

体现了这一特点。虽然目标化合物的活性不是很强, 还有进一步改造的空间, 但是这仍可以作为蛋白酶抑制剂研究工作的探索, 为发现具有更高活性及类药性的蛋白酶抑制剂奠定基础。

REFERENCES

- [1] SHANG F, TAYLOR A. Ubiquitin-proteasome pathway, cellular responses to oxidative stress [J]. *Free Radic Biol Med*, 2011, 51(1): 5-16.
- [2] PORTBURY A L, RONNEBAUM S M, ZUNGU M, et al. Back to your heart: ubiquitin proteasome system-regulated signal transduction [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2012, 52(3): 526-537.
- [3] FRANKLAND S S, BHAUMIK S R. The 26S proteasome complex: an attractive target for cancer therapy [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1825(1): 64-76.
- [4] ADAMS J. The proteasome: A suitable antineoplastic target [J]. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4(5): 349-360.
- [5] RIEDERER B M, LEUBA G, VERNAY A. The role of the ubiquitin proteasome system in Alzheimer's disease [J]. *Exp Biol Med*, 2011, 236(3): 268-276.
- [6] XIE W, LI X, LI C. Proteasome inhibition modeling nigral neuron degeneration in Parkinson's disease [J]. *J Neurochem*, 2010, 115(1): 188-199.
- [7] RIEDERER B M, LEUBA G, VERNAY A, et al. The role of the ubiquitin proteasome system in Alzheimer's disease [J]. *Exp Biol Med*, 2011, 236(3): 268-276.
- [8] ZHANG J, WU P, HU Y. Clinical, marketed proteasome inhibitors for cancer treatment [J]. *Curr Med Chem*, 2013, 20(20): 2537-2551.
- [9] BORISSENKO L, GROLL M. 20S proteasome, its inhibitors: Crystallographic knowledge for drug development [J]. *Chem Rev*, 2007, 107(3): 687-717.
- [10] ZHU Y, ZHU X, WU G, et al. Synthesis, *in vitro*, *in vivo* biological evaluation, docking studies, structure-activity relationship (SAR) discussion of dipeptidyl boronic acid proteasome inhibitors composed of beta-amino acids [J]. *J Med Chem*, 2010, 53(5): 1990-1999.
- [11] SHINAGAWA S, KANAMARU T, HARADA S, et al. Chemistry, inhibitory activity of long-chain fatty-acid oxidation of emeriamine, its analogs [J]. *J Med Chem*, 1987, 30(8): 1458-1463.
- [12] FRACKENPOHL J, ARVIDSSON P I, SCHREIBER J V, et al. The outstanding biological stability of beta-, gamma-peptides toward proteolytic enzymes: An *in vitro* investigation with fifteen peptidases [J]. *Chembiochem*, 2001, 2(6): 445-455.
- [13] FUCHS V, JAEGER K E, WILHELM S, et al. The BapF protein from *Pseudomonas aeruginosa* is a beta-peptidyl aminopeptidase [J]. *World J Microb Biot*, 2011, 27(3): 713-718.
- [14] CHENG R P, GELLMAN S H, DEGRADO W F. Beta-peptides: From structure to function [J]. *Chem Rev*, 2001, 101(10): 3219-3232.
- [15] ZHU Y, WU G, ZHU X, et al. Synthesis, *in vitro*, *in vivo* biological evaluation, comprehensive understanding of structure-activity relationships of dipeptidyl boronic acid proteasome inhibitors constructed from beta-amino acids [J]. *J Med Chem*, 2010, 53(24): 8619-8626.
- [16] KUMAR V, JAGGI M, SINGH A T, et al. 1,8-Naphthyridine-3-carboxamide derivatives with anticancer, anti-inflammatory activity [J]. *Eur J Med Chem*, 2009, 44(8): 3356-3362.
- [17] ADAMS J, PALOMBELLA V J, SAUSVILLE E A, et al. Proteasome inhibitors: A novel class of potent, effective antitumor agents [J]. *Cancer Res*, 1999, 59(11): 2615-2622.

收稿日期: 2015-06-05

氧化苦参碱凝胶体外经皮渗透及大鼠药动学研究

何治芬^{1,2}, 汤湛¹, 尹丽娜¹, 王胜浩¹, 金志敏², 王俏^{1*} (1.浙江省医学科学院药物研究所, 杭州 310013; 2.浙江工业大学药学院, 杭州 310014)

摘要: 目的 研究氧化苦参碱凝胶的体外经皮渗透影响因素, 并对其在大鼠体内的药动学进行研究。方法 采用 Valia-Chien 双室扩散池, 以大鼠离体皮肤为渗透屏障, HPLC 测定氧化苦参碱浓度, 以药物累积渗透量为指标, 对药物及渗透促进剂的浓度进行筛选。结果 氧化苦参碱经皮凝胶的最优处方 12 h 累积渗透量为 $(18.094 \pm 1.253) \text{mg} \cdot \text{cm}^{-2}$, 大鼠静注与经皮给药的血浆药动学研究表明, 经皮给药的 $\text{AUC}_{(0-t)}$ 是注射给药的 1.9 倍 ($P < 0.01$)。结论 氧化苦参碱凝胶的经皮吸收能力良好, 能长时间持续释放药物, 有望成为新的给药剂型。

