

# 汉方抗痘凝胶制备工艺研究

廖 夔, 蒋德锡, 王沼丹, 张 婧, 杨玉霞, 张大明, 唐 蕾, 何 勤\*  
(四川大学华西药学院靶向药物与释药系统教育部重点实验室, 四川 成都 610041)

[摘要] 目的: 筛选以中药汉方为组方依据的抗痘凝胶的最佳制备工艺。方法: 采用  $L_9 3^3$  正交设计, 以黄芩苷含量和抑菌效果为指标, 筛选最佳提取工艺; 通过 HPLC 法测定透皮实验中药物透过大鼠皮到达接收液中黄芩苷的含量, 以其为指标采用  $L_9 2^3$  正交设计筛选汉方抗痘凝胶剂渗透促进剂用量。结果: 最佳提取工艺: 10 倍量 60% 乙醇, 提取 2 次, 每次 1.5 h; 卡波姆为凝胶基质, 35% 的丙二醇和 2% 的氮酮为渗透促进剂制备抗痘凝胶。结论: 该优选制备工艺稳定合理。

[关键词] 痤疮; 提取; 凝胶; 抑菌实验; 透皮促进剂

[中图分类号] R286.3 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2009)05-0032-03

粉刺是由于青春期雄性激素的分泌量增多, 导致皮脂分泌量增多, 形成栓塞, 再经继发性感染所引起的慢性化脓性毛囊炎。中医中药对面部寻常痤疮的治疗有其一定优势。《慈禧光绪医方选议》中记载了以黄芩、苦参等四味药材组成的清宫女抗痘方, 本研究拟将此方依据, 对其制备工艺进行筛选, 研制成使用方便且能较大程度发挥治疗作用的汉方抗痘凝胶。将制备工艺实验分为药材提取工艺和抗痘凝胶剂处方的筛选。

## 1 仪器、试剂及动物

Alltech 高效液相色谱仪 (Alltech, USA), 色谱柱 (Diamonsil 钻石  $C_{18}$  200 mm × 4.6 mm, 5  $\mu$ m); TK-12A 型 Franz 透皮扩散实验仪 (上海锴凯科技贸易有限公司); BP211D 型电子天平 (德国 Sartorius 公司); 隔水

式电热培养器 (上海市跃进医疗器械厂); YJ-1450 医用净化工作台; 甲醇 (HPLC, Fisher); 黄芩苷对照品 (中国药品生物制品检定所); 氮酮 (山西省芮城兴庆化工厂); 卡波姆 (Carbopol 934P); 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) (上海医药工业研究院); 甲醇为色谱纯, 其余试剂均为分析纯。Wistar 大鼠 (♀ ♂, 四川大学华西实验动物中心)。

## 2 方法与结果

### 2.1 提取工艺研究

2.1.1 正交实验设计 根据单因素实验结果, 选用 60% 乙醇作提取溶剂, 加热回流提取。选用影响提取效果的: 乙醇用量 (A)、提取时间 (B) 及提取次数 (C) 为考察因素。以黄芩苷含量, 抑菌分数为指标, 设计  $L_9 3^3$  正交实验。

2.1.2 HPLC 测定黄芩苷的含量 色谱条件<sup>[1]</sup>: 甲醇-0.1% 磷酸水溶液 (40: 60), 三乙胺调 pH 至 7.2 左右, 检测波长 220 nm, 柱温 30  $^{\circ}$ C, 进样量 15  $\mu$ L, 流速 1 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>, 理论板数以黄芩苷峰计算应不低于 2 500。以峰面积对浓度作图绘制标准曲线, 在 48.7

[收稿日期] 2008-09-01

[通讯作者] \* 何 勤, Tel: (028) 85502532; E-mail: qinhe317@126.com

~ 146.1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  浓度范围内线性关系良好, 回归方程为  $Y = 55\,989X + 860.44$  ( $r = 0.999\,9$ ), 精密度 RSD 为 0.25%, 平均回收率 98.95%, RSD 1.57%。

**2.1.3 抑菌实验** 将 9 份提取液等量稀释 2 倍, 4 倍, 8 倍, 16 倍, 分别吸取原液和上述稀释液各 2 mL 于培养皿中, 加入 18 mL MH 肉汤培养基, 37 °C 恒温孵箱中放置 16 h, 观察各药基, 在确保其未污染情况下, 分别接种金黄色葡萄球菌 41 (MRSA)、23 (MSSA)、29 (MSSA)、表皮葡萄球菌 19 (MSSE), 37 °C 恒温孵箱中培养 16 h 观察细菌生长情况, 根据 9 份提取物对以上 4 种细菌的抑制情况打分, 在 16 倍、8 倍、4 倍、2 倍稀释液及原液中有抑制的分别计分为 5、4、3、2、1 分, 累计每份提取液对 4 种细菌的抑制分数, 结果见表 1。

