

复方肝舒贴的体外释放研究*

□汤秀珍** 刘志远 沈平壤 (国家中药制药工程技术研究中心 上海 201203)

摘要:本文旨在研究复方肝舒药物的体外释放速度和药物中化学成分自身经皮渗透特性。复方肝舒用医用胶制备成为贴剂,体外释放速度和经皮渗透特性分别通过药典释放度方法和 Franz 扩散池法进行考察。体外释放研究表明,复方肝舒贴制剂中黄芪甲苷在 2h 释放率约为 5%,12h 释放超过 70%,此后释放速度逐渐放缓;莪术醇 24h 累计释放超过 50%;没药和王不留行中成分也有不同程度释放。经皮渗透结果表明,莪术、郁金和没药中所含成分能够穿过裸鼠皮肤。

关键词:复方肝舒贴 释放 渗透

复方肝舒贴原为临床经验方,具有活血化瘀、行气止痛、益气通络之功效。含黄芪、莪术、郁金等 6 味药,其中黄芪中含黄芪皂苷甲、乙、丙(astragalus-saponin I, II, III),莪术和郁金中含姜黄素、挥发油等,王不留行中含多种皂苷,夏枯草中含熊果酸(ur-solic acid),齐墩果酸(oleanolic acid),芦丁(rutin),槲皮素(quercetin)等,没药中含挥发油等。

本中心以医用胶为基质,采用现代制剂手段将中药复方制成树脂型贴剂。为考察新剂型的可行性,我们进一步考察了复方肝舒贴中黄芪甲苷、莪术醇等多种成分的体外释放以及经皮渗透性能,为该剂型研究提供理论依据。

一、仪器与材料

ZRS-8G 智能溶出试验仪(天津大学无线电厂); GC-17A 型气相色谱仪(日本岛津); Franz 扩散池(上

海市中国科学院有机化学研究所); CS501 型超级恒温水浴(上海浦东荣丰科学仪器有限公司); 78-1 型磁力加热搅拌器(浙江乐清乐成电器厂); Camma 薄层色谱数码成像系统; Camma 薄层色谱自动点样系统; 硅胶 G 预制板(青岛海洋化工厂)。

药材(上海养和堂饮片厂); 复方肝舒贴(国家中药工程技术研究中心自制); 复方肝舒贴中间提取物(国家中药工程技术研究中心自制); 黄芪甲苷对照品(100115-200305 中国药品生物检定所); 莪术醇对照品(批号 100185-200305 中国药品生物检定所); 熊果酸对照品(批号 110742-200313 中国药品生物检定所); 没药对照药材(批号 129671-200202 中国药品生物检定所); 王不留行对照药材(批号 121094-200302 中国药品生物检定所); 所用试剂均为分析纯。

二、实验方法与结果

1. 分析方法研究

收稿日期: 2005-10-31

修回日期: 2006-03-30

* 国家中医药管理局课题(02-03ZQ03): 中药复方透皮给药制剂技术的基础研究, 负责人: 汤秀珍。

** 联系人: 汤秀珍, 高级工程师, 研究方向: 中药制剂, Tel: 021-50805522, E-mail: xztang@nercmctcm.com。

60 [World Science and Technology/Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica]

(1) 黄芪甲苷的含量测定方法研究。

君药黄芪中黄芪甲苷为有效成分之一,故以其为定量对象,参照有关文献^[1-2]建立黄芪甲苷的测定方法。

①薄层层析条件:硅胶 G 薄层板,以氯仿-甲醇-水 (13:6:2) 10℃ 以下放置过夜的下层溶液为展开剂,10%硫酸乙醇溶液为显色剂,105℃ 烘至显色。

②对照品溶液的制备:精密称取黄芪甲苷对照品,加甲醇制成每 1mL 含 1mg 的溶液,作为对照品溶液。

③扫描波长 $\lambda_s=530\text{nm}$, $\lambda_R=700\text{nm}$, 测量供试品吸收度积分值与对照品吸收度积分值,计算,即得。

(2) 莪术醇的含量测定方法研究^[6]。

莪术和郁金中含有挥发油,而挥发油中主要含有莪术醇、牻牛儿酮、莪术酮、榄香烯等倍半萜成分。为此,建立了莪术醇的测定方法。

①色谱条件:

色谱柱:OV 1701 (30mm*0.32mm*0.25 μm);柱温:190℃;进样口温度 230℃;检测温度 260℃;载气 氮气;分流比 2:1;进样量 2 μL 。

②方法学研究:

在本色谱条件下,空白无干扰;高、中、低 3 种浓度的回收率分别为 101.2%, 99.2%, 101.6% 平均回收率为 100.6 $\pm$ 1.29%, RSD 为 1.3% (n=6)。

(3) 其他成分的薄层鉴别方法研究。

复方肝舒贴中除了含有黄芪、莪术、郁金外,还含有王不留行、夏枯草、没药等味药,为了更好地反映复方中其它组合体外释放情况,又建立了这些物质的薄层鉴别方法。

①以没药、王不留行为对照药材,熊果酸为对照品的 TLC^[3-5,7]:

对照品、对照药材溶液制备:熊果酸对照品 5.0mg,加无水乙醇溶解,并定容于 10mL,作为熊果酸对照品溶液;没药对照药材 0.3g,加无水乙醇 50mL,超声提取 20min,滤过,滤液减压浓缩至 2mL,作为没药对照药材溶液;另取王不留行药材 1g,加水 30mL,热回流提取 0.5h,过滤,滤液减压浓缩至干,加无水乙醇 5mL 溶解,用硅胶柱 (1.5cm*13cm, 200 目) 分离,

先用 50mL 蒸馏水洗脱,弃去,再用 10% 甲醇 50mL 洗脱,收集洗脱液,蒸干,残渣加无水乙醇 1mL 使溶解,作为王不留行对照药材溶液。

薄层条件:硅胶 G 板,以环己烷-氯仿-乙酸乙酯-冰醋酸 (20:5:1:0.5) 为展开剂;展距为 15cm;显色剂 a 碘缸蒸熏, b 10% 硫酸乙醇

点样量:供试品 5 μL ,对照品溶液、对照药材溶液各 3 μL

②以王不留行对照药材为考察指标的 TLC:

薄层条件:硅胶 G 板,展开剂以氯仿:甲醇:水 (15:7:2) 10℃ 以下放置过夜的下层溶液为展开剂,对照药材为王不留行对照药材,展距为 15cm,显色剂为碘缸蒸熏。

点样量:供试品 5 μL ,对照品溶液、对照药材溶液各 3 μL 。

2. 体外释放度研究

(1) 黄芪甲苷的释放度测定。

取复方肝舒贴成品 8 贴,剪成圆形,3.0g/贴,溶出介质为 20% 乙醇,温度 37℃,转速 100r·min⁻¹,于 2, 4, 6, 8, 12, 18, 24, 30h 不同时间取样,然后减压浓缩干,加甲醇溶解,定容至 2mL。按分析方法项下“黄芪甲苷”的方法进行测定,其中供试品溶液 2, 4, 6, 8hr 的上样量为 8 μL ; 12, 18, 24, 30h 的为 4 μL ,对照品溶液为 2 μL 。

计算黄芪甲苷的累计释放百分数,结果见图 1。

从结果可以看出黄芪甲苷 2h 释放 5% 左右, 12h

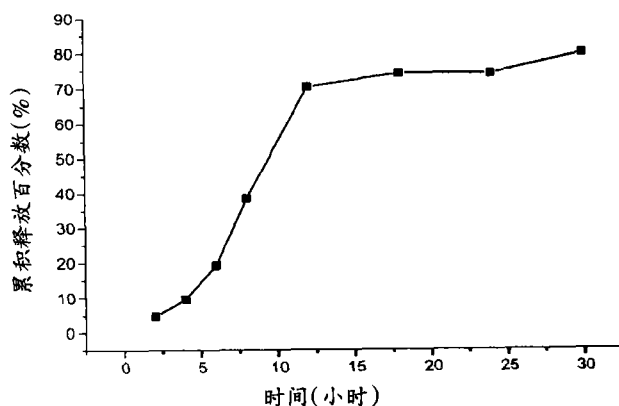


图 1 不同时间黄芪甲苷的体外释放度结果

已溶出 70%以上,以后释放渐缓。

(2) 莪术醇的体外释放度研究。

取复方肝舒贴成品 12 贴,剪成圆形,3.0g/贴,溶出介质为 20%乙醇,温度 37℃,转速 100r·min⁻¹,于 24hr 取样,合并溶出液,减压浓缩至无醇味,按药典方法水蒸气提取挥发油,然后按分析方法项下“莪术醇的含量测定”进行测定,计算莪术醇 24hr 累计释放百分数,结果为 53.3%。

