DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.06.015
第26卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 6
2004年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2004

文章编号:1000-5404(2004)06-0509-04

论著

双氯芬酸钾脂质体制剂的制备及大鼠体外透皮研究

赵 凯,王 昆,张敬如,蔡明志,黄复生 (第三军医大学基础医学部病原生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 研究双氯芬酸钾(DP)脂质体制剂的制备及体外的经皮吸收特点。方法 采用改良均质法制备DP钾脂质体制剂;采用改良Franz扩散池,研究DP脂质体制剂与上市凝胶制剂大鼠皮肤的体外透皮吸收差异。结果 改良均质法制备的DP脂质体,平均粒径为345 nm,粒径分布比较均匀,包封率为87.3%。体外透皮实验中,DP脂质体制剂较凝胶制剂的透皮能力高($P<0.05$)。结论 脂质体包封的双氯芬酸钾制剂质地均一,稳定,能有效地渗透过皮肤。

关键词:脂质体;双氯芬酸钾;体外;皮肤渗透
中图法分类号:R334.5;R944.15;R977.1 文献标识码:A

Preparation of liposomal diclofenac potassium formulation and its percutaneous penetration *in vitro* in rats

ZHAO Kai, WANG Kun, ZHANG Jing-ru, CAI Ming-zhi, HUANG Fu-sheng (Department of Pathogenic Biology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To study the preparation of topical liposomal diclofenac potassium (DP) formulation and the percutaneous absorption *in vitro*. **Methods** DP was encapsuled in liposome. The difference of *in vitro* percutaneous absorption of DP formulation and commercial gel formulation in modified Franz diffusion device was observed. **Results** The diameter of liposomal DP formulation was around 345 nm. The liposomal DP formulation could penetrate through the rat skin more effectively *in vitro*, as compared with that of the commercial gel formulation. The rate of percutaneous penetration of liposomal DP formulation was higher than that of commercial gel formulation ($P<0.05$). **Conclusion** The liposomal DP formulation can penetrate through the skin more effectively than the commercial gel formulation.

Key words: liposome; diclofenac potassium; *in vitro*; percutaneous penetration

双氯芬酸钾(diclofenac potassium, DP)为邻氨基苯甲酸非甾体类抗炎药物,临床广泛用于抗风湿、消炎、镇痛和退热的治疗,但口服给药易产生胃肠刺激、肝损害等不良反应。目前,非全身性给药途径成为DP给药的研究热点。脂质体以其良好的皮肤促渗作用、生物兼容性和作为新的皮肤局部给药载体系统已受到广泛重视,故本研究采用脂质体包被DP,旨在一方面通过皮肤给药,避免肝首过效应和胃肠刺激等副作用,进一步提高该药的安全性,另一方面与已上市的DP凝胶制剂比较,是否较之增加透皮吸收率,为此我们对DP脂质体制剂和上市的DP凝胶制剂进行了大鼠体外的透皮吸收研究。

1 材料和方法

1.1 实验材料

Waters高效液相色谱仪,包括2487检测仪,515泵(美国);Sartorius BS110S电子天平(德国);Grant Y14恒温水浴循环系统(英国);MILLIPORE Simplicity 185纯水机(美国);GAST(tm) DQA-V130-BN真空泵(美国);改良Franz体外扩散池(自制);磷脂(DERMOPRO公司,美国);胆固醇(DERMOPRO公司,美国);DP原料药(西南药业提供);DP凝胶制剂(购自重庆科瑞公司,商品名"迪普");甲醇(Honeywell international公司,美国,色谱纯);其它试剂为分析纯;Wistar雄性大鼠,15~20周龄,由第三军医大学实验动物中心提供。

1.2 DP脂质体制剂的制备

采用改良均质法,精密称取磷脂10 g、胆固醇1 g,双氯芬酸钾2 g,加热至85 ℃左右,然后喷射加入100 ml用氮气饱和的注射用水混合,不断搅拌,再于旋风式匀浆器处理30 min,用DERMOPRO公司提供的稳定过滤支持剂透析和粒径成型器处

基金项目:中关村科技生物医药创新研究基金资助项目(2000-2)
Supported by the Research Foundation for Innovation of Science and Technology of Biomedicine in Zhongguanchun (Beijing, China, 2000-2)
作者简介:赵 凯(1975-),男,河南省郑州市人,硕士,助教,主要从事脂质体方面的研究。电话:(023)68752243
通信作者:黄复生,电话:(023)68752244;E-mial:fushengh@mail.tmmu.edu.cn
收稿日期:2003-10-30;修回日期:2004-01-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

