

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00454

· 短篇论著 ·

透皮促渗剂对双乌跌打损伤药方中胡椒碱体外经皮渗透的影响

Effects of penetration enhancers on percutaneous permeability of piperine in *Shuangwu* fracture prescription *in vitro*

顾圣莹, 丁雪鹰, 高静, 高申*

第二军医大学药学院药剂学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的:** 研究不同透皮促渗剂对复方跌打损伤药方中主要成分胡椒碱体外经皮渗透的促进作用。**方法:** 采用 Franz 扩散池, 选择氮酮、丙二醇、N-甲基吡咯烷酮(NMP)、油酸、薄荷油及其组合作为透皮促渗剂, 以预处理的离体小鼠皮肤作为渗透屏障, HPLC 法测定接收液中胡椒碱的含量。**结果:** 与空白对照组相比, 除丙二醇以外, 其余透皮促渗剂均能显著提高胡椒碱的渗透速率($P < 0.05$), 其中以氮酮与 NMP 合用促渗效果最好, 渗透速率达到 $4.49 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ 。**结论:** 氮酮与 NMP 联用的复合促渗剂促渗效果最好, 适合作为本复方的透皮促渗剂。

[关键词] 双乌跌打损伤药方; 胡椒碱; 透皮促渗剂; 透皮吸收

[中图分类号] R 289 **[文献标志码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2009)04-0454-03

双乌跌打损伤中药复方乃劳氏伤科世代祖传秘方, 由胡椒、毕拔、生草乌等 20 味中药组成, 制成膏药外用敷贴, 具有祛瘀止痛、续筋接骨等功效, 疗效显著。由于中药成分复杂, 加入适当的透皮促渗剂可以促进药物的透皮吸收, 本研究以复方中胡椒和毕拔的有效成分胡椒碱为指标药物, 考察了不同透皮促渗剂及其组合的透皮促进作用, 为研制双乌跌打损伤水凝胶贴剂提供实验依据。

1 仪器和材料

TK-12A 型透皮扩散试验仪(上海锴凯科技贸易有限公司); 岛津 SPD-10Avp 型检测器, LC-10ATvp 型高效液相色谱泵; KLE-1000 型恒温水浴(上海贺得实验设备有限公司)。胡椒碱对照品(上海顺勃生物工程技术有限公司); 水溶性氮酮(北京耐通生化技术研究所); 油酸(上海化学试剂公司); 丙二醇(上海凌峰化学试剂有限公司); N-甲基吡咯烷酮(美国国际特品有限公司上海代表处); 薄荷油(上海化学试剂公司); 试剂均为分析纯。双乌跌打损伤方药材由慈溪市骨伤科医院提供。昆明种雄性小鼠, 体质量(20 ± 2) g, 上海斯莱克实验动物有限责任公司, SCXK(沪)2007-2005。

2 方法和结果

2.1 分析方法的建立

2.1.1 检测波长的确定 称取适量胡椒碱标准品用流动相溶解, 制备成一定浓度的标准品溶液。将标准品溶液按紫外分光光度法(《中国药典》2005 版附录 IV A), 在 200~400 nm 波长下扫描。紫外扫描结果显示, 胡椒碱标准品在 343 nm 处有最大吸收, 故本实验采用 343 nm 作为检测波长。

2.1.2 色谱条件 色谱柱为 Diamonsil C₁₈ (5 μm , 4.6 mm \times 250 mm), 流动相为甲腈-水 = 80 : 20^[1], 流速 1 ml/min, 检测波长 343 nm, 进样量 20 μl , 室温。

2.1.3 胡椒碱标准曲线的制备 精密称取胡椒碱对照品 5 mg, 置于 50 ml 棕色容量瓶中, 加无水乙醇至刻度, 摇匀, 配成浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的储备液。分别精密量取胡椒碱储备液 5、1、0.5、0.1 ml, 置于 10 ml 容量瓶中, 加无水乙醇至刻度, 配成浓度为 50、10、5、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的胡椒碱标准液。再精密量取 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的胡椒碱标准液 5、1、0.5 ml, 置于 10 ml 容量瓶中, 加无水乙醇至刻度, 配成浓度为 0.5、0.1、0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的胡椒碱标准液。7 个标准液依次取样 20 μl , 按 2.1.2 项下条件测定峰面积, 以 3 次测定的平均峰面积(A)对进样浓度(C)回归得到标准曲线。回归方程为 $A = 123.771C - 609$, 相关系数 $r = 0.9992$, 表明胡椒碱对照品溶液在 0.05~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度范围内线性关系良好。HPLC 图谱见图 1。

