

• 制剂与质量 •

穴贴定喘膏体外透皮试验用皮肤的比较研究

祖 强, 狄留庆*, 赵晓莉, 黄耀洲, 于燕燕, 毕肖林

(南京中医药大学, 江苏 南京 210029)

摘 要:目的 对穴贴定喘膏体外透皮试验用皮肤做比较研究, 选择适宜亲脂性成分的实验皮肤。方法 应用 TP-5 型智能透皮扩散仪, 以穴贴定喘膏中木兰脂素为考察指标, 采用 HPLC 法测定, 比较了不同种皮肤对穴贴定喘膏经皮渗透参数的影响。结果 累积渗透量: 硝酸纤维素 > 裸鼠 > 小鼠 > 壳聚糖 > 大鼠 > 兔 > 乳猪 > 蛇蜕; 时滞: 蛇蜕 > 壳聚糖 > 硝酸纤维素 > 乳猪 > 兔 > 大鼠 > 小鼠 > 裸鼠。结论 硝酸纤维素膜可作为适宜亲脂性成分木兰脂素体外经皮渗透实验的理想皮肤模型。

关键词:穴贴定喘膏; 木兰脂素; 皮肤; 经皮渗透

中图分类号:R286.02

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)04-0519-03

Comparison of skin for percutaneous permeability of Xuetic Dingchuan Plaster *in vitro*

ZU Qiang, DI Liu-qing, ZHAO Xiao-li, HUANG Yao-zhou, YU Yan-yan, BI Xiao-lin

(Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

Abstract: **Objective** To study the comparison of the skins for percutaneous permeability of Xuetic Dingchuan Plaster *in vitro* and make a regulation of pre-disposal method which evaluates percutaneous permeability preliminarily for the excised skin *in vitro*. **Methods** Applying TP-5 automatic diffusion apparatus to determine magnolin in Xuetic Dingchuan Plaster by HPLC, comparison of the parameters of percutaneous permeability in different skins, lag time and amount of Xuetic Dingchuan Plaster permeability. **Results** Cumulative permeation amount: pyroxylin > hairless mouse > mouse > chitosan > rat > rabbit > porket > snake slough; Lag time: snake slough > chitosan > pyroxylin > porket > rabbit > rat > mouse > hairless mouse. **Conclusion** The cellulose nitrate filter can be regarded as a good model for the study of percutaneous permeability of lipophilic magnolin.

Key words: Xuetic Dingchuan Plaster; magnolin; skin; percutaneous permeability

穴贴定喘膏是江苏省名老中医许济群教授在清代张璐“白芥子涂法”基础上研制而成, 主要组成为辛夷、细辛、白芥子等, 每贴含膏体 0.48 g, 具有透达经络, 逐饮豁痰, 利气平喘的功效, 对哮喘实证有一定作用。在药物体外经皮渗透研究中, 不同皮肤的性质、状态差异对药物透皮扩散影响很大, 体外实验选择皮肤模型时, 应尽量选择实验重现性好, 个体差异小, 对亲水性和亲脂性药物均适用的一类皮肤模型。本实验选用穴贴定喘膏, 应用 TP-5 型智能透皮扩散仪, 以木兰脂素为考察指标, 比较了不同种皮肤对穴贴定喘膏经皮渗透参数的影响, 以选择适宜亲脂性成分的实验皮肤, 为中药经皮给药制剂经皮扩散试验评价体系的建立奠定基础。

1 实验材料

Agilent 1100 高效液相色谱仪(惠普公司); YXJ-2 台式高速离心机(金坛市金城国胜仪器厂); FA1104 电子分析天平(上海精密科学仪器有限公司); TP-5 型智能透皮扩散仪(中国药科大学研制)。

