

· 工艺与制剂 ·

pH 对马钱子碱经皮吸收性质与抗炎作用的影响

李磊^{1,2,3}, 陈军¹, 蔡宝昌^{1,2,3*}, 祁艳^{1,2,3}

(1. 南京中医药大学药学院, 南京 210029; 2. 江苏省中药炮制重点实验室, 南京 210029;
3. 国家教育部中药炮制规范化及标准化工程研究中心, 南京 210029)

[摘要] 目的: 考察不同 pH 对马钱子碱油水分配系数、体外经皮吸收性质与抗炎作用的影响。方法: 测定马钱子碱在 pH 5, 7.4, 9 的磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 中的油水分配系数和体外经皮吸收速率; 用二甲苯致小鼠耳壳肿胀, 分别测定马钱子碱在 pH 5, 7.4, 9 的 PBS 中对肿胀的抑制作用。结果: 与 pH 5 相比, 马钱子碱在 pH 9 的 PBS 中的油水分配系数和经皮吸收速率显著提高, 分别为 239.5 倍和 3.15 倍, 且对小鼠耳肿胀的抑制作用明显增强。结论: 增大 pH 可提高马钱子碱的油水分配系数及体外透皮性质, 促进马钱子碱的经皮吸收, 并且有利于抗炎作用的发挥。

[关键词] 马钱子碱; 油水分配系数; 抗炎; 经皮吸收

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)14-0001-04

Effect of pH on Transdermal Absorption Characteristics and Anti-inflammatory Activities of Brucine

LI Lei^{1,2,3}, CHEN Jun¹, CAI Bao-chang^{1,2,3*}, QI Yan^{1,2,3}

(1. Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China; 2. Jiangsu Key Laboratory of Chinese Medicine Processing, Nanjing 210029; 3. Engineering Center of State Ministry of Education for Standardization of Chinese Medicine Processing, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To study the influence of different pH on the oil-water partition coefficient, transdermal absorption characteristics and the anti-inflammation effect of brucine solution. **Method:** The oil-water partition coefficients and the permeation rates of brucine in pH 5, 7.4 and 9 phosphate buffer solution (PBS) were measured; The effects of brucine in pH 5, 7.4 and pH 9 on the inflammatory edema of ear induced by xylol in mice were also determined. **Result:** The oil-water partition coefficient and permeation rate of brucine in pH 9 were (22.17 ± 0.4) and $(2.84 \pm 0.10) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$, which was almost 239.5 times and 3.15 times more than the corresponding data obtained under pH 5 PBS. The effect of inhibiting the inflammatory edema in the ear of mice induced by xylol was also markedly increased under pH 9. **Conclusion:** The oil-water partition coefficient and transdermal absorption characteristics of brucine can be improved by increasing pH, which also markedly promotes the anti-inflammatory activities of brucine.

[Key words] brucine; oil-water partition coefficient; anti-inflammation; transdermal absorption

[收稿日期] 20100609(012)

[基金项目] “重大药物创制”科技重大专项(2009ZX09103-342)

[第一作者] 李磊, 硕士研究生, Tel: 025-86798281, E-mail: lil-eichengnana@126.com

[通讯作者] * 蔡宝昌, 教授, 博士生导师, 主要研究方向中药炮制理论和炮制机制研究, 联系电话: 025-86798281, E-mail: bccai@126.com

中药马钱子具有通络止痛、散结消肿等功效。历代医家常用于风湿及类风湿性关节炎, 跌打损伤, 痈疽肿痛等疾病的治疗。其中马钱子碱和土的宁为马钱子的 2 种主要吲哚类生物碱有效成分。药理研究表明, 与土的宁相比, 马钱子碱毒性小而活性强, 具有抗炎^[1], 镇痛^[1], 抗肿瘤^[2]等作用。

由于马钱子碱具有一定的中枢神经毒性^[3], 制

成经皮给药制剂后可以既发挥局部治疗作用,又减少吸收入血的药量从而降低全身毒性。本试验主要考察了马钱子碱游离药物溶液在 3 种 pH 条件下的油水分配系数、体外经皮吸收性质,并比较了其相应的对二甲苯致小鼠耳肿胀的抑制作用,为马钱子碱经皮制剂的处方设计提供科学依据。

