

论 著
(药学研究)不同粒径地塞米松纳米混悬剂的体外透皮行为
比较研究

段 靖,周燕萍,杨 辉,鲁 毅,王亚威,姜 漫,许桂丽

【摘要】 目的 比较不同粒径地塞米松纳米混悬剂(Dex-NS)的体外透皮行为,探讨粒径对 Dex-NS 经皮渗透性和皮肤滞留的影响。**方法** 采用介质研磨法,通过控制不同工艺参数制备 3 种不同粒径的 Dex-NS,扫描电镜观察形态,Franze 扩散池法比较不同粒径 Dex-NS 的体外透皮行为。**结果** 成功制备了 3 种不同粒径的 Dex-NS,分别为 Dex-NS200(199 nm)、Dex-NS500(491 nm)、Dex-NS800(810 nm);扫描电镜(SEM)结果显示 Dex-NS200 存在颗粒状和棒状两种结构,Dex-NS500 呈棒状结构,Dex-NS800 为短棒状结构;体外透皮实验结果显示,不同粒径 Dex-NS 的 24 h 体外经皮累积透过量(Q_t)顺序为:Dex-NS200 ($23.61 \mu\text{g}/\text{cm}^2$)>Dex-NS500 ($17.37 \mu\text{g}/\text{cm}^2$)>Dex-NS800 ($11.64 \mu\text{g}/\text{cm}^2$),皮肤滞留量顺序为:Dex-NS500 ($18.24 \mu\text{g}/\text{cm}^2$)>Dex-NS200 ($14.27 \mu\text{g}/\text{cm}^2$)>Dex-NS800 ($9.46 \mu\text{g}/\text{cm}^2$)。**结论** 粒径对 Dex-NS 的体外透皮行为有显著影响,500 nm 左右的 Dex-NS 的皮肤滞留量相对较高,适宜局部应用。

【关键词】 地塞米松;纳米混悬剂;粒径;体外透皮行为;皮肤滞留

【中图分类号】 R944.1 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1672-271X(2019)03-0273-04

【DOI】 10.3969/j.issn.1672-271X.2019.03.011

Comparative study on *in vitro* transdermal behavior of dexamethasone nanosuspensions with different particle sizesDUAN Jing¹, ZHOU Yan-ping¹, YANG Hui², LU Yi¹, WANG Ya-wei¹, JIANG Man¹, XU Gui-li¹

(Department of Pharmacy, Air Force Hospital of Eastern Theater Command, Nanjing 210002, Jiangsu, China)

【Abstract】 Objective To compare the *in vitro* transdermal behaviors of dexamethasone nanosuspension (Dex-NS) with three particle sizes and explore the influence of particle sizes on skin permeation and retention of Dex-NS. **Methods** Dex-NSs with three different particle sizes were prepared using media milling by adjusting process parameters. Their morphologies were observed by scanning electron microscope (SEM). The *in vitro* transdermal behaviors of Dex-NS with different particle sizes were compared by Franz diffusion cells. **Results** Dex-NSs with three different particle sizes, Dex-NS200 (199 nm), Dex-NS500 (491 nm) and Dex-NS800 (810 nm) were successfully prepared. SEM showed Dex-NS200 existed two structures of granular and rod-shaped. Dex-NS500 was rod-like in shape. And Dex-NS800 had a short rod-like structure. *In vitro* transdermal experiments gave the cumulative amount of drug penetrated (Q_t) of Dex-NSs with three different particle size in an order of Dex-NS200 ($23.61 \mu\text{g}/\text{cm}^2$)>Dex-NS500 ($17.37 \mu\text{g}/\text{cm}^2$)>Dex-NS800 ($11.64 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) and skin retention in an order of Dex-NS500 ($18.24 \mu\text{g}/\text{cm}^2$)>Dex-NS200 ($14.27 \mu\text{g}/\text{cm}^2$)>Dex-NS800 ($9.46 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). **Conclusion** The particle size has significant effect on *in vitro* transdermal behavior of Dex-NSs and Dex-NS with particle size around 500 nm, possessing higher skin deposition and being suitable for topical application.

