

PEG在本处方中起抑晶作用^[10],同时能包裹猪苓多糖脂质体,脂质体膜表面引入聚合物分子而形成空间稳定性的脂质体。PEG-脂质体表面白蛋白浓度高达80.0%,具有高度亲水性,有效的保护脂质体不被肝脾巨噬细胞吞噬,达到长循环的目的。同时,PEG-脂质体表面可形成较厚的立体位阻层,也阻碍了MPS的作用。

References:

- [1] Wang L L, Wu H Y, Luo G F. The pharmacological action and the clinical application of *Polyporus umbellatus* [J]. *China Pharm* (中国药业), 2002, 9(10): 58-59.
- [2] Roux E, Stomp R, Giasson S, et al. Steric stabilization of liposomes by pH-responsive N-isopropylacrylamide copolymer [J]. *J Pharm Sci*, 2002, 91(8): 1795.
- [3] Wang K P, Zhang Y, Zhang J. Preparation of *Polyporus umbellatus* polysaccharides long circulating liposomes [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(3): 368-370.
- [4] Zhu C P, Zhang S H. Detection of polysaccharide in *Lycium barbarum* extract [J]. *Food Ferment Ind* (食品与发酵工业), 2005, 31(2): 111-113.
- [5] Li Q, Ping Q N, Wang Q J, et al. Preparation of alprostadil liposomes and its test of irritation [J]. *Chin J New Drugs Clin Rem* (中国新药与临床杂志), 2004, 23(7): 423-426.
- [6] Cansell M, Parisel C, Jozefonvicz J, et al. Liposomes coated with chemically modified dextran interact with human endothelial cells [J]. *J Biomed Mater Res*, 1999, 44(2): 140-148.
- [7] Gao X L, Ji X M. Determining the trap efficiency of liposome using Sephadex column chromatography [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2003, 38(7): 515-517.
- [8] Guo H Y, Mo H L. Factors affecting physical stability and envelope rate of liposomes [J]. *Chin J New Drugs* (中国新药杂志), 2004, 13(6): 498-501.
- [9] Hayakawa E, Nakamura M, Kato Y, et al. Encapsulation of doxorubicin into liposome by a freeze-thawing method using buffer solution [J]. *Chem Pharm Bull*, 1991, 39(3): 773-776.
- [10] Yu B T, Zhang Z R, Zeng R J, et al. Preparation of poly(ethylene glycol)-coated baicalin liposome [J]. *Med J Natl Def Forces Southwest China* (西南国防医药), 2005, 15(1): 33-37.

宝泻灵提取物的体外透皮吸收研究

王冬梅¹, 李 静¹, 徐月红², 唐 志¹, 陈 宝², 李 欢¹

• (1. 中山大学药学院天然药物与中药研究所, 广东 广州 510080; 2. 中山大学药学院

药剂学与制药工程实验室, 广东 广州 510080)

摘要:目的 研究不同透皮促进剂对宝泻灵提取物中各指标性成分体外经皮渗透的影响, 筛选出有效的透皮吸收促进剂。方法 采用改良的Franz扩散池, 以离体大鼠皮肤为透皮屏障, 通过体外透皮实验, 用高效液相色谱法测定不同渗透促进剂对提取物中各指标性成分吴茱萸次碱、丁香酚和肉桂醛的累积渗透量、透皮渗透速率等体外透皮吸收动力学参数的影响。结果 低比例氮酮、以及3%氮酮与不同比例丙二醇联合使用时的累积渗透量均有明显提高, 其中以3%氮酮+10%丙二醇作为复合促进剂时的促渗作用最强。结论 通过考察渗透促进剂对宝泻灵提取物各指标性成分的影响, 为研究其透皮给药提供了参考依据。

关键词: 宝泻灵提取物; 吴茱萸次碱; 丁香酚; 肉桂醛; 透皮吸收; 促渗剂

中图分类号: R283.3; R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)10-1487-04

In vitro transdermal absorption of Baoxieling extract

WANG Dong-mei¹, LI Jing¹, XU Yue-hong², TANG Zhi¹, CHEN Bao², LI Huan¹

(1. Institute of Natural Product and Traditional Chinese Medicine, School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen

University, Guangzhou 510080, China; 2. Laboratory of Pharmacy and Pharmaceutical Engineering,

School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Key words: Baoxieling extract; rutaecarpin; eugenol; cinnamaldehyde; transdermal absorption; permeation enhancers

宝泻灵作为民间验方, 在治疗小儿腹泻方面有很好的临床疗效, 由吴茱萸、丁香、肉桂等组成。该验方为外用散剂, 用醋调和后贴敷给药。传统用药方式存在着粘着力差、药粉易于散落、药膏易于干涸、用

