

局部用辣椒碱传递体的制备及体外评价

龙晓英^{1,2*}, 罗佳波¹, 李立任², 林 丹², 容慧思², 黄伟民²

(1. 南方医科大学, 广东 广州 510515;

2. 广东药学院, 广东 广州 510224)

[摘要] 目的:制备辣椒碱传递体,并对其质量进行评价。方法:采用高剪切分散乳化均质机制备辣椒碱传递体,并对其大小与结构、包封率、释放度及体外皮肤渗透性进行评价。结果:辣椒碱传递体结构为小单室,平均粒径 150.6 nm,当脂质含量为 8%时,包封率为 96.7%。体外累积释放量随接受液中乙醇含量的提高而增加,不同基质大鼠腹部皮肤体外辣椒碱累积透皮量为:传递体>霜剂>混悬液。不同种类皮肤辣椒碱累积透皮量为:小鼠>大鼠>人,人体皮肤辣椒碱累积透皮量为:表皮膜>真皮层>完整皮肤。结论:辣椒碱传递体包封率达到药典的规定(>80%),辣椒碱传递体的确可以增加辣椒碱的皮肤透过性,皮肤种类及皮肤的不同层次影响辣椒碱传递体的皮肤透过性。

[关键词] 辣椒碱;传递体;包封率;皮肤渗透

[中图分类号] R 943 [文献标识码] A [文章编号] 1001-5302(2006)12-0981-04

除常用的非甾体抗炎药外,茄科植物辣椒 *Cap-sicum frutescens* L. 的果实辣椒中所含的辣椒碱(capsaicin)对骨关节病的治疗效果已得到肯定。药理试验证明,辣椒碱通过选择性拮抗神经肽 P 物质发挥药效。目前,辣椒碱在临床上除用于治疗关节炎、关节痛外,还可治疗肌肉酸痛、牙痛、带状疱疹后遗神经痛、糖尿病性神经痛、三叉神经痛、血管舒缩性鼻炎、皮肤瘙痒等症,为美国药典 24 版收载。近来随着辣椒碱受体的克隆表达,辣椒碱受体基因敲除小鼠模型的成功建立,人们对辣椒碱的研究进入新一轮高潮^[1]。但由于辣椒高度的肝首过效应^[2]及非常短的半衰期^[3],局部给药系统是辣椒碱合适的给药方式。

本研究采用传递体(transfersomes)泡囊将辣椒碱包裹。传递体的变形能力比普通脂质体大 5 个数量级,可穿过自身大小 1/5 的小孔,且高度亲水,可顺水化梯度穿透皮肤,具有良好的透皮作用。国内外研究表明,传递体可转运各种极性及分子质量的药物透过皮肤^[4,5]。

1 仪器与试剂

岛津 LC-10AD 高效液相色谱仪;7501 型 UV 分光光度计(无锡科达仪器厂),JEL-100CXII 透射电镜(日本),ZETASIZER 3000HSA 纳米粒度及电位分析仪(英国 Malvern Instruments Ltd),FA25 型高剪切分散乳化均质机(上海 FLUKO 机电设备有限公司),TK-128 透皮扩散试验仪(上海瑞凯科技贸易有限公司),Shimadzu LC-10A 高效液相色谱仪(日本),岛津 SPD-10A 型紫外检测器。

辣椒碱原料(贵州安顺生达生物科技开发公司,辣椒碱,含量>97%,批号 20030503),辣椒碱对照品(sigma 公司,含量>97%,批号 1092899),卵磷脂(de-gussa 公司,批号 149043),胆酸钠(中国医药集团上海化学试剂公司,进口分装,批号 F20030428),葡聚糖(Sephadex G-50,ICN Biomedicals Inc. 批号 94445),其余试剂均为分析纯。KM 雄性小鼠(广东省医学实验动物中心),KM 雄性大鼠(广东省医学实验动物中心)。

