

芎姜超临界CO₂提取物透皮凝胶的经皮渗透研究^Δ

钦富华^{1*},董宇²,章建民²,王明军¹(1.浙江医药高等专科学校,浙江宁波 315100;2.浙江省中医药研究院,杭州 310007)

中图分类号 R283.6 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)23-2116-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.23.02

摘要 目的:研究川芎、炮姜超临界CO₂提取物透皮凝胶(简称芎姜超临界CO₂提取物凝胶)的经皮渗透性。方法:通过透皮扩散仪测定芎姜超临界CO₂提取物凝胶经离体大鼠皮肤的渗透性,分别以藁本内酯、6-姜酚为指标成分,高效液相色谱(HPLC)法测定药物含量求算累积渗透量(Q)与稳态透皮速率(J_s)。结果:芎姜超临界CO₂提取物凝胶中藁本内酯和6-姜酚均能有效经皮渗透,J_s分别为(47.57±3.77)、(8.29±1.47)μg/(cm²·h),14 h平均累积渗透百分数分别为(26.99±1.89)%和(14.40±1.18)%。结论:芎姜超临界CO₂提取物凝胶具有良好的经皮渗透性,经皮给药有望作为芎姜超临界CO₂提取物的一种新给药途径。

关键词 芎姜复方;超临界CO₂提取物;经皮给药;凝胶

Transdermal Penetration of Hydrogel Containing Xiongjiang CO₂-SFE *in vitro*

QIN Fu-hua¹, DONG Yu², ZHANG Jian-min², WANG Ming-jun¹ (1.Zhejiang Pharmaceutical College, Zhejiang Ningbo 315100, China;2.Zhejiang Academy of TCM, Hangzhou 310007, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the transdermal permeation of hydrogel containing CO₂-SFE of Ligusticum chuanxiong and Zingiber officinale (called Hydrogel containing Xiongjiang CO₂-SFE for short). METHODS: The transdermal permeation of Hydrogel containing Xiongjiang CO₂-SFE was determined by transdermal diffusion device, with ligustilide and 6-shogaol as indicators. Accumulative transdermal quantity and static percutaneous rate of drugs were determined by HPLC. RESULTS: The results showed that ligustilide and 6-shogaol could both permeate across the rat skin *in vitro*; static percutaneous rate of them were (47.57±3.77) μg/(cm²·h) and (8.29±1.47) μg/(cm²·h); 14 h average accumulative permeation percentages were (26.99±1.89)% and (14.40±1.18)%, respectively. CONCLUSIONS: The results show good transdermal permeation of Hydrogel containing Xiongjiang CO₂-SFE. The percutaneous administration is a potential route of administration for Xiongjiang CO₂-SFE.

KEYWORDS Xiongjiang compound; Supercritical CO₂-SFE; Percutaneous administration; Hydrogel

近年来,剖宫产率呈明显上升趋势,然而不少研究表明剖宫产术后子宫复旧明显差于自然分娩^[1]。子宫复旧不良将导致产后宫底下降缓慢、恶露增多、恶露持续时间延长,甚至发生产后出血或产褥感染。促进剖宫产术后子宫复旧,减少因子宫复旧不良导致的相关并发症,促进产妇产褥期康复,有其重要的临床意义。中医根据产后“瘀血内阻,多瘀多虚”的特点,以活血祛瘀、养血益气的治疗原则,对促进产后子宫复旧取得了一定的进展^[2-4]。

本课题组通过采用正交试验对傅氏生化汤中的关键药味和最佳剂量进行分析和筛选,得出了具有明显的促产后子宫复旧功效的芎姜复方(川芎和炮姜的比例为9:2, *m/m*)^[5],并采

用优化的超临界CO₂提取工艺进行提纯,优化提取条件为提取压力300 bar,提取时间1.5 h,提取温度60℃,解析温度70℃,得率4.1%^[6]。超临界CO₂提取物中川芎、炮姜的有效成分内酯和萜类的含量较高,药效较强,将芎姜复合物超临界提取物制成透皮给药制剂外贴或可达到收缩子宫,促产后子宫复旧的功效^[7]。本研究以藁本内酯和6-姜酚为川芎和炮姜的指标成分,考察芎姜超临界CO₂提取物凝胶的体外透皮性能,初步探讨其经皮给药的可行性。