药量大、质量稳定性差、生物利用度不足等缺点。为了使该验方更好地服务于临床, 笔者拟将其开发成一种新型的透皮制剂。本实验首先对其提取物的透皮吸收特性进行了研究, 以吴茱萸次碱、丁香酚和肉

收稿日期: 2006-12-11

基金项目: 国家中医药管理局中医药留学回国人员科技活动择优资助项目(2003LHR20)

作者简介: 王冬梅(1968—), 女, 内蒙古包头市人, 副教授, 留日博士, 1992—2000年在日本Ochanomizu University留学工作, 2000年至今在中山大学生命科学学院和药学院工作, 研究方向: 天然药物和功能食品的研究, 以及中草药质量标准化研究。

Tel/Fax: (020) 87333159 E-mail: lsswdm@mail.sysu.edu.cn

桂醛为指标性成分,采用体外扩散池法,考察了氮酮以及氮酮和丙二醇联合使用时对提取物中各指标性成分的透皮吸收的影响,为开发研制其新型透皮制剂提供了参考依据。

1 仪器、药品和动物

Waters 高效液相色谱仪,包括 600E 四元梯度泵;2996 二极管阵列检测器;Empower 色谱管理系统。透皮扩散仪(上海黄海实验仪器厂有限公司);RH-KT/C 恒温磁力搅拌器(IKA 公司);超级恒温仪(上海实验仪器厂有限公司);AG-285 电子天平(0.1 mg/0.01 mg, Mettler Toledo)。

吴茱萸次碱、丁香酚和肉桂醛对照品均购自中国药品生物制品检定所,批号分别为 0801-9702、725-200209、110710-200212。吴茱萸、丁香、肉桂等药材均购自广州中医药大学大药房,经本院生药学与天然药物化学实验室鉴定。乙腈(色谱纯,美国 Tedia),超纯水。氮酮(上海三浦化工有限公司),1,2-丙二醇(分析纯,中国医药集团上海化学试剂公司)。其他试剂均为国产分析纯。SD 大鼠(清洁级,粤监证字 2004A089),购自本校实验动物中心。

2 方法结果

2.1 提取物的制备:将吴茱萸、丁香、肉桂等药材粉碎至过 60 目筛,按照宝泻灵的处方比例混匀。取该药粉适量,用 95%乙醇冷浸 1 d 后,回流提取 2 次,减压浓缩回收乙醇,得提取物(每克提取物相当于原生药量 5.1 g)。

2.2 各指标性成分分析方法的建立。

2.2.1 色谱条件:色谱柱 Kromasil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为 0.2%冰醋酸水溶液-乙腈,线性梯度洗脱,0~55 min 乙腈由 5%升至 60%,体积流量 1.0 mL/min,进样量 20 μL。吴茱萸次碱、丁香酚、肉桂醛的检测波长分别选为各化合物的最大吸收波长 343、280、290 nm。

2.2.2 标准曲线的绘制:精密称取对照品吴茱萸次碱、丁香酚和肉桂醛一定量,用乙醇溶解,制成吴茱萸次碱、丁香酚和肉桂醛质量浓度分别为 0.345、6.172、1.252 mg/mL 的对照品贮备液。精密吸取该对照品贮备液 8.0、4.0、2.0、1.0、0.5、0.05 mL,分别置 50 mL 量瓶中,用乙醇稀释至刻度,摇匀,进样 20 μL,按上述色谱条件测定峰面积。以峰面积对各化合物质量浓度进行线性回归,得吴茱萸次碱的回归方程为 $A = 1.4 \times 10^5 C + 12\,302$, $r = 0.999\,9$,在 0.35~55.20 μg/mL 呈良好的线性关系;丁香酚的回归方程为 $A = 2.2 \times 10^5 C + 81\,619$, $r = 0.999\,9$,在

6.18~987.52 μg/mL 呈良好的线性关系;肉桂醛的回归方程为 $A = 1.9 \times 10^5 C + 307\,580$, $r = 0.999\,9$,在 1.26~200.32 μg/mL 呈良好线性关系。

2.2.3 精密度试验:精密吸取同一对照品溶液 20 μL,1 d 内重复测定 6 次,计算峰面积,吴茱萸次碱、丁香酚和肉桂醛的 RSD 分别为 0.44%、0.34%、0.48%。

