

熊果酸纳米混悬凝胶剂的制备及其体外透皮研究

钦富华¹, 俞佳丹¹, 计竹娃¹, 蔡雁²

(1. 浙江医药高等专科学校, 浙江 宁波 315100; 2. 宁波市第九医院 药剂科, 浙江 宁波 315020)

摘要: 目的 制备熊果酸纳米混悬凝胶剂(UA-NS-gel), 并考察其体外透皮性能。方法 采用反溶剂沉淀联合高压均质法制备 UA-NS, 再以卡波姆 940 为基质制成凝胶剂(UA-NS-gel); 采用 Franz 扩散池法进行体外透皮试验, 比较 UA-NS-gel 和熊果酸凝胶剂(UA-gel) 的体外经皮渗透量及滞留量。结果 UA-NS-gel 24 h 药物经皮渗透量为 $(104.40 \pm 6.48) \mu\text{g}/\text{cm}^2$, 明显高于 UA-gel 的 $(28.56 \pm 2.16) \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($P < 0.01$); UA-NS-gel 皮肤滞留量为 $(138.08 \pm 19.39) \mu\text{g}/\text{cm}^2$, 高于 UA-gel 的 $(70.51 \pm 14.77) \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($P < 0.05$)。结论 将熊果酸制成纳米混悬凝胶剂, 能够有效地增加药物的皮肤渗透性能和皮肤的滞留量。

关键词: 熊果酸; 纳米混悬剂; 凝胶; 经皮渗透

中图分类号: R944.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 2096-3653(2017)03-0285-05

DOI: 10.16809/j.cnki.2096-3653.2016122201

Study on preparation and *in vitro* transdermal penetration of nanosuspension-based gel of ursolic acid

QIN Fuhua¹, YU Jiadan¹, JI Zhuwa¹, CAI Yan²

(1. Zhejiang Pharmaceutical College, Ningbo 315100, China; 2. Ningbo Municipal Ninth Hospital, Ningbo 315020, China)

Abstract: Objective To prepare a nanosuspensions-based gel of ursolic acid (UA-NS-gel) and investigate the *in vitro* transdermal penetration characteristics. **Methods** UA-NS was prepared by anti-solvent precipitation and high pressure homogenization method and then transformed into gel with carbopol 940 as support base. The cumulative permeation amount and the amount of drug in the skin of UA-NS-gel were assessed by Franz-diffusion and compared with UA conventional hydrogel (UA-gel). **Results** The amount of UA permeated through the skin and in the skin after applying UA-NS-gel for 24 h were $(104.40 \pm 6.48) \mu\text{g}/\text{cm}^2$ and $(138.08 \pm 19.39) \mu\text{g}/\text{cm}^2$, which were significantly higher than UA-gel of $(28.56 \pm 2.16) \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($P < 0.01$) and $(70.51 \pm 14.77) \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($P < 0.05$), respectively. **Conclusion** The UA-NS-gel has the ability to increase the transdermal penetration and drug concentration in the skin.

Key words: ursolic acid; nanosuspension; gel; transdermal penetration

熊果酸(ursolic acid, UA)是存在于山楂、枇杷叶等植物中的一种香树脂醇型五环三萜类化合物,具有抗感染、抗病毒、抑菌、抗肿瘤等多种生物活性^[1-3],特别是抗肿瘤活性近年来受到深入和系统的研究。熊果酸可抑制乳腺癌 MCF-7 及 SK-BR-3 细

胞增殖,通过影响 *Bax*、*Bcl-2*、*p53* 等基因的表达来诱导乳腺癌细胞的凋亡^[4-5],可用于乳腺癌的防治。国内也已有抗肿瘤熊果酸纳米脂质体的开发^[6],但熊果酸溶解性差,水中基本不溶,溶出困难,口服生物利用度低,其成药性差,极大地影响了疗效发挥。

