表面电位图

Fig 3 Particle surface potential

结果表明,随着温度的升高,GA 醇质体的酸值增大幅度不明显(t -test, $P > 0.05$)。见图 4。

(2) 过氧化值(POV):分别取 4℃、25℃、40℃ 贮存条件下的醇质体 1.0 g 于碘瓶中,加入醋酸-氯仿($V:V = 3:2$) 5 ml 溶解,加入饱和碘化钾试液 2 滴,盖好,加水密封,置暗处放置 45 min;滴定前加水 15 ml 和淀粉指示液 1 ml,用标准 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液滴定至溶液为无色,按下式计算过氧化值: $POV = N \times F \times V \times 103 / G$ 。其中, N 为 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 的浓度($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); F 为 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 的校正系数($F = 1.0458$); V 为

消耗的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液的体积 (ml); G 为样品的质量 (g); 103 为 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 与氧化产物的换算因子。

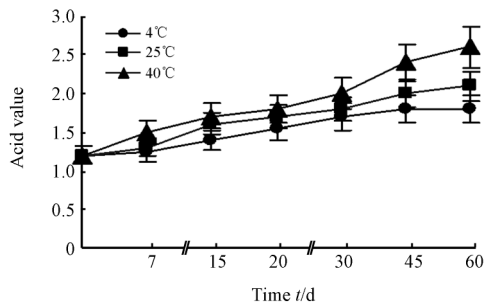


图4 不同温度下甘草次酸醇质体的酸值

Fig 4 Acid value of glycyrrhetic acid ethosomes at different temperatures

$n=3, \bar{x} \pm s$

GA 醇质体在 40°C 时过氧化值升高较快, 25°C 时贮存时 POV 值有一定增大; 4°C 放置 60 d 时, POV 值无较大变化。且在 10 d 内各组过氧化值两两比较差异无统计学意义 (t -test, $P > 0.05$), 故实验制备醇质体于 4°C 保存, 稳定性较好。见图 5。

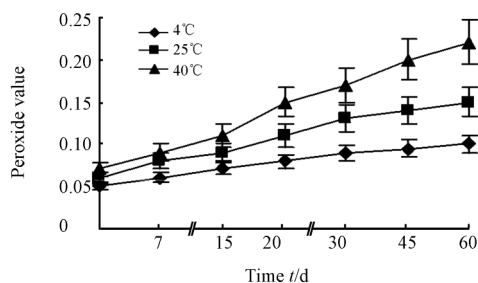


图5 不同时间下甘草次酸醇质体的过氧化值

Fig 5 Peroxide value of glycyrrhetic acid ethosomes at different time points

$n=3, \bar{x} \pm s$

2.3 包封率测定 将新制备的 GA 醇质体在低温离心机中 $8\ 055 \times g$ 离心 2 h, 吸取上清液用体积分数 32% 乙醇稀释 100 倍, 按 2.1 项下方法测定甘草次酸含量, 根据标准曲线计算上清液中 GA 的浓度 (ρ), 再根据下式计算包封率: 包封率 (%) = $(\rho_{\text{总}} - \rho) / \rho_{\text{总}} \times 100\%$, 其中 $\rho_{\text{总}}$ 为甘草次酸的总浓度。

测定 3 批醇质体的包封率, 分别为 $(75.84 \pm 2.25)\%$ 、 $(76.79 \pm 1.68)\%$ 、 $(74.26 \pm 1.53)\%$, 平均包封率为 $(75.63 \pm 1.86)\%$ 。

2.4 醇质体水凝胶贴剂的制备 量取 8 ml 的甘油, 依次加入 0.04 g 的甘羟铝, 0.008 g 的 EDTA, 0.95 g 的聚丙烯酸钠 NP-700 和 0.74 g 的聚乙烯吡咯烷酮 K-90, 搅拌均匀得 A 相; 然后称取 0.066 g 酒石酸溶解于 2 ml 水作为 B 相; 然后将 A 相加入 B 相

中, 搅拌均匀, 再加入 2.1 项下制的醇质体溶液 1 ml, 混合均匀后涂布于背衬材料上, 熟化, 加盖聚乙烯膜。即得 GA 乙醇 (32%) 溶液水凝胶贴剂、GA + 空白醇质体水凝胶贴剂、GA 醇质体水凝胶贴剂、GA 水凝胶贴剂 4 组水凝胶贴剂。

同上制得 A 相加入 B 相中, 搅拌均匀后, 分别加入 GA 乙醇 (32%) 1 ml 溶液, GA 空白醇质体 1 ml 溶液, GA 水溶液 1 ml 混合均匀后涂布于背衬材料上, 熟化, 加盖聚乙烯膜, 即得 GA 与空白醇质体混合物贴剂。上述制备各组贴剂其 GA 含量均为 $10\ \text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。

