

3 种促透剂对钩藤体外透皮吸收的影响

王晓颖, 叶梦屏(福建中医药大学药物制剂教研室, 福州 350108)

摘要: 目的 研究氮酮、冰片、薄荷脑 3 种促透剂对钩藤体外透皮吸收的影响。方法 用改良 Franz 扩散池, 选择大鼠背皮为渗透屏障, 从接受室取样, 用 HPLC 测定样品中钩藤碱含量, 比较 3 种促透剂对钩藤透皮吸收的影响。结果 不同浓度的 3 种促透剂对钩藤碱的透皮效果皆以 5% 为最佳, 含 5% 氮酮、5% 冰片、5% 薄荷脑的钩藤提取液平均透皮速率分别为 1.00, 0.92, 0.87 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$, 使钩藤碱透皮速率分别提高 2.44, 2.24, 1.95 倍。结论 3 种促透剂皆可以促进钩藤主要活性成分钩藤碱的透皮吸收, 在实验浓度范围内, 以 5% 氮酮促渗透效果最好。

关键词: 钩藤碱; 氮酮; 冰片; 薄荷脑; 经皮给药; 透皮吸收

中图分类号: R943.43

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2010)07-0623-03

Effects of Three Different Penetration Enhancers on Transdermal Absorption of the Extract of *Ramulus Uncariae Cum Uncis in Vitro*

WANG Xiaoying, YE Mengping(Department of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the effects of three different penetration enhancers on the transdermal absorption of the extract of *Ramulus Uncariae cum uncis in vitro*. **METHODS** Using the extracorporeal back skin of rat as the penetration barrier in a improved Franz diffusion cell, the percutaneous rates of rhynchophylline at various concentrations of azone, bornel and menthol were compared by determining the content of rhynchophylline by HPLC. **RESULTS** The average percutaneous rate of rhynchophylline were 1.00, 0.92, 0.87 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ respectively corresponding to the concentrations of azone, bornel and menthol at 5%, the enhancing rate (ER) were 2.44, 2.24, 1.95, respectively. **CONCLUSION** Azone, bornel and menthol can enhance transdermal absorption of rhynchophylline (the main active ingredient in *Ramulus Uncariae cum uncis*), and in study range of concentrations of azone, bornel and menthol, the effect of promoting penetration of 5% azone is the best.

KEY WORDS: rhynchophylline; azone; bornel; menthol; transdermal delivery system; transdermal absorption

钩藤为茜草科植物钩藤[*Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Jacks]及同属多种植物的干燥带钩茎枝, 是一种比较常用的中药。实验证实, 钩藤具有明显的降压作用, 其主要有效成分为生物碱类, 主要有钩藤碱和异钩藤碱等^[1]。钩藤碱半衰期短, 进入人体内达血药浓度高峰后迅速代谢^[2]。这不利于钩藤制剂的持续降压作用。经皮给药系统可以绕过肝脏的首过效应及胃肠道的破坏, 维持稳定、持久的血药浓度, 是长期用药的理想剂型。因此, 拟将以钩藤为君药的中药复方研制成经皮给药的巴布剂, 以达到持续降压的给药目的。本实验以钩藤碱为考察指标, 研究了氮酮、冰片和薄荷脑对钩藤提取液体外透皮吸收的影响, 旨在为以钩藤为君药的巴布剂经皮给药研究提供实验依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器

RYJ-6A 型药物透皮扩散试验仪(上海黄海药检仪器有限公司); SPD-10AVP 高效液相色谱仪(日本岛津公司); 4802 型紫外可见分光光度计(上海 UNIC 公司); 旋转蒸发仪(上海亚荣仪器厂); 数显恒温水浴锅(国华电器有限公司); FA2004N 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司)。

1.2 试剂与材料

钩藤碱对照品(中国南昌贝塔生物科技有限公司, 批号: 10172-080114, 纯度: 98.58%)。生理盐水(福州海王福药制药有限公司), 氮酮(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司), 乙腈、甲醇(色谱纯, 国药集团化学试剂有限公司)。水为娃哈哈饮用纯净水(浙江杭州娃哈哈有限公司), 其它试剂为分析纯。

钩藤购于福建中医药大学国医堂(批号: 20090620), 经福建中医药大学中药鉴定教研室鉴定为茜草科植物钩藤[*Uncaria rhynchophylla* (Miq.)