【Key words】 dexamethasone; nanosuspension; particle size; *in vitro* transdermal behavior; skin retention

0 引 言

作者单位:210002 南京,东部战区空军医院药剂科(段 靖、周燕萍、鲁 毅、王亚威、姜 漫、许桂丽),信息科(杨 辉)
通信作者:许桂丽, E-mail: guili_xu@126.com

地塞米松(dexamethasone, Dex)是临床常用的糖皮质激素,药理作用主要有抗炎、抗过敏、抗

休克及免疫抑制等^[1-3]。Dex 临床主要用于过敏性与自身免疫性炎症性疾病,如结缔组织病、严重的支气管哮喘、皮炎等疾病的治疗^[4-5]。Dex 外用剂型在接触性皮炎、脂溢性皮炎、神经性皮炎和急慢性湿疹等皮肤病中应用广泛^[6]。但 Dex 溶解性差,释放慢,经皮给药生物利用度低,极大地限制了其临床疗效。

为提高 Dex 的经皮渗透性和滞留,作者前期采用介质研磨法构建了 Dex 纳米混悬剂(dexamethasone nanosuspension, Dex-NS),研究结果表明,Dex-NS 能够显著增加 Dex 的经皮累积透过量 and 皮肤滞留量^[7]。另有文献报道,粒径可以影响纳米粒的经皮渗透行为^[8-10]。本研究在前期工作的基础上,通过控制不同的研磨工艺参数制备不同粒径的 Dex-NS,比较不同粒径 Dex-NS 的体外透皮行为,探讨粒径对 Dex-NS 经皮渗透性和皮肤滞留的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SD 雄性大鼠,体重约 180~220 g, SPF 级(购自军事医学科学院实验动物中心),实验动物许可证号为 SCXK-(军)2012-0004。在室温(25±1)℃,相对湿度(50±10)%,自然光照,自由饮食、饮水条件下适宜性饲养 1 周后进行实验。

1.2 主要试剂和仪器 地塞米松原料药(天津天药,生产批号:NDAC170104);Dex 对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100129-201506);十二烷基硫酸钠(SDS)和 D-α-生育酚聚乙二醇琥珀酸酯(TP-GS)由北京凤礼精求医药股份有限公司提供;所用试剂中甲醇为色谱纯,其余为分析纯。安捷伦 1260 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);DF-101D 恒温磁力搅拌器(巩义予华);S-4800 扫描电镜(日本 Hitachi 公司);NanoZS90 粒径分析仪(英国 Malvern 公司);CPA225D 电子分析天平(Sartorius);TP-6 智能透皮实验仪(天津市鑫洲科技有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 Dex-NSs 的制备 参照文献^[7]的方法制备 Dex-NSs。通过控制研磨转速和时间可得到不同粒径的 Dex-NS,800 rpm 研磨 8 h 即得 Dex-NS200,600 rpm 研磨 1 h 即得 Dex-NS500,400 rpm 研磨 1 h,即得 Dex-NS800。

1.3.2 粒径分析 量取“1.3.1”所制 Dex-NSs 适量,蒸馏水稀释,用激光动态纳米粒度仪在 25℃ 条件下测定其粒径及多分散度指数(PDI),平行测定 3 次。

1.3.3 Dex-NSs 形态观察 取 Dex-NSs 适量,蒸馏

水稀释至适宜浓度,滴于锡箔纸上,室温晾干,真空喷金后,于扫描电镜下观察并拍照,操作电压 15 kV。

1.3.4 体外透皮实验方法 采用 Franze 扩散池法比较不同粒径 Dex-NSs 体外透皮行为^[11-12]。扩散池有效扩散面积 1.77 cm²,接收池体积 22.5 mL。SD 大鼠实验前禁食不禁水 12 h,腹腔注射麻醉,麻醉剂为 10% 的水合氯醛(3 mL/kg),腹部脱毛,剪取脱毛区域皮肤,除去皮下组织、血管和脂肪,等渗盐水冲洗。取完整皮肤剪成适宜大小,固定于智能透皮实验仪的扩散池上,角质层面向供给池。20% 乙醇 NaCl 作为接收介质,转速为 400 r/min,控制恒温水浴温度为(32±1)℃。取不同粒径的 Dex-NSs(HPLC 测定含量后用蒸馏水稀释至 1 mg/mL)各 1 mL,加入供给池,间隔 0.5、1、2、4、6、8、10、12、24 h 各取样 1 mL,同时快速加入等体积接收介质,0.45 μm 滤膜过滤,用高效液相色谱仪按以下色谱条件进样分析:Inertsil ODS-3 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);甲醇-水(70:30)为流动相;流速 1.0 mL/min;检测波长 240 nm;进样量为 20 μL^[5]。计算 Dex 在各个时间点单位面积的累积透过量(Q_t),绘制累积渗透曲线,并计算稳态透皮速率常数(J_{ss})^[13]。

