

文章编号: (2011)05-0091-07

川芎和香附超临界 CO₂ 提取物及其制剂的体外经皮透过性

王小芳, 郭建博, 徐 晖, 唐 星

(沈阳药科大学 中药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: **目的** 考察川芎和香附超临界 CO₂ 提取物及其水凝胶贴剂的体外经皮透过性。**方法** 实验采用 Franz 扩散装置, 分别以藁本内酯和 α -香附酮为川芎和香附提取物的指标成分, 考察提取物及其水凝胶贴剂经离体大鼠皮肤的透过性。**结果** 川芎和香附超临界 CO₂ 提取物中的多种成分均具有经皮透过性, 提取物的比例不同对指标成分的经皮透过性无明显影响。**结论** 经皮给药可望作为川芎和香附超临界 CO₂ 提取物的一种新的给药途径。

关键词: 川芎; 香附; 超临界 CO₂ 提取物; 经皮透过性

“内病外治”是中医的特色治疗之一, 包括中药外用、针灸、按摩、导引等多种方法, 具有作用直接、操作方便、毒性与不良反应小等特点。中药外用可经皮肤或黏膜给药, 使之作用于局部病灶, 或经皮肤或黏膜吸收后发挥治疗作用^[1]。

川芎为伞形科藁本属川芎 (*Ligusticum chuanxiong* Hort.) 的干燥根茎, 主要成分包括川芎内酯、挥发油、阿魏酸、生物碱等, 具活血行气、祛风止痛之功效^[2]。香附为莎草科植物莎草 (*Cyperus rotundus* L.) 的干燥根茎, 其挥发油成分 (含 α -香附酮、 β -香附酮、香附醇、香附子烯等化合物), 具行气解郁, 调经止痛之功效^[3]。宋·王璆《百一选方》中的点头散由香附 200 g、川芎 100 g 组成, 主治偏正头痛, “川芎、香附皆为血中之气药, 辛温走窜, 有行气活血、通络止痛之功, 二药相辅为用, 对于气滞血瘀之头痛, 久服必能除根矣”。新药芎附正天软胶囊即以点头散为依据, 将川芎、香附以现代的超临界 CO₂ 工艺提取其挥发油组分为有效成分, 用于治疗偏头痛。

中药挥发油辛香走窜、善循经络而行, 既可有理气活血、破瘀散结的治疗功用, 又可助其他药物吸收, 研究证实中药挥发油多有经皮通透促进作用^[4]。据此分析, 川芎和香附提取物混合物可具有一定的经皮透过性。本文作者以藁本内酯 (ligustilide, lig) 和 α -香附酮 (α -cyperone, α -cyp) 为川芎和香附的指标成分, 考察川芎和香附超临界 CO₂ 提取物及其水凝胶贴剂的体外经皮透皮性, 初步探讨川芎和香附提取物经皮给药的可行性。

1 仪器与试药

FA1104 电子天平 (上海民桥精密科学仪器有限公司), 高效液相系统 (L-2400 紫外检测器、L-2130 输液泵、Hitachi), YB-P6 智能透皮仪 (天津药典标准仪器厂), ER807A 修剪器 (日本 Panasonic 公司)。

川芎超临界 CO₂ 提取物 (自制, lig 含量质量分数为 6.65%), 香附超临界 CO₂ 提取物 (自制, α -cyp 含量质量分数为 5.93%), α -cyp (北京艾美林科技有限公司), lig (自制, 纯度质量分数为 97.51%), 水凝胶贴 [自制, 载药质量分数为 16%, $m(\text{川芎}): m(\text{香附})=1:1$], 其余试剂均为分析纯或色谱纯。

Wistar 大鼠, 250~300 g (雄性, 沈阳药科大学实验动物中心), 实验室动物使用许可证号: SLXK 京 2010004。

2 方法与结果

2.1 藁本内酯的测定

收稿日期: 2011-03-14

基金项目: 辽宁省重大专项项目 (2009ZX09301012)

作者简介: 王小芳 (1985-), 女 (汉族), 河北承德人, 硕士研究生, 主要从事中药制剂工艺的研究工作, Tel. 15940273707, E-mail wxf240@163.com; 唐星 (1964-), 男 (汉族), 陕西西安人, 博士, 教授, 主要从事药物制剂工艺的研究, E-mail tangpharm@sina.com。