表 1 抑菌实验结果

试验号	实验结果				
	金黄色葡萄球菌 41 (MRSA)	金黄色葡萄球菌 23 (MSSA)	金黄色葡萄球菌 29 (MSSA)	表皮葡萄球菌 19 (MSSE)	分数
1	1	1			2
2	1	1	1		3
3	1	1	1	1	4
4	2	2	1		5
5	2	2		1	5
6	2	1		1	4
7	3	2	1	2	8
8	4	3	1	2	10
9	5	3	1	4	13

**2.1.4 正交实验结果** 正交实验结果见表 2。

由实验结果可以看出, 黄芩苷含量和抑菌分数相关, 因此以黄芩苷含量为指标对正交实验结果进行方差分析, 结果见表 2、表 3 和表 4, 各影响因素为  $A > B > C$ , 即乙醇用量的影响最大, 其次是提取时间, 最后是提取次数, 综合极差数据、抑菌实验结果, 确定工艺条件路线为  $A_3B_3C_2$ , 即: 10 倍量 60% 乙醇, 提取 2 次, 每次提取 1.5 h。

**2.1.5 工艺验证实验** 按照优化的工艺条件, 进行 3 次重复实验加以验证, 平均黄芩苷含量为 2.69%, RSD 为 1.89%, 抑菌分数 13 分, RSD 为 1.25%, 说明正交设计筛选的工艺是稳定合理的。

**2.2 抗痘凝胶剂处方筛选及制备工艺**

**2.2.1 凝胶基质的筛选** 常用的凝胶基质有卡波姆、瓜儿豆胶、壳聚糖和 CMC-Na 等<sup>[2]</sup>, 筛选结果见表 5。

表 2 正交实验结果

试验号	因素			评价指标	
	A 溶剂用量 (倍)	B 提取时间 (h)	C 提取次数 (次)	黄芩苷含量 (%)	抑菌总分 (分)
1	6	0.5	1	2.07	2
2	6	1	2	2.16	3
3	6	1.5	3	2.24	4
4	8	0.5	2	2.50	5
5	8	1	3	2.54	5
6	8	1.5	1	2.37	4
7	10	0.5	3	2.60	8
8	10	1	1	2.66	10
9	10	1.5	2	2.71	13
黄芩苷量 $K_1$	8.64	9.57	9.46		
$K_2$	9.88	9.81	9.83		
$K_3$	10.63	9.76	9.85		
R	1.99	0.24	0.39		
细菌分数 $K_1$	3	5	5		
$K_2$	5	6	7		
$K_3$	10	7	6		
R	7	2	2		

表 3 黄芩苷含量方差分析

变异来源	离均差平方和 SS	自由度	F	P 值
SS <sub>A</sub>	0.383 03	2	29.863 6	< 0.05
SS <sub>B</sub>	0.016 83	2	1.312 2	> 0.1
SS <sub>C</sub>	0.006 69	2	0.521 6	> 0.1
SS <sub>误</sub>	0.012 83	2		

表 4 抑菌分数方差分析

变异来源	离均差平方和 SS	自由度	F	P 值
SS <sub>A</sub>	89	2	18	0.5 < P < 0.1
SS <sub>B</sub>	6	2	1.2	> 0.1
SS <sub>C</sub>	4	2	0.8	> 0.1
SS <sub>误</sub>	5	2		

表 5 凝胶基质筛选

考察项	凝胶基质				
	卡波姆	瓜儿豆胶	壳聚糖	CMC-Na	明胶
pH 值	6~ 11	6~ 8	4.5~ 6.5 未成凝胶	7 以上成糊状	6~ 8
黏度	适中	较大	-	较大	大
是否与主药反应	否	与药反应生成絮状物	-	否	否
外观	好, 成半透明状凝胶	不好	-	不好, 干后成小块模脱落	不好

选择卡波姆为凝胶基质。

**2.2.2 透皮实验<sup>[3]</sup>** Wistar 大鼠用小剪刀小心剪去腹部毛,断颈处死;用镊子钝性分离腹部已去毛皮肤;将分离的皮肤用生理盐水洗净,小心剔除皮下组织和结缔组织,采用 Franz 扩散池装置( $S = 2.8 \text{ cm}^2$ ,  $V = 7.0 \text{ mL}$ ),将处理好的皮肤固定于水平扩散池接口处,使角质层面向给药室。开动恒温水浴循环( $32 \pm 1$ ) $^\circ\text{C}$ 和磁力加热搅拌器( $200 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ ),开始计时;分别在 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 6, 8 h 从接收室内取样 0.5 mL,并补充等体积  $32 \text{ }^\circ\text{C}$  的接收介质,样品经 HPLC 测定黄芩苷浓度,计算黄芩苷单位面积累积透皮量。