由于复方肝舒贴中挥发油量太少,本次实验采用 12 贴进行实验,并只做了 24h 的体外释放研究,可以看出莪术醇的体外释放基本完全。

(3) 复方肝舒贴中其他有关成分的释放度研究。

复方肝舒贴成品 8 贴,分别剪成圆形,3.0g/贴,溶出介质为 20%乙醇,温度 37℃,转速 100r·min⁻¹,分别经 2,4,6,8,12,18,24,30hr 释放度实验后,浓缩至干,加甲醇定容为 2mL,作为供试品溶液。按分析方法项下的“薄层鉴别”进行分析,结果见图 2,3。

如图所见,碘缸显色,供试品图谱与王不留行对照药材和没药对照药材图谱相应位置显相同颜色斑点;10%硫酸乙醇显色,供试品图谱与王不留行对照药材和没药对照药材图谱相应位置显相同颜色斑点,说明复方肝舒贴中的王不留行和没药所含成分也可以从制剂中释放出来。

3. 体外透皮研究

(1) 裸鼠的处理。

取 20g 左右的裸鼠,断颈处死,仔细剥离皮肤,除去皮下组织和脂肪、血管(注意不损伤角质层),用生理盐水冲洗干净不需要立即用于实验的皮肤样品,真空密闭包装后置冰箱低温(-20℃)保存,备用。

(2) 试验装置。

实验时选用改进的 Franz 扩散池。Franz 扩散池由两部分组成,上室为扩散室,下室为接收室,中间夹着皮肤。接收室底部连接一个取样管,扩散室直径 1.0cm,扩散有效面积 0.785cm²,接收室体积 6.8ml,接收液为 20%乙醇液,磁力搅拌速度为 100r/min,单室扩散池水浴温度维持在 32±0.5℃。

(3) 体外透皮实验研究。

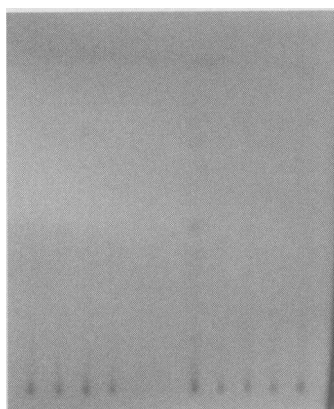


图 2 碘缸蒸熏 TLC

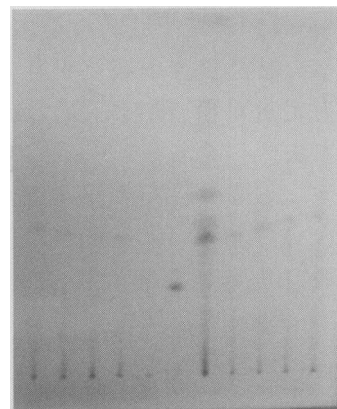


图 3 10%硫酸乙醇显色 TLC

① 莪术醇的经皮渗透试验：

首先考察皮肤对试验的干扰性,通过皮肤空白试验表明,皮肤 24h 不干扰试验,然后将样品加到扩散室中,24h 后收集样品,将透皮接收液转移至分液漏斗,分别用乙醚萃取 3 次,每次 10mL,收集乙醚液,合并,低温挥干,滴加乙醚溶解,按“莪术醇含量测定”项下方法进行分析,结果见表 1。

从表中可以看出,莪术油中的莪术醇可以经皮渗透,且随着挥发油量的增大,体外渗透量有增大的趋势。

② 其他成分的经皮渗透研究：

为考察复方肝舒贴中除莪术醇外其他成分的经皮渗透情况,将中间提取物加到扩散池中,透皮 24h 后,将接收液减压浓缩至干,然后用 95%乙醇 1mL 溶解,做 TLC 分析,结果见图 4,5。