20~25 g 的小鼠, 180~220 g 的大鼠, 2~2.15 kg 的大白兔, 雌雄不拘, 南京中医药大学动物房提供; 8~10 周龄的裸鼠, 购自中国药品生物制品检定所实验动物中心; 新鲜蛇蜕购自安徽亳州药材市场; 乳猪购自南京郊区农户。

木兰脂素对照品购自中国药品生物制品检定所, 批号 882-200001; 医药壳聚糖购自青岛海普生物技术有限公司, 相对分子质量 $3.5 \times 10^5 \sim 4.0 \times 10^5$; 硝酸纤维素膜(0.22 μm)购自上海大沪科学仪器有限公司; 穴贴定喘膏(自制, 每贴含膏体 0.48

收稿日期: 2006-06-29

基金项目: 江苏省教育厅高新技术产业化项目(JH02-103); 南京中医药大学青年基金课题(05XZR09)

作者简介: 祖强(1975-), 男, 江苏南京人, 助理工程师, 药剂学专业 2004 级在读硕士, 主要从事中药经皮给药系统合理性评价研究。

* 通讯作者 狄留庆 Tel: (025)86798226 E-mail: diliuqing928@163.com

g)。乙腈(色谱纯,美国 Tedia 公司);重蒸水(自制);其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 动物皮肤的预处理^[1]:取蛇蜕,剪成 3.5 cm×3.5 cm。其余实验动物脱颈椎处死,剪去背部的毛(裸鼠除外),剥取 3.5 cm×3.5 cm 的皮。除净皮下脂肪组织和结缔组织。将上述皮肤于 0.9%生理盐水反复洗净,10%甘油浸润后,置塑封袋中-20℃冷冻保存,实验前自然解冻并在生理盐水中浸泡 30 min,保存时间不超过 1 周。

2.2 壳聚糖膜的制备:称取壳聚糖 2 g,置 100 mL 量瓶中,用 0.1 mol/L 醋酸溶液定容至 100 mL。转移至烧杯中置 100℃水浴上加热搅拌使之全溶。抽滤,超声脱气 30 min。将脱气后的滤液等分体积置于直径 5.8 cm 的玻璃培养皿内,置 50℃恒温烘箱中 6 h,使之烘干,然后置于 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液中浸泡 24 h,成膜(膜厚约 45~50 μm)脱落后,用重蒸水反复洗涤,置塑封袋中-20℃冷冻保存,实验前自然解冻并在生理盐水中浸泡 30 min,于 1 周内进行实验。

2.3 硝酸纤维素膜的制备^[2]:将直径 47 mm 硝酸纤维素膜浸渍在肉豆蔻酸异丙酯中 20 min(膜重增加到 150%~160%),取出,允许大的液体滴掉,再把膜夹到两张吸墨水纸中轻轻挤压,去除表面多余的液体,备用。

2.4 木兰脂素的 HPLC 法测定^[3]

2.4.1 色谱条件: Lichrospher C₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-四氢呋喃-水(35:1:64);体积流量:1.0 mL/min;柱温:30℃;检测波长:278 nm。

2.4.2 对照品溶液的制备:取 60℃减压干燥至恒重的木兰脂素对照品 10.5 mg,加甲醇制成 1.05 mg/mL 的溶液,即得。

2.4.3 标准曲线的绘制:精密吸取 1.05 mg/mL 木兰脂素对照品溶液 2.0、1.0、0.6、0.4 mL 于 5 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,得不同质量浓度的木兰脂素对照品溶液,分别进样 5 μL,测定,记录峰面积积分值。以峰面积积分值对进样质量浓度进行线性回归,得回归方程: $A = 2\,633.809\,C + 14.430\,25$, $r = 0.999\,9$,线性范围为 0.42~5.25 μg。

