

付罐疗法对延胡索乙素贴剂透皮吸收的影响

徐剑*, 张永萍, 谢伟杰, 赵占利
(贵阳中医学院药学院, 贵阳 550002)

[摘要] 目的: 考察付罐疗法对延胡索乙素贴剂透皮吸收的影响。方法: 以 AUC_{0-t} , T_{max} , C_{max} 的综合评分为评价指标, 通过正交试验考察罐法、压力、罐疗时间 3 个因素对延胡索乙素贴剂透皮吸收的影响。采用 UPLC-MS/MS 测定延胡索乙素贴剂的血药浓度变化, 流动相乙腈-水 (70:30), 流速 $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 自动进样器温度 $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 柱温 $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 进样量 $3 \text{ } \mu\text{L}$, 电喷雾电离源 (ESI+), 质荷比 (m/z) 356.27, 毛细管电压 3.38 kV, 锥孔电压 38 V, 离子源温度 $150 \text{ }^\circ\text{C}$, 脱溶剂气温度 $350 \text{ }^\circ\text{C}$, 锥孔反吹气流量 $50 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$, 脱溶剂气流量 $650 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$, 碰撞气流量 $0.16 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。结果: 最佳付罐疗法条件为刮罐, 压力 -0.02 MPa , 时间 15 min。结论: 付罐能显著提高延胡索乙素贴剂的透皮吸收, 付罐疗法可作为一种新的物理促渗方法。

[关键词] 付罐疗法; 超高压液联用; 正交试验; 延胡索乙素贴剂

[中图分类号] R283.6; R945; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)24-0043-04

[doi] 10.11653/syfy2013240043

Effect of Fu's Cupping Therapy on Transdermal Absorption of Tetrahydropalmatine Patches

XU Jian*, ZHANG Yong-ping, XIE Wei-jie, ZHAO Zhan-li

(School of Pharmacy, Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate effect of Fu's cupping therapy on transdermal absorption of tetrahydropalmatine patches. **Method:** With composite score of AUC_{0-t} , T_{max} and C_{max} as index, orthogonal design was adopted to optimize technology parameters of Fu's cupping therapy by taking tank methods, pressure and time as factors. UPLC-MS/MS was used to determine plasma concentration of tetrahydropalmatine in tetrahydropalmatine patches, mobile phase of acetonitrile-water (70:30), flow rate $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, autosampler temperature $30 \text{ }^\circ\text{C}$, column temperature $30 \text{ }^\circ\text{C}$, injection volume $3 \text{ } \mu\text{L}$, electrospray ionization (ESI+), m/z 356.27, capillary voltage 3.38 kV, cone voltage 38 V, ion source temperature $150 \text{ }^\circ\text{C}$, desolvation temperature $350 \text{ }^\circ\text{C}$, anti-cone gas flow rate $50 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$, desolvation gas flow rate $650 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$, collision gas flow rate $0.16 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. **Result:** The best conditions of Fu's cupping therapy was: scraping tank, low pressure (-0.02 MPa) and time of 15 min. **Conclusion:** Fu's cupping therapy could significantly improve transdermal absorption of tetrahydropalmatine patches, which was a new physical method for promoting transdermal absorption.

[Key words] Fu's cupping therapy; UPLC-MS/MS; orthogonal design; tetrahydropalmatine patches

延胡索乙素是从延胡索中提取的生物碱类成分, 具有镇痛作用。通过对延胡索乙素贴剂的体外

透皮研究表明, 该制剂具有一定透皮吸收能力^[1], 但由于皮肤角质层的作用, 使多数药物达不到理想的渗透速率和渗透量。付罐疗法是在中国传统拔罐疗法基础上, 经过大量临床试验研究和基础研究后发明而得, 具有调正全身、通治百病之功。本实验结合药代动力学研究, 选用多指标综合评价法, 通过正交试验优选延胡索乙素贴剂的付罐疗法工艺参数^[2-5], 为中医传统疗法的临床推广提供参考。

[收稿日期] 20130527(006)

[基金项目] 贵州省科技厅基金项目(黔科合中药字[2011] LKZ7048号)

[通讯作者] * 徐剑, 硕士, 副教授, 从事中药制剂研究, Tel: 0851-5652056, E-mail: twt8489@126.com

1 材料

UPLC Xevo TQ 型超高液质仪(美国 Waters 公司),TGL-16C 型台式离心机(上海安亭科学仪器厂制造),MTN-2800D 型氮吹浓缩装置(天津奥特赛思斯仪器有限公司),MS2 shaker 型涡旋混合机(德国 IKA 公司),付罐(自制),Z60 型真空表(无锡市宜川仪表厂)。