2.1.1 测定方法

采用 HPLC 法测定藁本内酯(川芎的指标成分)的含量, 色谱条件如下: 迪马 C₁₈ (200 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 50 mmol·L⁻¹ 无水乙酸钠(乙酸调 pH4.0)-乙腈(体积比为 50:50)为流动相, 检测波长为 275 nm, 流速为 1 mL·min。

2.1.2 专属性实验

在上述色谱条件下, 香附挥发油与鼠皮浸出溶液对藁本内酯测定均无干扰, 且分离度良好, 专属性良好(如图 1 所示)。

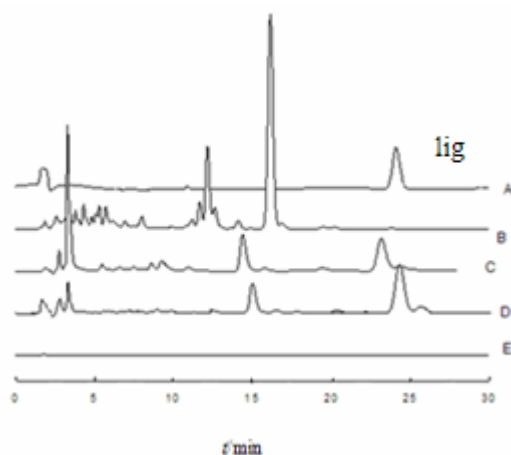


Fig. 1 Chromatograms of lig (A)、cyperus extract (B)、chuanxiong extract (C)、transdermal solution of the two extracts (D) through rat skin (E)

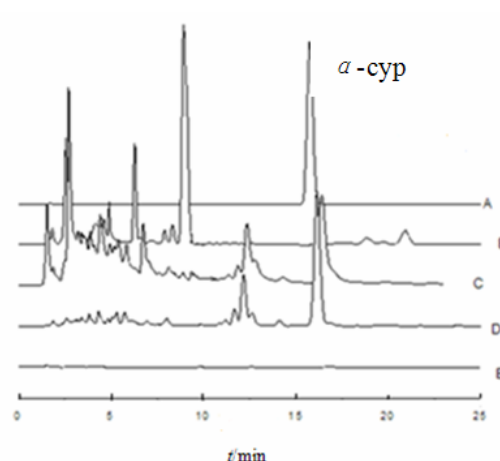


Fig. 2 Chromatograms of α-cyp (A)、chuanxiong extract (B)、cyperus extract (C)、transdermal solution of the two extracts (D) through rat skin (E)

2.1.3 标准曲线的绘制

精密称取藁本内酯对照品 0.1 g 置 25 mL 容量瓶, 加少量氯仿溶解, 甲醇定容, 作为储备液。精密移取藁本内酯对照品储备液 0.2、0.5、1.0、1.5、2.0、3.0、4.0 mL 置 10 mL 量瓶中, 甲醇稀释至刻度, 精密进样 20 μL, 记录峰面积, 以峰面积对藁本内酯质量浓度作图, 绘制标准曲线。在 71.38~1427.55 mg·L⁻¹ 内线性关系良好, 标准曲线方程为: $y=32\,874x+23\,920$ ($r=0.999\,9$)。

2.1.4 稳定性试验

精密称取川芎油 160.3 mg 置 10 mL 量瓶中, 少量氯仿溶解, 甲醇定容, 在 0、2、4、8、12、24 和 48 h 进样, 记录色谱图, RSD 为 0.58%, 样品溶液在 48 h 内稳定。

2.1.5 重复性试验

精密称取川芎油 6 份置 25 mL 量瓶, 氯仿溶解, 甲醇定容, 分别精密进样 20 μL, 记录色谱图, RSD 为 1.73%, 重复性良好。

2.1.6 精密度实验

精密移取藁本内酯对照品储备液 1 mL 置 10 mL 量瓶中, 甲醇稀释至刻度, 精密进样 20 μL, 记录峰面积, RSD 为 0.66%, 精密度良好。

2.1.7 回收率试验

精密称取藁本内酯对照品 24.4 mg, 置 25 mL 容量瓶中, 氯仿溶解, 甲醇定容, 作为储备液。称取已知含量的提取物 30 mg, 分别加储备液 1、2、3 mL 后定容至刻度, 制备低、中、高 3 种质量浓度样品 3 份, HPLC 法测定, 计算平均回收率为 97.08%, RSD 为 1.87%, 回收率合格。

