



## (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106943341 B

(45)授权公告日 2020.01.24

(21)申请号 201710325243.6

A61K 47/32(2006.01)

(22)申请日 2017.05.10

A61P 17/02(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106943341 A

(43)申请公布日 2017.07.14

(73)专利权人 重庆理工大学

地址 400054 重庆市巴南区李家沱红光大道69号重庆理工大学

(72)发明人 赵颖 宋丹 宋婷 李智豪

(74)专利代理机构 重庆辉腾律师事务所 50215

代理人 王海军

(51)Int.Cl.

A61K 9/06(2006.01)

A61K 31/343(2006.01)

A61K 47/24(2006.01)

(56)对比文件

US 2008233145 A1, 2008.09.25, 第0060, 0068段.

CN 1555804 A, 2004.12.22, 全文.

于吉臣等. 松萝酸脂质体的制备及质量评价.《中国药科大学学报》.2007, 第38卷(第5期), 第404-406页.

审查员 李双双

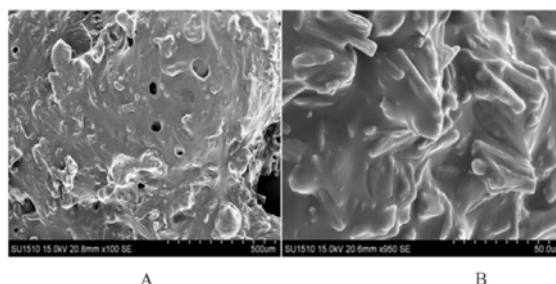
权利要求书1页 说明书15页 附图2页

(54)发明名称

一种改善松萝酸透皮吸收的外用制剂及其在促皮肤创伤愈合中的应用

(57)摘要

为了克服松萝酸吸收困难和现有松萝酸新型给药系统载药量小的问题,本发明提供了一种改善松萝酸透皮吸收和促进皮肤创伤愈合的外用制剂,所述外用制剂的配方为松萝酸、蛋黄卵磷脂、卡波姆940、丙三醇、三乙醇胺、水。本发明提供了一种改善松萝酸透皮吸收和促皮肤创伤愈合的外用制剂,解决了松萝酸溶解性差和现有松萝酸新型给药系统载药量小的技术问题,同时提供了一种将松萝酸应用于外用制剂的技术方案;提供了一种松萝酸用药的新途径。并且松萝酸磷脂复合物凝胶剂在促皮肤创伤愈合中具有良好的活性。



A

B

1.改善松萝酸透皮吸收的外用制剂的制备方法,其特征在于:包括以下步骤:

1) 根据比例称取松萝酸原料、蛋黄卵磷脂、卡波姆940、丙三醇和三乙醇胺;

2) 将氯仿溶解的10g/L的松萝酸原料与蛋黄卵磷脂混合,在50℃下反应5h,减压除去反应溶剂,得到松萝酸磷脂复合物;

3) 向 松萝酸磷脂复合物中,加入适量丙酮洗涤除去复合物中的游离松萝酸;

4) 抽滤,收集沉淀,减压干燥即为松萝酸磷脂复合物;

5) 用匀浆机将松萝酸磷脂复合物高速分散到水中,再加入处方量的卡波姆940均匀铺撒在水面,静置12h使之完全分散;

6) 加入三乙醇胺和丙三醇,混匀,补足水至处方量,得到松萝酸磷脂复合物凝胶剂;

步骤1) 中所述松萝酸原料与蛋黄卵磷脂的质量比为1:1。

2.权利要求1所述的方法制备的改善松萝酸透皮吸收的外用制剂在制备促皮肤创伤愈合药物中的应用。

## 一种改善松萝酸透皮吸收的外用制剂及其在促皮肤创伤愈合中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种外用制剂,更具体的说涉及一种改善松萝酸透皮吸收的外用制剂及其应用。

### 技术背景

[0002] 松萝酸为松萝科 (*Usneaceae*) 植物松萝 *Usnea diffracta* Vain. 和长松萝 *Usnea longissima* Ach. 的干燥地衣体。性质:黄色斜方棱柱状结晶(丙酮)。熔点204℃。旋光度 +509.4° ( $c=0.697$ , 氯仿)。25℃时的溶解度(g/100ml水) <0.01, 丙酮0.77, 醋酸乙酯0.88, 乙醇0.02, 糖醛7.32, 糖醇1.21。可化学合成或生物合成制得。

[0003] 松萝属等许多地衣类植物都含有抗菌物质,其中松萝酸之抗菌作用尤为突出。其抗菌谱主要为革兰氏阴性细菌及结核杆菌。在试管中松萝酸对肺炎球菌、溶血性链球菌、白喉杆菌、结核杆菌都有很强的抑菌作用,抑菌浓度为1-5 $\mu\text{g/ml}$ ,至50 $\mu\text{g/ml}$ 可完全抑制细菌的生长。对金黄色葡萄球菌之抑制较上述细菌稍弱,但强于对革兰氏阴性细菌之作用。右旋与左旋型的抗菌作用无大差别。但也有报告对革兰氏阴性的百日咳杆菌、枯草杆菌、肺炎杆菌乃至大肠杆菌、变形杆菌有效者,对痢疾杆菌、伤寒杆菌则无效。在体外试验中,松萝酸对人型结核杆菌有显著的抑制作用,20-50 $\mu\text{g/ml}$ 可获得完全抑制,血清略能降低其效力。在体内试验中(对豚鼠的实验性结核的治疗),一般认为口服或腹腔注射有较好的疗效,能限制结核病变的发展;也有人报告单用松萝酸,对豚鼠实验性结核并无影响,但可增强链霉素的作用。在试管中,它与链霉素或异烟肼也有轻度的协同作用。对人的肺、肠结核,每日口服0.1-1.0g 松萝酸钠盐或Evosin(一种含松萝酸及缩酚酸的制剂)0.1-0.5g,可使结核病的某些症状如咳嗽、食欲减退、发热或肠结核性腹泻等,获得好转,甚至使结核菌的镜检转阴,但观察尚不够完善,不能下最后结论。上述症状的好转,似乎并非药物对结核菌的直接作用,因口服后,血中达不到抑菌浓度的水平。有人认为,它对人的结核病并无明显疗效。国内用松萝酸治疗肺结核,曾观察到有一定疗效。对松萝酸的抑菌作用原理,曾进行过不少研究,有人认为它能抑制蛋白质的合成,也有认为它与氧化磷酸化的斥联有关。

[0004] 以0.2-0.4%松萝酸与破伤风毒素或白喉毒素混合或在毒素注射后10分钟内注射,可使小鼠耐受2倍的毒素致死量。对豚鼠接种白喉杆菌后2小时,皮下注射松萝酸2mg/kg,或事先将二者混合培养再接种于豚鼠,均有明显的保护作用。小鼠实验性破伤风杆菌感染,以松萝酸与青霉素联合应用的效果最好。用纸碟法证明,d-松萝酸0.5-5mg/ml有对抗噬菌体的作用。

[0005] 松萝酸对原虫、阴道滴虫也有抑制作用。口服松萝酸钠100-150mg/kg对羊的血吸虫、肝片吸虫均有伤害及杀灭作用,肌肉注射可获更好效果;对兔血吸虫,由于其毒性较大,而用其衍生物-松萝酸苯胺,口服200mg/kg/d,连服9天,亦获得良好效果。

[0006] 对部分肝切除的大鼠,喂食松萝酸有促进肝再生的作用。能降低离体大鼠横膈对葡萄糖的利用及其糖元含量。麻醉猫静脉注射松萝酸钠30mg/kg,可使血糖升高。D-松萝酸

能显著抑制海星 (Ar-bacia) 受精卵的分裂及磷的摄取,而对氧消耗则几无影响。它还能抑制大鼠腹水瘤细胞 (AH13AH7974) 的粒线体内 $\alpha$ -甘油磷酸新四唑还原酶的活性。D-松萝酸对离体豚鼠、蛙心均有抑制作用;对离体兔耳及蟾蜍下肢灌流,均有扩张血管之作用;对离体兔肠有罂粟碱样作用,麻痹肠管并拮抗氯化钡、乙酰胆碱引起的痉挛;对兔、牛的子宫、支气管及肠管亦有松弛作用。麻醉猫静脉注射10mg/kg松萝酸钠,能迅速而显著的增强其呼吸、较长时间的提高通气量、增加氧耗、升高体温,这些都说明代谢增进,有类似二硝基酚的作用,且毒性大于二硝基酚。