关键词: 氧化苦参碱; 凝胶; 水溶性氮酮; 经皮渗透; 药动学

中图分类号: R969.1; R944.15

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2015)11-1336-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.11.012

基金项目: 浙江省医学重点学科群项目(XKQ-010-001); 2010 年浙江省“新世纪 151 人才工程”二层次

作者简介: 何治芬, 女, 硕士生 Tel: (0571)88215623 E-mail: 314771348@qq.com *通信作者: 王俏, 女, 博士, 研究员, 硕士 Tel: (0571)88215623 E-mail: wangqiao-1@163.com

Transdermal Permeation of Oxymatrine Gel *in Vitro* and Its Pharmacokinetics in Rats

HE Zhifen^{1,2}, TANG Zhan¹, YIN Lina¹, WANG Shenghao¹, JIN Zhimin², WANG Qiao^{1*} (1. Institute of Materia Medica, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China; 2. College of Pharmacy, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate *in vitro* transdermal permeation ability of oxymatrine gel and its pharmacokinetics in rats. **METHODS** The skin permeation ability of oxymatrine was evaluated by using Valia-Chien permeation cells with isolated rat skin. The concentration of drug was determined by HPLC. The preparation formulation of the gel was optimized which took the permeation amount as the index. **RESULTS** The accumulative permeation amount of the optimal formulation of gel was $(18.094 \pm 1.253) \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-2}$ in 12 h. The pharmacokinetic parameters showed that the $\text{AUC}_{(0-12)}$ of transdermal administration was 1.9 times of iv administration. **CONCLUSION** Oxymatrine gel has good absorption and long-time sustained release, it can be developed as a novel transdermal preparation.

KEY WORDS: oxymatrine; gel; water-soluble azone; transdermal; pharmacokinetics

氧化苦参碱是豆科植物苦参、苦豆子的主要活性成分, 具有抗炎、抗病毒、抗纤维化、抗肿瘤、抗心律失常等作用^[1-5]。临床上多用来治疗慢性肝炎、肝纤维化, 常用剂型有注射液与口服胶囊。注射给药不方便且会出现局部疼痛, 口服给药胃肠道反应明显, 均给患者带来不便^[6]。经皮给药制剂可避免肝脏的首过效应及胃肠道破坏作用, 具有减少给药次数, 延长给药时间, 维持恒定的有效血药浓度, 降低不良反应, 提高疗效, 便于使用等优点^[7]。本研究将氧化苦参碱制成工艺较简单的经皮给药凝胶, 采用正交试验优选氧化苦参碱凝胶剂的处方并考察其体外经皮渗透能力, 然后研究其大鼠经皮给药药动学, 并与静注给药相比较, 为治疗肝炎、肝纤维化药物新剂型的开发提供依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

LC-20AT 高效液相色谱仪(日本岛津), SPD-20A 紫外检测器, 浙大 N2000 色谱工作站(浙江大学智能工程研究所); Valia-Chien 双室扩散池(自制); CH 系列超级恒温槽(上海方瑞仪器有限公司); 85-2 型恒温磁力搅拌器(上海司乐仪器有限公司); TGL-16C 台式离心机(上海安亭科学仪器厂); PHS-3C 精密 pH 计(上海虹益仪表有限公司)。

1.2 试药

苦参碱、氧化苦参碱对照品(中国食品药品检定研究所, 批号分别为 110805-200508、110780-201007, 纯度 $\geq 98\%$); 苦参碱、氧化苦参碱原料药(西安华萃生物技术有限责任公司, 批号分别为 20130903、20131015, 含量 $\geq 98\%$); 水溶性氮酮(新

乡高金药业, 批号: 090910); 1, 2-丙二醇(成都市科龙化工试剂厂, 批号: 20100125); 薄荷油(安吉市青原区恒诚天然香料油提炼厂); 乙酸乙酯(上海化学试剂采购供应五联化工厂); 羧甲基纤维素钠(300~800 mPa·s, 国药集团化学试剂有限公司); 乙腈为色谱纯(美国 TEDIA); 其他试剂均为分析纯。

1.3 动物

清洁级 SD 大鼠, 体质量 250~300 g, ♂, 浙江省医学科学院实验动物中心提供, 许可证号: SCXK(浙)2008-0033。

2 方法

2.1 色谱条件

Diamonsil Dikma C_{18} 色谱柱 ($4.6 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$); 预柱 C_{18} (江苏汉邦科技有限公司, $4 \text{ mm} \times 13 \text{ mm}$); 流动相: 乙腈-0.1%磷酸(用三乙胺调 pH 至 7.6~7.7)(12:88); 流速: $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 检测波长: 220 nm; 柱温: 35°C , 进样量 $20 \mu\text{L}$ 。