完成上述实验后,取下鼠皮,棉签擦拭其表面残余药物,0.9% 生理盐水反复冲洗,滤纸吸干水分,收集有效皮肤,剪碎,加生理盐水适量,高速剪切匀浆后,加甲醇超声提取 30 min,取提取液 1 mL,8000 r/min 离心 10 min,取上清液,HPLC 测定 Dex 浓度^[7],计算大鼠皮肤内 Dex 滞留量。

1.4 统计学分析 采用 SPASS 13.0 进行数据统计分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析,LSD 法进行多组间数据比较,以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Dex-NS 粒径分布 结果显示 Dex-NS200、Dex-NS500 和 Dex-NS800 的平均粒径分别为(199±17) nm、(491±27) nm、(810±24) nm,PDI 分别为 0.107±0.019、0.229±0.012、0.274±0.039,粒径分布见图 1。

2.2 Dex-NSs 形态 SEM 结果见图 2。Dex 原料药呈不规则颗粒状,粒径大小不等;Dex-NS200 存在颗粒状和棒状两种结构,粒径在 100~300 nm 之间,存在少量 500~600 nm 大小的棒状纳米粒;Dex-NS500 呈棒状结构,粒径在 400~800 nm;Dex-NS800 为短棒状结构,粒径在 800~1600 nm。

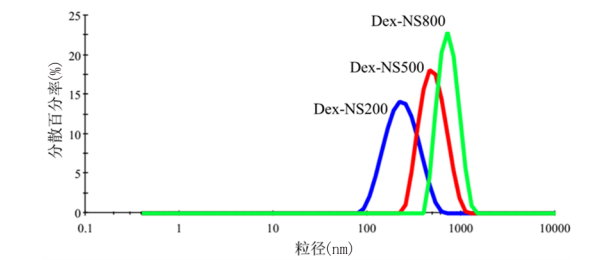
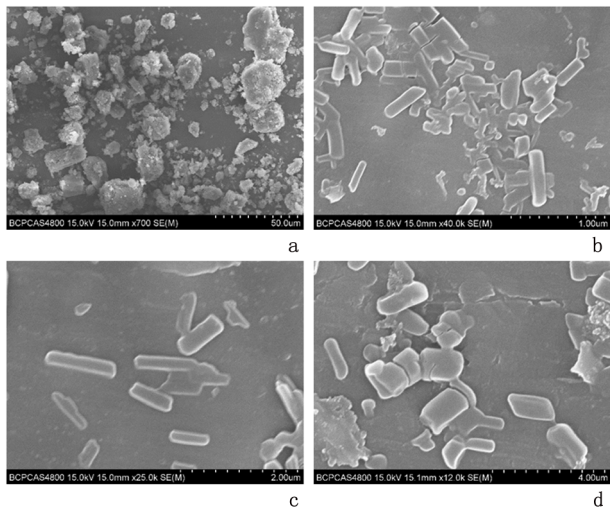


图1 Dex-NSs粒径分布图



a: Dex 原料药; b: Dex-NS200; c: Dex-NS500; d: Dex-NS800

图2 Dex-NSs扫描电镜图

2.3 透皮实验结果 采用前期建立的 HPLC 分析法测定接收介质及皮肤组织样品内的 Dex 含量,方法学考察结果表明,Dex 在 1.008 ~ 20.16 $\mu\text{g/mL}$ 范围内呈良好的线性关系,以浓度($X, \mu\text{g/mL}$)为横坐标,色谱峰面积(Y)为纵坐标,得到的线性方程为: $Y=41.291X+0.7148, R^2=1$;仪器的精密度、样品稳定性良好,RSD 均小于 2.0%,且空白无干扰;方法回收率为 99.18% ~ 104.37%,RSD 为 1.85%。不同粒径 Dex-NS 单位面积体外累积渗透量结果见表 1。绘制不同粒径 Dex-NSs 体外透皮累积渗透曲线,结果见图 3。以扩散平衡后的累积透过量 Q_t 为纵坐标,渗透时间 t 为横坐标,进行线性回归,即得不同粒径的 Dex-NSs 体外透皮动力学方程:

Dex-NS200: $Q_t=1.08t-2.37, R^2=0.9985$
Dex-NS500: $Q_t=0.79t-1.39, R^2=0.9971$
Dex-NS800: $Q_t=0.56t-1.42, R^2=0.9868$
方程斜率即为不同粒径 Dex-NSs 的稳态渗透速率常数 J_{ss} ,见表 2。可以看出,不同粒径的制剂 24 h 体外累积透过量 Q_t 的顺序为: Dex-NS200>Dex-

