

氮酮对罗红霉素纳米脂质载体凝胶剂体外透皮吸收的影响

金珊珊 潘虹 黄海涛 李瑶 韩翠艳

【摘要】 目的 研究氮酮对罗红霉素纳米脂质载体凝胶剂 (Roxithromycin Nanostructured Lipid Carriers hydrogel, ROX-NLCs-hydrogel) 体外透皮吸收的影响。**方法** 采用小鼠腹部皮肤, 在 Franze 扩散池中进行透皮实验。以皮肤透过量为指标, HPLC 法检测药物含量, 考察不同浓度氮酮对 ROX-NLCs-hydrogel 体外透皮吸收的影响。**结果** 当氮酮浓度为 2%、5%、8% 时, 药物的累积透皮量分别为 $10.98 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、 $27.99 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、 $14.41 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。**结论** 氮酮作为促渗剂, 浓度为 5% 时, 促进 ROX-NLCs-hydrogel 透皮的效果最佳。

【关键词】 氮酮; 罗红霉素; 纳米脂质载体; 凝胶剂; 透皮吸收

[中图分类号] R94 [文献标识码] A DOI: 10.3969/j.issn.1002-1256.2019.16.036

Effect of azone on trans-dermal absorption of Nanostructured Lipid Carrier hydrogel JIN Shan-shan.

Beijing Wanquan-Dezhong Medicine Technology Co., Ltd, Beijing, 100000, China.

【Abstract】 Objective To study the effect of azone on trans-dermal absorption of Roxithromycin nanostructured lipid carrier hydrogel (ROX-NLCs-hydrogel). **Methods** The test was performed by Franz diffusion pool on rat abdominal skin as penetration barrier. The effect of different concentrations of azone on trans-dermal absorption of ROX-NLCs-hydrogel was investigated using skin permeation quantity as evaluation index and HPLC as detection method. **Results** The trans-dermal quantity of azone was respectively $10.98 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $27.99 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, and $14.41 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectively, when the concentrations were 2%, 5%, and 8%, respectively. **Conclusions** As a penetration enhancer, 5% azone was the optimal concentration for promoting ROX-NLCs-hydrogel trans-dermal penetration.

【Key words】 Azone; Roxithromycin; Nanostructured lipid carriers; Hydrogel; Trans-dermal absorption

罗红霉素 (Roxithromycin) 是新一代大环内酯类抗生素, 其抗菌作用机制为抑制细菌蛋白质合成, 是呼吸道感染、咽炎、喉炎、皮肤软组织感染的首选药物, 外用可用于治疗脓疱疮等化脓性皮肤病及小面积烧伤、溃疡面的感染, 寻常性痤疮, 毛囊炎等皮肤疾病^[1]。但大环内酯类抗生素普遍存在胃肠道不良反应, 为解决上市产品的不足, 研制了罗红霉素纳米脂质载体凝胶剂, 其中氮酮作为促渗剂加入。有研究报道, 氮酮用量对外用制剂促渗效果不成正比^[2-3]。因此, 为探讨最佳透皮吸收, 提高制剂疗效, 本研究对氮酮的用量进行了筛选。

一、材料与方法

1. 材料: AL204 电子天平 (梅特勒-托利多仪器上海有限公司), 高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司), YB-P6 智能透皮试验仪 (天津市鑫洲科技有限公司)。罗红霉素纳米脂质载体冻干粉 (自制), 卡波姆 980 (杭州博峰有限公司), 丙二醇 (天津市富宇精细化工有限公司); 月桂氮酮 (郑州祥之达商

贸有限公司); 三乙醇胺 (天津市福晨化学试剂厂), 磷酸二氢铵 (天津基准化学试剂有限公司), 无水乙醇 (天津市福晨化学试剂有限公司), 乙腈 (津市光复精细化工研究所), 乙腈为色谱纯, 其余均为分析纯。昆明种雄性小鼠, 购于齐齐哈尔医学院动物实验中心。

2. 方法: (1) HPLC 法测定含量: ①色谱条件: 色谱柱: Diamonsil C18 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 流动相: 0.067 mol/L 磷酸二氢铵水溶液 (三乙胺调 pH 为 6.5) - 乙腈 (65:35); 检测波长: 210 nm; 流速: 1.0 ml/min; 进样量: 20 μL ^[5]。②标准曲线的绘制: 精密称取罗红霉素 50 mg 置于 50 ml 容量瓶中, 加流动相溶解并定容至刻度, 作为储备液。将储备液用流动相分别稀释成 1、5、10、30、50、70 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 一系列浓度的罗红霉素标准溶液, 经 0.22 μm 滤膜过滤后, HPLC 进样检测。③重复性考察: 取 5、30、70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 高中低三个浓度的罗红霉素溶液, HPLC 连续平行进样三次, 测定罗红霉素含量。④精密密度考察: 取 5、30、70 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 高中低三个浓度的罗红霉素溶液, HPLC 进样, 每天五次, 连续五天, 计算日内、日间精密密度。(2) ROX-NLCs-hydrogel 的制备: 称取适量卡波姆 980 溶于纯化水中, 配制卡波姆基质, 依次加入氮酮、丙二醇, 搅拌均匀, 备用。取适量 ROX-NLCs 冻干粉加纯化水复溶后, 加入到上述空白基质中, 搅拌均匀, 并用三乙醇胺调节 pH 值至 6~7, 最后加水定容。(3) 体外经皮给药研究: ①离体皮

