

氮酮对跌打活络微乳喷雾剂体外透皮吸收影响的研究

王利胜*, 赖宝林, 吴阳, 周莉玲

(广州中医药大学 药剂教研室, 广州 510006)

[摘要] 目的: 考察不同浓度的渗透促进剂氮酮对跌打活络微乳喷雾剂中蛇床子素和水杨酸甲酯体外透皮吸收的影响。方法: 采用 Franz 扩散池和离体裸鼠皮肤进行体外透皮实验, HPLC 同时测定处方中蛇床子素和水杨酸甲酯的渗透量, 并计算透皮速率常数、滞后时间。结果: 蛇床子素和水杨酸甲酯的体外透皮吸收均符合零级动力学方程; 随着氮酮浓度的增加, 蛇床子素和水杨酸甲酯的释放速度有降低趋势。结论: 本制剂微乳和挥发油本身具有良好的促渗作用, 无需另外加入氮酮。

[关键词] 跌打活络微乳喷雾剂; 氮酮; 蛇床子素; 水杨酸甲酯; 透皮吸收

[中图分类号] R 283.6 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)06-0026-04

Effect of Azone on Transdermal Absorption *in vitro* of Dieda Huoluo Microemulsion Spray

WANG Li-sheng*, LAI Bao-lin, WU Yang, ZHOU Li-ling

(Department of Pharmaceutics, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of different dosage azone on transdermal absorption *in vitro* of osthol and methyl salicylate in Dieda Huoluo Microemulsion Spray. **Method:** The experiment of percutaneous penetration *in vitro* was operated with the methods of Franz diffusion cell and hairless mice skin, and the penetration quantity of osthol and methyl salicylate was determined by HPLC, and calculate the transdermal rate and lag time. **Result:** The releasing permeated amount of osthol and methyl salicylate *in vitro* followed the zero releasing equation. The results showed that the transdermal rate was slower as increased the dosage of azone. **Conclusion:** The formulation of microemulsion and volatile oil in preparation contributed to the good transdermal absorption *in vitro* of osthol and methyl salicylate. It's not necessary to add azone to the preparation.

[Key words] Dieda Huoluo Microemulsion Spray; azone; osthol; methyl salicylate; transdermal absorption

跌打活络微乳喷雾剂由蛇床子、红花、水杨酸甲酯、薄荷油等几味中药组成, 具有活血化瘀、消肿止痛、收敛生肌的功效, 主要用于治疗跌打损伤、水火烫伤、扭伤等症^[1]。微乳(Microemulsion)是由水相、油相、表面活性剂和助表面活性剂按适当比例自发形成的一种透明或半透明的、低黏度的、各向同性且热力学和动力学稳定的纳米级溶液体系。微乳作为新型经皮给药的载体具有稳定性高、透皮速度快、生

物利用度高, 以及可避免肝脏的“首过效应”和胃肠道的破坏等优点, 是现代制剂研究的热点之一。经皮制剂通常需要加入促渗剂促进有效成分透皮吸收, 以便更好地发挥药效。本试验考察不同浓度的氮酮对本制剂中有效成分蛇床子素以及水杨酸甲酯体外透皮吸收的影响, 为临床应用和优化制剂处方提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1100 高效液相色谱(美国); GR-202AND 分析天平(日本); TK-12A 型透皮扩散试验仪, 7 mL 立式玻璃扩散池, 接口面积: 2.92 cm² (上海凯谱科技贸易有限公司)。

1.2 药品与试剂 蛇床子素、水杨酸甲酯对照品(中国药品生物制品鉴定所, 批号分别为 110822-200406, 110707-200710); 含不同浓度氮酮的跌打活

[收稿日期] 20100107(003)

[基金项目] 国家自然科学基金(30672669)

[通讯作者] * 王利胜, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 中药新剂型、新药研究, E-mail: wlis68@126.com