收稿日期: 2016-12-22

基金项目: 宁波市科技创新团队项目(2015C110027); 浙江省大学生科技创新活动计划项目(2016R435001)

作者简介: 钦富华(1981—),男,副教授,从事药物制剂新剂型和新技术研究,Email: qinfh@mail.zjpc.net.cn。

网络出版时间: 2017-06-08 15:12 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1413.R.20170608.1512.025.html>

纳米混悬凝胶(NS-gel) 是纳米混悬液与凝胶相结合的新体系^[4], 结合了纳米混悬剂和凝胶剂各自的特点。难溶性药物制成纳米混悬剂, 可提高溶解度和溶出度^[7-8], 纳米级的尺寸能提高药物的渗透性能; 将纳米混悬剂制备成凝胶可提高纳米混悬剂的稳定性, 同时具有涂布性好、黏附性好、皮肤刺激性小、局部给药后易吸收等优点^[9-10]。本研究将熊果酸制成纳米混悬凝胶, 以期提高其经皮渗透性能, 使熊果酸可以直接作用于乳腺部位而充分发挥治疗乳腺癌的作用。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent1260 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司, 包括 G1312B 二元泵, G1315D DAD 检测器, G1329B 进样器, G1316A 柱温箱, G1322A 脱气机); Zetasizer Nano ZS90 纳米粒径电位分析仪(英国马尔文公司); S-3400N 型扫描电子显微镜(日本日立公司); 超纯水机(美国密理博公司); SECRURA 125-1CN 电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司); APV-2000 高压均质机(苏州微流生物科技); FJ-200 高速分散均质机(上海标本模型厂); JY92-2D 超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技有限公司); TK-12B 透皮扩散试验仪(上海锴凯科技有限公司); TGL-16B 离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.2 试剂

熊果酸对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 11807-200205); 熊果酸原料(西安华瑞生物工程有限公司, 批号: 20160920, 质量分数>98%); 泊洛沙姆 407(德国巴斯夫公司, 批号: WPII574B); 泊洛沙姆 188(德国巴斯夫公司, 批号: WPCI514B); 十二烷基硫酸钠(国药集团化学试剂有限公司, 批号: 20160309); 二甲基亚砜(北京百灵威科技有限公司); 三乙醇胺(天津市永大化学试剂有限公司); 丙二醇(国药集团化学试剂有限公司); 卡波姆-940(广州博峰化学有限公司); 乙腈为色谱纯, 水为超纯水, 其余试剂均为分析纯。

1.3 动物

健康 SD 大鼠, 雄性, 体质量(250 ± 20) g, 浙江省医学科学院浙江省实验动物中心, 合格证号: SCXK(浙) 2003-0001。

2 方法与结果

2.1 熊果酸纳米混悬液(UA-NS) 的制备

采用反溶剂沉淀联合高压均质法制备 UA-NS:

称取 300 mg UA 溶于 1.5 mL 二甲亚砜; 将稳定剂分散于 60 mL 水中作为反溶剂, 于高速分散均质机(8 000 r/min) 中边剪切边用注射器将二甲亚砜溶液缓慢注入到反溶剂中, 均质 5 min 即得不同稳定剂体系的 UA 纳米晶初混悬液; 将初混悬液在高压均质机中进一步均质, 得 UA-NS。

2.1.1 稳定剂的筛选 固定有机相中药物质量浓度及反溶剂中稳定剂的质量浓度(0.4%), 制备纳米晶初混悬液, 以粒径大小及其多分散指数(PDI) 考察稳定剂 SDS、Tween80、P188、PVP 对 UA 纳米晶初混悬液稳定性的影响, 见图 1。结果显示, P188 作为稳定剂的效果最好, 平均粒径在 300 nm 左右, 但是 PDI 指数相对较大(>0.3), 表明粒子大小的均一性不够理想。考虑通过高压均质处理提高粒子的均一性, 并进一步降低其粒径大小。