2.5 HPLC 法测定 GA 含量

2.5.1 色谱条件 Shim-pack VP-ODS C_{18} 色谱柱 ($5\ \mu\text{m}$, $150\ \text{mm} \times 4.6\ \text{mm}$), 流动相为甲醇-水-冰醋酸 (体积比, 89:10:1), 流速为 $0.5\ \text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长为 250 nm, 进样量为 $20\ \mu\text{l}$, 柱温为 30°C。在此条件下甘草次酸对照品与空白辅料色谱峰得到较好分离, 专属性良好, 方法可行。GA 醇质体水凝胶贴剂色谱图及标准品色谱图见图 6。

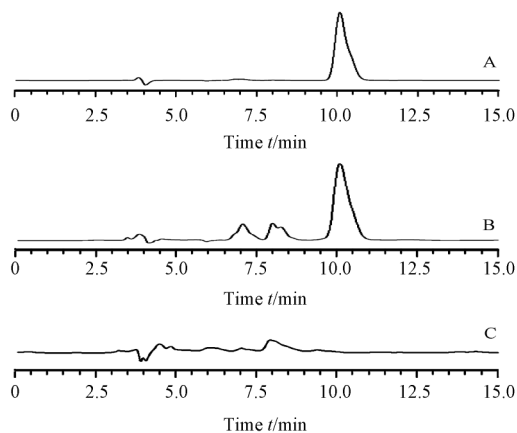


图6 甘草次酸液相色谱图

Fig 6 HPLC chromatograms of glycyrrhetic acid

A: Glycyrrhetic acid; B: Sample solution; C: Blank solution

2.5.2 标准曲线的制备 取 GA 对照品 10.0 mg, 精密称定; 置于 50 ml 量瓶中, 甲醇溶解并定容, 得 GA 储备液。精密吸取上述储备液 0.1、0.2、1.0、2.0、4.0、8.0 ml 分别置于 20 ml 量瓶中, 甲醇定容, 得到系列浓度 (C) 对照品溶液。按 2.5.1 项下色谱条件分别进样, 记录峰面积 (A)。以 A 对 C 进行回归, 回归方程: $A = 51\ 026C - 9\ 600.1$ ($r = 0.999\ 5$), 在 $1.00 \sim 80.00\ \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 范围内呈良好线性关系。

2.5.3 方法学考察 (1) 精密度实验: 取对照品溶液, 按 2.5.1 项下色谱条件测定, 重复进样 6 次, 以甘草次酸的峰面积计算, 其 $\text{RSD} = 2.63\%$ 。

(2) 稳定性实验: 取对照品溶液分别在 0、2、4、6、8、10 h 进样, 其 $\text{RSD} = 1.5\%$, 结果表明, 溶液至少

在 10 h 内稳定。

(3) 回收率实验:精密量取 5 份已知含量的样品 2.5 ml,置于 50 ml 量瓶中,再分别精密加入质量浓度为 $0.080\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ GA 对照品溶液 2.5、2.5、5.5、7.5、7.5 ml,用体积分数 32% 乙醇稀释至刻度,混合均匀;将样品低温离心机中 ($8\ 055 \times g$) 离心 2 h,吸取上清液 $20\ \mu\text{l}$ 注入高效液相色谱仪测定,得平均回收率为 $(99.86 \pm 0.96)\%$ 。

2.6 体外经皮渗透实验 取健康昆明种小鼠,脱颈处死,剥取腹部皮肤,除毛发及去皮下脂肪,用蒸馏水冲洗干净;将处理好的小鼠皮肤置 Franz 立式扩散池上(有效扩散面积为 3.14 cm^2),将皮肤角质层朝向供给池。在接收池注入 19.0 ml 磷酸盐缓冲液 ($\text{pH}=7.0$) 为接收液,接收池置于磁力搅拌器上,以 300 转/分搅拌,并保持在 32°C 水浴。将醇质体水凝胶贴剂、GA 乙醇(32%)溶液水凝胶贴剂,GA+空白醇质体水凝胶贴剂、GA 水凝胶贴剂贴于小鼠皮肤上。分别于 0.5、1、2、4、6、8、12、24 h 时间点取样 0.5 ml,并及时补充等量新鲜接收液。样品经 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤后,取 $20\ \mu\text{l}$ 注入高效液相色谱仪进行分析,测定峰面积,代入标准曲线求出药物浓度,计算累积渗透量和透皮速率。根据每个取样点样品的浓度,依下式计算单位面积累积渗透量 Q:

$$Q = (C_n V + V_0 \sum_{i=1}^{n-1} C_i) / A$$

其中, C_n 和 C_i 分别为第 n 、 i 个取样点测得的药物浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), V 和 V_0 分别为接收池体积和取样体积 (ml), A 为渗透面积 (cm^2)。