2.2 凝胶的制备

氧化苦参碱加蒸馏水溶解, 加入适量渗透促进剂(水溶性氮酮、丙二醇和薄荷油), 最后加入粉末状羧甲基纤维素钠充分溶胀后, 搅拌均匀使之成为凝胶, 即得。

2.3 样品处理

体外样品: $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 6 min 后, 进样测定。血浆样品处理: 精密吸取 $40 \mu\text{L}$ 血浆样品于离心管中, 加入 $60 \mu\text{L}$ 乙腈混匀沉淀蛋白, 涡旋震荡 1 min, $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 6 min, 取上清液进样测定。

2.4 离体大鼠皮肤制备

取 SD 大鼠, 处死后用电动剃须刀剃毛。剥离

背部皮肤, 仔细剔除皮下脂肪和黏连物, 剪成适当的大小, -20°C 保存, 使用前自然解冻。

2.5 体外渗透试验

将解冻后的大鼠皮肤用生理盐水浸润, 吸干, 分别紧缚于 Valia-Chien 双室扩散池两室之间。真皮层面向接受室, 角质层面涂上凝胶(约 0.2 g , 池口面积约 0.7 cm^2), 并用弹簧夹把两室的双口固定, 在接受室中加入 4 mL 事先预热至 $(32\pm0.5)^{\circ}\text{C}$ 生理盐水作为接受液。控制扩散池夹层内水温在 $(32\pm0.5)^{\circ}\text{C}$, 电磁搅拌转速 $500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 分别于 2, 4, 6, 8, 10, 12 h 取出接受室中的全部渗透液作为待测液, 然后再补加 4 mL 同温度的生理盐水。

样品按“2.3”项下方法处理后测定氧化苦参碱样品的渗透量。药物的皮肤渗透量按下述公式计算: 渗透量($\text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}$)=扩散池样品质量浓度($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) $\times 10^{-3}\times$ 扩散池容积(mL)/扩散池口面积(cm^2)。以单位面积累积渗透量($\text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}$)为纵坐标, 时间(h)为横坐标作图, 得药物累积渗透曲线, 对所得曲线进行回归, 求出斜率, 即为药物的渗透速率($\text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$)。

2.6 药动学研究

根据文献报道氧化苦参碱治疗大鼠肝纤维化等的有效剂量为 $40\sim 120\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ^[8-9], 本试验选用 $80\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 静注给药与经皮给药(给药面积 4 cm^2 , 1 g)比较。12 只 SD 大鼠随机分成静注给药组与经皮给药组, 每组 6 只, 手术前禁食 12 h, 自由饮水, 用 20%乌拉坦麻醉(腹腔注射 $1.25\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)。静脉给药组: 按 $80\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 股静脉注射氧化苦参碱生理盐水, 给药前及给药后 0, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330, 360, 420, 480 min 收集 0.1 mL 尾静脉血于肝素钠处理过的 0.5 mL PE 离心管中。经皮给药组: 给药前用电动剃毛刀剃除大鼠腹部毛发, 将前面筛选最优处方的氧化苦参碱凝胶涂布于大鼠腹部皮肤, 面积为 $2\text{ cm}\times 2\text{ cm}$ 。给药后每 1 h 收集 0.1 mL 尾静脉血于肝素钠处理过的 0.5 mL PE 离心管中, 共收集 10 h。血样以 $10\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 6 min 后, 精密吸取 $40\text{ }\mu\text{L}$ 血浆样品于离心管中, 按“2.3”项下处理测定。

由 HPLC 分析得到的数据绘制氧化苦参碱静脉注射给药与凝胶经皮给药的血药浓度-时间曲线。以 DAS 2.0 药动学软件进行相关药动学参数分析。

3 结果

3.1 专属性试验

空白皮肤溶液、生理盐水对照品溶液、体外经皮渗透样品溶液、血浆空白溶液、血浆对照品溶液和血浆样品溶液的 HPLC 图谱见图 1。结果表明, 在此色谱条件下, 空白皮肤样品、空白血浆样品对氧化苦参碱测定无干扰。氧化苦参碱出峰时间约为 4.9 min 。

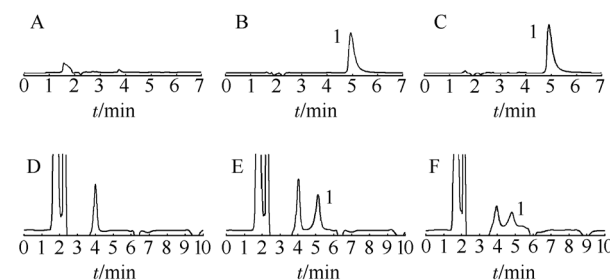


图 1 氧化苦参碱的色谱图

A-空白皮肤溶液; B-对照品溶液($126.88\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); C-体外经皮渗透样品溶液; D-空白血浆溶液; E-血浆对照品溶液($101.50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); F-血浆样品溶液; 1-氧化苦参碱。

Fig. 1 HPLC chromatograms of oxymatrine

A-blank transdermal solution; B-0.9% NaCl solution spiked with $126.88\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ oxymatrine; C-transdermal permeation solution sample; D-blank blood plasma; E-blank blood plasma spiked with $101.50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ oxymatrine; F-plasma sample; 1-oxymatrine.

