

3 讨论

利用 D-半乳糖复制衰老的小鼠模型,在一定时间内,连续给动物注射大剂量 D-半乳糖,使机体细胞内半乳糖浓度增高,在醛糖还原酶的催化下还原成半乳糖醇,这种物质不能被细胞进一步代谢而堆积在细胞内,影响正常的渗透压,导致细胞肿胀和功能障碍。一些重要的酶类包括抗氧化酶的作用部位及环境改变,导致代谢紊乱,自由基堆积,最终引起衰老^[3,4]。本实验结果显示,与正常成年小鼠相比,衰老小鼠脑匀浆 SOD 活性明显降低,MDA 含量明显增加。此种变化与人类衰老时变化相吻合,使用该模型验证药物的作用可望有较好的临床参考价值。

自由基理论是衰老的基本理论,大量实验表明衰老尤其是中枢神经系统的衰老大部分与自由基及其中间产物的毒性有关^[5,6]。实际上,衰老过程与自由基的过量生成以及它们的浓度与抗氧化系统的平衡密切相关^[7]。正常情况下,生物体内具有一整套的能产生和清除自由基的平衡体系,即自由基及其中间产物的产生(如 MDA、NO 等)与抗氧化系统(如 SOD、GSH、GPx、vitamin E、vitamin C 等)保持着一定的平衡,但是,随着衰老过程的进程,这个平衡被打破,以至于活性氧大量产生,抗氧化系统逐渐减弱。生物体内,氧自由基作用于脂质发生过氧化反应,氧化终产物为 MDA,会引起蛋白质、核酸等生命大分子的交联聚合,且具有细胞毒性。因此,MDA 既是评价衰老的重要指标,又可反映组织氧化的程度。SOD 和 GSH-Px 是机体酶防御体系中清除自由基或活性氧的最主要的抗氧化物酶。它们在人体的抗衰老方面发挥重要作用。SOD 作为体内重要的抗氧化酶,能促使超氧化物阴离子自由基(O_2^-)歧化为过氧化氢和氧离子,从而减少脂质过氧化反应,即减少 MDA 的生成,使机体细胞和组织免受损害^[8],GSH-Px 是机体内存在的一种含硒的清除氧自由基和抑制自由基反应的酶系统,能特异的催化还原性谷胱甘肽(GSH)对过氧化氢的还原反应,能抑制烟酰胺腺嘌呤二核苷酸形成羟自由基($OH^\cdot$),对 MDA 的生成具有明显的抑制作

用,所以它们可以保护脂质不受氧自由基作用而发生过氧化,具有保护细胞膜结构和功能完整的作用。本实验研究结果显示,LSPC 能显著抑制 D-半乳糖致衰老小鼠脑组织中的脂质过氧化,降低其 MDA 含量,提高 SOD、GSH-Px 等抗氧化物酶的活性,表明 LSPC 对于 D-半乳糖造成的氧化损伤有一定的保护作用。对于由 D-半乳糖所致的衰老小鼠,LSPC 能显著增高抗氧化系统相关酶 SOD、GSH-Px 活性,降低 MDA 含量,LSPC 通过提高抗氧化酶活性和减少自由基的产生起到延缓衰老的作用。

参 考 文 献

- 1 Laparra J, Michaud J, Masquelier J. Etude pharmacocinetique des oligomeres flavanoliques[J]. *Plant Med phytother*, 1977, 11:133-142
- 2 凌智群, 谢笔钧. 莲房原花青素对氧自由基和脂质过氧化的作用[J]. *营养学报*, 2002, 24(2):121-125
- 3 Cui X, Zuo P, Zhang Q, et al. Chronic systemic D-galactose exposure induces memory loss, neurodegeneration and oxidative damage in mice: protective effects of R-alpha-lipoic acid[J]. *J Neurosci Res*, 2006, 83(8):1584-1590
- 4 Lu J, Zheng YL, Luo L, et al. Ursolic acid ameliorates cognition deficits and attenuates oxidative damage in the brain of senescent mice induced by D-galactose[J]. *Biochem Pharmacol*, 2007, 74:1078-1090
- 5 Barja G. Free radicals and aging[J]. *Trends Neurosci*, 2004, 27(10):595-600
- 6 Biesalski HK. Free radical theory of aging[J]. *Curr Opin Clin Nutr*, 2002, 5:5-10
- 7 Poon HF, Calabrese V, Scapagnini G, et al. Free radicals and brain aging[J]. *Clin Geriatr Med*, 2004, 20:329-359
- 8 Giardio R, Giavaresi G, Fini M, et al. The role of different chemical modifications of superoxide dismutase in preventing a prolonged muscular ischemia/reperfusion injury[J]. *Artif Cell Blood Substit Immobil Biotechnol*, 2002, 30(3):189-198

