

葛根素立方液晶的制备及在微针作用下的体外透皮特性研究

莫建民*(湖州市第一人民医院药剂科,浙江 湖州 313000)

中图分类号 R943 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)22-3132-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.22.29

摘要 目的:制备葛根素立方液晶,研究其在微针作用下的体外透皮特性。方法:以单油酸甘油酯、乙醇、葛根素、纯化水为材料,采用注入法制备葛根素立方液晶;用偏光显微镜和小角X射线衍射进行表征。采用改进的Franz扩散池比较葛根素10%乙醇水溶液和葛根素立方液晶的体外透皮特性;考察葛根素立方液晶在微针作用下的体外透皮特性。结果:所制葛根素立方液晶在偏光显微镜下无明显晶体分布,呈暗绿色,显各向同性;其散射峰位之比为 $\sqrt{6}:\sqrt{8}$,证明其内部结构为螺旋型晶格。葛根素10%乙醇水溶液和葛根素立方液晶的透皮速率分别为15.306、29.101 $\mu\text{g}/(\text{cm}^2\cdot\text{h})$,20 h内的累积透皮量分别为190、545 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$;200 μm 微针预处理皮肤后,葛根素立方液晶的透皮速率为78.15 $\mu\text{g}/(\text{cm}^2\cdot\text{h})$,20 h内的累积透皮量为1 450 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。结论:成功制得葛根素立方液晶,其具有较葛根素乙醇水溶液更强的透皮能力,且联合微针给药具有更好的透皮性能。

关键词 葛根素;立方液晶;制备;微针;体外透皮

Preparation of Puerarin Cubic Phase and Study on Its *in vitro* Transdermal Characteristics under Microneedle

MO Jianmin(Dept. of Pharmacy, the First People's Hospital of Huzhou City, Zhejiang Huzhou 313000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To prepare the puerarin cubic phase, and study its *in vitro* transdermal characteristics under microneedle. METHODS: Using glycerol monooleate, ethanol, puerarin and purified water as materials, injection method was used to prepare the puerarin cubic phase. Polarizing microscopy and small angle X-ray diffraction were used for characterizing. The *in vitro* transdermal characteristics of Puerarin 10% ethanol solution and puerarin cubic phase were comparatively studied by modified Franz diffusion cell, and the *in vitro* transdermal characteristics of puerarin cubic phase under microneedle were studied. RESULTS: Prepared puerarin cubic phase had no obvious phase distribution under polarizing microscope with dark green color, showing isotropic trait. The ratio of scattering peak position was $\sqrt{6}:\sqrt{8}$, indicating that its internal structure was spiral lattice. The transdermal rates of Puerarin 10% ethanol solution and puerarin cubic phase were 15.306, 29.101 $\mu\text{g}/(\text{cm}^2\cdot\text{h})$, and the cumulative transdermal amounts within 20 h were 190, 545 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectively. After the pretreatment on skin by 200 μm microneedle, the transdermal rates of puerarin cubic phase was 78.15 $\mu\text{g}/(\text{cm}^2\cdot\text{h})$, and the cumulative transdermal amounts within 20 h was 1 450 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. CONCLUSIONS: Puerarin cubic phase is successfully prepared, which shows stronger transdermal ability than puerarin ethanol aqueous solution and better transdermal ability when combined with microneedle administration.

KEYWORDS Puerarin; Cubic phase; Preparation; Microneedle; *in vitro* transdermal

研究杂志,2014,41(6):637-640,647.

- [3] 陈静嫦,邓大明,麦光焕.消旋山莨菪碱滴眼液治疗儿童近视[J].眼视光学杂志,2009,11(6):469-471.
- [4] 夏苗芬,梁文权,李士敏,等.复方甲硫酸新斯的明眼用原位凝胶的处方工艺研究[J].中国现代应用药学,2014,31(06):711-713.
- [5] Qian J, Zhang JM, Lin LL, *et al.* A combination of neostigmine and anisodamine protects against ischemic stroke by activating alpha 7nAChR[J]. *Inter J Stroke*, 2015, 10(5): 737-744.
- [6] Sun L, Zhang GF, Zhang X, *et al.* Combined administration of anisodamine and neostigmine produces anti-shock

effects: involvement of alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2012, 33(6): 761-766.

