

风灵凝胶中秋水仙碱的体外透皮特性

刘容飞¹, 谢燕^{1,2}, 袁秀荣^{1,2*}

(1. 上海中医药大学, 上海 201203; 2. 上海中医大源创科技有限公司, 上海 201203)

[摘要] 目的: 研究风灵凝胶中秋水仙碱的体外透皮吸收和体外释放情况。方法: 采用改良 Franz 扩散池装置, 以离体 SD 大鼠皮肤、透析膜为体外渗透屏障, 采用 HPLC 测定接收液中秋水仙碱的含量, 计算秋水仙碱单位面积累积渗透量和释药量, 比较透皮速率和释放速率。结果: 风灵凝胶中秋水仙碱 8 h 的体外释放和经皮渗透行为均符合 Higuchi 动力学方程, 体外释药量高于经皮渗透量, 且释药速率高于透皮速率。结论: 皮肤为风灵凝胶中秋水仙碱透皮吸收的主要屏障, 该制剂能平稳的释放药物, 具有长效缓释的特点。

[关键词] 秋水仙碱; 高效液相色谱法; 透皮吸收; 体外释放

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)11-0022-04

Study on *in vitro* Percutaneous Absorption Properties of Colchicine in Fengling Gelatin

LIU Rong-fei¹, XIE Yan^{1,2}, YUAN Xiu-rong^{1,2*}

(1. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;
2. Shanghai Zhongyida Yuanchuang Technology Co. Ltd., Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective:** To study the *in vitro* percutaneous absorption and *in vitro* release state of the main effective element colchicine in Fengling gelatin. **Method:** The Franz diffusion cells were chosen with excised SD rat skin and dialyzer as the *in vitro* permeability barrier; the content of colchicine was determined by HPLC, the cumulative permeation amount per unit area and release amount of colchicine were calculated, and the percutaneous

[收稿日期] 20110108(002)

[基金项目] 上海市科委中药现代化项目(08DZ1970400)

[第一作者] 刘容飞, 硕士研究生, 从事中药新药的研究工作, E-mail: rongfei526@yahoo.com.cn

[通讯作者] *袁秀荣, 博士, 教授, 硕士生导师, 从事中药新药研究开发, E-mail: yuany@189.cn

为含量测定指标, 对独一味镇痛止血有效部位进行富集工艺研究。

独一味化学成分以环烯醚萜苷和黄酮类成分为主, 所以采用聚酰胺法, 可以将两类成分初步分离。再利用大孔吸附树脂富集总环烯醚萜苷。30%乙醇能洗脱下大部分的环烯醚萜苷类成分, 此结果与我们之前药理实验结果相吻合。佐证了环烯醚萜苷类成分为独一味药材中镇痛止血的主要有效部位。

独一味中的环烯醚萜类成分具有相似的结构, A 环结构相似, 一般 4 位有一 CO—取代, 所以采用

对二甲氨基苯甲醛法测定总环烯醚萜苷含量较为适合^[1]。

[参考文献]

- [1] 李茂星, 贾正平, 沈涛, 等. 分光光度法测定藏药独一味及其制剂中总环烯醚萜苷的含量[J]. 中药新药与临床药理, 2006, 17(1): 45.
- [2] 钱大玮, 段金殿, 朱玲英, 等. HPLC 测定独一味中 Phlorigidioside C 的含量[J]. 中国药科大学学报, 2004, 35(6): 549.

[责任编辑 全燕]

absorption velocity and release velocity were compared. **Result:** The *in vitro* release and penetration process of colchicine in Fengling gelatin conformed to Higuchi kinetic equation process within 8h; the release amount of colchicine in Fengling gelatin was higher than cumulative permeation amount, and the release velocity was higher than percutaneous absorption velocity. **Conclusion:** Skin was the main percutaneous absorption barrier of colchicine in Fengling gelatin. The active constituent could be released steadily, which showed that Fengling gelatin was a prolonged action lente liberantes praeparatum.

[**Key words**] colchicines; HPLC; percutaneous absorption; *in vitro* release

风灵凝胶来源于云南民间验方,由丽江山慈姑、三七组成,具有清热通络、活血止痛之功效,临床用于急性痛风性关节炎的治疗,具有较好的疗效。对于痛风的治疗,西医上虽有经典药物秋水仙碱消炎止痛^[1],但口服给药起效慢,不良反应大,一定程度上限制了其临床应用。风灵凝胶将原药方经特定工艺改良成外用制剂,可避免产品主要成分丽江山慈姑所含秋水仙碱口服所引起的胃肠道毒副作用^[2],以期达到对局部性病变产生持久作用的疗效。制剂的体外释放度和经皮渗透性为外用制剂释放性能的重要参数,对制剂的透皮速率及药效有较大的影响。本文以风灵凝胶的君药丽江山慈菇中所含秋水仙碱为指标成分,进行风灵凝胶的体外释放和经皮渗透实验,考察该制剂的体外释药行为,从而控制产品质量,为临床安全用药提供实验依据。