[0007] 针对松萝酸水溶解性不佳的问题,Vesna Nikolic' (人名) 等采用 $\beta$ -环糊精及其衍生物 HP- $\beta$ -环糊精包封松萝酸,发现通过分子包封可以改善松萝酸在水中的溶解度,松萝酸 $\beta$ -环糊精包合物的溶解度为0.3mg/cm<sup>3</sup>,HP- $\beta$ -环糊精包合物的溶解度为4.2mg/cm<sup>3</sup>,而未形成包合物的松萝酸溶解度为0.06mg/cm<sup>3</sup>。但是上述的包封处理仅适用于口服直接的应用。目前还没有找到适用外用制剂的改善松萝酸水溶解性和吸收的方法,并发表在2013年的《包封及大环化合物杂志》(Vesna Nikolic'、Mihajlo Stankovic'、Ljubis a Nikolic' • Goran Nikolic'、Snez'ana Ilic'-Stojanovic'、Mirjana Popsavin、Sas'a Zlatkovic'、Tatjana Kundakovi. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry. (2013) 76:173 -182.) 上。

[0008] 于吉臣以蛋黄粗磷脂作为原料分离提纯得到E80 (磷脂酰胆碱PC的含量在80%以上) 以及深加工产品E98 (磷脂酰胆碱PC的含量在98%以上),并对两种产品的质量做出评价。结果表明,E98和胆固醇以70:30 (mol:mol) 为配方制备的脂质体,可以包封松萝酸药量达1mg/50mg 左右,脂质体的粒径为130 $\pm$ 120nm,包封率在90%以上。将贮存一个月后的脂质体再进行质量评价,发现脂质体粒径较以前有所变大。这和PC为中性磷脂有关,符合文献报道的情况。包封率也有所下降 (硕士论文,郑州大学,2007年)。

## 发明内容

[0009] 为了克服松萝酸吸收困难和现有松萝酸新型给药系统载药量小的问题,本发明提供了一种改善松萝酸透皮吸收和促进皮肤创伤愈合的外用制剂,所述外用制剂的配方为松萝酸、蛋黄卵磷脂、卡波姆940、丙三醇、三乙醇胺、水。

[0010] 改善松萝酸透皮吸收的外用制剂的制备方法,包括以下步骤:

[0011] 1) 根据比例称取松萝酸原料、蛋黄卵磷脂、卡波姆940、丙三醇和三乙醇胺;

[0012] 2) 将氯仿溶解的10g/L松萝酸原料与蛋黄卵磷脂混合,在50℃下反应5h,减压除去反应溶剂,得到松萝酸磷脂复合物;

[0013] 3) 将松萝酸磷脂复合物中,加入适量丙酮洗涤除去复合物中的游离松萝酸;

[0014] 4) 抽滤,收集沉淀,减压干燥即为松萝酸磷脂复合物;

[0015] 5) 将松萝酸磷脂复合物用匀浆机将其高速分散到水中,再加入处方量的卡波姆940均匀铺撒在水面,静置12h使之完全分散;

[0016] 6) 加入三乙醇胺和丙三醇,混匀,补足水至处方量,得到松萝酸磷脂复合物凝胶剂。

[0017] 所述松萝酸的反应质量浓度为10g/L。

[0018] 所述松萝酸的水溶物中含有的松萝酸与蛋黄卵磷脂的质量比为1:1;所述松萝酸

磷脂复合物的平均复合率大于85%。

[0019] 所述的改善松萝酸透皮吸收的外用制剂在制备促皮肤创伤愈合中的应用。

[0020] 本发明的有益技术效果是：本发明提供了一种改善松萝酸透皮吸收和促皮肤创伤愈合的外用制剂，解决了松萝酸溶解性差和现有松萝酸新型给药系统载药量小的技术问题，同时提供了一种将松萝酸应用于外用制剂的技术方案。提供了一种松萝酸用药的新途径。并且松萝酸磷脂复合物凝胶剂在促皮肤创伤愈合中具有良好的活性。

## 附图说明

[0021] 图1 UA与磷脂物理混合物与UA磷脂复合物的电镜观察(A为物理混合,B为复合)；

[0022] 图2 UA磷脂物理混合物(A组)与UA磷脂复合物(B组)系统<sup>1</sup>H图；

[0023] 图3松萝酸不同脂类载体的单位面积累积渗透量(兔皮)。

## 具体实施方式

[0024] 实施例1松萝酸不同脂质载体经皮凝胶制剂的制备

[0025] 1.样品的制备

[0026] 1.1松萝酸磷脂复合物凝胶的制备

[0027] 1.1.1不同洗脱溶剂对磷脂复合物复合率的影响

[0028] 固定反应时间、松萝酸质量浓度、松萝酸：磷脂投料比，反应温度不变，考察不同洗脱溶剂种类对复合率的影响，结果见表1。

[0029] 表1：不同洗脱溶剂对磷脂复合物复合率的影响

| [0030] | NO | 洗脱溶剂 | 反应时间 (h) | 松萝酸质量浓度 (g/L <sup>-1</sup> ) | 松萝酸：磷脂投料比 (g/g)     | 反应温度 (°C) | 复合率 (%) |
|--------|----|------|----------|------------------------------|---------------------|-----------|---------|
|        | 1  | 乙醇   | 4        | 5 (20mL反应溶剂中加入100mg松萝酸)      | 1: 1 (100mg: 100mg) | 40        | 38%     |
| [0031] | 2  | 丙酮   | 4        | 5                            | 1: 1                | 40        | 63%     |
|        | 3  | 乙酸乙酯 | 4        | 5                            | 1: 1                | 40        | 30%     |

[0032] 实验结果表明丙酮为最佳洗脱溶剂。

[0033] 1.1.2不同反应溶剂对磷脂复合物复合率的影响

[0034] 固定洗脱溶剂、松萝酸质量浓度、反应时间、松萝酸：磷脂投料比，反应温度不变，考察不同反应溶剂种类对复合率的影响，结果见表2。

[0035] 表2：不同反应溶剂对磷脂复合物复合率的影响

| [0036] | 洗脱溶剂 | 反应溶剂 | 松萝酸质量浓度 | 反应时间 | 松萝酸：磷脂投料比           | 温度 | 复合率 |
|--------|------|------|---------|------|---------------------|----|-----|
|        | 丙酮   | 四氢呋喃 | 5       | 4h   | 1: 2 (100mg: 200mg) | 40 | 63% |
|        | 丙酮   | 二氯甲烷 | 5       | 4h   | 1: 2 (100mg: 200mg) | 40 | 65% |
|        | 丙酮   | 三氯甲烷 | 5       | 4h   | 1: 2 (100mg: 200mg) | 40 | 81% |

[0037] 实验结果表明氯仿为最佳反应溶剂。

[0038] 1.1.3不同反应时间对松萝酸磷脂复合物复合率的影响

[0039] 固定反应溶剂、洗脱溶剂、松萝酸质量浓度、松萝酸：磷脂投料比，反应温度不变，

考察不同反应时间对复合率的影响,结果见表3。

[0040] 表3:不同反应时间对磷脂复合物复合率的影响

|        | 洗脱溶剂 | 反应溶剂 | 松萝酸质量浓度 | 反应时间 | 松萝酸磷脂投料比 | 温度 | 复合率 |
|--------|------|------|---------|------|----------|----|-----|
| [0041] | 丙酮   | 三氯甲烷 | 5       | 1h   | 1: 2     | 40 | 51% |
|        | 丙酮   | 三氯甲烷 | 5       | 2h   | 1: 2     | 40 | 49% |
|        | 丙酮   | 三氯甲烷 | 5       | 3h   | 1: 2     | 40 | 63% |
|        | 丙酮   | 三氯甲烷 | 5       | 4h   | 1: 2     | 40 | 79% |
|        | 丙酮   | 三氯甲烷 | 5       | 5h   | 1: 2     | 40 | 78% |

[0042] 实验结果表明4h是较为理想的反应时间。

[0043] 1.1.4药物浓度对松萝酸磷脂复合物复合率的影响

[0044] 固定反应溶剂、洗脱溶剂、反应时间、松萝酸:磷脂投料比,反应温度不变,考察不同松萝酸质量浓度对复合率的影响,结果见表4。

[0045] 表4:药物浓度对松萝酸磷脂复合物复合率的影响

|        | 洗脱溶剂 | 反应溶剂 | 松萝酸质量浓度                     | 反应时间 | 松萝酸磷脂投料比          | 温度 | 复合率 |
|--------|------|------|-----------------------------|------|-------------------|----|-----|
| [0046] | 丙酮   | 三氯甲烷 | 2.5 (20mL 反应溶剂中加入 50mg 松萝酸) | 4h   | 1:2 (50mg:100mg)  | 40 | 52% |
|        | 丙酮   | 三氯甲烷 | 5 (20mL 反应溶剂中加入 100mg 松萝酸)  | 4h   | 1:2 (100mg:200mg) | 40 | 73% |
|        | 丙酮   | 三氯甲烷 | 10 (20mL 反应溶剂中加入 200mg 松萝酸) | 4h   | 1:2 (200mg:400mg) | 40 | 80% |