**2.2.3 正交实验筛选渗透促进剂** 单因素筛选渗透促进剂种类实验表明,以丙二醇和氮酮联合应用更加有利于指标成分黄芩苷的渗透。氮酮常用量为 1%~10%,丙二醇常用量为 30%~70%,为确定渗透促进剂丙二醇、氮酮的用量,设计  $L_9 2^3$  正交实验。

**2.2.4 正交实验结果** 实验结果见表 6。

表 6 正交实验表

实验号	因素				评价指标 黄芩苷累积 渗透量( $\mu\text{g}$ )
	A		B		
	丙二醇(%)	丙二醇(g)	氮酮(%)	氮酮(g)	
1	35	3.5	2	0.19	53.89
2	35	3.52	5	0.49	39.02
3	35	3.51	8	0.81	30.41
4	50	5.01	2	0.21	46.18
5	50	5	5	0.5	42.35
6	50	5	8	0.81	57.61
7	65	6.5	2	0.2	33.81
8	65	6.5	5	0.5	28.35
9	65	6.49	8	0.81	30.16
0	0	-	0	-	15.34

表 7 黄芩苷 8 h 累积透皮量方差分析

变异来源	离均差平方和 SS	自由度	F	P 值
SS <sub>A</sub>	486.213 52	2	1.502 17	> 0.1
SS <sub>B</sub>	100.268 65	2	0.309 78	> 0.1
SS <sub>误</sub>	323.674 11	2		

以黄芩苷累积渗透量为指标,对正交实验结果进行方差分析,丙二醇和氮酮无显著性影响,为使单位量凝胶中药物浓度更高,并综合考虑成本因素,确定处方为  $A_1 B_1$ ,即:丙二醇用量为处方量的 35%,氮酮用量为处方量的 2%。

**2.2.5 抗痘凝胶制备工艺** 抗痘凝胶制备工艺为:将一份卡波姆,5份甘油,加水至卡波姆浓度为 1%。静置溶胀过夜,三乙醇胺调 pH 5.5~6.5,加入基质量 35% 的丙二醇和 2% 的氮酮制备成凝胶基质,每 10 g 基质与 3 mL 药液混合均匀,即得。

**2.3 初步质量评价** 本品为黄色透明黏稠状胶体;pH 值为  $6.0 \pm 0.2$ ,符合人体皮肤 pH 值 4.5~6.5;取本品 10 g 置于离心管中,以  $4\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 40 min 后无分层现象;取本品适量,分别装于密闭小瓶中,放于  $55 \text{ }^\circ\text{C}$  湿箱中恒湿 24 h,置冰箱  $-10 \text{ }^\circ\text{C}$  中放置 24 h,外观、色泽、均匀性、稠度等都不变,且无酸败、分层、变质现象<sup>[4]</sup>。表明本品稳定性较好。

### 3 讨论

**3.1** 在提取工艺正交实验中,选用了抑菌分数作为考察指标,是本实验的一大特色。痤疮的主要致病菌为表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌,将不同提取方法所得到的提取液作细菌抑制实验,从实验结果可以看出,指标成分黄芩苷的含量越高,抑菌分数越高,因此最终选用黄芩苷为指标优化提取工艺。

**3.2** 为了排除抑菌实验中醇提液中乙醇对实验结果的影响,设计了阴性对照实验:将 60% 的乙醇对四种细菌做抑菌实验,发现其仅对金黄色葡萄球菌 41 (MRSA) 有轻微的抑制作用,对药品的抑菌效果的干扰极小。

**3.3** 在透皮实验中,选择生理盐水作为接收液,可减少乙醇接收液对鼠皮的刺激作用,并避免其对皮肤细胞结构和通透性的改变,能较好的模拟人体皮肤渗透状况。并且有效成分在生理盐水和 20%、40%、60%、80% 的乙醇溶液中的渗透性能无显著性差异,故选取了生理盐水作为接收液。

### [参考文献]

[1] 黄志勤,李小波,程齐来.高效液相色谱法优选黄芩中黄芩苷的提取工艺研究[J].四川中医,2007,25(2):54-55.

[2] 陆彬.药物新剂型与新技术[M].北京:人民卫生出版社,2005.5.

[3] 刘辉,汤韧,张宜.奥沙普秦凝胶剂体外透皮实验条件及促渗剂的选择[J].中国药房,2001,12(6):331-333.

[4] 陈枝岚,李力,刘强.复方中草药凝胶的制备和质量控制[J].制剂技术,2006,15(10):32-33.