延胡索乙素对照品(中国食品药品检定研究院,批号 1107-20100706),延胡索乙素原料(陕西锦泰生物工程有限公司),延胡索乙素贴剂(贵阳中医学院制剂实验室提供,规格 5 cm × 5 cm,每贴含延胡索乙素 45 mg),肝素钠注射液(天津生物化学制药有限公司,批号 201106),乙腈为色谱纯,水为屈臣氏蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

新西兰大白兔 24 只,体重 2.0 ~ 2.5 kg,由贵阳医学院实验动物中心提供,许可证号 SCXK(黔)2002-0001。

2 方法与结果

2.1 罐疗方式^[6]

- 2.1.1 留罐 调定罐内压力,至规定时间去罐。
- 2.1.2 颤罐 将付罐施于穴位处,用压力调节阀不断调节罐内压力,至规定时间去罐。
- 2.1.3 刮罐 调定罐内压力,来回移动付罐,至规定时间去罐。

2.2 给药方案及血样处理^[7] 取新西兰种白兔 18 只,背部脱毛,给药前禁食 16 h。按试验设计分别进行罐疗,将延胡索乙素贴剂贴于背部,用胶布固定,于预定时间点(0.5,1.5,3,4,6,8,10,12,14,16,20,24 h)从耳缘静脉处用 5 mL 注射器(内浸润肝素钠)取血约 2 mL。向血样中加入浓氨水 20 μ L 进行碱化,离心 10 min(6 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$),精密吸取血浆 0.7 mL 于 10 mL 离心管中,用三氯甲烷萃取 3 次,每次 3 mL,涡旋混合 3 min,离心 15 min(4 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$),移取合并三氯甲烷层萃取液,于 35 $^{\circ}\text{C}$ 下氮气吹干,加乙腈 0.7 mL 复溶,涡旋混合 1 min,离心,经 0.2 μ L 微孔滤膜过滤,即得供试品溶液。

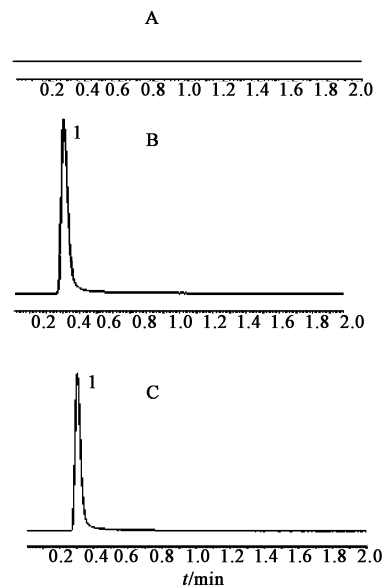
2.3 延胡索乙素的含量测定

2.3.1 色谱/质谱条件 ACQUITY UPLC Shield RP 18 色谱柱(2.1 mm × 50 mm,1.7 μ m),流动相乙腈-水(70:30),流速 0.3 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,自动进样器温度 30 $^{\circ}\text{C}$,柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,进样量 3 μ L,电喷雾电离源(ESI+),质荷比(m/z)356.27,毛细管电压 3.38 kV,锥孔电压 38 V,离子源温度 150 $^{\circ}\text{C}$,脱溶剂气温度 350 $^{\circ}\text{C}$,锥孔反吹气流量 50 $\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$,脱溶剂气流量

650 $\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$,碰撞气流量 0.16 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

2.3.2 标准曲线与检测限 精密称取延胡索乙素对照品适量,加入空白血浆 0.7 mL,混旋 3 min,按 2.2 项下血样处理方法操作,分别配制成 1.31,2.61,5.23,10.45,52.25,104.50,522.50,1 045.00,2 090.00 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 系列质量浓度的对照品溶液,按 2.3.1 项下色谱条件测定,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得标准曲线 $Y = 7.840 \times 10^3 X + 1.354 \times 10^4$ ($r = 0.9987$),线性范围 1.31 ~ 104.50 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $Y = 5.425 \times 10^3 X + 2.134 \times 10^5$ ($r = 0.9996$),线性范围 10.45 ~ 2 090.00 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,以保证定量的准确性。在信噪比 $S/N = 10$ 的条件下,最低定量限 0.50 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.3.3 专属性试验 分别将延胡索乙素对照品溶液、血浆样品、空白样品按 2.3.1 项下色谱条件进行分析,见图 1,结果表明空白血浆对血浆中延胡索乙素的测定无干扰。