1 材料

1.1 仪器

U3000型高相液相色谱(HPLC)仪(美国戴安公司);

[17] Miglio G, Rosa AC, Rattazzi L, *et al.* Protective effects of peroxisome proliferator-activated receptor agonists on human podocytes: proposed mechanisms of action[J]. *Br J Pharmacol*, 2012, 167(3):641.

[18] Sheng X, Wang M, Lu M, *et al.* Rhein ameliorates fatty

liver disease through negative energy balance, hepatic lipogenic regulation, and immunomodulation in diet-induced obese mice[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2011, 300(5):E886.

[19] Choi SB, Ko BS, Park SK, *et al.* Insulin sensitizing and alpha-glucoamylase inhibitory action of sennosides, rheins and rhaponticin in Rhei Rhizoma[J]. *Life Sci*, 2006, 78(9):934.

(收稿日期:2014-01-01 修回日期:2014-03-03)

^Δ 基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(No.Y2080501);宁波市科技项目(No.2007A610078)

* 讲师。研究方向:药物制剂新剂型。E-mail: qinfh@mail.zjpc.net.cn

TU-1810SPC型紫外分光光度仪(北京普析通用仪器有限责任公司); Advantage系列超纯水机(美国Pall公司); TK-12B型透皮扩散试验仪(上海铂凯科技有限公司); HJ-3型磁力搅拌器(常州国华电器有限公司); AL204型电子天平[梅特勒-托利仪器(上海)有限公司]; pHS-25型数显pH计(上海精密科学仪器有限公司); XW-80A型漩涡混合器(上海精科实业有限公司); DHG-9203A型电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科技有限公司)。

1.2 药品与试剂

蒿本内酯对照品(批号:20130305,纯度:≥98%)、6-姜酚对照品(批号:20130120,纯度:≥98%)均购自(上海金穗生物科技有限公司); 芎姜超临界CO₂提取物(浙江中医药研究院,批号:20130512,总内酯和总萜类质量分数:67.5%); 氮酮(上海展云化工有限公司); 卡波姆940(上海医药工业研究院); 无水乙醇、聚乙二醇、丙二醇(国药集团化学试剂有限公司); 甲醇为色谱纯,乙腈为特级色谱纯,其余试剂均为分析纯。

1.3 动物

健康SD大鼠,♂,体质量(250±20)g,由浙江省医学科学院浙江省实验动物中心提供[实验动物使用合格证号:SCXK(浙)2003-0001]。

2 方法与结果

2.1 检测波长的确定

蒿本内酯和6-姜酚分别在215、218 nm波长处有最大吸收,为使两个组分在同一色谱条件下进行检测,经预试验将218 nm作为测定波长,灵敏度较高^[9]。

2.2 色谱条件

色谱柱:Agilent TC-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相:甲醇-0.5%乙酸溶液(60:40, V/V)为; 流速:1.0 ml/min; 检测波长:218 nm; 柱温:30 ℃; 进样量:20 μl。在此色谱条件下,6-姜酚和蒿本内酯的出峰时间分别为5.9、10.1 min,峰形、分离度、检测时间均较为理想。色谱见图1。

