



伤湿止痛巴布剂体外透皮吸收实验研究

吴笑如¹, 贺成¹, 王乃婕¹, 张媛媛¹, 席春霞², 解素花^{3*}

1. 中药复方新药开发国家工程研究中心, 北京 100075;
2. 天津市山佳医药科技有限公司, 天津 300190;
3. 北京同仁堂科技发展股份有限公司, 北京 100075)

[摘要] 目的:对所制备的伤湿止痛巴布剂进行体外透皮吸收实验研究。方法:采用立式 Franz 扩散池和大鼠进行经皮渗透试验,酸性染料比色法、HPLC 分别测定总生物碱和阿托品、硫酸土的宁在一定时间的经皮累积透过量。结果:生物碱的累积透过量(Q)随时间(t)的增加而增加,两者呈线性关系。结论:伤湿止痛巴布剂的体外经皮渗透符合零级动力学过程。

[关键词] 透皮吸收;巴布剂;生物碱;酸性染料比色法;高效液相色谱法

伤湿止痛巴布剂由伤湿止痛流浸膏、颠茄流浸膏、芸香浸膏、薄荷脑、樟脑、冰片、水杨酸甲酯组成。原剂型为橡胶膏剂,临床上用于风湿性关节炎、肌肉疼痛、关节肿痛,疗效显著。与橡胶膏剂相比,巴布剂的人体用药顺应性更好;生产工艺比较简单;生产过程中不使用汽油,更安全、环保。该制剂处方组方庞大,可测成分含量低。处方中颠茄、生草乌、生川乌、生马钱子均含有生物碱,为处方中主要有效成分,本研究采用酸性染料比色法测定透皮接收液中总生物碱的含量,HPLC 测定接收液中土的宁、硫酸阿托品的含量,研究伤湿止痛巴布剂的体外透皮特性。

1 材料

电子天平(梅特勒 AB135-S,瑞士),TK-60B 透皮扩散仪(上海楷凯科技贸易有限公司),紫外-可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司),Agilent 1200 series 高效液相色谱仪。硫酸阿托品、土的宁对照品(中国药品生物制品检定所,批号分别为100040-200510,110705-200306),伤湿止痛巴布剂(自制),伤湿止痛原料药(奇正藏药提供),乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

Wistar 大鼠,雄性,180 ~ 200 g,购自中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心,合格证号 SCXK(军)2007-004。

2 方法与结果

2.1 鼠皮的制备 取雄性 Wistar 大鼠,脱颈椎处死后用电动剃毛器将其腹部脱毛,剪下腹部皮肤,小心剥离脂肪层、筋膜,备用。

2.2 总生物碱体外分析方法^[1-2] 取全部透皮接收液 18 mL(3 份平行接收液合并),置预先精密加入三氯甲烷 10 mL 的分液漏斗中,加溴甲酚绿溶液(取溴甲酚绿 50 mg 与邻苯二甲酸氢钾 1.021 g,加 0.2 mol · L⁻¹ 氢氧化钠溶液 6.0 mL 使溶解,再加水稀释至 100 mL,摇匀,必要时滤过)5.0 mL,振摇提取 2 min 后,静置使分层,分取澄清的三氯甲烷液,415 nm 处测定吸光度,计算。

取硫酸阿托品对照品适量,精密称定,加接收液分别配制成每 1 mL 含有 0.113, 0.226, 0.453, 0.680, 1.130, 2.260, 4.530 μg 的对照品溶液。精密吸取上述对照品溶液 18 mL,加溴甲酚绿溶液 5.0 mL,三氯甲烷 10 mL,振摇提取 2 min,静置分层,分离出三氯甲烷层,在 415 nm 处测定吸光度,以硫酸阿托品的量(Y)对吸光度(X)进行线性回归,计算得标准曲线为 $Y = 199.95X + 0.662$, $r = 0.9998$,线性范围 2.03 ~ 81.5 μg 。

取供试品溶液,用紫外分光光度计重复测定 6 次,计算吸光度 RSD 1.8%,表明精密度良好。

取同一供试品溶液分别于 10, 20, 30 min, 1, 2, 3, 4 h 测定吸光度, RSD 2.8%,表明供试品溶液在 4 h 内基本稳定。

取同样的空白透皮接收液配置低、中、高 3 个浓度的对照品溶液,每个浓度平行 3 份,按照供试品溶

[稿件编号] 20110831008

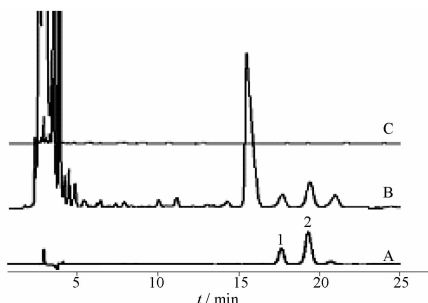
[基金项目] 国家“十一五”科技支撑计划项目(2008BA153B077)