[0048] 实验结果表明10mg/ml是松萝酸比较理想的反应浓度。

[0049] 1.1.5反应温度对松萝酸磷脂复合物复合率的影响

[0050] 固定反应溶剂、洗脱溶剂、反应时间、松萝酸质量浓度、松萝酸:磷脂投料比不变,考察不同反应温度对复合率的影响,结果见表5。

[0051] 表5:反应温度对松萝酸磷脂复合物复合率的影响

|        | 洗脱溶剂 | 反应溶剂 | 松萝酸质量浓度 | 反应时间 | 松萝酸磷脂投料比 | 反应温度 | 复合率   |
|--------|------|------|---------|------|----------|------|-------|
| [0052] | 丙酮   | 三氯甲烷 | 10      | 4h   | 1: 2     | 20   | 65.5% |
|        | 丙酮   | 三氯甲烷 | 10      | 4h   | 1: 2     | 30   | 88.5% |
|        | 丙酮   | 三氯甲烷 | 10      | 4h   | 1: 2     | 40   | 87.5% |
|        | 丙酮   | 三氯甲烷 | 10      | 4h   | 1: 2     | 50   | 85%   |

[0053] 实验结果表明,30℃和40℃的温度条件均可以使制成品达到较理想的复合率。

[0054] 1.1.6正交试验设计

[0055] 在单因素考察的基础上,本实验根据松萝酸的理化性质,固定反应溶剂为三氯甲烷20mL,洗脱溶剂为丙酮,以复合率和复合物中药物含量作为评价指标,分别考察UA质量浓度、松萝酸磷脂投料比、反应时间、反应温度四个实验因素,每个因素各取3个水平,采用L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)表,对松萝酸磷脂复合物进行正交试验设计。因素水平见表6,试验结果见表7。

[0056] 复合率的计算:每号试验取圆底烧瓶精密称重记录重量,将一定量的药物和蛋黄磷脂加入到圆底烧瓶中,用20ml反应溶剂溶解后,在一定条件下反应一定时间后,减压除去反应溶剂,放于玻璃干燥器中充分干燥后,称定圆底烧瓶和药物的总重,减去圆底烧瓶重即得(药物+蛋黄磷脂)重量,再加入适量的洗脱溶剂,充分溶解其中的未形成复合物的游离药物,将洗脱溶剂快速倒出进行抽滤,收集沉淀,干燥后称重得到游离药物重,同时将圆底烧瓶中的复合物再次减压干燥,蒸干所得物即为松萝酸磷脂复合物。松萝酸药物的初始投料量与沉淀量之差即为与磷脂复合的药物的量,从中计算出每号试验中药物与磷脂的复合率,计算公式:松萝酸磷脂复合物的复合率 =  $(W_0 - W) / W_0 \times 100\%$ ,式中,  $W_0$  为松萝酸初始投入量,  $W$  为松萝酸的最终沉淀量。

[0057] 复合物中药物含量测定:称取磷脂复合物5mg,用二氯甲烷5mL溶解后,加甲醇稀释定容至50mL,0.45um微孔滤膜过滤后,285nm处测定峰面积值,计算药物含量。

[0058] 综合评分:综合评分 = 复合率绝对值  $\times 0.5$  + 复合物中药物含量  $\times 0.5$

[0059] 表6因素水平

|        | 因素 | UA 质量浓度                  | 松萝酸磷脂投料比 | 反应时间    | 反应温度(D) |
|--------|----|--------------------------|----------|---------|---------|
|        | 水平 | (g/L <sup>-1</sup> ) (A) | (B)      | (C) (h) | (°C)    |
| [0060] | 1  | 5 (100mg)                | 1:1      | 3       | 30      |
|        | 2  | 10 (200mg)               | 1:2      | 4       | 40      |
|        | 3  | 15 (300mg)               | 1:3      | 5       | 50      |

[0061] 表7正交实验考察

|        | 实验号 | 评价指标    |         |         |         |         |                 |
|--------|-----|---------|---------|---------|---------|---------|-----------------|
|        |     | A       | B       | C       | D       | 复合率 (%) | 复合物中药物含量 (mg/g) |
| [0062] | 1   | 1       | 1       | 1       | 1       | 77.54   | 291.03          |
|        | 2   | 1       | 2       | 2       | 2       | 69.3    | 243.52          |
|        | 3   | 1       | 3       | 3       | 3       | 74.13   | 186.6           |
|        | 4   | 2       | 1       | 2       | 3       | 83.93   | 417.66          |
|        | 5   | 2       | 2       | 3       | 1       | 85.59   | 297.1           |
|        | 6   | 2       | 3       | 1       | 2       | 85.96   | 205.5           |
|        | 7   | 3       | 1       | 3       | 2       | 85.27   | 387.24          |
|        | 8   | 3       | 2       | 1       | 3       | 89.65   | 237.57          |
|        | 9   | 3       | 3       | 2       | 1       | 87.72   | 171.55          |
|        | k1  | 157.017 | 223.78  | 164.54  | 168.42  |         |                 |
|        | k2  | 195.957 | 170.453 | 178.95  | 179.467 |         |                 |
|        | k3  | 176.503 | 135.243 | 185.987 | 181.59  |         |                 |
|        | R   | 38.94   | 88.537  | 21.447  | 13.17   |         |                 |

[0063] 直观分析表明:比较各因素极差,松萝酸磷脂复合物和药物含量的影响因素从大到小为:  $B>A>C>D$ ,比较各因素不同水平均值,确定最佳制备条件为: $A_2B_1C_3D_3$ ,即松萝酸的质量浓度为10g/L,投料比为1:1,反应时间为5h,反应温度为50℃。

[0064] 按照优选条件制备松萝酸磷脂复合物:按上述最佳条件将松萝酸原料和蛋黄卵磷脂加入到反应瓶中,用三氯甲烷反应溶剂溶解后,在50℃下反应5h,减压除去反应溶剂,充分干燥后,再加入适量丙酮洗涤除去复合物中的游离药物,抽滤,收集沉淀,减压干燥即为松萝酸磷脂复合物,将其置于干燥器中保存,制备得到UA磷脂复合物。

[0065] UA磷脂复合物的含量测定:精密称取UA磷脂复合物于50ml容量瓶中,先用5mL  $CH_2Cl_2$ 溶解,再加甲醇稀释定容至50mL,过滤后,进行HPLC检测,进样20 $\mu$ L,于285nm波长处检测样品的峰面积值,按外标法以峰面积计算,求出样品中松萝酸的含量。具体如表8所示。

[0066] 表8 UA磷脂复合物样品含量测定数据

|        | 组别       | 质量/mg | 松萝酸质量 mg | 松萝酸含量% |
|--------|----------|-------|----------|--------|
| [0067] | UA 磷脂复合物 | 4.851 | 2.343    | 48.3   |

[0068] 从表8 的数据可知,每1g的PC中能够包埋的松萝酸0.934g。扣除在包埋过程中的损失,因此,松萝酸和PC的投料比以1:1为最佳。所以以松萝酸和PC的投料比以1:1制备得到的产物为UA磷脂复合物。将UA磷脂复合物通过电镜检测和MR检测,具体如图1、2所示。

[0069] 1.1.7松萝酸磷脂复合物凝胶剂的制备

|        |      |            |         |
|--------|------|------------|---------|
| [0070] | 【处方】 | 卡波姆 940    | 0.125g  |
|        |      | UA 磷脂复合物   | 0.35g   |
|        |      | 丙三醇        | 2.5g    |
|        |      | 三乙醇胺 (TEA) | 0.1699g |
|        |      | 纯化水        | 加至 25g  |

[0071] 【制备方法】采用溶胀法。精密称取采用松萝酸和PC的投料比为0.8:1制备的UA磷脂复合物0.35g (相当于0.127gUA),用匀浆机将其高速分散在15ml纯化水中,再加入处方量的卡波姆940均匀铺撒在水面,静置12h使之完全分散,再分别称取处方量的TEA和甘油加入其中,混匀,补足纯化水至处方全量,得到5.0229mg/g浓度的松萝酸磷脂复合物凝胶剂,置于容器中密闭低温保存,得到UA磷脂复合物凝胶。