2.2.4 稳定性考察:取提取物适量,用乙醇溶解,在 0、2、4、6、8、12、24 h 分别进样测定,以峰面积计算,考察其 24 h 内稳定性。结果吴茱萸次碱、丁香酚和肉桂醛的 RSD 分别为 0.54%、0.40%、0.46%,表明样品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.5 加样回收率试验:精密称取提取物样品 6 份,适量,其中含吴茱萸次碱、丁香酚和肉桂醛分别为 14.69、305.12、58.17 mg。分别精密加入低、中、高 3 种质量浓度的吴茱萸次碱、丁香酚和肉桂醛混合对照品溶液,其中吴茱萸次碱的质量分别为 7.26、14.51、29.02 mg,丁香酚的质量分别为 155.08、310.17、620.34 mg,肉桂醛的质量分别为 30.02、60.03、120.06 mg 各一式两份,测定各成分的量,计算回收率,结果吴茱萸次碱、丁香酚和肉桂醛的平均回收率分别为 102.95%、101.22%、98.77%,RSD 分别为 0.55%、0.07%、0.52%。

2.2.6 样品的测定:取提取物约 0.3 g,精密称定,置 50 mL 量瓶中,加乙醇适量,超声处理 2 min,放冷至室温,加乙醇至刻度,摇匀,滤过,作为供试品溶液。进样 20 μL,按外标法以峰面积计算样品各指标成分的量,得吴茱萸次碱、丁香酚和肉桂醛的量分别为 (4.60 ± 0.02) 、 (95.52 ± 0.26) 、 (18.14 ± 0.11) mg/g ($n=3$)。

2.3 体外透皮吸收实验

2.3.1 离体鼠皮的制备^[1]:取体重 200 g 左右的 SD 雄性大鼠,处死后用电须刀剃除鼠毛,剪下腹部皮肤,除去皮下脂肪层、血管及残留物,用生理盐水洗净,并检查其完整性,用生理盐水漂洗后,置-20℃冰箱中冷冻保存备用。

2.3.2 体外透皮吸收实验^[2]:采用改良 Franz 扩散池^[3]。上室为筒状释放池,下室也为筒状接受室,两室对合,其间夹皮肤并固定。

准确称取提取物 1.0 g,分别加入相当于提取物质量分数 2%氮酮、3%氮酮、5%氮酮、3%氮酮+5%丙二醇、3%氮酮+10%丙二醇、3%氮酮+15%丙二醇渗透促进剂,混合均匀制成 6 份含不同渗透促进剂的提取物,另取 1 份提取物不加渗透促进剂作为对照。将上述提取物分别均匀涂布于擦干的鼠皮

角质层面(皮肤渗透面积 3.14 cm^2)。在接受池底连有取样管,供取样、补充接受液和排气用。以潜水式电磁搅拌机维持接受池的动态环境。接受池中精密加入 13.0 mL 接受液,使接受液与皮肤紧密接触,置于 $(37\pm 0.5)\text{ }^\circ\text{C}$ 超级恒温水浴中,开动电磁搅拌机保持恒速搅拌(约 300 r/min)。启动后在 $1, 2, 4, 6, 8, 10, 12\text{ h}$ 分别定时精密吸取接受液 2 mL (同时补加等量接受液)。将取出的接受液经 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 的微孔滤膜过滤后,测定其中吴茱萸次碱、丁香酚和肉桂醛 3 个指标成分的质量浓度,并计算累积透过量。以上每种供试提取物的透皮吸收试验均平行 3 次。

因接受液连续取样并每次加入空白液,使各指

标成分的测得值较真值小,故用 C_r 进行校正: $C_r = \frac{C_n + V_1 \sum C_{i-1}}{V}$ ($i=1\sim n$),式中, C_n 为实测质量浓度, V_1 为取样体积, V 为接受池容积。本实验中, $V_1=2.0\text{ mL}$, $V=13.0\text{ mL}$, $A=3.14\text{ cm}^2$ 。

单位面积累积渗透量 $Q=C_r V/A$

式中 A 为接受池面积, V 为接受池容积, C_r 为接受液中指标成分的校正质量浓度。

宝泻灵提取物在不同时刻的各指标性成分的累积渗透量见图 1。将累积透过量对时间回归,得 3 种指标成分的渗透曲线方程,该方程的斜率为渗透速率,含渗透促进剂的宝泻灵提取物的渗透速率与不含渗透促进剂的渗透速率的比值为增渗倍数。见表 1。