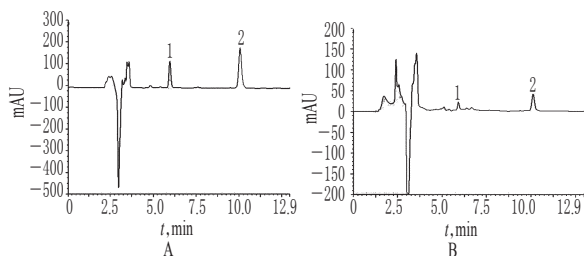


图1 高效液相色谱图

A. 对照品; B. 透皮样品; 1. 6-姜酚; 2. 蒿本内酯

Fig 1 HPLC chromatograms

A. control substance; B. sample; 1. 6-shogaol; 2. ligustilide

2.3 溶液的制备

2.3.1 蒿本内酯对照品溶液的制备 精密称取蒿本内酯对照品93.9 mg,置50 ml量瓶中,加少量氯仿溶解,用甲醇定容至刻度。精密吸取上述溶液10 ml,置50 ml量瓶中,用甲醇定容至刻度,混匀,得质量浓度为375.6 μg/ml的蒿本内酯对照品溶液,贮藏,备用。

2.3.2 6-姜酚对照品溶液的制备 精密称取6-姜酚对照品10.0 mg,置25 ml量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,得质量浓度为400 μg/ml的6-姜酚对照品液,贮藏,备用。

2.3.3 混合对照品系列溶液的制备 精密吸取蒿本内酯溶液

和6-姜酚对照品溶液适量,置10 ml量瓶中,加甲醇稀释至刻度,制备成系列混合对照品溶液,其中蒿本内酯的质量浓度分别为3.756、9.39、18.78、37.56、93.9、187.8 μg/ml,6-姜酚的质量浓度分别为1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0 μg/ml。贮藏,备用。

2.4 方法学考察

2.4.1 标准曲线的制备 精密吸取“2.3.3”项下系列混合对照品溶液各20 μl,按“2.2”项下色谱条件进样测定。以6-姜酚对照品质量浓度(c, μg/ml)为横坐标,6-姜酚峰面积(A₁)为纵坐标,进行线性回归,得回归方程为A₁=0.444 2c+0.127 3(r=0.999 8)。结果表明,6-姜酚质量浓度在1.0~50.0 μg/ml范围内与其峰面积呈良好线性关系。以蒿本内酯对照品质量浓度(c, μg/ml)为横坐标,蒿本内酯峰面积(A₂)为纵坐标,进行线性回归,得回归方程为A₂=0.109 3c+0.274 8(r=0.999 7)。结果表明,蒿本内酯质量浓度在3.756~187.8 μg/ml范围内与蒿本内酯峰面积呈良好线性关系。

2.4.2 精密度试验 取“2.3.3”项下制备的高、中、低质量浓度的混合对照品溶液,1 d内连续进样6次,测定峰面积,计算日内精密度;连续测定6 d,计算日间精密度。结果显示,供试液中蒿本内酯高、中、低质量浓度的日内RSD分别为0.87%、1.01%、1.51%,日间RSD分别为0.95%、1.14%、1.38%;供试液中6-姜酚高、中、低质量浓度的日内RSD分别为0.74%、0.44%、1.28%,日间RSD分别为1.16%、0.91%、1.42%,表明精密度良好。

2.4.3 加样回收率试验 按处方取空白凝胶基质适量,置5 ml量瓶中,加入“2.3.3”项下制备的高、中、低质量浓度的混合对照品溶液溶解并定容,0.45 μm微孔滤膜过滤后按“2.2”项下色谱条件进样测定,按标准曲线方程计算。结果显示,蒿本内酯高、中、低质量浓度的加样回收率分别为102.9%、101.6%、98.7%,RSD分别1.21%、1.53%、0.96%;6-姜酚高、中、低质量浓度的加样回收率分别为101.7%、100.8%、98.1%,RSD为0.92%、1.57%、1.81%,表明符合方法学要求。

2.4.4 稳定性试验 取“2.3.3”项下混合对照品溶液(蒿本内酯、6-姜酚质量浓度分别为18.78、5.0 μg/ml)适量,按“2.2”项下色谱条件进样,于0、2、4、8、12、24 h测定,计算得到的峰面积RSD=1.28%,表明指标成分在24 h内稳定。