基金项目: 福建省教育厅项目(JA07122); 福建省自然科学基金项目(2008J0291)

作者简介: 王晓颖, 女, 硕士, 讲师

Tel: 13960704809

E-mail: wangxy623@yeah.net

Jacks]。

1.3 动物

健康清洁级 SD 大鼠, 体重(200±10)g, ♂, 购于上海斯莱克实验动物有限责任公司, 实验动物合格证号: 0057155。

2 方法与结果

2.1 样品中钩藤碱含量测定方法的建立

2.1.1 色谱条件 Platisil C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水(78:22, 含 0.01 mol·mL⁻¹ 三乙胺, 用冰醋酸调 pH 7.5); 检测波长: 254 nm, 流速 1 mL·min⁻¹, 进样量 20 μL。此条件下钩藤碱与钩藤中其他成分均能基线分离。

2.1.2 对照品溶液的制备 取钩藤碱对照品适量, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇溶解, 稀释至刻度, 配制成浓度为 20.6 μg·mL⁻¹ 的钩藤对照品溶液。

2.1.3 标准曲线及线性关系的考察 精密吸取一定体积的对照品溶液, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 配制成浓度为 0.10, 0.21, 0.62, 1.03, 2.06, 4.12, 10.30 μg·mL⁻¹ 钩藤碱对照品溶液, 按上述色谱条件, 各进样 20 μL, 测钩藤碱的峰面积。以峰面积为纵坐标, 钩藤碱的浓度为横坐标, 进行回归, 求得标准曲线方程 $Y=50\,292X-976.42$, $r=1.000$, 钩藤碱在 0.10~10.30 μg·mL⁻¹ 内呈良好线性关系。

2.1.4 仪器精密度试验 精密吸取浓度为 10.30 μg·mL⁻¹ 的钩藤碱对照品溶液 20 μL, 重复进样 6 次, 按上述色谱条件测定峰面积, RSD 为 0.18%。

2.1.5 稳定性试验 精密吸取同一份钩藤碱对照品溶液, 分别在 0, 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48 h 进样测定, 计算峰面积 RSD 为 0.40%($n=8$), 表明样品在 48 h 内稳定。

2.1.6 加样回收率试验 分别向已知含量的透皮接受液中加入一定量的钩藤碱对照品溶液, 测定峰面积, 利用标准曲线计算含量, 计算回收率, 结果钩藤碱平均加样回收率为 100.20%, RSD=0.19% ($n=6$)。

2.2 透皮吸收实验准备工作

2.2.1 实验样品的制备 钩藤药材粗粉, 氨水碱化后加 70%乙醇于 82 °C 水浴上提取 2 次, 首次 8 倍量乙醇、提取 2 h, 第二次 6 倍量乙醇, 提取 1 h, 滤过, 合并滤液, 减压回收乙醇, 浓缩至每 1 g 药液相当于原药材 1 g。取钩藤提取液, 每份 1 mL,

按实验要求加入不同比例量的促透剂, 备用。

2.2.2 钩藤提取液中钩藤碱含量的测定 精密吸取钩藤提取液 1 mL, 用甲醇定容至 10 mL, 取其中 1 mL 再次用甲醇定容至 10 mL, 滤过后, 取 20 μL 注入高效液相色谱仪, 测钩藤碱峰面积, 代入标准曲线方程得药材提取液中钩藤碱含量为 0.412 mg·mL⁻¹。

2.2.3 离体鼠皮的制备 SD 大鼠断颈处死, 用 8% Na₂S 溶液脱毛, 取背皮, 剥离皮下脂肪和筋膜, 用生理盐水清洗干净后置于冰箱中冷冻保存, 备用。