2 方法与结果

2.1 样品制备 辣椒碱传递体制备:取卵磷脂 2%~8%,胆酸钠 0.4%~1.6%,Vit E 0.02%,辣椒碱 0.07%等成分用无水乙醇溶解,开启高剪切分散乳化均质机,将上述乙醇溶液慢慢滴加到 45~50℃生理盐水中,保持 45℃,磁力搅拌水化 1 h 即得,同法不加入辣椒碱制备空白传递体。辣椒碱霜剂的制备:油相[硬脂酸 17 g,蜂蜡 3.4 g,脱水山梨醇单油

[收稿日期] 2005-10-20

[基金项目] 广东省科技厅重点引导项目(2004BI0401023)

[通讯作者] * 龙晓英, Tel:13312809263, E-mail:longxy3156@

163.com

酸酯(span-80) 0.6 g,辣椒碱 0.07 %]与水相[聚氧乙烯脱水山梨醇单油酸酯(tween-80) 7 g,甘油 11 g,蒸馏水 65 g]分别加热至 80 ℃,将水相搅拌下加入油相,冷却得 O/W 型膏霜。辣椒碱混悬液的制备:将辣椒碱 0.07 %用少量乙醇溶解然后分散于蒸馏水中即得。

2.2 辣椒碱传递体结构及粒径大小测定 采用 1 %磷钼酸负染色制备样品,于透射电镜下观测并照相。用 zetasizer 激光光子粒径测定传递体泡囊的平均粒径和多分散性。传递体的平均粒径为 150.6 nm,多分散性系数为 0.28,电镜投射照片及粒度分布图见图 1、2。

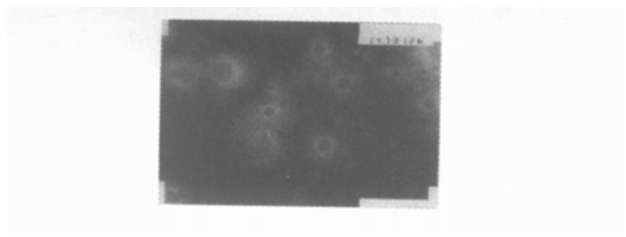


图1 传递体透射电镜照片(×14万)

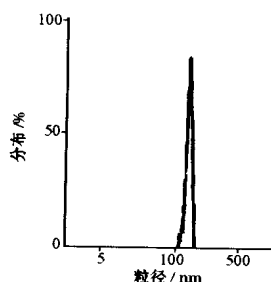


图2 传递体 zetasizer 粒径分布图

2.3 辣椒碱及辅料紫外扫描图谱 将辣椒碱、辣椒碱传递体、空白传递体(辅料)按处方用量分别溶解于乙醇中,在 200 ~ 400 nm 进行扫描,辣椒碱在 281 nm 有最大吸收,辅料在此波长也有吸收。一阶导数扫描图谱说明在辣椒碱导数峰处,空白传递体为一直线,由此,采用一阶导数可扣出传递体材料对测定辣椒碱含量的影响。

2.4 标准曲线 分别精密称取辣椒碱 9,13.5,18,22.5,27,31.5 mg 置 50 mL 烧杯中,加入处方量的卵磷脂、胆酸钠和三氯叔丁醇溶液制成脂质体 25 mL。吸取 0.4 mL 脂质体置 10 mL 量瓶中,加入 2 mL 水,再用无水乙醇定容至 10 mL,一阶导数法测定。回归方程 $DA = -0.0021C - 0.0015$, $r = 0.9999$ 。说明在 14 ~ 50.4 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 线性关系良好。

2.5 回收率与精密度 于空白柔性脂质体中精密加入辣椒碱 27,18,9 mg,按含量测定项下,测定 27,18,9 mg 的回收率分别为 104.82 %, 99.04 %, 100.64 % ($n = 5$),5 h 日内精密度的 RSD 分别为 3.57 %, 0.68 %, 0.89 %,5 d 日间精密度的 RSD 分别为 0.69 %, 1.26 %, 0.89 % ($n = 5$)。

