

复方卡力孜然凝胶剂主要活性成分体外经皮渗透

邢建国¹, 王新春^{2,3*}, 赵媛³, 马建红¹, 薛桂蓬¹, 刘桂花¹

(1. 新疆维吾尔自治区药物研究所, 乌鲁木齐 830004; 2. 石河子大学医学院一附院, 新疆 石河子 832008; 3. 石河子大学药学院, 新疆 石河子 832002)

[摘要] **目的:** 研究不同透皮促进剂对复方卡力孜然凝胶剂 3 种有效成分体外经皮渗透的影响, 筛选有效的透皮吸收促进剂。**方法:** 采用改良 Franz 扩散池法、离体鼠皮进行体外透皮试验, HPLC 测定透皮吸收促进剂对 3 种有效成分补骨脂素、异补骨脂素及蛇床子素的累积透过量及透皮速率的影响。**结果:** 不同促透剂对复方卡力孜然凝胶剂中补骨脂素、异补骨脂素及蛇床子素体外透皮吸收产生不同的影响, 确定 2% 氮酮为促进剂时 3 种有效成分的促透效果最好。**结论:** 2% 氮酮能够促进复方卡力孜然凝胶剂 3 种有效成分的有效渗透, 透皮吸收过程符合 Higuchi 方程。

[关键词] 复方卡力孜然凝胶剂; 氮酮; 丙二醇; 透皮吸收

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)03-0019-04

In vitro Percutaneous Penetration of Main Active Ingredient from Fufang Kali Ziran Gel

XING Jian-guo¹, WANG Xin-chun^{2,3*}, ZHAO Yuan³, MA Jian-hong¹, XUE Gui-peng¹, LIU Gui-hua¹

(1. Xinjiang Institute of Materia Medica, Urumchi 830004, China; 2. First Affiliated Hospital of Medical College, Shihezi University, Shihezi 832008, China; 3. School of Pharmacy, Shihezi University, Shihezi 832000, China)

[Abstract] **Objective:** To study on effects of *in vitro* percutaneous penetration of different penetration enhancers for three active ingredients from Fufang Kali Ziran gel, and to screen out effective transdermal absorption enhancers. **Method:** *In vitro* transdermal test was used by modified Franz diffusion cell method and *in vitro* rat skin, effect of cumulative penetration volume and penetration rate from transdermal absorption enhancers for three active ingredients (psoralen, isopsoralen and osthole) was determined by HPLC. **Result:** Different enhancers were found to have different degree *in vitro* penetration enhancing effect on psoralen, isopsoralen and osthole in Fufang Kali Ziran gel, determined 2% azone had optimum promoting effect as enhancers to three active ingredients. **Conclusion:** 2% azone could promote effective penetration of three active ingredients from Fufang Kali Ziran gel. This process of penetration absorption could be in line with Higuchi equation.

[Key words] Fufang Kali Ziran gel; azone; propylene glycol; penetration absorption

复方卡力孜然凝胶剂是由补骨脂、蛇床子、驱虫斑、斑鸠菊、何首乌等 10 味药材制成的维药外用制剂,

具有祛风燥湿、活血化瘀、舒经活络之功效, 是维吾尔民族用于治疗白癜风的经典名方^[1]。本研究以复方卡力孜然凝胶剂中补骨脂素、异补骨脂素和蛇床子素 3 种有效成分^[2]为指标, 通过离体皮肤透皮试验, 考察复方卡力孜然凝胶剂的主要活性成分的经皮渗透行为, 优选最佳促透剂的种类和用量, 为本品处方筛选及临床应用的合理性提供依据。

1 材料

SPD-10AVP 型高效液相色谱仪 (日本岛津),

[收稿日期] 20110511(011)

[基金项目] 新疆维吾尔自治区科技援疆计划项目(201091156)

[第一作者] 邢建国, 硕士, 研究员, 从事维药新制剂与新剂型研究

[通讯作者] * 王新春, 主任药师, 博士, 硕士生导师, 从事中西药物新制剂与新剂型研究, Tel: 15199586171, E-mail: cwjwXc@163.com