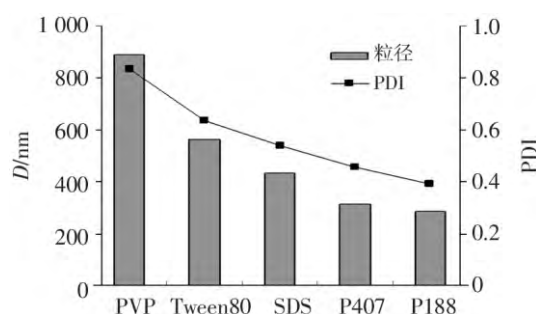


图 1 不同稳定剂对 UA 纳米晶混悬液粒径和 PDI 的影响

Figure 1 Effects of different stabilizers on particle size and PDI of UA nanosuspension

2.1.2 均质压力的确定 以 p188 为稳定剂, 按“2.1”项制备得纳米晶初混悬液, 固定循环次数为 10 次, 在不同的均质压力下均质, 观察粒径和 PDI 的变化, 见图 2。可见, 纳米晶体的粒径和 PDI 随压力的增加均呈现下降趋势, 但当压力增大到 50 MPa 以上时, 两者的变化甚微, 从保护仪器及能源节约的角度考虑, 确定均质压力为 50 MPa。

2.1.3 UA-NS 制备工艺确认 以 P188 为稳定剂, 按“2.1”项制备得纳米晶初混悬液, 将初混悬液在 50 MPa 压力下高压均质 10 次, 即得 UA-NS。

2.2 UA-NS 的表征

2.2.1 粒径的测定 取 UA-NS 适量, 采用纳米粒径电位分析仪测定 UA-NS 的粒径, 结果见图 3。可见, UA-NS 的平均粒径为(203.3 ± 8.9) nm, PDI 为(0.159 ± 0.018); 另取 UA 0.3 g, 均匀分散在 60 mL 含 2.5% DMSO 和 0.4% P188 的溶液中, 测得 UA 分散液的平均粒径为($1\,719 \pm 101$) nm, PDI 为(1.10 ± 0.13)。

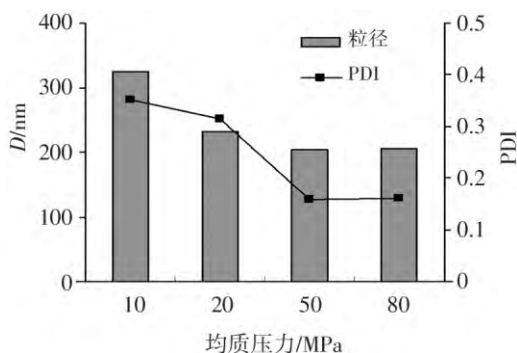


图2 均质压力对 UA 纳米晶混悬液粒径和 PDI 的影响

Figure 2 Effect of homogeneous pressure on particle size and PDI of UA nanosuspension

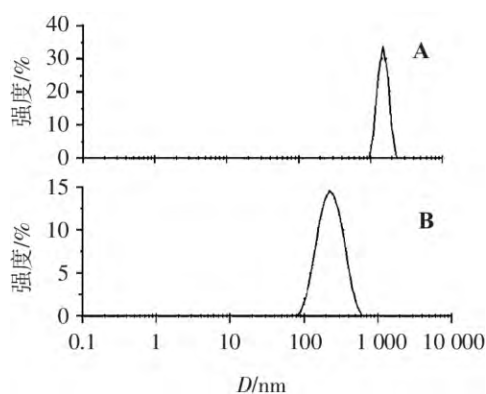


图3 UA 分散液(A)和 UA-NS(B)的粒径分布图

Figure 3 Particle size distribution of UA dispersion (A) and UA-NS (B)