[0072] 精密称取0.1g松萝酸磷脂复合物凝胶剂,先用1mL三氯甲烷溶解,再定容至25mL,摇匀。取定容后的溶液2mL于10mL容量瓶中,用甲醇定容至10mL,用0.45 $\mu$ m微孔滤膜过滤,进样20  $\mu$ L,于285nm处检测样品的峰面积值并记录色谱图,代入线性回归方程,计算样品中松萝酸的含量。松萝酸磷脂复合物凝胶剂样品中松萝酸的含量为:0.3629%。

[0073] 1.2松萝酸纳米乳凝胶的制备

[0074] 1.2.1松萝酸纳米乳的制备



|        |      |                                    |       |
|--------|------|------------------------------------|-------|
| [0075] | 【处方】 | 松萝酸                                | 100mg |
|        |      | Labrafac Lipophile WL 1349(中链甘油三酯) | 2.5g  |
|        |      | Maisine35-1(单亚油酸甘油酯)               | 2.5g  |
| [0076] |      | Cremophor RH40(聚氧乙烯氢化蓖麻油 RH40)     | 10g   |
|        |      | Transcutol P(二乙二醇单乙基醚)             | 5g    |

[0077] 【制备方法】采用混合法。称取处方中的聚氧乙烯氢化蓖麻油RH40于三角锥形瓶中50℃下保温使其溶解,将处方量的松萝酸加入到其中充分混合均匀,然后将二乙二醇单乙基醚加入三角锥形瓶中混匀,最后加入中链甘油三酯和单亚油酸甘油酯于容器中,于37℃下恒温振荡直至药物完全溶解混合均匀,即得到松萝酸纳米乳的浓缩液,将其置于4℃冰箱中密闭保存,临用加水稀释至一定倍数即得,得到UA纳米乳。

[0078] 精密称取制备得到的松UA纳米乳每份50mg,分别置于10mL容量瓶中,加入适量甲醇超声10min溶解后定容至刻度,摇匀,用0.45μm微孔滤膜滤过,按UA SMEDDS体外样品HPLC的测定方法,进样20μL,于285nm波长处检测样品的峰面积值并记录色谱图,按外标法以峰面积计算,求出样品中松萝酸的含量。UA纳米乳的含量为3.57%。

[0079] 1.2.2松萝酸纳米乳凝胶的制备

|        |      |         |         |
|--------|------|---------|---------|
| [0080] | 【处方】 | 卡波姆 940 | 0.125g  |
|        |      | UA 纳米乳  | 3.0g    |
|        |      | 丙三醇     | 2.5g    |
|        |      | 三乙醇胺    | 0.1699g |
|        |      | 纯化水     | 加至 25g  |

[0081] 【制备方法】采用溶胀法。精密称取3.0g(相当于UA0.1125g)松萝酸纳米浓缩乳,加纯化水20mL稀释混匀,再加入处方量的卡波姆940轻轻铺撒在其表面,静置过夜使其分散均匀,再分别精密称取0.1699g三乙醇胺和0.25g丙三醇加入到凝胶中,混匀,补足纯化水至处方全量,得到松萝酸纳米乳凝胶剂,置于4℃冰箱中密闭保存,制备得到UA纳米乳凝胶。

[0082] 分别精密称取松萝酸纳米乳凝胶剂0.5g,共3份,先用1mL三氯甲烷溶解,再用甲醇定容至10mL,摇匀,超声10min,用0.45μm微孔滤膜过滤,进样20μL,于285nm处检测样品的峰面积值并记录色谱图,代入线性回归方程,求出样品中松萝酸的含量。松萝酸的含量为0.447%。

[0083] 1.3松萝酸凝胶的制备

|        |      |           |         |
|--------|------|-----------|---------|
| [0084] | 【处方】 | 松萝酸       | 0.1g    |
|        |      | 卡波姆940    | 0.125g  |
|        |      | NaOH      | 0.025g  |
|        |      | 三乙醇胺（TEA） | 0.0845g |
|        |      | 甘油        | 2.5g    |
|        |      | 纯化水       | 加至25g   |

[0085] 【制备方法】采用溶胀法。精密称取0.125g CP940均匀铺撒在装有适量纯化水（约12.5mL）的烧杯中溶胀过夜，使其充分分散。然后先用适量的纯化水将处方量的氢氧化钠溶解，再加入处方量的松萝酸，混匀后加入到烧杯中，加入称量好的TEA和丙三醇，搅匀后定量至25g，得到UA凝胶。

[0086] 分别精密称取0.1g松萝酸凝胶剂三份，先用1mL三氯甲烷溶解后，再用甲醇定容至25 mL，摇匀。移取2mL定容后的样品溶液于10mL容量瓶中，用甲醇定容至10mL，微孔滤膜过滤后，进样20 $\mu$ L，于285nm处检测样品的峰面积值，代入线性回归方程，求出样品中松萝酸的含量，松萝酸凝胶剂样品中松萝酸含量为：0.387%。

[0087] 实施例2松萝酸不同脂质载体凝胶剂的体外透皮吸收测定

[0088] 1 试验方法

[0089] 体外经皮透过实验用皮肤，以取自临床上给药部位的离体人皮为佳，但是人的皮肤不但不易得到，而且很难是条件保持一致，因此常常选用合适的动物皮肤来代替。本研究采用小鼠皮肤及中型家兔的皮肤进行松萝酸不同脂质载体制剂的体外透皮测定。

[0090] 1.1 主要试剂的配制

[0091] 1.1.1 pH 7.4磷酸盐缓冲液：精密称取1.36g磷酸二氢钾，加入79mL 0.1mol/L的氢氧化钠溶液，轻轻振荡，混合均匀后加入纯化水定容至200mL即可。

[0092] 1.1.2 生理盐水：精密称取0.90g氯化钠，加入纯化水定容至100mL。

[0093] 1.1.3 流动相：精密称取3.4g磷酸二氢钾置于500ml容量瓶中，加入适量的纯化水使其完全溶解，再加纯化水定容至刻度线，最后加入1mL三乙胺，摇匀过滤后，放置于4℃冰箱密闭保存。

[0094] 1.2 离体皮肤制备

[0095] 1.2.1 家兔皮肤的制备

[0096] 选取体重2.0~2.5kg的家兔，处死后取其腹部的皮，采用宠物剪毛器剪去皮上的长毛后，进一步用电剃须刀剃去剩余的毛，至皮肤裸露，务必使皮肤完好无损；除去皮下脂肪，得到厚度均匀的离体兔皮，浸入生理盐水中于4℃下保存备用。离体兔皮须在一周内使用，一般不超过4天。

[0097] 1.2.2 小鼠皮肤的制备

[0098] 选取大小体重相接近的健康雄性小鼠，采用剪刀剪去较长的毛发，然后用电动剃须刀处理短毛发。用单背刀小心刮去皮下脂肪组织和粘连物，务必使皮肤完好无损，用生理盐水反复冲洗干净后，浸入0.9%氯化钠溶液中于4℃冷冻保存待用，1周内用完。

[0099] 1.3 体外透皮实验

[0100] 采用直立式Franz扩散池进行透皮试验。透皮仪扩散面积:3.4cm<sup>2</sup>,有效透皮面积为1.431cm<sup>2</sup>,接受池容积为15ml,接受液为pH 7.4磷酸盐缓冲液。

