

· 药剂与炮制 ·

吴茱萸水包油微乳巴布剂的体外透皮吸收特性

张广唱, 郭殷锐, 武哲丽, 王剑*

(广州中医药大学基础医学院, 广州 510006)

[摘要] 目的:考察水包油微乳巴布剂与常规巴布剂对吴茱萸脂溶性成分体外释放性能的差异,为巴布剂制备工艺的改进提供参考。方法:按吴茱萸提取物-肉豆蔻酸异丙酯-丙二醇-聚山梨酯80-氢化蓖麻油-水(0.3:0.6:3.6:3.6:18)制备水包油微乳,将微乳添加至巴布剂基质制成水包油微乳巴布剂。采用体外扩散池法测定巴布剂中吴茱萸碱和吴茱萸次碱的体外透皮累积渗透量。结果:吴茱萸水包油微乳巴布剂中的吴茱萸碱、吴茱萸次碱24 h单位面积累积渗透量分别为常规巴布剂的1.86,1.40倍。结论:采用微乳工艺制备的巴布剂中吴茱萸脂溶性成分的释放性能明显优于传统方法制备的巴布剂,适合中药水难溶性成分巴布剂的制备。

[关键词] 水包油微乳;巴布剂;累积渗透量;吴茱萸碱;吴茱萸次碱;吴茱萸

[中图分类号] R283.6;R284.1;R284.2;R917 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)17-0001-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2015170001

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150713.1509.018.html>

[网络出版时间] 2015-07-13 15:09

In Vitro Transdermal Effect of Euodiae Fructus Oil-in-water Microemulsion Cataplasm

ZHANG Guang-chang, GUO Yin-rui, WU Zhe-li, WANG Jian* (School of Basic Medical, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To study *in vitro* release difference of oil-in-water microemulsion cataplasm and conventional cataplasm to liposoluble components from Euodiae Fructus. **Method:** According to ratio of Euodiae Fructus extract-isopropyl myristate-propylene glycol-ploysorbae 80-hydrogenated castor oil-water (0.3:0.6:3.6:3.6:18) for preparing oil-in-water microemulsion, then microemulsion was added to matrix for preparing microemulsion cataplasm. *In vitro* diffusion method was adopted to determine *in vitro* cumulative permeation quantity of evodiamine and rutaecarpine in cataplasm. **Result:** Cumulative permeation quantity per unit area at 24 h of evodiamine and rutaecarpine in Euodiae Fructus oil-in-water microemulsion cataplasm were 1.86, 1.40 times to conventional cataplasm, respectively. **Conclusion:** Release performance of liposoluble components from Euodiae Fructus in microemulsion cataplasm is better than those in conventional cataplasm, which is suitable for preparation of water-insoluble ingredients cataplasm.

[Key words] oil-in-water microemulsion; cataplasm; cumulative permeation quantity; evodiamine; rutaecarpine; Euodiae Fructus

吴茱萸功效散寒止痛、降逆止呕、助阳止泻,临床常用于治疗厥阴头痛、寒湿脚气、经行腹痛等,具有保护心脏、抗心律失常、抗炎镇痛等药理作用^[1]。其主要有效成分为吴茱萸碱和吴茱萸次碱,二者具有良好的强心、降压、抗炎、镇痛功效^[2-4]。微乳亦

称纳米乳,粒径10~100 nm,是由水、油、表面活性剂和助表面活性剂组成的一种流动、透明、热力学稳定、各向同性的液体,可增加难溶性药物的溶解度、延长作用时间,口服或外用均可提高药物生物利用度^[5-6]。巴布剂系指将药物加入水溶性高分子化合

[收稿日期] 20150125(006)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81173150)

[第一作者] 张广唱,在读硕士,从事中医舌、脉、证与方药研究,Tel:020-39358637,E-mail:772390670@qq.com

[通讯作者] *王剑,教授,硕士生导师,从事中医药延缓衰老研究,Tel:020-39358637,E-mail:zswj@gzucm.edu.cn

物或亲水性物质基质中所制成的贴膏剂。相对于其他外用贴膏,巴布剂具有载药量大、透气性和贴敷性好、刺激性小等优点^[7]。微乳巴布剂是将中药提取物制备成水包油微乳后与水溶性高分子基质混匀后涂于无纺布上制成的外用经皮给药制剂,可提高脂溶性成分的透过率。张晓伟等^[8]将十一酸睾酮制成微乳巴布剂,利用体外扩散池法测定了巴布剂中十一酸睾酮的累积渗透量,发现微乳巴布剂 24 h 单位面积累积渗透量为常规巴布剂的 2.6 倍。由于吴茱萸中有效成分吴茱萸碱和吴茱萸次碱为脂溶性成分,难溶于水,不容易通过水溶性基质接触皮肤,故本实验将吴茱萸提取物制成水包油微乳,将含药微乳与巴布剂结合,探讨水包油微乳巴布剂对脂溶性成分透过率的影响。