(2009-03-20 收稿 2009-04-14 修回)

羧甲基壳聚糖对雌二醇凝胶透皮吸收促进作用的研究

刘萍 (北京老年医院药剂科 北京 100095)

摘 要 目的:研究羧甲基壳聚糖(CMC)对雌二醇凝胶体外透皮吸收的影响。方法:合成 CMC,用电位滴定法确定其取代度。以含 2% CMC 的雌二醇凝胶为试验组,含 2% 氮酮的雌二醇凝胶为阳性对照组,无任何促透剂的雌二醇凝胶为阴性对照组,通过体外透皮扩散实验得到各组累积透过量,并求出稳态透皮速率。结果:合成得到的 CMC 取代度为 0.52。试验组的累积透过量 and 稳态透皮速率显著大于阴性对照组($P < 0.05$),但与阳性对照组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论:2% CMC 与 2% 氮酮的促透效果相似,值得进一步研究。

关键词 羧甲基壳聚糖;雌二醇;凝胶;透皮促进作用;体外

中图分类号:R945 文献标识码:A 文章编号:1008-049X(2009)08-1025-04

作者简介:刘萍,女,学士,主管药师,主要研究方向:药物制剂。 TEL:13691260613 E-mail:lp1201@126.com

Study on the Transdermal Permeation Enhancing Effect of Carboxymethyl Chitosan on Estradiol Gels *in vitro*

Liu Ping (Department of Pharmacy , Beijing Geriatric Hospital, Beijing 100095, China)

ABSTRACT Objective: To study the enhancing effect of carboxymethyl chitosan (CMC) on the estradiol gel *in vitro*. **Method:** CMC was synthesized and the substitution degree was determined by potentiometric titration. Three different kinds of estradiol gels, which was with 2% CMC (testing group), 2% azone (positive control group) and without any enhancer (negative control group), respectively, were studied. The cumulative penetration (Q) and steady penetration rate (J) *in vitro* were used as the indices. The cumulative penetration was calculated. **Result:** The substitution degree of CMC was 0.52. Significant difference was found on the cumulative penetration and the steady penetration rate of testing group when compared with negative control group ($P < 0.05$), however no significant difference was found when testing group was compared with positive control group ($P > 0.05$). **Conclusion:** 2% CMC was an efficient penetration enhancer with similar effect with 2% azone and valuable to be studied further.

KEY WORDS Carboxymethyl chitosan; Estradiol; Gels; Transdermal permeation enhancing; *in vitro*

羧甲基壳聚糖 (carboxymethyl chitosan, CMC) 为壳聚糖 (chitosan, CS) 的一种水溶性衍生物, 具有良好的生物相容性、生物降解性和生物粘附性。作为一种阳离子型大分子吸收促进剂, 主要通过与其上皮细胞的负电荷成分作用, 打开细胞间紧密结合而促进药物的胃肠道及其他黏膜 (如鼻, 口腔, 肺) 的吸收^[1]。由于皮肤角质层细胞也具有带负电荷的成分, 因此 CMC 可以相同或相似机制作为透皮吸收剂用于经皮给药系统中。

本试验选用 2% CMC 做为透皮吸收促进剂, 以雌二醇为模型药物, 以同浓度氮酮作为对照, 进行体外透皮速率考察, 以期 CMC 用于透皮吸收促进剂提供试验依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

RE-52C 旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂); 100401-真空冷冻干燥机 (德国 MARTIN CHRIST 公司); HJ-3 恒温磁力搅拌器 (江苏金坛医疗仪器厂); DK-8B 型电热恒温水槽 (上海精密实验设备有限公司); pH-25 型 pH 计 (上海精密科学仪器有限公司); FIRT8300 红外分光光度计 (日本岛津); TK-6A 型透皮扩散试验仪以及配套 Franz 扩散池 (横截面积 2.8cm^2 , 容积 6.6ml , 上海锺凯科技贸易有限公司); 高效液相色谱仪 (美国 Agilent 1100series)。

