

加或新色谱峰,结果表明峰面积降低和检测不到的色谱峰可能转化为增加或新的特征色谱峰。

3 讨论

3.1 检测方法的选择:人参皂苷 HPLC 检测方法多数为测定人参属或相关产品中某单一或几种皂苷的量^[8~10]。在本实验中均不能对总皂苷酶法修饰产物进行合理检测。考虑到要将多个组分有效分开,合理检测分析其成分变化情况。反复试验后,确定了本实验中的色谱分析洗脱梯度条件。

3.2 总皂苷修饰用酶制剂的筛选:在适宜条件下不同酶制剂对人参总皂苷进行修饰后, TG-M7 与 TG-M0 的图谱和相关数据比较分析显示,复酶制剂 A 的修饰效果明显,与 TLC 定性分析结果基本相符。根据生物酶催化反应特点,一方面不同酶制剂存在不同的特异性和专一性,结果表现出单一酶制剂对人参茎叶总皂苷修饰作用不明显;另一方面,不同酶制剂之间也存在相互协同作用,可能是复酶制剂 A 对人参茎叶总皂苷修饰效果明显的原因,具体酶类及协同作用机制与修饰顺序有待进一步阐明。

References:

- [1] Dou D Q, Ling J, Chen Y J. Advances and prospects of the study on chemical constituents and pharmacological activities of *Panax ginseng* [J]. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 1999, 16(2): 151-156.
- [2] Dou D Q, Wen Y, Pei Y P, et al. A new minor saponins from leaves of *Panax ginseng* [J]. *Planta Med*, 1996, 62: 179-181.
- [3] Kim D S, Cheng Y J, Zedk U. Dammarane saponins from *Panax ginseng* [J]. *Phytochemistry*, 1995, 40(5): 1493-1497.
- [4] Shibata S. Chemistry and cancer preventing activities of ginseng saponins and some related triterpenoid compounds [J]. *J Korean Med Sci*, 2001 16(Suppl): S28-37.
- [5] Tawab M A, Bahr U, Karas M, et al. Degradation of ginsenosides in humans after oral administration [J]. *Drug Metabol Dispos*, 2003, 31: 1065-1071.
- [6] Dong S H, Chen B, Ma Z Z, et al. Studies on *in vivo* metabolism of ginseng saponins [J]. *Ginseng Res* (人参研究), 2003, 15(1): 2-6.
- [7] Ji H Y, Lee H W, Kim H H, et al. Liquid chromatography-mass spectrometric analysis of compound K, a ginseng saponins metabolite [J]. *Anal Lett*, 2004, 37(7): 1307-1318.
- [8] Lau A J, Seo B H, Woo S O, et al. High-performance liquid chromatographic method with quantitative comparisons of whole chromatograms of raw and steamed *Panax notoginseng* [J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1057: 141-149.
- [9] Li L, Zhang J L, Sheng Y X, et al. Liquid chromatographic methods for determination of four active saponins from *Panax notoginseng* in rat urine solid-phase extraction [J]. *J Chromatogr B*, 2004, 808: 177-183.
- [10] Fuzzati N. Analysis methods of ginsenosides [J]. *J Chromatogr B*, 2004, 812: 119-133.

均匀设计法筛选盐酸川芎嗪促透剂组方的最佳配比

张瑞涛¹, 王 晖^{2*}, 陈 丽³

(1. 南方医科大学药学院, 广东 广州 510515; 2. 广东药学院中药学院, 广东 广州 510006;

3. 南方医科大学实验动物中心, 广东 广州 510515)

摘要:目的 筛选 3 种促透剂组方对盐酸川芎嗪的透皮吸收的理论最佳促透配比。方法 用两室扩散池体外透皮实验装置,以盐酸川芎嗪为对象,采用均匀设计处理考察加入不同剂量配比的冰片、薄荷醇、氮酮后,盐酸川芎嗪在 BALB/c 裸小鼠皮肤上的渗透系数,并对组方中各促透剂所占比例进行筛选。结果 促透剂组方中冰片、薄荷醇、氮酮的最佳配比是 1.5% : 1.5% : 1.5% (15 mg/mL : 15 mg/mL : 15 mg/mL),实际渗透系数为 69.575 $\mu\text{g}/(\text{h} \cdot \text{cm}^2)$,理论最佳渗透系数为 69.749 $\mu\text{g}/(\text{h} \cdot \text{cm}^2)$ 。结论 均匀设计法筛选促透剂组方的理论最佳促透配比对于盐酸川芎嗪的透皮吸收研究是可行的。