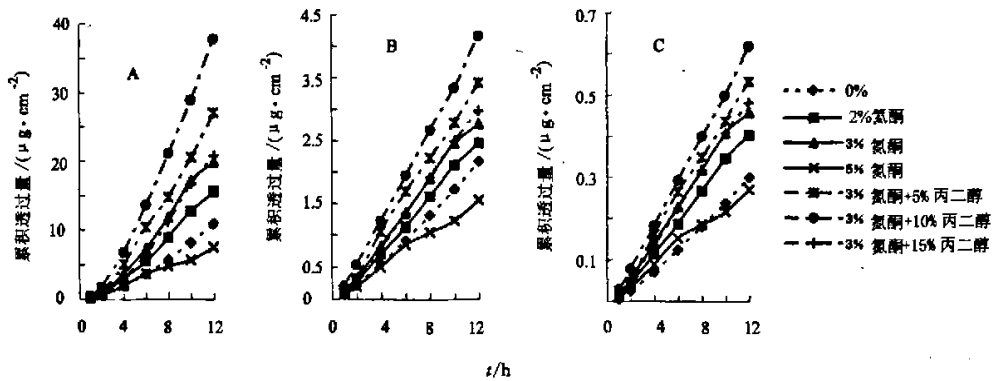


图 1 渗透促进剂对宝泻灵提取物中吴茱萸次碱(A)、丁香酚(B)和肉桂醛(C)累积渗透量的影响

Fig. 1 Effect of permeation enhancers on cumulative osmosis of rutaecarpin (A), eugenol (B) and cinnamaldehyde (C) in Baoxieling extract

表 1 不同渗透促进剂对宝泻灵提取物中各指标性成分体外透皮渗透动力学的影响($n=3$)

Table 1 Effect of permeation enhancers on transdermal permeation dynamics of rutaecarpin, eugenol, and cinnamaldehyde in Baoxieling extract ($n=3$)

指标性成分	促渗剂	渗透曲线方程	r	渗透速率/ $(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1})$	促渗倍数
吴茱萸次碱	无	$Q=0.97t-1.533\ 4$	0.978 4	0.97	—
	2% 氮酮	$Q=1.44t-2.163\ 4$	0.986 0	1.44	1.48
	3% 氮酮	$Q=1.89t-2.883\ 9$	0.985 0	1.89	1.95
	5% 氮酮	$Q=0.65t-0.496\ 4$	0.991 9	0.65	0.67
	3% 氮酮+5% 丙二醇	$Q=2.45t-3.758\ 5$	0.988 2	2.45	2.53
	3% 氮酮+10% 丙二醇	$Q=3.43t-5.310\ 7$	0.986 6	3.43	3.55
丁香酚	3% 氮酮+15% 丙二醇	$Q=1.94t-3.526\ 1$	0.974 3	1.94	2.01
	无	$Q=190.71t-173.21$	0.996 6	190.71	—
	2% 氮酮	$Q=221.62t-162.37$	0.998 5	221.62	1.16
	3% 氮酮	$Q=252.27t-154.81$	0.996 3	252.27	1.32
	5% 氮酮	$Q=132.45t-31.179$	0.992 3	132.45	0.69
	3% 氮酮+5% 丙二醇	$Q=300.74t-178.41$	0.998 2	300.74	1.58
肉桂醛	3% 氮酮+10% 丙二醇	$Q=357.77t-183.53$	0.999 5	357.77	1.88
	3% 氮酮+15% 丙二醇	$Q=268.22t-228.02$	0.998 5	268.22	1.41
	无	$Q=26.85t-30.901$	0.996 3	26.85	—
	2% 氮酮	$Q=36.60t-29.809$	0.998 4	36.60	1.36
	3% 氮酮	$Q=41.79t-25.81$	0.996 1	41.79	1.56
	5% 氮酮	$Q=23.33t-7.1135$	0.990 2	23.33	0.87
	3% 氮酮+5% 丙二醇	$Q=47.48t-33.828$	0.997 9	47.48	1.77
	3% 氮酮+10% 丙二醇	$Q=53.43t-28.696$	0.999 6	53.43	1.99
	3% 氮酮+15% 丙二醇	$Q=43.52t-35.452$	0.998 9	43.52	1.62

由图1、表1可知,提取物中的各指标性成分以零级方式透过皮肤,但含不同渗透促进剂的提取物的渗透速率和增渗倍数不同。

与不加渗透促进剂的提取物的透皮吸收相比,单独使用氮酮作为促进剂时,随着氮酮质量分数的增大(2%和3%),提取物中3种指标性成分的12 h累积透过量和渗透速率都会增加;但增大到5%时,则对3种指标性成分的透皮吸收都产生了明显地抑制作用。