GA 醇质体与其他样品组水凝胶贴剂累积渗透量结果见图 7,GA 醇质体水凝胶贴剂 24 h 累积渗透量为 $3\ 037.38\ \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$,24 h 的渗透速率为 $126.56\ \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$,是 GA 水凝胶贴剂 5.55 倍,GA 乙醇(32%)溶液水凝胶贴剂的 3.47 倍,GA+空白醇质体水凝胶贴剂的 1.86 倍,促渗效果明显。差异均具有统计学意义 (t -test, $P < 0.01$)。

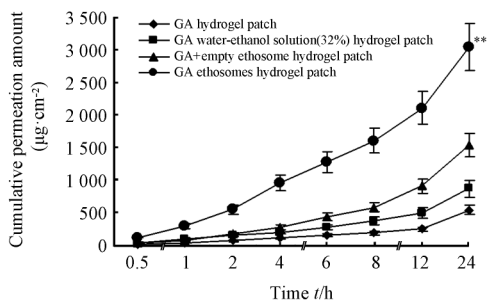


图 7 醇质体与其他样品组水凝胶贴剂的经皮渗透曲线

Fig 7 Cumulative penetration curves of glycyrrhetic acid penetration through mouse skin in different groups

** $P < 0.01$ vs the other 3 groups; $n=3, \bar{x} \pm s$

3 讨论

醇质体 (ethosome) 是一种含醇新型脂质体,其透过皮肤和黏膜的能力较强^[2,4],是近年来透皮给药领域研究的热点。本实验首次将 GA 醇质体与水凝胶贴剂结合进行透皮给药的相关研究,避免了醇质体混悬液易于流动、给药不便的弊端。稳定性试验表明,在普通条件 (25°C) 下贮存醇质体,60 d 之内 AV 值与 POV 值增大幅度均不明显,特别是在低温 (4°C) 下储存,醇质体稳定性较高。

体外透皮实验表明,本实验制备的 4 种贴剂中,空白醇质体水凝胶贴剂和乙醇(32%)水凝胶贴剂与 GA 水凝胶贴剂比较,在一定程度上促进了 GA 的透皮吸收,且前者略高于后者;而 GA 醇质体水凝胶贴剂中 GA 的促透效果显著优于 GA 与空白醇质体混合物制备贴剂中 GA 的促透效果,能极大地增加甘草次酸的透皮速率和累积透过量。这可能是由于载药醇质体提供了外源性脂质双层膜,使角质细胞间结构改变,由紧密有序结构变为紊乱的无序结构,从而降低角质层的障碍促进药物透过皮肤^[5];还可能溶解在醇质体磷脂层中高浓度的乙醇可增强膜的柔性和流动性,使其在传递过程中发生变形,更易通过比其更小的间隙,透过紊乱的角质层,增强了渗透能力,从而使 GA 的累积透过量显著增加^[4,6]。

[参考文献]

- [1] 金敏,吴红金.甘草次酸药理作用的研究进展[J].医学综述,2009,15:1712-1715.
- [2] 李理宇,王洪权.新型经皮给药载体——醇质体的研究进展[J].中国新药杂志,2010,19:33-38.
- [3] 杨飞,李芳,焦海胜,邱雯,张鸿燕,赵慧,等.秋水仙碱醇质体的制备及体外经皮渗透研究[J].中国药学杂志,2009,44:349-352.
- [4] Godin B, Touitou E. Ethosomes: new prospects in transdermal delivery[J]. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 2003, 20: 63-102.
- [5] Paolino D, Luciani G, Mardente D, Alhaique F, Fresta M. 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 Contr Rel, 2005, 106: 99-110.
- [6] Zhaow Z, Xiaoli W, Yangde Z, Nianfeng L. Preparation of matrine ethosome, its percutaneous permeation *in vitro* and anti-inflammatory activity *in vivo* in rats[J]. J Liposome Res, 2009, 19: 155-162.
- [7] 刘晓昱,饶跃峰,梁文权. 决雌醇醇质体凝胶的经皮渗透研究[J]. 中国药学杂志, 2006, 41: 284-286.
- [8] 刘婷,甄小龙,程昊,李伟泽,郝保华. 银杏内酯 B 柔性纳米脂质体的制备及体外透皮研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34: 2181-2183.
- [9] Manosroi A, Jantrawut P, Manosroi J. Anti-inflammatory activity of gel containing novel elastic niosomes entrapped with diclofenac diethylammonium[J]. Int J Pharm, 2008, 360: 156-163.

[本文编辑] 尹茶