



· 制剂与炮制 ·

宣痹凝胶贴膏剂有效成分的透皮行为研究

刘月环, 陆洋, 杜守颖*, 白洁, 王玥, 李慧云

(北京中医药大学 中药学院, 北京 100102)

[摘要] 目的:研究宣痹凝胶贴膏剂中有效成分龙胆苦苷、柚皮苷、原苏木素 B 的透皮吸收特性。方法:采用 Franz 扩散池法,以大鼠腹皮为体外模型,用 HPLC 测定接受液、皮中、膏中残留的龙胆苦苷、柚皮苷、原苏木素 B 3 种指标成分的含量。结果:宣痹凝胶贴膏剂中龙胆苦苷、柚皮苷、原苏木素 B 的透皮速率分别为 $3.47, 1.59, 2.13 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$; 24 h 的累积透过率分别为 25.42%, 11.73%, 17.78%; 在皮中的滞留量分别为 $0.231, 0.593, 0.568 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$, 滞留率分别为 0.027%, 0.227%, 0.475%; 在膏中的残留量分别为 $2179, 674, 278 \mu\text{g}$, 残留率分别为 81.36%, 81.92%, 73.83%。结论:宣痹凝胶贴膏剂中有效成分的体外透皮行为接近零级过程,皮中滞留率相比透过率和膏中残留率来说非常低。

[关键词] 宣痹凝胶贴膏剂;龙胆苦苷;柚皮苷;原苏木素 B;透皮吸收

宣痹凝胶贴膏剂由秦艽、骨碎补、苏木等 15 味药组成,具有驱风除湿、活血化瘀之功效,主要用于治疗关节痹痛、骨性关节炎等症。凝胶膏剂是一类以水溶性高分子材料为基质的新型外用剂型,具有载药量大、对皮肤无刺激、重复揭贴性好等优点,尤其适合于大处方的中药制剂,是目前中药经皮给药系统研究的热点之一。本研究以方中秦艽、骨碎补、苏木药材中有效成分龙胆苦苷、柚皮苷、原苏木素 B 为指标,考察了宣痹凝胶贴膏剂中有效成分龙胆苦苷、柚皮苷、原苏木素 B 的透皮吸收行为,探讨了宣痹凝胶贴膏剂开发和临床应用的可行性。

1 材料

LC-20AT 高效液相色谱仪,SPD-20A VWD 检测器,LCSolution 色谱工作站(日本岛津公司);TP-5 智能透皮试验仪(南京红蓝电子科技有限公司);赛多利斯 BT125D 和 BSA224S 型电子分析天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司);KQ5200DA 型数控超声

波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

龙胆苦苷,柚皮苷(中国药品生物制品检定所,批号分别为 110770-200409,110722-200610);原苏木素 B(北京伊普瑞斯科技有限公司,批号 A0365);宣痹凝胶贴膏剂(自制,批号 20110914),乙腈(色谱纯,Mreda Technology Inc 公司);娃哈哈纯净水(杭州娃哈哈集团);磷酸(色谱纯,天津市光复精细化工研究所);生理盐水(石家庄四药有限公司);硅藻土(天津市光复精细化工研究所);其余试剂均为分析纯。

SD 大鼠,雄性,体重 180 ~ 200 g,北京维通利华实验动物技术有限公司提供,动物合格证号 SCXK(京)2006-0009。

2 方法与结果

2.1 含量测定方法的建立^[1]

2.1.1 色谱条件 Merck RP-18 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸(B),梯度洗脱,0 ~ 33 min, 11% A; 33 ~ 36 min, 11% ~ 20% A; 36 ~ 67 min, 20% A。流速 $0.6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;柱温 20 °C;检测波长 283 nm。色谱图见图 1。