1 材料

YB-P6 型智能透皮仪(天津药典标准仪器厂),AUI220 型电子分析天平(广州湘仪机电设备有限公司),LC-20A 型高效液相色谱仪(日本岛津),FY-6032 型初粘性测试仪(深圳市方源仪器有限公司),WN801 型激光粒度分析仪(济南微纳仪器有限公司)。

冰片、肉豆蔻酸异丙酯(IPM)(阿拉丁试剂上海有限公司),明胶、卡波姆、酒石酸、甘油、聚山梨酯 80(tween-80)和氢化蓖麻油(CO40)(天津市大茂化学试剂厂),聚丙烯酸钠(NP800,天津市福晨化学试剂厂),甘羟铝(天津市富于精细化工有限公司),吴茱萸(广州南北行中药饮片有限公司,批号 20140503G322,经广州中医药大学王剑教授鉴定为芸香科植物吴茱萸 *Euodia rutaecarpa* 的干燥近成熟果实),吴茱萸碱、吴茱萸次碱(成都曼斯特生物科技有限公司,批号分别为 MUST-12031010, MUST-10091505),D101 型大孔树脂(天津光复精细化工研究所),水为超纯水,乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

SPF 级雌性 Balb/c 裸鼠 10 只,体重 10 ~ 13 g,购自广州中医药大学实验动物中心,合格证号 SCXK(粤)2013-0034。

2 方法与结果

2.1 水包油微乳的制备

2.1.1 吴茱萸有效部位的提取与分离^[9] 将吴茱萸 4.5 kg 置烘箱干燥 24 h,置于循环水反应釜中,加入 10 倍量 70% 乙醇于 80 °C 加热回流 3 次,每次 2 h,提取液合并,离心(3 500 r·min⁻¹, 10 min),离心液减压浓缩至含生药量 1 g·mL⁻¹。浓缩液经

D101 型大孔树脂纯化,加水冲洗到 Molisch 反应为阴性,收集 70% 乙醇洗脱液,浓缩至流浸膏状。浸膏经乙酸乙酯萃取 3 次,每次 20 mL,乙酸乙酯萃取部位挥去有机溶剂,即得吴茱萸提取物。

2.1.2 水包油微乳制备 称量吴茱萸提取物 0.3 g,加入 IPM 0.6 g,水浴超声充分搅拌,冷却至室温,加入 tween-80,CO40 和丙二醇各 3.6 g,混匀,边搅拌边缓慢加入水 18 g,得黄绿色透明液体,离心(2 000 r·min⁻¹, 10 min)不分层,粒径 50.57 nm,染色法^[10]鉴定蓝色快于红色,即得吴茱萸水包油微乳。

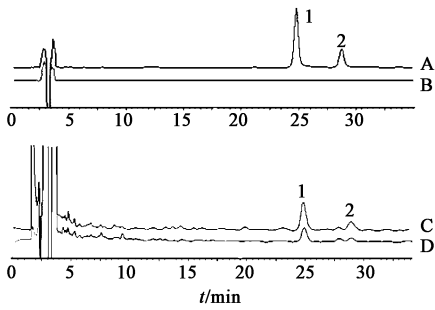
2.2 巴布剂的制备

2.2.1 水包油微乳巴布剂 将卡波姆 1 g 加水溶解至 100 mL,充分搅拌,放置 24 h 使其完全溶胀成 1% 卡波姆凝胶,备用。称取甘油 13 g 至烧杯中,加入 NP-800 2 g,搅拌均匀,加入甘羟铝(用水 1 g 溶解)0.04 g,搅拌 1 min,作为 A 相。另取一烧杯,加入水 18 g 和明胶 4.5 g,置于 80 °C 水浴中溶解,充分溶解后加入酒石酸 0.05 g,作为 B 相。取制备好的微乳 20 g,加入卡波姆(三乙醇胺调至中性)6 g,两者混合均匀作为 C 相。将 B 相加入 A 相中,搅拌 5 min 至均匀。将 C 相加入混合均匀的 A 相中搅拌 10 min,至膏体均匀无结块。加入促渗剂冰片 1.5 g(加无水乙醇 1 mL 溶解),搅拌 5 min,促渗剂分布均匀即可涂布成 10 cm × 10 cm 大小,背面朝上放置 1 d 晾干成型。制备的微乳巴布剂膏体光洁、细腻,为淡黄色透明状,且易涂布,黏度适中,质地柔软,保湿性好,无脱膏现象。