2.2.4 透皮接受液的选择 为更好模拟皮下生理环境并使透皮后的成分在接受液中有很好的溶解度, 选择生理盐水、生理盐水-乙醇(7:3)、生理盐水-乙醇(5:5)、生理盐水-乙醇(3:7)4 种接受液进行测试, 结果表明以生理盐水-乙醇(3:7)为接受液的钩藤碱累积渗透率较好。

2.3 透皮吸收实验

实验采用改良 Franz 扩散池, 透皮扩散面积 2.8 cm², 接受室的体积为 6.5 mL。取制备好的鼠皮, 解冻后用生理盐水洗净, 剪成适合大小, 仔细检查确定皮肤表面无破损, 分别置于透皮扩散池的供给室与接受室之间, 固定, 角质层朝向供给室。将接受室内注入生理盐水-乙醇(3:7)做为接受液, 使真皮一侧与接受液接触, 排除气泡, 将安装好的扩散池置于 37 °C 恒温水浴中磁力搅拌, 搅拌速度为 200 r·min⁻¹, 在供给池中加入 1 mL 生理盐水, 0.5 h 后将供给室中的生理盐水吸干, 弃去接受室中的接受液并重新注入新的接受液, 排除气泡。然后将供给室内加入准备好的样品 1 mL, 实验开始后 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h 后取出全部接受液, 每次取样后立即补同温度等体积的生理盐水, 排除气泡后继续实验, 同法用生理盐水 1 mL 做空白。

取出的接受液用 0.22 μm 微孔滤膜过滤后, 吸取 20 μL 注入高效液相色谱仪, 在 254 nm 下测钩藤碱的峰面积, 代入“2.1.3”项下标准曲线方程, 计算浓度, 然后计算单位面积累积渗透量。其 HPLC 图见图 1。

单位面积累积渗透量计算公式: $Q = \sum C_n V / A$; $\sum C_n = C_1 + C_2 + C_4 + \dots + C_j$, 式中 Q 为单位面积累积渗透量, A 为接受室面积, V 为接受液体积, j 为接受液取样时间。每份样品重复 4 次。

将单位面积累积渗透量 Q 对时间 t 作图, 所得曲线的直线部分进行回归, 得回归方程, 该方程为

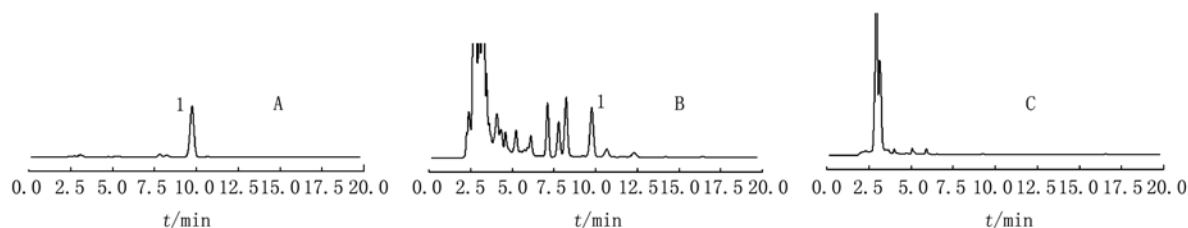


图1 高效液相色谱图

A-对照品溶液; B-皮肤透过液; C-空白皮肤透过液; 1-钩藤碱

Fig 1 HPLC chromatogram

A-reference sample; B-receptor solution; C-blank receptor solution; 1-rhynchophylline