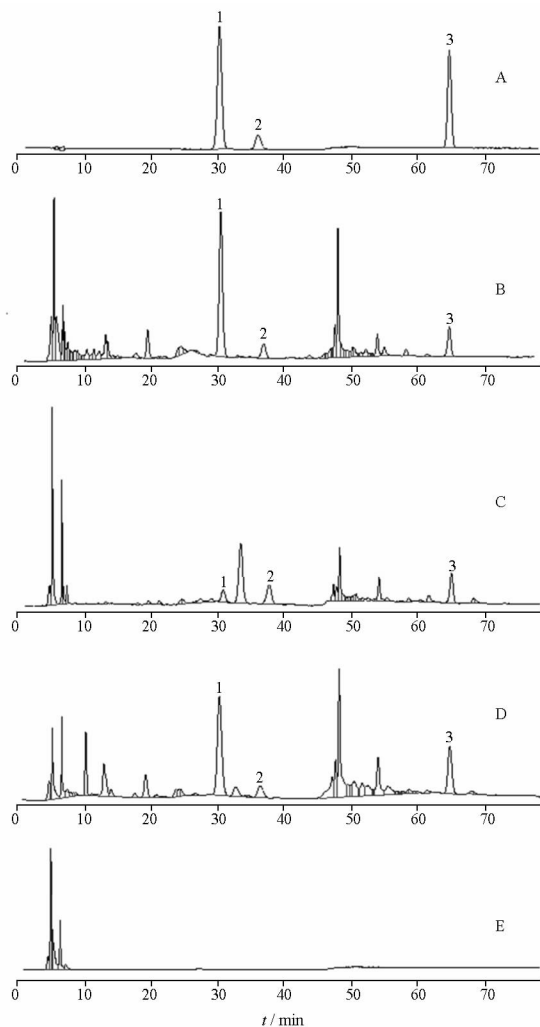
2.1.2 标准曲线的绘制 精密称取龙胆苦苷、柚皮苷、原苏木素 B 对照品适量,加甲醇制成每 1 mL 含龙胆苦苷 0.043 3 mg、柚皮苷 0.005 3 mg、原苏木素 B 0.005 5 mg 的对照品溶液。精密移取 1 mL 分别至 10, 50 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,分别得到每 1 mL 含龙胆苦苷 0.004 33 mg、柚皮苷

[稿件编号] 20111227008

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09502-008,2009ZX09308-003);国家自然科学基金面上项目(81073057);北京中医药大学校级课题(2011JYB22XS-052);北京中医药大学复方中药制剂研究创新团队发展计划项目(2011-CXTD-13)

[通信作者] * 杜守颖,博士,教授,博士生导师,主要从事中药新剂型与制剂关键技术研究, Tel: (010) 84738615, E-mail: dushouying@263.net

[作者简介] 刘月环,硕士研究生, Tel: (010) 84738645, E-mail: rita_liu009@163.com



A. 对照品; B. 接受液样品; C. 皮肤处理样品; D. 膏处理样品; E. 空白样品; 1. 龙胆苦苷; 2. 原苏木素 B; 3. 柚皮苷。

图1 宣痹凝胶贴膏剂有效成分 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of active ingredient in Xuanbi gel plaster

0.000 53 mg、原苏木素 B 0.000 55 mg 的对照品溶液和每 1 mL 含龙胆苦苷 0.000 87 mg、柚皮苷 0.000 106 mg、原苏木素 B 0.000 11 mg 的对照品溶液,将对照品溶液分别进样 5, 8, 10, 12, 16, 20, 25, 30, 35, 40 μL , 进行色谱分析;以进样量(μg)为横坐标,峰面积为纵坐标,得标准曲线,并计算回归方程,龙胆苦苷 $y = 2\,253\,636x - 1\,032.0, r = 0.999\,9$;柚皮苷 $y = 3\,116\,268x - 1\,319.3, r = 0.999\,9$;原苏木素 B $y = 2\,050\,381x + 1\,228.6, r = 0.999\,7$ 。龙胆苦苷、柚皮苷、原苏木素 B 分别在 0.008 7 ~ 1.082 5, 0.001 1 ~ 0.212 0, 0.002 8 ~ 0.137 5 μg 呈良好的线性关系。

2.1.3 精密度试验 分别取高、中、低 3 个浓度的对照品溶液,重复进样 5 次,计算 RSD。龙胆苦苷高、中、低 3 个浓度的 RSD 分别为 0.66%, 0.38%, 0.48%;柚皮苷高、中、低 3 个浓度的 RSD 分别为 1.2%, 0.21%, 0.28%;原苏木素 B 高、中、低 3 个浓度的 RSD 分别为 1.7%, 0.47%, 0.38%。

2.1.4 稳定性试验 取同一供试品溶液,按上述色谱条件分别在 0, 2, 4, 8, 10, 12, 24 h 进样,测定峰面积,计算 RSD,龙胆苦苷为 1.3%,柚皮苷为 1.3%,原苏木素 B 为 0.79%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2 样品的测定

2.2.1 透皮接受液的测定 大鼠断颈处死,取适量脱毛膏均匀涂于大鼠腹部脱去鼠毛,用生理盐水反复冲洗后,取下腹皮,用干棉花将脂肪及黏液组织擦拭干净,置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存,实验时取出,室温下自然解冻。

采用 TP-5 智能透皮试验仪,上室为扩散室,下室为接受室,扩散池容积为 23 mL,有效扩散面积为 3.14 cm^2 ,恒温水浴加热,温度 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。实验时,接受室加满释放介质(生理盐水),将鼠皮附在接受室上,再将凝胶膏剂贴于鼠皮上,使其背衬层朝向扩散室,将其固定在两室之间,排除气泡。磁搅拌转速设定为 $300\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 。在设定的时间点 1, 2, 4, 6, 8, 12, 20, 24 h 精密移取接受液 1 mL,同时补加同样体积的新鲜接受液。过滤进行含量测定。