2.2.2 形态观察 取 UA 原料药和 UA-NS 适量,用水分散至适当浓度后滴加至锡箔纸上,自然干燥后于扫描电镜下观察粒子形态,见图 4。可见,UA 原料药呈不规则的条状或块状,粒子大小约 10~100 μm ; UA-NS 则为大小均一的圆整颗粒。

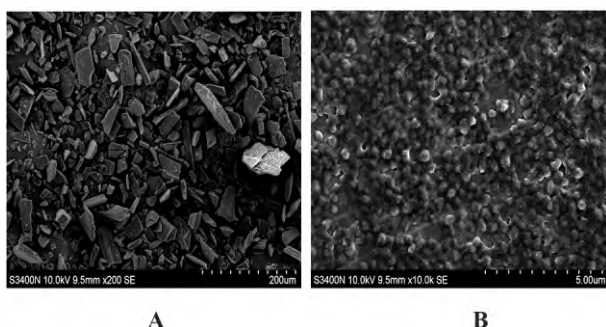


图4 UA 原料药(A)与 UA-NS(B)的扫描电镜图

Figure 4 SEM images of raw UA (A) and UA-NS (B)

2.3 UA-NS-gel 的制备

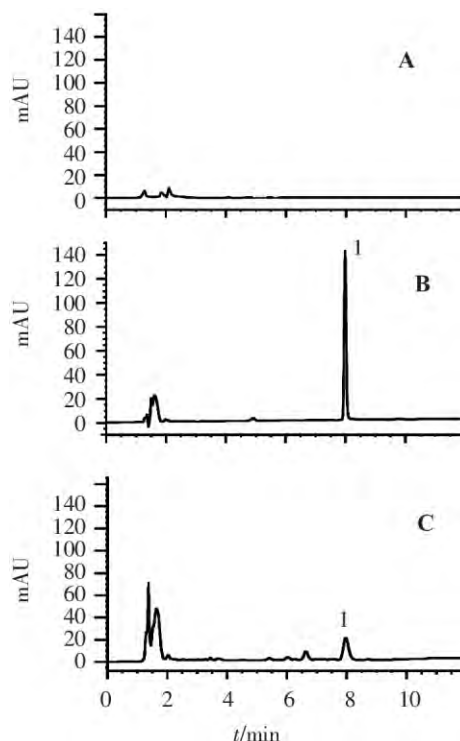
取 0.5 g 卡波姆 940,加水 10 mL,放置过夜使充分溶胀。将 UA-NS 和丙二醇 5 g 加入卡波姆中混合均匀,用 20% 三乙醇胺调 pH 值至 5.5~6.5,最后加水至 100 g,即得载药量为 0.3% 的 UA-NS-gel。

2.4 UA-gel 的制备

取 0.5 g 卡波姆 940,加水 10 mL,放置过夜使充分溶胀。取 UA 0.3 g 分散在 60 mL 含 2.5% DMSO 和 0.4% P188 的溶液中,与丙二醇 5 g 先后加入溶胀后的卡波姆中,混合均匀,用 20% 三乙醇胺调 pH 值至 5.5~6.5,最后加水至 100 g,即得载药量为 0.3% 的 UA-gel。

2.5 HPLC 法测定 UA 含量^[1]

2.5.1 色谱条件 色谱柱: Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-质量分数 0.1% 磷酸(体积比 85:15); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 210 nm; 柱温: 25 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 20 μL 。



A.空白皮肤浸出液; B.对照品; C.透皮样品; 1.熊果酸。

图5 熊果酸高效液相色谱图

Figure 5 Chromatogram of UA

2.5.2 标准曲线 精密称取干燥至恒重的熊果酸对照品 12.50 mg 至 50 mL 量瓶中,用甲醇溶解并定容,得质量浓度为 250 $\mu\text{g/mL}$ 的储备液。精密移取储备液,加甲醇稀释得质量浓度分别为 0.5、1.25、