[通信作者] * 解素花, Tel: (010) 87632654, E-mail: jiesuhua@ tongrentang.com



液制备方法制备,依法测定,回收率分别为 99.1%, 99.7%, 104%, RSD 分别为 1.9%, 3.5%, 2.8%。

2.3 士的宁、硫酸阿托品体外分析方法^[3] 流动相乙腈-磷酸盐缓冲液(取磷酸二氢钾 6.8 g 溶于 1 000 mL 水中,加入 10 mL 三乙胺,用磷酸调节 pH 至 2.8)(12:88);Apollo-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);检测波长 210 nm;流速 1.0 mL · min⁻¹;柱温 20 °C。色谱图见图 1。



A. 对照品;B. 透皮接收液样品;C. 阴性样品;1. 士的宁;2. 硫酸阿托品。

图 1 士的宁、硫酸阿托品透皮试验的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of strychnine and atropine of transdermal absorption *in vitro*

取透皮接收液(10 份巴布剂 1 透皮接收液合并;30 份巴布剂 2 透皮接收液合并),减压浓缩至 15 mL,加氨试液 5 mL 摇匀,加乙酸乙酯萃取 4 次,每次 15 mL,合并乙酸乙酯层,回收乙酸乙酯至干,用流动相溶解定容至 5 mL,微孔滤膜滤过,取续滤液即得。

取 120 °C 干燥 3 h 士的宁、硫酸阿托品对照品适量,精密称定,加流动相配制每 mL 含士的宁、硫酸阿托品 31.8, 236.4 μg 的混合对照品溶液。分别精密吸取上述混合对照品溶液 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15 μL, 进样,以峰面积(Y)对进样量(X)进行线性回归,计算得标准曲线为士的宁 $Y = 3\ 825.1X - 1.338$, $r = 0.999\ 9$, 线性范围 0.063 6 ~ 0.477 μg;硫酸阿托品 $Y = 1\ 198.3X - 17.177$, $r = 0.999\ 9$, 线性范围 0.472 8 ~ 3.546 μg。

精密吸取对照品溶液 10 μL,连续重复进样 6 次,记录峰面积,计算士的宁、硫酸阿托品的精密度 RSD 分别为 1.9%, 1.5%, 表明本方法精密度良好。

取同一供试品溶液,分别在 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 24 h 进样测定,士的宁、硫酸阿托品 RSD 分别为 3.5%, 2.6%, 表明样品在 24 h 内稳定。

取同样的空白透皮接收液配置低、中、高 3 个浓度的对照品溶液,每个浓度平行 3 份,按照供试品溶液制备方法制备,依法测定,士的宁和硫酸阿托品的平均回收率分别为 97.1%, 101%, RSD 分别为 3.3%, 2.1%。

2.4 体外透皮试验^[4] 采用立式 Franz 扩散池装置(扩散池容积为 6 mL,有效扩散面积为 2.92 cm²),将伤湿止痛巴布剂紧密贴于处理好的鼠皮角质层,排除气泡,固定于渗透扩散装置的扩散室和接收室之间,背衬层向上。接收室加满生理盐水作为扩散介质,使液面恰与鼠皮接触。水浴加热,温度精密控制在(37 ± 0.2) °C,开动磁力搅拌器,搅拌转速设定为 400 r · min⁻¹,分别在 2, 4, 6, 8, 24 h 将接收室中的接收液全部倒出,同时补加同样体积的新鲜接收液。取接收液按 2.2, 2.3 项下方法测定总生物碱和士的宁、硫酸阿托品含量,计算累积透过量 Q,将 Q 对时间 t 进行回归,得体外透皮动力学方程及透皮速率。结果见表 1, 2, 图 2, 3。巴布剂 1、巴布剂 2 中总生物碱、士的宁、硫酸阿托品的 24 h 体外经皮渗透 Q 与 t 相关性较好,二者呈线性关系,体外经皮渗透均符合零级动力学过程;不同载药量的巴布剂随载药量增大透皮速率增大。

表 1 巴布剂 1, 2 总生物碱体外透皮试验

Table 1 Results of total alkaloid of transdermal absorption of cataplast 1, 2

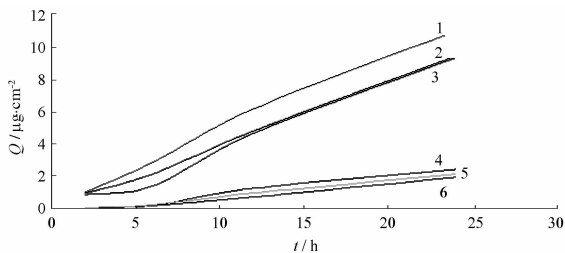
No.	动力学方程	r	透皮速率/μg · cm ⁻² · h ⁻¹
巴 1-1	$Q = 0.430\ 9t - 0.930\ 8$	0.996	0.430 9
巴 1-2	$Q = 0.398\ 9t - 0.154\ 7$	0.999	0.398 9
巴 1-3	$Q = 0.441\ 8t + 0.441\ 2$	0.997	0.441 8
巴 2-1	$Q = 0.120\ 1t - 0.383\ 0$	0.985	0.120 1
巴 2-2	$Q = 0.104\ 1t - 0.348\ 7$	0.999	0.104 1
巴 2-3	$Q = 0.096\ 4t - 0.394\ 6$	0.999	0.096 4

