

纳洛酮醇质体的经皮渗透研究

冯璇^{1,2}, 许东航^{1,2*}, 徐翔², 章琴³ (1. 浙江大学药学院, 杭州 310031; 2. 浙江大学医学院附属第二医院, 杭州 310009; 3. 浙江中医药大学, 杭州 310053)

摘要:目的 考察以醇质体为载体的纳洛酮经皮给药的可行性以及醇浓度、药物含量对药物渗透速率的影响。方法 采用注入法制醇质体,以SD雄性大鼠皮肤为媒介, Franz单室扩散池为体外模型,用HPLC法测定透过皮肤的纳洛酮含量。求算累积渗透量、稳态透皮速率和皮肤中的滞留量,考察醇浓度和药物含量对渗透速率的影响。结果 纳洛酮为 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,含醇20%、30%、40%和50%的醇质体稳态透皮速率分别为 (54.3 ± 3.6) 、 (92.0 ± 8.8) 、 (111.4 ± 22.6) 和 $(139.8 \pm 7.6) \mu\text{g} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$,与纳洛酮水溶液 $(30.9 \pm 3.4) \mu\text{g} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ 相比,其增渗倍数分别为1.76、2.98、3.61和4.52倍;在皮肤中的滞留量和时滞的顺序一致:50%醇质体 > 40%醇质体 > 30%醇质体 > 20%醇质体 > 药物水溶液。含纳洛酮0.625、1.25、2.5、5、7.5和 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的30%的醇质体,其渗透速率分别为 (2.8 ± 1.3) 、 (15.1 ± 2.4) 、 (43.8 ± 5.0) 、 (92.0 ± 8.8) 、 (145.2 ± 4.6) 和 $(193.8 \pm 5.7) \mu\text{g} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ 。结论 醇质体能显著地促进渗透,增加药物在皮肤中的滞留量。随着醇质体内醇的含量增加,其渗透速率增加。醇质体内药物含量增加,渗透速率也增加。

关键词: 纳洛酮,醇质体,经皮

中图分类号: R944.1; R943.43

文献标识码: A

文章编号: 1007-7693(2008)01-0037-03

Study on Percutaneous Permeation of Naloxone Ethosomes

FENG Xuan^{1,2}, XU Dong-hang^{1,2*}, XU Xiang², ZHANG Qin³ (1. College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University, Hangzhou, 310058, China; 2. Second Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310009, China; 3. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the possibility of percutaneous transport of naloxone which is carried by ethosomes, and the effect of the concentrations of ethanol and naloxone content on the permeation rate. **METHODS** Naloxone ethosomes was prepared by injection method. With the skin of SD male rat, the penetration experiments in vitro were performed on modified Franz diffusion cells. The amount of drug penetration concentrations of naloxone was determined by HPLC. The accumulation of drug-penetration, the steady penetration rate for different concentration of ethanol and naloxone content were calculated. **RESULTS** Keeping the concentrations of naloxone at $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, the steady rate of naloxone ethosomes with 20%, 30%, 40%, 50% ethanol were (54.3 ± 3.6) 、 (92.0 ± 8.8) 、 (111.4 ± 22.6) and $(139.8 \pm 7.6) \mu\text{g} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$, respectively. The value was 1.76, 2.98, 3.61 and 4.52 higher than that of naloxone aqueous solution [$(30.9 \pm 3.4) \mu\text{g} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$]. The order of drug amount accumulated in skin was: 50% > 40% > 30% > 20% naloxone ethosomes > drug aqueous solution. The steady rate of naloxone ethosomes with 0.625, 1.25, 2.5, 5, 7.5 and $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ naloxone were (2.8 ± 1.3) 、 (15.1 ± 2.4) 、 (43.8 ± 5.0) 、 (92.0 ± 8.8) 、 (145.2 ± 4.6) and $(193.8 \pm 5.7) \mu\text{g} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$, respectively. **CONCLUSION** Ethosomes can strikingly improve permeation, and increase the skin accumulation of drug. The steady state flux of naloxone increased with increasing the concentration of ethanol and naloxone content.

