

• 实验与方药 •

消癥止痛凝胶贴膏指纹图谱 及体外释放度研究



开放科学(资源服务)
标识码(OSID)

杜茂波¹ 徐君² 李要远³ 刘瑞³ 鲍艳举³

¹ 中国中医科学院中药研究所中药制剂研究中心, 北京 100700; ² 山东中医药大学附属医院药学部, 济南 250014;

³ 中国中医科学院广安门医院感染科, 北京 100053

通信作者: 鲍艳举, Email: baoyanju@126.com

【摘要】 目的 建立评价消癥止痛凝胶贴膏制备工艺重现性的方法。**方法** 采用指纹图谱技术及体外释放度试验对消癥止痛凝胶贴膏制备工艺的重现性进行评价。采用 HPLC 法建立消癥止痛凝胶贴膏的指纹图谱, 色谱柱为 Agilent HC-C18 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 检测波长 280 nm; 流速 1 ml/min; 柱温 25 °C; 流动相为乙腈-0.2%磷酸水溶液, 梯度洗脱。建立 HPLC 法测定延胡索乙素含量的方法, 并采用垂直式 Franz 扩散池法考察其体外释放度。**结果** 10 批消癥止痛凝胶贴膏与对照图谱的相似度均在 0.95 以上; 消癥止痛凝胶贴膏中延胡索乙素 24 h 累积释放量为 0.23 mg, 8 h 累积释放率为 91.54%, 且 6 份样品各时间点的 RSD 值均<3%。**结论** 应用指纹图谱技术及体外释放度建立了消癥止痛凝胶贴膏制备工艺重现性的评价方法, 可为贴膏剂制备工艺重现性的评价提供参考和依据。

【关键词】 凝胶膏剂; 消癥止痛方; 指纹图谱; 中药制药工艺

基金项目: 国家自然科学基金(81973890); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(ZZ13-YQ-052)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115398-20200507-00056

Study on fingerprint and in vitro release of Xiaozheng-Zhitong cataplasm

Du Maobo¹, Xu Jun², Li Yaoyuan³, Liu Rui³, Bao Yanju³

¹Chinese Medicine Preparation Research Center, Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; ²Department of Pharmacy, Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China; ³Department of Infection, Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China

Corresponding author: Bao Yanju, Email: baoyanju@126.com

【Abstract】 Objective To establish a method of evaluating the reproducibility of the preparation process of Xiaozheng-Zhitong cataplasm. **Methods** Used fingerprint spectrum technology and in vitro release test to evaluate the reproducibility preparation process of Xiaozheng-Zhitong cataplasm. By using HPLC to establish the fingerprint of Xiaozheng-Zhitong cataplasm. The chromatographic column was an Agilent HC-C18 column (4.6 mm×250 mm, 5 μm); the detection wavelength was 280 nm; the flow rate was 1 ml/min; the column temperature was 25 °C. The mobile phase was acetonitrile-0.2% phosphoric acid aqueous solution, used gradient elution method. An HPLC method for the determination of tetrahydropalmatine content was established, and the vertical Franz diffusion cell method was used to investigate its in vitro release. **Results** The results showed that the similarity between the 10 batches of Xiaozheng-Zhitong cataplasm and the control map was above 0.95, indicating that the process of Xiaozheng-Zhitong cataplasm was stable and feasible; the cumulative release amount of tetrahydropalmatine was 0.23 mg in 24 hours, and the cumulative release rate in 8 hours was 91.54%, and the RSD of 6 samples at each time point was <3%. **Conclusion** The method of evaluating the reproducibility of the preparation process of Xiaozheng-Zhitong cataplasm was established by using fingerprint technology and in vitro release; it can provide a reference and scientific basis for the evaluation of the reproducibility of the preparation process of the plaster.

【Key words】 Gel cream; Xiaozheng-Zhitong cataplasm; Fingerprint; Pharmaceutical technology (TCD)

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81973890); Fundamental Research Funds for the Central Public Welfare Research Institutes (ZZ13-YQ-052)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115398-20200507-00056

消癥止痛凝胶贴膏处方包含延胡索、血竭、乳香、没药、冰片等中药,为中国中医科学院广安门医院的临床有效方,可行气止痛、化瘀通络、解毒抗癌^[1-2]。凝胶贴膏制备工艺相对较为复杂,制膏工艺的稳定性、可重现性至关重要。在评价凝胶贴膏制备工艺重现性时,常以体外释放度评价其工艺情况。释放度是评价药物从凝胶贴膏中释放快慢及释放量的重要指标,是观察药物与基质之间相互作用情况的重要参数^[3]。中药材指纹图谱指中药材经适当处理后,采用一定的分析手段,得到可标示该中药材特性的共有峰的图谱^[4],主要用于中药注射剂、中成药、中药材或中药饮片的质量评价^[5-7]。指纹图谱技术可充分反映消癥止痛凝胶贴膏制备工艺中提取、精制、浓缩、基质及成品制备过程中产生的差异,从而直接评价工艺情况。本研究采用指纹图谱及体外释放度研究评价消癥止痛凝胶贴膏制备工艺,为贴膏剂制备工艺评价提供参考。