注:巴 1. 高载药量 0.011 g · cm⁻²;巴 2. 低载药量 0.003 4 g · cm⁻², 与原剂型橡胶膏载药量一致。

表 2 巴布剂 1, 2 中士的宁、硫酸阿托品体外透皮试验

Table 2 Results of strychnine and atropine of transdermal absorption of cataplast 1, 2

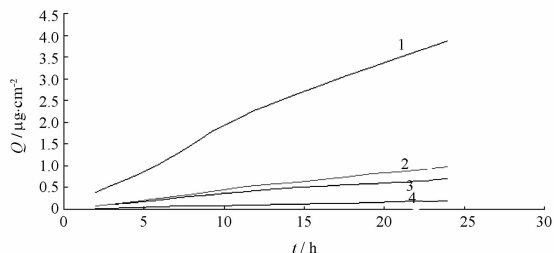
化合物	动力学方程	r	透皮速率/μg · cm ⁻² · h ⁻¹
士的宁 巴 1	$Q = 0.026\ 3t + 0.085\ 3$	0.993	0.026 3
巴 2	$Q = 0.007\ 5t + 0.015\ 1$	0.998	0.007 5
阿托品 巴 1	$Q = 0.153\ 7t + 0.248\ 8$	0.993	0.153 7
巴 2	$Q = 0.040\ 4t + 0.028\ 7$	0.996	0.040 4



1. 巴 1-3;2. 巴 1-1;3. 巴 1-2;4. 巴 2-1;5. 巴 2-2;6. 巴 2-3。

图 2 巴布剂 1,2 的总生物碱 24 h 体外经皮渗透曲线

Fig. 2 The 24 h permeability curve of total alkaloid of cataplasms 1,2



1. 巴 1 中阿托品;2. 巴 1 中的士的宁;3. 巴 2 中的硫酸阿托品;4. 巴 2 中的士的宁。

图 3 巴布剂 1,2 的士的宁、硫酸阿托品 24 h 体外经皮渗透曲线

Fig. 3 The 24 h permeability curve of strychnine and atropine of cataplasms 1,2

3 讨论

前期伤湿止痛巴布剂的体外释放度研究表明其释放过程符合骨架材料的 Higuchi 方程的扩

散模式,硫酸阿托品的体外释放曲线方程为 $Q = 84.004 t^{1/2} + 26.464$,药物的释放速率远远大于透皮速率,表明该巴布剂为皮肤控制经皮渗透的给药系统。

预试验曾选择水、生理盐水、40% PEG400 水溶液以及 10% 乙醇溶液等作为接收液,结果表明 PEG400 水溶液在测定波长处有干扰,累积透过量生理盐水 > 纯水 > 10% 乙醇;且生理盐水与体内环境相似,选择生理盐水作为接收液。

中药复方外用制剂组方庞大,成分复杂,可测成分含量低,选择合适的体外透皮实验的定量指标比较困难。以总生物碱为指标和以阿托品、士的宁为指标的体外透皮结果,二者结论基本一致,考虑到后者的样本量太大,提示在复方中药巴布剂的制剂处方工艺筛选研究中,视情况采用大类成分作为体外透皮实验的定量指标是有可行性的。

本实验对原剂型伤湿止痛橡胶膏和与之相同载药量的巴布剂的体外透皮特性进行了对比,结果表明两者透皮速率基本一致,体外经皮渗透均符合零级动力学过程。

[参考文献]

[1] 中国药典. 二部[S]. 2010:982.
 [2] 张丽萍,刘萌,寿钥莺,等. 比色法测定颠茄剂中莨菪类生物碱的含量[J]. 海峡药学,2005,17(2):76.
 [3] 中国药典. 一部[S]. 2010:396
 [4] 彭丽华,刘淑芝,郭春燕,等. 两种巴布剂基质的体外经皮渗透性考察[J]. 中国实验方剂学杂志,2005,11(5):1.

Experimental study on *in vitro* transdermal absorption of Shangshi Zhitong cataplasms

WU Xiaoru¹, HE Cheng¹, WANG Naijie¹, ZHANG Yuanyuan¹, XI Chunxia², XIE Suhua^{3*}

(1. State Research Center for Research and Development of Traditional Chinese Medicine Multi-ingredient Drugs, Beijing 100075, China; 2. Tianjin Sanca Medical Technology Co., Ltd., Tianjin 300190, China; 3. Tong Ren Tang Technologies Co., Ltd., Beijing 100075, China)

[Abstract] **Objective:** To conduct an experimental study on *in vitro* transdermal absorption of prepared Shangshi Zhitong cataplasms. **Method:** Franz diffusing cells and mice were adopted for the percutaneous penetration study. The accumulative percutaneous permeation of total alkaloids, strychnine and atropine in certain time was determined by acid dye colorimetry and HPLC. **Result:** The accumulative permeation of alkaloids (Q) increased with time (t), with a linear relation between them. **Conclusion:** The *in vitro* percutaneous penetration of Shangshi Zhitong cataplasms complies with the zero-order kinetics.

[Key words] transdermal absorption; cataplasms; alkaloids; acid dye colorimetry; HPLC