将质量分数为3%氮酮分别与5%、10%、15%的丙二醇联合使用,除与5%丙二醇合用促进剂与单独使用3%氮酮的渗透促进效果无明显差异外,其他2个合用促进剂均显著增加了各指标性成分的透皮吸收量和渗透速率,其中以3%氮酮+10%丙二醇合用组的渗透促进效果最佳,吴茱萸次碱、丁香酚和肉桂醛的渗透速率分别是不加渗透促进剂的渗透速率的3.55、1.88、2.01倍。

通过以上结果,可选定3%氮酮+10%丙二醇联合促进剂作为宝泻灵外用制剂的渗透促进剂。

3 讨论

本研究曾考察了生理盐水、20%乙醇水溶液、30%乙醇水溶液和乙醇-PEG400-生理盐水(3:3:4)4种透皮接受液对提取物中3种指标性成分的透皮接受情况。通过对透皮接受液中各指标性成分的HPLC法测定分析得知,丁香酚和肉桂醛在使用生理盐水以外的其他3种接受液时,均表现出良好的渗透性;但吴茱萸次碱只有在以30%乙醇水溶液、乙醇-PEG400-生理盐水(3:3:4)作为透皮接受液时才可检测到,其中乙醇-PEG400-生理盐水(3:3:4)的渗透接受效果最佳。吴茱萸次碱、丁香酚和肉桂醛均为脂溶性成分,在生理盐水中的溶解度小,很快就达到饱和和浓度,影响了各指标性成分的进一步溶出和分析。因此,在不破坏角质层的屏障作用下,为了维持有效浓度梯度,本研究选用乙醇-PEG400-生理盐水(3:3:4)作为对不同渗透促进剂体外促渗效果研究的接受液。

氮酮、氮酮与丙二醇的合用对各指标性成分的释放均具有促进作用,且合用效果更好。氮酮是目前最常用的一类促进剂,其促进透皮吸收的作用机制

据认为是影响皮肤角质层中扁平角化细胞的有序叠集结构,主要作用于其中类脂质,使之流化,让药物通过^[4]。丙二醇被广泛作为助渗溶剂应用,单独使用促进效果不明显,有时反而阻滞药物扩散,但丙二醇与其他促进剂合用通常会产生明显促进效果^[5,6]。氮酮的脂溶性与丙二醇的水溶性,对几乎所有药物的透皮均有促进作用,但两者的比例均不宜过高,过高比例时,有可能使脂质双分子层结构受到破坏,从而导致皮肤受损,渗透量减少。本研究结果显示,对于吴茱萸次碱、丁香酚和肉桂醛的透皮吸收,3%氮酮+10%丙二醇的促渗效果最佳。

芳香性中药的脂溶性成分本身就具有促渗效果^[7],虽然该复方中丁香和肉桂药材均为芳香性药材,但从前述研究结果可以看出,在使用了促渗剂后,对此两种药材主要成分(丁香酚和肉桂醛)的增渗倍数仍有较大程度提高。

将此宝泻灵提取物制备成贴剂,根据提取物的透皮效果,比较了加入3%氮酮+10%丙二醇和不加任何促渗剂这两种贴剂的透皮效果,最终测得各指标性成分的透皮促渗结果与本实验一致。表明采用提取物进行透皮吸收促渗剂筛选的方法能够对该药物的剂型研究有指导性的作用,也为该药物的上市提供了很好的理论支持。

References:

- [1] Miao M S. *Experimental Animal and Technology of Animal Experiment* (实验动物和动物实验技术) [M]. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 1997.
- [2] Mao L Y, Gao J J, Chu D N. Studies permeation of asthma adhesive plaster through rat skin *in vitro* [J]. *Chin J Mod Appl Pharm* (中国现代应用药学), 2004, 21(3): 249-250.
- [3] Gungor S, Bergisadi N. Effect of penetration enhancers on *in vitro* percutaneous penetration of nimesulide through rat skin [J]. *Pharmazie*, 2004, 59(1): 39-41.
- [4] Huang K. New transdermal drug absorption enhancer-Azone [J]. *Chin J Pharm* (中国医药工业杂志), 1989, 20(4): 185.
- [5] Huang Y W, Song X H. Selected study on enhancers of percutaneous absorption for TCM compound Xinankang Patches [J]. *China Pharm* (中国药师), 2003, 6(7): 391-393.
- [6] Zhang Q, Deng Y J, Liu L M. Study on the preparation and pharmacokinetics of the Qinglong Plaster, a transdermal delivery from a Chinese drug [J]. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 1999, 16(4): 254-257.
- [7] Xu D K, Wang W. Study progress on percutaneous absorption of traditional Chinese medicine [J]. *China Pharm* (中国药业), 2005, 14(1): 78-79.