

· 工艺与制剂 ·

香莲软膏剂体外透皮试验

袁小红^{1,2},袁雪妹³,范瑞强^{2*}

(1. 广东省中医药科学院,广州 510006; 2. 广州中医药大学第二临床医学院,广州 510120;
3. 广州中医药大学,广州 510006)

[摘要] 目的:优选香莲软膏剂体外透皮试验条件。方法:使用药物透皮试验仪进行试验,采用紫外分光光度法测定不同时间、接收液、取样量及鼠皮试验时总生物碱的含量,计算其累积透过率,优选香莲软膏剂的体外透皮试验条件。结果:优选的香莲软膏剂体外透皮试验条件为香莲取样量 0.1 g,以 30% 乙醇为接收液,有角质层的大鼠鼠皮为介质;采用 UV 测定总生物碱含量,波长 345 nm。结论:该优选试验方法简便可行、稳定。

[关键词] 香莲软膏剂;经皮渗透;紫外分光光度法;总生物碱

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)11-0010-03

In vitro Transdermal Test of Xianglian Ointment

YUAN Xiao-hong^{1,2}, YUAN Xue-mei³, FAN Rui-qiang^{2*}

(1. Guangdong Provincial Academy of Chinese Medical Sciences, Guangzhou 510006, China;
2. Second College of Clinical Medicine of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China; 3. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] Objective: To optimize *in vitro* transdermal test conditions of Xianglian ointment. Method: Drug percutaneous permeability tester was used, the content of total alkaloids in different time, accepting liquid, sampling volume and mouse skin test were determined by UV-spectrophotometry. The cumulative transmittance was calculated to optimize *in vitro* transdermal test conditions of Xianglian ointment. Result: Optimized *in vitro* transdermal test conditions were: sampling volume of Xianglian ointment was about 0.1 g, 30% ethanol as receiving liquid, rat skin with cutin layer as medium; UV spectrophotometry was used to determine the content of total alkaloid with wavelength 345 nm. Conclusion: This optimized test method was simple, feasible and stable.

[Key words] Xianglian ointment; percutaneous penetration; UV spectrophotometry; total alkaloids

香莲系列制剂是广东省中医院的院内制剂,主要由黄连、丁香等中药组成,具有清热燥湿、杀虫止痒的功效,临床上用于治疗各种皮肤病和阴道炎等疾病^[1]。香莲软膏剂属于经皮吸收制剂,使用效果关键在于透皮。本实验通过体外渗透试验比较不同条件下香莲软膏剂中总生物碱的透皮效果,优选出较佳的体外透皮试验条件,以期为其进一步研究提供依据。

1 材料

RYJ-6A 型药物透皮扩散仪(上海黄海药检仪器有限公司),BS224S 型 1/万电子天平(德国赛多利斯),UV-2450 型紫外分光光度计(日本岛津公司),B600A 型医用离心机(安新县白洋离心机厂)。

盐酸小檗碱对照品(中国药品生物制品检定所,批号 0713-9906),香莲软膏剂由广东省中医院中药制剂实验室提供,实验所用试剂均为分析纯。

[收稿日期] 20111231(009)

[基金项目] 国家“十一五”科技支撑计划(2008BAI53B04)

[第一作者] 袁小红,硕士,研究员,从事中药新剂型及新技术研究, Tel: 020-39318571, E-mail: mier-yuan@163.com

[通讯作者] *范瑞强,博士,主任中医师,从事中医皮肤病的临床、教学和科研, Tel: 020-81887233, E-mail: fanrq54@126.com

2 方法与结果

2.1 总生物碱含量测定

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取盐酸小檗碱对照品 10.2 mg,置 100 mL 量瓶中,加无水乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得 102 mg·L⁻¹ 盐酸小檗碱对照品储备液。

2.1.2 供试品溶液的制备 精密称取香莲软膏 0.5 g,置小烧杯中,加无水乙醇使之分散,转移至 25 mL 量瓶中,加无水乙醇至刻度以下,超声数分钟至软膏完全分散在无水乙醇中,放冷至室温,加无水乙醇至刻度,摇匀。滤过,精密吸取续滤液 1 mL,置 10 mL 量瓶中,加无水乙醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.1.3 阴性样品溶液的制备 取空白软膏,按 2.1.2 供试品溶液的制备方法制备,得阴性样品溶液。

2.1.4 紫外吸收波长的确定 取盐酸小檗碱对照品储备液,阴性样品溶液,供试品溶液于 200 ~ 500 nm 波长扫描。盐酸小檗碱和样品溶液均有多个吸收峰,在 345 nm 波长处阴性样品溶液没有干扰,故本实验选择 345 nm 波长为香莲软膏中总生物碱的测定波长。