- [7] 张井明.复方新斯的明山莨菪碱对缺血性脑卒中的治疗作用研究[D].上海:第二军医大学,2015.
- [8] 顾万清,周小莉.复方山莨菪碱新斯的明缓释片及其制备方法,中国:105943537A[P]. 2016-09-21.
- [9] 齐晓丹,马志鹏,宋益民.口服缓控释系统的研究进展[J].中国药房,2015,26(16):2281-2283.
- [10] 王宝庆,陆新汉,唐星,等.乌拉地尔 HPMC 骨架片的研制及释放度的考察[J].沈阳药科大学学报,2001,18(1): 5-8.

* 药师。研究方向:药物经皮给药系统。E-mail:903818262@qq.com

(收稿日期:2017-04-30 修回日期:2017-05-16)
(编辑:邹丽娟)

葛根素是葛根中的有效成分之一,属于黄酮类药物,具有提高免疫、增强心肌收缩力、保护心肌细胞、降低血压、抗血小板聚集、改善胰岛素抵抗等作用^[1-2]。但是葛根素有口服吸收较差、生物利用度低、注射给药不良反应多等缺点^[3-4]。采用经皮给药制剂可避免肝首关效应,维持持久的血液浓度,降低葛根素的毒副作用。

立方液晶是两亲性材料与水形成的溶质液晶的一种相态^[5]。作为药物传递系统,该独特的双水道结构和巨大的膜表面积使其具有多样化的药物包载性^[6]。立方液晶凝胶具有促透皮及缓释等特点。

微针给药系统是近几年来最热门的经皮给药系统之一,其可实质性地打通皮肤孔道,增加药物的透皮量^[7]。笔者制备了葛根素立方液晶,并研究了其在微针作用下的体外透皮特性。

1 材料

1.1 仪器

Agilent1200 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);UV-3000 紫外分光光度计(上海美谱达仪器有限公司);DM2500P 偏光显微镜(德国Leica公司);SAXSess小角X射线衍射仪(奥地利HMBG公司)。

1.2 药品与试剂

葛根素原料药(西安华萃生物技术有限责任公司,批号:20150115,纯度:98%);葛根素对照品(上海瑞楚生物科技有限公司,批号:20150322,纯度:98.694%);无水乙醇(国药集团化学试剂有限公司,批号:20140910);单油酸甘油酯(美国杜邦集团丹尼斯克有限公司,批号:116703,纯度:≥90%);其余试剂均为分析纯或药用级。

1.3 动物

SPF级SD大鼠,♂,体质量为(90±10)g,由浙江省实验动物中心提供,合格证号:SCXK(浙)2009-0033。实验前大鼠适应性喂养1周左右,室温25℃,自由进食和饮水。

2 方法与结果

2.1 立方液晶中葛根素的含量测定

2.1.1 色谱条件 按文献[8]中相应方法进行测定。色谱柱:Dikma Diamonsil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相:甲醇-水(含0.01%乙酸)(35:65),流速:1.0 mL/min,检测波长:252 nm,柱温:20℃,进样量:20 μL。

2.1.2 线性关系考察 精密称取葛根素对照品100 mg,置于100 mL量瓶中,甲醇定容,得1.0 mg/mL的葛根素母液。取适量葛根素母液分别稀释成质量浓度为1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0 μg/mL的葛根素对照品溶液,进样测定。以葛根素质量浓度为横坐标(*c*)、峰面积为纵坐标(*A*)进行回归分析,得回归方程为 $A=28\ 571c+9\ 152.1$ ($r=0.999\ 1, n=5$)。结果表明,葛根素检测质量浓度的线性范围为1.0~50.0 μg/mL。

2.1.3 精密度试验 制备低、中、高质量浓度(1.0、10.0、

50.0 μg/mL)的葛根素对照品溶液,进样测定。每个浓度同日内进样5次,连续进样3 d,考察日内、日间精密度。结果,日内RSD分别为0.56%、1.32%、1.25%($n=5$),日间RSD分别为1.53%、1.87%、1.01%($n=3$)。

2.1.4 回收率试验 分别量取低、中、高质量浓度(1.0、10.0、50.0 μg/mL)的葛根素对照品溶液适量,按处方比例加入单油酸甘油酯混合均匀,进样测定,计算回收率。结果,回收率分别为(98.56±5.4)%、(99.12±4.1)%、(101.32±7.1)%($n=3$)。