根据以下公式计算累积透皮吸收率, $Q = (VC_n + \sum_{i=1}^{n-1} V_s C_i) / W \times 100\%$,式中, V 为接受室中接受液的体积(mL); V_s 为取出接受液的体积(mL); C_n 为第 n 个取样点测得的接受液中药物质量浓度($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$); W 为凝胶膏剂中所含药物的质量(mg)。

3 组数据平均累积透皮吸收率见表 1。以 3 组数据平均累积透皮吸收率-时间做图,见图 2。宣痹凝胶贴膏剂中龙胆苦苷、柚皮苷、原苏木素 B 的透皮吸收过程接近零级方程。

以上述实验数据进行模型拟合,各模型拟合结果见表 2。

2.2.2 皮中滞留量的测定 体外经皮渗透试验结束后,揭去制剂,用浸有生理盐水的棉签擦去皮肤表面药物,沿扩散池边缘剪下有效渗透面积的皮肤并剪碎置于组织匀浆器中^[2],加入 2 mL 50% 乙醇生



表1 药物不同时间的累积透皮吸收率(n=3)

Table 1 Cumulative penetration rate at different time of active ingredient(n=3)

指标成分	时间点/h	累积透皮率/%
龙胆苦苷	1	0.85
	2	1.51
	4	3.42
	6	5.73
	8	8.66
	10	11.65
	12	14.47
	20	21.13
	24	25.42
	柚皮苷	1
2		0.24
4		0.88
6		3.17
8		3.83
10		4.40
12		5.51
20		8.80
24		11.73
原苏木素 B		1
	2	0.00
	4	2.19
	6	4.65
	8	6.27
	10	6.96
12	7.97	
20	12.22	
24	17.78	

表2 体外透皮率-时间模型拟合方程

Table 2 Model fitting equation of cumulative penetration rate-time in vitro

指标成分	模型	模型拟合方程	r
龙胆苦苷	零级方程	$Q=0.0109t-0.0025$	0.9957
	一级方程	$\ln Q=1.1212\ln t-4.8459$	0.9966
	Higuchi 方程	$Q=0.0654t^{1/2}-0.0834$	0.9843
柚皮苷	零级方程	$\ln[1/(1-Q)]=0.0867 \times \ln t-0.0497$	0.9047
	一级方程	$Q=0.005t-0.0052$	0.9938
	Higuchi 方程	$\ln Q=1.5105\ln t-6.7024$	0.9699
原苏木素 B	零级方程	$Q=0.0296t^{1/2}-0.0416$	0.9782
	一级方程	$\ln[1/(1-Q)]=0.0468 \times \ln t-0.0489$	0.9377
	Weibull 方程	$Q=0.0067t-0.0022$	0.9808
木素 B	一级方程	$\ln Q=1.0398\ln t-5.0782$	0.9813
	Higuchi 方程	$Q=0.0433t^{1/2}-0.0591$	0.9765
	Weibull 方程	$\ln[1/(1-Q)]=0.086 \times \ln t-0.1113$	0.9435

液进样。将3组实验结果取平均值,结果见表3。

表3 皮肤滞留量和滞留率

指标成分	皮肤滞留量/ $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$	皮肤滞留率/%
龙胆苦苷	0.231	0.027
柚皮苷	0.593	0.227
原苏木素 B	0.568	0.475

2.2.3 膏中残留量的测定 体外经皮渗透试验结束后,揭去制剂,从中精密称取0.1g膏药,精密加入3倍量硅藻土研磨均匀,放入20mL西林瓶中,精密加入80%甲醇6mL,称定,超声处理15min,冷却到室温,再称定质量,用80%甲醇补足减失的质量,摇匀,从中精密吸取上清液2mL至5mL量瓶中,用80%甲醇稀释至刻度,用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,取续滤液,得供试品溶液,进行含量测定。将3组实验结果取平均值,结果见表4。

表4 膏中残留量和残留率

Table 4 Results of retention volumes and retention rate in gel plaster

指标成分	膏中残留量/ μg	膏中残留率/%
龙胆苦苷	2179	81.36
柚皮苷	674	81.92
原苏木素 B	278	73.83

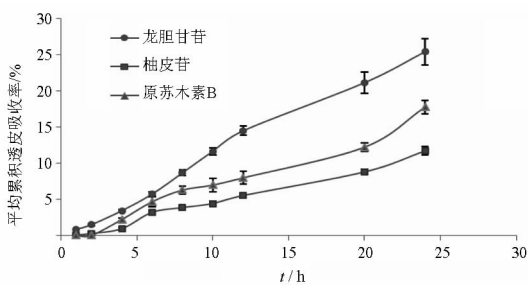


图2 宣痹凝胶贴膏剂中药物透皮吸收曲线(n=3)