KEY WORDS: naloxone; ethosomes; percutaneous penetration

药物经皮给药系统,可避免肝脏的首关效应及胃肠道的降解,维持稳定、持久的血药浓度,降低药物毒性和不良反应,减少给药次数,提高疗效,所以受到越来越多的关注。但皮肤角质层的屏障作用,使大部分药物的透皮速率很低,达不到治疗浓度。有文献报道将磷脂、乙醇和水制备醇质体具有脂质双分子层的囊泡,将其应用于经皮给药,能显著地促

进药物渗透速率^[1-2],增加皮肤中的累积量^[2-3]。

纳洛酮(naloxone)是特异性阿片受体拮抗剂,它与吗啡受体的亲和力比吗啡或β-内啡肽大,能竞争性阻止并取代吗啡样物质的作用。它的应用非常广泛,能有效治疗阿片类药物滥用引起的各种症状,如急性中毒的解救,急性乙醇中毒,各型休克,镇静催眠药中毒,有机磷中毒,脑梗塞,心肺脑复

作者简介:冯璇,女,主管药师

* 通讯作者:许东航,男,硕士生导师,副主任药师

E-mail: xudonghang@zju.edu.cn

苏,乙型脑病等,但由于纳洛酮的首关效应大,口服通常无效,目前主要采用皮下注射、肌内注射或静脉滴注给药方式,由于纳洛酮半衰期短,作用持续时间仅 45~90 min,因此需重复给药,使用不便。由于其良好的油水分配系数 ($K_{o/w} = 0.54 \pm 0.15$)^[4],非常适合开发为经皮制剂^[5-7],用于解酒。但普通经皮给药制剂无法达到治疗浓度,若将其制备成醇质体,可达到有效浓度。

1 仪器和试剂

LC-10AT vp 高效液相色谱仪,SPD-10A vp 可变波长紫外监测器,N-2000 双通道色谱工作站(浙江大学智能信息工程研究所),HT-230A 保温箱;Dikma Diamond C₁₈ 色谱柱(5 μm,250 mm × 4.6 mm),85-2 型恒温磁力搅拌器(上海司乐仪器厂),TK-12B 型 Franz 单室扩散池(S=2.8 cm²,V=7 mL,上海谱凯贸易有限公司);纳洛酮(Sigma-Aldrich 公司),磷脂酰胆碱(北京华清美恒天然产物技术开发有限公司),乙醇为分析醇,甲醇、乙腈为色谱纯。

2 实验方法

2.1 制备离体皮肤

取重约 150 g 的雄性 SD 大鼠(浙江中医药大学提供),断颈处死,剪去腹部皮肤毛,剪取皮肤,剥离皮下脂肪组织,冰箱 4℃ 取用。

2.2 制备空白接受液

采用改良的 Franz 单室扩散池,以蒸馏水作为供应室介质,pH 7.4 磷酸缓冲液为接受室溶液,皮肤夹于两室之间,真皮面向接受室,控制水温为 37℃。间隔一定时间取出全部接受液,并补充等量的接受液。收集接受液备用,作为空白接受液。

2.3 纳洛酮 HPLC 测定条件

色谱柱:Dikma C₁₈(250 mm × 4.6 mm),流动相:0.1 mol · L⁻¹ 磷酸盐缓冲液(pH 4.0) 甲醇-乙腈(75:15:10);检测波长:240 nm;流速 1.0 mL · min⁻¹;柱温 35℃;进样量 20 μL。

2.4 纳洛酮 HPLC 标准曲线的建立

采用峰面积定量法:精密称取纳洛酮适量,双蒸水溶解,冰箱 4℃ 备用,作为纳洛酮对照品储备液。分别精密量取储备液适量,加入“2.1”制的空白接受液使浓度分别为 0.878, 1.756, 3.512, 8.78, 17.56, 35.12 μg · mL⁻¹ 的对照品系列溶液。

2.5 纳洛酮醇质体的制备

精密称取纳洛酮和磷脂酰胆碱适量,用适量乙醇溶解,在搅拌下加蒸馏水适量,过 0.22 μm 微孔滤膜,冷藏备用。

2.6 纳洛酮脂质体的制备

精密称取磷脂酰胆碱适量,用氯仿溶解,薄膜分散后,以纳洛酮水溶液溶解,超声制得脂质体,冷藏备用。

2.7 纳洛酮经皮给药方法

将皮肤固定在改良的 Franz 单室扩散池上,控制水浴温度为 37℃,以 pH 7.4 磷酸缓冲液为接受介质,在供应室上加入适量制备的样品,密封,每隔 1 h 取样,测定。直到稳态。根据标准曲线,接受室体积和有效扩散面积,求得稳态透皮