1.2 试药

雌二醇 (上海郎中堂化剂公司, 批号: 100142); 雌二醇对照品 (北京市药品检验所提供, 批号 071223, 纯度 99.67%); CS (Mw210kDa, 脱乙酰度 $> 95\%$, 青岛海普生物技术有限公司); PVA (聚合度为 1750 ± 50 , 醇解度为 99.8%, 国药集团化学试剂有限公司, 批号 20060514); 异丙醇 (天津市广成化学试剂有限公司, 批号 20051110); 氯乙酸 (天津市科密欧化学试剂开发中心, 批号 20060226); 25% 戊二醛 (国药集团化学试剂有限公司, 批号 20051228); 泊洛沙姆 P407 (德国 BASF 公司); 氮酮 (山西芮城兴庆化工厂); 聚乙二醇 400 (国药集团化学试剂有限公司); 甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯, 试验中所用水均为纯水。

1.3 动物

昆明种小白鼠, $(20 \pm 2)\text{g}$, 雌雄不限, 北京大学医学部实

验中心提供。

2 方法与结果

2.1 CMC 的合成

参照文献^[2], 取 6g CS 用 10ml 40% 的 NaOH 溶液搅拌使其充分润湿, 冷冻 (-20°C) 过夜使其充分碱化。取出后, 自然解冻, 转入三颈瓶中, 加入 150ml 异丙醇, 室温下搅拌, 分次加入氯乙酸 7.2g, 反应 2h。然后在 60°C 水浴中反应 2h。静置, 去除上清液, 沉淀物用适量纯水溶解, 调 pH 至 7.0, 过滤后, 滤液在去离子水中透析, 直至用 AgNO_3 检测无 Cl^- 。浓缩, 冻干, 得类白色 CMC。

2.2 CMC 的检测

2.2.1 CMC 取代度的测定^[3] CMC 于 50°C 下干燥至恒重, 取约 0.2g, 精密称定, 溶于 $0.3\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 溶液 1ml 中, 蒸馏水定容至 50ml。精确量取 20ml 于锥形瓶中, 用 $0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 标准溶液滴定, 测其 pH。记录消耗 NaOH 标准溶液体积 $V(\text{NaOH})$ 与 pH 对应关系可得到电位滴定曲线, 如图 1, 图中两竖线分别为两个突跃点所对应的 NaOH 标准溶液的体积。滴定曲线突跃用二阶微商法求得。

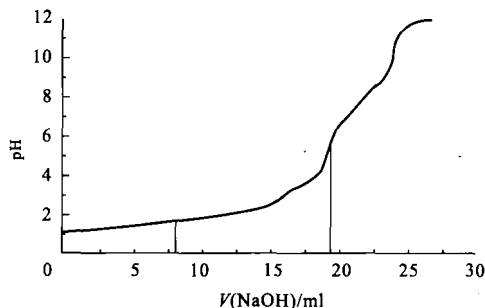


图 1 CMC 取代度测定的电位滴定曲线图

计算公式^[4]: 取代度 $= 163.252A / (1 - 58A)$; $A = (V_2 - V_1)C_{\text{NaOH}} / m$ 。式中: V_1, V_2 分别为两次突跃所对应的 NaOH 标准溶液的体积 (ml); C_{NaOH} 为 NaOH 标准溶液的浓度 ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); m 为 CMC 的质量 (g); 163.252 为氨基葡萄糖单元的摩尔质量 ($5\% \times 203.19 + 95\% \times 161.25$, 95% 为 CS 的脱乙酰度); 58 为羧甲基的相对分子质量。经测定, 得到取代度为 0.52 的 CMC。

2.2.2 IR 定性检测 采用傅立叶红外分析对 CMC 进行表征,待测品经 KBr 压片。在 $4000 \sim 400\text{cm}^{-1}$ 的范围内测定 IR 谱,见图 2。从谱图中可以看到 CMC 在 1600cm^{-1} 左右和 1400cm^{-1} 左右均有明显的羧酸盐的吸收峰。它们分别是 COO^- 的反对称伸缩振动和伸缩振动峰,这说明样品中含有羧基,并且以盐的形式存在。另外,在 3420cm^{-1} 左右处有一较宽峰,可能是由于 O-H 和 N-H 基团形成了氢键而宽化,两振动峰相互重叠所造成的。