2.2 方法学考察

2.2.1 标准曲线的制备 分别精密吸取盐酸小檗碱储备液 0.5,1.0,2.0,3.0,4.0,5.0 mL,置 25 mL 量瓶中,加无水乙醇稀释至刻度,摇匀,即得到质量浓度分别为 2.04,4.08,8.16,12.24,16.32,20.4 mg·L⁻¹ 的盐酸小檗碱对照品溶液;精密吸取 2.04 mg·L⁻¹ 对照品溶液 0.1,0.3,0.5,0.7,1.0 mL 置 10 mL 量瓶中,加无水乙醇稀释至刻度。以无水乙醇为空白,采用紫外分光光度法在 345 nm 波长处测定吸光度。以对照品溶液质量浓度 C 为横坐标,以吸收度 A 为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $A = 0.060\ 29C + 0.034\ 47$ ($r = 0.999\ 9$),线性范围 0.020 4 ~ 20.40 mg·L⁻¹。

2.2.2 精密度试验 取 0.102 mg·L⁻¹ 盐酸小檗碱对照溶液,于 345 nm 波长处分别测定吸光度 6 次,结果 RSD 0.1%,说明仪器精密度良好。

2.2.3 稳定性试验 按 2.1.2 项下方法制备 1 份供试品溶液,分别于 0,1,2,4,8,24,48 h 时测定 A ,结果 RSD 1.8%,说明样品在 48 h 内稳定。

2.2.4 重复性试验 取同一批号的样品 6 份,按 2.1.2 项下方法平行配制供试品溶液 6 份,测定吸光度,结果香莲软膏中总生物碱量的平均值 2.220 3 mg·g⁻¹,RSD 0.7%。说明该方法重复性好。

2.2.5 加样回收率试验 精密称取香莲软膏样品 6 份,分别精密加入 102 mg·L⁻¹ 盐酸小檗碱对照液 10 mL,按 2.1.2 项下方法平行制备 6 份加样供试品溶液,分别测定其 A ,结果盐酸小檗碱平均回收率为 98.29%,RSD 1.0%。

2.3 体外透皮试验 采用 RYJ-6A 型药物透皮扩散仪进行实验。接收池体积为 6.5 mL,透皮扩散面积 2.28 cm²,接收液温度 (37 ± 1) °C,电磁搅拌速度 250 r·min⁻¹。将涂有香莲软膏的鼠皮覆盖在接收池上,用铁夹夹紧并固定;接收池内加满接收液 (6.5 mL),使鼠皮与接收液充分接触 (不能有气泡)。在 (37 ± 1) °C 下连续搅拌接收液。分别于 2,4,6,8,10,24 h 时取样,每次全部取完接收池内的接收液,并迅速补充等体积接收液。采用 UV 测定各样品溶液中总生物碱的含量,求算不同取样点的累积渗透量。累积渗透量 (M) 按式 (1) 计算。

$$M = C_{i-1} V_{i-1} + C_i V_i \tag{1}$$

其中 C_i 为第 i 个取样点测得的质量浓度, V_i 为第 i 个取样点样品定容后的体积。

2.4 溶出样品溶液的制备 将所取样品液置于蒸发皿中蒸干,加无水乙醇适量溶解残渣,完全转移至 5 mL 量瓶中,加适量无水乙醇定容,摇匀,离心 (2 500 r·min⁻¹) 10 min,取上清液作为待测的样品溶液。

2.5 透皮接收液的选择 按 2.3 项下方法,分别用 0.9% 生理盐水,0.1 mol·mL⁻¹ 盐酸和 30% 乙醇作为接收液进行试验,比较总生物碱在不同的接收液中透过大鼠皮肤的量,结果见表 1。

表 1 香莲软膏剂中总生物碱在不同接收液中的累积透过率

接收液	累积透过率/%				
	2 h	4 h	6 h	20 h	24 h
0.9% 生理盐水	1.49	2.28	3.19	7.74	8.96
0.1 mol·mL ⁻¹ 盐酸	0.61	0.76	0.90	1.28	2.02
30% 乙醇	2.07	3.54	5.27	10.55	13.38

由结果可知,总生物碱在不同接收液中的累积透过率的大小顺序为 30% 乙醇 > 0.9% 生理盐水 > 0.1 mol·mL⁻¹ 盐酸,故本实验采用 30% 乙醇作为香莲软膏体外透皮试验的接收液。

