DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.06.017
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)06-0513-04

论著

双氯芬酸钾脂质体制剂的大鼠体内透皮研究

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)脂质体制剂体内经皮吸收和药物分布特点。方法 用SPE-HPLC方法,研究在体条件下局部外用脂质体制剂和传统凝胶制剂后,DP在深层和浅层肌肉、血清、肝、胃等不同组织中的分布情况。结果 脂质体外用制剂于浅层肌肉、深层肌肉中的浓度峰值分别为3202.82 ng/g和1465.79 ng/g,较凝胶外用制剂高($P<0.01$),且药物浓度维持时间长。结论 脂质体包封的双氯芬酸钾制剂能有效地渗透皮肤到达皮下组织,持续发挥局部药物作用,同时减少全身其它部位的药物分布浓度。

关键词:脂质体;双氯芬酸钾;体内;皮肤渗透
中图法分类号:R944.15;R969.1;R977.1 文献标识码:A

Percutaneous penetration of liposomal diclofenac potassium formulation *in vivo* 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 *in vivo* percutaneous absorption and distribution of liposomal diclofenac potassium (DP) formualtion. Methods Distribution of DP in muscles, serum, liver, and stomach was determined by solid-phase extraction-high-performance liquid chromatography (SPE-HPLC) after topical administration of liposomal formulation and commercial gel formulation in rats. Results The *in vivo* concentration of liposomal formulation in surface-muscle and deep-muscle was higher than that of gel formulation ($P<0.01$). The peak concentrations were 3 202.82 ng/g and 1 465.79 ng/g, respectively, and could last longer. Conclusion The liposomal formulation of diclofenac potassium can penetrate through the skin more effectively as compared with the commercial gel formulation, and can also reduce the distributed concentration in the other parts of the body *in vivo*.

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

双氯芬酸钾(diclofenac potassium, DP)是一种非甾体抗炎药(non-steroidal anti-inflammatory drug, NSAIDs),具有解热、消炎和镇痛作用。主要用于各种类型的关节炎、非关节炎骨骼肌疾病、抗风湿及头痛、牙痛和痛经等,临床应用广泛。但是其不良反应发生率高,尤其是长期大剂量应用的患者,不良反应发生率更高。因此如何减少DP的副作用,同时提高其抗炎作用是一个非常有意义的问题。本实验旨在研究脂质体用作局部给药的载体,使药物具有较大的皮肤透过量,同时考察药物在体内的分布情况。

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);IKA (tm) T18 Basic组织匀浆机(德国);GAST (tm) DQA-V130-BN真空泵(美国);Waters(tm) HLB萃取柱(美国);DP原料药(西南药业提供);DP脂质体制剂(我室自制);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 体内实验

取70只大鼠,分为DP脂质体制剂组、DP凝胶制剂组。选择左侧后腿部用剃刀和脱毛剂脱毛,然后用温水清洗,24 h后将大鼠固定于平板上,选择脱毛部位完好的皮肤于已脱毛的部位量出约1 cm×1 cm的部位,在此范围内按5 mg/kg的剂量涂抹DP脂质体制剂或DP凝胶制剂。于0.5、1、2、3、4、6、8 h,剪断大鼠未给药侧的股动脉,收集血液,然后用50 mmol/L的PBS清洗给药侧皮肤数次,滤纸吸干水分,沿标记的近侧线处剪断大鼠腿部,剪去皮肤,于-20 ℃冷冻3 h,取出标本,从给药区域向下,沿皮层和股骨的中线将腿部肌肉平均剖为深浅两层,并修剪至给药范围大小。同时收集对照侧肌肉、肝、胃组织各约1 g,备用。

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-mail:fushengh@mail.tmmu.edu.cn
收稿日期:2003-10-30;修回日期:2004-01-02

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

1.3 样本的预处理

1.3.1 血清样本的处理 将采集的血液4 ℃静置过夜，收集血清，按1∶1的比例加入6%高氯酸，振荡2 min，10 000 r/min离心10 min，收集上清，过滤后备用。