[0101] 选取完好的皮肤,将其剪长宽2cm的正方形。接收池分别标记为1、2、3号,并放置磁力搅拌子,将皮肤固定于扩散池的供体池和接收池之间,使角质层面向供体池。接收池中加满pH7.4磷酸缓冲盐作为接收介质,并排出气泡,使液面恰与皮肤接触。分别精密称取松萝酸不同脂质载体的制剂共3份,设置水浴温度为32℃,磁力搅拌子以200rpm的速度搅,在0.5h、1h、3h、6h、9h、12h、24h各时间点在接收池取出1mL样品于EP管中,同时补加1mL 等温、新鲜的pH7.4磷酸缓冲盐于接受池中,再向EP管中加入甲醇1mL,摇匀。取定容后的样品溶液于0.45μm微孔滤膜过滤,弃去初滤液,收集续滤液,进样20μL,在285nm处检测样品的峰面积值,并按式(1)计算单位面积累积透过量。

$$[0102] \quad Q_n = (C_n \times V_0) / A \quad (1)$$

[0103] 式中A为皮肤有效扩散面积,V<sub>0</sub>为接受池体积,C<sub>n</sub>为第n次取样时药物浓度的测量值。

[0104] 1.4药物在皮肤的滞留量的测定

[0105] 取持续透皮24h的皮肤,用pH 7.4磷酸盐缓冲液反复清洗皮肤表面残留物,并用滤纸将水分吸干;分别将各号皮肤剪碎,加入一定量的pH 7.4磷酸盐缓冲液匀浆,匀浆后超声10min,再放入冰箱(4℃)静置30min,8000r/min离心30分钟,转移上清液于离心管中,用磷酸缓冲液定容至2.5ml,再用甲醇定容至10ml,0.45μm微孔滤膜过滤后,取样20μL,在285nm波长下检测样品的峰面积。并按式(2)计算单位面积皮肤的滞留量(Q<sub>s</sub>)。

$$[0106] \quad Q_s = C_s \times 10 / A \quad (2)$$

[0107] 式中C<sub>s</sub>为透皮24小时皮肤样品溶液中药物质量浓度(μg/mL),A为皮肤有效渗透面积(cm<sup>2</sup>)。

[0108] 2松萝酸不同脂质载体经皮凝胶制剂的体外透皮吸收数据的分析

[0109] 2.1采用小鼠皮肤对松萝酸不同脂质载体的制剂进行透皮实验的结果如表9、10、11、12、13所示。

[0110] 表9 UA凝胶单位面积累积透皮量数据(n=3)

|        | 时间    | 单位面积累积透皮量 μg/cm <sup>2</sup> |                   |                   | 平均单位面积累积透皮量 μg/cm <sup>2</sup><br>(x ± s) |
|--------|-------|------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------------------------------|
|        |       | 样品 1<br>(2.0041)             | 样品 2<br>(2.0048g) | 样品 3<br>(2.0030g) |                                           |
| [0111] | 30min | 2.799                        | 3.188             | 1.881             | 2.622 ±0.671                              |
|        | 1h    | 6.121                        | 6.030             | 3.606             | 5.253 ±1.426                              |
|        | 2h    | 13.647                       | 18.005            | 15.408            | 15.687 ±2.192                             |
|        | 3h    | 18.995                       | 20.514            | 17.497            | 19.002 ±1.509                             |
|        | 6h    | 21.840                       | 22.642            | 20.057            | 21.513 ±1.323                             |
|        | 9h    | 24.267                       | 24.931            | 21.793            | 23.664 ±1.654                             |
| [0112] | 12h   | 26.751                       | 27.340            | 23.666            | 25.919 ±1.973                             |
|        | 24h   | 34.333                       | 32.346            | 32.323            | 33.001 ±1.154                             |

[0113] 表10 UA纳米乳单位面积累积透皮量数据(n=3)

|        | 时间    | 单位面积累积透皮量 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ |                   |                   | 平均单位面积累积透皮量 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$<br>( $\bar{x} \pm s$ ) |
|--------|-------|-------------------------------------|-------------------|-------------------|--------------------------------------------------------------|
|        |       | 样品 1<br>(2.0190g)                   | 样品 2<br>(2.0066g) | 样品 3<br>(2.0165g) |                                                              |
| [0114] | 30min | 0.412                               | 1.788             | 0.422             | 0.874 $\pm$ 0.791                                            |
|        | 1h    | 0.879                               | 2.556             | 2.270             | 1.902 $\pm$ 0.897                                            |
|        | 2h    | 2.429                               | 3.149             | 2.786             | 2.788 $\pm$ 0.360                                            |
|        | 3h    | 4.116                               | 3.740             | 3.470             | 3.775 $\pm$ 0.324                                            |
|        | 6h    | 8.376                               | 8.552             | 8.468             | 8.466 $\pm$ 0.088                                            |
|        | 9h    | 11.955                              | 13.066            | 12.720            | 12.580 $\pm$ 0.568                                           |
|        | 12h   | 12.847                              | 17.319            | 13.971            | 14.712 $\pm$ 2.327                                           |
|        | 24h   | 20.807                              | 24.012            | 22.149            | 22.323 $\pm$ 1.609                                           |

[0115] 表11 UA纳米乳凝胶单位面积累积透皮量数据 (n=3)

|        | 时间    | 单位面积累积透皮量 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ |                   |                   | 平均单位面积累积透皮量 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$<br>( $\bar{x} \pm s$ ) |
|--------|-------|-------------------------------------|-------------------|-------------------|--------------------------------------------------------------|
|        |       | 样品 1<br>(2.0040g)                   | 样品 2<br>(2.0102g) | 样品 3<br>(2.0073g) |                                                              |
| [0116] | 30min | 0.450                               | 0.869             | 0.378             | 0.566 $\pm$ 0.265                                            |
|        | 1h    | 0.991                               | 1.305             | 0.965             | 1.087 $\pm$ 0.189                                            |
|        | 2h    | 1.362                               | 1.564             | 1.750             | 1.559 $\pm$ 0.194                                            |
|        | 3h    | 1.799                               | 1.769             | 2.079             | 1.882 $\pm$ 0.171                                            |
|        | 6h    | 2.483                               | 2.143             | 2.415             | 2.347 $\pm$ 0.180                                            |
|        | 9h    | 3.099                               | 2.646             | 3.273             | 3.006 $\pm$ 0.324                                            |
|        | 12h   | 7.379                               | 6.159             | 7.036             | 6.858 $\pm$ 0.629                                            |
|        | 24h   | 15.226                              | 16.918            | 15.646            | 15.930 $\pm$ 0.881                                           |

[0117] 精密称取松萝酸磷脂复合物0.15g加入到10ml纯化水中,用匀浆机将其高速分散后得到含量为5.3817g/mL的水分散液,精密移取2mL加入到各供给池中进行透皮试验。

[0118] 表12松萝酸磷脂复合物单位面积累积透皮量数据 (n=3)

|        | 时间    | 单位面积累积透皮量 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ |               |               | 平均单位面积累积透皮量 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$<br>( $\bar{x} \pm s$ ) |
|--------|-------|-------------------------------------|---------------|---------------|--------------------------------------------------------------|
|        |       | 样品 1<br>(2mL)                       | 样品 2<br>(2mL) | 样品 3<br>(2mL) |                                                              |
| [0119] | 30min | 0.823                               | 0.778         | 1.321         | 0.974 $\pm$ 0.301                                            |
|        | 1h    | 2.765                               | 2.776         | 3.036         | 2.859 $\pm$ 0.153                                            |
|        | 2h    | 3.525                               | 3.643         | 3.930         | 3.699 $\pm$ 0.208                                            |
|        | 3h    | 3.985                               | 4.267         | 4.413         | 4.222 $\pm$ 0.218                                            |
|        | 6h    | 6.092                               | 7.403         | 6.484         | 6.660 $\pm$ 0.673                                            |
|        | 9h    | 15.152                              | 16.870        | 17.523        | 16.515 $\pm$ 1.225                                           |
|        | 12h   | 35.240                              | 35.625        | 37.928        | 36.264 $\pm$ 1.454                                           |
|        | 24h   | 120.990                             | 109.983       | 117.500       | 116.158 $\pm$ 5.625                                          |

[0120] 表13 UA磷脂复合物凝胶单位面积累积透皮量数据 (n=3)

|        | 时间    | 单位面积累积透皮量 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ |                   |                   | 平均单位面积累积透皮量 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$<br>( $\bar{x} \pm s$ ) |
|--------|-------|-------------------------------------|-------------------|-------------------|--------------------------------------------------------------|
|        |       | 样品 1<br>(2.0426g)                   | 样品 2<br>(2.0056g) | 样品 3<br>(2.0045g) |                                                              |
| [0121] | 30min | 2.068                               | 2.628             | 2.130             | 2.275 $\pm$ 0.307                                            |
|        | 1h    | 3.975                               | 3.289             | 3.278             | 3.514 $\pm$ 0.399                                            |
|        | 2h    | 5.128                               | 3.897             | 4.275             | 4.433 $\pm$ 0.631                                            |
|        | 3h    | 6.949                               | 5.221             | 5.667             | 5.946 $\pm$ 0.897                                            |
|        | 6h    | 12.937                              | 12.015            | 12.625            | 12.526 $\pm$ 0.469                                           |
|        | 9h    | 27.965                              | 26.685            | 23.545            | 26.065 $\pm$ 2.274                                           |
|        | 12h   | 47.295                              | 40.037            | 42.857            | 43.396 $\pm$ 3.659                                           |
|        | 24h   | 105.634                             | 106.573           | 107.227           | 106.478 $\pm$ 0.801                                          |