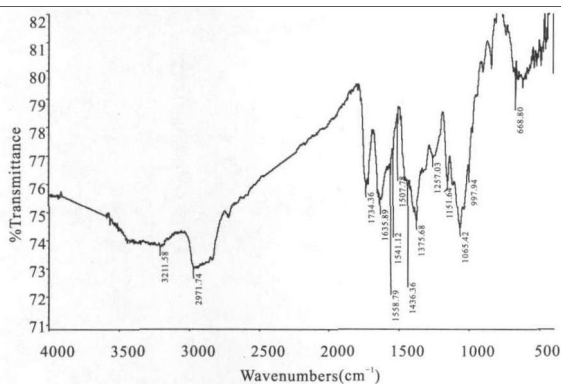


图 2 CMC 的 IR 图谱

2.3 雌二醇含量测定方法的确定

2.3.1 色谱条件^[5] 色谱柱: ZORBA $\times$ SB- C_{18} 柱 (250mm $\times$ 4.6mm, $5\mu\text{m}$); 灵敏度: 0.01 AUFS; 流动相: 甲醇: 水 = 75: 25; 流速: $1\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$; 柱温: 25°C ; 检测波长: 280nm; 进样量: $20\mu\text{l}$ 。理论塔板数以雌二醇计算不低于 2 000。

2.3.2 标准曲线的制备 精密称取经 105°C 干燥至恒重的雌二醇对照品 100mg, 用含 40% PEG400 的 0.9% 氯化钠溶液溶解, 并定容至 250ml, 得到 $400\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 雌二醇的标准贮备液, 再精密吸取 1ml 用 40% PEG400 的 0.9% 氯化钠溶液定容至 100ml, 得到 $4\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的雌二醇对照品溶液, 将此溶液用二倍稀释法稀释, 分别得到雌二醇浓度为 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, $0.0625\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的 40% PEG400 的 0.9% 氯化钠溶液^[6], 进行 HPLC 检测, 见图 3。以雌二醇浓度 (X) 和相应峰面积 (Y) 进行回归计算, 结果表明, 当雌二醇浓度在 $0.0625 \sim 4\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 范围内呈良好的线性关系, 回归方程为: $Y = 7.8544X + 0.6238$, $r = 0.9996$ 。

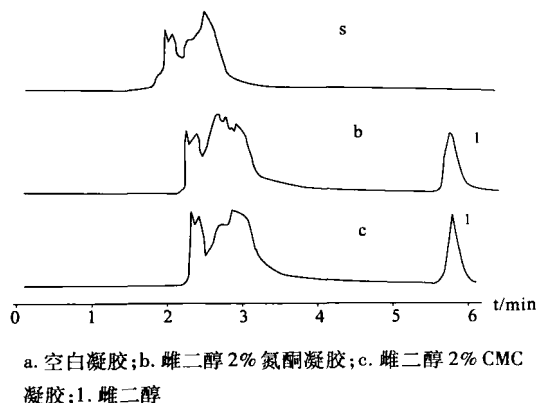


图 3 雌二醇的 HPLC 图谱

2.3.3 回收率及精密度测定 精密吸取雌二醇标准贮备液

适量, 加入相应处方量的空白凝胶基质, 用 40% PEG400 的 0.9% 氯化钠溶液完全溶解后, 定容, 分别得到 2, 0.5, $0.125\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的雌二醇溶液, 测定其中雌二醇含量, 计算回收率, 三种浓度的平均回收率分别为 $99.4\% \pm 0.80\%$, $99.5\% \pm 0.19\%$, $96.2\% \pm 1.16\%$ ($n = 5$)。三种浓度雌二醇溶液在同日内进样 5 次, 连续进样 5d, 分别计算 RSD。结果日内 RSD 分别为: 0.88%, 1.75%, 1.67%; 日间 RSD 分别为: 1.5%, 1.4%, 1.8%。

2.4 雌二醇凝胶的制备

2.4.1 试验组 取 0.2g CMC 在室温下溶解于少量水中, 在 4°C 下冷却, 得 CMC 溶液。取 2.5g 泊洛沙姆 P407, 加入少量水溶解成凝胶状, 在 4°C 冰箱放置 0.5h, 溶胀。另称取 0.2g 雌二醇, 加少量无水乙醇, 超声溶解, 得到雌二醇溶液。将雌二醇溶液和 CMC 溶液分别加入泊洛沙姆 P407 凝胶中, 用水定量至 10g。 4°C 放置, 直至得到澄清溶液。室温下, 胶凝为试验组 (含 2% CMC 的雌二醇凝胶)。