络微乳喷雾剂(自制);氮酮(药用,天津市津科精细化工研究所);甲醇为色谱纯;其他试剂均为分析纯。

1.3 动物 BALB/C 裸鼠(5 周),雄性[广州中医药大学实验动物中心提供,动物许可证号 SCXK(粤)2008-0020]。

2 方法与结果

2.1 离体经皮渗透试验方法的建立

2.1.1 色谱条件 色谱柱 Diamonsil 钻石 C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相甲醇:水(80:20);流速 1.0 mL·min⁻¹;检测波长 322 nm;进样量 10 μL。

2.1.2 线性范围的考察

2.1.2.1 对照品储备溶液的制备 精密称取蛇床子素、水杨酸甲酯适量,用无水乙醇分别制成每 1 mL 含蛇床子素 0.200 mg、水杨酸甲酯 0.628 mg 的溶液,摇匀,作为对照品储备溶液。

2.1.2.2 蛇床子素线性关系的考察 精密吸取蛇床子素对照品储备溶液 1 mL,用无水乙醇稀释定容至 100 mL,精密吸取 0.4,0.5,1.0,2.0,3.0,5.0 mL,分别用无水乙醇稀释定容至 10 mL,精密吸取 10 μL,按照上述色谱条件进行测定。以蛇床子素的浓度(μg·mL⁻¹)(*X*)和相应峰面积积分值(*Y*)进行线性回归,得到蛇床子素的标准曲线方程为 $Y = 35.203X - 0.5516$, $r = 0.9997$,蛇床子素含量在 0.8~10 ng 线性关系良好。

2.1.2.3 水杨酸甲酯线性关系考察 精密吸取水杨酸甲酯对照品储备液 0.2,0.5,1.0,1.5,2.0,2.5 mL,分别用无水乙醇稀释定容至 25 mL,精密吸取 10 μL,按照上述色谱条件进行测定。以水杨酸甲酯的浓度(μg·mL⁻¹)(*X*)和相应峰面积积分值(*Y*)进行线性回归,得水杨酸甲酯的标准曲线方程 $Y = 6.7415X - 2.5057$, $r = 0.9999$,水杨酸甲酯含量在 0.05024~0.628 μg 线性关系良好。

2.1.3 精密度试验 分别取两种对照品溶液,重复进样 5 次,测定峰面积,蛇床子素的 RSD 1.2%,水杨酸甲酯的 RSD 0.20%,表明精密度良好。

2.1.4 稳定性试验 取同一样品液在 12 h 内,每隔 2 h 进样,测定蛇床子素和水杨酸甲酯的峰面积,计算 RSD,分别为 0.61% 和 0.84%,表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.1.5 回收率试验 分别向空白乳剂的接受液中加入一定量的蛇床子素和水杨酸甲酯对照品溶液,

以 0.45 μm 微孔滤膜滤过,去初滤液,取续滤液,测定峰面积,计算含量和回收率。结果蛇床子素和水杨酸甲酯的回收率分别为 100.04% 和 99.68%,RSD 分别为 1.35% 和 1.73%。

2.2 实验皮肤的制备 取 5 周龄 16~20 g 裸鼠,断颈处死,取其皮肤,用实验棉签仔细刮去皮下黏液组织及脂肪层,生理盐水冲洗数次,直至皮肤洗液无白色浑浊,皮肤为白色为止,锡箔纸包封,放入冰箱低温(-20℃)冷冻保存,实验前自然解冻,于 3 日内进行实验。每次实验前检查鼠皮的完整性,确保无任何破损。

2.3 离体试验方法设计 采用改良 Franz 扩散池,剪取适当大小、完整的皮肤固定在扩散池上,使角质层面向供给池,真皮层面向扩散池。接受室中注入 30% 乙醇生理盐水 7 mL(使用前超声脱气 30 min),供给池中加入 2 mL 乳剂,用石蜡密封供给池与接收池的结合部位,保持(32±0.5)℃ 恒温水浴,磁力搅拌保持约 200 r·min⁻¹,预平衡 1 h,分别于 2,4,6,8,10,12,14,16 h 时取出接受室中全部溶液,立即用新鲜接受液润洗,再加等体积、相同温度的新鲜接受液(注意保持皮肤下层与液面紧密接触并排除所有气泡)。样液以 0.45 μm 的微孔滤膜过滤,弃去前 1 mL 的初滤液,精密吸取续滤液 10 μL,按上述色谱条件测定扩散液中蛇床子素和水杨酸甲酯的含量,按以下公式计算各时间点的单位面积累积透过量(Q ,μg·cm⁻²)。