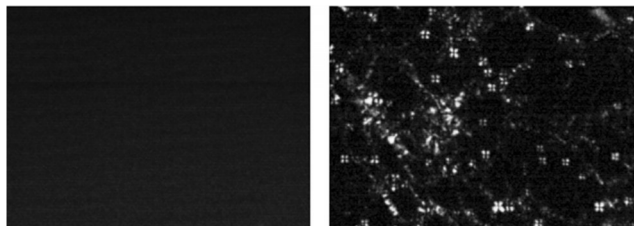
2.1.5 样品含量测定 精密称取0.5 g葛根素立方液晶,置于100 mL量瓶中,甲醇定容,经0.22 μm微孔滤膜过滤后进样测定。结果,葛根素立方液晶中葛根素含量为(5.04±1.12) mg/g($n=3$)

2.2 葛根素立方液晶的制备

称取6.4 g单油酸甘油酯,置于50 mL离心管中,加入0.6 mL乙醇,密封,60℃水浴融化30 min作为有机相;取50.83 mg葛根素原料药溶于3 mL 60℃的去离子水中作为水相;在涡旋状态下将水相缓慢滴加到有机相中形成葛根素含量约为5.0 mg/g的葛根素立方液晶。

2.3 葛根素立方液晶的表征

2.3.1 偏光显微镜 取葛根素立方液晶和未搅拌均匀的葛根素层状液晶适量,在偏光显微镜下观察其晶体分布,见图1。



A.葛根素立方液晶

B.葛根素层状液晶

图1 偏光显微镜图(×400)

Fig 1 Polarized photomicrographs(×400)

由图1可知,因为立方液晶具有各向同性,所以葛根素立方液晶在偏光显微镜下未见明显的晶体分布,且显暗绿色(图中未显现)^[9];而葛根素层状液晶因具有各向异性,故能看到明显的晶体分布^[10]。

2.3.2 小角X射线衍射仪 将装有葛根素立方液晶的样品池,置于小角X射线衍射仪检测室,抽真空至 10^{-5} Pa后,进行射线测定葛根素立方液晶的散射强度。以散射强度对散射因子(*q*)作图得小角X射线衍射谱图,见图2。

由图2显示,图谱中有2个散射峰,两峰位之比为 $\sqrt{6}:\sqrt{8}$,这是典型的立方液晶小角X射线衍射峰特征,其内部结构对应的为螺旋型晶格^[11]。

2.4 体外透皮试验

2.4.1 试验皮肤的制备 取SD大鼠,脱白处死,剪尽腹部毛发,剥离此处皮肤,剔除皮下脂肪组织,用生理盐水

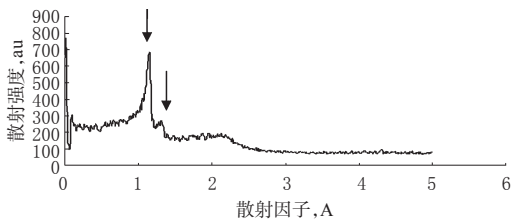


图2 葛根素立方液晶的小角X射线衍射谱图

Fig 2 Small angle X ray diffraction spectrum of puerarin cubic phase

冲洗干净,剪取适当大小角质层完好的皮肤,备用。

2.4.2 试验方法 采用改良的Franz扩散池进行试验。

将处理好的皮肤固定在供给池与接收池之间(角质层朝供给池,真皮层朝接收池,有效扩散面积为 3.14 m^2)。将1 g葛根素立方液晶和1 g同浓度的葛根素的10%乙醇水溶液分别加到供给池中,并紧贴皮肤角质层面,接收池内注入20 mL的生理盐水,以100 r/min的转速搅拌,水温为 $(32 \pm 1)\text{ }^\circ\text{C}$ 。分别于2、4、6、8、10、12、16、20 h收集接收液2 mL(同时补充等量、等温生理盐水),样品过 $0.2\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜后,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,计算累积透皮量($Q_n, \mu\text{g}/\text{cm}^2$)^[12], $Q_n = [c_n \cdot V + V_i \sum_{i=1}^{n-1} c_i] / A$ 。

式中, Q_n 为 t 时间内累积透皮量, c_n 和 c_i 分别为第 n 次和第 i 次取样时接收液中药物浓度, A 为有效扩散面积, V 为接收池中接收液总体积, V_i 为取样体积。结果显示,葛根素立方液晶的透皮速率为 $29.101\text{ }\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$ 、 $Q_{20\text{ h}}$ 为 $545\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$,明显高于葛根素10%乙醇水溶液的透皮速率 $15.306\text{ }\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$ 和 $Q_{20\text{ h}}$ $190\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$;经 t 检验,二者差异有统计学意义($P < 0.05$)。以 Q_n 为纵坐标、对应的时间(t)为横坐标作图,体外透皮曲线见图3。