[0122] 采用小鼠皮肤对松萝酸不同脂质载体的制剂进行透皮实验的数据分析;

[0123] 将得到的各个数据进行比较分析,明显看出,松萝酸磷脂复合物及其凝胶制剂的平均单位面积累积透皮量均高于其他几种制剂。中性磷脂作为松萝酸的载体,能够大大地提高药物中松萝酸的含量,同时由于脂类载体的作用,使药物仅作用于病变部位或靶细胞,延长在血液中驻留时间,提高药物的疗效,减少剂量,为松萝酸在肿瘤治疗、克服生物屏障等领域提供了良好的发展前景。

[0124] 2.2采用家兔皮肤对松萝酸不同脂质载体的制剂进行透皮实验,得到的结果如表14-18所示。

[0125] 表14松萝酸凝胶单位面积累积透皮量数据 (n=3)

|        | 时间    | 单位面积累积透皮量 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ |                   |                   | 平均单位面积累积透皮量 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$<br>( $\bar{x} \pm s$ ) |
|--------|-------|-------------------------------------|-------------------|-------------------|--------------------------------------------------------------|
|        |       | 样品 1<br>(2.0034g)                   | 样品 2<br>(2.0018g) | 样品 3<br>(2.0046g) |                                                              |
| [0126] | 30min | 1.238                               | 2.693             | 1.298             | 1.743 $\pm$ 0.823                                            |
|        | 1h    | 11.517                              | 10.978            | 11.454            | 11.316 $\pm$ 0.295                                           |
|        | 2h    | 13.107                              | 12.301            | 12.775            | 12.728 $\pm$ 0.405                                           |
|        | 3h    | 16.360                              | 14.435            | 17.756            | 16.184 $\pm$ 1.668                                           |
|        | 6h    | 18.991                              | 16.218            | 20.604            | 18.604 $\pm$ 2.218                                           |
|        | 9h    | 20.811                              | 18.037            | 22.396            | 20.414 $\pm$ 2.206                                           |
|        | 12h   | 24.381                              | 24.181            | 27.641            | 25.401 $\pm$ 1.942                                           |
|        | 24h   | 30.085                              | 30.138            | 31.805            | 30.676 $\pm$ 0.978                                           |

[0127] 表15松萝酸纳米乳单位面积累积透皮量数据 (n=3)

|        | 时间    | 单位面积累积透皮量 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ |                   |                   | 平均单位面积累积透皮量 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$<br>( $\bar{x} \pm s$ ) |
|--------|-------|-------------------------------------|-------------------|-------------------|--------------------------------------------------------------|
|        |       | 样品 1<br>(2.0034g)                   | 样品 2<br>(2.0018g) | 样品 3<br>(2.0046g) |                                                              |
| [0128] | 30min | 2.838                               | 2.653             | 3.340             | 2.944 $\pm$ 0.356                                            |
|        | 1h    | 4.093                               | 4.144             | 4.249             | 4.162 $\pm$ 0.079                                            |
|        | 2h    | 5.079                               | 5.985             | 6.067             | 5.710 $\pm$ 0.548                                            |
|        | 3h    | 8.822                               | 9.201             | 9.179             | 9.067 $\pm$ 0.213                                            |
|        | 6h    | 13.553                              | 14.421            | 17.196            | 15.057 $\pm$ 1.903                                           |
|        | 9h    | 26.351                              | 20.640            | 21.232            | 22.741 $\pm$ 3.141                                           |
| [0129] | 12h   | 35.769                              | 34.023            | 30.994            | 33.595 $\pm$ 2.416                                           |
|        | 24h   | 68.338                              | 64.233            | 69.792            | 67.454 $\pm$ 2.883                                           |

[0130] 表16松萝酸纳米乳凝胶单位面积累积透皮量数据 (n=3)

| 时间    | 单位面积累积透皮量 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ |                   |                   | 平均单位面积累积透皮量 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$<br>( $\bar{x} \pm s$ ) |
|-------|-------------------------------------|-------------------|-------------------|--------------------------------------------------------------|
|       | 样品 1<br>(2.0034g)                   | 样品 2<br>(2.0018g) | 样品 3<br>(2.0046g) |                                                              |
| 30min | 3.974                               | 4.185             | 5.189             | 4.449 $\pm$ 0.649                                            |
| 1h    | 6.774                               | 6.005             | 7.161             | 6.647 $\pm$ 0.588                                            |
| 2h    | 9.275                               | 8.227             | 9.031             | 8.844 $\pm$ 0.548                                            |
| 3h    | 11.434                              | 9.762             | 10.692            | 10.629 $\pm$ 0.838                                           |
| 6h    | 14.513                              | 12.366            | 14.780            | 13.887 $\pm$ 1.323                                           |
| 9h    | 16.818                              | 14.332            | 16.613            | 15.921 $\pm$ 1.380                                           |
| 12h   | 24.356                              | 18.261            | 22.430            | 21.682 $\pm$ 3.116                                           |
| 24h   | 32.207                              | 28.581            | 31.485            | 30.758 $\pm$ 1.920                                           |

[0132] 精密称取松萝酸磷脂复合物0.15g加入到10ml纯化水中,用匀浆机将其高速分散后得到含量为5.3817g/mL的水分散液,精密移取2mL加入到各供给池中进行透皮试验。

[0133] 表17松萝酸磷脂复合物单位面积累积透皮量数据 (n=3)

| 时间    | 单位面积累积透皮量 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ |                   |                   | 平均单位面积累积透皮量 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$<br>( $\bar{x} \pm s$ ) |
|-------|-------------------------------------|-------------------|-------------------|--------------------------------------------------------------|
|       | 样品 1<br>(2.0034g)                   | 样品 2<br>(2.0018g) | 样品 3<br>(2.0046g) |                                                              |
| 30min | 4.231                               | 2.884             | 2.497             | 3.204 $\pm$ 0.910                                            |
| 1h    | 5.764                               | 4.356             | 4.444             | 4.855 $\pm$ 0.789                                            |
| 2h    | 7.478                               | 6.823             | 6.350             | 6.884 $\pm$ 0.566                                            |
| 3h    | 9.807                               | 8.155             | 10.378            | 9.447 $\pm$ 1.154                                            |
| 6h    | 12.822                              | 10.337            | 13.967            | 12.375 $\pm$ 1.856                                           |
| 9h    | 17.449                              | 13.286            | 18.032            | 16.256 $\pm$ 2.588                                           |
| 12h   | 40.186                              | 38.413            | 48.671            | 42.423 $\pm$ 5.483                                           |
| 24h   | 85.965                              | 88.865            | 87.600            | 87.477 $\pm$ 1.454                                           |

[0135] 表18松萝酸磷脂复合物凝胶单位面积累积透皮量数据 (n=3)

| 时间    | 单位面积累积透皮量 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ |                   |                   | 平均单位面积累积透皮量 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$<br>( $\bar{x} \pm s$ ) |
|-------|-------------------------------------|-------------------|-------------------|--------------------------------------------------------------|
|       | 样品 1<br>(2.0034g)                   | 样品 2<br>(2.0018g) | 样品 3<br>(2.0046g) |                                                              |
| 30min | 4.540                               | 3.283             | 3.950             | 3.924 $\pm$ 0.629                                            |
| 1h    | 11.899                              | 6.506             | 7.494             | 8.633 $\pm$ 2.871                                            |
| 2h    | 15.522                              | 9.684             | 11.555            | 12.254 $\pm$ 2.981                                           |
| 3h    | 19.562                              | 13.176            | 15.616            | 16.118 $\pm$ 3.223                                           |
| 6h    | 23.843                              | 15.678            | 18.550            | 19.357 $\pm$ 4.142                                           |
| 9h    | 29.064                              | 23.424            | 24.751            | 25.746 $\pm$ 2.948                                           |
| 12h   | 32.804                              | 28.556            | 28.730            | 30.030 $\pm$ 2.404                                           |
| 24h   | 44.490                              | 42.108            | 43.806            | 43.468 $\pm$ 1.227                                           |

[0138] 采用家兔皮肤对松萝酸不同脂质载体的制剂进行透皮实验的数据分析

[0139] 将得到的各个数据进行比较分析,得到如下所示的图3。从图中,明显看出,松萝酸磷脂复合物及其凝胶制剂的平均单位累积透皮量均高于其他几种制剂。这个结果与采用鼠皮进行透皮吸收实验的结果一致,进一步证实了磷脂作为松萝酸的载体,具有良好的发展前景。