$$Q_n = (C_n \times 7 + \sum_{i=1}^{n-1} C_i \times 7) / A$$

式中, C_n :第 n 个取样点测得的药物质量浓度(μg·mL⁻¹); C_i :第 i ($i \leq n-1$) 个取样点测得的药物质量浓度(μg·mL⁻¹); A :有效透皮面积(2.92 cm²)。

2.4 结果 供给池内分别加入氮酮浓度为 0%,1%,2%,4%,6% 的跌打活络微乳喷雾剂进行体外透皮试验。不同浓度氮酮对水杨酸甲酯(M)、蛇床子素(O)的单位面积累积透过量(Q),结果见表 1,以 $Q-t$ 作图所得的体外透皮动力学曲线见图 1,2。

以各组分 Q 对时间 t (即对图 1,2 所得动力学曲线)进行线性回归得直线方程, r 为所得方程对零级动力学方程的拟合度,所得直线的斜率 J (μg·cm⁻²·h⁻¹)为稳态透皮速率常数,将稳态直线推至时间轴,得渗透时滞 T_{lag} (h),增渗比(ER)的计算以加 0% 氮酮组成分的透皮速率常数为参比,结果见表 2。

表 1 水杨酸甲酯和蛇床子素体外渗透动力学方程 ($n = 5$)

组分	Azone /%	$Q/\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$							
		2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h	14 h	16 h
M	0	102.23	205.42	305.88	403.16	497.97	583.80	658.52	738.44
	1	91.78	189.21	279.99	367.25	443.93	508.78	591.2	671.23
	2	68.21	148.25	220.88	298.58	373.87	439.79	505.00	564.62
	4	53.10	107.17	167.86	228.68	283.76	347.5	417.04	482.44
	6	42.22	90.55	142.49	196.19	254.51	309.31	367.43	417.99
	O	0	0.65	1.37	2.21	3.08	4.00	4.89	5.76
1		0.43	0.97	1.51	2.10	2.72	3.32	3.92	4.57
2		0.30	0.64	1.01	1.44	1.91	2.43	3.01	3.55
4		0.25	0.54	0.86	1.25	1.67	2.13	2.56	2.93
6		0.18	0.43	0.71	1.09	1.54	2.06	2.60	3.09

表 2 水杨酸甲酯和蛇床子素体外透皮动力学方程及透皮吸收参数 ($n = 5$)

组分	Azone /%	$Q-t$ 方程	r	J		ER	T_{lag} /h
				$/\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$			
M	0	$Y = 45.52X + 27.24$	0.998 4	45.52	—	—	—
	1	$Y = 40.65X + 27.07$	0.998 6	40.65	0.89	—	—
	2	$Y = 35.66X + 6.47$	0.998 9	35.66	0.78	—	—
	4	$Y = 30.65X - 14.88$	0.999 4	30.65	0.67	0.49	0.64
	6	$Y = 27.22X - 17.43$	0.999 7	27.22	0.60	0.60	0.64
	O	0	$Y = 0.44X - 0.35$	0.999 4	0.44	—	0.81
1		$Y = 0.30X - 0.22$	0.999 6	0.30	0.68	0.76	0.76
2		$Y = 0.23X - 0.32$	0.995 9	0.23	0.52	1.37	1.37
4		$Y = 0.20X - 0.25$	0.997 8	0.20	0.45	1.26	1.26
6		$Y = 0.21X - 0.45$	0.991 8	0.21	0.47	2.12	2.12

