



活血止痛凝胶体外释放和经皮渗透性研究

于娟¹, 杜茂波², 刘淑芝^{2*}, 宋立华¹, 沈硕², 刘道芳³

(1. 首都医科大学 中医药学院, 北京 100069; 2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700;
3. 安徽安科余良卿药业有限公司, 安徽 安庆 246001)

[摘要] 采用 Franz 扩散池进行实验, 以半透膜和小鼠皮肤为透过屏障, 采用 HPLC 测定接受液 [PEG400-95% 乙醇-水 (1:3:6)] 中丹皮酚的含量, 考察活血止痛凝胶体外释放和经皮渗透规律。结果显示, 活血止痛凝胶中丹皮酚的释药规律符合 Weibull 方程, 拟合方程为 $\ln[-1/(1-Q)] = -0.7905 \ln t - 1.7012$ ($r=0.9809$), 在 8 h 内丹皮酚的累积释放率为 85.18%, 释放速率为 $2.827 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$; 丹皮酚的累积经皮渗透率以零级模型拟合好, 拟合方程为 $Q(t) = 1.7579t + 0.7213$ ($r=0.9991$), 给药 8 h 后丹皮酚的累积经皮渗透率为 54.85%, 渗透速率为 $1.820 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ 。研究结果表明, 活血止痛凝胶具有良好的释放透皮性能。

[关键词] 释放; 透皮; 丹皮酚; HPLC; 活血止痛凝胶

活血止痛凝胶由白芷、牡丹皮、天南星、冰片等组成, 有活血止痛、疏通经络的作用。外用凝胶剂作为新型的外用制剂, 由于具有良好的生物相容性, 易于涂抹, 局部给药后易于吸收、不污染衣物、稳定性好。此外, 凝胶基质多为亲水性高分子材料, 有利于皮肤水合形成, 促进药物的吸收, 所以成为近年来外用制剂研究热点。本实验以方中君药牡丹皮中丹皮酚为指标, 采用不同模型对体外释药曲线与经皮给药数据进行拟合, 考察活血止痛凝胶的体外释放与经皮渗透规律。

1 材料

高效液相色谱仪 (2487 型双波长紫外检测器, 717 型自动进样器, 美国 Waters), BSA224S CW 型电子分析天平 (德国赛多利斯公司), TK-20B 型 Franz 扩散池 (上海锆凯有限公司), 透析袋 (截留相对分子质量 7 000, 北京经科宏达生物技术有限公司)。

活血止痛凝胶 (自制, 批号 13111), 丹皮酚 (中国食品药品检定研究院, 批号 110708-200506), 聚乙二醇 (PEG, 国药集团化学试剂有限公司), 甲醇为色谱纯, 水为哇哈哈纯净水, 其余试剂均为分析纯。

[收稿日期] 2014-06-24

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项 (2014ZX09301306-009)

[通信作者] * 刘淑芝, 研究员, 博士生导师, 主要从事中药新剂型与新药开发研究, Tel (010) 84043227, E-mail: liushuzhi2004@ sina.com

[作者简介] 于娟, 硕士研究生, E-mail: juanmaozi@163.com

2 方法与结果

2.1 方法学考察

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取丹皮酚对照品适量, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇配成 $0.646 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液, 即得。精密移取上述对照品溶液 0.1 mL, 置于 100 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 配成 $0.646 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品溶液备用。

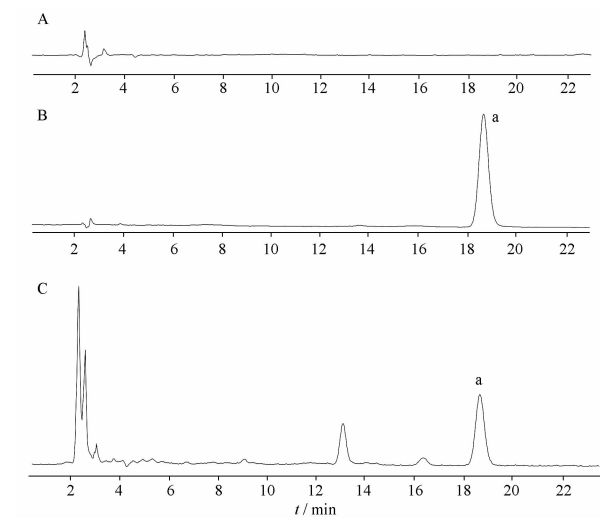
2.1.2 供试品溶液的制备 取体外释放 (透皮) 接收液, 过 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜, 弃去初滤液, 取续滤液, 进样量 10 μL 。