1 材料

HP1100 Series 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);SHZ-88 台式水浴恒温振荡器(江苏太仓市实验设备厂);YXJ-2 型高速离心机(常州国华电器有限公司);AG-285 电子天平(瑞典 METTLER 公司);PHS-3C pH 计(上海康仪仪器有限公司)。

马钱子碱(自提,经 HPLC 归一化法测得纯度 > 90%);马钱子碱对照品(中国药品生物制品检定所,110706-200505);庚烷磺酸钠(山东禹王实业有限公司禹城化工厂,2009041503);云南白药酊(云南白药集团股份有限公司);二甲苯(南京化学试剂一厂);直径 6 mm 打孔器;乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

SD 大鼠,雄性,220 ~ 250 g,合格证号:SCXK(浙)2008-0033,由浙江省实验动物中心提供。ICR 小鼠,雌雄各半,体重 18 ~ 22g,合格证号:SCXK(苏)2007-0001,由扬州大学比较医学中心提供。

2 方法

2.1 色谱条件 色谱柱 Licrospher C₁₈(4.6 mm × 300 mm, 5 μm);流动相乙腈-0.01 mol·L⁻¹庚烷磺酸钠与 0.02 mol·L⁻¹磷酸二氢钾等量混合溶液(用质量分数为 10% 的磷酸调 pH2.8)(25:75);检测波长 264 nm;流速 1.0 mL·min⁻¹;柱温 30 °C;进样量 20 μL。

2.2 马钱子碱标准曲线 取马钱子碱对照品适量,精密称定,用甲醇溶解并制得 0.01 g·L⁻¹的储备液。分别精密吸取储备液适量,置 6 个 10 mL 量瓶中,用甲醇定容得 1.03, 5.15, 10.3, 20.6, 30.9, 41.2 mg·L⁻¹ 的系列标准溶液,进样测定峰面积。以马钱子碱浓度(X)对峰面积(Y)作线性回归。直线回归方程为:Y = 30.579X - 5.868 7 (r = 0.999 9)。可见在 1.03 ~ 41.2 mg·L⁻¹, 马钱子碱质量浓度和峰面积线性关系良好。

2.3 精密度考察 分别取 1.03, 20.6, 41.2 mg·L⁻¹ 马钱子碱对照品溶液,每一质量浓度连续进样 6 次,记录峰面积,计算其日内精密度。分别于每日进样

测定 1 次,记录峰面积,连续测定 5 d,考察日间精密度。低、中、高 3 个质量浓度的日内精密度分别为 1.43%, 0.71%, 1.08% (n = 6), 日间精密度分别为 2.89%, 1.06%, 1.43% (n = 6)。

2.4 油水分配系数的测定

2.4.1 马钱子碱样品溶液的配制 取马钱子碱适量,精密称定,置 25 mL 量瓶中,用经正辛醇预饱和的 pH 7.4 PBS 定容至刻度,混匀;使马钱子碱对照品质量浓度为 0.2 g·L⁻¹。同理配制 pH 5 和 9 的马钱子碱 PBS 溶液。

2.4.2 马钱子碱的油水分配系数的测定 精密量取一定体积的马钱子碱样品溶液,加入相同体积的 pH7.4 PBS 预饱和的正辛醇,平行 5 份操作,32 °C 恒温水浴振荡,于 120 min 后分取下层 pH7.4 PBS,测定马钱子碱质量浓度 C_水。并根据已知样品溶液初始浓度 C₀ 计算 32 °C 时的油水分配系数 P。