NS500>Dex-NS800 ($P<0.05$),皮肤滞留量顺序为: Dex-NS500>Dex-NS200>Dex-NS800 ($P<0.05$),结果表明,粒径对 Dex-NSs 的体外透皮行为有显著影响。

表 1 不同粒径的 Dex-NS 单位面积体外累积透过量 ($\bar{x}\pm s, \mu\text{g/cm}^2, n=3$)

时间(h)	Qt		
	Dex-NS200	Dex-NS500	Dex-NS800
0.5	0	0	0
1	0	0	0
2	0.56±0.32	0.33±0.15	0.12±0.07
4	2.26±0.38	1.81±0.41	0.45±0.26
6	3.83±0.67	3.11±0.54	1.82±0.34
8	6.09±1.02	4.71±0.81	2.68±0.53
10	8.34±1.33	6.48±0.99	4.73±0.57
12	11.08±1.94	8.65±0.91	5.86±0.87
24	23.61±1.73	17.37±1.38	11.64±1.69

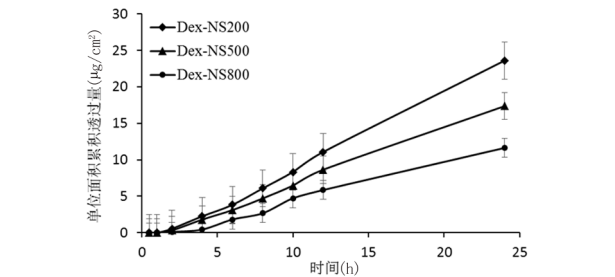


图3 Dex-NSs体外透皮累积渗透曲线($n=3$)

表 2 Dex-NSs 体外透皮渗透参数 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

制剂	Qt	J_{ss}	皮肤滞留量
	($\mu\text{g/cm}^2$)	[$\mu\text{g}/(\text{cm}^2\cdot\text{h})$]	($\mu\text{g/cm}^2$)
Dex-NS200	23.61±2.23	1.08	14.27±1.79
Dex-NS500	17.37±1.38*	0.79	18.24±1.63*
Dex-NS800	11.64±1.69**	0.56	9.46±0.62**

与 Dex-NS200 比较, * $P<0.05$; 与 Dex-NS500 比较, # $P<0.05$

3 讨 论

介质研磨法是一种较为常用的 NS 制备方法,具有工艺简单,易于产业化等优点;研磨转速和研磨时间是影响 NS 粒径的重要因素^[14]。课题组前期研究表明,研磨转速和研磨时间能够显著影响 Dex-NSs 的粒径,本研究通过控制不同的研磨转速和研磨时间成功制备了 3 种不同粒径的 Dex-NSs。SEM 显示 3 种粒径 Dex-NSs 存在形态差异,说明研磨工艺

的不同,不仅能够影响 NS 的粒径,还可影响 NS 的形态^[10]。

体外透皮实验结果显示,不同粒径的 Dex-NSs 24 h 体外累积透过量 Q_t 的顺序为:Dex-NS200>Dex-NS500>Dex-NS800($P<0.05$),这是因为 NS 是通减小粒径,改善药物溶出,进而促进皮肤渗透;NS 的粒径越小,溶出速率越快,溶出度越高,累积透过量越高^[10,13,15-16]。与累积透过量不同,不同粒径的 Dex-NSs 皮肤滞留量顺序为:Dex-NS500>Dex-NS200>Dex-NS800($P<0.05$),这是由于 NS 不仅能改善药物溶出,促进皮肤渗透,NS 中纳米粒还可以进入皮肤毛囊等附属器形成药物储库,不断释放药物进而增加药物的局部生物利用度^[17-18];小粒径的 NS 释放快,滞留少,大粒径的 NS 无法有效进入毛囊。

然而,NS 稳定性差,储存和运输过程易聚集沉降^[19];且 NS 作为液体制剂,储存、运输和使用均不方便,局部应用时药物易流失,无法很好的发挥制剂优势。纳米混悬凝胶剂结合了纳米混悬剂和凝胶剂的双重优势,不仅能够提高 NS 的稳定性,还具有生物相容性好、易黏附、无刺激性等优点,是一种优良的局部应用制剂^[20]。因此,可考虑将 Dex-NS 进一步制成凝胶剂,用于局部给药。

[参考文献]

