

三黄喷雾剂体外透皮吸收

朱鹏飞¹, 冯伟红², 杜茂波², 王洪珍³, 李颖³, 刘树扬¹, 吴志成², 刘淑芝^{2*}
(1. 首都医科大学,北京 100069; 2. 中国中医科学院中药研究所,北京 100700;
3. 通化万通药业股份有限公司,吉林 通化 134001)

[摘要] 目的:考察三黄喷雾剂小鼠体外经皮渗透规律。方法:采用垂直式改良 Franz 扩散池装置进行试验,以黄芩苷和盐酸小檗碱含量为考察指标,HPLC 测定接受液中指标成分含量。结果:黄芩苷、盐酸小檗碱的透皮速率分别为 42.35、49.99 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$;黄芩苷、盐酸小檗碱 6 h 平均累积透过率分别为 19.51%、7.17%。结论:三黄喷雾剂小鼠体外透皮吸收效果理想,透皮行为符合零级方程。
[关键词] 三黄喷雾剂;透皮吸收;黄芩苷;盐酸小檗碱
[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)12-0015-03

Transdermal Absorption of Sanhuang Spray *in vitro*

ZHU Peng-fei¹, FENG Wei-hong², DU Mao-bo², WANG Hong-zhen³,
LI Ying³, LIU Shu-yang¹, WU Zhi-cheng², LIU Shu-zhi^{2*}
(1. Capital Medical University, Beijing 100069, China;
2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;
3. Wantong Pharmaautical Co. Led, Tonghua 134001, China)

[Abstract] Objective: To investigate *in vitro* percutaneous penetration law of Sanhuang spray in mice. Method: Vertical modified Franz diffusion cell device was used with the content of baicalin and berberine hydrochloride as indexes, index ingredients in receiving liquid were determined by HPLC. Result: Transdermal rates of baicalin and berberine hydrochloride were 42.35, 49.99 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$, respectively; Average cumulative penetration rate of baicalin and berberine hydrochloride in 6 h were 19.51%, 7.17%, respectively. Conclusion: *In vitro* transdermal absorption effect in mice of Sanhuang spray was ideal, transdermal behavior was in accordance with zero-level equation.
[Key words] Sanhuang spray; transdermal absorption; baicalin; berberine hydrochloride

三黄喷雾剂收载于《中药部颁标准》第 1 册,由黄柏、黄芩、黄连、栀子组成,具有清热解毒、消肿止痛的功效,治疗疮痈疔毒、红肿热痛、轻度烧烫伤。本实验以黄芩苷和盐酸小檗碱为考察指标,研究三黄喷雾剂的体外透皮吸收行为,测定其透皮速率、累积透过量、皮肤药物滞留量及滞留时间,为中药喷雾剂的透皮吸收研究提供试验依据。

1 材料

Alliance 型高效液相色谱仪(2695 型溶剂管理系统,2996 型二极管阵列检测器,Empower² 色谱工作站,美国 Waters 公司),Sartorius BP211D 型 1/10 万电子天平(德国 Sartorius 公司),TK-20B 型透皮扩散试验仪(上海锴凯科技贸易有限公司),垂直式改良 Franz 扩散池, Sartorius 普及型 pH 计(德国 Sartorius 公司)。

盐酸小檗碱(中国药品生物制品检定所,批号 110710-200106),黄芩苷(中国药品生物制品检定

[收稿日期] 20111219(007)

[基金项目] 重大新药创制项目(2009ZX09502-010, 2009ZX09301-005-05);中国中医科学院自主选题项目(Z02094)

[第一作者] 朱鹏飞,硕士,从事中药学研究, E-mail: zpfthy@126.com

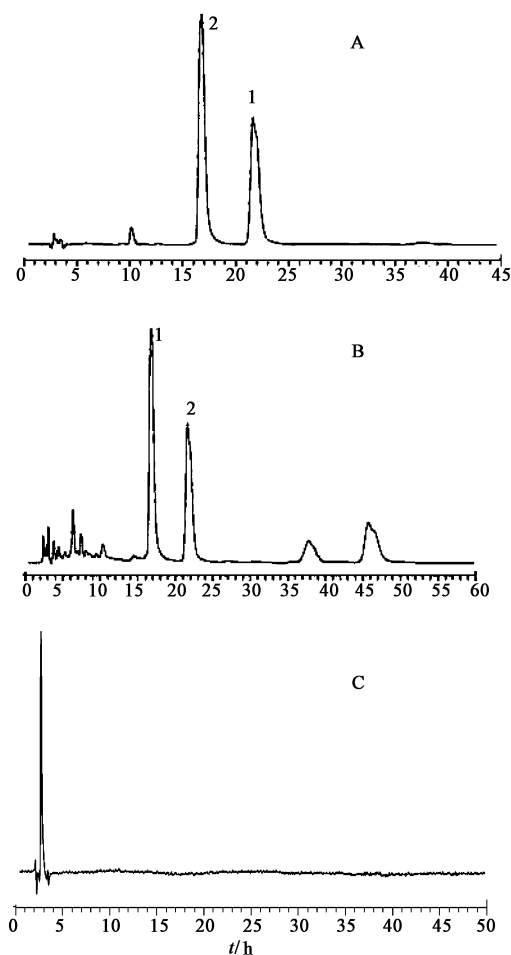
[通讯作者] *刘淑芝,研究员,博士生导师,从事中药制剂研究, Tel: 010-84043227, E-mail: liushuzhi2004@sina.com