Fig. 2 The Curve of the active ingredient infiltration(n=3)

理盐水匀浆。匀浆液再1万 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心2min,吸取上清液600 μL ,加入甲醇2mL沉淀蛋白,涡旋混合器震荡60s,1万 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10min,吸取上清液1.2mL, N_2 吹干,加入甲醇120 μL 溶解,涡旋混合器震荡60s,1万 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10min,取上清



3 讨论

本实验测定了接受液、皮中、膏中残留的龙胆苦苷、柚皮苷、原苏木素 B 的含量,计算了接受液、皮中、膏中残留的指标成分的含量之和,并与透皮实验之前凝胶膏剂中指标成分的含量作对比,结果龙胆苦苷为 106.8%,柚皮苷为 93.88%,原苏木素 B 为 92.09%。且在以生理盐水为接受液时,24 h 龙胆苦苷、柚皮苷、原苏木素 B 的透过率分别为 25.42%, 11.73%, 17.78%; 皮肤滞留率分别为 0.027%, 0.227%, 0.475%; 膏中残留率分别为 81.36%, 81.92%, 73.83%。表明凝胶膏剂在透皮过程中,有效成分一部分透过皮肤进入血液循环,一部分残留于凝胶膏剂中,另一部分滞留于皮肤上,但皮中滞留量很低。

本实验为了更深入研究药物的透皮过程(透过,滞留和残留),对透皮过程中的药物的分布进行了探讨。理论上累积透过率+皮中滞留率+膏中残留率应为 100%,但是由于这 3 个数据的样品需要分别制备,分别测定,且皮肤滞留率和膏中残留率的药物成分测定需要经过比较复杂的处理过程,因此

产生的测定误差累积后影响到了最终的加和数。但是总体看来,3 种成分的总体回收率均在 90%~110%,符合了一般样品测定的要求。

对于 3 种指标成分,从相对分子质量比较,龙胆苦苷和原苏木素 B 相差不多,而柚皮苷远远高于两者;从极性上看,龙胆苦苷最小,其次是原苏木素 B,极性最大的是柚皮苷。原理上,相对分子质量小,脂溶性强的药物易透过皮肤,因此理论上,透过率的大小应为龙胆苦苷>原苏木素 B>柚皮苷。本实验结果与理论相符。

在样品测定过程中,本研究建立了同时测定复方中龙胆苦苷、柚皮苷、原苏木素 B 3 种成分的快速检验方法,该方法不仅满足了测定要求,而且大大减少了含量测定的工作量,为中药复方多指标成分的测定提供了参考。

[参考文献]

- [1] 杜茂波,刘淑芝,李曼玲,等. 黄连巴布剂体外释放和透皮行为的研究[J]. 中国中药杂志,2009,34(8):969.
- [2] 邓亚利,周莉玲,陈道阳. 青风藤超临界提取物参与体内外透皮作用研究[J]. 辽宁中医药大学学报,2011,13(4):23.

Transdermal behavior of effective constituents in Xuanbi gel plaster

LIU Yuehuan, LU Yang, DU Shouying*, BAI Jie, WANG Yue, LI Huiyun

(School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To study the transdermal absorbability of gentiopicroside, naringin and protosappanin B contained in Xuanbi gel plaster. **Method:** The Franz diffusing cells method was adopted for the *in vitro* model of rat belly skins. Three indexes, gentiopicroside, naringin and protosappanin B, residued in the accept liquid, skins and plaster were determined by HPLC. **Result:** The penetration rates of gentiopicroside, naringin and protosappanin B were respectively 3.47, 1.59, 2.13 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$. After 24 h, their penetration rates were 25.42%, 11.73%, 17.78%, respectively. The residual quantities of gentiopicroside, naringin and protosappanin B in skin were 0.231, 0.593, 0.568 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$, with the retention rates of 0.027%, 0.227%, 0.475%, respectively. The amount of residue of gentiopicroside, naringin and protosappanin B in plaster were 2 179, 674, 278 μg , with the retention rates of 81.36%, 81.92%, 73.83%, respectively. **Conclusion:** The *in vitro* transdermal behavior of Xuanbi gel plaster is close to a zero-order process. The residual quantity the retention rate in skins is much lower than the penetration rate and the residual rate in plaster.

[Key words] Xuanbi gel plaster; gentiopicroside; naringin; protosappanin B; transdermal absorption

doi:10.4268/cjcm20120907

[责任编辑 马超一]