2.6 传递体中辣椒碱含量测定 定量取辣椒碱传递体置 10 mL 的量瓶中,用无水乙醇定容至刻度。用一阶导数法测定,求出的 DA 值代入回归方程中求得辣椒碱的含量。得 3 批样品的标示含量分别为 100.01 %, 99.34 %, 99.76 %。

2.7 辣椒碱传递体包封率的测定 根据文献[6]报道的方法,葡聚糖凝胶用蒸馏水充分膨胀后,填充到凝胶柱,离心去除部分水分,吸取 0.4 mL 脂质体滴加到柱上,离心洗脱脂质体,将此溶液转入 10 mL 量瓶中,用无水乙醇定容。一阶导数法求被包封的辣椒碱含量 C_1 。另取 0.4 mL 的脂质体置于 10 mL 的量瓶中,加水 1.5 mL,无水乙醇定容。用一阶导数法求脂质体中辣椒碱总含量 C_2 ,包封率 = $C_1 / C_2 \times 100\%$ 。脂质含量为 2 %, 4 %, 6 %, 8 % 的辣椒碱传递体包封率分别为 73.1 %, 81.0 %, 88.4 %, 96.7 %。

2.8 释放度试验 参考文献[7],并作改进,确定 HPLC 测定条件:Diomonsil C_{18} 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-水-磷酸(75:25:0.1),检测波长为 281 nm,流速 1 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。称取辣椒碱对照品 5 mg 溶于 25 mL 无水乙醇,分别吸取 0.3,1,2,3,4,5,6 mL 于 10 mL 量瓶中,无水乙醇定容,得到含量为 6,20,40,60,80,100,120 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的辣椒碱标准溶液。按上述色谱条件测定,绘制辣椒碱 HPLC 标准曲线 $A = 6525C + 2913$, $r = 0.9995$,6 ~ 120 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 线性关系良好。日内、日间精密度的 RSD 均小于 2 % ($n = 5$),最低检测限为 5 μg 。

将半透膜(DM21 mm,截留分子质量 8 000 ~ 14 000)夹在透皮扩散试验仪供给池与接受池之间(扩散池面积 2.92 cm^2),在供给池一侧加入药液(含辣椒碱 490 μg),接受池含接受液与搅拌子,32 ℃ 恒温搅拌,在 2,4,6,8,10,12,24 h 定时取样 0.5 mL,同时补充同样体积的接受液。样品用 0.45 μm 微孔滤膜滤过按上述条件上 HPLC 测定,释放度结果见图 3。不同接受液,对透过影响很大,释放量随乙醇的比例增加而增加。