$$P = C_{\text{正辛醇}} / C_{\text{水}} = (C_0 - C_{\text{水}}) / C_{\text{水}}$$

同法平行测定 pH 5 和 9 的马钱子碱的油水分配系数。

2.5 体外经皮吸收性质考察

2.5.1 离体皮肤的制备 大鼠处死后,机械脱毛,剪下腹部皮肤,小心去除皮下组织和脂肪,生理盐水清洗干净,立即使用。

2.5.2 体外经皮吸收试验 将大鼠皮肤自然固定在改良的 Franz 扩散池上,有效扩散面积为 3.14 cm²,接收室体积为 7 mL,使皮肤表面面向供药室,皮肤里层与接受液刚好接触。供给室中加入马钱子碱的 pH 7.4 PBS 溶液,质量浓度为 0.2 g·L⁻¹,接受液为脱气并 32 °C 预热的乙醇体积分数为 20% 的生理盐水。接受室水浴温度为 32 °C,磁力搅拌转速为 500 r·min⁻¹,供药室加入药液后封闭,分别于 0.5, 0.45, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h 定时取样 0.4 mL, 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液测定马钱子碱浓度,每次取样后均补加同等体积同温度的乙醇体积分数为 20% 的生理盐水。同法测定在 pH 为 5 和 9 中马钱子碱的体外透皮性质,平行 3 份操作。按下式计算单位面积累积透过量 Q(μg·cm⁻²),从而得出不同时间单位面积马钱子碱溶液的累积透皮吸收量。

$$Q = (V \times C_n + V_0 \sum C_i) / A$$

式中,Q:单位面积累积透过量(μg·cm⁻²);A:有效经皮吸收面积(cm²);V:接受液体积(mL);V₀:取样体积(mL);C_n:第 n 个取样点测得的接受液中药

物浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); C_i 第 i ($i \leq n-1$) 个取样点测得的接受液中药物浓度 ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)。以不同时间的 Q (平均值) 对时间 t 作图, 并对作图后直线部分的 Q 对时间 t 进行线性回归, 所得斜率即为药物的经皮吸收速率 J ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$)。

按下式计算累积透过百分率 $Q\%$:

$$Q\% = Q_{12\text{h}} \times A / Q_r$$

式中 Q_r : 供给室中加入的总药量; $Q_{12\text{h}}$: 12 h 的药物累积透过总量。

2.6 不同 pH 马钱子碱溶液对二甲苯所致小鼠耳壳炎症的影响

2.6.1 马钱子碱溶液的配制

称取马钱子碱适量, 分别用含 20% 乙醇的 pH 5, 7.4 和 9 的 PBS^[4] 溶解, 使质量浓度均为 $5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.6.2 分组及剂量

取 18 ~ 22g 的小鼠 50 只, 随机分为 5 组, 每组 10 只, 分别为空白对照组 (生理盐水), 阳性对照组 (云南白药酊), 3 种不同 pH 的马钱子碱组, 给药剂量均为 $30\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.6.3 试验过程

将小鼠右耳涂抹 $50\mu\text{L}$ 二甲苯, 左耳不涂作为对照, 30 min 后各组小鼠右耳涂抹相应的药物, 给药组分别给予相应的 pH 5, 7.4 和 9 的马钱子碱磷酸盐缓冲溶液 (含 20% 乙醇), 空白对照组给予等量生理盐水, 共给药 3 次, 每次 $40\mu\text{L}$, 每次间隔 10 min, 末次给药 20 min 后处死小鼠, 沿耳廓剪下左右耳, 用直径 6 mm 的打孔器在左右耳相同部位打下耳片, 称重, 求左右耳质量差, 计算肿胀度和肿胀抑制率^[5], 与空白组进行组间比较。

耳肿胀度 = 右耳重 - 左耳重

肿胀抑制率 = (空白组平均耳肿胀度 - 给药组平均耳肿胀度) / 空白组平均耳肿胀度 $\times 100\%$

3 结果

3.1 马钱子碱的油水分配系数

马钱子碱对照品在 pH 5, 7.4, 9 缓冲溶液中的油水分配系数分别为 0.094 ± 0.0018 , 3.11 ± 0.02 , 22.17 ± 0.40 。马钱子碱在 pH 9 中的油水分配系数明显升高, 约为 pH 5 PBS 中的 235.9 倍, 提示提高 pH 可显著增大马钱子碱的油水分配系数。

3.2 马钱子碱的体外经皮性质

测定结果见图 1, 表 1。由试验结果可知, 与 pH 5 相比, 马钱子碱在 pH 9 时的经皮渗透速率和累积透过百分率显著提高, 约为 pH 5 时的 3.58 倍和 3.13 倍。提示提高马钱子碱溶液的 pH, 可显著提高马钱子碱的体外透皮性质。