2.2.2 常规巴布剂 A 相的制备同 2.2.1 项,B 相加水 38 g 和明胶 4.5 g,水浴溶解后加入酒石酸 0.05 g 搅拌溶解,C 相加入等药量吴茱萸提取物,加乙醇 3 g 溶解,加入卡波姆(三乙醇胺调至中性)6 g。将 A 相与 B 混合均匀,加入 C 相搅拌约 10 min 至均匀,加入冰片(加无水乙醇 1 mL 溶解)1.5 g,搅拌均匀,涂成 10 cm × 10 cm 大小晾干成型。

2.3 色谱条件 Inertsil ODS-SP 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-水-四氢呋喃-冰乙酸(41:59:1:0.2),流速 1 mL·min⁻¹,柱温 30 °C,进样量 10 μL,检测波长 225 nm,见图 1。

2.4 对照品溶液的制备 精密称取吴茱萸碱 1.25 mg 和吴茱萸次碱 0.625 mg,分别加 30% 乙醇生理盐水溶液定容至 100 mL,得各成分的对照品储备液。精密吸取各对照品储备液 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mL,分别置于 100 mL 量瓶中,加 30% 乙醇生理盐水溶液稀释至刻度,摇匀,经 0.45 μm 微孔



A. 对照品; B. 空白样品; C. 供试品; D. 常规巴布剂样品; 1. 吴茱萸碱; 2. 吴茱萸次碱

图 1 吴茱萸水包油微乳巴布剂 24 h 样品接受液 HPLC
Fig. 1 HPLC of accepting liquid at 24 h of Euodiae Fructus oil-in-water microemulsion cataplasm

滤膜滤过, 得系列混合对照品溶液。

2.5 供试品溶液的制备 精密吸取接受液 1 mL, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.6 方法学考察

2.6.1 标准曲线绘制 取系列混合对照品溶液, 按 2.3 项下色谱条件测定, 以峰面积为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 得吴茱萸碱、吴茱萸次碱回归方程分别为 $Y = 25.85X + 1.707 \times 10^3$ ($r = 0.9998$), $Y = 18.78X - 5352$ ($r = 0.9997$), 线性范围依次为 12.5 ~ 62.5, 6.25 ~ 31.25 μg·L⁻¹。

2.6.2 精密度试验 取同一吴茱萸碱和吴茱萸次碱混合对照品溶液连续进样 6 次, 按 2.3 项下色谱条件测定, 计算 RSD 分别为 0.2%, 0.4%。

2.6.3 稳定性试验 取同一微乳巴布剂透过液供试品溶液, 分别于制备后 0, 3, 6, 9, 12 h 按 2.3 项下色谱条件测定, 计算吴茱萸碱和吴茱萸次碱峰面积的 RSD 分别为 1.0% 和 0.9%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.6.4 重复性试验 取同一微乳巴布剂透过液供试品溶液 6 份, 按 2.3 项下色谱条件测定, 计算吴茱萸碱和吴茱萸次碱峰面积的 RSD 分别为 0.4% 和 0.6%。

2.6.5 加样回收率试验 精密吸取已测定吴茱萸碱和吴茱萸次碱含量的微乳巴布剂供试液 6 份, 每份 1 mL, 分别准确加入混合对照品溶液(吴茱萸碱、吴茱萸次碱质量浓度分别为 12.5, 6.25 μg·L⁻¹) 1 mL, 重复 3 次, 按 2.3 项下色谱条件测定, 计算吴茱萸碱和吴茱萸次碱的平均加样回收率分别为 98.2% 和 97.6%, RSD 分别为 0.6% 和 0.7%。

2.7 体外透皮吸收试验

2.7.1 离体皮肤的制备 取健康裸鼠 10 只, 体重

10 ~ 13 g, 颈椎脱臼处死, 用剪刀将腹部皮肤剪下并用刀片轻轻刮下筋膜, 生理盐水漂洗干净备用。

2.7.2 离体皮肤接收液的选择 理论要求接收液必须尽量和小鼠生理体液条件相近, 生理盐水可作为接收液, 但吴茱萸碱和吴茱萸次碱不溶于生理盐水, 为保证透过成分能更好地溶解, 使用 30% 乙醇生理盐水。