2.6 大鼠腹皮透皮效果比较

2.6.1 大鼠腹皮的处理

2.6.1.1 有角质层的大鼠腹皮的处理 将大鼠处死后立即取其腹部皮肤,用 8% 硫化钠酒精溶液脱毛,小心除去皮下脂肪组织和粘液组织,注意不能损

伤角质层,用清水清洗,用 0.9% 生理盐水洗净皮肤至不浑浊,用 0.9% 生理盐水放置至冰箱浸泡 24 h,取出置于 -80 ℃ 冰柜中冷藏备用。

2.6.1.2 无角质层大鼠腹皮的处理 同上法取得大鼠腹部皮肤,处理用清水洗净,用压敏胶带均匀用力地剥离角质层,平行操作 25 次,即得无角质层大鼠腹皮^[2],用 0.9% 生理盐水洗净皮肤至不浑浊,用 0.9% 生理盐水放置至冰箱浸泡 24 h 后,取出置于 -80 ℃ 的冰柜中冷藏备用。

2.6.2 不同大鼠腹皮的透皮试验 按 2.3 项下方法,采用 30% 乙醇作为接收液进行试验,结果见表 2。

表 2 香莲软膏剂在无角质层和有角质层皮肤中的透皮情况						
大鼠腹皮类型	累积透过率/%					
	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	24 h
无角质层	58.80	73.18	80.22	83.99	85.29	87.76
有角质层	0.61	1.03	1.36	1.67	2.11	13.13

由表 2 可知,在香莲软膏剂的体外透皮试验中,无角质层的大鼠腹皮比有角质层的大鼠腹皮的累积透过率明显要大,24 h 时累积透过率前者约是后者的 6.7 倍。有角质层的腹皮更能反应透皮的真实性,故试验确定采用有角质层的大鼠腹皮作为介质。

2.7 香莲软膏剂取样量的选择 透皮试验时软膏剂取样量对结果有较大的影响,取样量太小,测定结果误差较大,取样量太大,软膏涂抹得太厚,则整体的透过率会比较低,在预试验的前提下,对软膏取样量进行筛选,结果见表 3。

表 3 不同取样量时香莲软膏剂中总生物碱的透过量							
取样量 /g	生物碱含量 /μg	累积透过量 /μg					
		2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	24 h
0.050	111.02	0.61	0.93	0.98	1.20	1.53	13.96
0.075	166.52	0.84	1.39	1.59	1.94	2.51	15.68
0.100	222.03	1.30	2.40	3.01	3.66	4.70	23.69

由表 3 可知,总生物碱的透过量随取样量增大而增大,故本实验选择取样量 0.100 g。

2.8 验证试验 通过上述试验优选出香莲体外透皮试验条件为选用波长为 345 nm 的 UV 测定香莲软膏中总生物碱的含量,以 30% 乙醇作为接收液,

以有角质层的大鼠鼠皮作为透皮的介质,香莲的取样量为 0.1 g 进行体外透皮试验,结果生物碱含量为 222.47 μg。2,4,6,8,10,12 h 时累积透过量分别为 1.16,2.53,3.93,5.82,7.93,28.07 μg。说明该方法简便,稳定,重复性较好。

3 讨论

在体外透皮试验中,透皮介质有采用大鼠鼠皮^[2]、小鼠腹皮^[3,4]以及半透膜^[5]等。以半透膜为介质比用鼠皮的透过率大大增加,采用鼠皮做介质时,处理鼠皮的过程中极易损伤角质层,故试验对 2 种鼠皮进行比较,探讨角质层对透皮试验的影响。由试验结果可知,角质层是主要渗透障碍,对结果影响很大,故在处理大鼠腹皮时宜保证皮肤的一致性,减少实验误差。所用大鼠腹部皮肤可能存在厚度的差异,皮肤状况难以完全一致等。故要尽量挑选体重一致的大鼠,尽量除净皮下脂肪同时小心不要破坏角质层,且鼠皮处理好后最好在一周内使用;进行体外透皮试验时软膏涂抹要尽量薄而均匀;温湿度对试验结果有一定影响,实验过程中要注意接收池中接收液的量,使其充满接收杯,以使鼠皮与接收液充分接触,尤其是试验时间较长时,当接收液减少要及时补充,以免接收液的液面不接触鼠皮而影响透皮的效果。

[参考文献]

[1] 范瑞强. 中药香莲复方外用治疗股癣及外阴念珠菌病的实验和临床研究[J]. 广州中医学院学报, 1991, 8 (2): 170.

[2] 张英丰,汪小根,周莉玲. 大鼠皮肤角质层对青藤碱脂质体贴剂透皮吸收的影响[J]. 中草药, 2006, 37 (9):1322.

[3] 姜昊,谢京宇,龙海东,等. 癣湿涂膜剂的制备工艺研究及评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13 (11):13.

[4] 马平勃,黄中伟. 透皮促进剂对青藤碱凝胶体外透皮吸收的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2003, 9(2):7.

[5] 吴健,李嵘,谭家风,等. 烫伤膜体外释放的初步研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(3):18.

[责任编辑 全燕]