2.4.2 阳性对照组 取 2.5g 泊洛沙姆 P407, 加入少量水溶解成凝胶状, 在 4°C 冰箱放置 0.5h, 溶胀。另称取 0.2g 雌二醇, 加少量无水乙醇, 超声溶解, 得到雌二醇溶液。将雌二醇溶液和 0.2g 氮酮分别加入泊洛沙姆 P407 凝胶中, 用水定量至 10g。 4°C 放置, 直至得到澄清溶液。室温下, 胶凝为阳性对照组 (含 2% 氮酮的雌二醇凝胶)。

2.4.3 阴性对照组 取 2.5g 泊洛沙姆 P407, 加入少量水溶解成凝胶状, 在 4°C 冰箱放置 0.5h, 溶胀。另称取 0.2g 雌二醇, 加少量无水乙醇, 超声溶解, 得到雌二醇溶液。将雌二醇溶液加入泊洛沙姆 P407 凝胶中, 用水定量至 10g。 4°C 放置, 直至得到澄清溶液。室温下, 胶凝为阴性对照组 (不含促渗剂的雌二醇凝胶)。

2.5 体外透皮试验

2.5.1 离体鼠皮制备^[7] 取小白鼠, 脱臼处死, 用手术剪剪去其背部皮肤的毛, 用剃须刀除尽余毛, 取背部皮肤约 $2\text{cm} \times 2\text{cm}$ 大小区域于 0.9% 氯化钠溶液中浸泡。去除皮下脂肪, 置于 0.9% 氯化钠溶液中 4°C 储存, 24h 内用完。

2.5.2 接受液的配制 取适量 0.9% 氯化钠溶液配成 40% PEG400 的 0.9% 氯化钠溶液溶液, 4°C 保存, 每次加入接收池前, 先预热至 32°C 。

2.5.3 体外透皮实验 使用 Franz 扩散池, 将处理好的鼠皮固定于供给池与接收池中间, 角质层朝向供给池。在三个供给池中分别均匀加入制得的各种凝胶 1g, 涂抹均匀。扩散池水浴温度 (32 ± 0.2) $^\circ\text{C}$, 磁力搅拌转速 $400\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。在 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6.5, 8, 10, 12, 24h 分别从接收池取出所有样品液, 同时补加等量等温新鲜的接受液。将所取液用 $0.45\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤后, HPLC 检测样品的浓度 $C(\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1})$ 。扩散池的容积 V 为 6.6ml, 皮肤的扩散面积 A 为 2.8cm^2 , 通过以下公式计算累积透过量 $Q(\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2})$: $Q = (C_n \times V + \sum_{i=1}^{n-1} C_i \times V) / A$ ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$), 其中, C_n 为第 n 个取样点测

的药物浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$); C_i 为第 i 个取样点测的药物浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$); V 为接受液体积 (ml); V' 为取样体积 (ml); A

为透过面积(cm^{-2})。累积透过量 Q 随时间 t 的变化情况,如图 4,可见与阴性对照组相比,试验组和阳性对照组对雌二醇透皮吸收均具有明显的促进作用。根据 Fick's 第一定律,以不同时间的 Q 对时间 t 作图,斜率即是稳态透皮速率 J ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$),如表 1。

表 1 各组稳态透皮速率结果

组别	透过动力学方程	R	$J(\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1})$
实验组	$Q = 7.5588 + 0.8521t$	0.9912	0.8521
阳性对照组	$Q = 6.9852 + 0.8550t$	0.9948	0.8550
阴性对照组	$Q = 3.3210 + 0.3608t$	0.9939	0.3608

进行 F 检验,实验组和阳性对照组的 Q 和 J 均大于阴性对照组(P 均 < 0.05),说明 CMC 和氮酮都是较好的透皮吸收促进剂;而试验组和阳性对照组的 Q 和 J 均无显著性差异($P > 0.05$),说明同浓度的 CMC 和氮酮的促透效果无显著性差异。

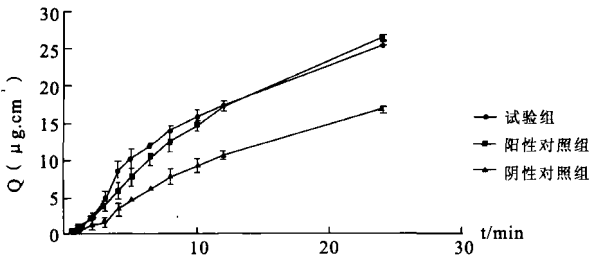


图 4 雌二醇凝胶累积透过量

3 讨论

由于 CMC 带有正电荷,不能选用卡波姆、羧甲基纤维素钠等阴离子型凝胶基质,因此本试验选用非离子型泊洛沙姆 P407 做为凝胶基质。通过预试验确定其用量为 25%。