理样品，样品充氮气密封，即得2%浓度的DP脂质体。取一定体积的上述脂质体加入同体积的CARBOPOL空白凝胶，搅拌，即获得含量为1%的DP脂质体凝胶外用制剂。

1.3 DP脂质体制剂稳定性预测

1.3.1 不同条件状态下的 ①常温状态下，分别将DP脂质体10 ml于3 000、5 000、10 000、15 000、20 000 r/min离心10 min，观察有无沉淀和分层现象发生。②40 ℃孵浴24 h后，分别将DP脂质体10 ml于3 000、5 000、10 000、15 000、20 000 r/min离心10 min，观察有无沉淀和分层现象发生。③4 ℃冷藏24 h，分别将DP脂质体10 ml于3 000、5 000、10 000、15 000、20 000 rpm离心10 min，观察有无沉淀和分层现象发生。

1.3.2 激光散射学检测 取1 ml DP脂质体，用PBS缓冲液100 ml稀释后用激光粒度分析仪进行测定，经动态光散射处理软件处理。

1.3.3 包封率的测定 精密量取DP脂质体制剂1 ml置12 ml容量超高速冷冻离心管中，PBS缓冲溶液稀释配平，100 000 r/min离心2 h，吸取上清，补足缓冲液，再次以100 000 r/min离心30 min。收集上清，进样20 μl，HPLC检测DP含量。并按下式计算制备包封率(EN%)：EN%＝(Wt-Ws)/Wt×100%。其中Ws，Wt分别表示上清中药物含量和总药量。

1.4 体外透皮实验。

取大鼠12只，等分为DP脂质体凝胶制剂组和凝胶制剂组。用剃刀和脱毛剂脱腹部毛，然后用温水清洗，24 h后选择皮肤完好的区域，剪下腹部皮肤。仔细修剪皮下脂肪、结缔组织，用生理盐水冲洗数遍，用生理盐水纱布覆盖，备用。采用改良Franz扩散池，口径2.54 cm^2，接受池体积(14±0.5) cm^3，加入50 mmol/L的PBS，池内置磁力搅拌子，转速约300 r/min。恒温37 ℃水浴循环[1]。将准备好的大鼠皮覆盖于接受池上，角质层朝上。接受池注入14 ml PBS，平衡30 min后，更换接受液，排尽鼠皮下的空气，滤纸吸干皮肤表面的液体。分别将脂质体凝胶制剂和凝胶制剂按2 mg/样本的量小心加在鼠皮上，对比DP脂质体制剂与普通DP凝胶市售制剂的体外透皮效果。随机取大鼠24只，等分为2、5、10、15 mg给药组，皮肤准备同上述方法，将DP脂质体凝胶按2、5、10、15 mg /样本的量小心加在鼠皮上，轻轻拨平，使之平铺在鼠皮上，夹紧供给池。于2、4、6、8、10、12 h抽取4 ml接受液，同时补充等体积37 ℃接受液。样品经0.4 μm滤膜过滤，置于4 ℃备用。

1.5 样品的检测(HPLC 检测)[2]

1.5.1 HPLC分析条件 流动相，甲醇∶水∶36%乙酸＝67∶33∶2；用前真空抽滤除气；固定相采用Waters (tm) Symmetry Shield RP18色谱柱，3.9 mm×150 mm；流速，1 ml/min；柱温，室温；检测波长，275 nm；灵敏度，0.01 AUFS，进样量20 μl。

1.5.2 标准曲线制备 称取经105 ℃干燥至恒重的DP，用PBS分别配制为浓度为50、100、500、2 000、5 000 ng/ml的标准溶液，进行HPLC检测，以样品峰峰面积(A)为横坐标，以DP浓度(C)为纵坐标进行线性回归。得方程：C＝0.0271A－17.588，R＝0.9999。当信噪比为2时，最低检测限为25 ng/ml。