BP211D 型 1/10 万电子天平 (Sartorius), Millipore simplicity-185 型超纯水器 (美国密理博公司), ZTYTP3A 型智能透皮试验仪 (巩义市英峪予华仪器厂), 补骨脂素、异补骨脂素和蛇床子素对照品 (批号分别为 110739-200613, 110738-200511, 110822-200406, 均购自中国药品生物制品检定所), 复方卡力孜然凝胶剂浸膏粉 (新疆药物研究所自制), 交联聚丙烯酸树脂 (卡波姆 940, Cp, 武汉银河化工有限公司), 氮酮 (天津市塞迪药业有限公司), 1,2-丙二醇 (中国医药集团上海化学试剂公司), 甲醇为色谱纯, 水为超纯水, 其余试剂为分析纯。

Waster 大鼠, 雌雄不限 (200 ± 50) g, 新疆医科大学动物实验中心提供, 动物合格证号: 新医动字第 2003-0001 号。

2 方法和结果

2.1 凝胶剂的制备

取处方量复方卡力孜然提取物浸膏粉及卡波姆 940, 过 100 目筛, 加入适量的甘油, 无水乙醇及适量蒸馏水, 搅拌均匀后放置过夜, 加入处方量透皮促进剂, 聚山梨醇酯 (吐温)-80 等其他辅料, 搅拌均匀, 三乙醇胺调节 pH 6 ~ 7, 即得复方卡力孜然凝胶剂。

2.2 补骨脂素、异补骨脂素及蛇床子素分析方法

2.2.1 色谱条件

SHIMADZU VP-ODS C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇 (A)-0.4% 磷酸 (B), 梯度洗脱 (0 min, 51% A; 15 min, 51% A; 21 min, 74% A; 40 min, 74% A), 双波长检测 245 nm (检测补骨脂素、异补骨脂素), 322 nm (检测蛇床子素), 流速 1 mL · min⁻¹, 柱温 35 °C; 进样量 10 μL。

2.2.2 对照品溶液制备

精密称取补骨脂素和异补骨脂素对照品适量, 加甲醇配制成补骨脂素、异补骨脂素质量浓度分别为 230, 240 mg · L⁻¹ 的储备液。分别吸取上述储备液 2.5, 2.0 mL 至 50 mL 棕色量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 即得 11.50, 9.60 mg · L⁻¹ 补骨脂素和异补骨脂素的混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液制备

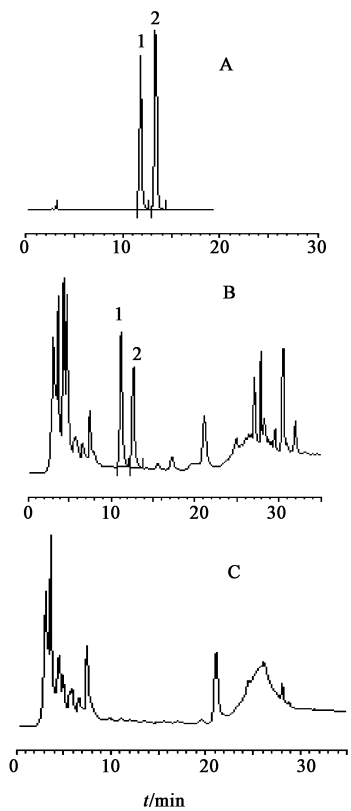
取凝胶剂约 1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理 30 min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.4 阴性对照溶液制备