CMC 作为黏膜促渗剂的常用浓度为 0.5%^[1],由于皮肤

的角质层较黏膜而言屏障作用更强,所以本研究通过预试验结果初步确定 CMC 的使用浓度为 2%。体外透皮试验结果表明,2% 的 CMC 与同浓度的氮酮促渗作用相似。

通过累积透过量对时间的变化曲线可以看出:试验组对雌二醇透皮吸收促进作用仍有一定的时滞。这可能是由于 CMC 作为大分子在透皮吸收开始时,对雌二醇有吸附作用,从而阻碍其透过,当吸附达到饱和后,其促透作用占主导地位,表现为促进作用。

参 考 文 献

1 Kotze AF, Luessen HL, Boer AG, et al. Chitosan for enhanced intestinal permeability:prospects for derivatives soluble in neutral and basic environment[J]. *Eur J Pharm Sci*,1998,7(7):145-151

2 Chen LY, Du YM, Zeng XQ. Relationships between the molecular structure and moisture-absorption and mositure-retention abilities of carboxymethyl chitosan; II. Effect of degree of the deacetylation and carboxymethylation[J]. *Carbohydrate Research*, 2003,338(4):333-340

3 陈浩凡,潘仕荣,胡瑜,等. 胶体滴定法测定羧甲基壳聚糖的取代度[J]. *分析测试学报*, 2003,22(6):70-73

4 刘长霞,陈国华,晋治涛,等. N,O-羧甲基壳聚糖羧化度计算式的修正[J]. *北京化工大学学报*,2004,31(2):14-17

5 刘放,王俏,叶金翠,等. RP-HPLC 法测定雌二醇透皮控释制剂的含量和溶出度[J]. *华西药杂志*,1998,13(3):156-158

6 张望刚,丁宇,叶金翠,等. 雌二醇控释贴片的研制[J]. *中国医药工业杂志*,2002,33(11):541-542

7 沈子龙,汪笑菲,沈燕宁,等. 雌二醇霜剂透皮吸收示踪研究[J]. *药物生物技术*,2000,7(3):169-172

(2008-12-02 收稿 2009-04-17 修回)

甲氧沙林/β-环糊精包合物分散片的制备及其稳定性考察

王军 (武汉大学人民医院药学部 武汉 430060)

摘 要 目的:进一步提高甲氧沙林(8-MOP)分散片的稳定性。方法:将 8-MOP 与 β-环糊精(β-CYD)形成包合物,再制备成分散片。与普通分散片相比,通过稳定性试验,判断包合物分散片的体外稳定性。通过体外溶出度测定,考察包合物分散片对溶出度的影响。**结果:**本包合物的包合率为(96.8±2.4)%($n=3$),说明包合物形成较好。稳定性试验表明,包合物分散片对强光的稳定性显著提高,其体外溶出度也有明显增加($P<0.05$)。**结论:**8-MOP/β-CYD 包合物分散片比普通 8-MOP 分散片稳定性更好,溶出速率更高,值得进一步研制。

关键词 甲氧沙林;β-环糊精;包合物;分散片;稳定性;溶出度

中图分类号:R944.4 文献标识码:A 文章编号:1008-049X(2009)08-1028-03

Study on the Preparation and Stability of the 8-Methoxypsoralen Inclusive Dispersible Tablets

Wang Jun (Department of Pharmacy, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China)

ABSTRACT Objective: To improve the stability of 8-methoxypsoralen (8-MOP) dispersible tablets. **Method:** The β-cyclodextrin (β-CYD) was used as host molecules to prepare the 8-MOP inclusive dispersible tablets. The stability and in vitro dissolution of the 8-MOP inclusive dispersible tablets were studied by compared with those of the common 8-MOP dispersible tablets. **Result:** The inclusive rate of the inclusion was 96.8% ± 2.4% ($n=3$), suggesting the promising formation of the inclusions. The stability and dissolution of the inclusive dispersible tablets were both improved when compared with those of the common dispersible tablets. **Conclu-**