1.5.3 回收率和精密度测定 精确配制50、200、2 000 ng/ml的标准液3份，反复进样5次测定回收率。

1.5.4 样品测定 根据每个取样点样品的浓度，依下式计算累计透皮量Q ($\mu g/cm^2$)。

$$Q=(Cn\times 14+\sum_{i=1}^{n-1}Ci\times 4)/A$$

式中Cn为第n个取样点测得的药物浓度，Ci为该取样点前各点的测定浓度，A为渗透面积。以扩散平衡后的Q对渗透时间t进行回归，所得的直线斜率即为渗透速率常数Pm($\mu g/cm^2\cdot h$)。

1.6 统计学处理

采用χ^2检验。

2 结果

2.1 DP脂质体制剂外观评价和初步稳定性预测

①改良均质法制备的DP脂质体为乳白色胶体溶液，经不同条件状态下离心后均无沉淀和分层现象发生，制备的外用脂质体凝胶样品为淡黄色水溶性透明凝胶制剂，质地均一，稠度适宜，胶体均匀细腻，涂展性好。②激光散射学研究。结果见图1。测定结果表明，改良均质法制备的DP脂质体，平均粒径为345 nm，粒径分布比较均匀。③本实验制备的DP脂质体的包封率为87.3%，制剂中DP含量为10 mg/ml，实验结果重现性好。

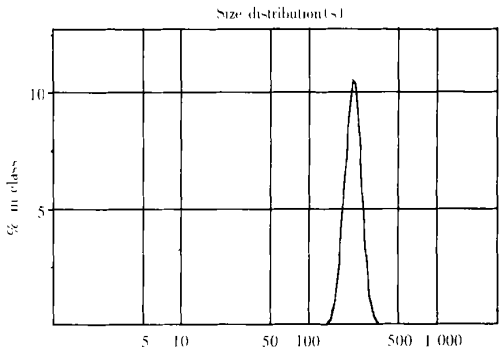


图1 DP脂质体粒径结果

Fig 1 Results of the diameter of DP liposome

2.2 透皮结果

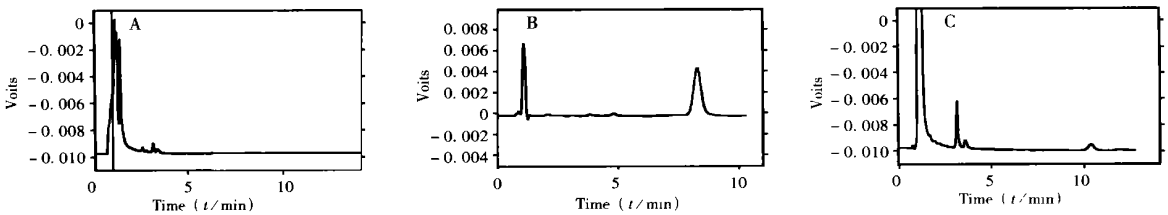
2.2.1 色谱行为 在上述色谱条件下，DP的保留时间为11 min左右，无杂峰干扰，见图2。

2.2.2 回收率和精密度测定 测得的回收率数据：50 ng/ml组为89.6%，200 ng/ml组为98.6%，2 000 ng/ml组为97%。日内误差分别为：9.26%，3.68%，3.16%。

2.2.3 DP脂质体制剂与DP凝胶制剂的时间透皮曲线比较

累积透皮结果见图3。脂质体制剂于2 h时相点的释放浓度较传统DP凝胶制剂高($P<0.05$)，在随后的时相点，这种差异更显著($P<0.01$)。脂质体制剂的累积渗透速率方程为：Q＝18.57t－27.18，r＝0.986；DP凝胶制剂的累积渗透速率方程为：Q＝5.04t－1.93，r＝0.996。DP脂质体组的渗透速率常数Pm较凝胶组有非常显著的差异($P<0.01$)。DP脂质体制剂在透皮量和透皮速率上均较DP凝胶制剂存在明显的优势，并随着给药时间的延长，这种优势也越明显。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



A: Blank; B: Standard DP; C: Sample containing DP

图 2　DP 色谱图

Fig 2　Chromatogram of DP

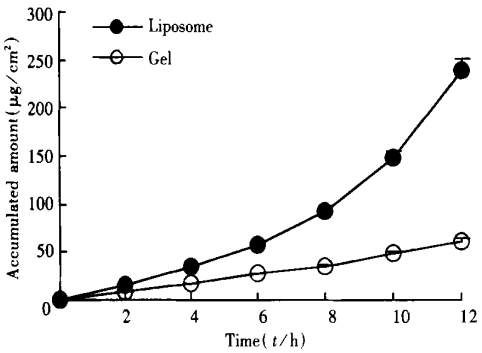


图 3　脂质体组和凝胶制剂组的体外释放曲线(n= 6)