2.7.3 样品的收集及测定 微乳巴布剂和常规巴布剂各 5 组, 将处理好的裸鼠皮肤固定于扩散池上, 扩散池体积 10 mL, 有效渗透面积 1.13 cm², 使皮外表层面朝上, 并贴上直径 1.2 cm 的圆形巴布剂贴。接受室加满扩散介质, 置于 37 °C 恒温水浴中, 磁力搅拌子以 200 r·min⁻¹ 的速度搅拌, 分别于 2, 4, 8, 12, 24 h 吸取接受液 1 mL, 同时补充等温 30% 乙醇生理盐水, 接收液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 精密吸取 20 μL 按 2.3 项下色谱条件测定, 计算单位面积累积渗透量(Q_n), 见表 1。

$$Q_n = (C_n \cdot V + \sum_{i=1}^{n-1} C_i \cdot V_i) / A$$

式中 C_n 为第 n 个取样点测得的药物质量浓度, V 为接受池体积, V_i 为取样体积, A 为供药池池口面积, C_i 为第 i ($i \leq n-1$) 个取样点测得的药物质量浓度。计算微乳巴布剂和常规巴布剂中吴茱萸碱、吴茱萸次碱 2, 4, 8, 12, 24 h 的 Q_n 。以 Q_n 对时间 t 作图, 曲线中直线部分进行线性回归, 求出直线斜率 d_0/d_t , 即稳态渗透速率(J_s), 结果见表 2。甘羟铝用量对微乳巴布剂中吴茱萸碱和吴茱萸次碱 Q_n 的影响见表 3。

表 1 吴茱萸水包油微乳巴布剂和常规巴布剂中吴茱萸碱和吴茱萸次碱的单位面积累积渗透量($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 1 Cumulative permeation quantity per unit area of evodiamine and rutaecarpine in Euodiae Fructus oil-in-water microemulsion cataplasm and conventional cataplasm ($\bar{x} \pm s, n=5$)

巴布剂	t/h	$Q_n / \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$	
		吴茱萸碱	吴茱萸次碱
微乳	2	0.56 ± 0.12	0.16 ± 0.01
	4	0.97 ± 0.13	0.24 ± 0.02
	8	1.78 ± 0.21	0.41 ± 0.02
	12	2.80 ± 0.29	0.73 ± 0.05
	24	4.75 ± 0.53	1.22 ± 0.05
常规	2	0.48 ± 0.09	0.13 ± 0.01
	4	0.87 ± 0.14	0.18 ± 0.01
	8	1.18 ± 0.07	0.33 ± 0.02
	12	1.37 ± 0.07	0.53 ± 0.04
	24	2.55 ± 0.18	0.87 ± 0.05

表 2 吴茱萸水包油微乳巴布剂和常规巴布剂的透皮吸收比较

Table 2 Comparison of peridermal absorption of evodiamine and rutaecarpine in *Euodiae Fructus* oil-in-water microemulsion cataplasm and conventional cataplasm

成分	体系	回归方程	<i>r</i>	$Q_{24\text{h}}/\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$	$J_s/\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$
吴茱萸碱	微乳巴布剂	$Q_n = 0.1916t + 0.2562$	0.992	4.75 ± 0.53	0.1916
	常规巴布剂	$Q_n = 0.0889t + 0.4012$	0.985	2.55 ± 0.18	0.0889
吴茱萸次碱	微乳巴布剂	$Q_n = 0.0493t + 0.0586$	0.988	1.22 ± 0.05	0.0493
	常规巴布剂	$Q_n = 0.0344t + 0.0639$	0.990	0.87 ± 0.05	0.0344

表 3 甘羟铝用量对微乳巴布剂中吴茱萸碱和吴茱萸次碱累积渗透量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of dihydroxyaluminium aminoacetate dosage on cumulative permeation quantity at 24 h of evodiamine and rutaecarpine in *Euodiae Fructus* oil-in-water microemulsion cataplasm ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

甘羟铝/%	$Q_{24\text{h}}/\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$	
	吴茱萸碱	吴茱萸次碱
0.1	5.22 ± 0.36	1.57 ± 0.07
0.2	3.89 ± 0.45	0.98 ± 0.05
0.3	2.53 ± 0.26	0.61 ± 0.04
0.4	1.71 ± 0.32	0.49 ± 0.02
0.5	1.38 ± 0.29	0.37 ± 0.02