基金项目: 齐齐哈尔市科学技术计划项目 (SFGG-201336)

作者单位: 100000 北京, 北京万全德众医药科技股份有限公司 (金珊珊); 161006 黑龙江齐齐哈尔, 齐齐哈尔医学院药学院 (潘虹、韩翠艳); 161006 黑龙江齐齐哈尔, 齐齐哈尔医学院纪检检查处 (黄海涛); 154100 黑龙江鹤岗, 鹤岗市中医院药剂科 (李瑶)

通信作者: 韩翠艳, Email: heymuphar@qmu.edu.cn

肤的制备:采用脊椎脱臼法将小鼠处死,用电动理发剪剃去腹部鼠毛,刀片刮去脂肪组织和结缔组织后,蒸馏水反复冲洗,并浸泡于生理盐水中,待用^[4]。②鼠皮浸出液考察:将处理干净的鼠皮在接收介质中,浸泡 24 h。浸出液经 0.22 μm 滤膜过滤后,HPLC 进样检测。采用该浸出液对储备液进行稀释,配制 50、30、70 μg/mL 高中低三个浓度的罗红霉素溶液,HPLC 进样检测,每个浓度平行进样三次,计算平均回收率。

③体外透皮实验:采用 YB-P6 智能透皮试验仪,安装 Franz 装置,其有效接触面积为 1.79 cm²。在接收室中加入 17 mL 接收介质,该介质由 20%乙醇和 2%吐温 80 组成,水浴温度保持在 32 ℃。将鼠皮用滤纸吸干表面水分,夹在接收室和供给室中间,调整 Franz 装置,排除气泡,350 rpm/min 下磁力搅拌。取适量 ROX-NLCs-hydrogel 于供给室皮肤表面,于 0、1、2、4、6、8、10、12、24 h 取样 0.8 ml,并及时补充相同体积的空白接收介质,用 HPLC 法检测,按照下述公式计算累积透皮量^[3]:

$$Q_t = C_s V_t + \sum_{i=1}^t C_{i-1} \times V_i$$

其中 V 为接收室介质体积,Vi 为取样体积,Ci 为第 i 次取样时接收液中的药物浓度。

二、结果

1.HPLC 法测定含量:对罗红霉素系列标准溶液,进行 HPLC 检测,记录峰面积。以浓度 X 为横坐标,峰面积 Y 为纵坐标,绘制标准曲线,计算得回归方程:Y = 2524.3X + 1844.5, R² = 0.9995,表明罗红霉素在 1.040 ~ 72.80 μg/mL 范围内线性良好。重复性实验中,高中低三个浓度罗红霉素溶液的 RSD 值分别为 2.19%、0.63%、0.57%,重现性良好;精密度实验中,高中低三个浓度罗红霉素溶液的日内精密度 RSD 值分别为 0.87%、0.60%、0.74%,日间精密度的 RSD 值分别为 1.26%、0.58%、0.53%,RSD 均小于 5%。由此可见,按照上述条件检测样品含量,方法准确可靠。

2.体外经皮给药实验:(1)鼠皮浸出液:将鼠皮浸出液过膜处理后,HPLC 检测,结果见图 1。参照罗红霉素溶液的 HPLC 图谱(图 2)可知,该浸出液在罗红霉素出峰时间处,无吸收。高中低三个浓度罗红霉素溶液的平均回收率分别为 98.20%、100.7%、101.5%,平均回收率均介于 98% ~ 102% 之间。因此,可判定该浸出液对主药的测定无干扰,“1.2.3”项下的 HPLC 法可用于体外透皮实验。(2)体外透皮实验:采用不同质量浓度的氮酮制备得到的 ROX-NLCs-hydrogel,体外经皮给药 24 h 后,透皮结果见图 3。由图可知:2 h 时,无氮酮组的累积透皮量几乎为零,添加氮酮后,透皮量增加;24 h 内,无氮酮、2%氮酮、5%氮酮、8%氮酮组的累积透皮量依次为 22.56 μg/cm²、10.98 μg/cm²、27.99 μg/cm²、14.41 μg/cm²,即 5%氮酮组 > 8%氮酮组 > 2%氮酮组。由结果可知,氮酮的促渗作用与其用量不呈正相关,本制剂中氮酮的最佳用量为 5%。