关键词:盐酸川芎嗪; 经皮吸收; 冰片; 薄荷醇; 氮酮; 均匀设计

中图分类号: R286.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)01-0050-03

Uniform design method for optimizing proportion of transdermal penetration enhancers of ligustrazine hydrochloride

ZHANG Rui-tao¹, WANG Hui², CHEN Li³

(1. School of Pharmacy, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 2. School of Chinese Materia Medica, Guangdong Pharmaceutical College, Guangzhou 510006, China; 3. Center of Experimental Animals, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract: Objective To optimize the proportion of three transdermal penetration enhancers on

收稿日期: 2006-04-04

基金项目: 广东省卫生厅资助课题(2000490); 广东省自然科学基金重点项目(06105114)

作者简介: 张瑞涛(1981-), 男, 在读博士, 研究方向为病毒免疫学与抗病毒药物。

*通讯作者 王 晖 Tel: (020) 39152175 E-mail: gdwanghui@tom.com

transdermal absorption of ligustrazine hydrochloride. **Methods** Permeation tests *in vitro* through BALB/c nude mouse skin in two compartment diffusion cells were performed to study the effect of synthetic borneol, menthol, and Azone on transdermal absorption of ligustrazine hydrochloride by changing their concentrations, and uniform design method was used to determine the penetration coefficient of ligustrazine hydrochloride and optimize the proportion of three transdermal penetration enhancers. **Results** The optimal proportion and contents of synthetic borneol, menthol, and Azone were 1.5% : 1.5% : 1.5% (15 mg/mL : 15 mg/mL : 15 mg/mL), the real penetration coefficient of ligustrazine hydrochloride was 69.575 $\mu\text{g}/(\text{h} \cdot \text{cm}^2)$, while the theoretical penetration coefficient was 69.749 $\mu\text{g}/(\text{h} \cdot \text{cm}^2)$. **Conclusion** Uniform design method is an effective way to optimize the proportion of three transdermal penetration enhancers on transdermal absorption of ligustrazine hydrochloride.

Key words: ligustrazine hydrochloride; transdermal absorption; synthetic borneol; menthol; Azone; uniform design

透皮给药系统具有避免肝脏首过效应及肠胃灭活,维持恒定的血药浓度或药理效应,降低药物不良反应,患者可以自主用药等特点,但由于皮肤对外来物质的屏障作用,大多数药物经皮渗透速率都很难满足治疗的需要,在促进药物透皮吸收方面,最常用的药剂学方法就是使用各种各样的透皮吸收促进剂,如冰片、薄荷醇、氮酮等^[1]。由于各种促透剂的促透性质不同,联合应用有可能使促透剂的应用范围扩大,促透效果增强^[2]。本研究采用均匀设计与药动学结合的方法,以渗透系数作为观察指标,考察 3 种常用促透剂组方的最佳促透配比,为在皮肤药物制剂中合理应用促透剂提供理论依据。

1 材料与仪器

BALB/c 裸小鼠,6 周龄,12 只,雌雄各半,由广东医学院实验动物中心提供,合格证号:2004A030。盐酸川芎嗪(广东利民制药厂,质量分数 99.2%),冰片(广州化工厂),氮酮(中原化工厂),薄荷醇(广州化工厂提供)。

ZD-85 型气浴恒温振荡器(深圳国华仪器厂),752 型紫外可见分光光度计(上海分析仪器厂)。

2 方法与结果

2.1 剂量的设计和选择:采用均匀设计的方法^[3],按 $U_7(7^4)$ 安排试验,冰片、薄荷醇、氮酮各取 7 个剂量,分别为 0、0.5、1、1.5、2、2.5、3 mg/mL。剂量和配伍见表 1。共设 8 个试验组,盐酸川芎嗪为对照组,其余 7 组为加入不同剂量促透剂的盐酸川芎嗪组(按表 1 进行配比)。