3.2 标准曲线的制备

精密称取氧化苦参碱对照品 40.60 mg , 置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解至刻度, 制成浓度为 $4\,060\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的标准储备液。

0.9%NaCl 溶液标准曲线的制备: 将上述标准储备液用 0.9%氯化钠溶液稀释得氧化苦参碱浓度为 7.93, 15.86, 31.72, 63.44, 126.88, 253.75, 507.50, $1\,015.00\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的系列标准溶液。按“2.1”项下色谱条件测定, 以峰面积(Y_1)为纵坐标, 以浓度($X_1, \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)为横坐标, 作图并进行线性回归, 得标准曲线回归方程, $Y_1=8\,942.313X_1+2\,782.106$ ($r=1.000, n=5$), 结果表明氧化苦参碱在 $7.93\sim 1\,015.00\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好。

血浆标准曲线的制备: 将上述标准储备液用血浆稀释得氧化苦参碱浓度为 6.34, 12.69, 25.38, 50.75, 101.50, 203.00, $406.00\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的系列标准溶液, 按“2.3”项下处理后测定, 以峰面积(Y_2)为纵坐标, 以浓度($X_2, \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)为横坐标, 作图并进行线性回归, 得标准曲线回归方程, $Y_2=1\,082.722X_2-1\,025.302$ ($r=1.000, n=5$), 结果表

明氧化苦参碱在 6.34~406.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好。

3.3 精密度和准确度

制备高(507.50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、中(126.88 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、低(15.86 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)3 个浓度的氧化苦参碱 0.9%NaCl 溶液, 1 d 平行操作 5 次考察日内精密度和准确度, 连续 5 d 考察日间精密度和准确度, 结果日内 $\text{RSD}\leq 2.3\%(n=5)$ 、日间 $\text{RSD}\leq 5.4\%(n=5)$, 精密度良好。日内平均准确度分别为 101.2%, 102.8%, 97.2%, 日间平均准确度分别为 102.5%, 105.6%, 104.8%。

制备高(406.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、中(101.50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、低(12.69 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)3 个浓度的氧化苦参碱血浆溶液, 1 d 平行操作 5 次考察日内精密度和准确度, 连续 5 d 考察日间精密度和准确度, 结果日内 $\text{RSD}\leq 5.6\%(n=5)$ 、日间 $\text{RSD}\leq 6.9\%(n=5)$, 精密度良好。日内平均准确度分别为 100.2%, 101.5%, 101.2%, 日间平均准确度分别为 103.2%, 101.1%, 100.9%。

3.4 氧化苦参碱凝胶剂处方筛选

3.4.1 正交试验设计筛选凝胶处方 根据一些预实验得知, 当羧甲基纤维素钠为 7%时, 制成凝胶剂外观良好, 故下面的处方筛选中羧甲基纤维素钠固定为 7%; 渗透促进剂以水溶性氮酮和丙二醇联用对氧化苦参碱有较好的促渗作用; 薄荷油能缩短经皮渗透的时滞, 但对提高药物累积渗透量没有明显影响。故本试验在薄荷油一定的情况下(浓度为 5%)首先对水溶性氮酮(A)、丙二醇(B)、氧化苦参碱(C)浓度 3 个主要因素进行正交试验筛选, 设计处方浓度因素水平表, 见表 1。以每平方厘米氧化苦参碱 12 h 平均累积渗透量为指标($n=4$)进行试验, 结果见表 2, 方差分析见表 3。

表 1 处方浓度因素水平表

Tab. 1 Levels and factors of concentration orthogonal test

水平	因素/%		
	水溶性氮酮	丙二醇	氧化苦参碱
1	3	3	5
2	5	5	8
3	8	10	11

从表 2、3 可知, 各因素的优先顺序为 $C>A>B$, 即对氧化苦参碱渗透量影响最大的因素为含药量, 其次为水溶性氮酮浓度, 再者为丙二醇浓度。以极值最小的 $A\times B$ 因素为误差项进行方差分析,

表 2 处方浓度正交设计实验结果($\bar{x}\pm s, n=4$)

Tab. 2 Results of prescription concentration orthogonal test using accumulative permeation amount as index($\bar{x}\pm s, n=4$)