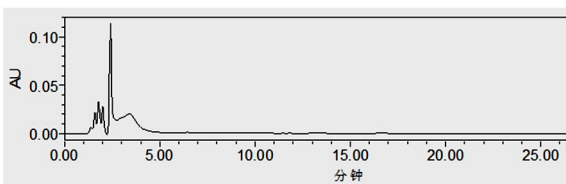


图 1 鼠皮浸出溶液高效液相色谱图

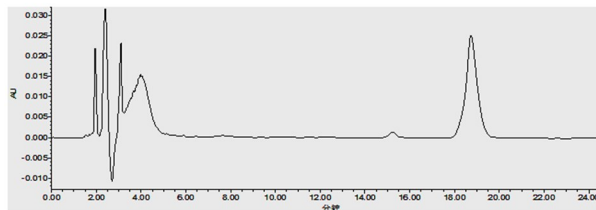


图 2 罗红霉素溶液高效液相色谱图

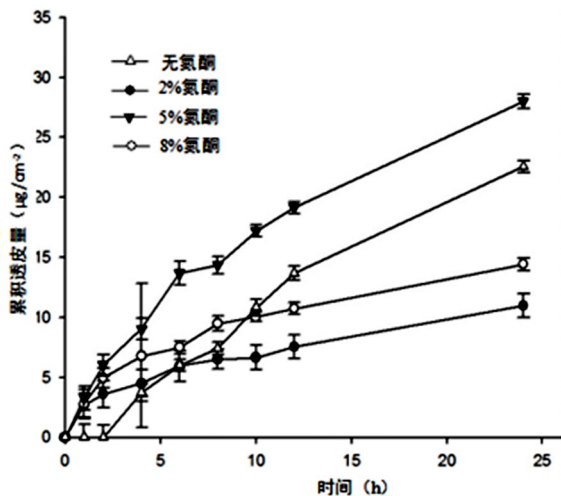


图 3 不同用量的氮酮对 ROX-NLCs-hydrogel 体外透皮性的影响

讨论 角质层是人体皮肤的重要屏障,也是影响外用制剂药物吸收主要的限速壁垒。目前常用的促渗手段分为三大类:制剂方法、物理手段和化学添加或改造。制剂方法包括将药物包载进脂质体、纳米粒等靶向制剂中,化学方法最常见的是使用化学促渗剂,如丙二醇、薄荷醇、氮酮和萘类等^[6-9]。其中,氮酮因其低毒性和高效促渗能力,被广泛应用^[10-11]。

罗红霉素作为新一代的大环内酯类抗生素,具有合适的油水分配系数,皮肤渗透性较好,可经皮给药^[12]。为降低其常见的不良反应,本研究前期采用制剂方法,将罗红霉素制成了纳米脂质载体,提高皮肤靶向性,也可进一步提高其促渗能力^[13-14]。但实验结果显示,体外给药前 2 h,接收室中几乎没有检测到药物。究其原因,凝胶中的罗红霉素纳米脂质载体需自凝胶中进入皮肤后释放药物,一方面罗红霉素纳米脂质载体初期进入皮肤的量不多,同时又具有缓释特点,因此释放出的药量较少而检测不到,加入氮酮可有效地促进更多的罗红霉素纳米脂质载体快速的进入皮肤,使初期释放的药量增加,弥补了缓释制剂前期经皮给药的不足,有望实现快速起效,是一种理想的透皮促渗剂。

参考文献

- [1] M arkham A, Fauids D. Roxithromycin: an update of its antimicrobial activity, pharmacokinetics and therapeutic use [J]. *Drugs*, 1994, 48 (2): 297.
- [2] 林桂涛,刘新. 氮酮对痹舒巴布剂体外透皮吸收影响的研究 [J]. *山东中医药大学学报*, 2007, 31 (4): 326-328.
- [3] 赵维娟,梅巍,张梅,等. 氮酮对阿糖胞苷乳膏体外透皮吸收作用的影响 [J]. *解放军药学学报*, 2005, 21 (5): 377-378.
- [4] 孙权,李冰,王星,等. 氮酮对 6-姜酚透皮吸收的影响 [J]. *中成药*, 2018, 40 (3): 583-586.

[5] 曾朝晖,林明越.罗红霉素纳米脂质体封装率的测定[J].中国医药科学,2017,7(7):31-34.

[6] 黎婉婉.三子巴布剂的制备及体外透皮吸收研究[D].广东药学院,2014.

[7] López-Cervantes M, Márquez-Mejía E, Cázares-Delgado J, et al. Chemical enhancers for the absorption of substances through the skin: Laurocapram and its derivatives [J]. Drug Dev Ind Pharm, 2006, 32(3): 267-286.