2.2 川芎嗪的 UV 法测定

2.2.1 标准曲线的制定:精密称取盐酸川芎嗪 10 mg,置 100 mL 量瓶中,用生理盐水稀释至刻度,摇匀,即得 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 盐酸川芎嗪贮备液。精密量取贮备液适量,用生理盐水稀释成 50.00、25.00、

表 1 均匀设计法的剂量和配比

Table 1 Dose and proportion in uniform design method

试验号	冰片/(mg · mL ⁻¹)	薄荷醇/(mg · mL ⁻¹)	氮酮/(mg · mL ⁻¹)
1	1	2	3
2	2.5	0.5	2.5
3	0	3	2
4	1.5	1.5	1.5
5	3	0	1
6	0.5	2.5	0.5
7	2	1	0

12.50、6.25、3.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 盐酸川芎嗪溶液。在 272.4 nm 波长处测定吸光度。以质量浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,得回归方程 $Y=0.0421X-0.0011$, $r=0.9982$ 。

2.2.2 精密度试验:精密量取盐酸川芎嗪贮备液适量,用生理盐水稀释成 3.12、12.50、50.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的盐酸川芎嗪溶液,进样测定。1 d 内测定的 5 次结果,计算日内精密度。5 d 内测定 5 次,计算日间精密度。结果日内 RSD 分别为 2.43%、1.41%和 1.98%,日间 RSD 分别为 4.52%、2.44%和 3.31%。

2.2.3 回收率试验:精密量取盐酸川芎嗪不同量,用生理盐水稀释成 3.12、12.50、50.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 盐酸川芎嗪溶液,进样测定吸光度。标准曲线计算质量浓度,以测得量与加入量的比值计算回收率。结果盐酸川芎嗪不同水平的回收率分别为 (101.72 ± 1.14)%、(99.92 ± 2.18)%、(100.21 ± 1.18)%。

2.3 离体鼠皮的制备:脱颈处死裸小鼠,剥取背部皮肤,剪除损伤的皮肤,小心去掉皮下脂肪,用生理盐水反复冲洗,直至洗液澄清为止,置 -4℃ 保存备用。

2.4 透皮试验:常温下解冻皮肤,在本室已建立的双室透皮扩散装置上进行体外透皮吸收试验^[4]。实验温度为 32℃,振速为 120 r/min,扩散面积为 0.502 cm²,0.1 mg/mL 盐酸川芎嗪 0.1 mL 作为释

放液,生理盐水 5 mL 为接收液,在 2、4、8、12、24 h 分别取样 4 mL,同时补加等量的生理盐水,测定吸光度,并代入回归方程,计算质量浓度。上述皮肤连续透皮 24 h 后,去除释放液,生理盐水反复冲洗,用滤纸吸干水分,按前法进行透皮试验,取样仍在 24 h 内。将每次测定的质量浓度代入公式,计算单位面

积的累计透过量(Q)。以 Q 对时间 t 进行线性回归,所得方程的斜率即为渗透系数。结果见表 2。

$$Q=(C_n\times 5+\sum_{i=1}^{n-1}C_i\times 4)/A$$

其中 C_n 为第 n 个取样点的药物浓度,C_i 为第 i 个取样点的药物浓度,A 为扩散面积。

表 2 促透剂对比对盐酸川芎嗪累积透过量的影响($\bar{x}\pm s,n=5$)

Table 2 Effect of various proportions of transdermal penetration enhancers on accumulating permentation amount of ligustrazine hydrochloridein ($\bar{x}\pm s,n=5$)