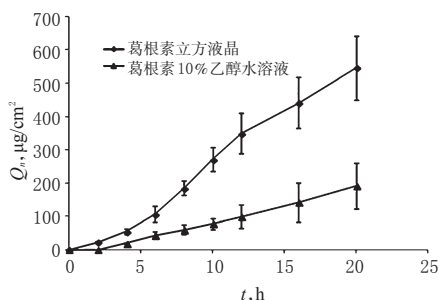


图3 葛根素10%乙醇水溶液和葛根素立方液晶的体外透皮曲线

Fig 3 The *in vitro* transdermal curves of Puerarin 10% ethanol solution and puerarin cubic phase

2.4.3 微针作用下葛根素立方液晶的体外透皮试验 将“2.4.1”项下处理好的皮肤取出,用长度为 $200\text{ }\mu\text{m}$ 的微针阵列施以5 N的力分别处理1 min后用于葛根素立方液晶透皮试验,其他步骤同“2.4.2”项。结果显示,微针预处理后,葛根素立方液晶的透皮速率为 $78.15\text{ }\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$, $Q_{20\text{ h}}$ 为 $1\text{ }450\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$,分别是未用微针处理时的2.69、2.66

倍。这说明微针与立方液晶共同作用可显著提高药物的透皮特性。葛根素立方液晶及其微针作用下的体外透皮曲线见图4。

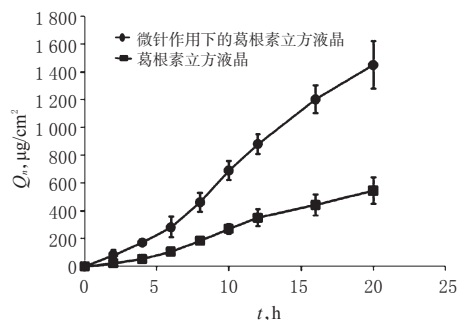


图4 葛根素立方液晶及其微针作用下的体外透皮曲线($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig 4 The *in vitro* transdermal curves of puerarin cubic phase and under microneedle($\bar{x} \pm s, n=3$)

3 讨论

立方液晶具有双连续水区和脂质区的闭合脂质双层结构,有巨大的膜表面积,能包裹不同极性的药物并可提高药物的稳定性。作为药物的载体,立方液晶有两大外用的优势,一是较高的原位生物黏附特性,二是具有良好的透皮吸收性能。而立方液晶透皮的主要机制是单油酸甘油酯能紊乱角质层细胞间的脂质排列,影响皮肤完整结构而促进药物经皮吸收^[13]。

常用的立方液晶制备材料有植烷三醇和单油酸甘油酯^[14]。本研究选择单油酸甘油酯,以注入法制备葛根素立方液晶。除水、乙醇、单油酸甘油酯三者用量影响立方液晶形成之外,能否均匀搅拌也是影响立方液晶形成的关键因素。同样的处方,若没有混匀,则可形成各向异性的层状液晶。

微针阵列技术是一种新型的物理辅助经皮给药技术,其透皮机制是在很小的面积上,同时覆盖数百根微针刺穿皮肤角质层,打开给药通路,允许药物通过这个重要的屏障。本实验结果显示,在微针的作用下葛根素立方液晶的体外透皮效果与被动给药时相比明显提高。

葛根素临床功效广泛,但因为其偏亲水性,一直未见有相关的外用制剂上市。立方液晶联合微针阵列给药可很好地促进药物透皮吸收,有望成为葛根素的新型经皮给药系统。

参考文献

[1] 翟羽佳,李凌冰.葛根素纳米制剂的研究进展[J].药学研究,2016,35(2):97-103.
 [2] 赵洁,苏畅,温德广,等.葛根素及葛根提取物在大鼠体内的药动学研究[J].中国药房,2016,27(10):1131-1134.
 [3] Yi Y, Tu L, Hu K, et al. The construction of puerarin nanocrystals and its pharmacokinetic and in vivo-in vitro correlation (IVIVC) studies on Beagle dog[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2015, 133(1):164-170.