1.3.2 组织样本的预处理 取肌肉、肝、胃组织适量(0.5～1 g)，称重后剪碎，加入50 mmol/L的PBS匀浆至10 ml。按1∶1的比例加入6%高氯酸，振荡2 min，10 000 r/min离心10 min，收集上清。

1.3.3 固相萃取(Solid-Phase extraction，SPE) 采用SPE优化方法，取HLB柱用1 ml甲醇活化后1 ml纯水平衡，加入1 ml 2 μg/ml样本，用60%的2%磷酸甲醇洗涤、2%氨水纯甲醇进行洗脱，收集1 ml洗脱液。40 ℃氮气吹干后，用100 μl流动相溶解，进样20 μl。

1.4 样品的检测(HPLC检测)[11]。

1.4.1 色谱条件及系统适用性 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) SymmetryShield 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。

1.4.2 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=0.999 9。当信噪比为2时，最低检测限为25 ng/ml。

1.4.3 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。

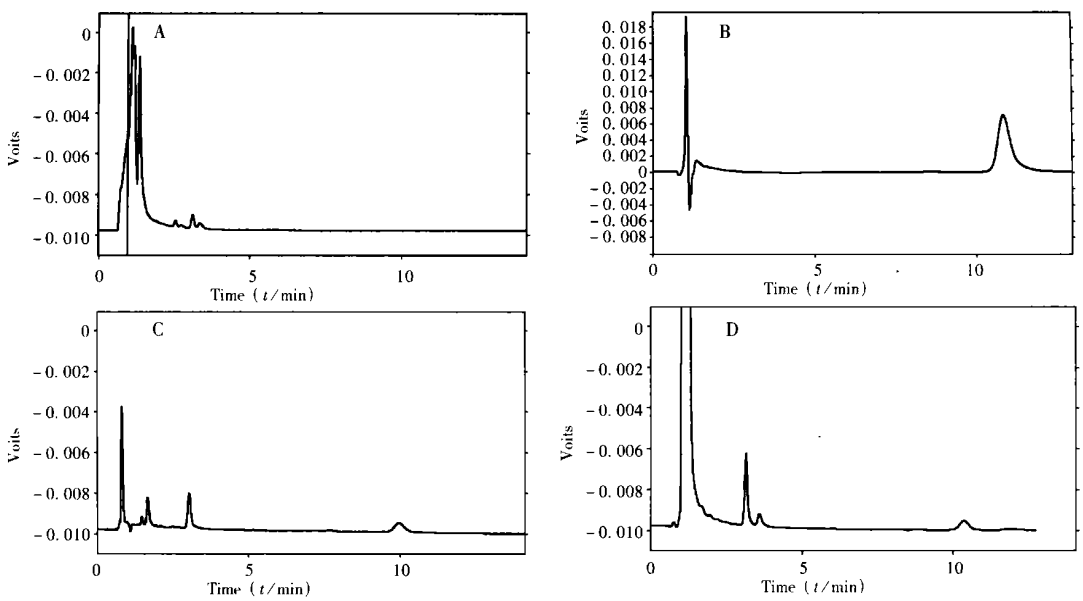
1.5 统计学处理

采用χ^2检验。

2 结果

2.1 色谱行为

在本色谱条件下，DP的保留时间为11 min左右。无杂峰干扰。组织匀浆液经SPE处理后杂质的色谱峰较处理前明显降低，对DP色谱峰无干扰，分离度良好，见图1。



A：Blank；B：Standard DP；C：Sample without SPE；D：Sample with SPE

图1 组织样品色谱图

Fig 1 Chromatogram of tissue sample

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%，2000 ng/ml组为97%。日内误差分别为：9.26%，3.68%，3.16%。

2.3 样品测定结果

2.3.1 DP脂质体制剂和DP凝胶制剂在深、浅层肌肉中的渗透结果，见图2。

2.3.1.1 两种制剂浅层肌肉渗透浓度 DP脂质体外用制剂肌肉浓度峰值出现在4 h左右，峰浓度为3 202.82 ng/g组织，在每个时相点均较凝胶组高($P<0.01$)。DP凝胶组的峰值出现在2～4 h，峰浓度为1 431.88 ng/g组织。