2.1.4 回收率试验 分别配制高、中、低 3 种浓度(10、1、0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)的胡椒碱溶液, 按 2.1.2 项下色谱条件分析, 测定峰面积, 计算回收率。结果方法回收率在 95%~105% 之间, 符合含量要求。

2.1.5 日间精密度的测定 取浓度分别为 10、1、0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的胡椒碱标准液, 按 2.1.2 项下色谱条件测定, 1 d 内每个浓度测定 5 次, 计算所得数据的相对标准差 RSD, 结果日间精密度的 RSD 均 $< 2\%$, 符合含量测定要求。

2.1.6 稳定性考察 配制高、中、低 3 种浓度(10、1、0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)的胡椒碱溶液, 避光室温放置, 在 0、2、4、8 及 12 h 后分别进样, 测定峰面积。测得峰面积的 RSD 分别为 0.45、0.73、0.85%, 均 $< 1\%$, 表明被测组分在 12 h 内化学性质稳定, 满

[收稿日期] 2008-11-05 **[接受日期]** 2009-02-07

[作者简介] 顾圣莹, 硕士。E-mail: gsy15815@163.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81871285, E-mail: ggss99@126.com

足实验定量的要求。

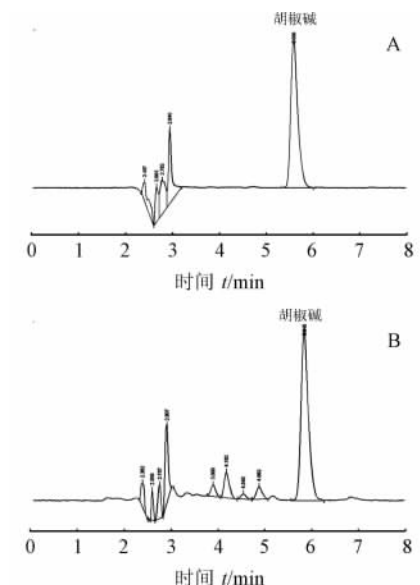


图1 胡椒碱含量测定 HPLC 色谱图

A: 标准液; B: 样品溶液

2.1.7 干扰实验 按处方量比例称取除毕拔和胡椒外各味药,按2.2实验方法取2h时间点的透皮接受液,用胡椒碱的色谱条件检测,结果表明胡椒碱的含量测定不受其他成分干扰。

2.2 体外透皮吸收实验

2.2.1 实验样品的制备 将双乌跌打损伤药材粉碎,过6号筛备用。依处方量称取各味药粉,按等量递增法混匀,以1:2比例加入去离子水制备成混悬液。

2.2.2 离体鼠皮的制备及预处理^[2-3] 用脱毛膏涂布小鼠腹部皮肤除毛,清洁后饲养24h,再断颈处死,剥离腹部皮

肤,除去皮下脂肪组织和黏连物,用生理盐水冲洗干净后置-20℃冰箱冰冻保存。在实验前将皮肤取出,于37℃生理盐水解冻,用医用纱布包裹,分别将0.5ml不同透皮促渗剂(复合促透剂按1:1预先混合)滴加到角质层面,保持扩散至整个皮肤表面并与皮肤接触12h,除去纱布,用生理盐水洗净擦干后使用。

2.2.3 透皮装置及计算方法^[4-5] 将处理好的小鼠腹部皮肤固定在垂直扩散池的上下两个半池之间,角质面向供给池,供给池加上4g实验样品,接收池加入6.2ml的30%乙醇生理盐水,水浴温度(32±0.5)℃,磁力搅拌子搅拌速度300r/min,分别于0.5、1、2、4、6、8、10、12h取样,每次吸取接收液6.2ml,并补充等量的接收液。接收液需预先超声除气,并32℃水浴预热。将样品用0.45μm滤膜滤过,续滤液在12h内按2.1.2项下条件测定浓度。按下式计算药物单位面积的累计透过量:

$$Q = \frac{C_n \times V_0 + \sum_{i=1}^{n-1} (C_i \times V_i)}{A}$$

其中,C_n和C_i为第n次和第i次取样时接受液的浓度,V₀为扩散池体积,V_i为第i次取样的体积,Q为单位面积累计透过量,A为皮肤透过面积(4.13cm²)。本实验中,V₀和V_i都是6.2ml。

