

癌痛巴布剂中细辛脂素释放度和离体透皮率的测定^Δ

周燕萍^{1*}, 瞿 娇², 杨全伟³, 徐宏峰³, 张 耕³, 胡作为^{3#}(1.湖北中医药大学中医临床学院, 武汉 430061; 2.湖北中医药大学临床医学院, 武汉 430061; 3.武汉市第一医院, 武汉 430022)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)04-0482-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.04.16

摘要 目的:测定癌痛巴布剂中细辛脂素释放度和离体大鼠透皮率。方法:采用自制的释放度装置以及改良的Franz扩散池,以离体的大鼠皮肤为屏障、生理盐水为溶剂,采用高效液相色谱法测定细辛脂素含量,考察癌痛巴布剂20、50、80、120 min内的释放度和2、4、8、12、24 h内的透皮量,计算累计释放度和累计透皮率。结果:癌痛巴布剂中细辛脂素的120 min累计释放度为73.01%; 24 h离体透皮率为26.01%,细辛脂素的透皮动力学方程为 $Q=5.717 7t^{1/2}-0.385 4$ ($r=0.979$)。结论:癌痛巴布剂具有良好的释放及透皮性能,透皮动力学符合Higuchi方程。

关键词 癌痛巴布剂;细辛脂素;释放度;离体透皮率;高效液相色谱法

Determination of Release Rate and *in vitro* Transdermal Rate of Asarinin in Cancer Pain Cataplastm

ZHOU Yanping¹, QU Jiao², YANG Quanwei³, XU Hongfeng³, ZHANG Geng³, HU Zuowei³(1.Clinical College of TCM, Hubei University of TCM, Wuhan 430061, China; 2.Clinical Medicine College, Hubei University of TCM, Wuhan 430061, China; 3.Wuhan First Hospital, Wuhan 430022, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To determinate the release rate and *in vitro* transdermal rate of asarinin in Cancer pain cataplastm. METHODS: Using homemade devices and modified France diffusion, isolated skin of rats as barrier, normal saline as solvent, the content of asarinin was determined by HPLC. Release rate of Cancer pain cataplastm within 20, 50, 80 and 120 min and transdermal amount within 2, 4, 8, 12, 24 h were investigated, and accumulative release rate and accumulative transdermal rate were calculated. RESULTS: Accumulative release rate by 120 min of asarinin in Cancer pain cataplastm was 73.01%; 24 h *in vitro* transdermal rate was 26.01%, and transdermal kinetics equation of asarinin was $Q=5.717 7t^{1/2}-0.385 4$ ($r=0.979$). CONCLUSIONS: Cancer pain cataplastm has good release and transdermal performance. Its transdermal kinetics is in line with Higuchi equation.

KEYWORDS Cancer pain cataplastm; Asarinin; Release rate; *in vitro* transdermal rate; HPLC

癌痛巴布剂为武汉市第一医院肿瘤科胡作为主任医师临床经验方,其处方为川乌、细辛、蚤休、莪术、乳香、没药、龙血竭、蟾酥、冰片、薄荷脑,全方以温经散寒通络、解毒活血化痰立法^[1],临床上取得了较好疗效。其制法为:按处方比例称取川乌、细辛、蚤休3味药材,用70%乙醇按优选的最佳提取工艺

回流提取,将所得药液水浴挥发浓缩成稠膏;按比例称取乳香、没药、莪术,粉碎成10~30目,过4号筛,用超临界-CO₂萃取法按最佳提取工艺萃取挥发油;按比例称取龙血竭、蟾酥、冰片、薄荷脑4味药材,粉碎,过100目筛;将上述所得稠膏,加基质调成药膏,加入乳香、没药、莪术所提取的挥发油,加入龙

(1):115.

- [4] 李星霞,万丽丽,朱金辉,等. HPLC法测定络石藤中黄酮苷元成分[J]. 中国药房, 2008, 19(6): 436.
- [5] 赵秀娟,夏薇,赵艳,等. 芹菜素人体内代谢研究[J]. 中国公共卫生, 2008, 24(4): 446.
- [6] 赵秀娟,吴坤. 芹菜素代谢动力学研究进展[J]. 中国公共卫生, 2007, 23(8): 1 020.
- [7] 娄月芬,唐跃年,孙朝荣,等. 用HPLC法测定大鼠血浆和胆汁中芹菜素的浓度[J]. 药学服务与研究, 2009, 9(3): 203.
- [8] Zhang YZ, Xu F, Dong J, et al. Profiling and identifica-

tion of the metabolites of calycosin in rat hepatic 9 000×g supernatant incubation system and the metabolites of calycosin-7-O-β-D-glucoside in rat urine by HPLC-DAD-ESI-IT-TOF-MSⁿ technique[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2012, 70(11): 425.