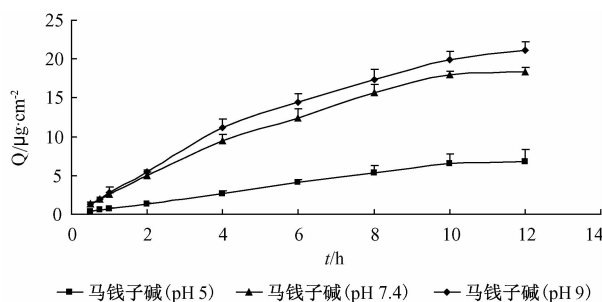


图 1 马钱子碱在不同 pH PBS 中不同时间的单位面积累积透过总量

表 1 马钱子碱在不同 pH PBS 中的经皮渗透速率及累计透过率

pH	Q-t 方程	r	$J/\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$	Q/%
5	$Q = 0.645 1t + 0.073 8$	0.9992	0.65 ± 0.14	21.20 ± 2.23
7.4	$Q = 2.328 8t + 0.206 3$	0.9997	2.33 ± 0.43	56.73 ± 1.58
9	$Q = 2.835 3t - 0.166 7$	0.9998	2.84 ± 0.10	66.27 ± 3.48

3.3 马钱子碱溶液对二甲苯所致小鼠耳壳炎症的影响

测定结果见表 2。由表 2 可知, pH 5 时马钱子碱的抗炎作用不明显, pH 7.4 和 9 时马钱子碱溶液均具有确切的抗炎作用, 且马钱子碱 pH 9 的 PBS 抗炎作用强于马钱子碱 pH 5 的 PBS。

表 2 不同 pH 的马钱子碱缓冲溶液对小鼠耳廓肿胀的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 ($\mu\text{L}/\text{只}$)	肿胀度/mg	抑制率/%
空白对照	120	5.05 ± 1.02	
云南白药酊	120	$2.17 \pm 0.57^{1)}$	57.0
马钱子碱 (pH 5)	120	4.26 ± 1.85	15.6
马钱子碱 (pH 7.4)	120	$2.89 \pm 1.02^{2)}$	42.7
马钱子碱 (pH 9)	120	$2.18 \pm 0.86^{3)}$	56.8

注: 与空白组相比, ¹⁾ $P < 0.01$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

本文在马钱子碱溶液抗炎试验中前期分别考察了 15, 30, 60 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 3 个剂量的马钱子碱含 20% 乙醇的 pH 7.4 PBS 溶液抗炎效果, 根据试验结果确定马钱子碱溶液抗炎作用的有效剂量为 $30\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 且 3 个剂量组没有明显的量效关系。

马钱子碱油水分分配系数和体外经皮性质的考察表明, pH 对马钱子碱的体外透皮性质影响显著。油水分分配系数通常用来评价药物的脂溶性, 脂溶性较大的游离型药物更容易透过皮肤的角质层屏障^[6], pH 升高至 9, 马钱子碱多以游离状态存在, 脂溶性提高, 透皮吸收效果好。但应该注意的如果药物脂

(下转第 8 页)

2.8 葛根芩连汤配方颗粒剂中试样品含量测定及转移率计算 3 批葛根芩连汤配方颗粒样品照 1.3.2 方法制备样品,照 1.4 法进行色谱分析,记录并计算,结果见表 8。

表 8 葛根芩连汤配方颗粒 3 批中试样品含量测定及转移率结果 %

批号	葛根素	黄芩苷	小檗碱	转移率		
				葛根素	黄芩苷	小檗碱
0506006	2.78	5.78	2.29	65.8	67.2	72.9
0506007	2.72	5.58	2.25	66.7	67.1	74.2
0506008	2.68	5.55	2.25	65.6	66.7	74.1