以单位面积累计渗透量为纵坐标,时间为横坐标,进行回归,所得直线的斜率为稳态透皮速率J(μg·cm⁻²·h⁻¹),增渗指数ER=J_{促渗剂组}/J_{空白组}。

用透皮促渗剂预处理过离体小鼠皮肤,分别考察了氮酮(azone),N-甲基吡咯烷酮(N-methylpyrrolidone, NMP),丙二醇(propylene glycol, PG),油酸(oleic acid, OA),薄荷油(peppermint oil, PO)以及氮酮与NMP、油酸、薄荷油、丙二醇按1:1配制的复合促透剂对胡椒碱体外透皮行为的影响(表1、2)。

表1 不同透皮促渗剂对胡椒碱平均单位面积累积透过量的影响

(n=5, x̄±s)

组别	渗透时间 t/h							
	0.5	1	2	4	6	8	10	12
空白	0.23±0.07	0.57±0.14	1.31±0.44	2.62±0.63	4.73±1.13	7.11±1.56	9.96±2.17	12.89±2.46
氮酮	0.25±0.10	0.80±0.25	2.10±0.62	5.13±1.20	9.15±1.85	13.02±1.76	17.47±1.88	21.79±1.87
丙二醇	0.17±0.04	0.47±0.07	1.20±0.20	3.00±0.65	5.15±1.26	7.56±1.59	10.46±1.78	13.28±1.85
油酸	0.27±0.14	0.91±0.17	2.57±0.36	7.74±1.17	14.40±2.10	21.50±3.01	28.98±4.01	37.41±5.38
薄荷油	0.27±0.35	0.53±0.52	1.62±1.07	3.96±1.71	7.35±2.39	11.21±3.16	14.09±3.77	19.84±3.70
N-甲基吡咯烷酮	0.46±0.10	0.96±0.15	2.16±0.27	4.55±0.73	7.91±1.21	11.38±1.34	14.63±1.52	18.44±3.04
氮酮+丙二醇	0.21±0.05	0.63±0.19	1.89±0.50	6.10±1.68	13.05±3.35	19.53±4.45	26.41±5.58	32.96±6.50
氮酮+油酸	0.42±0.4	0.99±0.74	2.42±1.29	8.53±3.40	15.36±5.05	21.98±6.21	29.00±7.41	35.49±8.82
氮酮+N-甲基吡咯烷酮	0.69±0.15	2.43±0.68	5.34±1.35	13.16±3.65	22.42±5.49	30.99±6.46	41.51±6.85	53.01±5.28
氮酮+薄荷油	0.57±0.26	1.31±0.47	3.22±1.56	8.97±2.61	15.80±3.54	22.69±4.32	29.48±5.31	37.09±4.67

表2 胡椒碱透皮动力学参数

组别	渗透方程	r	J ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$) ^a	增渗倍数
空白	$y=1.08x-0.94$	0.990 3	1.08±0.22	—
氮酮	$y=1.87x-1.51$	0.996 8	1.87±0.17**	1.73
丙二醇	$y=1.13x-1.00$	0.994 1	1.13±0.18	1.05
氮酮+丙二醇	$y=2.91x-3.26$	0.993 5	2.91±0.60** Δ	2.69
油酸	$y=3.22x-3.33$	0.993 9	3.23±0.47**	2.98
氮酮+油酸	$y=3.13x-2.76$	0.997 2	3.13±0.77** Δ	2.90
薄荷油	$y=1.67x-1.67$	0.991 8	1.68±0.33**	1.55
氮酮+薄荷油	$y=3.120x-2.53$	0.997 3	3.20±0.46**	2.89
N-甲基吡咯烷酮	$y=1.56x-0.93$	0.997 1	1.56±0.23*	1.44
氮酮+N-甲基吡咯烷酮	$y=4.49x-3.22$	0.996 7	4.49±0.56** Δ	4.16

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 与空白组比较; $\Delta P<0.05$ 与单纯促透剂组比较, ^a: $n=5$

实验结果表明,胡椒碱的经皮扩散呈零级动力学过程,累积渗透量与渗透时间线性关系良好。对实验数据进行两样本双侧的 *t* 检验可知,与空白组相比,除丙二醇外,其余透皮促渗剂的稳态透皮速率均具有显著差异 ($P<0.05$),说明对胡椒碱的体外经皮渗透均有显著的促进作用,促渗效果依次为氮酮+NMP>薄荷油>氮酮+薄荷油>氮酮+油酸>氮酮+丙二醇>氮酮>薄荷油>NMP,其中氮酮+NMP组的稳态渗透速率达到 $4.49 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$,是空白组的4.16倍,促透作用最强。