速率和累积渗透量。

2.8 皮肤中纳洛酮浓度测定

达到稳态时,取出皮肤,倒出液体,捣碎皮肤,取流动相 2 mL 提取,测定其中药物含量。

3 结果

3.1 纳洛酮测定方法建立按“2.3”下进样,回归得到标准曲线为:

$$y = 2384.8x + 456.7, r = 0.9999$$

说明纳洛酮溶液在 0.878~3.512 μg · mL⁻¹ 内,峰面积与浓度呈良好的线性关系。并将 0.878, 3.512, 35.12 μg · mL⁻¹ 分别作为质控,进行专一性、准确性与精密度、回收率以及稳定性研究,结果符合 FDA 关于生物样本检测的要求^[8],说明我们建立的方法可以用于纳洛酮体外经皮给药研究的药物浓度测定。

3.2 分别制备含 5 mg · mL⁻¹ 纳洛酮的水溶液、醇溶液、脂质体和不同醇含量的醇质体,进行了透皮给药,其稳态透皮速率、皮肤中的滞留量见表 1。

表 1 乙醇含量对纳洛酮透皮速率的影响

Tab 1 Effect of ethanol concentration on the steady rate of naloxone

乙醇含量	稳态透皮速率 /μg · h ⁻¹ · cm ⁻²	增渗倍数 (ER)	稳态时在皮肤中的滞留量/μg
水溶液	30.9 ± 3.4	4/4	118.2 ± 5.2
30%醇溶液	68.3 ± 5.8	4/4	154.0 ± 21.8
脂质体	60.2 ± 1.3	4/4	205.8 ± 30.7
20%醇质体	54.3 ± 3.6	1.76	270.8 ± 39.8
30%醇质体	92.0 ± 8.8	2.98	497.0 ± 60.7
40%醇质体	111.4 ± 22.6	3.61	666.8 ± 7.4
50%醇质体	139.8 ± 7.6	4.52	775.2 ± 36.2

注:增渗倍数=醇质体稳态透皮速率/水溶液透皮速率

Note: the enhancing rate(ER) = the steady rate of ethosomes / the steady rate of aqueous solution

3.3 制备不同药物含量的 30% 的醇质体,进行透皮给药,其稳态透皮速率、皮肤中的滞留量见表 2。

表 2 药物含量对醇质体透皮速率的影响

Tab 2 Effect of naloxone content on the steady rate of ethosomes

纳洛酮浓度 /mg · mL ⁻¹	稳态透皮速率 /μg · h ⁻¹ · cm ⁻²	稳态时在皮肤中的滞留量/μg
0.625	2.8 ± 1.3	66.8 ± 9.4
1.25	15.1 ± 2.4	106.0 ± 13.6
2.5	43.8 ± 5.0	143.2 ± 24.6
5.0	92.0 ± 8.8	497.0 ± 60.7
7.5	145.2 ± 4.6	622.4 ± 19.4
10.0	193.8 ± 5.7	832.0 ± 14.8

4 讨论

笔者建立的 HPLC 测定纳洛酮方法简单、方便,可以满足纳洛酮经皮给药体外测定要求。

醇质体能显著促进药物的渗透速率,且随乙醇浓度的升高渗透速率明显增加,在 50% 时,渗透速率达最大值,这是因

为药物在水溶液中不能深入渗透皮肤,仅停留在皮肤的表层,而醇质体对药物的包裹率更高,且能更好地分散在皮肤中,能深入皮肤角质层,克服皮肤的屏障作用,使得药物经皮传递效率更高,达到较好的渗透效果。药物在皮肤中的累积量也随醇的浓度的升高而增加。