所,批号 110715-200212),聚乙二醇 400(PEG 400, 国药集团化学试剂有限公司),甲醇、乙腈为色谱纯,水为娃哈哈纯净水,其他试剂均为分析纯,小鼠由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供,昆明种雄性小鼠,体重 15 ~ 17 g,合格证号 SCXK-(军)2007-004。

2 方法与结果

2.1 方法学考察

2.1.1 色谱条件 Waters Symmetry® C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.2% 磷酸水溶液 (25:75),检测波长 270 nm,柱温 35 °C,流速 1 mL·min⁻¹,理论板数按黄芩苷峰计算应不低于 6 000。在上述色谱条件下,黄芩苷和盐酸小檗碱的色谱峰均达到基线分离,空白溶液无干扰,满足定量分析的要求(图 1)。



A. 对照品;B. 供试品;C. 空白对照;1. 黄芩苷;2. 盐酸小檗碱

图 1 三黄喷雾剂 HPLC

2.1.2 线性关系考察 分别精密称取黄芩苷对照品 2.6 mg,盐酸小檗碱对照品 2.55 mg,分别置于 10 mL 量瓶中,加适量甲醇超声溶解,放冷,加甲醇定

容至刻度,摇匀,精密吸取 1 mL 置 10 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,作为对照品溶液(黄芩苷质量浓度 0.026 g·L⁻¹,盐酸小檗碱质量浓度 0.025 5 g·L⁻¹)。吸取对照品溶液适量,过 0.45 μm 微孔滤膜,均分别进样 1,2,5,10,15,20 μL。按 2.1.1 项下色谱条件测定黄芩苷^[1]、盐酸小檗碱^[2]的峰面积,以对照品进样质量为横坐标,峰面积为纵坐标进行线性回归。结果黄芩苷回归方程 $Y = 2.69 \times 10^6 X + 2.73 \times 10^4$ ($r = 0.999 9$),线性范围 0.026 ~ 0.52 μg;盐酸小檗碱回归方程 $Y = 2.36 \times 10^6 X - 1.07 \times 10^3$ ($r = 0.999 9$),线性范围 0.025 5 ~ 0.51 μg。

2.1.3 精密度试验

2.1.3.1 日内精密度 将供试品溶液于同日内连续进样 6 次,测定峰面积,经计算,黄芩苷 RSD 0.30%,盐酸小檗碱 RSD 0.80%,表明仪器的精密度良好。

2.1.3.2 日间精密度 将供试品溶液于 3 日内连续进样,每日连续进样 3 次,测定峰面积,经计算,黄芩苷 RSD 0.33%,盐酸小檗碱 RSD 1.50%,表明仪器的精密度良好。

2.1.4 重复性试验 取 6 份供试品溶液,分别进样,测定指标成分含量。经计算,黄芩苷的 RSD 0.65%,盐酸小檗碱的 RSD 0.94%,表明方法的重复性良好。

2.1.5 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别于样品制备后第 0,2,4,8,12,24,48 h 进样,测定峰面积。经计算黄芩苷的 RSD 0.50%,盐酸小檗碱的 RSD 0.88%,表明供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.1.6 加样回收率试验 精密吸取已知含量的 6 份供试品溶液,每份 1 mL,按供试品-对照品 1:1 的比例准确加入对照品溶液中,混合均匀,测定成分含量。经计算,黄芩苷平均加样回收率 101.22%,RSD 1.05%;盐酸小檗碱平均加样回收率 100.73%,RSD 1.57%。表明该方法准确度良好。

2.2 三黄喷雾剂制备 称取处方药提取物适量,60% 乙醇水浴加热溶解,滤过,向滤液中依次加入 PVP-K30 和丙二醇,振摇溶解,冷却至室温,10% HCl 调 pH 3.0 ~ 4.0,制成 0.1 g·mL⁻¹ 的药液,按照 20 mL/瓶的规格灌装。即得。

2.3 离体鼠皮制备^[3] 将体重相近、年龄适宜的雌性健康小鼠处死,脱毛剂将鼠毛小心脱去,冲洗干净,剪下皮肤,小心剥离脂肪,选取完整的皮肤,用生理盐水冲洗干净,备用。