[0140] 2.3体外透皮吸收方程的拟合

[0141] 将松萝酸凝胶、松萝酸纳米乳、松萝酸纳米乳凝胶、松萝酸磷脂复合物、松萝酸磷脂复合物凝胶在各时间点的单位面积累积渗透量 $Q_n$ 对时间 $t$ 进行方程拟合,以相关系数最 $R^2$ 大者为佳,得到的方程如表19所示:

[0142] 表19体外透皮方程拟合

|        | 样品         | 鼠皮                          | $R^2$   | 兔皮                           | $R^2$   |
|--------|------------|-----------------------------|---------|------------------------------|---------|
| [0143] | UA 凝胶      | $y = 6.8221x^{1/2} + 2.415$ | 0.88128 | $y = 6.0122x^{1/2} + 8.0427$ | 0.90726 |
|        | UA 纳米乳     | $y = 0.93835x + 1.683$      | 0.95712 | $y = 2.7538x + 0.29868$      | 0.99613 |
|        | UA 纳米乳凝胶   | $y = 0.6325x - 0.39174$     | 0.94837 | $y = 1.079x + 6.347$         | 0.96808 |
|        | UA 磷脂复合物   | $y = 4.7683x - 10.854$      | 0.92393 | $y = 3.5685x - 2.7836$       | 0.95218 |
|        | UA 磷脂复合物凝胶 | $y = 4.4444x - 6.3652$      | 0.97256 | $y = 1.5715x + 6.0642$       | 0.94265 |

[0144] 结果表明,松萝酸纳米乳、松萝酸纳米乳凝胶、松萝酸磷脂复合物、松萝酸磷脂复合物凝胶均符合零级动力学方程,相关性良好,在鼠皮中的稳态渗透速率 $J$ 为:0.93835, 0.6325, 4.7683, 4.4444 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ ;在兔皮中的稳态渗透速率 $J$ 为:2.7538, 1.079, 3.5685, 1.5715  $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ 。

[0145] 2.4皮肤滞留量的实验数据

[0146] 表20不同皮肤的平均药物滞留量

|        | 药品         | 鼠皮单位面积皮肤滞<br>药量 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ | 兔皮单位面积皮肤滞<br>药量 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ |
|--------|------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|
| [0147] | UA 凝胶      | $6.342 \pm 1.322$                         | $2.490 \pm 1.990$                         |
|        | UA 纳米乳     | $8.181 \pm 2.580$                         | $4.092 \pm 2.261$                         |
|        | UA 纳米乳凝胶   | $12.984 \pm 9.686$                        | $3.668 \pm 1.973$                         |
|        | UA 磷脂复合物   | $48.648 \pm 5.014$                        | $15.397 \pm 2.123$                        |
| [0148] | UA 磷脂复合物凝胶 | $30.460 \pm 10.823$                       | $5.907 \pm 2.594$                         |

[0149] 结果表明,松萝酸不同脂类载体的制剂在鼠皮中的药物滞留量均大于在兔皮中的药物滞留量,且松萝酸磷脂复合物及其凝胶制剂在两种不同的动物皮肤中,均有较大的皮肤滞留量。

[0150] 实施例3松萝酸各制剂对皮肤愈合的活性考察

[0151] 皮肤损伤模型的建立:SD大鼠70只,体重180~220g,雌雄兼用,大鼠用1%戊巴比妥钠腹腔麻醉(30mg/kg),背部用电动推剪毛,10%硫化钠脱毛后,皮肤经强力碘消毒后,在大鼠背部同一部位用特制打孔器将背部切成直径约1.2cm,面积为1.44 $\text{cm}^2$ 的创面2个,皮肤圆型全层切除,止血,形成机械损伤动物模型,所有大鼠均单笼喂养,充足给水。每组10只动物,20个创伤面。第1组生理盐水空白对照组,创伤面涂100 $\mu\text{L}/\text{d}$ 生理盐水;第2组给药UA对照组(UA溶解,2g/10ml溶于DMSO中),第3-6组作为实验组,均给药实施例1优选方法制备得到UA制剂;第2组为UA磷脂复合物组,创伤面涂UA磷脂复合物的溶解物组(1g/10ml溶于DMSO中)100 $\mu\text{L}/\text{d}$ 。第3组为UA纳米乳组,创伤面涂300 $\mu\text{L}/\text{d}$  UA纳米乳;第4组为UA米乳凝胶

组,创伤面涂300 $\mu$ L/d UA米乳凝胶;第5组为UA纳米乳组,,创伤面涂300 $\mu$ L/d复合物凝胶组;第6组,bFGF(组牛碱性成纤维细胞生长因子外用溶液)对照组,创伤面涂100 $\mu$ L/d bFGF2(120AU)(购自珠海亿胜生物制药有限公司);每天观察术后表皮、肉芽组织生长情况,动态观察创面愈合过程,测量创面面积大小,计算愈合率。

[0152] 愈合率=(1.44-现伤口面积) $\div$ d<sub>0</sub>伤口面积 $\times$ 100%。

[0153] 创面一般观察:实验组各组、UA对照组、bFGF组、对照组之间创面修复情况有明显差别。术后24h,实验组中UA磷脂复合物组和UA复合物凝胶组伤口开始出现少许红晕,表明肉芽组织已在生长,而对照组伤口湿润;伤后3d,UA磷脂复合物组、UA纳米乳凝胶组、UA复合物凝胶组和bFGF组肉芽组织生长明显,局部已长出薄层或点状上皮,创缘皮肤收缩明显;伤后7d,UA磷脂复合物组、UA纳米乳凝胶组、UA复合物凝胶组与bFGF组伤口干燥、无感染,创面已基本为肉芽组织所填充,而对照组伤口湿润,有渗出物,收缩不明显,仅见薄层肉芽,未见明显的新生上皮。伤后12d,实验组中各组与bFGF组创面基本愈合,其中,UA复合物凝胶组效果最为显著;而对照组创面修复欠佳。

[0154] 动态观察创面愈合情况:实验组和bFGF组能明显加速皮肤创伤愈合,结果见表21所示。

[0155] 表21各组大鼠皮肤损伤伤口愈合率( $\bar{x} \pm s$ , n=20)

| [0156] | 组别        | 创面愈合%             |                   |                   |                  |                  |                  |
|--------|-----------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|------------------|------------------|
|        |           | 2d                | 3d                | 5d                | 7d               | 10d              | 12d              |
|        | 生理盐水组     | 13.9 $\pm$ 5.5    | 20.6 $\pm$ 10.8   | 37.8 $\pm$ 9.0    | 52.2 $\pm$ 11.7  | 82.5 $\pm$ 11.6  | 94.9 $\pm$ 4.0   |
|        | UA 对照组    | 31.2 $\pm$ 8.7*   | 34.6 $\pm$ 6.9*   | 43.3 $\pm$ 6.6*   | 64.6 $\pm$ 7.2*  | 72.5 $\pm$ 7.3*  | 96.8 $\pm$ 2.1*  |
|        | UA 磷脂复合物组 | 32.1 $\pm$ 12.6*  | 38.5 $\pm$ 12.0** | 51.1 $\pm$ 11.0   | 77.6 $\pm$ 9.7** | 95.5 $\pm$ 5.2** | 99.1 $\pm$ 0.5** |
| [0157] | UA 纳米乳组   | 30.1 $\pm$ 10.2*  | 35.9 $\pm$ 7.7*   | 43.3 $\pm$ 6.6*   | 65.5 $\pm$ 7.3*  | 73.7 $\pm$ 6.7*  | 97.8 $\pm$ 1.5** |
|        | UA 纳米乳凝胶组 | 32.5 $\pm$ 11.5*  | 41.6 $\pm$ 11.2*  | 48.5 $\pm$ 11.1*  | 72.8 $\pm$ 9.5*  | 86.4 $\pm$ 5.4*  | 98.3 $\pm$ 1.5** |
|        | UA 复合物凝胶组 | 37.2 $\pm$ 10.2** | 45.9 $\pm$ 7.7**  | 56.3 $\pm$ 6.6*   | 81.5 $\pm$ 7.3** | 97.7 $\pm$ 6.7** | 99.4 $\pm$ 0.5** |
|        | bFGF 组    | 22.3 $\pm$ 11.9*  | 31.2 $\pm$ 10.5*  | 51.9 $\pm$ 11.9** | 66.9 $\pm$ 9.8** | 91.4 $\pm$ 5.1*  | 98.4 $\pm$ 1.4** |

[0158] 注:与生理盐水组比较,\*P<0.05,\*\*P<0.01;