含不同浓度促透剂的钩藤提取液的透皮释药动力学方程($Q-t$ 方程), 其斜率即为透皮速率。平均累积释药曲线见图 2。不同促透剂对钩藤提取液的促透结果见表 1。

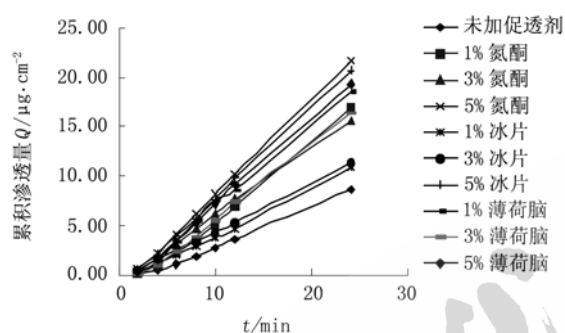


图2 不同促透剂对钩藤提取液体外透皮的影响($n=4$)

Fig 2 Penetration profiles of the extract of *Ramulus Uncariae cum uncis* with different penetration enhancers *in vitro* ($n=4$)

表1 不同促透剂作用下的钩藤提取液透皮速率($n=4$)

Tab 1 The percutaneous rate of the extract of *Ramulus Uncariae cum uncis* through the back skin of rat with different penetration enhancers ($n=4$)

促透剂	透皮速率/ $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$	促透倍率/ ER
未加	0.41 ± 0.02	1.00
1%氮酮	0.80 ± 0.03	1.95
3%氮酮	0.78 ± 0.08	1.90
5%氮酮	1.00 ± 0.03	2.44
1%冰片	0.49 ± 0.06	1.20
3%冰片	0.49 ± 0.08	1.20
5%冰片	0.92 ± 0.05	2.24
1%薄荷脑	0.85 ± 0.07	2.07
3%薄荷脑	0.76 ± 0.08	1.85
5%薄荷脑	0.87 ± 0.03	1.95

2.4 透皮吸收实验结果分析

综合分析实验结果, 氮酮、冰片和薄荷脑对钩藤碱皆具有促渗透作用, 并在实验浓度范围内, 3种促透剂皆以5%浓度促透效果最好。24 h 内含5%氮酮、5%冰片、5%薄荷脑的钩藤提取液的平均透

皮速率分别为 $1.00, 0.92, 0.87 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$, 使钩藤碱透皮速率分别提高 2.44, 2.24, 1.95 倍。促透效果: 5%氮酮 > 5%冰片 > 5%薄荷脑。

3 讨论

透皮吸收实验最理想的皮肤材料是人的皮肤, 但人的皮肤难以获得。人腹皮与大鼠背皮厚度最接近^[3], 大鼠背皮角质层厚度比其腹皮大, 层数比其腹皮多, 许多透皮制剂的筛选研究选用大鼠背部皮肤作为基本部位^[4]。本研究是以钩藤为君药的中药巴布剂研究的重要组成部分, 该制剂拟以神阙穴(肚脐)为用药部位, 故本实验选择与人腹皮较为相近的大鼠背皮作为渗透屏障, 并在实验前后检查皮肤无破损, 确定实验结果可靠。

氮酮对皮肤的毒性、刺激性都很低, 是目前公认的优良促透剂, 其最佳促透浓度为 0.1%~5%, 所以本实验选取氮酮浓度范围为 1%~5%。天然促透剂也具有较好的促透作用, 虽然效果稍弱于氮酮, 但同样具有良好的使用前景。除此以外, 其他中药挥发油亦有很好的促透作用, 因此, 本实验将进一步尝试其他促透剂及联合使用各种促透剂, 以使钩藤透皮达到更好的效果, 为以钩藤为君药的巴布剂的研究提供重要实验依据。

REFERENCES

- [1] SONG C Q, FAN Y, HUANG W H, et al. Different hypotensive effects of various active constituents isolated from *Uncaria rhynchophylla* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2000, 31(10): 762-764.
- [2] WANG Y F, WEI L X, WANG B Z. Biopharmaceutical analysis in experimental animal of rhynchophylline [J]. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 1999, 19(1): 58-60.
- [3] LIANG B W. New Technology of Transdermal Delivery of Tradit Chin Med(中药经皮给药技术) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2006: 27.
- [4] ZHENG J M. New Formulations of Transdermal Delivery(经皮给药新剂型) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2006: 28.

收稿日期: 2009-12-28