1 仪器与试药

1.1 试验仪器

TK-20 透皮扩散实验仪(上海锴凯科技贸易有限公司); Waters e2695 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司, PDA 检测器, Empower 3 工作站); Mettler AE 240 型十万分之一电子天平(梅特勒托利多仪器上海有限公司)。

1.2 药品与试剂

延胡索(产地安徽,批号 190818)、血竭(产地马来西亚,批号 191204)、乳香(产地阿曼,批号 181226)、没药(产地索马里,批号 181106)、人工冰片(产地山东,批号 190218)、木香(产地印度,批号 190806)购自亳州永刚饮片厂有限公司,经

中国中医科学院中药资源中心副研究员杨光鉴定均符合 2020 年版《中华人民共和国药典》质量规定。延胡索乙素对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110726-201911,纯度>98%); MD44 mm 型透析袋(美国 SCIENTIFIC RESEARCH SPECIAL); 乙腈、甲醇(色谱纯,天津市康科德科技有限公司); 纯净水(广州屈臣氏食品饮料有限公司); 其余试剂均为国产分析纯。

2 方法与结果

2.1 消癥止痛凝胶贴膏制备工艺

按照前期研究的制备工艺制备 10 批消癥止痛凝胶贴膏作为样品,规格为 7 cm²×10 cm²^[8]。消癥止痛凝胶贴膏制备工艺为:延胡索、血竭、乳香、没药、木香以 60%乙醇提取 3 次,1.5 h/次,合并醇提液,回收乙醇,水浴浓缩至膏状物,放至室温后加入处方量的冰片,混匀,即得该浸膏;称取处方量的聚丙烯酸钠、卡波姆、明胶,加水溶胀,制成基质;将处方量的浸膏和基质混合均匀,均匀涂布于衬布上,加盖聚乙烯薄膜,即得。

2.2 消癥止痛凝胶贴膏指纹图谱研究

2.2.1 色谱条件:参考文献[9]方法,色谱柱为 Agilent HC-C18(4.6 mm×250 mm, 5 μm);检测波长 280 nm;流速 1.0 ml/min;柱温 25 ℃;流动相为乙腈-0.2%磷酸水溶液,梯度洗脱,程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

时间	乙腈(%)	0.2%磷酸水溶液(%)
0~29 min	22	78
30~53 min	32	68
54~64 min	55	45
65~74 min	70	30
75 min	85	15
76 min	22	78

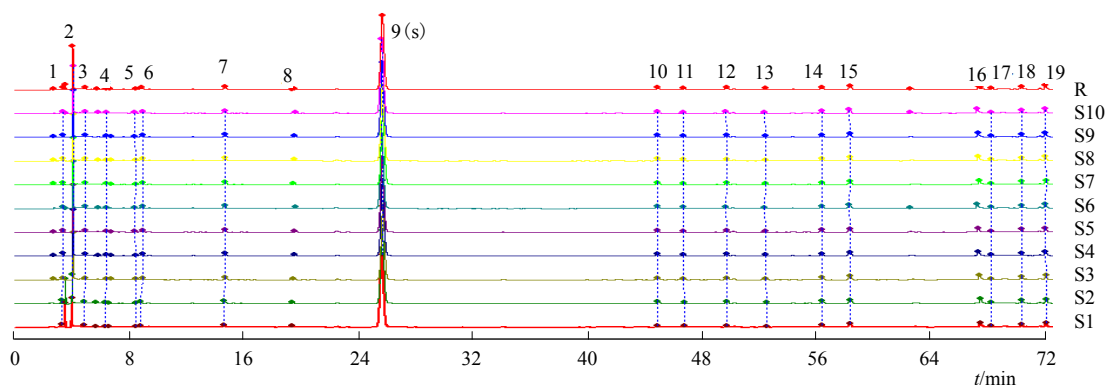
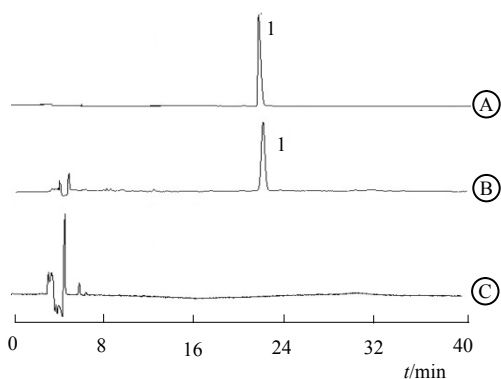