[8] 齐红艺,李莉,吴纯洁.薄荷醇促渗透作用的研究进展[J].时珍国医国药,2006,17(9):1776-1778.

[9] Cid YP, Pedrazzi V, de Sousa VP, et al. In vitro characterization of chitosan gels for buccal delivery of celecoxib; influence of a penetration enhancer [J]. AAPS Pharm Sci Tech, 2012, 13(1): 101-111.

[10] 宛超,黄明亚.月桂氮酮的促渗和抑菌作用研究进展[J].中国药房,2013,24(13):1239-1242.

[11] 于波涛,范开华,金伟华,等.氮酮用量对马尼地平乳膏离体透皮吸收影响的研究[J].西南国防医药,2011,21(3):250-252.

[12] 王建,曾红霞,洪利娅.罗红霉素在胃肠道介质中溶解度、油水分配系数、稳定性及原研片溶出行为研究[J].药物分析杂志,2013,33(10):1787-1791.

[13] Pardeike J, Hommoss A, Müller RH. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products [J]. Int J Pharm, 2009, 366: 170-184.

[14] Jenning V, Gysler A, Schafer-Korting M, et al. Vitamin A loaded solid lipid nanoparticles for topical use: occlusive properties and drug targeting to the upper skin [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2010, 49: 211-218.

(收稿日期:2019-02-25)

(本文编辑:王小龙)

· 预防医学 ·

福州市 5525 例女性人乳头瘤病毒检测情况分析

徐桂秋 林伟

【摘要】 目的 分析福州市 2014—2018 年女性宫颈人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)感染阳性率及其基因亚型的分布情况,并对阴道微环境改变与高危型人乳头瘤病毒(HR-HPV)感染进行相关性研究,从而为宫颈癌的预防提供基础数据。**方法** 使用 PCR-反向点杂交法检测 HPV 的基因亚型。取阴道分泌物,显微镜下观察清洁度、念珠菌、滴虫,采用唾液酸酶法检测细菌性阴道病(BV)。**结果** 5525 例样本中共检出 1793 例阳性标本,阳性率为 32.45%。排名前三的基因亚型为 HPV52、HPV16 和 HPV51。HPV 多重感染中以高危型合并低危型为主。以不同年龄分组,在高危型 HPV 感染中以 ≤30 岁和 >50 岁的女性为主,各年龄组检出率差异有统计学意义($P < 0.05$)。459 例患者同时进行了 HPV 基因分型和阴道微环境检测,157 例 HR-HPV 检测阳性,273 例阴道微环境检测异常,HR-HPV 感染与阴道微环境的改变存在相关性($P < 0.05$)。**结论** HPV 感染具有明显的地域性,福州地区女性的 HPV 感染率高于全国很多城市。阴道微环境的异常可能导致机体感染 HR-HPV 的概率增加。

【关键词】 人乳头瘤病毒; 基因亚型; 阴道微环境; 宫颈癌; 福州市

[中图分类号]R737 [文献标识码]A DOI:10.3969/j.issn.1002-1256.2019.16.037

Analysis of detection results of human papillomavirus in 5525 women in Fuzhou city XU Gui-qiu.

Department of clinical laboratory, Fuzhou first hospital affiliated to Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian, 350009, China.

【Abstract】 Objective To analyze the infection rate and genotype distribution of human papillomavirus (HPV) in cervix of women in Fuzhou from 2014 to 2018, the correlation between vaginal microenvironment changes and high-risk human papillomavirus (HR-HPV) infection was studied, so as to provide basic data for the prevention of cervical cancer.**Methods** PCR reverse dot blot (PCR-RDB) was used to detect the genotype of HPV. Vaginal secretions were taken, and the cleanliness, Candida and trichomonad were observed under the microscope, bacterial vaginosis (BV) was detected by sialidase method.**Results** 1793 out of 5525 samples were positive samples, with a positive rate of 32.45%. The top three genotypes were HPV52, HPV16 and HPV51. High-risk types combined with low-risk types were the main types of HPV multiple infection. The infection of high-risk HPV was mainly occurred in women younger than 30 years old or equal to 30 years old and older than 50 years old, and the difference of detection rate among different age groups was statistically significant ($P < 0.05$). HPV genotype and vaginal microenvironment detection were performed in 459 patients, 157 cases were positive in HR-HPV, 273 cases were abnormal in vaginal microenvironment detection, there was a correlation between HR-HPV infection and vaginal microenvironment changes ($P < 0.05$).**Conclusions** HPV infection performs obvious regional characteristics, and the infection rate of HPV in Fuzhou city is higher than that in many other cities in China. Abnormal vaginal microenvironment may increase the risk of HR-HPV infection.

【Key words】 Human papillomavirus; Genotype; Vaginal microenvironment; Cervical cancer; Fuzhou city