1 材料

1.1 试药 秋水仙碱(SIGEMA公司提供,含量为95%),甲醇、乙腈(色谱纯,SK Chemicals),氯化钠(中国医药集团上海化学试剂公司),戊巴比妥钠(德国分装,批号WS20090520),透析袋(上海青阳仪器设备有限公司)。

1.2 仪器 岛津LC-20AB型高效液相色谱仪(日本),Kromasil C₁₈色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm, 上海安谱科学仪器有限公司),CP225D型微量电子分析天平(德国Sartorius),FA-2004型电子天平(上海精密科学仪器有限公司),改良Franz扩散池(天津富兰克斯),RYJ-6A型透皮扩散实验仪(上海黄海药检仪器有限公司),SK7200LH型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司)。

1.3 动物 SD大鼠,雄性,(250 ± 10)g,上海中医药大学实验动物中心,动物合格证号SCXK(沪)2007-0005。

2 方法与结果

2.1 秋水仙碱含量测定

2.1.1 色谱条件 Kromasil C₁₈色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-水(30:70),流速1 mL·min⁻¹,检测波长245 nm,柱温25 °C,进样量20 μL。

2.1.2 检测波长选择 利用二极管阵列检测器在线扫描,扫描波长为200~400 nm,得到秋水仙碱在243 nm附近吸收最强,本实验选择秋水仙碱检测波长为245 nm。

2.1.3 流动相选择 参照文献[3]选择50%甲醇-磷酸盐缓冲液(pH 4.5)体系作为流动相,发现在此流动相条件检测时极易产生气泡导致压力不稳,且流动相中含有盐,柱压较高,易损伤色谱柱,改换甲醇-水体系,但在此条件下检测秋水仙碱峰型较宽,峰型前延较为明显,对称性差,最终选择乙腈-水体系进行检测,结果表明此体系下,峰型佳,分离度好,检测体系稳定。

2.1.4 专属性考察在上述色谱条件下,取空白鼠皮透皮接收液,按供试品溶液制备方法制备阴性对照供试液进样,阴性对照液在秋水仙碱色谱峰位置处无相应峰出现,表明该方法专属性良好。见图1。

2.1.5 最低定量限 将秋水仙碱对照品溶液稀释不同倍数后按2.1.1色谱条件进样,记录相应的浓度及其对应的信噪比,结果表明秋水仙碱在该色谱条件下的最低定量限0.1 mg·L⁻¹(信噪比10:1)。

2.1.6 供试品溶液制备 将各时间点所取透皮接收液离心15 min(13 000 r·min⁻¹)后再用0.22 μm微孔滤膜滤过,弃去初滤液,取续滤液即可。

2.1.7 标准曲线 精密称取秋水仙碱对照品2.63 mg至10 mL量瓶中,甲醇溶解定容得秋水仙碱浓配液(249.85 mg·L⁻¹),精密吸取该浓配液0.8 mL至10 mL量瓶中,以生理盐水定容得秋水仙碱对照品储备液(19.99 mg·L⁻¹)。以该储备液为母液,用生理盐水稀释成质量浓度分别为14.99,10,5,1,0.5,0.2 mg·L⁻¹的系列对照品溶液,吸取上述对照品溶

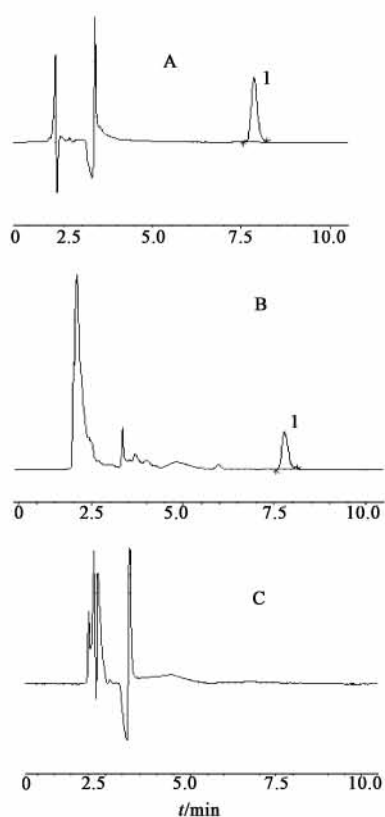


图 1 秋水仙碱透皮试验 HPLC

A. 对照品; B. 风灵凝胶透皮吸收样品;
C. 鼠皮空白浸出液; 1. 秋水仙碱

液各 20 μL 注入液相色谱仪, 以秋水仙碱的含量为横坐标 (X), 相应的色谱峰峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 得秋水仙碱回归方程为 $Y = 90\,443X - 4\,053.5$ ($R^2 = 0.9999$), 表明秋水仙碱在 0.2 ~ 19.99 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 呈良好的线性关系。