- [9] Zhang YZ, Xu F, Yi T, et al. Chemical profile analysis and comparison of two versions of the classic TCM formula Danggui Buxue Tang by HPLC-DAD-ESI-IT-TOF-MSⁿ [J]. *Molecules*, 2014, 19(5): 5 650.
- [10] 赵秀娟,赵艳,张宇秋,等. 高效液相色谱电化学法检测人体血浆中芹菜素和相关黄酮类化合物[J]. 分析化学, 2007, 35(10): 1 517.
- [11] 丁健桦,王兴祥,张慧,等. 芹菜素的电喷雾萃取电离串联质谱[J]. 高等学校化学学报, 2011, 32(8): 1 714.

(收稿日期:2015-05-27 修回日期:2015-08-18)

(编辑:刘 萍)

^Δ 基金项目:武汉市科技攻关项目(No.2013060602010263)

* 副教授,博士。研究方向:温病治则、方药的临床应用与实验研究。电话:027-68889038。E-mail:zhouyp0515@sina.com

通信作者:主任医师,博士。研究方向:中西医结合治疗肿瘤。电话:027-85332014。E-mail:huzouwei@sohu.com

血竭、蟾酥、冰片、薄荷脑4味药粉,搅匀,摊涂,制成巴布剂。为了测定癌痛巴布剂的释放度及透皮率,本试验以处方组成药细辛的有效成分细辛脂素为考察指标,以高效液相色谱法测定细辛脂素的含量。

1 材料

1.1 仪器

YB-P6 智能透皮试验仪(天津药典标准仪器厂); Waters2695 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); 电热恒温水浴锅(北京医疗设备厂); 旋转搅拌机(江苏省江阴科研器械厂)。

1.2 药品与试剂

癌痛巴布剂(武汉市第一医院制剂中心制备,批号:141210,规格:2.00 g/贴); 细辛脂素对照品(中国食品药品检定研究院,批号:0726-200508,纯度:95.6%); 乙腈(美国 Fisher 公司,色谱纯); 其余试剂均为分析纯,水为双蒸水。

1.3 动物

SPF 级大鼠,♂,体质量约 120 g,购于湖北省实验动物中心,由武汉大学基础医学部提供,实验动物合格证号:SCXK(鄂)2013-0003。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[2]

色谱柱:Hypersil BDS-C₁₈(200 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相:乙腈-0.2% 醋酸水(48:52, V/V),流速:1.0 ml/min; 检测波长:287 nm; 柱温:30 ℃,进样量:20 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取细辛脂素对照品适量,以甲醇制备成质量浓度为 0.2 mg/ml 的对照品溶液^[3]。

2.2.2 供试品溶液 取癌痛巴布剂(批号:141210)1 张,约 2.0 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密称定,精密加入 50% 甲醇溶液 50 ml,超声(200 W, 50 kHz)提取 30 min,放冷后补甲醇质量,过滤,取续滤液即得。

2.2.3 空白对照溶液 按癌痛巴布剂处方比例称取除细辛外的其他药材,按癌痛巴布剂制备工艺制成空白贴剂,再按照“2.2.2”项下方法制备成空白对照溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 方法专属性 分别吸取对照品溶液、供试品溶液、空白对照溶液,按“2.1”项下色谱条件进样检测,记录色谱。结果显示,对照品溶液、供试品溶液在 10 min 左右出现细辛脂素特征吸收峰,空白对照溶液该处无色谱峰,且对其测定无干扰,色谱图见图 1。

2.3.2 线性关系考察^[2] 精密吸取对照品溶液 1、2、3、4、5、10 ml,分别置于 50 ml 量瓶中,各加入甲醇定容至刻度制备成质量浓度为 0.004、0.008、0.012、0.016、0.02 mg/ml 的系列对照品溶液。取上述系列对照品溶液按照“2.1”项下色谱条件进样检测,记录峰面积。以峰面积(y)为纵坐标、对照品质量浓度(x)为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程为: $y=957.88x-14.78$ ($r=0.9998$)。结果表明,细辛脂素检测质量浓度的线性范围为 5.0~40.0 μg/ml; 以信噪比为 10 计算得定量下限为 10.04×10^{-3} μg; 以信噪比为 3 计算得检测限为 3.24×10^{-3} μg。

2.3.3 精密度考察 取质量浓度为 0.02 mg/ml 的对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次,记录峰面积。结果,峰面积的 RSD 为 1.28% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