2.4 体外透皮试验^[4] 由于本制剂为液体制剂,药物在皮肤的停留时间较短,综合考虑,将体外透皮试验取样时间点设定为 6 h。采用垂直式改良 Franz 扩散池装置,该装置由上下 2 只筒状玻璃管对合而成,扩散池容积为 18 mL,有效扩散面积为 2.377 cm²,恒温水浴加热,温度控制在 (32.5 ± 0.2) °C,接受液为 PEG 400-95% 乙醇-生理盐水 (1:3:6),内加搅拌子。将已处理好的鼠皮固定在两室之间,角质层面向扩散池一侧,加入接收液,排除接受池内的气泡,向扩散池内加入 2 mL 喷雾剂药液,开动透皮扩散试验仪,转速为 350 r·min⁻¹,于时间点 0.5,1,2,4,6 h 将接受液全部取出,同时立即补加同体积的新鲜接受液,将所得接收液过 0.45 μm 微孔滤膜,采用 HPLC 进行含量测定。按下式计算单位面积累积透过量 Q 。

$$Q = \left[\sum_{i=1}^n C_n \right] \times V/S$$

式中, Q 表示单位面积累积透过量; C_n 表示第 n 次取样时接受液中药物质量浓度; V 表示取样体积; S 表示有效扩散面积。

以 6 份样品 6 h 平均累积透过量对时间 t 进行动力学方程拟合,结果黄芩苷拟合曲线为 $Q = 42.352t - 12.277$ ($r = 0.9989$),透皮速率常数 K 为 42.35 μg·cm⁻²·h⁻¹;盐酸小檗碱拟合曲线为 $Q = 49.997t - 29.724$ ($r = 0.9948$),透皮速率常数 K 为 49.50 μg·cm⁻²·h⁻¹。以指标成分的单位面积平均累积透过量 Q 对时间 t 作图,绘制透皮曲线(图 2)。经计算,6 h 平均累积透过率为黄芩苷 19.51%,盐酸小檗碱 7.17%。

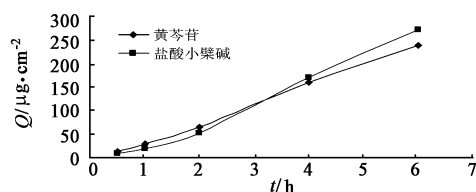


图 2 三黄喷雾剂体外透皮曲线

2.5 皮肤药物滞留量考察^[5] 6 h 体外透皮试验取样完成后,立刻清除扩散池中药物,用水将扩散池

中药物和皮肤表面药物残渣冲洗干净,重新加入新鲜的接收液(同透皮试验接受液),放入透皮扩散试验仪中进行透皮试验,于设定的时间点 2,3,4 h 将接受液全部取出,同时立即补加同体积的新鲜接受液,将所得接收液过 0.45 μm 微孔滤膜,采用 HPLC 进行含量测定,计算清除药物后皮肤药物滞留量和滞留时间。

指标成分的皮肤药物滞留量数值上等于清除药物后继续透皮所得的累积透过量 Q ,皮肤清除药物后的黄芩苷各时间点的透过量 Q 分别为 29.60, 2.31, 0.00 μg;盐酸小檗碱透过量 Q 分别为 51.07, 1.80, 0.00 μg。

3 讨论

由试验结果可知,黄芩苷、盐酸小檗碱的体外经皮渗透行为均符合零级方程,本制剂为液体制剂,不存在药物从基质中释放出来的过程,说明喷雾剂的体外经皮吸收过程中,皮肤障碍仍是最主要影响因素,决定着药物的经皮渗透规律,喷雾剂溶媒也起到一定的促进经皮吸收作用。黄芩苷的皮肤滞留时间为 4 h,皮肤滞留量为 31.91 μg,占黄芩苷 6 h 累积透过量的 5.57%;盐酸小檗碱的皮肤滞留时间为 4 h,皮肤滞留量为 52.87 μg,占盐酸小檗碱 6 h 累积透过量的 8.12%。

[参考文献]

- [1] 夏荃,李灿明. HPLC 测定黄柏生品与不同炮制品中 3 种生物碱的含量[J]. 中成药,2008,30(7):1018.
- [2] 孙光文,胡华明,杨先哲. HPLC 测定黄连膏中小檗碱的含量[J]. 中成药,2004,26(10):附 25.
- [3] 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.
- [4] 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):970.
- [5] 刘洪卓,王淑芳,王永军,等. 环孢素 A 双连续型微乳在大鼠皮肤中的药物滞留量考察[J]. 沈阳药科大学学报,2007,24(6):333.

[责任编辑 仝燕]