2.1.8 精密度和回收率 配制秋水仙碱线性浓度范围内高、中、低 3 个浓度的对照品, 于 1 d 内连续进样 6 次, 3 d 内重复测定, 分别计算日内、日间精密度及回收率。结果得出高、中、低浓度日内精密度 RSD 分别为 0.54%, 0.06%, 0.02% ($n = 6$), 日间精密度 RSD 分别为 0.96%, 0.32%, 0.06% ($n = 3$); 回收率分别为 $(101.25 \pm 0.65)\%$, $(99.66 \pm 0.08)\%$, $(100.03 \pm 0.02)\%$ ($n = 6$)。结果表明仪器精密度较高, 回收率符合规定。

2.1.9 稳定性实验 取同一供试品溶液于 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 测定, 计算平均值及 RSD, 结果显示 RSD 均小于 2%, 表明样品在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 24 h 内稳定性良好。

2.2 体外透皮及释放试验

2.2.1 鼠皮制备 SD 大白鼠 (250 ± 10) g, 3% 戊

巴比妥钠腹腔注射麻醉, 脱毛后用温生理盐水擦净脱毛部位, 静养 24 h 后断颈处死, 小心剥离腹部皮肤, 剔除皮下脂肪和粘连物。以生理盐水反复冲洗干净, 检查皮肤的完整性, 置于密封袋中, 加入适量的生理盐水, -20 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存, 于 1 周内用完, 用前自然解冻^[4]。

2.2.2 透析膜预处理 将透析袋 (相对分子质量 10 000 ~ 13 000) 剪成适当长度, 剖开成单层透析膜, 置于 50% 乙醇中加热煮沸 1 h, 再用 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaHCO_3 溶液清洗 2 次, 然后用 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA 溶液清洗 2 次, 再用蒸馏水清洗 2 次, 最后在蒸馏水中加热除去残留的 EDTA。将处理好的透析膜在 4 $^{\circ}\text{C}$ 蒸馏水中保存备用。

2.2.3 体外透皮试验 将完整的鼠皮固定在 Franz 扩散池上, 皮肤外表面面向供药池, 在供药池中均匀加入风灵凝胶 0.6 g (凝胶中秋水仙碱的质量分数 476.24 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), 平行 6 份, 在接受池中注入超声脱气后的生理盐水, 小心排出气泡, 将扩散池置透皮扩散仪中 (37 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 磁力搅拌, 预平衡 15 min 后开始计时, 分别在 1, 2, 4, 6, 8 h 后取接收液 1 mL, 并立即补加等量同温的新鲜接收液于接收池, 将所取各样品按供试品溶液制备方法处理后测定^[5], 按公式 1 计算秋水仙碱单位面积累积渗透量。

$$Q = (C_n \times V + \sum_{i=1}^{n-1} C_i \times 1) / A \quad (1)$$

式中 Q 为单位面积累积渗透量, C_n 为第 n 个取样点浓度, V 为接收液体积, C_i 为第 i 个取样点浓度, A 为渗透面积。结果见表 1。

表 1 风灵凝胶中秋水仙碱体外透皮与释放累积释药方程拟合

类型	拟合方式	拟合方程	R^2
释放	零级	$Q = 6.4665t + 8.1609$	0.9934
	一级	$\text{Ln}Q = 0.2047t + 2.5709$	0.9238
	Higuchi 方程	$Q = 24.894t^{1/2} - 12.934$	0.9931
透皮	零级	$Q = 4.6077t + 5.3135$	0.9875
	一级	$\text{Ln}Q = 0.2158t + 2.1501$	0.8962
	Higuchi 方程	$Q = 17.851t^{1/2} - 9.9343$	0.9996

2.2.4 体外释放试验 为考察风灵凝胶中秋水仙碱的体外药物释放情况, 采用预处理的透析膜代替鼠皮作为渗透的屏障膜^[6], 按照体外透皮试验方法, 按公式 1 计算秋水仙碱 8 h 单位面积累积释药量。体外释放 1, 2, 4, 6, 8 h Q 值分别为 12.86, 22.59, 34.16, 48.39, 58.60 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$; 体外透皮吸收的 Q 值

分别为 8.12, 15.29, 25.40, 33.67, 40.85 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ 。

2.3 体外透皮与释放拟合方程 分别采用零级模型、一级模型、Higuchi 模型^[7]对风灵凝胶中秋水仙碱透皮吸收及体外释放各时间点单位面积累积渗透量和释药量进行模型拟合,求回归方程,方程斜率即为透皮速率。结果见表 1。