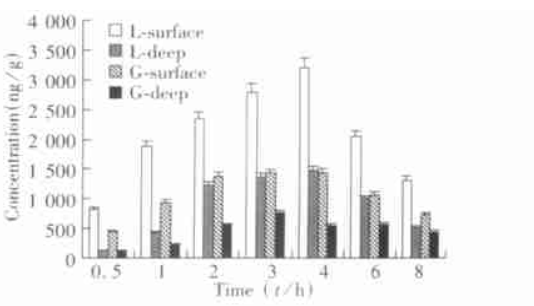


图2 DP在肌肉组织中的分布($n=5$)

Fig 2 Distribution of liposomal formulation and commercial gel formulation in the muscle *in vivo* ($n=5$)

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

2.3.1.2　两种制剂深层肌肉渗透浓度　　DP 脂质体外用制剂肌肉浓度峰值出现在 4 h 左右, 峰浓度为 1 465.79 ng/g 组织, 在 0.5 h 时相点无显著性差异, 在 1 h 和 8 h 时相点均较凝胶组高 ($P<0.05$), 其余时相点有非常显著的差异 ($P<0.01$)。DP 凝胶组的峰值出现在 3 h, 峰浓度为 756.20 ng/g 组织。DP 脂质体制剂组在肌肉组织中的渗透浓度较 DP 凝胶制剂组有着显著的差异。有效药物浓度持续时间长。

2.3.2　DP 脂质体制剂与凝胶制剂对照侧肌肉药物浓度

DP 脂质体外用制剂对照侧肌肉浓度峰值出现在 2 h 左右, 见图 3, 峰浓度为 1 006.87 ng/g 组织, 在 0.5、4、6 h 时相点无显著性差异, 在 1、2、3 h 时相点均较 DP 凝胶组高 ($P<0.01$)。DP 凝胶组的峰浓度为 538.99 ng/g 组织。

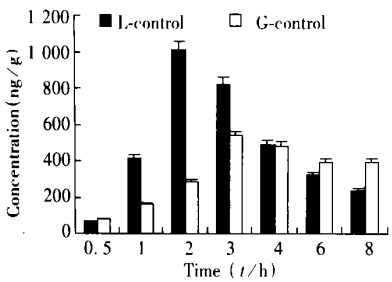


图 3　脂质体与凝胶制剂对照侧肌肉中 **DP** 的浓度 ($n=5$)

Fig 3　Concentrations of liposomal formulation and commercial gel formulation in the control muscle *in vivo* ($n=5$)

2.3.3　DP 脂质体制剂与凝胶制剂血清药物浓度　　DP 脂质体外用制剂血清浓度峰值出现在 2 h 左右, 图 4, 峰浓度为 1 046.10 ng/g 组织, 在 1、2、8 h 时相点均较 DP 凝胶组高 ($P<0.01$)。DP 凝胶组的峰值出现在 3 h, 峰浓度为 714.30 ng/g 组织。

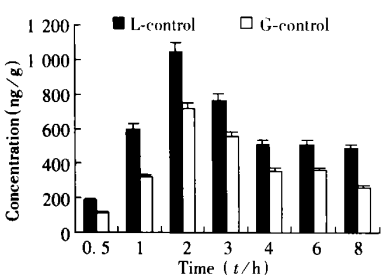


图 4　**DP** 脂质体与 **DP** 凝胶制剂血清中 **DP** 的浓度 ($n=5$)

Fig 4　Concentrations of liposomal formulation and commercial gel formulation in serum *in vivo* ($n=5$)

2.3.4　DP 脂质体制剂与凝胶制剂肝组织药物浓度　　DP 脂质体外用制剂肝组织浓度峰值出现在 4 h 左右, 图 5, 峰浓度为 1 363.24 ng/g 组织, 在 1、2、8 h 时相点均较 DP 凝胶组高 ($P<0.05$, $P<0.01$)。DP 凝胶组的峰值出现在 2 ~ 4 h, 峰浓度为 1 162.45 ng/g 组织。