2.5 体外经皮渗透性实验:取出实验皮肤,实验前自然解冻,生理盐水中浸泡 30 min,用滤纸吸干。称取穴贴定喘膏 1.05 g,贴于预处理过的实验皮肤上,钢夹固定皮肤在 TP-5 型智能透皮扩散仪的扩散室与接受室之间,皮肤角质层(人造皮肤除外)朝上,在接受室中注入 40%乙醇的接收液 22 mL,液面恰与皮肤内层接触,开动电磁搅拌器,保持恒速搅拌和恒温,水浴温度(37±1)℃,转速 300 r/min,于 1、2、3、4、6、8、12、24 h 取样 1 mL 置量瓶中。每次取样后均补加相同体积的新鲜接收液并排除接受室中的气泡。样品液用 0.2 μm 的微孔滤膜滤过后,直接进样,进行分析,在测得的峰面积标准曲线上求出相应的药物质量浓度,计算累积渗透量(Q)。以累积渗透量 Q 对时间(t)进行线性回归所得方程的斜率即为透皮速率常数 J。实验结果见表 1。

$$Q = \frac{C_n \times 22 + \sum_{i=1}^{n-1} C_i \times 1}{A}$$

C_n :第 n 个取样点测得的药物质量浓度(μg/mL); C_i :第 i 个取样点测得的药物质量浓度(μg/mL);A:渗透面积(cm²)

表 1 木兰脂素在不同皮肤的体外透皮渗透动力学参数 (n=5)

Table 1 Kinetic parameters of magnolin via various skins in vitro (n=5)

皮 肤	Q-t 方程	r	J/(μg·cm ⁻² ·h ⁻¹)	时滞/h	Q/(24 h, μg·cm ⁻²)
蛇蜕	Q=0.30t+3.61	0.993 8	0.30±0.07	12.15	10.57±1.68
小鼠	Q=9.09t-1.16	0.998 7	9.09±1.93	0.12	217.67±48.92
裸鼠	Q=19.61t+1.97	0.996 8	19.61±9.23	0.10	486.15±221.71
大鼠	Q=3.61t-4.47	0.997 2	3.61±1.29	1.24	83.07±29.88
兔	Q=2.42t-3.52	0.985 2	2.42±0.41	1.46	58.12±9.44
乳猪	Q=0.63t+0.93	0.988 8	0.63±0.22	1.49	15.48±4.70
壳聚糖	Q=4.33t+46.15	0.966 1	4.33±0.92	10.66	140.19±16.46
硝酸纤维素	Q=157.52t+294.90	0.985 9	157.92±15.90	1.87	3 853.24±336.41

可见,不同皮肤模型累积渗透量 Q 及透皮速率快慢程度为:硝酸纤维素>裸鼠>小鼠>壳聚糖>大鼠>兔>乳猪>蛇蜕;时滞:蛇蜕>壳聚糖>硝酸纤维素>乳猪>兔>大鼠>小鼠>裸鼠。从实验的重复性和操作性来看,以硝酸纤维素膜为最好。在体

外经皮渗透试验规范性研究中,硝酸纤维素膜可作为适宜亲脂性成分木兰脂素体外经皮渗透实验的理想皮肤模型。

3 讨论

文献中记载常用的体外透皮扩散试验的接受介

质有生理盐水、适宜体积分数的乙醇和聚乙二醇等,本研究考虑到木兰脂素的溶解性能,选择40%乙醇作为接受介质,获得了不同皮肤模型的差异性试验结果。有关40%乙醇作为接受介质的适宜性有待进一步研究。

动物去毛时需仔细剪除并不破坏到皮肤,皮肤用手术刀小心剥离后置15倍放大镜下观察有无破损或病变。实验用皮肤最好现取现用,若需保存,则要展平,用10%的甘油浸润,可以防止冰晶形成,保护皮肤细胞完整。再置密封性好的塑封袋内,于-20℃以下冰箱中保存备用。临用前取出,放置时间不宜过长,一般不超过1个月。