2.5、5.0、12.5、25.0、50.0 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液。分别精密吸取上述对照品溶液 20 μL , 注入液相色谱仪中按上述色谱条件测定。记录峰面积。以熊果酸质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程 $Y=10.568X+6.0476$, $r=0.9999$, 表明熊果酸质量浓度在 0.5~50.0 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好。

2.5.3 精密性试验 精密吸取“2.5.2”项下的熊果酸对照品溶液(5.0 $\mu\text{g/mL}$), 照上述色谱条件, 重复进样 6 次, 测得熊果酸的峰面积 RSD 值为 0.47%, 表明仪器精密性良好。

2.5.4 稳定性试验 精密吸取“2.5.2”项下的熊果酸对照品溶液(5.0 $\mu\text{g/mL}$), 照上述色谱条件分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样, 测得熊果酸峰面积 RSD 值为 0.52%, 表明熊果酸对照品溶液在 24 h 内稳定。

2.5.5 回收率试验 分别取低、中、高浓度的熊果酸对照品(0.5、5.0、50.0 $\mu\text{g/mL}$) 1 mL, 加空白凝胶基质适量, 用甲醇定容至 10 mL, 超声分散, 离心取上清, 0.22 μm 微孔滤膜过滤后 HPLC 测定, 按标准曲线方程计算得回收率分别为 98.7%、99.1%、101.6%, 符合方法学要求。取低、中、高浓度的熊果酸对照品溶液 1 mL, 加适量空白皮肤浸出液, 蒸干后用甲醇定容至 1 mL, 过滤后 HPLC 测定, 求得透皮实验方法回收率分别为 97.5%、98.7%、100.3%, 符合要求。另取熊果酸储备液适量, 加空白皮肤, 按“2.6.2”项下提取和分离方法, 制备成质量浓度为 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液 3 份, HPLC 测定, 求得平均回收率为 102.1%, RSD 为 1.8%。

2.6 体外透皮试验及皮肤滞留试验

2.6.1 体外透皮试验^[13] 取健康雄性 SD 大鼠, 脱颈处死, 将腹部的毛剪干净后剥离皮肤, 清除皮下脂肪组织和血管, 用生理盐水冲洗干净后即用于; 将皮肤固定于扩散池中间, 角质层面向供应室, 真皮层面向接收室; 供应室分别加入 UA-NS-gel 和 UA-gel 各 1 g, 接收室中加入 10% 异丙醇作为接收液, 以恒定的速度(100 r/min) 搅拌, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴恒温; 分别于 1、

2、4、6、8、10、12、24 h 取样 1 mL, 并补充等量等温空白接收液。接收液经蒸干后用甲醇定容至 1 mL, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 按照“2.5.1”项下方法测定熊果酸浓度, 按下式计算累计渗透量(Q):

$$Q = [C_n \times V_0 + \sum_{i=1}^{n-1} C_i \times V] / S,$$

式中, C_n 为第 n 个取样点浓度($\mu\text{g/mL}$); C_i 为第 i 个取样点浓度($\mu\text{g/mL}$); S 为扩散面积(3.14 cm^2); V_0 为接收池体积(6.8 mL); V 为取样体积(mL)。以 Q 对时间(t) 作图(见图 6) 并进行线性回归, 直线的斜率即为稳态透皮速率常数(J_s), 结果见表 1。可见, UA-NS-gel 的 24 h 累计渗透量为(104.40 $\pm$ 6.48) $\mu\text{g/cm}^2$, 为 UA-gel 的 3.66 倍, 经双侧 t 检验, 差异具有统计学意义($P<0.01$)。