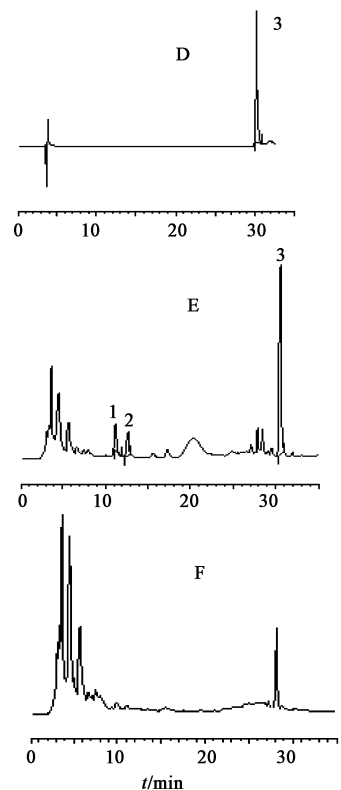
按凝胶剂制备方法制备不含补骨脂和蛇床子的样品凝胶剂, 按 2.1 方法制成相应的阴性样品溶液, 在上述色谱条件下进样, 见图 1, 2。

2.2.5 标准曲线的制备

精密吸取含有补骨脂素 11.5 mg · L⁻¹ 和异补骨脂素 9.6 mg · L⁻¹ 的混合对照



A. 对照品; B. 样品; C. 缺补骨脂素阴性; 1. 补骨脂素; 2. 异补骨脂素
图 1 补骨脂素及异补骨脂素 HPLC



D. 对照品; E. 样品; F. 缺蛇床子素阴性; 3. 蛇床子素
图 2 蛇床子素 HPLC

品贮备液 1,3,5,7,10 mL,分别置 10 mL 棕色量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得补骨脂素及异补骨脂素系列对照品溶液。精密吸取 $10.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 蛇床子素对照品储备液 1,2.5,5,7.5,10 mL,分别置 10 mL 棕色量瓶中,加乙醇至刻度,摇匀,即得蛇床子素系列对照品溶液。分别精密吸取上述溶液 $10 \mu\text{L}$,注入高效液相色谱仪,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,分别得到补骨脂素、异补骨脂素及蛇床子素的线性回归方程: $Y_{\text{补骨脂素}} = 70\,771X + 3\,335$ ($r = 0.999\,9$), $Y_{\text{异补骨脂素}} = 87\,318X + 5\,963.3$ ($r = 0.999\,6$); $Y_{\text{蛇床子素}} = 39\,080X + 7\,326$ ($r = 0.999\,5$)。补骨脂素 $1.15 \sim 11.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,异补骨脂素 $0.96 \sim 9.60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,蛇床子素 $1.02 \sim 10.20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 与峰面积线性关系良好。

2.3 体外透皮扩散试验

2.3.1 离体鼠皮的制备 取健康大鼠,用剪刀小心剪去大鼠腹部的绒毛,再用剃须刀刮干净,注意别弄破皮肤。脱颈处死小鼠,迅速剥离大鼠腹部皮肤,清理残余的皮下组织和脂肪,浸在生理盐水中,备用。

2.3.2 Franz 扩散试验 采用透皮扩散试验仪的立式玻璃扩散池,容积 17.0 mL ,扩散面积 1.3 cm^2 ,将

鼠皮置于扩散池与接受池之间,皮肤真皮面向接受池。接受液为 40% 乙醇生理盐水,透皮扩散试验仪温度 $(32 \pm 0.2) \text{ }^\circ\text{C}$,磁搅拌子转速为 $(300.0 \pm 1.0) \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。将凝胶剂均匀涂抹于皮肤角质层上,分别于 2,4,6,8,10,12 h 吸取接受液 1.0 mL , $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,同时于接受池中补充 1.0 mL 接受液。用 2.2 项下方法分别测定补骨脂素、异补骨脂素和蛇床子素的含量。

2.3.3 促进剂的筛选 在常用的促进剂氮酮(AZ)、丙二醇(PG)中进行筛选。按照 2.1 方法制备含不同透皮促进剂的复方卡力孜然凝胶剂。将上述各种凝胶剂分别按照 2.3.2 方法进行体外渗透试验,计算 12 h 累积渗透量(Q),将累积渗透量对时间(t)进行回归,绘制 $Q-t$ 曲线,得复方卡力孜然凝胶剂中补骨脂素、异补骨脂素和蛇床子素的体外透皮动力学方程及渗透速率。结果 11 种促透剂对复方卡力孜然凝胶剂中补骨脂素、异补骨脂素和蛇床子素体外透皮吸收产生不同的影响。2% 氮酮为复方卡力孜然凝胶剂处方中的最适促透剂;3 种有效成分的 Q 均与 $t^{1/2}$ 呈良好线性关系,提示体外渗透药动学均符合符合 Higuchi 方程。见表 1~3。