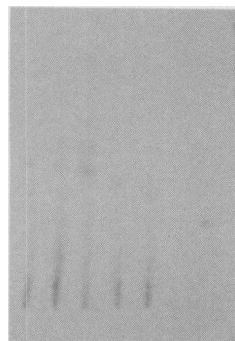
从 TLC 图谱可以看出,经皮渗透的接受液中有些成分与没药对照药材、王不留行对照药材中的一些斑点可以对应,说明复方肝舒贴中的没药、王不留行中的成分也可以透过裸鼠皮肤。

表 1 莪术醇体外透皮结果

样品	渗透量 Ws(mg)(n=3)
空白	0.006
莪术挥发油 0.5mL	0.0213
莪术挥发油 1mL	0.0301
莪术挥发油 1mL+莪术醇(1mg/mL)0.5mL	0.0433

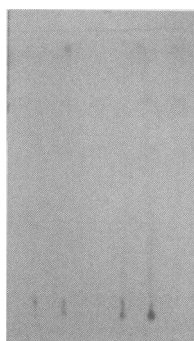
三、讨 论

1. 从复方肝舒贴的体外释放可以看出黄芪、没药、莪术、郁金、王不留行中的成分均可以从制剂中释放出来。其中黄芪中黄芪甲苷 2h 释放 4.81%, 12h 时可到 70%, 释放基本完全; 其他成分在考察时间范围内均有一定程度的释放。



1, 2, 4, 5 号样品为复方肝舒贴中间提取物, 3 号样品为没药对照药材, 6 号样品为王不留行对照药材, 7 号样品为熊果酸对照品

图 4 经皮成分的 TLC 图



1, 2, 3, 4 号样品为复方肝舒贴中间提取物, 5 号样品为王不留行对照药材

图 5 经皮成分的 TLC 图

2. 复方肝舒贴处方中没药、莪术、郁金均含有挥发性油类成分, 这些成分既可以从基质中释放出来, 又可以经皮渗透, 探讨复方制剂中挥发性药物的体外渗透具有一定的意义。

3. 复方制剂中由于成分复杂, 一种成分的体外释放并不能反映全部, 所以, 本实验采用定量与定性结合的方法, 多指标的考察了体外释放以及经皮渗透性能, 从而认为可以更全面地反映复方肝舒贴的释放特点。

参考文献

- 1 王慕邹. 高效液相色谱分析常用中草药. 北京: 科学出版社, 1998, 324~327.
- 2 中国药典 2000 年版一部. 北京: 化学工业出版社, 2000, 249~250.
- 3 郑虎占. 中药现代研究与应用. 北京: 学苑出版社, 1999, 3663~3664.
- 4 邓书渊, 陈巧玲. 肌痛康口服液质量标准的研究. 中成药, 2000, 22(5): 335~337.
- 5 徐苓, 余彦明. 乳块消胶囊质量控制方法探讨. 西北药学杂志, 1998, 13(4): 158.
- 6 邓嵘, 满羽. 莪术醇的研究进展. 辽宁药物与临床, 2001, 4(1): 37~39.
- 7 贺英菊. 没药薄层定性鉴别. 中国民族民间医药杂志, 1999, 3(9): 236~238.

Study on release of compound Ganshu patches

Tang Xiuzhen, Liu Zhiyuan and Shen Pingliang

(National Engineering Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanghai, 201203)

The objective of this paper was to investigate the in vitro release of the constituents of compound Ganshu patches, such as astragalosides, curcumin and vacsego-side etc. A pharmacopoeia method for in vitro drug release and a Franz diffusion means were utilized for the determination of the in vitro drug release of constituents from patch formulations and the permeability of constituents per se respectively. Results showed that about 5% and 70% of astragaloside were released from the tested formulations in 2 h and 24 h respectively when further increasing release time led to a decreased release rate, whereas more than 50% of curcumin were released in 24 h. In addition, other constituents were also found to be released to some extent in 30 h. Diffusion results suggested that lipophilic ingredients per se, such as curcumin, could penetrate through the hairless mouse skin, whereas those hydrophilic compounds, such as astragalosides, possessed limited permeability.

Keywords: compound Ganshu patch, release, percutaneous permeability

(责任编辑: 廖永红, 责任编审: 张志华, 责任译审: 廖永红)