2.3.5　DP 脂质体制剂与凝胶制剂胃组织药物浓度　　脂质体外用制剂胃组织浓度峰值出现在 3 h 左右 (图 6), 峰浓度为 1 099.55 ng/g 组织, 在 1、2 h 时相点均较凝胶组高 ($P<0.01$), 在 3、4 h 时相点均较凝胶组高 ($P<0.05$)。DP 凝胶组的峰值出现在 3 h。峰浓度为 786.84 ng/g 组织。

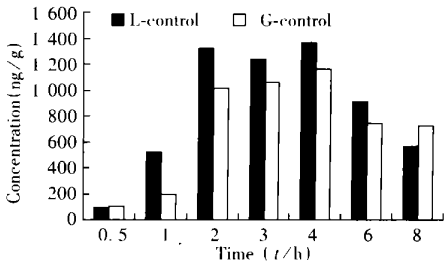


图 5　脂质体与凝胶制剂肝组织中 **DP** 的浓度 ($n=5$)

Fig 5　Concentrations of liposomal formulation and commercial gel formulation in the liver tissue *in vivo* ($n=5$)

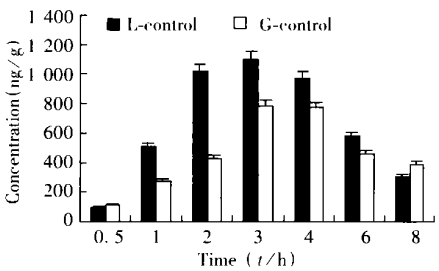


图 6　脂质体与凝胶制剂胃组织中 **DP** 的浓度 ($n=5$)

Fig 6　Concentrations of liposomal formulation and commercial gel formulation in the stomach tissue *in vivo* ($n=5$)

3　讨论

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。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[2]; 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[3]; 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[4]。

3.1　SPE 方法的优化

样品中药物浓度较低, 需进一步富集才能检出, 需要对样品进行适当的预处理, 以使药物净化、富集。通常的方法是进行液液萃取 (liquid-liquid extraction, LLE), 但 LLE 存在诸如易产生乳化、杂质较多、回收率低、需要的样品量大等缺点。固相萃取 (solid phase extraction, SPE) 是利用选择性吸附与选择性洗脱的液相色谱法分离原理, 使液体样品通过吸附剂, 保留其中某

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

一组分,再选用适当溶剂冲去杂质,然后用少量溶剂迅速洗脱,从而达到分离、净化与浓缩的目的。SPE 作为从生物样品中提取净化微量药物或其代谢产物的新方法,已被广泛地用于生物样品的检测中。在本实验中选用了 HLB 萃取柱,通过两步洗脱法对 SPE 进行了优化。利用不同浓度、不同 pH 值洗脱液,对 DP 进行洗脱,最后确定既能尽可能地去除杂质,又能较少减少 DP 的丢失的方法。

3.2 体内的渗透效果

双氯芬酸钾的药效已经非常明确,但要达到治疗作用,则在肌肉中的浓度要在 0.5 μg/g 以上[5]。在本实验中,DP 脂质体组和 DP 凝胶组在肌肉中的渗透能力以及在体内的分布有着较明显的差别。对比 DP 脂质体与 DP 凝胶制剂的外用给药效果,DP 脂质体组肌肉中药物浓度可以较长时间保持治疗浓度,在 2 h 后药物浓度均大于 0.5 μg/g 组织;而 DP 凝胶组虽然在 4~6 h 的肌肉药物浓度大于或接近 0.5 μg/g 组织,但是其浓度小于 DP 脂质体组($P<0.01$),这说明 DP 脂质体制剂经皮给药能力较市售的 DP 凝胶制剂要强,同时也提示,用 DP 脂质体制剂可以减少药物的用量而达到同样的治疗效果。DP 脂质体组给药侧深层较对照侧的药物浓度要高,这说明脂质体经皮给药可以在局部产生一个浓度相对较高的药物"储库",这有利于提高病患处的治疗效果,减少全身的副作用。DP 脂质体制剂在对照侧、血清、肝、胃组织中的浓度在 2~4 h 左右也相对较高,但是峰浓度在 4 h 以后消减的也比较快这提示 DP 脂质体制剂的副作用可能比较小。

DP 脂质体外用制剂在体内实验中,较 DP 凝胶制剂显现出其明显的促透优势、增加局部给药的靶向特点以及其持续给药的能力,这对减少 NSAIDs 的副作用,提高其抗炎作用是非常有意义的,特别在治疗关节、肌肉等局部病患有着很好的应用前景。

参考文献:

[1] 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.