2.1.3 色谱条件与系统适应性考察 高效液相色谱仪 (2487 型双波长紫外检测器, 717 型自动进样器, 美国 Waters), Diamonsil C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-0.1% 磷酸水溶液 (50:50); 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$, 检测波长 274 nm, 理论塔板数为 4 334, 分离度 2.38。色谱图见图 1。

2.1.4 标准曲线的制备 取丹皮酚对照品溶液 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25 μL 进样, 以进样量为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得回归方程 $Y = 5679.4X - 1245.6$, $R^2 = 0.9999$ ($n=7$), 线性范围 0.646 ~ 16.15 ng。

2.1.5 日内精密性 精密吸取对照品溶液 10 μL , 连续进样 6 次, 测定丹皮酚峰面积, RSD 1.5%, 表明仪器精密性良好。

2.1.6 日间精密性 精密吸取对照品溶液 10 μL , 于 3 日内每日分别进样 3 次, 测定丹皮酚峰面积, RSD 1.0%, 表明仪器的精密性良好。



A. 阴性样品; B. 对照品; C. 供试品; a. 丹皮酚。
图 1 丹皮酚在活血止痛凝胶剂中的 HPLC 图
Fig. 1 HPLC chromatograms of paeonol in Huoxue Zhongtong gel

表 1 活血止痛凝胶中丹皮酚的加样回收率
Table 1 Recovery rate of paeonol in Huoxue Zhitong gel

No.	样品量/ μg	对照品加入量/ μg	测得量/ μg	加样回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	0.970 1	0.960 0	1.909	97.77	100.7	2.6
2	0.965 9	0.960 0	1.952	102.7		
3	0.951 5	0.960 0	1.896	98.42		
4	0.965 6	0.960 0	1.972	104.8		
5	0.961 1	0.960 0	1.905	98.33		
6	0.965 8	0.960 0	1.944	101.9		

溶胀过夜,搅拌均匀后加入三乙醇胺,使 pH 调为 7,得卡波姆基质;另取处方量聚乙烯醇(PVA)于蒸馏水中加热至 90℃,搅拌使其充分溶解,将一定量羟丙甲纤维素(HPMC)分散于加热的 PVA 液中,冷却,搅拌,溶解。最后将 HPMC 与 PVA 的混合液与卡波姆基质混合均匀,最后加入处方量中药浸膏,搅拌均匀制得活血止痛凝胶。

2.3 体外释放试验

2.3.1 半透膜的预处理 将透析袋剪成适当长度的小段对剖剪开,用蒸馏水煮沸 10 min,放冷,置 4℃保存,使用前蒸馏水清洗干净即可。

2.3.2 释放度试验 采用 Franz 扩散池,将预处理的半透膜固定在释放池与接收池之间,平行精密称取 7 份活血止痛凝胶(0.70 g/份,每份中丹皮酚含量为 77.53 μg),置于扩散池内,使其均匀分布在半透膜的表面,于扩散池内加入已预热的释放液,接受液为 PEG400-95%乙醇-生理盐水(1:3:6)。池内置

2.1.7 稳定性试验 精密吸取同一份供试品溶液 10 μL ,分别于 0,2,4,6,8,10,12,16,24,36,48 h 进样,测定丹皮酚峰面积,结果 RSD 1.5%,表明供试品溶液在 48 h 稳定。

2.1.8 重复性试验 精密吸取 6 份供试品溶液 10 μL ,注入液相色谱仪中,测定丹皮酚含量,其 RSD 0.63%,表明方法的重复性良好。

2.1.9 加样回收率试验 精密量取已知含量的释放接收液 1 mL,按照质量比 1:1 的比例加入丹皮酚对照品,按 2.2.3 项下色谱条件进行测定,进行加样回收试验,结果丹皮酚的平均加样回收率为 100.7%,RSD 2.6%,表明方法的准确度良好,结果见表 1。

2.2 活血止痛凝胶的制备

按基质处方比例称取卡波姆适量,于蒸馏水中

电磁搅拌子以 350 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的转速转动,水浴温度为 (32.5 $\pm$ 0.2)℃,分别在 20 min,40 min,1 h,2 h,3 h,4 h,6 h,8 h 的时间点将释放液全部取出,同时补加同体积的新鲜接受液。取续滤液作为供试品溶液,测定供试品中丹皮酚的含量,计算累积释放率。释放量见表 2,释放曲线见图 2。