图1 消癥止痛凝胶贴膏指纹图谱



注 A: 对照品溶液; B: 样品溶液; C: 空白溶液; 1: 延胡索乙素

图2 消癥止痛凝胶贴膏延胡索乙素 HPLC 图

2.3.2 溶液制备: 按“2.2.3”项下方法制备对照品溶液。释放样品过 0.22 μm 微孔滤膜, 即可。

2.3.3 线性关系考察: 取配制好的延胡索乙素对照品溶液, 用甲醇稀释, 制成延胡索乙素浓度分别为 80、40、20、10、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的线性溶液, 取 10 μl 进样, 记录色谱图和峰面积, 以延胡索乙素浓度为横坐标(X), 峰面积为纵坐标(Y), 绘制标准曲线, 得回归方程: $Y=9\,054.7X+498.62$ ($r^2=0.999\,6$), 线性范围 0.05~0.80 μg 。

2.3.4 精密度试验: 精密吸取对照品溶液, 进样 6 次, 记录延胡索乙素峰面积, 计算 RSD 为 1.27%, 表明仪器精密度良好。

2.3.5 稳定性试验: 取同一供试品溶液, 于 0、2、4、6、8、12、24 h 进样, 记录延胡索乙素峰面积, 计算 RSD 为 1.38%, 表明供试品溶液在室温放置

24 h 内稳定。

2.3.6 重复性试验: 制备供试品溶液 6 份, 分别进样, 记录延胡索乙素峰面积, 计算 RSD 为 2.51%, 说明该方法重复性良好。

2.3.7 加样回收试验: 取已知延胡索乙素含量的供试品溶液 6 份, 置棕色量瓶中, 按 1:1 比例加入对照品, 得加样回收试验样品。计算得延胡索乙素平均回收率为 99.31%, RSD 为 0.81%。结果见表 3。

表3 延胡索乙素加样回收试验结果($n=6$)

测得量 (mg)	样品含量 (mg)	对照品加入量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
0.124 5	0.062 4	0.062 5	99.41	99.31	0.81
0.125 4	0.062 4	0.062 5	100.80		
0.125 0	0.063 0	0.062 5	99.22		
0.124 6	0.062 8	0.062 5	98.91		
0.123 9	0.062 4	0.062 5	98.42		
0.124 3	0.062 3	0.062 5	99.21		

2.3.8 释放试验: 参考文献[10-12]方法, 采用垂直式 Franz 扩散池, 消癥止痛凝胶贴膏样品紧密贴于处理好的半透膜上, 固定于释放池与接收池之间, 加入接收液 8 ml, 注意排除气泡。扩散池有效扩散面积 3.14 cm^2 , 接收液为聚乙二醇 400-乙醇(95%)-水(1:3:6), 磁力搅拌器转速 425 r/min、水浴温度 $(32\pm 0.5)^\circ\text{C}$ 。于 0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、24.0 h 取样。按照释放试验设计进行试验并测定样品中延胡索乙素含量, 计算累积释放量、平均释

放速率。结果消癥止痛凝胶贴膏中延胡索乙素 24 h 平均累积释放量为 0.23 mg, 8 h 出现拐点, 累积释放率为 91.54%, 平均释放速率 $29.7 \mu\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ 。累积透过量-时间释放曲线见图 3, 拟合方程见表 4。

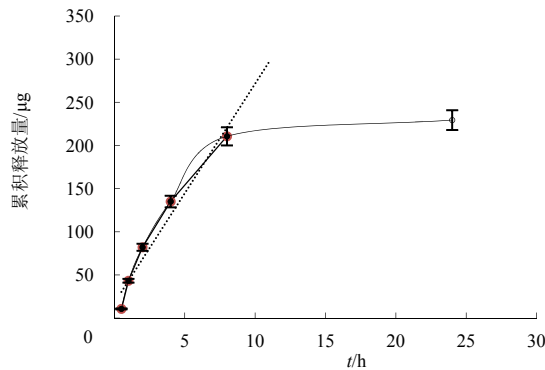


图 3 6 份消癥止痛凝胶贴膏中延胡索乙素累积透过量-时间释放曲线

表 4 消癥止痛凝胶贴膏中延胡索乙素累积释放量与时间拟合方程

方程类型	拟合方程	R^2
一级方程	$\ln Q = 0.3146t + 3.1853$	0.6837
Higuchi 方程	$Q = 93.278t^{1/2} - 51.956$	0.9992
Peppas 方程	$\ln Q = 0.7596 \ln t + 3.532$	0.9365