2.5 体外透皮试验

2.5.1 透皮凝胶的制备 取芎姜超临界CO₂提取物2 g,乙醇10 ml,丙二醇10 g,三乙醇胺1.5 g,1.0 g卡波姆940,加蒸馏水至100 g。将卡波姆940制备成4%的浓溶液静置过夜,让其充分溶胀,取蒸馏水适量,溶解丙二醇,并与上述卡波姆溶液混合均匀后,边搅拌边加入三乙醇胺,使成凝胶基质,将芎姜超临界CO₂提取物溶于乙醇中,在搅拌下缓慢加入凝胶基质中,最后加蒸馏水至足量,即得。

2.5.2 凝胶含量测定 精密称定约0.3 g提取物凝胶,置25 ml量瓶中,用接收液超声溶解并定容。用0.45 μm微孔滤膜过滤,取滤液进行HPLC分析,根据峰面积计算药物含量。经测定,所制备的凝胶蒿本内酯含量为5.48 mg/g(质量分数为0.548%);6-姜酚的含量为1.82 mg/g(质量分数0.182%)。

2.5.3 接收液的选择 分别测定了川芎超临界CO₂提取物中蒿本内酯和6-姜酚在不同接收液中的饱和溶解度。在体积分数为30%的乙醇溶液中,蒿本内酯与6-姜酚的溶解度较大,满足试验要求的漏槽条件。因此,最终选择了体积分数为30%的乙醇溶液作为接收介质。

2.5.4 离体皮肤的制备^[9] 将SD大鼠脱颈处死,剪去腹部皮肤长毛,刮除绒毛后,剥离腹部皮肤,剔除皮下组织和脂肪,用生理盐水洗净,低温(-20℃)贮藏,备用。试验前自然解冻,并用生理盐水浸泡15 min。

2.5.5 透皮吸收试验方法^[10] 取大鼠皮肤固定于直立式双室Franz扩散池上,角质层朝上。以30%无水乙醇溶液为接收液,池内置磁力搅拌子,转速为300 r/min,(37.0±0.5)℃恒温水浴,先平衡30 min,更换接收液,排尽皮肤下的空气,滤纸吸干皮肤表面的液体。在供给室装入凝胶,于透皮试验开始后2、4、6、8、10、12、14 h时分别取样1 ml,并补充等体积同温的接收液。不同时间点样品作HPLC分析,将测得的样品峰面积代入标准曲线方程中换算成药物质量浓度。

2.5.6 累积渗透量(Q)和稳态透皮速率(J_s)的计算^[11] 通过测定Franz扩散池中的藁本内酯和6-姜酚的质量浓度,按照以下公式求出不同时间内藁本内酯和6-姜酚的Q:

$$Q=[c_n \times V_0 + \sum_{i=1}^{n-1} c_i \times V] / S$$

式中,c_n为第n个取样点(J_s)浓度(μg/ml);c_i为第i个取样点质量浓度(μg/ml);S为扩散面积(cm²);V₀为扩散池体积(ml);V为取样体积(ml)。以Q对时间(t)作图,将曲线的直线部分进行线性回归,直线的斜率为J_s[(μg/cm²·h)]。芎姜超临界CO₂提取物凝胶的体外透皮参数见表1;芎姜超临界CO₂提取物凝胶的体外透皮曲线见图2。

表1 芎姜超临界CO₂提取物凝胶的体外透皮参数(n=5)

Tab 1 Permeation parameters of Hydrogel containing Xiongjiang CO₂-SFE in vitro (n=5)

指标成分	渗透动力学方程	回归系数(r)	J, μg/(cm ² ·h)	14 h 累积渗透百分数, %
藁本内酯	Q=47.573t-211.5	0.991	47.57±3.77	26.99±1.89
6-姜酚	Q=8.2895t-36.491	0.995	8.29±1.47	14.40±1.18

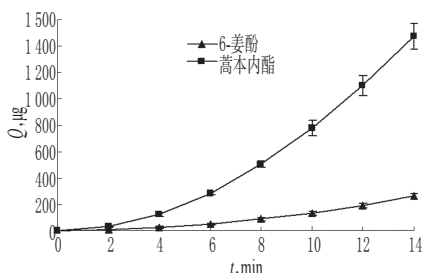


图2 芎姜超临界CO₂提取物凝胶的体外透皮曲线(n=5)