No.	A	B	A×B	C	累积渗透量/ $\text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}$
1	1	1	1	1	5.644±0.042
2	1	2	2	2	11.533±0.038
3	1	3	3	3	10.872±0.038
4	2	1	2	3	11.451±0.049
5	2	2	3	1	6.824±0.041
6	2	3	1	2	9.565±0.044
7	3	1	3	2	13.154±0.060
8	3	2	1	3	14.939±0.106
9	3	3	2	1	7.511±0.049
Ij1	28.050	30.250	30.148	19.980	
Ij2	27.841	33.297	30.496	34.252	
Ij3	35.605	27.948	30.851	37.263	
$\bar{I}\bar{j}1$	9.350	10.083	10.049	6.660	
$\bar{I}\bar{j}2$	9.280	11.099	10.165	11.417	
$\bar{I}\bar{j}3$	11.868	9.316	10.284	12.421	
Rj	2.588	1.783	0.234	5.761	

表 3 以累积渗透量为指标的正交试验方差分析

Tab. 3 Analysis of variance of orthogonal test using accumulative permeation amount as index

因素	偏差平方和	自由度	F	P
A	13.045	2	159.085	<0.01
B	4.798	2	58.512	<0.05
A×B(误差)	0.082	2	1.000	
C	56.831	2	693.061	<0.01

注: $F_{0.01}(2,2)=99, F_{0.05}(2,2)=19$ 。

Note: $F_{0.01}(2,2)=99, F_{0.05}(2,2)=19$ 。

结果显示因素 A、C 具有极显著意义, B 因素具有显著意义, 含药量越高, 累积渗透量越大; 水溶性氮酮的水平 1 与 2 之间的累积渗透量相差不大, 但当浓度提高到水平 3 时, 累积渗透量有较大增加, 故下一步研究继续增加氧化苦参碱与水溶性氮酮浓度时, 药物累积渗透量是否会再有提升。而丙二醇在水平 2 时的最佳, 故确定丙二醇浓度为 5%。计算正交试验表时, 使用渗透速率作为参考指标计算的结果与累积渗透量相同, 但累积渗透量更能体现出凝胶剂的最终经皮渗透情况。

3.4.2 对含药量的进一步筛选 当水溶性氮酮为 8%、丙二醇为 5%、薄荷油为 5%时, 比较 11%、14%、17%含药量的氧化苦参碱凝胶处方 12 h 累积渗透量, 结果见图 2。14%含药量时累积渗透量为 $(18.094\pm 1.253)\text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}$, 11%含药量时累积渗透量

为 $(14.939 \pm 0.732) \text{mg} \cdot \text{cm}^{-2}$, 两者相比有极显著差异 ($P < 0.01$), 而 17% 含药量累积渗透量为 $(17.487 \pm 0.666) \text{mg} \cdot \text{cm}^{-2}$, 与 14% 相比无显著性差异。表明含药量进一步增加时累积渗透量不会随之增加, 故氧化苦参碱凝胶的含药量确定为 14%。

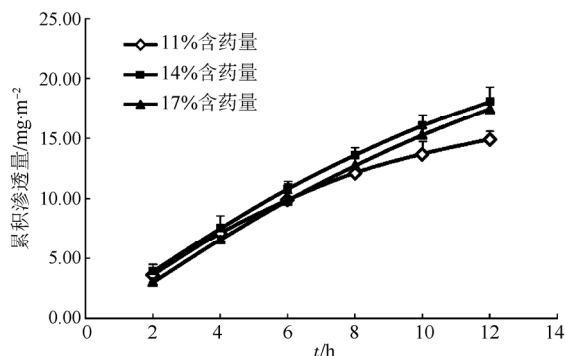


图 2 含药量对氧化苦参碱经皮累积渗透量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

Fig. 2 Accumulative permeation amount of oxymatrine with different drug concentrations ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

3.4.3 对水溶性氮酮浓度的进一步筛选 在以上实验的基础上, 对水溶性氮酮浓度进一步筛选, 当氧化苦参碱为 14%、丙二醇为 5%、薄荷油为 5% 时, 比较 8% 与 11% 水溶性氮酮对氧化苦参碱凝胶经皮渗透的影响, 结果见图 3。当水溶性氮酮浓度为 8% 时, 药物的累积渗透量为 $(18.094 \pm 1.253) \text{mg} \cdot \text{cm}^{-2}$, 而为 11% 时, 药物的累积渗透量为 $(16.719 \pm 1.052) \text{mg} \cdot \text{cm}^{-2}$, 两者比较, 无显著性差异。故确定氧化苦参碱凝胶中水溶性氮酮浓度为 8%。

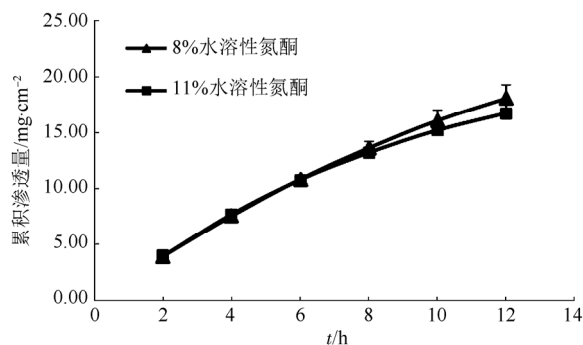


图 3 水溶性氮酮浓度对氧化苦参碱经皮累积渗透量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

Fig. 3 Accumulative permeation amount of oxymatrine with different percentages of water-soluble azone ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