3 讨论

本研究应用指纹图谱技术对消癥止痛凝胶贴膏的制备工艺进行了考察, 10 批消癥止痛凝胶贴膏与对照图谱的相似度均在 0.95 以上, 表明其工艺重现性好, 工艺稳定。提示指纹图谱技术可综合反映凝胶贴膏提取、精制、基质制备、成型、干燥等各工艺环节中的差异情况, 可为贴膏剂制备工艺评价方法的建立提供参考。

消癥止痛凝胶贴膏中延胡索乙素 8 h 累积释放量达到 91.54%, 体外释放动力学拟合方程与 Higuchi 方程相关性较高。延胡索乙素 Peppas 方程拟合得到 $n=0.7596$, 表明其释放为非 Fick 扩散, 凝胶贴膏基质骨架溶蚀作用与延胡索乙素性质均对体外释放度与释放速率产生影响。6 份样品各时间点体外释放度差异 RSD 均在 3% 以内, 表明样品离散度小, 制备工艺比较稳定。

本研究应用指纹图谱技术及释放度评价技术评价消癥止痛凝胶贴膏制备工艺, 2 种方法相结合可更全面的反映凝胶贴膏制备工艺情况, 为贴膏剂制备工艺的评价提供参考和依据。

利益冲突申明 除基金项目支持外, 本文全体作者未接受过第三方的资助或服务, 无个人或企业的经济利益

作者贡献声明 杜茂波: 酝酿和设计试验; 徐君、李要远: 采集数据; 刘瑞: 统计分析; 鲍艳举: 对文章的知识性内容作批评性审阅

参 考 文 献

[1] Bao YJ, Hua BJ, Hou W, et al. Alleviation of cancerous pain by external compress with Xiaozheng Zhitong Paste[J]. Chin J Integr Med, 2010, 16(4):309-314. DOI:10.1007/s11655-010-0501-5.

[2] 鲍艳举, 花宝金, 侯炜, 等. 消癥止痛外用方治疗癌性疼痛的临床作用特点分析[J]. 北京中医药, 2010, 29(2):112-115. DOI:10.16025/j.1674-1307.2010.02.021.

[3] 杜茂波, 刘亚梅, 何爱萍, 等. 川芎眼用微乳原位凝胶的流变学及释放动力学分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(24):23-27. DOI:10.13422/j.cnki.syfjx.2017240023.

[4] 安春志, 刘莉, 刑学锋, 等. 中药指纹图谱的现状和研究进展[J]. 第一军医大学分校学报, 2005, 28(2):197-200, 204.

[5] 冯五文, 王晶, 张世洋, 等. 注射用双黄连(冻干)的 UPLC 指纹图谱研究及质量评价[J]. 中药与临床, 2018, 9(6):31-33, 8.

[6] 张子龙, 李淑女, 陈彬, 等. 紫连油指纹图谱与含量测定研究[J]. 国际中医中药杂志, 2020, 42(11):1108-1113. DOI:10.3760/cma.j.cn115398-20200529-00278.

[7] 王秋云. 不同产地升麻的高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 国际中医中药杂志, 2018, 40(6):539-542. DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4246.2018.06.014.

[8] 鲍艳举, 杜茂波, 刘淑芝, 等. 消癥止痛凝胶膏剂经皮渗透性研究[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(22):3907-3909. DOI:10.4268/cjcmm20132222.

[9] 游修琪, 顾雪竹, 毛淑杰, 等. 延胡索产地不同加工品 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中成药, 2009, 31(10):1481-1484. DOI:10.3969/j.issn.1001-1528.2009.10.002.

[10] 杜茂波, 刘淑芝, 李曼玲, 等. 莨菪巴布剂体外释放和透皮行为的研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(8):969-972. DOI:10.3321/j.issn:1001-5302.2009.08.009.

[11] 杜茂波, 吴志成, 刘淑芝, 等. 冠心凝胶膏剂的体外释放和透皮吸收评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(11):43-45. DOI:10.3969/j.issn.1005-9903.2012.11.013.

[12] 于娟, 杜茂波, 刘淑芝, 等. 活血止痛凝胶体外释放和经皮渗透性研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(24):4778-4781. DOI:10.4268/cjcmm20142416.

(收稿日期: 2020-05-07)
(本文编辑: 张琪)