表 2 活血止痛凝胶不同时间段丹皮酚的累计释放量
Table 2 Cumulative release of paeonol in Huoxue Zhitong gel

t/h	释放量 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$
0.33	3.035 $\pm$ 0.128 1
0.66	5.095 $\pm$ 0.122 5
1	7.156 $\pm$ 0.131 8
2	12.55 $\pm$ 0.450 7
3	16.55 $\pm$ 0.663 8
4	19.22 $\pm$ 0.747 1
6	21.49 $\pm$ 0.819 9
8	22.43 $\pm$ 0.809 3

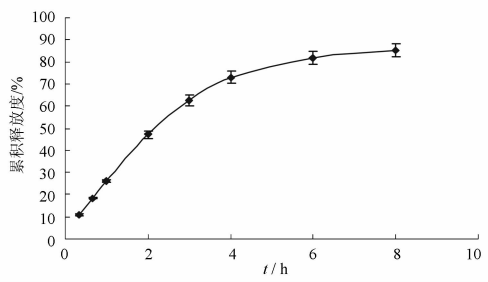


图 2 活血止痛凝胶体中丹皮酚的累积释放曲线
Fig. 2 The cumulative release curve of paeonol in Huoxue Zhitong gel

分别用采用零级模型、一级模型、Higuchi 模型、Weibull 模型对活血止痛凝胶各时间点累积释放量进行数学处理,求回归方程,结果见表 3。

表 3 活血止痛凝胶在 8 h 的累积释药动力学方程
Table 3 The cumulative release mathematical equations of Huoxue Zhitong gel in 8 h

拟合方式	拟合方程	r
零级	$Q = 2.6428t + 5.1918$	0.9282
一级	$\ln Q = 0.238t + 1.6416$	0.8451
Higuchi 方程	$Q = 9.5462t^{1/2} - 1.8398$	0.9790
Weibull 方程	$\ln[-1/(1-Q)] = -0.7905\ln t - 1.7012$	0.9809

2.4 体外经皮渗透试验

2.4.1 离体鼠皮的制备 将小鼠断颈处死,用适量脱毛剂将小鼠毛小心脱去,用生理盐水冲洗干净,剪下皮肤,小心剥离脂肪层,选取完整的皮肤,置于生理盐水中,于 4℃ 贮存。

2.4.2 经皮渗透试验 平行精密称取 7 份活血止痛凝胶,按 2.3 项下方法进行实验,将半透膜换成小鼠皮,于 1,2,3,4,6,8 h 取样用高效液相色谱法测定丹皮酚含量,计算累积透过率,并绘制曲线,结果见表 4,图 3。

表 4 活血止痛凝胶不同时间段丹皮酚的累计渗透量(n=7)
Table 4 cumulative permeation of paeonol in Huoxue Zhitong gel

t/h	Q
1	2.254 ± 0.155 4
2	4.357 ± 0.262 6
3	6.354 ± 0.329 7
4	8.180 ± 0.410 5
6	11.69 ± 0.536 3
8	14.88 ± 0.605 9

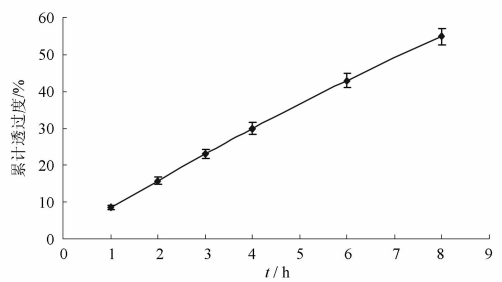


图 3 活血止痛凝胶中丹皮酚体外累积透皮曲线
Fig. 3 The cumulative permeation curve of paeonol in Huoxue Zhitong gel

分别采用零级模型、一级模型、Higuchi 模型、Weibull 模型对活血止痛凝胶各时间点累积渗透量进行数学处理,求回归方程,结果见表 5。对活血止痛凝胶中丹皮酚在 8 h 的体外释放和经皮渗透速率进行比较,结果见表 6。

表 5 活血止痛凝胶在 8 h 的累积经皮渗透动力学方程
Table 5 The cumulative permeation of Huoxue Zhitong gel in 8 h

拟合方式	拟合方程	r
零级	$Q(t) = 1.7579t + 0.7213$	0.9991
一级	$\ln Q = 0.2484t + 0.8819$	0.9530
Higuchi 方程	$Q = 6.8034t^{1/2} - 5.201$	0.9943
Weibull 方程	$\ln[-1/(1-Q)] = -1.1347\ln t - 0.321$	0.9972