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

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

[4] 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.

[5] Cevc G, Blume G. New, highly efficient formulation of diclofenac for the topical, transdermal administration in ultradeformable drug carriers, Transfersomes[J]. Biochim Biophys Acta, 2001, 1514: 191—205.

(编辑 冯崇英)

(上接 512 页)

3 讨论

单纯疱疹性角膜炎是 HSV-1 所致,它是一种较大的 DNA 病毒,对神经组织和来源于外胚叶的上皮细胞有亲和力。在患者感冒、紫外线照射、外伤、变态反应等条件下,潜伏在三叉神经节、颈交感神经节的 HSV 激活,通过神经传导路到达角膜[2],也可以通过潜伏在角膜原位的 HSV 激活,导致感染性上皮性角膜炎[3]。临床所见病例以树枝状角膜溃疡居多,病毒在角膜上皮细胞内复制,导致角膜上皮细胞坏死、脱落,未侵及深层组织,主要表现为不同形式的表浅角膜溃疡。

组胺(Histamine, H)是一种神经介质,能通过免疫细胞表面的2型组胺(H2)受体发挥免疫抑制作用,第一代组胺 H2 受体阻滞剂甲氰咪胍用于治疗消化道溃疡,后来发现它对角膜溃疡同样有效,口服甲氰咪胍治疗带状疱疹能减轻炎症反应,缩短疗程。带状疱疹和单纯疱疹病毒都属于疱疹病毒科,都可产生明显细胞病变,病毒复制相似,均特异性编码一些酶和蛋白质,能在宿主体内引起原发性和继发性感染,都可引起角膜上皮感染。基于两病毒间的相似性和组胺 H2 受体阻滞剂治疗溃疡有效考虑,我们选用第二代组胺 H2 受体阻滞剂法莫替丁治疗感染性上皮性角膜炎。

目前对单纯疱疹病毒性角膜炎主要用 0.1% 无环鸟苷滴眼,它是嘌呤核苷衍生物,对 DNA 合成有抑制作用,但对溃疡修复效果欠佳,法莫替丁作为第二代组胺 H2 受体阻滞剂,可以明显提高 T 淋巴细胞转化率,增强机体免疫功能,促进溃疡愈合,我们的观察主要是对比单纯抗病毒的甘泰和促进溃疡修复的法莫替丁对 HSV 浅层溃疡的疗效差异。初步观察的结果表明,治疗单纯疱疹感染性上皮性角膜溃疡加用法莫替丁,溃疡愈合时间明显缩短,治愈率提高,治疗时间缩短,患者自觉症状改善,无严重不良反应。我们认为对单纯疱疹感染性上皮性角膜溃疡治疗口服法莫替丁联合无环鸟苷能明显促进溃疡愈合,改善症状,效果优于甘泰片。但对于免疫反应导致的基质性角膜炎、角膜内皮炎治疗效果尚待进一步研究证实,对促进角膜溃疡愈合的机制也待深入的研究。从临床角度我们认为口服法莫替丁联合 0.1% 无环鸟苷滴眼治疗单纯疱疹感染性上皮性角膜溃疡是安全有效的。

关键词:法莫替丁;HSV

中图法分类号:R772.210.5 文献标识码:B

参考文献:

[1] 单纯疱疹性角膜炎的临床分类(通讯)[J]. 眼科研究, 2001, 19(3): 282.

[2] 刘家琦, 李凤鸣. 实用眼科学[M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2000. 322—324.

[3] 谢立信, 李绍伟, 董晓光, 等. 单纯疱疹病毒 1 型功能性基因在角膜内潜伏感染的实验研究[J]. 中华眼科杂志, 2000, 31(1): 36—39.

(编辑 刘洪娥)

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