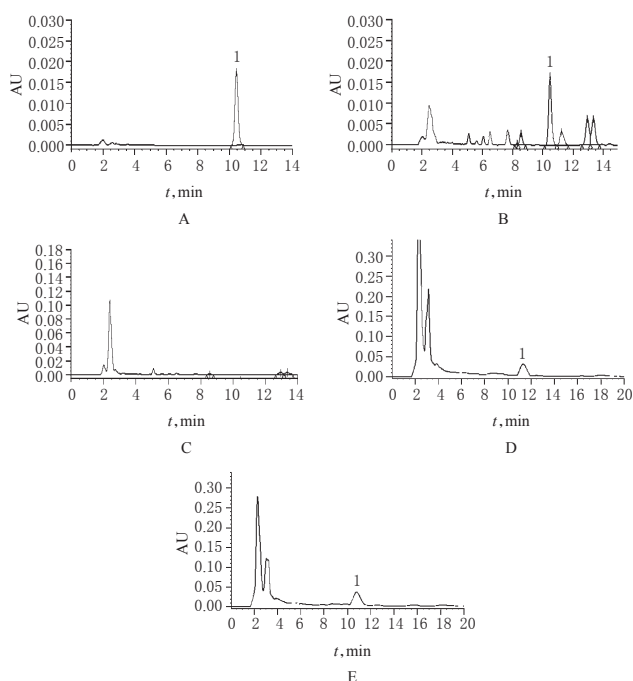


图 1 高效液相色谱图

A. 对照品溶液; B. 供试品溶液; C. 空白对照溶液; D. 释放度供试品溶液; E. 透皮供试品溶液; 1. 细辛脂素

Fig 1 HPLC chromatograms

A. substance control solution; B. test sample solution; C. negative control solution; D. test sample solution of release rate; E. test sample solution of transdermal rate; 1. asarinsin

2.3.4 稳定性考察^[3] 取癌痛巴布剂(批号:141210),精密称取 1 份,按照“2.2.2”项下方法制备成供试品溶液,分别于 0、2、4、8、12、24 h 时按“2.1”项下色谱条件进样检测,记录峰面积。结果,峰面积的 RSD 为 1.31% ($n=6$),表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.5 重复性考察 取癌痛巴布剂(批号:141210),精密称取 6 份,按照“2.2.2”项下方法制备成供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样检测,记录峰面积。结果,峰面积的 RSD 为 1.42% ($n=6$),表明该方法重复性良好。

2.3.6 准确度试验 精密称取已知含量的同一批样品 6 份,分别加入适量的细辛脂素对照品,精密加入 50% 甲醇溶液 50 ml,超声(200 W, 50 kHz)提取 30 min,放冷后补甲醇质量,过滤,取续滤液按“2.1”项下色谱条件进样检测,记录峰面积,计算回收率。结果,平均回收率为 99.84%, RSD 为 1.83% ($n=6$)。

2.4 释放度试验

按 2015 年版《中国药典》(四部)溶出度与释放度测定法第四法^[4]进行操作。用不锈钢筛网(孔径 2 mm×2 mm)做成 2 个网碟,精确称取癌痛巴布剂 1.005 g,将其用 2 个网碟固定,同时使巴布剂药面向上,置于 500 ml 烧杯中,精密加入 37 ℃ 的生理盐水 500 ml,保持恒温,采用搅拌桨进行匀速搅拌,分别于 20、50、80、120 min 时精密吸取 250 ml 溶液,取样后分别再注入恒温生理盐水 250 ml,继续搅拌。

2.4.1 供试品溶液的制备 将 4 个时间点吸取的释放液分别水浴浓缩至干,残渣加甲醇溶解并定容于 1 ml 量瓶中,过微孔滤膜即得。

2.4.2 释放度的测定 分别精密吸取 4 个时间点的释放度供

试品溶液各 20 μl , 按照“2.1”项下色谱条件进样检测, 记录色谱, 计算释放度。结果, 20、50、80、120 min 的累计释放度分别为 32.48%、38.16%、49.87%、73.01%。释放度供试品溶液的色谱图见图 1E。

2.5 离体大鼠透皮试验⁶⁻⁷

首先将改良的 Franz 扩散池的接收池内加满生理盐水, 确保接收池中无气泡, 设置电磁搅拌器恒速搅拌速度为 200 r/min 和恒温水浴温度为 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$, 启动。待达到所设定条件后, 将制备好的新鲜鼠皮固定于接收池上, 使皮肤脱毛面向上, 取癌痛巴布剂约 1.005 g, 作为透皮试验中癌痛巴布剂样品, 连同背衬材料固定于皮肤外层, 巴布剂药面紧贴于皮肤外层。以皮肤进入接收液时开始计时, 分别于 2、4、8、12、24 h 时取出接收池中全部接收液, 同时立即补加相同体积、相同温度的生理盐水。