有文献报道药物溶于乙醇和水的混合溶液时,随着乙醇浓度的升高,药物透皮速率先增大,然后呈现减小的趋势,在乙醇浓度为 66%时,透皮速率达到最大值^[7]。它解释为乙醇蒸发,热力学运动加剧所产生的推力和拉力作用。而醇质体的透皮速率在乙醇 50%时为最大值,但是当乙醇的浓度 >30%时,累积渗透量在 24 h 内的增加并不显著,这可能是高浓度的醇质体达到透皮稳态的速率较低浓度的慢,也可能是醇浓度高的醇质体促进了药物在皮肤中的累积,对药物进入接受室有轻微的抑制作用。也有文献^[2]报道高浓度的乙醇会破坏醇质体的囊泡,对醇质体形成不利,故醇质体系统中乙醇浓度一般 ≤ 50%。本实验结果是醇含量在 20% ~ 50%内,药物渗透速率随醇含量的增加而增加,渗透速率增渗倍数(纳洛酮水溶液作为参照)和醇浓度有较好的线性关系: $y = 0.0891x + 0.099$, $R^2 = 0.9847$ 。

本实验比较了相同醇含量的纳洛酮醇质体和醇溶液的经皮渗透速率,结果前者为后者的 1.35 倍,其皮肤的滞留量也比后者高的多 (497.0 ± 60.7 vs 154.0 ± 21.8 , 见表 1)。说明醇质体是很好的经皮给药载体。

文献报道脂质体也是很好的促渗方法^[9],笔者采用不同制备方法制备了纳洛酮脂质体。结果显示和溶液相比,脂质体促进了纳洛酮经皮渗透(数据未显示)。根据渗透速率和制备的稳定性,最后选择本实验的脂质体处方作为醇质体对照,比较了不同浓度的醇质体和脂质体渗透速率和皮肤中的滞留量。结果 20%醇质体和脂质体渗透速率及皮肤滞留量相仿。但 30%, 40%和 50%的醇质体渗透速率及皮肤滞留量显著高于脂质体 ($P < 0.05$)。

制备了不同浓度的 30%醇质体,发现随着药物浓度的增加,其稳态渗透速率也增加。这和普通经皮制剂释药性质相似。同样,将药物渗透速率与药物浓度进行回归: $y = 20.416x - 9.3296$, $R^2 = 0.9997$ 。

一定浓度的醇质体能促进药物的渗透速率,增加药物累积渗透量,为较好的经皮给药载体。

REFERENCES

- [1] GODIN B, TOUITOU E. Ethosomes: new prospects in transdermal delivery [J]. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 2003, 20(1): 63-102.
- [2] TOUITOU E, DAYAN N, BERGELSON L, *et al*. Ethosomes - novel vesicular carriers for enhanced delivery: characterization and skin penetration properties [J]. *J Controlled Release*, 2000, 65(3): 403-418.
- [3] RAO Y F, LI F, LIANG W Q. Study on transdermal permeation and skin accumulation of flinasteride ethosomes [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2004, 39(12): 923-925.
- [4] JAISWAL J, PODURI R, PANCHAGNULA R. Transdermal delivery of naloxone: ex vivo permeation studies [J]. *Int J Pharm*, 1999, 179(1): 129-134.
- [5] PANCHAGNULA R, BOKALIAL R, SHARMA P, *et al*. Transdermal delivery of naloxone: skin permeation, pharmacokinetic, irritancy and stability studies [J]. *Int J Pharm*, 2005, 293(1-2): 213-223.
- [6] PANCHAGNULA R, SHARMA P, KHANDAVILLIS, *et al*. RP-HPLC method and its validation for the determination of naloxone from a novel transdermal formulation [J]. *Farmaco*, 2004, 59(10): 839-842.
- [7] PANCHAGNULA R, SALVE P S, THOMAS N S, *et al*. Transdermal delivery of naloxone: effect of water, propylene glycol, ethanol and their binary combinations on permeation through rat skin [J]. *Int J Pharm*, 2001, 219(1-2): 95-105.
- [8] US Food and Drug Administration. Center for drug evaluation and research. guidance for industry: bioanalytical method validation [EB/OL]. [2001-5]. <http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.htm>.
- [9] XU D H, XU X, LIANG W Q. The trends and development of liposome for transdermal drug delivery [J]. *Chin J Mod Appl Pharm* (中国现代应用药学), 2005, 22(6): 465-468.