2.9 体外透皮试验 大鼠腹部皮肤透皮试验:取体

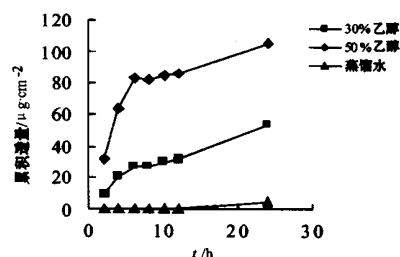


图 3 不同接受液对传递体中辣椒碱释放度的影响

重 150 g 雄性大鼠,乙醚麻醉后将腹部皮肤用含 6 % Na_2S 的脱毛液进行脱毛,清水洗净皮肤表面,处死大鼠,取下无损伤腹部皮肤,去除皮下脂肪,用生理盐水洗净并浸泡于生理盐水中。置 4 °C 冰箱放置,24 h 内使用。实验方法与释放度相同,只是将半透膜换成大鼠腹部皮肤,样品池分别为辣椒碱含量相同的霜剂、混悬液及传递体,接受液为 50 % 乙醇,透皮结果见图 4,辣椒碱累积透皮量传递体远大于霜剂、混悬液。小鼠腹部皮肤的体外透皮试验:昆明雄性小白鼠(20 ± 1) g,处死,剥皮,将腹部毛拔尽并去除皮下脂肪。用生理盐水洗净并浸泡于生理盐水中,置 4 °C 冰箱保存,24 h 内使用。实验方法与释放度相同,只是将半透膜换成小鼠腹部皮肤,样品池为辣椒碱传递体,接受液为 50 % 乙醇,并与大鼠及人皮肤比较,透皮结果见图 5,辣椒碱累积透皮量为:小鼠 $\gg$ 大鼠 $\gg$ 人。人体皮肤的体外透皮试验:小心去除人体腹部的皮下脂肪,得到完整皮肤;将除去皮下脂肪的皮肤浸入 65 °C 水中 1 min,小心剥离表皮层,得到表皮膜;除去表皮膜的为真皮层。完整皮肤、表皮膜、真皮层用生理盐水洗净并浸泡于生理盐水中置 4 °C 冰箱放置,24 h 内使用。实验方法与释放度相同结果见图 6,辣椒碱累积透皮量为:表皮膜 $\gg$ 真皮层、完整皮肤。

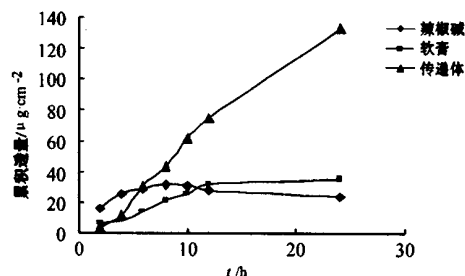


图 4 辣椒碱大鼠皮肤体外累积透皮量
(释放介质为 50 % 乙醇)

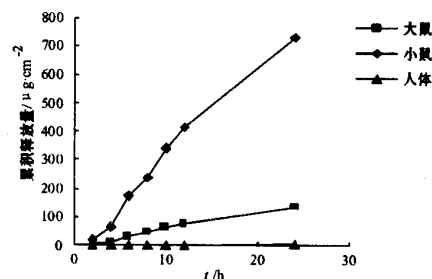


图 5 传递体中辣椒碱于不同皮肤层累积透过量

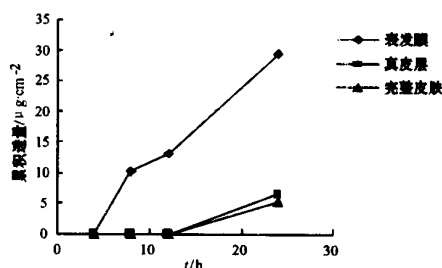


图 6 传递体中辣椒碱于人体不同皮肤层累积透过量

3 讨论

3.1 辣椒碱传递体结构、大小及包封率 采用高剪切分散乳化均质机,电镜照片显示辣椒碱传递体为小单室脂质体,平均粒径为 150.6 nm,多分散性系数为 0.28,粒度比较均匀。一阶导数法测定辣椒碱传递体包封率,辅料没有干扰,包封率随脂质含量增加而增加,当脂质浓度在 4 % 以上,均能达到药典规定的包封率大于 80 % 的要求。

3.2 释放度 传递体中辣椒碱的累积释放量随乙醇含量的提高增加,这是因为辣椒碱在水中溶解度较低的缘故。对于水溶性低的药物,已有多篇文章^[2,8]采用 50 % 乙醇作为接受液。但即使采用 50 % 的乙醇作接受液,辣椒碱累积释放量达到一定程度后不再线性增加,原因是乙醇反渗透,从接受池进入样品池,使辣椒碱传递体结构受到破坏,辣椒碱析出结晶不能透过半透膜。

3.3 透皮效果 辣椒碱传递体累积透皮量显著高于霜剂、混悬液,说明传递体的确有促进药物穿透皮肤的作用。大鼠腹部皮肤体外辣椒碱累积透过量近似一级过程,不同于采用半透膜的释放过程,这主要是皮肤不同于半透膜,不会发生乙醇反渗透的问题。

从小鼠、大鼠及人体皮肤体外辣椒碱累积透过量来看,皮肤越厚透皮越慢,尤其是小鼠与人体皮肤存在巨大差别,是否适合做透皮制剂的实验动物值得考虑,对于人体而言,需要多次给药让药物在体内

