

石榴皮多酚凝胶的制备及质量控制

严欢^{1,2}, 顾政一^{2*}, 陈孝娟¹, 刘宣麟¹, 马建红¹, 庞市宾¹

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

[摘要] 目的: 制备石榴皮多酚凝胶, 建立其质量控制方法并考察其经皮渗透性。方法: 以卡波姆-940 为基质, 甘油为润湿剂, 氮酮为透皮吸收促进剂, 山梨酸钾为防腐剂, 三乙醇胺为中和剂, 制备凝胶剂; 采用紫外分光光度法测定石榴皮多酚凝胶中总多酚含量, 并做小鼠离体皮肤经皮渗透试验。结果: 凝胶制备工艺可行; 没食子酸在 $0.0245 \sim 0.2450 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 线性关系良好 ($r=0.9996$); 平均回收率 99.56%, RSD 0.58%。没食子酸 24 h 皮肤透过率为 36.95%。结论: 石榴皮多酚凝胶的制备方法简单, 质量控制方法可靠, 且有良好的渗透性。

[关键词] 石榴皮多酚; 凝胶; 卡波姆 940; 离体皮肤; 渗透性

[中图分类号] R283.6, R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)08-0004-03

Preparation and Quality Control of Pomegranate Polyphenols Gel

YAN Huan^{1,2}, GU Zheng-yi^{2*}, CHEN Xiao-juan¹, LIU Xuan-lin¹, MA Jian-hong¹, PANG Shi-bin¹

(1. Pharmacy College of Shihezi University, Shihezi 832002, China;

2. Xinjiang Institute of Materia Medica, Urumqi 830004, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare pomegranate polyphenols gel and control the quality and to observe penetrability of gallic acid from the gel *in vitro*. **Method:** Carbopol-940 was used as the gel matrix, glycerin as wetting agent, potassium sorbate as a preservative and triethanolamine as neutralizer. UV-spectrometry method was used to determine total polyphenol content of the gel. The skin of rat was put between the supplying container and receiving container, and the experimentation of penetrating was carried out. **Result:** The preparing technology of gels was feasible. Gallic acid can be completely separated within a linear range of $0.0245 \sim 0.2450 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ($r=0.9996$). The average recovery was 99.56%, RSD 0.58%. The rate of penetrability in Gallic acid is 36.95% during 24 hours. **Conclusion:** The preparation technique is simple and feasible for the quality control. It shows excellent transdermal effects.

[Key words] pomegranate polyphenols; gel; carbopol-940; skin of the rat; transdermal effects

石榴皮为《中国药典》历版记载的品种^[1], 具有涩肠、止血、驱虫等功效, 主要用于久泻、出血、久痢等^[2-3]。此外, 石榴皮还具有促进皮肤创伤愈合的药

理活性。多酚是一类具有多酚羟基化合物的总称, 主要是鞣质类、黄酮类和有机酸类化合物, 包括鞣花单宁、没食子单宁、鞣花酸、没食子酸、儿茶素、花色素、绿原酸、阿魏酸和栲精等多种化合物。石榴皮中多酚的含量约为其干质量的 10% ~ 30%, 故其为石榴皮的主要化学成分^[4-6]。凝胶剂是中药经皮给药新剂型, 具有涂抹性好、无油腻感、皮肤表面停留时间长、透皮吸收速度快、使用方便等优点^[7]。为此, 作者研制了石榴皮多酚凝胶, 用于急慢性皮肤创伤的愈合, 效果良好。

[收稿日期] 20101222(001)

[基金项目] 国家自然科学基金(C191002)

[第一作者] 严欢, 助理研究员, 在读硕士, 研究方向: 药物新制剂及新剂型研究, Tel: 13999980272, E-mail: 19835500@qq.com

[通讯作者] * 顾政一, 研究员, 硕士, 研究方向: 药物新制剂及新剂型研究, Tel: 0991-2828537, E-mail: zhengyi@xj.cninfo.net

1 材料

UV-2501PC 紫外分光光度仪(日本岛津公司);BP-210 型 Sartorius 电子分析天平;Sartorius pH 计(北京赛多利斯有限公司);SK3300H 型 KUDOS 超声波清洗器(上海申生科技有限公司)。

石榴皮多酚凝胶(自制,多酚质量分数 20%);没食子酸对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110831-200302,含量测定用),昆明种小鼠,雄性,体重 18~22 g,许可证号 XK(新)2003-0001。