A. 空白血浆;B. 空白血浆加延胡索乙素对照品;

C. 给药后血浆样品;1. 延胡索乙素

图 1 延胡索乙素贴剂的 MRM

2.3.4 精密度试验 取空白血浆 0.7 mL,精密加入延胡索乙素对照品适量,配制高、中、低 3 个质量浓度,按 2.2 项下血样处理方法操作,按 2.3.1 项下色谱条件连续进样 5 次,结果精密度的 RSD 分别为 4.2%,3.9%,5.5%,表明仪器精密度良好。

2.3.5 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别放置 0,2,4,8,12,16,24 h,按 2.3.1 项下色谱条件测定,计算 RSD 4.32%,表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.3.6 回收率试验 取 2.3.4 项下高、中、低 3 个质量浓度的溶液,按 2.2 项下血样处理方法操作 ($n=5$),按 2.3.1 项下色谱条件测定,结果回收率分别为 $(92 \pm 4.7)\%$, $(95 \pm 5.6)\%$, $(93 \pm 6.2)\%$ 。

2.4 正交试验优选 按 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验,以 AUC_{0-t} , T_{max} , C_{max} 的综合评分为评价指标,权重系数分别为 0.4, 0.3, 0.3, 考察罐法、压力、罐疗时间 3 个因素对延胡索乙素透皮吸收的影响,因素

水平见表 1, 试验安排及结果见表 2, 方差分析见表 3。

表 1 延胡索乙素贴剂的付罐疗法正交试验因素水平

水平	A 罐法	B 压力/MPa	C 时间/min
1	留罐	-0.02	5
2	颤罐	-0.04	10
3	刮罐	-0.05	15

表 2 延胡索乙素贴剂的付罐疗法正交试验安排

No.	A	B	C	D(误差)	$AUC_{0-t}/ng \cdot cm^{-2}$	T_{max}/h	$C_{max}/\mu g \cdot L^{-1}$	综合评分/%
1	1	1	1	1	1 127.65	4.68	150.32	23.56
2	1	2	2	2	1 130.43	3.23	212.00	31.64
3	1	3	3	3	2 509.54	2.43	423.32	50.83
4	2	1	2	3	2 902.46	5.32	177.54	30.85
5	2	2	3	1	1 354.65	3.41	311.65	34.51
6	2	3	1	2	1 424.77	3.11	358.76	38.06
7	3	1	3	2	8 679.23	3.65	1 028.32	87.92
8	3	2	1	3	4 458.45	3.43	345.76	49.70
9	3	3	2	1	3 907.76	2.18	709.43	68.71
K_1	106.03	142.32	111.32	126.78				
K_2	103.43	115.86	131.20	157.62				
K_3	206.33	157.60	173.26	131.38				
R	34.30	13.91	20.65	10.28				

表 3 综合评分方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	2 295.01	2	12.43	>0.05
B	297.32	2	1.61	>0.05
C	666.79	2	3.61	>0.05
D(误差)	184.58	2		

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19$ 。

采用 PK Solver 2.0 软件对试验数据进行处理, 结果表明各因素对付罐疗法的影响顺序为 $A > C > B$, 方差分析表明各因素均无显著性影响, 最佳组合为 $A_3B_3C_3$; 但在实际罐疗过程中, 由于压力过大, 会造成皮肤受损导致瘀血外渗, 反而影响药物的透皮吸收, 故确定最佳罐疗条件为 $A_3B_1C_3$, 即刮罐, 压力 -0.02, 时间 15 min。

2.5 验证试验 采用最优罐法和空白组分别各取 3 只白兔, 按 2.2 项下方法处理, 测定 24 h 内的血药浓度, 结果见图 2, 证明罐疗能够促进延胡索乙素贴剂的透皮吸收。