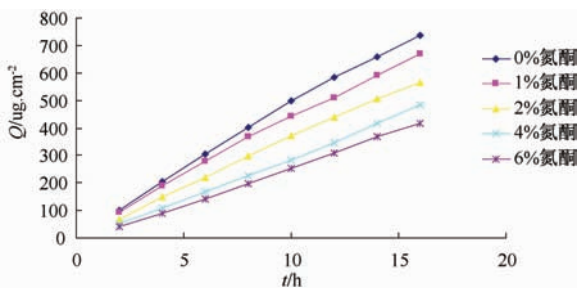


图 1 水杨酸甲酯体外透皮的渗透动力学曲线

由表 2 可知, 跌打活络微乳喷雾剂中的蛇床子素和水杨酸甲酯, $Q-t$ 均呈良好的线性关系 ($r > 0.99$), 体外透皮行为符合零级动力学方程, 即在 16 h 内体外透皮速率接近恒速 (与药物浓度无关), 作用时间较长, 为控释长效的经皮给药制剂。

由表 2 可见, 不加氮酮组水杨酸甲酯和蛇床子素具有良好的经皮渗透性, 其透皮速率常数分别为

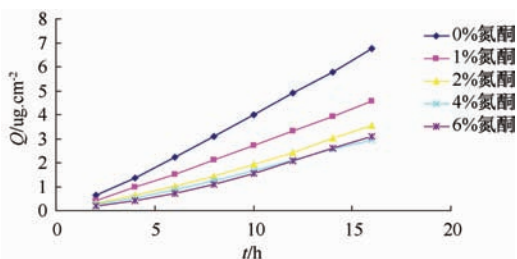


图 2 蛇床子素体外透皮的渗透动力学曲线

$45.52, 0.44 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$, 水杨酸甲酯的渗透不存在时滞, 蛇床子素的渗透时滞为 0.81 h。随着氮酮质量浓度的升高, 水杨酸甲酯 J 逐渐降低, 加入 1%, 2% 氮酮不存在时滞, 但 4%, 6% 氮酮时滞有上升的趋势; 蛇床子素 J 亦降低, 2 ~ 6% 氮酮 J 维持在一定的范围, 但时滞有上升的趋势。结果表明氮酮对跌打活络微乳喷雾剂中蛇床子素和水杨酸甲酯的透皮促进作用不明显。

3 讨论与结论

3.1 检测方法的确定 蛇床子素的最大吸收波长为 322 nm, 水杨酸甲酯的最大吸收波长为 290 nm, 在 322 nm 处也有较高的峰响应值, 由于蛇床子素的含量相对较低, 为了检测方便和保证蛇床子素的检测出来, 所以选择 322 nm 作为检测波长。

3.2 实验皮肤的选择 目前大多数研究认为裸鼠皮肤结构与人相似, 其毛囊数目和直径与人皮肤最为接近, 据报道^[2] 裸鼠皮与人皮肤的透皮速率常数接近, 重复性也好, 这可能与硫化物脱毛对实验动物皮肤造成的损伤有关。因此采用裸鼠皮肤作为经皮渗透试验的皮肤模型。

3.3 取样量的确定 体外透皮实验中, 常采取从接受池中定时吸取一定量接受液进行测定, 并立即补充等量接受液的方法。此方法扩散量较少、成分测定较困难, 并且易造成一定的系统误差。本实验参考文献^[3-4] 采用定时取出全部接受液, 取完后立即用新鲜接受液洗净扩散池, 并补充等体积、同温的新鲜接受液的取样方法, 实验证明效果良好。此方法另一优点是能更好地模拟药物透皮吸收的实际情况, 即药物透皮吸收进入血液后, 能快速的被血液带走, 保持了良好的漏槽条件。

3.4 两成分的稳态透皮速率常数的差异性 本实验属于供给池浓度不发生严重耗竭的情况, 可以将皮肤看作简单的膜, 用 Fick 扩散定律分析药物在皮肤内的通透行为, 用公式 $J = ADK/h(C_0 - C_t)$ (A : 药物的有效扩散面积; D : 药物在皮肤中的扩散系数;

K : 药物在皮肤/介质中的分配系数; h : 药物在皮肤中的扩散路径度, C_0 : 给药池中药物的饱和浓度; C_t : t 时刻接收池中药物的浓度; $P = DK/h$ 为扩散系数)表示^[5], 本实验中 $C_0 > C_t$, 可以改写为 $J = APC_0$, 因此造成两成分的稳态透皮速率常数差异较大的原因可能有两方面: ①药物性质: 水杨酸甲酯具有较好的通透性, 容易透过皮肤, 即 P 值较蛇床子素大; ②药物浓度: 处方中水杨酸甲酯的含量高, 即 C_0 值较蛇床子素大。