表 1 不同促进剂条件下补骨脂素透皮率($n=3$)

促渗剂	累积透过率 /%	$Q-t^{1/2}$ 方程	r	J / $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$
2% 氮酮	61.33	$Y = 13.11X - 11.39$	0.971 6	13.11
4% 氮酮	30.70	$Y = 35.31X - 38.42$	0.996 9	35.31
6% 氮酮	25.17	$Y = 13.95X - 9.472$	0.998 5	13.95
2% 丙二醇	20.14	$Y = 12.50X - 9.089$	0.992 5	12.50
4% 丙二醇	18.61	$Y = 8.399X - 1.995$	0.976 2	8.399
6% 丙二醇	23.32	$Y = 9.741X - 7.246$	0.996 0	9.741
8% 丙二醇	26.95	$Y = 12.41X - 10.80$	0.995 0	12.41
10% 丙二醇	20.70	$Y = 13.15X - 7.858$	0.999 0	13.15
2% 氮酮 + 4% 丙二醇	40.99	$Y = 12.79X - 14.98$	0.994 5	12.79
2% 氮酮 + 8% 丙二醇	57.07	$Y = 24.99X - 30.69$	0.982 0	24.99
无促透剂	25.06	$Y = 33.09X - 40.05$	0.989 1	33.09

3 讨论

复方卡力孜然中的补骨脂素、异补骨脂素和蛇床子素是治疗白癜风的主要活性成分^[3],以这 3 种成分进行复方卡力孜然凝胶剂体外透皮试验的研究具有重要药效学意义。复方卡力孜然提取物质量稳定性及可控性是决定复方卡力孜然凝胶剂质量的主要影响因素。本试验在前期研究工作中^[4],已优化了复方卡力孜然的提取工艺,得到了符合半成品质量要求的复方卡力孜然提取物浸膏,经测定 3 批复方卡力孜然提取物中补骨脂素、异补骨脂素、蛇床子素 3 种有效成分

含量分别是 $5.48, 2.91, 23.68 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,RSD 分别为 $1.19\%, 3.62\%, 0.87\%$;浸出物得率 23.23% ,RSD 1.92% ,为复方卡力孜然凝胶剂的研制奠定了基础。

本研究结果表明,补骨脂素、异补骨脂素和蛇床子素在不含有促透剂的凝胶剂处方中也能一定程度地透过皮肤,一方面可能是原方中含有的丁香酚等挥发油成分产生的促透作用;另一方面方中白芥子中的芥子油也能通过引起细胞膜蛋白质可逆的构型变化、置换皮肤角质层结构,达到增加皮肤的渗透性的目的^[5]。

表 2 不同促透剂条件下异补骨脂素透过率 (n=3)

促渗剂种类及用量	累积透过率	Q-t ^{1/2} 方程	r	J
	/%			/μg·cm ⁻² ·h ⁻¹
2% 氮酮	61.02	Y = 9.588X - 8.795	0.975 2	9.588
4% 氮酮	26.94	Y = 26.20X - 29.04	0.997 0	26.20
6% 氮酮	23.67	Y = 9.334X - 6.862	0.997 0	9.334
2% 丙二醇	19.41	Y = 8.928X - 7.003	0.989 4	8.928
4% 丙二醇	18.39	Y = 6.198X - 2.137	0.978 3	6.198
6% 丙二醇	22.51	Y = 7.271X - 5.905	0.997 0	7.271
8% 丙二醇	19.37	Y = 8.957X - 8.166	0.995 5	8.957
10% 丙二醇	21.34	Y = 9.531X - 6.050	0.998 0	9.531
2% 氮酮 + 4% 丙二醇	39.87	Y = 9.209X - 11.14	0.994 5	9.209
2% 氮酮 + 8% 丙二醇	55.92	Y = 18.08X - 22.46	0.990 5	18.08
无促透剂	24.49	Y = 24.42X - 31.28	0.967 0	24.42