2 方法与结果

2.1 含量测定

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取没食子酸对照品 50 mg,置 100 mL 棕色量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,精密量取 5 mL,置 50 mL 棕色量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,即得(每 1 mL 中含没食子酸 0.05 mg)。

2.1.2 供试品溶液的制备 取石榴皮多酚凝胶适量,精密称定,置 250 mL 棕色量瓶中,加水 150 mL,放置过夜,超声处理 10 min,放冷,用水稀释至刻度,摇匀,滤过,弃去初滤液 50 mL,精密量取续滤液 20 mL,置 100 mL 棕色量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,即得。

2.1.3 标准曲线的建立 精密量取对照品溶液 0.5,1.0,2.0,3.0,4.0,5.0 mL,分别置 25 mL 棕色量瓶中,分别加水 11.5,11,10,9,8,7 mL,再各加入磷钼钨酸试液 1 mL,用 29% 碳酸钠溶液稀释至刻度,摇匀。放置 30 min,以相应的试剂为空白,照紫外-可见分光光度法(《中国药典》2005 年版一部附录 V A),在 760 nm 的波长处测定吸光度,回归方程为 $Y = 5.2588X + 0.0985$ ($r = 0.9991$),说明没食子酸在 0.0245~0.2450 $g \cdot L^{-1}$ 吸光度呈良好线性关系。

2.1.4 精密度试验 精密吸取对照品溶液 6 份,每份 3 mL,并按标准曲线项下自“各加入磷钼钨酸试液 1 mL”起的方法测定含量,结果多酚含量 RSD 0.43%,精密度良好。

2.1.5 稳定性试验 将同一份供试品溶液分别置冰箱冷藏保存(棕色瓶,避光)0,1,2,3,4,5 d,精密吸取 1 mL,并按标准曲线项下自“各加入磷钼钨酸试液 1 mL”起的方法测定含量,结果 RSD 0.69% ($n = 6$),说明样品溶液在 5 d 内稳定。

2.1.6 重复性试验 分别制备供试品溶液 6 份,精

密吸取每份 1 mL,按标准曲线项下自“各加入磷钼钨酸试液 1 mL”起的方法测定含量。结果石榴皮多酚凝胶剂中总多酚质量分数平均值为 23.30%,RSD 0.51% ($n = 6$),重复性良好。

2.1.7 加样回收率试验 精密称已知含量的样品 9 份分成 3 组,每份 1 g,各组分别精密加入高中低不同质量浓度的没食子酸对照品溶液适量,按照供试品溶液的制备方法制得。依标准曲线项下方法显色后测定吸光度值,计算回收率,回收率达到要求,结果见表 1。

表 1 没食子酸加样回收率测定

No.	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	2.33	1.47	3.81	100.68	99.56	0.58
2	2.34	1.47	3.80	99.32		
3	2.33	1.47	3.78	98.64		
4	2.32	2.45	4.75	99.18		
5	2.33	2.45	4.77	99.59		
6	2.32	2.45	4.75	99.18		
7	2.34	3.43	5.76	99.71		
8	2.33	3.43	5.75	99.71		
9	2.33	3.43	5.76	100.00		

2.2 小鼠离体透皮试验

2.2.1 离体皮肤的制备 取小鼠,将其固定背部脱毛,把脱毛膏按从胸部到腹部,由中间向两侧均匀涂布,静置 3 min 左右,待脱毛膏充分浸润鼠毛后,用热湿纱布轻轻擦拭腹部,再用干纱布拭干,自然饲养 1 d,于次日试验前断颈脱臼处死,立即剥离腹部皮肤,去除皮下脂肪组织,用生理盐水浸湿、平铺在表面皿上,将其剪成合适大小用于体外透皮实验或将完整的皮肤转移到铝箔上包好,储存于 -20℃ 冷藏备用。

2.2.2 接收液配制 称取 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 59.66 g 于 500 mL 量瓶中,加水超声溶解并稀释至刻度,为 0.33 $mol \cdot L^{-1}$,称取 KH_2PO_4 22.68 g 于 500 mL 量瓶中,加水溶解并稀释到刻度,为 0.33 $mol \cdot L^{-1}$,取 0.33 $mol \cdot L^{-1} Na_2HPO_4$ 溶液 85 mL 和 0.33 $mol \cdot L^{-1} KH_2PO_4$ 溶液 15 mL 混合,再加入 0.9% NaCl 注射液 2 900 mL,即得 pH 7.4 的 0.011 $mol \cdot L^{-1}$ 磷酸盐缓冲液(PBS),置 4℃ 冰箱保存。