表 6 活血止痛凝胶丹皮酚 8 h 的体外释放速率与经皮渗透速率比较

Table 6 The comparison between release and transdermal permeation

项目	累积渗透量/μg	累积透过率/%	速率/μg · cm ⁻² · h ⁻¹
经皮渗透	42.52	54.85	1.820
释放	66.04	85.18	2.827

3 讨论

3.1 指标成分的选择

活血止痛凝胶由白芷、牡丹皮、天南星、冰片等组成,牡丹皮为本方中的君药;另外,丹皮酚化学名为 2-羟基 4-甲氧基苯乙酮,相对分子质量 166.17,熔点 49 ~ 51℃,油水分配系数为 263.2 (lgP 为 2.42) 且在紫外区有强烈的吸收,以上性质说明丹皮酚非常适合作为外用制剂含量测定的指标成分。

3.2 取样时长的确定

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、空气的影响),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。

3.3 活血止痛膏体外释放、透皮规律

活血止痛凝胶的体外释药曲线以 Weibull 模型拟合较好,说明其释放符合 Weibull 动力学方程。即释放的初期,凝胶外层吸附的药物快速释放,呈现突释效应,其原因是凝胶基质为水溶性聚合物,凝胶剂与半透膜接触时,表层迅速被湿润,药物以被动扩散方式通过半透膜,4 h 释放量已经达到总释放量的 85.69%,而后期释放速度较慢。活血止痛凝胶在经皮渗透试验中,以小鼠皮代替半透膜,呈现出了零级释放的特点,说明皮肤角质层是主要的限速因素。将实验结果以方程拟合得到体外释药速率 $2.827 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ 明显高于透皮速率 $1.820 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$,单位面积累积渗透量与释药速率比

较均说明皮肤是活血止痛凝胶中丹皮酚经皮吸收的主要屏障,并起到限速作用。

4 结论

通过对活血止痛凝胶膏剂中丹皮酚体外释放及透皮规律的研究,丹皮酚可以迅速从凝胶基质形成的网状结构中释放出来到达皮肤表面,该基质配方与活血止痛膏具有较好的相容性及很高的经皮渗透速率,具有皮肤控释给药特点。

[参考文献]

- [1] 刘树扬,冯伟红,杜茂波. 中药复方双秦眼用凝胶体外释放性能[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(8):9.
- [2] 管咏梅,赵益,陈丽华. 雷公藤微乳凝胶释药性能研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(17):1.
- [3] 刘星言,刘宏,范海珠. 榄香烯透皮凝胶的制备及体外透皮性能[J]. 中国组织工程研究,2012,16(25):4659.
- [4] 宋立华,杜茂波,刘淑芝. 止痛凝胶膏剂的体外释放及经皮渗透[J]. 中国中药杂志,2013,14(38):2306.
- [5] 邢建国,赵媛,王新春,等. 不同基质对复方卡力孜然凝胶剂主要活性成分体外透皮吸收的影响[J]. 中成药,2011,33(10):1718.

Study on *in vitro* release and percutaneous absorption of Huoxue Zhitong gel

YU Juan¹, DU Mao-bo², LIU Shu-zhi^{2*}, SONG Li-hua¹, SHEN Shuo², LIU Dao-fang³

(1. College of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

3. Anke Yu Liangqing Pharmaceutical Co. Ltd. of Anhui, Anqing 246001, China)

[Abstract] To evaluate *in vitro* release and transdermal behaviors of Huoxue Zhitong gel, modified Franz diffusion cell methods was applied to investigate *in vitro* transdermal absorption of Huoxue Zhitong gel and the content of paeonolan in receptor fluid composed of PEG400%-95% ethanol-water(1:3:6) were determined by HPLC. The results were processed and different equations were fitted. The release law were in accordance with Weibull equation and the fitting equation was $\ln[-1/(1-Q)] = -0.7905 \ln t - 1.7012$ ($r=0.9809$). In 8 hours, cumulative release of paeonol was 85.18% and the release rate was $2.827 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$. Transdermal actions were consistent with zero-level model fit and the fitting equation was $Q(t) = 1.7579t + 0.7213$ ($r=0.9991$). In 8 hours, cumulative transdermal rate and transmission rate of paeonol was 54.85%, $1.820 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$. So the Huoxue Zhitong gel had a good release and transdermal properties.

[Key words] release; transdermal behaviors; paeonol; HPLC; Huoxue Zhitong gel

doi:10.4268/cjcmm20142416

[责任编辑 马超一]