- [1] 付运禄. PLGA-地塞米松纳米载药系统的制备及性能研究[D]. 西安:西北大学,2013.
- [2] 郭红霞,徐尔山,陈真堂. 小剂量地塞米松治疗小儿秋季腹泻呕吐疗效观察[J]. 东南国防医药,2012,14(2):162-163.
- [3] 张严高,余磊,王建莉,等. 地塞米松预处理减轻异丙肾上腺素所致心肌损伤及 TNF- α 的表达[J]. 东南国防医药,2015,17(5):467-470.
- [4] 唐秀凤,高莹莹,李晓曦,等. 淫羊藿苷和齐墩果酸协同地塞米松对糖皮质激素敏感型/抵抗型细胞内信号通路蛋白的影响[J]. 医学研究生学报,2018,31(9):910-915.
- [5] 陆韦,刘清亮,冉丰丰,等. 动态研究地塞米松对哮喘小鼠肺 IL-25mRNA 和 IL-25 表达的影响[J]. 医学研究生学报,2013,26(10):1032-1036.
- [6] 梅芬,曾维东,万涛,等. 醋酸地塞米松微乳的制备及对皮肤渗透性的影响[J]. 药学学报,2016,51(6):979-984.
- [7] 周燕萍,段靖,皇飞,等. 地塞米松纳米混悬剂的制备及其体外经皮渗透性考察[J]. 解放军药科学学报,2018,34(3):225-229.
- [8] Ghosh I, Michniak-Kohn B. Influence of critical parameters of nanosuspension formulation on the permeability of a poorly soluble drug through the skin-a case study [J]. *AAPS Pharm Sci Tech*,2013,14(3):1108-1117.
- [9] Lai F, Schlich M, Pireddu R, *et al.* Production of nanosuspensions as a tool to improve drug bioavailability: focus on topical delivery[J]. *Curr Pharm Des*,2015,21(42):6089-6103.
- [10] Liu X, Shen B, Shen C, *et al.* Nanoparticle-loaded gels for topical delivery of nitrofurazone: Effect of particle size on skin permeation and retention [J]. *J Drug Deliv Sci Technol*,2018,45:367-372.
- [11] Shen CY, Li RS, Shen BD, *et al.* Influence of drug physicochemical characteristics on in vitro transdermal absorption of hydrophobic drug nanosuspensions[J]. *Drug Dev Ind Pharm*,2015,41(12):1997-2005.
- [12] Wang WP, Hul J, Sui H, *et al.* Glabridin nanosuspension for enhanced skin penetration: formulation optimization, in vitro and in vivo evaluation[J]. *Pharmazie*,2016,71(5):252-257.
- [13] 郑娟,沈成英,庞建云,等. 丹参酮 II_A 纳米结构脂质载体的处方优化及其体外透皮研究[J]. 中国中药杂志,2016,41(17):3232-3238.
- [14] Malamataris M, Taylor KMG, Malamataris S, *et al.* Pharmaceutical nanocrystals: production by wet milling and applications [J]. *Drug Discov Today*,2018,23(3):534-547.
- [15] Bi C, Miao XQ, Chow SF, *et al.* Particle size effect of curcumin nanosuspensions on cytotoxicity, cellular internalization, in vivo pharmacokinetics and biodistribution [J]. *Nanomedicine*,2017,13(3):943-953.
- [16] Sinico C, Pireddu R, Pini E, *et al.* Enhancing Topical Delivery of Resveratrol through a Nanosizing Approach [J]. *Planta Med*,2017,83(5):476-481.
- [17] Vidlářová L, Romero GB, Hanuš J, *et al.* Nanocrystals for dermal penetration enhancement-Effect of concentration and underlying mechanisms using curcumin as model [J]. *Eur J Pharm Biopharm*,2016,104:216-225.
- [18] Corrias F, Schlich M, Sinico C, *et al.* Nile red nanosuspensions as investigative model to study the follicular targeting of drug nanocrystals[J]. *Int J Pharm*,2017,524(1-2):1-8.
- [19] Wang Y, Zheng Y, Zhang L, *et al.* Stability of nanosuspensions in drug delivery[J]. *J Control Release*,2013,172(3):1126-1141.
- [20] Shen C, Shen B, Liu X, *et al.* Nanosuspensions based gel as delivery system of nitrofurazone for enhanced dermal bioavailability [J]. *J Drug Deliv Sci Technol*,2018,43:1-11.

(收稿日期:2018-11-29; 修回日期:2019-03-04)

(责任编辑:叶华珍; 英文编辑:朱一超)