2.5.1 供试品溶液的制备 将接收液分别水浴浓缩至干, 残渣加甲醇溶解并定容于 1 ml 量瓶中, 过微孔滤膜, 即得。

2.5.2 离体透皮率的测定 将不同时间点的透皮供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样检测, 记录峰面积, 计算透皮率。结果表明, 2、4、8、12、24 h 时的离体透皮率分别为 6.05%、11.40%、16.65%、21.47%、26.01%。透皮供试品溶液的色谱图见图 1, 癌痛巴布剂中细辛酯素累计透皮量-时间变化曲线见图 2。

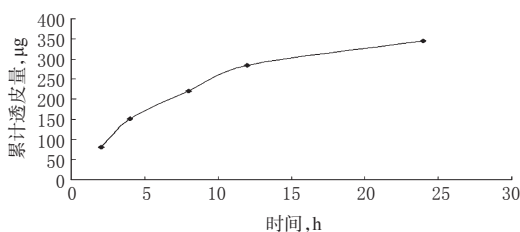


图2 癌痛巴布剂中细辛酯素累计透皮量-时间变化曲线

Fig 2 Cumulative transdermal amount-time curve of asarinin in Cancer pain cataplastm

以细辛脂素的累计透皮量(Q)对透皮时间(t)按零级、一级、Higuchi 方程⁸进行拟合, 结果见表 1。

表1 癌痛巴布剂中细辛脂素累计释药的药动力学拟合方程

Tab 1 Cumulative release kinetics equation of asarinin in Cancer pain cataplastm

拟合方式	模型拟合方程	r
零级方程	$Q=0.8453t+7.8627$	0.932
一级方程	$\ln Q=0.0563t+2.1111$	0.849
Higuchi 方程	$Q=5.7177t^{1/2}-0.3854$	0.979

由表 1 可知, 癌痛巴布剂中细辛酯素能持续透过大鼠皮肤, 而且透皮过程与 Higuchi 方程拟合较优, 表明所制备的巴

布剂具有缓释作用。

3 讨论

癌痛巴布剂主要药物组成为川乌、细辛、蚤休、莪术、乳香、没药、龙血竭、蟾酥等药味。试验结果表明, 随着时间延长, 癌痛巴布剂中细辛脂素的透皮率逐渐增加, 但单位时间内透皮量逐渐降低, 说明该巴布剂具有较好的透皮性能。

体外透皮试验中, 透皮温度的控制是重要的因素。为了更好地模拟人体的体表温度, 本研究选用温度为 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。

通过对癌痛巴布剂释放度研究结果可以看出, 癌痛巴布剂中的细辛脂素于 120 min 后从基质中释放出来, 释放度达到 73.01%, 释放率较高。通过对癌痛巴布剂中细辛酯素累计透皮量-时间变化曲线可以看出, 癌痛巴布剂 24 h 后达峰, 释放量趋于平缓、稳定。Higuchi 方程拟合证明, 癌痛巴布剂具有缓释作用, 可以达到持续的止痛效果, 持续时间可以达到 24 h。

影响透皮吸收的因素很多, 如药物成分性质、基质性质、药物浓度、给药面积、不同年龄的动物的皮肤、不同动物的皮肤以及皮肤角质层贮库作用等, 都对药物的透皮吸收有一定的影响⁹。本实验未考虑到这些方面的影响因素, 因此, 今后在这方面值得进一步探究。

参考文献

- [1] 胡作为, 陈赛里. 癌痛贴镇痛作用的实验研究[J]. 湖北中医杂志, 2012, 34(8): 28.
- [2] 金秀丽, 唐淑洁, 张华, 等. HPLC 测定细辛醇提取物中细辛脂素的含量[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2010, 31(12): 1927.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2010 年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 362-363.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 四部[S]. 2015 年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 121.
- [5] 吴和珍, 付冲, 杨艳芳, 等. 天杏咳喘贴中盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱的大鼠离体透皮试验[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(18): 58.
- [6] 肖柳, 杨全伟. 祛风活络膏贴中川续断皂苷 VI 离体小鼠透皮率测定研究[J]. 湖北中医杂志, 2013, 35(6): 25.
- [7] 易蕾, 赵瑛. 碘化钾微乳的制备及其体外透皮吸收作用考察[J]. 中国药房, 2015, 26(13): 1830.
- [8] 梁秉文. 中药经皮给药制剂技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 36-38.
- [9] 韩建伟, 乔明, 刘新国. 消炎退热贴离体透皮吸收试验[J]. 湖北中医杂志, 2006, 28(7): 52.

(收稿日期: 2015-05-25 修回日期: 2015-12-19)

(编辑: 邹丽娟)

《中国药房》杂志——RCCSE 中国核心学术期刊, 欢迎投稿、订阅