2.2.3 体外经皮渗透试验 将皮肤真皮层面向接

收室固定在 Franz 扩散池上,精密称石榴皮多酚凝胶 1 g,均匀涂布于皮肤表面,接收池内以含 30% 乙醇的 PBS 溶液作为接收液^[8]。将接收池置于(37 ± 1) °C 的恒温水浴中,分别于 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 间隔取样 2 mL 置于 5 mL 量瓶中,同时立即补充等体积同温度的接收液;滤过,取续滤液在 270 nm 波长处测定吸收度,计算出样品浓度,乘以扩散池体积,得出扩散入池量,再与上药量相比即为透过率。结果见图 1。

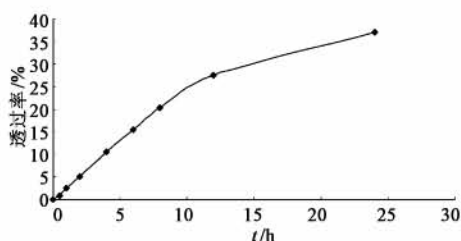


图 1 不同时间石榴皮多酚凝胶剂中没食子酸的透过率

3 讨论

国外学者 Murthy K N 等用干燥石榴果皮的甲醇提取物(多酚质量分数约 44%)制成 10% 水溶性凝胶,研究其对新西兰兔实验性皮肤损伤愈合的影响,结果表明低剂量治疗组中度愈合,而高剂量治疗组具有良好的愈合^[9]。国内有报道陈定雄等用自拟复方石榴皮煎剂外洗为主治疗慢性体表性溃疡,治疗组痊愈率显著高于对照组^[10]。本研究立足于新疆石榴的资源优势,结合石榴皮的药用价值和前期工作基础,拟研究石榴皮多酚促进慢性皮肤溃疡愈合的物质基础及其作用机制。

本品选用卡波姆-940 作为水溶性凝胶基质,具有通透性好、起效快、作用时间长、无油腻感、无刺激、易于涂布、皮肤偶合效果好等优点;处方中甘油作为润湿剂和保湿剂;选用三乙醇胺调 pH 5.0 ~ 7.0。制备方法简单,易行。

试验测定方法参照《中国药典》2005 年版一部

附录 XB 鞣质含量测定法,采取单点(760nm)测定。采用 Folin-Ciocalteu 法测定总多酚时,工作曲线线性良好,该方法操作简单,显色明显,精密度高,稳定性和重现性好,回收率高。可作为该制剂的质控方法。

以含 30% 乙醇的 PBS 为接收液,可以增大石榴皮多酚的溶解度,同时有利于药物浓度的测定。该制剂的小鼠离体透皮实验显示:石榴皮多酚凝胶有良好的经皮渗透性。小鼠离体皮肤应采用同一部位,如腹部,保持试验条件的一致;皮肤不可剪破,皮肤应与扩散池中的液体密切接触,防止气泡产生,否则影响经皮渗透,可将吸收液预先超声脱气。

[参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S]. 2005:63,附录 VA:28.
- [2] 中华人民共和国卫生部药品标准·维吾尔药分册[M]. 乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,1999:18.
- [3] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会.中国植物志.第 52 卷第 2 分册[M].北京:科学出版社,1983:120.
- [4] 刘延泽,李海霞.石榴皮中的鞣质及多元酚类成分[J].中草药,2007,38(4):502.
- [5] 王如峰,向兰,杜力军,等.石榴的化学成分[J].亚太传统医药,2006(3):61.
- [6] 李海霞,王钊,刘延泽.石榴科植物化学成分及药理活性研究进展[J].中草药,2002,33(8):765.
- [7] 中华人民共和国卫生部药政局.新药(西药)临床前研究指导原则汇编(药理学、毒理学)[S],1993.
- [8] 杨淑清,郭咸希.补骨脂素脂质体凝胶的皮肤渗透性研究[J].中国药师,2007,10(9):845.
- [9] Murthy K N, Reddy V K, Veigas J M, et al. Study on wound healing activity of Punica granatum peel[J]. Med Food,2004,7(2):256.
- [10] 陈定雄,李玉林.自拟复方石榴皮煎剂外洗为主治疗慢性体表性溃疡[J].广西中医药,1994,4:5.

[责任编辑 全燕]