试验号	不同时间的盐酸川芎嗪的累积透过量/ μg					渗透系数/ ($\mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$)
	2 h	4 h	8 h	12 h	24 h	
1	59.93± 5.17	78.84± 4.66	103.82± 8.93	116.26±13.16	131.94±18.13	67.089
2	53.67±11.37	75.20±11.95	106.40±13.87	124.37±13.91	144.19±17.41	63.940
3	53.76± 9.17	74.71± 8.62	101.95±11.08	116.09±14.13	130.90±17.64	60.044
4	60.18± 3.84	81.00± 4.53	109.37± 9.02	123.36±11.78	141.11±15.99	69.575
5	53.39± 1.83	74.49± 3.76	105.27± 3.81	120.69± 7.70	136.24±13.34	60.478
6	44.28± 6.63	67.47± 6.50	96.04± 9.00	114.65±10.68	129.96±13.66	57.825
7	35.24± 6.34	59.38± 6.65	83.18± 8.00	107.19± 6.63	126.20± 4.71	56.300
对照组	27.93± 6.18	41.65± 9.98	64.68±12.89	81.64±17.02	101.59±19.29	41.425*

与试验组比较: * $P<0.01$

* $P<0.01$ vs test group

将表 2 的实验结果输入计算机,按文献方法^[3],用 SAS8.0 软件处理实验结果,进行带平方项的逐步回归,Slstay=0.05,得出回归方程,并进行检验: $R=0.998\ 3,Y=61.474+6.527\ X_1-2.164\ X_1^2-0.857\ X_1X_3,R=0.998\ 3$ 。从结果中得知,当 $X_1=1.741,X_3=1.588$ 时,渗透系数 Y 有最大值 $Y=69.749$,接近于第 4 号试验点的 $X_1=1.5,X_3=1.5$ 。从回归方程的显著性检验结果得知: $P<0.05$,回归方程式有显著意义。从回归方程可看出实验结果与冰片、氮酮的剂量有相当的关系,与薄荷醇基本无关。从表 2 可见,第 4 号试验点促透作用最显著,与对照组相比有显著意义($P<0.01$)。

3 讨论

透皮吸收促进剂单独使用有时效果不佳,所以常常由两种或多种促透剂构成二组分、三组分等,使它们对药物的渗透产生协同作用,通过改善极性或非极性通道或两者都有改善来增加药物的透过量,从而达到药物透皮吸收的目的,既可以减少促透剂的用量,降低毒性反应,又可以使主药发挥最佳效能,其中一般至少包括一种亲水性分子和一种亲油性分子。

本实验研究表明,实验结果与冰片、氮酮的剂量有相当的关系,与薄荷醇基本无关。经均匀设计所得优化组方冰片、薄荷醇、氮酮的最佳配比是 1.5% : 1.5% : 1.5%(15 mg/mL : 15 mg/mL :

15 mg/mL),实际渗透系数为 69.575 $\mu\text{g}/(\text{h}\cdot\text{cm}^2)$,非常接近于理论最佳渗透系数为 69.749 $\mu\text{g}/(\text{h}\cdot\text{cm}^2)$,证明均匀设计可作为有效筛选组方最佳配比的方法。同时表明 3 种透皮吸收促进剂合用时,对盐酸川芎嗪的渗透产生协同作用,通过改善极性或非极性通道或两者都有改善来增加盐酸川芎嗪的透过量,从而达到增加盐酸川芎嗪透皮吸收的目的,可能由于冰片的促进作用主要在角质层,改变脂质分子的排列和增加其流动性;氮酮则通过增加角质层类脂流动性和溶解皮肤的类脂来增加药物的透皮吸收;薄荷醇的促透作用机制主要与其作用于皮肤表皮和引起超微结构的改变密切相关^[5]。

References:

[1] Yang X C, Zhang Q, Wu L. The current situation in TDS research in China [J]. *Chin J New Drug* (中国新药杂志), 2001,10(5):321-324.
[2] Hu J H, Chen L, Zhu Y. Transdermal penetration enhancers and unite application [J]. *Foreign Med: Sci Sect Pharm* (国外医学:药学分册),1996,23(2):105-108.
[3] Sun S G. *Multivarial Statistics and Statistics Softwire of Medicine* (医学多变量统计和统计软件) [M]. BeiJing: Beijing Medical University Publishing House,2000.
[4] Xu W M, Wang Z R, Liu G, et al. The amelioration in a high efficiency experiment equiption of drug transdermal absorption [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报),1997,13(2): 185-186.
[5] Wang H, Xu W M, Wang Z R. Effect of L-menthol and synthetic borneol on enhance percutaneous penetration [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1997, 28(2): 93-95.