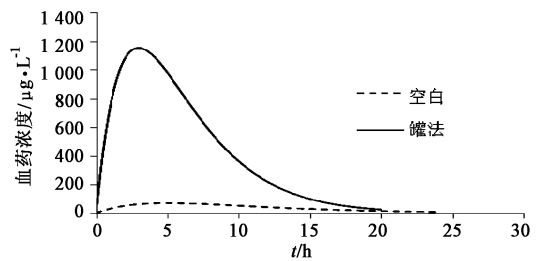


图 2 罐疗组、空白组对延胡索乙素贴剂透皮率的影响

3 讨论

由于罐疗目的在于增加药物的透过量、提高透皮效率, 故正交试验中选择 AUC_{0-t} , T_{max} 和 C_{max} 为测评指标, 以全面考察不同罐疗条件对透皮吸收的影响, 结果表明付罐疗法能提高药物透皮速率和透过量, 是传统医学与现代科学技术结合的一种新的物理促渗方法。各因素均无显著差异的原因可能是动物对延胡索乙素的透皮、吸收和代谢存在个体差异, 试验数量不足等因素引起的误差; 由于罐疗压力过大, 处理时间过长会造成皮肤受损和瘀血外渗, 反而影响药物的透皮吸收。

半仿生法提取鸡骨草中总三萜酸的工艺优选

赖红芳*, 邓秋芬

(河池学院化学与生命科学系, 广西 宜州 546300)

[摘要] 目的: 优选鸡骨草中总三萜酸的半仿生法提取工艺。方法: 采用 UV 测定总三萜酸含量。以总三萜酸提取率为指标, 在单因素试验基础上, 通过正交试验考察提取温度、酸提取时间、碱提取时间、料液比对鸡骨草总三萜酸提取工艺的影响, 并与传统水提法、超声波法进行比较。结果: 最佳提取工艺条件为料液比 1:25, 恒温水浴温度 100 ℃, 酸 (pH 2) 提取时间 55 min, 碱 (pH 8) 提取时间 25 min; 总三萜酸提取率达 0.123%, 高于传统水提法 (0.089%), 但低于超声波法 (0.304%)。结论: 采用半仿生法提取鸡骨草中总三萜酸的工艺具有绿色环保、成本低等优点。

[关键词] 总三萜酸; 鸡骨草; 半仿生法; 提取工艺; 正交试验; 单因素试验

[中图分类号] R283.6; R284.2; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)24-0046-03

[doi] 10.11653/syfy2013240046

Optimization of Extraction Technology for Total Triterpene Acids from Abri Herba by Semi-Bionic Method

LAI Hong-fang*, DENG Qiu-fen

(Department of Chemistry and Life Sciences, Hechi University, Yizhou 546300, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize semi-bionic extraction technology of total triterpene acids from Abri Herba. **Method:** The content of total triterpene acids was determined by UV. With yield of total triterpene acids as index, based on single factor tests, orthogonal test was adopted to optimize semi-bionic extraction technology of total triterpene acids by taking extraction temperature, ratio of solid-liquid, acid and alkali extraction time as factors, then compared with water extraction method and lower than ultrasonic method. **Result:** Optimum semi-bionic extraction technology was as following: extraction temperature at 100 ℃, solid-liquid ratio of 1:15, acid (pH 2) extraction time 55 min, alkali (pH 8) extraction time 25 min; Under these conditions, yield of total triterpene acids was 0.123%, which was higher than water extraction method (0.089%) and lower than

[收稿日期] 20130501(004)

[基金项目] 广西教育厅科研立项项目(201106LX584)

[通讯作者] * 赖红芳, 硕士, 副教授, 从事天然产物提取及化学成分分析研究, Tel:0778-3141892, E-mail: laihongfang263@163.com

[参考文献]

- [1] 徐剑, 张智豪, 张永萍. 延胡索乙素贴剂处方研究[J]. 中南药学, 2008, 6(2): 148.
- [2] 梁俊, 徐璐, 付文心. NSEM 对付罐作用下家兔表皮形态的观察[J]. 贵州大学学报: 自然科学版, 1998, 15(2): 130.
- [3] 张永萍, 林亚平, 邱德文, 等. 罐疗提高盐酸维拉帕米透皮吸收的研究[J]. 中国药学杂志, 2003, 38(12): 930.

- [4] 付文心. 付罐疗法[M]. 北京: 中医古籍出版社, 2000: 10.
- [5] 杨芳芳, 张永萍. 促进药物透皮吸收物理方法的应用概述[J]. 贵阳中医学院学报, 2006, 28(1): 41.
- [6] 刘文, 邱德文, 张永萍, 等. 透皮吸收制剂研究进展[J]. 贵阳中医学院学报, 2001, 23(2): 45.
- [7] 卞冰瑶, 张永萍. 罐疗促进川芎嗪凝胶剂透皮吸收后血液中盐酸川芎嗪的富集研究[J]. 微量元素与健康研究, 2011, 28(5): 6.

[责任编辑 全燕]