3.4.4 对薄荷油浓度的筛选 当氧化苦参碱为 14%、水溶性氮酮为 8%、丙二醇为 5% 时, 比较

0%, 5%, 10% 的薄荷油对氧化苦参碱凝胶经皮渗透的影响, 结果见图 4。当薄荷油浓度为 5% 时, 药物 12 h 累积渗透量为 $(18.094 \pm 1.253) \text{mg} \cdot \text{cm}^{-2}$, 薄荷油浓度为 0% 时, 药物的累积渗透量为 $(15.420 \pm 1.346) \text{mg} \cdot \text{cm}^{-2}$, 薄荷油浓度为 10% 时, 药物的累积渗透量为 $(15.582 \pm 2.291) \text{mg} \cdot \text{cm}^{-2}$ 。5% 薄荷油组的累积渗透量明显高于 0%、10% 薄荷油组, 结果有显著差异 ($P < 0.05$)。第 1 个取样时间点 (2 h) 的渗透量, 0% 薄荷油组仅仅为 $(1.695 \pm 0.394) \text{mg} \cdot \text{cm}^{-2}$, 而 5% 薄荷油组达到 $(3.928 \pm 0.174) \text{mg} \cdot \text{cm}^{-2}$, 10% 薄荷油组达到 $(3.503 \pm 0.538) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ 。5%, 10% 薄荷油组与 0% 薄荷油组相比, 前 2 组起始点的渗透量明显提高, 结果有极显著差异 ($P < 0.01$), 而 5% 与 10% 相比无显著性差异, 故最终薄荷油优选为 5%。

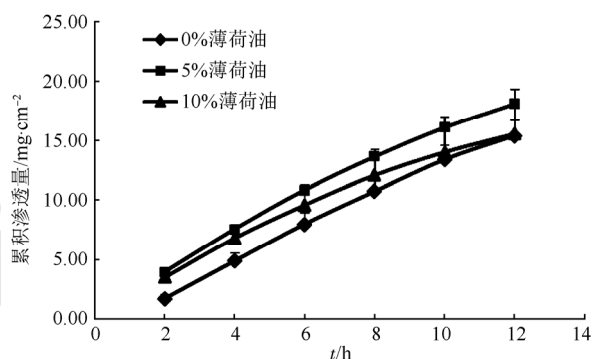


图 4 薄荷油浓度对氧化苦参碱经皮累积渗透量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

Fig. 4 Accumulative permeation amount of oxymatrine with different percentages of peppermint oil ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

最后确定最优处方组合为: 14% 氧化苦参碱 + 8% 水溶性氮酮 + 5% 丙二醇 + 5% 薄荷油 + 7% 羧甲基纤维素钠, 12 h 累积渗透量平均值为 $(18.094 \pm 1.253) \text{mg} \cdot \text{cm}^{-2}$, 其渗透速率平均值为 $(1.418 \pm 0.122) \text{mg} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ 。

3.5 药动学研究

氧化苦参碱静脉给药与最优凝胶处方经皮给药后的血药浓度-时间曲线见图 5, 统计主要药动学参数见表 4。氧化苦参碱按 $80 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 股静脉给药, 与最优凝胶处方经皮给药 (4cm^2) 相比, 经皮给药的 $\text{AUC}_{(0-t)}$ 是静注给药的 1.9 倍 ($P < 0.01$), 而且经皮给药 480 min 时的 AUC 为 $(14759.94 \pm 3265.15) \text{min} \cdot \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 也要比同时时间段的静注稍高; 经皮给药的 $\text{MRT}_{(0-t)}$ 比静脉的长 ($P < 0.01$), 表明药物在大鼠体内的滞留时间明显延长。研究表明氧

化苦参碱制成凝胶经皮给药后,能使血浆药物浓度长时间稳定地维持在一定水平。

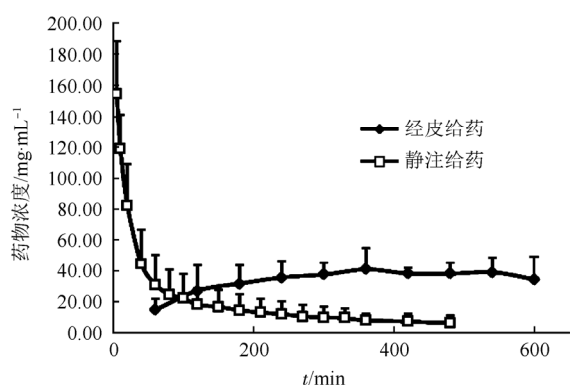


图5 氧化苦参碱静注给药($80\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)与经皮给药(4 cm^2 , 1 g)氧化苦参碱的血药-浓度时间曲线($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Fig. 5 The concentration versus time profile of oxymatrine in plasma after iv $80\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ and transdermal administration (4 cm^2 , 1 g) in rats ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