以8种皮肤作为透皮实验材料对穴贴定喘膏的透皮吸收进行研究,发现其体外释药为一线性递增过程,符合零级释放。

硝酸纤维素膜是一种亲水性膜,肉豆蔻酸异丙

酯作为一种亲脂性成分用来浸渍硝酸纤维素膜,增加脂质结构,尽可能模拟角质层限速。经肉豆蔻酸异丙酯浸渍的硝酸纤维素膜渗透性远大于其他皮肤,其重现性好、易操作,可用于含亲脂性成分中药透皮贴剂基质处方的预筛选,能否作为中药经皮给药制剂的体外扩散试验评价体系最合适的皮肤模型,有待进一步的实验验证。

References:

- [1] Chu P, Huang Y B, Lin H H, et al. Percutaneous absorption of captopril from hydrophilic cellulose gel through excised rabbit skin and human skin [J]. *J Pharm Sci*, 1996, 145: 215-220.
- [2] Santóyq S, Arellano A, Yjartua P, et al. In vitro percutaneous absorption of piroxicam through synthetic membranes and abdominal rat skin [J]. *Pharm Acta*, 1996, 71: 141-146.
- [3] Ni M H, Di L Q, Sun S P. HPLC Determination of magnolin in Xuetie Dingchuan Plaster [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol* (中药新药与临床药理), 2005, 16(2): 433-435.

HPLC 法测定侧柏叶及其制剂侧柏 V 号胶囊和异海松酸胶囊中异海松酸

程立方¹, 崔秀君², 马海勇³

(1. 山东省中医药研究院, 山东 济南 250014; 2. 济南市妇幼保健院, 山东 济南 250001;

3. 南京中医药大学, 江苏 南京 210046)

摘要:目的 建立异海松酸的 HPLC 测定方法, 控制侧柏叶及其制剂侧柏 V 号胶囊和异海松酸胶囊的质量。方法 采用高效液相色谱法。色谱条件: Kromasil C₁₈ 柱(200 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水-冰醋酸(60:37:3); 体积流量: 1 mL/min; 柱温: 25℃; 检测波长: 231 nm; 进样量: 10 μL。采用外标法计算样品中异海松酸的质量分数。结果 异海松酸的线性关系范围为 1.25~10.00 μg, 回归方程为 Y=66 214 X+2 487.9, r=1.000。平均回收率为 95.8%, RSD 为 2.7% (n=5)。侧柏叶药材中异海松酸的测定结果分别为 3.09、3.20、3.56 mg/g, 侧柏 V 号胶囊的测定结果分别为 10.39、9.67、10.99 mg/g, 异海松酸胶囊的测定结果分别为 553.89、541.50、528.83 mg/g。结论 该方法简便、准确、分离效果好、无干扰, 可用于侧柏及其胶囊的质量评价。

关键词: 侧柏; 侧柏 V 号胶囊; 异海松酸胶囊; 异海松酸; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2007)04-0521-03

Determination of isopimaric acid in leaves of *Platycladus orientalis* and its preparations Cebai No. V Capsula and Isopimaric Acid Capsula by HPLC

CHENG Li-fang¹, CUI Xiu-jun², MA Hai-yong³

(1. Shandong Academy of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China; 2. Jinan Maternity and Children Health Hospital, Jinan 250001, China; 3. Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

Abstract: Objective To establish an HPLC method for the determination of isopimaric acid in the leaves of *Platycladus orientalis* and its preparations Cebai No. V Capsula and Isopimaric Acid Capsula to evaluate the quality of them. **Methods** HPLC Method was developed. Kromasil C₁₈ (200 mm×4.6 mm, 5 μm) column was used and the mobile phase; methyl alcohol - water - acetic acid (60:37:3), float

收稿日期: 2006-07-12

基金项目: 山东省中医药管理局科技计划项目(ZY19981018)

作者简介: 程立方(1965—), 男, 山东济南人, 副研究员, 从事中药及复方活性成分与质量控制研究工作。

Tel: (0531)86671401 E-mail: clf01@163.com