表 3 不同促透剂条件下蛇床子素的透过率 (n=3)

促渗剂种类及用量	累积透过率	Q-t ^{1/2} 方程	r	J
	/%			/μg·cm ⁻² ·h ⁻¹
2% 氮酮	13.92	Y = 3.232X - 4.347	0.981 3	3.232
4% 氮酮	2.69	Y = 26.93X - 36.39	0.990 5	26.93
6% 氮酮	1.74	Y = 3.519X - 3.063	0.888 8	3.519
2% 丙二醇	1.44	Y = 3.355X - 3.806	0.982 9	3.355
4% 丙二醇	1.69	Y = 1.900X - 0.997	0.880 3	1.900
6% 丙二醇	1.78	Y = 2.944X - 3.427	0.984 9	2.944
8% 丙二醇	2.47	Y = 3.377X - 4.273	0.991 5	3.377
10% 丙二醇	1.79	Y = 4.149X - 3.960	0.993 0	4.149
2% 氮酮 + 4% 丙二醇	8.51	Y = 3.629X - 5.838	0.973 7	3.629
2% 氮酮 + 8% 丙二醇	14.99	Y = 16.85X - 23.31	0.973 1	16.85
无促透剂	1.74	Y = 28.38X - 42.49	0.989 1	28.38

氮酮的促渗作用主要与以下机制有关^[6-7]:使细胞间脂质排列有所下降,增加皮肤角质层组织的流动性;能与角质层细胞间脂质相互作用,并脱去脂质形成孔道,降低药物的扩散阻力;能增加角质层的含水量,使角质层蓬松胀大,细胞间隙扩大,药物在角质层/基质间的分配系数增大,有利于药物在角质层形成储库。本实验促透剂筛选结果表明,2% 氮酮能显著提高补骨脂素、异补骨脂素和蛇床子素的累积释放量和透皮速率,但促透效果并不与氮酮的浓度呈依赖性,即有效成分的含量并不随氮酮浓度的增高而增高。分析原因,可能是补骨脂素、异补骨脂素和蛇床子素在单位面积的皮肤和角质层的贮存量达到一定浓度后存在饱和现象^[8]。原方中含有的促进药物透过的挥发性成分与氮酮具有相似的促透机制,与 2% 氮酮共同促进方中补骨脂素、异补骨脂素和蛇床子素的透过性,达到了最大值。其确切的机制还需要通过进一步的研究。

[参考文献]

[1] 章新根,张彦彦,王翠娟. 中药外用治疗白癜风进展

[J]. 中医外治杂志,2007,16(3):42.

[2] 将小音,沈斌. 复方卡力孜然酊联合窄谱中波紫外线治疗白癜风临床疗效观察[J]. 临床皮肤科杂志, 2008,37(2):125.

[3] 赵媛,邢建国,王新春,等. HPLC 法同时测定复方卡力孜然凝胶剂中三组分的含量[J]. 药物分析杂志, 2010,30(4):718.

[4] 赵媛,邢建国,王新春,等. 正交实验优化复方卡力孜然凝胶剂的提取工艺[J]. 中国中药杂志,2010,35(9):1130.

[5] 李卫虹,徐绍东. 白芥子“发泡疗法”治疗白癜风疗效观察[J]. 中国美容医学,2001,10(2):108.

[6] 王武军,黄一帆. 促渗剂促进药物透皮吸收机理的研究进展[J]. 中国兽药杂志,2005,39(4):28.

[7] 丁平田,郝劲松,郑俊民. 应用 ATR-FTIR 研究两种皮肤渗透促进剂的作用机理[J]. 生物物理学报,2000,16(1):48.

[8] 王来友, Jo elle Millet, 黄芳芳,等. 花椒毒素在人体皮肤及角质层中的渗透动力学探讨[J]. 药学学报, 2006,41(9):878.

[责任编辑 仝燕]