逐步达有效含量。

同时,注意到人体皮肤表皮膜的辣椒碱累积透皮量显著高于真皮层及完整皮肤。一般认为表皮膜的角质层是吸收的限速过程,当药物透过角质层到达真皮层后,由于真皮层含有丰富的毛细血管,很容易吸收。但离体皮肤,毛细血管不再起作用,而相比起表皮层(50 ~ 100 μm),真皮层要厚得多(1 ~ 2 mm),导致其成为辣椒碱透皮的限速过程。

[参考文献]

- [1] 黎万寿,陈 幸. 辣椒的研究进展. 中国中医药信息杂志, 2002,9(3):82.
- [2] Donnerer J, Amann R, Schuligoi R, *et al.* Absorption and metabolism of capsaicinoids following intragastric administration in rats. *Naunyn-Schmiedebers Arch Pharmacol*, 1990, 342:357.
- [3] Fang J Y, Wu P C, Huang Y B, *et al.* *In vivo* percutaneous absorp-

tion of capsaicin, nonivamide and sodium nonivamide acetate from ointment bases: pharmacokinetic analysis in rabbits. *Int J Pharm*, 1996,128:169.

- [4] El Maghraby G M, Williams A C, Barry B W. Skin delivery of 5-fluorouracil from ultradeformable and standard liposomes *in vitro*. *J Pharm Pharmacol*, 2001,53(8):1069.
- [5] El Maghraby G M, Williams A C, Barry B W. Oestradiol skin delivery from ultradeformable liposomes: refinement of surfactant concentration. *Int J Pharm*, 2000,196(1):63.
- [6] 洪 慧,龙晓英,李力任,等. 葡聚糖微型凝胶柱测定辣椒碱柔性脂质体包封率的条件探讨. 广东药学院学报, 2005,21(2):120.
- [7] 黎万寿,陈 幸,石克金,等. 辣椒素的工业化提取工艺. 现代中药研究与实践, 2004,18(1):55.
- [8] Maria Manconi, Chiara Sinico, Donatella Valenti, *et al.* Niosomes as carriers for tretinoin. I. Preparation and properties. *Int J Pharm*, 2002,234(2):237.

Preparation and *in vitro* evaluations of topically applied capsaicin transfersomes

LONG Xiao-ying^{1,2}, LUO Jia-bo¹, LI Li-ren², LIN dan², RONG Hu-si², HUANG Wei-min²

(1. Southern Medical University, Guangzhou 510515, China;

2. Guangdong College of Pharmaceutical Science, Guangzhou 510244, China)

[Abstract] **Objective:** Capsaicin transfersomes were prepared and its quality specifications were evaluated. **Method:** Capsaicin transfersomes were prepared by high shear dispersing machine and evaluated on the entrapment efficiency, drugs release rate and *in vitro* skin permeation. **Result:** Capsaicin transfersomes is composed of single unilamellar vesicles, with average size of 150.6 nm. Capsaicin entrapment efficiency achieved 96.7% while concentration of lecithin used was 8%. cumulative release amount of capsaicin was in direct proportion to the ethanol concentration in the medium. The *in vitro* rate cumulative penetration rate of capsaicin was higher in transfersomes than in cream and suspension in rats. Adomen skin cumulative penetration rate *in vitro* of capsaicin transfersomes in mouse was significantly higher than that from rat and men. In the same way, cumulative penetration rate *in vitro* of capsaicin transfersomes through abdomen skin epidermal membrane was significantly higher than that with derma and full skin in men. **Conclusion:** Entrapment efficiency of capsaicin transfersomes reached 96.7%, meeting the criterion of China pharmacopia(>80%), skin penetration of capsaicin was enhanced by a capsaicin transfersomes preparation and was affected by diverse characters and levels of skin.

[Key words] capsaicin; transfersomes; entrapment efficiency; skin penetration

[责任编辑 鲍 雷]