表4 氧化苦参碱静注给药($80\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)与经皮给药(4 cm^2 , 1 g)氧化苦参碱的主要药动学参数($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Tab. 4 Main pharmacokinetic parameters of oxymatrine in plasma after iv ($80\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) and transdermal administration (4 cm^2 , 1 g) in rats ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

参数	静注给药	经皮给药
$AUC_{(0-t)}/\text{min}\cdot\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$10\ 016.87\pm4\ 328.06$	$19\ 289.53\pm2\ 874.75^{(1)}$
$MRT_{(0-t)}/\text{min}$	122.31 ± 18.87	$346.01\pm32.55^{(1)}$
$T_{\max}/\text{min}$	7.50 ± 6.13	$430.00\pm158.37^{(1)}$
$C_{\max}/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	148.25 ± 34.05	$51.72\pm7.94^{(1)}$

注:与静注给药组相比, $^{(1)}P<0.01$ 。

Note: Compared with iv group, $^{(1)}P<0.01$.

4 讨论

经皮给药系统具有减少血药浓度波动、降低不良反应、患者用药方便,顺应性好等优点,理想的经皮吸收候选药物要求分子量 <600 ,熔点 <200 ,油水分配系数的对数值多在 $0\sim3$ 之间^[10],氧化苦参碱的分子量为 264 ,熔点为 $77\sim78\text{ }^{\circ}\text{C}$,油水分配系数的对数值为 0.41 ^[11],是较理想的候选药物。本研究先在一些预实验基础上选取最少的3个主要因素做正交试验,然后对正交试验得出的2个极具显著意义因素用单因素变化试验进一步筛选,缩小了影响因素试验的范围,比单用正交试验与单用单因素变化试验,减少了试验的工作量而又得到更优化的处方。

含药量对凝胶经皮渗透能力起主要作用,当含药量不断增加,药物的累积渗透量也在不断增加,但当含药量增加到一定程度,累积渗透量将

不会增加。为了提高药物的经皮渗透量,常用的方法是加入渗透促进剂。氮酮具有高效、低毒、不影响凝胶性质等优点,常作为经皮制剂的渗透促进剂,但其用量并不是越多越好,试验中, 11% 的水溶性氮酮与 8% 相比,药物的累积渗透量明显降低,说明当水溶性氮酮增加到一定浓度时,可能对药物的渗透起到阻滞作用,这与之前的研究结果类似^[12],所以最终选择了 8% 水溶性氮酮。在预试验中,通过对联合促渗剂进行筛选^[13],发现水溶性氮酮与丙二醇有一定的协同促渗作用,正式的筛选实验表明以 8% 水溶性氮酮+ 5% 丙二醇促渗作用较好。

薄荷油作为天然的渗透促进剂,有促渗作用强、起效快、不良反应小等优势^[14]。天然类与化学类促进剂联合使用能增加促渗效果,薄荷油组与无薄荷油组相比,能促进氧化苦参碱的渗透并缩短时滞,但随着薄荷油用量的增大,氧化苦参碱的累积渗透量反而有所降低,故选 5% 的薄荷油。本试验将天然类促进剂与化学类促进剂联合使用,能减少化学类促进剂的用量,降低皮肤的刺激性,并通过协同作用使主药发挥最大效能。

经皮给药体内药物浓度一般与给药面积呈正比,增大给药面积能增加体内药物浓度。本研究采用给药面积较小($2\text{ cm}\times2\text{ cm}$),相应时间就能超过静注 $80\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的AUC,说明筛选的处方渗透性非常好;体内血药浓度平稳,体外与体内相关性也良好。临床上治疗肝纤维化等的给药剂量一般为每天 $150\sim400\text{ mg}$ ^[15-16],筛选的凝胶在大鼠背部皮肤的平均渗透速率为 $(1.418\pm0.122)\text{ mg}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$,推算贴敷 12 cm^2 凝胶 24 h 的累积渗透量可达 408.38 mg ,渗透量很高,虽然人皮肤上的渗透可能会与此不一样,但人皮肤上的贴敷面积还可调整(临床最大面积可至 100 cm^2),预期能满足临床治疗的需要。

药动学研究考虑到凝胶贴敷性与需要给药面积保持不变,采用了大鼠麻醉状态下试验,一般最长试验时间 10 h 左右,以后可进一步研究清醒状态的给药情况,考察药动学特性的变化。从本试验血浆浓度-时间曲线图中(图5)可以预测氧化苦参碱凝胶还将继续维持一定浓度的药物水平。研究表明氧化苦参碱凝胶能持续释放药物,长时间维持血药浓度于一定水平,这一结果为开发氧化苦参碱经皮给药新剂型提供了一定的依据。