Fig 2 Permeation curves of hydrogel containing Xiongjiang CO₂-SFE in vitro (n=5)

3 讨论

本研究采用超临界CO₂萃取技术提取芎姜复方中的有效成分,相比传统的乙醇回流法,本法可保持有效成分的活性,并能充分地提取萜类和内酯成分,且提取物纯度高,无溶剂残留,是较为理想的提纯方法。

在芎姜超临界CO₂提取物凝胶的透皮试验中,藁本内酯和6-姜酚14 h平均累积渗透百分数分别为(26.99±1.89)%和(14.40±1.18)%,显示有较高的经皮透过性,证明了芎姜提取物透皮给药的可行性。经皮给药可望作为川芎和炮姜提取物

的一种新的给药途径。有关于透皮凝胶的有效性还有待于进行进一步的研究。

本研究考察了基质质量浓度对药物经皮渗透的影响。结果表明,基质质量浓度低,凝胶剂中药物透皮快,累积透过量大。0.5%卡波姆凝胶14 h藁本内酯和6-姜酚的Q分别为1.5%卡波姆凝胶的1.74倍和1.61倍。但是,0.5%卡波姆凝胶剂外观接近流体,黏稠度小,不利于基质与皮肤的黏附;而1%卡波姆凝胶剂透明度和黏附性好,流动性适宜,符合外用凝胶的质量要求。综合药物的透皮速度和凝胶剂的使用方便性,确定1%卡波姆作为药物基质。

为了进一步提高提取物中有效成分的经皮渗透,本研究在原有的处方基础上加入了一定量的亲油性或亲水性的氮酮,与大多数情况下氮酮促渗作用不同的是,研究结果显示不管是亲油性还是亲水性氮酮的加入,都不能有效地促进两种有效成分的经皮渗透,反而呈现一定的阻滞作用,具体的原因还有待于进一步分析。

参考文献

- [1] 李晓勤,张瑛,孙江川,等.剖宫产与自然分娩子宫复旧情况的比较[J].重庆医科大学学报,2009,34(5):640.
- [2] 左燕,陈丽宏,谢人明.试论中成药子宫复旧促进剂的概念、分类及临床应用[J].中国医院药学杂志,2011,31(12):1014.
- [3] 张帆,吴成,林珊.温经活血扶正法对剖宫产术后子宫复旧及血液流变学的影响[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(3):282.
- [4] 黄益平.产后子宫复旧不全的中医药防治进展[J].河南中医,2012,32(1):124.
- [5] 王明军,叶定江,朱荃.傅氏生化汤缩宫效应的正交设计分析[J].成都中医药大学学报,2000,23(4):39.
- [6] 钦富华,夏晓静,董宇,等.UV-Vis测定芎姜复方CO₂超临界提取物中总内酯和总萜类的含量[J].中中药学,2013,11(3):222.
- [7] 吴平丽,刘雯,张继全,等.川芎中洋川芎内酯A和Z-藁本内酯的HPLC法测定[J].中国医药工业杂志,2010,41(4):290.
- [8] 文红梅,彭国平,朱国元,等.HPLC内标法同时测定坤血安软胶囊中藁本内酯和6-姜酚的含量[J].中成药,2007,29(3):371.
- [9] 刘晓昱,饶跃峰,梁文权.炔雌醇醇质体凝胶的经皮渗透研究[J].中国药学杂志,2006,41(4):284.
- [10] 王小芳,郭建博,徐晖,等.川芎和香附超临界CO₂提取物及其制剂的体外经皮透过性[J].中国药剂学杂志,2011,9(5):91.
- [11] 胡英,陈心舒,夏晓静.氯雷他定包合物凝胶的体外透皮研究[J].中国药房,2010,21(29):2727.

(收稿日期:2013-06-02 修回日期:2013-08-11)