3 讨论

吴茱萸水包油微乳巴布剂中吴茱萸碱、吴茱萸次碱的 $Q_{24\text{h}}$ 分别为常规巴布剂的 1.86, 1.40 倍, 说明水包油微乳巴布剂可提高中药脂溶性成分的透过率。吴茱萸碱和吴茱萸次碱极性较小, 均为亲脂性成分, 难溶于水, 制成水包油微乳后不仅可以增加两者的溶解度, 还可使其更加容易通过亲水性巴布剂基质, 因此比常规巴布剂透过率高。

由表 3 可知, 交联剂用量与中药有效成分的释放量成反比。因为巴布剂基质加入了交联剂甘羟铝, 与巴布剂基本骨架 NP-800 形成了网状结构, 可以增加巴布剂的内聚力, 防止膏体残留, 但这种网状结构会阻碍药物成分的释放, 故透过率较低。在体外经皮渗透试验中, 接收液只是一种模拟人体环境, 而对于脂溶性较强的化合物, 可采用 20% 乙醇代替水制备生理盐水作为接收液, 以营造更好的接收环境, 还可加入适量的表面活性剂以增加药物在接受液中的溶解度。综合考虑溶解度和乙醇的防腐作用, 选择 30% 乙醇生理盐水作为接收液。

目前中药巴布剂的透皮吸收率普遍较低, 因为中药有效成分主要为脂溶性成分, 不易透过水溶性巴布剂基质而接触皮肤。将传统巴布剂开发为水包油微乳巴布剂, 可显著增加有效物质的经皮渗透量, 为巴布剂的开发提供参考。现在国际上对微乳作为药物载体的应用前景的态度十分乐观, 而中药有效成分大多是脂溶性药物, 特别是巴布剂制备中, 基质

作为亲水性物质限制了巴布剂的制备和推广, 因此开发新的微乳制备工艺并将微乳工艺更好地应用在巴布剂制备具有良好的应用前景。

[参考文献]

- [1] 龚慕辛, 王智民, 张启伟, 等. 吴茱萸有效成分的药理研究进展[J]. 中药新药与临床药理, 2009, 20(2): 183-184.
- [2] Kobayashi Y, Hoshikume K, Nakano Y, et al. The positive inotropic and chronotropic effects of evodiamine and rutaecarpine, indoloquinazoline alkaloids isolated from the fruits of *Evodia rutaecarpa*, on the guinea-pig isolated right atria; possible involvement of vanilloid receptors[J]. *Planta Med*, 2001, 67(3): 2442-2481.
- [3] Wang G J, Wu X C, Chen C F, et al. Vasorelaxing action of rutaecarpine effects of rutaecarpine on calcium channel activities in vascular endothelial and smooth muscle cells[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999, 289(3): 1237-1244.
- [4] 兰州军区 84806 部队医院, 兰州大学生物学系. 吴茱萸对高血压和实验性高血压的影响[J]. 新医学, 1976, 7(11): 517-520.
- [5] Pouton C W. Ingenta connect formulation of self-emulsifying drug delivery systems[J]. *Adv Drug Deliver Rev*, 1997, 25(1): 47-58.
- [6] Kawakami K, Yoshikawa T, Moroto Y, et al. Microemulsion formulation for enhanced absorption of poorly soluble drugs. II. *In vivo* study[J]. *J Control Release*, 2002, 81(1/2): 75-82.
- [7] 李晋, 胡晋红, 朱全刚, 等. 酮洛芬巴布剂的研制及体外透皮研究[J]. 药学服务与研究, 2006, 6(5): 338-341.
- [8] 张晓伟, 杨丹, 刘丹华, 等. 十一酸睾酮外用微乳巴布剂的质量控制和体外透皮效果[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(2): 22-24.
- [9] Wang C, Wang M W, Tashiro S, et al. Evodiamine induced human melanoma A375-S2 cell death partially through interleukin 1 mediated pathway[J]. *Biol Pharm Bull*, 2005, 28(6): 984-989.
- [10] Ho H O, Hsiao C C, Sheu M T. Preparation of microemulsions using polyglycerol fatty acid esters as surfactant for the delivery of protein drugs[J]. *J Pharm Sci*, 1996, 85(2): 138-143.

[责任编辑 刘德文]