REFERENCES

- [1] ZHANG S, WU J, WANG H, et al. Liposomal oxymatrine in hepatic fibrosis treatment: formulation, *in vitro* and *in vivo* assessment [J]. AAPS PharmSciTech, 2014, 15(3): 620-629.
- [2] CUI X, WANG Y, KOKUDO N, et al. Traditional Chinese medicine and related active compounds against hepatitis B virus infection [J]. Biosci Trends, 2010, 4(2): 39-47.
- [3] DONG X Q, DU Q, YU WH, et al. Anti-inflammatory effects of oxymatrine through inhibition of nuclear factor-kappa B and mitogen-activated protein kinase activation in lipopolysaccharide-induced BV2 microglia cells [J]. Iran J Pharm Res, 2013, 12(1): 165-174.
- [4] WEI J, ZHU Y, XU G, et al. Oxymatrine extracted from sophora flavescens inhibited cell growth and induced apoptosis in human osteosarcoma MG-63 cells *in vitro* [J]. Cell Biochem Biophys, 2014, 70(2): 1439-1444.
- [5] WANG Y, XU Y H, XIONG A Q, et al. Proective effect of oxymatrine on chronic heart failure and ADMA metabolism pathway in isoproterenol-induced chronic heart failure in rats [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2014, 39(3): 471-477.
- [6] LI J L, HUANG H L. Epidemiological characteristics of adverse reation of oxymatrine on database analyze [J]. Anti-tumor Pharm(肿瘤药理学), 2011, 1(2): 142-149.
- [7] ALEXANDER A, DWIVEDI S, AJAZUDDIN, et al. Approaches for breaking the barriers of drug permeation through transdermal drug delivery [J]. J Control Release, 2012, 164(1): 26-40.
- [8] CHEN X L, LI J, DENG Z Y, et al. Regulating effect of oxymatrine on TGF- β 1 in CCl₄-induced hepatic fibrosis rats [J]. Chin J Pharmacol Bull(中国药理学通报), 2009, 25(6): 761-764.
- [9] JIAN Y C, LI W, HE Y, et al. Effect of oxmatrine on hepatic gene expression profile in experimental liver fibrosis of rat [J]. Chin J Integr Med(中国结合医学杂志), 2012, 18(4): 445-450.
- [10] LU B. New Techniques and New Dosage Forms of Drugs(药物新剂型与新技术) [M]. 2th Ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2005: 507-508.
- [11] ZHENG H. Studies on the cutaneous pharmacokinetics and metabolites of the alkaloids in rats [D]. Shanghai: The Second Military Medical University, 2007.
- [12] XU H, DAI L, SHEN C L, et al. Preparation and *in vitro* release of matrine gels [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2014, 20(1): 8-11.
- [13] LIANG Z Y, YANG J M, DU L F, et al. Study on percutaneous permeation of Ethosomes Gel of Cinnamon extract [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2013, 30(11): 1202-1206.
- [14] HUA N, LU W, GUO R C. Development and evaluation of terpene penetration enhancers [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2008, 33 (24): 2875-2881.
- [15] 梁建新, 屈杏芬, 曾文铤, 等. 氧化苦参碱治疗慢性乙型肝炎肝纤维化的作用机制[J]. 中国老年学杂志, 2010, 6(30): 1505-1507.
- [16] MENG Z J, CHEN Y, TANG S B, et al. Clinic investigation of oxymatrine for therapy of chronic hepatitis B [J]. Chin J Inf TCM(中国中医药信息杂志), 2005, 12(4): 10-11.

收稿日期: 2015-05-26

Box-Behnken 效应面法优化苦参碱类脂囊泡的处方

王建筑, 毕研平, 李菲, 郝吉福(泰山医学院药学院, 山东 泰安 271016)

摘要: 目的 通过 Box-Behnken 试验设计, 优选苦参碱类脂囊泡的最佳处方。方法 采用 3 因素 3 水平 Box-Behnken 优化设计, 逆向蒸发法制备苦参碱类脂囊泡, 利用效应面法对影响包封率和载药量的因素进行考察, 采用二次多项式模型描述各指标与因素间的数学关系, 最后对优化处方进行验证。**结果** 优化处方为: 山梨醇酐单硬脂酸酯与胆固醇比例为 2.64:1, 药物与类脂材料比例为 1:5.15, 有机相水相比例为 5:1。制得的囊泡包封率为 46.02%, 载药量为 13.20%。**结论** 采用 Box-Behnken 效应面法得到了苦参碱类脂囊泡的优化模型, 实现了处方优化, 各项指标与预测值均能较好地吻合, 模型选用合理有效。

关键词: 苦参碱; 非离子表面活性剂囊泡; Box-Behnken 设计

中图分类号: R944.9

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2015)11-1342-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.11.013

Optimization on Formulation of the Matrine Noisomes by Box-Behnken Design and Response Surface Methodology

WANG Jianzhu, BI Yanping, LI Fei, HAO Jifu(Pharmacy Department of Taishan Medical College, Taian 271016, China)

基金项目: 泰安市科技发展规划(201440774-16)

作者简介: 王建筑, 男, 硕士, 讲师

Tel: 13668681261

E-mail: jzwang@tsmc.edu.cn