结论:葛根芩连汤配方颗粒 3 批工艺中试样品的葛根素、黄芩苷和小檗碱平均转移率均大于 65%。

3 讨论

由于处方中药味较多,本文中选取葛根、黄芩和黄连的主要指标性成分葛根素、黄芩苷和盐酸小檗碱的含量及干膏得率为评价指标对葛根芩连汤配方颗粒的提取工艺进行优选。根据成分极性不同,用梯度洗脱同时测定了葛根素、黄芩苷和盐酸小檗碱的含量。从试验结果可以看出,葛根芩连汤配方颗粒 4 味药材合煎会降低黄连指标性成分盐酸小檗碱的含量,其主要原因是盐酸小檗碱能与黄芩苷等成分形成沉淀,因此本研究采用葛根、黄芩和甘草 3 药合煎,黄连单煎的工艺。另外黄连原药材直接提取不

利于盐酸小檗碱的溶出,因此选用黄连饮片。最后根据工艺小试及中试试验结果确定葛根、黄芩和甘草 3 药合煎的最佳提取工艺为加水量第 1 煎 10 倍,第 2 煎 8 倍;提取 1.5 h;提取 2 次;黄连单煎的最佳提取工艺为加水量第 1 煎 12 倍,第 2 煎 10 倍;提取 1.5 h;提取 2 次。

[参考文献]

[1] 熊曼琪. 伤寒论[M]. 北京:人民卫生出版社,2000:1.

[2] 黄泰康,施诚. 中药方剂现代研究大典[M]. 北京:科学技术出版社,1996:1.

[3] 陈丽红,王强. 葛根芩连汤不同配伍对黄芩苷、小檗碱含量的影响[J]. 西北药学杂志,2005,20(4):147.

[4] 陈丽红,王强,刘济宁,等. 葛根芩连汤配方颗粒主要标志成分含量分析及指纹图谱研究[J]. 分析化学,2006,6(8):1109.

[5] 李奉勤,韩月芝,范文成,等. 正交试验研究仙方活命胶囊的最佳生产工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2007,13(2):18.

[6] 刘俊亭,申庆亮. 正交设计法研究益肾坚骨胶囊的最佳生产工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2001,7(1):8.

[责任编辑 全燕]

(上接第 3 页)

溶性太强也难以透过亲水性的活性表皮和真皮层。本试验中采用小鼠耳壳炎症模型证明了马钱子碱在 pH 9 时的抗炎效果明显好于 pH 5,从而说明提高马钱子碱溶液的 pH 至 9,油水分配系数大大提高,透皮吸收效果没有降低。从试验结果值得考虑的是与体外透皮试验提高程度相比,抗炎效果并未显现出相应程度的提高,这有可能是体外透皮试验只能估计其体内吸收性^[7],与动物在体经皮吸收情况还是有一定差距。

本试验提示在设计马钱子碱经皮制剂时,提高马钱子碱的 pH 值,使成为游离状态,有可能提高马钱子碱的透皮吸收,从而更好的发挥药效。需要注意的是,正常人皮肤所能承受的 pH 为 5~9,将马钱子碱经皮制剂的 pH 提高到 9,还处于皮肤的耐受范围之内,是否存在对皮肤的刺激性还需要进一步考察。

[参考文献]

[1] 简江波,袁媛,杨柏灿,等. 皮肤外用纳米马钱子碱脂质体的镇痛抗炎作用[J]. 中成药,2006,28(12):1778.

[2] 邓旭坤,蔡宝昌,殷武,等. 马钱子碱对小鼠肿瘤的抑制作用[J]. 中国天然药物,2005,11(3):392.

[3] 吴贤仁,陈运立,陈协辉. 大剂量马钱子中毒致呼吸心跳骤停 1 例[J]. 汕头大学医学院学报,1999,12(1):37.

[4] 胡巍,陈军,蔡宝昌. 马钱子碱与土的宁体外经皮渗透性质的考察[J]. 中国新药杂志,2008,17(12):1053.

[5] 曲香芝,庄桂兰,金正男,等. 朝鲜槐树皮的抗炎作用[J]. 延边医学院学报,1996,19(2):18.

[6] 梁文权. 生物药剂学与药物动力学[M]. 北京:人民卫生出版社,2003:67.

[7] 郑俊民. 经皮给药新剂型[M]. 北京:人民卫生出版社,2006:473.

[责任编辑 全燕]