[0159] 除UA的DMSO溶剂物和UA纳米乳以外,松萝酸其他几种制剂(UA磷脂复合物、UA纳米乳凝胶、UA复合物凝胶)用于外涂治疗大鼠皮肤机械损伤,获得理想治疗效果,作用与bFGF作用相当。

[0160] 据屈纪富等报道,bFGF能够刺激伤口修复过程的物质是有限的,尽管近来研究报道多种生长因子可促进伤口愈合,其中最重要的是剂量和安全问题。由于多肽生长因子受体具有下调效应,因而使用时必须注意剂量不可过高。而长松萝资源丰富,松萝酸易于提取纯化,松萝酸的制剂因为良好的透皮吸收特性对创面的愈合展现良好的活性,尤其是UA复合凝胶的活性最优,这也与其透皮吸收能力向对应的。因此松萝酸的复合物凝胶可望成为生长因子的替代品,用于创伤愈合。

[0161] 通过透皮实验结果表明,松萝酸磷脂复合物及其凝胶制剂24h后单位面积累积透皮量明显高于其他组别,有利于长时间发挥药效;松萝酸凝胶剂的体外透皮行为更符合



Higuchi方程,而松萝酸纳米乳及其凝胶剂、松萝酸磷脂复合物及其凝胶剂的透皮吸收行为符合零级动力学方程,具有良好的线性关系,能够稳定的释放药物;体外透皮后,单位面积皮肤滞药量的比较结果为:松萝酸磷脂复合物>松萝酸磷脂复合物凝胶>松萝酸纳米乳>松萝酸纳米乳凝胶>松萝酸凝胶。直接将药物添加到凝胶基质中,制备成松萝酸普通凝胶剂外用,在一定程度上可以改善药物的溶解性,但不能很好的控制药物的释放,达到缓释的效果;纳米乳作为新型药物载体较凝胶剂相比,符合零级动力学方程,可以稳定的释放药物,能够增加松萝酸的皮肤滞留量,延长作用时间,但由于其载药量较磷脂复合物相对偏低,导致松萝酸的单位面积累积渗透量相对偏低;松萝酸磷脂复合物含有较高的载药量,能起到药物储库的作用,还能够完整地穿过角质层,有较大的皮肤滞留量从而达到缓释的目的,同时符合零级动力学方程,维持恒定的血药浓度。因此,UA磷脂复合物、UA磷脂复合物凝胶为松萝酸对经皮给药的提供新的较好的剂型选择。

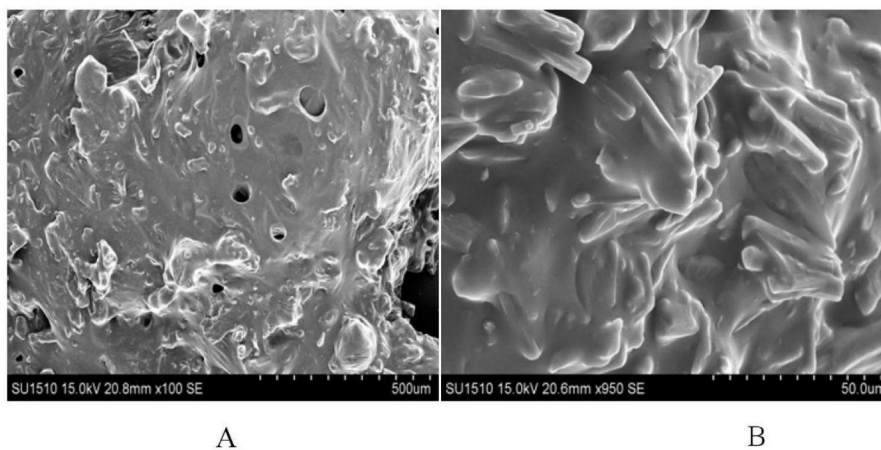


图1

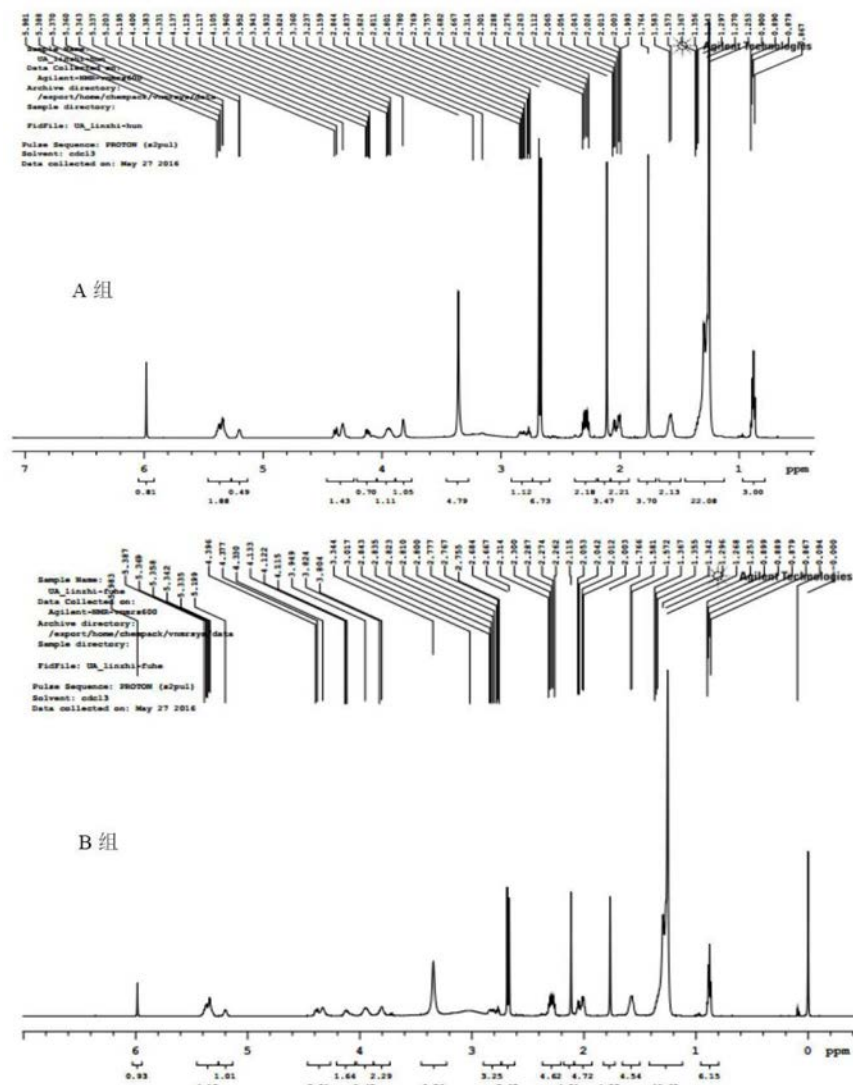


图2

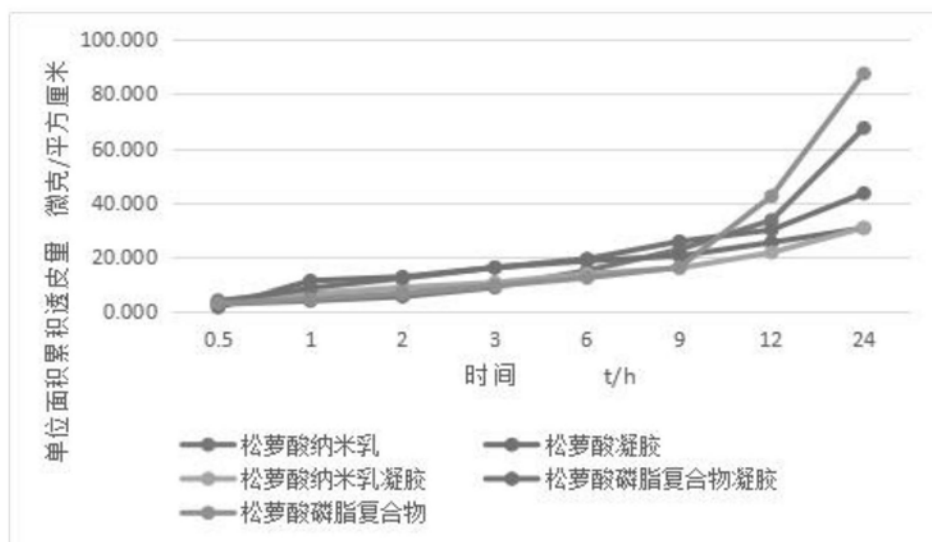


图3