2011—2015年我国药品监管统计年报分析

祁永飞*,包 晗,邱鹏程,张鑫磊,王 伟,王玉琨[#](第四军医大学药学院,西安 710032)

中图分类号 R95 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)22-3135-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.22.30

摘 要 目的:为药监部门加强药品监管工作提供参考。方法:收集2011—2015年连续5年国家药品监管统计年报,采用文献分析、内容分析、对比分析、二次分析等方法对统计年报中有关药品生产许可、经营许可、广告审批、中药品种保护、药品投诉、药品案件查处等数据进行分析。结果与结论:我国药品生产企业和经营企业数量逐年增加,但生产企业的增速有放缓趋势,而持证经营企业中零售连锁企业门店有超越零售单体药店的趋势;相比批准的药品广告数量的下降趋势,中药保护品种数量的下降更为明显;药品投诉增加的同时并未引起查处的药品案件数量的增加,反而呈下降趋势。建议药监部门通过严格药品生产经营许可审批、改革药品广告监管和中药品种保护制度、加大药品投诉和案件的查处力度、发挥媒体和群众的舆论监督作用,进一步提升我国药品监管工作的质量和效率。

关键词 药品监管;统计年报;分析

Analysis of Drug Regulatory Statistical Yearbooks in China during 2011-2015

QI Yongfei, BAO Han, QIU Pengcheng, ZHANG Xinlei, WANG Wei, WANG Yukun (School of Pharmacy, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To provide reference for strengthening drug regulation in drug administration department. METHODS: Drug regulatory statistical yearbooks during 2011-2015 were collected. Literature analysis, content analysis, comparative analysis and secondary analysis were conducted to analyze and explore the drug production license, business license, advertising approval, protection of TCM varieties, drug complaints, investigation and punishment of drug cases, etc. in statistical yearbook. RESULTS & CONCLUSIONS: The number of drug manufacturers and operating enterprises had been increasing year by year, while the retail chain stores in certified enterprises showed tendency to go beyond the single retail pharmacy. Compared with the down-

- [4] 刘伟星,李宁,高崇凯.葛根素自微乳化渗透泵控释胶囊的制备[J].中草药,2013,44(12):1568-1573.
- [5] 彭新生,杨志文,陈美婉,等.辣椒碱立方液晶凝胶的制备、表征及含量测定[J].中国中药杂志,2010,35(23):3123-3125.
- [6] Li L, Zhang XY, Chen Y, et al. Application of response surface methodology for optimization of resveratrol liquid crystalline nanoparticles[J]. *Lat Am J Pharm*, 2015, 34(4):773-781.
- [7] 陈娟,陈志鹏,瞿敏明.微针技术在经皮给药中的应用[J].国际药学研究杂志,2011,38(2):142-147.
- [8] 王丹,石力夫,胡晋红,等.一种葛根素经皮给药系统体外透皮性能的初步考察[J].药学服务与研究,2009,9(2):104-106.
- [9] 吴晓晴,桂双英,陈玉林,等.水杨酸甲酯立方液晶的研制[J].中国新药杂志,2015,24(7):837-840.
- [10] 付怀秀,于翔,康宏向,等.Photosan脂质立方液晶纳米光敏剂的制备及光动力杀伤效应研究[J].中国生物工程杂志,2015,35(3):35-41.
- [11] 房秋雨,彭新生,典灵辉,等.两性霉素B立方液晶前体胶囊的制备及释放度考察[J].中国医院药学杂志,2012,32(11):817-820.
- [12] Yu X, Du LN, Li Y, et al. Improved anti-melanoma effect of a transdermal mitoxantrone ethosome gel[J]. *Biomed Pharmacother*, 2015, doi:10.1016/j.biopha.2015.05.002.
- [13] Yu X, Du LN, Zhu LF, et al. Melanoma therapy with transdermal mitoxantrone cubic phases[J]. *Drug Deliv*, 2016, 23(5):1565-1570.
- [14] 韩珂,叶丽卡,吴传斌.肝动脉栓塞用多西他赛原位植烷三醇立方液晶的体内药理学评价[J].中国医院药学杂志,2014,34(17):1438-1442.

* 药师,硕士研究生。研究方向:药事管理学。电话:029-84772495。E-mail:815639011@qq.com

[#] 通信作者:教授,博士。研究方向:药学教育、药事管理学。电话:029-84776811。E-mail:wangyk@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2016-10-25 修回日期:2017-01-09)

(编辑:邹丽娟)