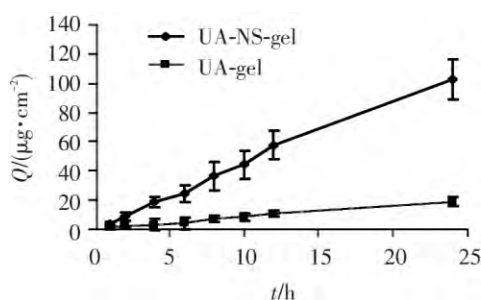


图 6 UA-NS-gel 和 UA-gel 的体外透皮吸收曲线图

Figure 6 Cumulative amount of UA-gel and UA-NS gel penetrations

2.6.2 皮肤滞留试验^[13] 透皮试验结束(24 h) 后将皮肤取下, 擦净凝胶, 用水冲洗后滤纸吸干, 剪下有效吸收皮肤, 剪碎置于 10 mL 离心管中, 加 5 mL 甲醇探头超声 5 min, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 按照“2.5.1”项下方法测定药物含量并计算皮肤滞留量, 见表 1。可见, 24 h 后, UA-NS-gel 的皮肤滞留量为(138.08 $\pm$ 19.39) $\mu\text{g/cm}^2$, 相比于 UA-gel 的(70.51 $\pm$ 14.77) $\mu\text{g/cm}^2$, 明显增加, 经双侧 t 检验, 差异具有统计学意义($P<0.05$)。

表 1 2 种凝胶的体外透皮参数和皮肤滞留量

Table 1 Transdermal parameters and skin deposition of two gels($n=5$)

组别	渗透动力学方程	r	$J_s /$ ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$)	24 h 累计渗透量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$)	皮肤滞留量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$)
UA-gel	$Q=1.1871t+0.5416$	0.994	1.19 $\pm$ 0.09	28.56 $\pm$ 2.16	70.51 $\pm$ 14.77
UA-NS-gel	$Q=4.3465t+0.6791$	0.997	4.35 $\pm$ 0.27	104.40 $\pm$ 6.48**	138.08 $\pm$ 19.39*

与 UA-gel 组比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

3 讨论

药物纳米混悬剂的制备方法主要分为 Bottom-up(从小到大)技术和 Top-down(从大到小)技术两类,包括反溶剂沉淀法、乳化法、介质研磨法、高压均质法等。本研究前期尝试采用高压均质法制备熊果酸纳米混悬剂,但因熊果酸的疏水性较强,分散后粒子较粗,易导致高压均质机堵塞。改用反溶剂沉淀法进行有效分散后再结合高压均质法进一步减小粒径并增加粒子的均一性,效果良好。

纳米混悬剂中药物分散程度高,易发生粒子的聚集及晶体的长大等不稳定现象,需在制备过程中加入适当的稳定剂,通过静电稳定、立体稳定等机制提高体系的稳定性,常用的稳定剂有 poloxamer、SDS、PVP、Tween 及 TPGS 等^[4-5]。本研究结果显示, poloxamer 类非离子表面活性剂对熊果酸纳米晶体具有较好的稳定作用,将纳米混悬剂进一步制成凝胶可通过体系的黏度防止粒子的聚集而增加稳定性。

本研究结果显示, UA-NS-gel 24 h 药物累积透过量为 $(104.40 \pm 6.48) \mu\text{g}/\text{cm}^2$, 为 UA-gel 的 3.66 倍; 皮肤滞留量为 $(138.08 \pm 19.39) \mu\text{g}/\text{cm}^2$, 是 UA-gel 的 1.96 倍, 说明将熊果酸制成纳米混悬液凝胶, 不但能增加药物的经皮渗透性能, 而且能增加皮肤的滞留量^[6], 其原因可能是药物粒径减小至纳米级, 能提高药物的溶解度和溶出, 制成凝胶后增加了药物在皮肤的滞留时间, 有利于药物的经皮渗透和皮肤的深层滞留。

参考文献:

- [1] 张明发, 沈雅琴. 齐墩果酸和熊果酸的抗炎及其抗变态反应 [J]. 抗感染药学, 2011, 8(4): 235-240.
- [2] 王涛, 邵敬伟, 郭养浩. 熊果酸抗肿瘤作用及其机制研究进展 [J]. 药物生物技术, 2008, 15(2): 148-151.
- [3] 阎昭. 天然抗肿瘤药物熊果酸脂质体早期临床研究 [D]. 天津: 天津大学, 2012.
- [4] 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): 145-147.
- [5] 马于平, 孙圣荣. 熊果酸对乳腺癌细胞凋亡影响及其机制 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2014, 16(8): 59-62.
- [6] VENKATARAMAN M, NAGARSENKER M. Silver sulfadiazine nanosystems for burn therapy [J]. AAPS Pharm Sci Tech, 2013, 14(1): 254-264.
- [7] 岳鹏飞, 万晶, 胡鹏翼, 等. 中药固体化纳米混悬给药系统的研究进展与思考 [J]. 中草药, 2012, 43(4): 625-628.
- [8] MOSCHWITZER J P. Drug nanocrystals in the commercial pharmaceutical development process [J]. Int J Pharm, 2013, 453(1): 142-156.
- [9] 张宁, 徐艳明, 祁永华, 等. 外用凝胶剂研究进展 [J]. 黑龙江医药, 2010, 23(1): 92-93.
- [10] 徐和, 戴领, 沈成英, 等. 苦参碱凝胶剂的制备及体外释药特性考察 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(1): 5-8.
- [11] 林杭娟, 钦富华, 高建青. 熊果酸平衡溶解度和油水分配系数的测定 [J]. 中国现代应用药学, 2012, 29(7): 635-637.
- [12] 陈彦, 吴青青, 张振海, 等. 熊果酸醇质体的制备和体外透皮研究 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(8): 988-991.
- [13] 沈成英, 申宝德, 徐平华, 等. 灵芝三萜纳米混悬凝胶剂的制备及其体外透皮研究 [J]. 中草药, 2014, 45(19): 2770-2775.
- [14] 雷亚亚, 冯军, 王虹, 等. 甘草次酸钠混悬液的稳定化研究 [J]. 中国药理学杂志, 2016, 51(2): 115-119.
- [15] 张艳, 李周, 王利胜. 双藤微乳凝胶的制备和体外释放度的考察 [J]. 今日药学, 2017, 27(3): 145-148.

(责任编辑: 陈翔)

美国 FDA 批准首个治疗巨细胞动脉炎药物 Actemra(tocilizumab)

美国 FDA 于 2017 年 5 月 22 日批准 Hoffman La Roche 公司生产的 Actemra(tocilizumab) 皮下注射剂用于治疗成人巨细胞动脉炎(giant cell arteritis, GCA), 这也是 FDA 批准的首个治疗巨细胞动脉炎的特效药物。

巨细胞动脉炎是一种血管炎, 多发于头部动脉, 颞动脉尤其高发, 因此有时也称为颞动脉炎。但其他动脉, 甚至一些大的动脉如主动脉都可能发生巨细胞动脉炎。巨细胞动脉炎会导致动脉血管变得狭窄或者不规则, 引起血流不畅。以前巨细胞动脉炎的标准治疗方法是使用大剂量糖皮质激素, 但临床上这种治疗方法越来越少用了。

Actemra 并非新药, 此前 FDA 已经批准 Actemra 皮下注射剂用于治疗中重度活动性风湿性关节炎, 也已批准 Actemra 静脉注射剂用于治疗中重度活动性风湿性关节炎、全身型幼年特发性关节炎和多关节炎型幼年特发性关节炎。FDA 这次批准 Actemra 皮下注射剂治疗巨细胞动脉炎只是增加新的适应证, 但 FDA 为 Actemra 皮下注射剂治疗巨细胞动脉炎这一新的适应证授予了突破性疗法认证(Breakthrough Therapy designation) 并采用了优先审批程序(Priority Review)。此外需特别指出的是 Actemra 静脉注射剂未获准用于治疗巨细胞动脉炎。

(来源: 美国 FDA 政府公告, 2017-05-22 夏训明 编译)