Fig 3　*In vitro* release curves of liposomal formulation and common commercial gel formulation (n= 6)

2.2.4　不同上样量对体外透皮的影响　　随着加样量的增加, DP 的透皮量也随之增加, 结果见图 4。在 2 h 时相点, 2 mg 组的透皮量最低, 较 10 mg 组和 15 mg 组有非常显著的差异(P < 0.01), 而与 5 mg 组无显著性差异。在 4 ~ 6 h 时相点, 15 mg 组同其它 3 组的差异均明显(P< 0.05, P< 0.01), 而 2 mg 组与 5 mg 组无显著性差异。

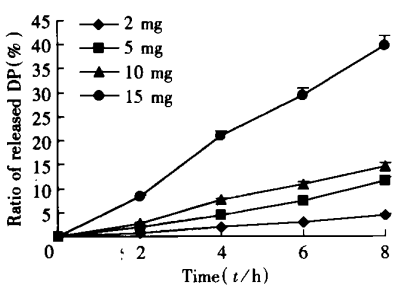


图 4　不同上样量的体外释放曲线(n= 6)

Fig 4　*In vitro* release curves of different dosages of administration (n=6)

在 8 h 时相点, 2 mg 组与 5 mg 组出现显著性的差异(P< 0.05), 15 mg 组的浓度均大于其它 3 组的浓度(P< 0.05, P< 0.01)。

3　讨论

本实验中采用 HPLC 作为检测 DP 的方法。HPLC 检测杂质的灵敏度为 0.1%或更低, 并可获得很好的准确度、精密度, 且重复性较好。用 HPLC 分析杂质, 可根据不同的分析要求选择不同分离机制的色谱类型, 如正相、反相、分配等。对小分子药物, 常用反相 HPLC 分析, 通过调节流动相可获得不同的选择性。DP 在本实验所选用的 HPLC 条件下, 保留时间在 11 min 左右, 峰形对称, 分离度好, 无其它杂质峰的干扰。DP 低浓度和较高浓度回收率的误差较小, 有着较高的重复性。

选用改良匀质法制备的 DP 脂质体, 工艺成熟, 配方比例合理, 制剂粒径均匀, 包封率高, 稳定性好, 各项指标均达到实验需要。

脂质体是一种定向药物载体, 它具有类细胞结构, 有亲脂性, 可以和皮肤表面融合, 有利于药物吸收。与凝胶制剂相比, 脂质体组的渗透速率常数 Pm 较凝胶组大, 说明脂质体制剂较凝胶制剂的透皮速率高, 其可能的机制是脂质体能增加角质层湿化和水合作用, 使角质细胞间结构改变, 脂质双层中疏水性尾部排列紊乱, 药物通过扩散等作用进入细胞间质[3]; 同时脂质体的磷脂与表皮脂质屏障中的脂质层融合, 使角质层脂质组成和结构改变, 形成一种扁平的颗粒状结构, 使其屏障作用发生逆转, 包封有药物的脂质体可顺利通过这些脂质颗粒的间隙, 而促进药物透皮吸收[4]; 另外脂质体可经皮脂腺、汗腺、毛囊甚至直接穿透皮肤角质层进入皮肤深层、皮下组织, 达到透皮作用[5]。本实验中, 脂质体组在 4 h 后透皮更加明显, 这可能是脂质体制剂促进药物大量穿透皮肤屏障的结果。

上样量对体外透皮的影响比较明显, 但 2 mg 和 5 mg 组之间无显著性差异, 即 DP 脂质体制剂的给药剂量在 0.8 ~ 2 mg/cm² 对透皮量的影响不明显, 提示在此范围内不能通过简单的增加剂量以增加疗效, 而应该

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

从其它途径对制剂进行优化，以期得到更好的透皮效果。

参考文献：

[1] 徐叔云，卞如濂，陈 修. 药理实验方法学[M]. 北京：人民卫生出版社，2002. 1.

[2] Klimes J, Sochor J, Dolezal P, *et al*. HPLC evaluation of diclofenac in transdermal therapeutic preparations[J]. Int J Pharm, 2001, 217(1-2): 153－160.