与单一促渗剂相比,除薄荷油+氮酮组以外,其余复合促渗剂的稳态渗透速率均有显著差异 ($P<0.05$),说明大多数透皮促渗剂联用会有协同作用,可以显著提高药物的累积透过量 and 稳态渗透速率,取得对药物最大的促透效果。

3 讨论

本实验建立了胡椒碱的高效液相分析方法,采用体外透皮实验,用透皮促渗剂预处理过离体小鼠皮肤,分别考察了氮酮、NMP、油酸、薄荷油、丙二醇以及氮酮与 NMP、油酸、薄荷油、丙二醇按 1:1 配制的复合促透剂对胡椒碱体外透皮行为的影响,结果表明,除个别例外,复合促透剂对双乌跌打损伤药方中的胡椒碱有较好的促透效果,其中 NMP 与氮酮联合促透效果最好,可以加入药方以提高治疗效果,并为今后研究提供试验依据。

胡椒和毕拔温中散寒,行气止痛,其主要成分胡椒碱的含量高,易于检测,具有消炎镇痛作用^[7],与复方药效关联度好,因此选其作为指标化合物对双乌跌打损伤药方混悬液进行含量测定。参考文献^[8]并结合前期实验结果,采用 30%乙醇生理盐水作为接收液,溶解度好,可以满足实验漏槽条件,溶液在避光条件下 12 h 内检测,稳定性良好。

在本实验中,氮酮与 NMP 联用之后促透效果明显加强,可能是因为 NMP 作为透皮促渗剂可以有效分配到角质层中,改变组织内部膜的溶解特性,使得氮酮更容易分配进入细胞间区域,破坏细胞类脂质双分子层的有序结构,增加流动性,促进药物扩散^[9]。

使用油酸对皮肤处理后,药物的皮肤透过性明显加强,稳态渗透速率达到 $3.23 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$,是空白组的 2.98

倍,促透效果仅次于 NMP 与氮酮联用。据文献^[10]报道,油酸渗入皮肤的角质层后与角质细胞间类脂相互作用,破坏了类脂所形成的膜结构,产生大量腔隙,使细胞间隙扩大,形成许多易于物质渗透的通道,从而降低丁扩散阻力,有利于药物穿过角质层^[9]。在本实验中,油酸与氮酮联用后,促透效果反而不如油酸单用,可能是因为油酸与氮酮同为脂溶性,两者联用可能竞争降低脂质双分子层结构的有序程度,不仅无法发挥出协同促渗的作用,反而降低了促透效果^[11]。

【参考文献】

- [1] 包同力嘎,包桂花,阿拉腾花. HPLC法测定蒙药五味清浊散中胡椒碱的含量[J]. 中华中医药学刊,2008,26:865-866.
- [2] 成明建,宋文霞,黄齐慧. 促渗剂对奥沙普秦体外经皮渗透的影响[J]. 国际医药卫生导报,2004,10:151-153.
- [3] 刘成,胡晋红,朱全刚,孙华君. 促渗剂对来氟米特体外经皮渗透的影响[J]. 中国药学杂志,2002,37:507-509.
- [4] 郑俊民. 经皮给药新剂型[M]. 北京:人民卫生出版社,1997:42-43.
- [5] 朱姚亮,刘卫,陈华兵,徐辉碧,杨祥良. 醋酸曲安奈德纳米结构脂质载体的制备及其透皮吸收研究[J]. 中国药科大学,2007,38:30-34.
- [6] 陈寒杰. HPLC测定二十五味鬼臼丸中胡椒碱的含量[J]. 中成药,2007,19:296-297.
- [7] Eun Bang L, Kuk Hyun S, Won Sick W. Pharmacological study on piperine[J]. Pharm Soc Korea,1984,7:127-132.
- [8] 寿旦,孙静芸. 化癍巴布膏体外透皮吸收研究[J]. 中草药,2003,34:220-222.
- [9] 杨鹏,丁雪鹰,高静,高申. 透皮促渗剂对盐酸氟西汀经皮渗透性的影响[J]. 第二军医大学,2007,28:1252-1254. Yang P, Ding X Y, Gao J, Gao S. Effects of penetration enhancers on skin permeation behavior of fluoxetine hydrochloride *in vitro* [J]. Acad J Sec Mil Med,2007,28:1252-1254.
- [10] 褚爱武,崔跃红,刘文波,姜少军. 油酸经皮促透作用微观机理的研究[J]. 电子显微学报,2002,21:184-187.
- [11] 李磊,赵秀丽,陈大为,师帅. 化学促渗剂在经皮给药系统中的应用进展[J]. 中南药学,2007,5:532-535.

【本文编辑】尹茶