3.5 微乳和氮酮的促渗作用 由实验结果可知, 跌打活络微乳喷雾剂本身具有很好的体外经皮渗透性, 这可能有如下原因: ①微乳中的油相由薄荷油、冰片等挥发性成分组成, 据报道均有促进药物渗透作用^[6-7]。微乳的助乳化剂丙二醇是良好的共溶媒, 可以增加并用的其他促渗剂在皮肤角质层中的分配; ②微乳可以增加药物在整个给药体系中的溶解度, 增大经皮给药时皮肤两侧浓度梯度, 有利于药物的透皮扩散; ③微乳的表面张力较低, 易于润湿皮肤, 增加角质层脂质双分子层的流动性, 促进药物的经皮吸收; ④微乳的粒径与人体毛囊大小相近, 微乳可以完整的结构经毛囊透皮吸收^[8]。

氮酮是一种新型高效、无毒、无刺激性的透皮吸收促进剂, 对亲水性和疏水性成分均有较好的促渗作用, 适于有效成分多而复杂的中药制剂, 是目前国内外常用的渗透促进剂。因此本实验选择氮酮考察跌打活络微乳喷雾剂体外经皮吸收的情况。实验结果表明氮酮对本制剂的促渗作用不明显, 可能有下列三方面的原因: ①本制剂中微乳作为给药载体和处方中挥发油有良好的促渗作用, 加入氮酮后促渗效果相比不明显; ②氮酮和中药促进剂按一定比例合用, 多数有协同作用, 也有一定比例合用后促渗作用降低的报道^[9,3], 可能氮酮与处方中的挥发油成分在一定比例联合使用后有相互抑制作用, 致使促渗

效果降低; ③药物在皮肤中的扩散是依赖于浓度梯度的被动扩散, 氮酮为油溶性物质, 随着其量的增加, 蛇床子素、水杨酸甲酯等成分在其中的溶解性增大, 从而使维持皮肤两侧药物浓度梯度的能力下降。

综上所述, 跌打活络微乳喷雾剂由于应用微乳作为新型经皮给药载体, 以及处方中挥发油成分的促渗作用, 本身具有良好的体外经皮渗透性, 氮酮加入后对蛇床子素和水杨酸甲酯体外透皮促进效果不明显, 因此无需另外加入氮酮。

[参考文献]

[1] 王利胜, 占建坤, 周莉玲. 高效液相色谱法测定跌打活络微乳中蛇床子素的含量[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(1): 2.
[2] 周莉玲, 李锐, 刘强. 青藤碱透皮吸收接收液和实验皮肤的选择研究[J]. 中药新药与临床药理, 1999, 10(1): 43.
[3] 张先洲, 周健, 何文, 等. 促透剂对青藤碱凝胶经皮渗透作用的研究[J]. 中草药, 2004, 35(10): 1115.
[4] 王晓辉, 李丽, 申去非, 等. 不同剂型扑热息痛离体透皮吸收效果研究[J]. 中国药房, 2008, 19(28): 2189.
[5] 郑俊民. 经皮给药新剂型[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 283.
[6] 方晓阳, 叶青. 中药透皮吸收促进剂的研究与发展[J]. 中草药, 2003, 34(2): 189.
[7] 韩永龙, 王建国, 李士峰, 等. 中药透皮吸收促进剂研究进展[J]. 中医药信息, 2007, 24(2): 23.
[8] 张立超, 胡晋红. 微乳透皮给药系统的研究进展[J]. 国外医学·药学分册, 2004, 31(1): 44.
[9] 王晖, 许卫铭, 王宗锐. 薄荷醇和氮酮对水杨酸体外透皮吸收的促进作用[J]. 中国临床药理学与治疗学杂志, 1996, 1(1): 26.

[责任编辑 全燕]