[3] McNeely W, Goa K. Diclofenac-potassium in migraine：a review [J]. Drugs, 1999, 57(6)：991－1003.

[4] Meisner D, Mezei M. Liposome ocular delivery systems [J]. Advanced Drug Delivery Rev, 1995, 16(1)：75－93.

[5] Maghraby G M, Williams A C, Barry B W. Skin delivery of oestradiol from deformable and traditional liposomes：mechanistic studies[J]. J Pharm Pharmacol, 1999, 51(10)：1123－1134.

（编辑 冯崇英）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2004)06-0512-02

法莫替丁联合无环鸟苷治疗 HSV 感染性上皮性角膜炎 124 例

Clinical observation of 124 cases of HSV corneal ulcer treated by famotidine and acyclovir

陈 康，谢汉平 （第三军医大学西南医院全军眼科中心，重庆 400038）

单纯疱疹性感染性上皮性角膜炎是由单纯疱疹病毒(herpes simplex virus, HSV)引起，主要侵犯角膜上皮。根据病理生理学改变将其分为：角膜小泡、树枝状溃疡、地图状溃疡和边缘性溃疡[1]。本研究以甘泰片作对照，进行法莫替丁治疗单纯疱疹性上皮性角膜炎的临床效果对比。

1 临床资料

1.1 病例资料

收集从2001年5月至2003在本院门诊就医的HSV感染性上皮性角膜炎患者124名，其中男性82例(82眼)，女性42例(42眼)，年龄14～53岁。将其随机均分为2组，每组62名。分别采用法莫替丁、甘泰片治疗，通过单盲实验比较疗效。单纯性角膜小泡很少见，予以剔出，树枝状溃疡72眼，地图状溃疡31眼，边缘性角膜溃疡21只眼。随访3个月至1年，对疑似病例收集泪液做普通PCR检查确诊，剔除其他侵犯角膜上皮以组织的单纯疱疹性病毒性角膜炎，如：神经营养性角膜病变、基质性角膜炎、角膜内皮炎等。

1.2 治疗方法

法莫替丁组和甘泰组均用0.1%无环鸟苷滴眼6次/d，法莫替丁组口服法莫替丁20 mg，3次/d，甘泰组口服甘泰片0.2，3次/d，连续3周，服药后3 d、1周、2周、3周定期复查，以后间断随访。

1.3 疗效评价

按疗效分为三级：①治愈：眼部无刺激症状，结膜充血消失，荧光素染色阴性，角膜无水肿。②显效：眼部刺激症状缓解，结膜充血，溃疡变小变浅，荧光素染色阴性或阳性面积缩小，角膜局部水肿减轻。③无效：眼部刺激症状持续或加重，结膜充血明显，角膜溃疡无好转或扩大，荧光素染色持续阳性，角膜水肿明显。

1.4 统计学处理

采用χ^2检验。

2 结果

法莫替丁组的单纯疱疹性角膜溃疡平均治愈时间是(10.23±2.25) d，甘泰片组为(14.37±4.58) d，两组差异显著($P<0.01$)。法莫替丁副作用较少，偶见倦怠、乏力(4人)，腹泻(3人)，无其它不良反应。

表1 法莫替丁和甘泰治疗三种HSV角膜溃疡的疗效比较

	法莫替丁			甘泰片		
	治愈	显效	无效	治愈	显效	无效
树枝状溃疡(只)	30	4	2	25	7	4
地图样溃疡(只)	13	3	1	6	5	3
边缘性溃疡(只)	7	2	2	4	4	2

患者总治愈率：法莫替丁组78.13%，甘泰组58.33%，差异显著($P<0.01$)。其中①树枝状溃疡治愈率法莫替丁组83.33%，甘泰组69.44%，两组差异显著($P<0.05$)。②地图样溃疡治愈率法莫替丁组76.47%，甘泰组42.86%，两组差异显著($P<0.01$)。③边缘性溃疡治愈率法莫替丁组63.64%，甘泰组40%，两组差异显著($P<0.01$)。

（下转516页）

作者简介：陈 康(1972－)，男，重庆市人，医师，主要从事角膜单纯疱疹病毒方面的研究，电话：(023)65390046

通信作者：谢汉平，电话：(023)68754401

收稿日期：2003-07-17；修回日期：2003-10-11

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net