从拟合曲线 R^2 值大小可以看出,秋水仙碱体外释药曲线及透皮吸收曲线以 Higuchi 模型拟合较好,说明其释放和透皮吸收符合 Higuchi 动力学方程。将实验结果以 Higuchi 方程拟合得到体外释药速率 ($24.89 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1/2}$),明显高于透皮速率 ($17.85 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1/2}$)。单位面积累积渗透量与释药速率比较均说明皮肤是风灵凝胶中秋水仙碱经皮吸收的主要屏障,并起到限速作用。

风灵凝胶中秋水仙碱的体外释药过程与经皮渗透过程比较见图 2。在 8 h 内风灵凝胶中的秋水仙碱单位面积累积渗透量和释药量都随时间递增,与 $t^{1/2}$ 均具有良好的线性关系,即该制剂能长时间平稳的传递药物。这也有力证明了风灵凝胶具有长效缓释的特点。体外释药过程与经皮渗透过程的差异同时也说明体外释放度仅仅是评价该凝胶剂的间接指标。

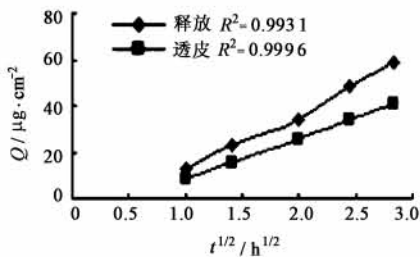


图 2 风灵凝胶中秋水仙碱体外透皮和释药规律比较

3 讨论

接受介质是保证实验漏槽条件的关键,秋水仙碱为水溶性药物,本实验采用体外释药实验模型对生理盐水, pH 6.8 PBS 液, pH 7.4 PBS 液进行筛选,以风灵凝胶中秋水仙碱 8 h 累积透过量为评价指标,最终选择透过量最大的生理盐水为接收介质。

由于局部外用半固体制剂涂布于皮肤上时易受外界条件影响(如衣物摩擦等),因而不能保证药物长时间停留在皮肤上,药物作用于皮肤上的时间受到限制,所以体外透皮和释药规律考察实验取样点设为 8 h。

本研究对不同上样量进行考察,以单位面积累

积渗透量为评价指标比较分析,结果表明当上样量低于 0.6 g 时 Q 随着上样量增大而逐渐增加,当上样量超过 0.6 g 后, Q 趋于稳定,故选取凝胶上样量为 0.6 g。

本研究采用 HPLC 测定透皮吸收接收液中秋水仙碱的含量,计算单位面积累积渗透量及透皮速率。本方法灵敏度高,分离效果好,分离时间短,重现性好,操作简便快速。

秋水仙碱对治疗急性痛风有奇效,目前临床以口服给药为主,但口服秋水仙碱剂量难于控制^[8],胃肠道副反应明显,风灵凝胶为外用制剂,局部使用可避免肝脏首过效应及全身给药方式的毒副作用。实验结果表明,风灵凝胶中秋水仙碱在 8 h 内的累积透过量与时间以 Higuchi 模型拟合最佳,释放度与时间以零级和 Higuchi 模型拟合均优于一级模型,且两者差异不明显,为保证透皮与释放参数比较的一致性,透皮和释放对时间的模型拟合均采用 Higuchi 模型。同时,采用的体外透皮吸收模型和方法可以较好的评价风灵凝胶的体外透皮吸收特性。

[参考文献]

- [1] Michael P K, William R G. Updates in the management of gout[J]. Am J Med, 2007, 120(3):221.
- [2] Pande I. An update on gout[J]. Indian J Rheumatol, 2006, 1(2):60.
- [3] 魏莉,王志,林洁. 风灵凝胶的质量标准研究[J]. 中成药, 2008, 30(5):6.
- [4] 官仕杰,闫小平,毛超一,等. 微米大黄瘰疬乳膏的透皮吸收研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(10):1215.
- [5] 黄芳芳,杨得坡,梁淑明. 补骨脂素乳膏与凝胶体外释放与透皮吸收的比较研究[J]. 中成药, 2007, 29(3):349.
- [6] 秦剑,刘淑芝,张强,等. 左金微乳凝胶与水凝胶体外释放和经皮渗透特性的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(12):40.
- [7] 高成林,蒋俊,贾晓斌,等. 小儿腹泻脐贴膏的体外释放与透皮行为研究[J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(5):674.
- [8] Huang H Y, Appel L J, Choi M J, et al. The effects of Vitamin C Supplementation on Serum concentrations of uric acid; results of a randomized, controlled trial[J]. Arthritis Rheum, 2005, 52:1843.

[责任编辑 全燕]