2.2 α-香附酮的测定

2.2.1 测定方法

采用 HPLC 法测定 α -香附酮 (香附的指标成分) 的含量, 色谱条件如下: 迪马 C₁₈ (200 mm×4.6 mm, 5 μ m) 色谱柱, 乙腈-水 (体积比为 65:35) 为流动相, 检测波长为 254 nm, 流速为 1 mL·min⁻¹。

2.2.2 专属性实验

在上述色谱条件下, 空白鼠皮和川芎挥发油对 α -香附酮的测定均无干扰, 且分离度良好, 专属性良好 (如图 2 所示)。

2.2.3 α -香附酮标曲的绘制

精密称取 α -香附酮对照品 21.0 mg 置 10 mL 量瓶, 甲醇溶解并稀释至刻度, 作为储备液, 分别取 0.1、0.2、0.4、0.8、2.0、5.0 mL 贮备液置 100 mL 量瓶中, 甲醇定容至刻度, 分别精密进样 20 μ L, 记录色谱图, 以峰面积对 α -香附酮质量浓度作图, 绘制标准曲线。在 2.1~210.0 mg·L⁻¹ 内线性关系良好, 标准曲线方程为: $y=77\,620x-80\,651$ ($r=0.999\,8$)。

2.2.4 稳定性试验

精密称取香附油 42.0 mg 置 10 mL 量瓶中, 甲醇溶解并定容, 在 0、2、4、8、12、24、48 h 进样 10 μ L, 记录色谱图, RSD 为 1.69%, 样品溶液在 48 h 内稳定。

2.2.5 重复性试验

精密称取香附油 6 份置 25 mL 量瓶, 甲醇溶解并定容, 分别精密进样 20 μ L, 记录色谱图, RSD 为 1.36%, 重复性良好。

2.2.6 精密度试验

精密移取 α -香附酮对照品储备液 0.2 mL 置 25 mL 量瓶中, 甲醇定容, 精密进样 20 μ L, 平行进样 6 次, 记录色谱图, RSD 为 0.54%。

2.2.7 回收率试验

精密称取 α -香附酮对照品 37.7 mg, 置 25 mL 容量瓶中, 甲醇溶解并定容作为储备液。称取已知含量的提取物 40 mg, 分别加储备液 1、2、3 mL 后定容至刻度, 制备低、中、高 3 种浓度样品 3 份, HPLC 法测定, 计算平均回收率为 99.80%, RSD 为 1.81%, 回收率合格。

2.3 经皮透过实验

2.3.1 接收液的选择

实验分别测定了川芎和香附提取物中藁本内酯和 α -香附酮在不同介质中的饱和溶解度 (见表 1), 以此选择合适的接受介质。

Table 1 The saturation solubility of lig and α -cyp in different solutions

Solution	$\rho_{\text{solubility}}$ (mg·L ⁻¹)	
	Lig	α -cyp
Water	7.89	0.07
ϕ (ethanol)=20%	99.49	30.05
ϕ (ethanol)=40%	517.87	507.04
ϕ (PG)=20%	25.44	5.90
ϕ (PG)=40%	125.17	48.06
ϕ (PEG)=20%	41.59	7.45
ϕ (PEG)=40%	149.53	36.28
ϕ (SDS)=1%	207.55	401.16
ϕ (SDS)=3%	816.38	1 153.38

在体积分数为 40% 的乙醇溶液中, 川芎中藁本内酯与香附中 α -香附酮溶解度相似, 同时也满足试验要求的漏槽条件, 因此, 最终选择了体积分数为 40% 的乙醇溶液作为接受介质。

2.3.2 鼠皮的处理

大鼠断颈处死, 修剪器剪除腹部鼠毛, 剥离皮肤, 角质层朝下, 平铺于干净平板上, 用手术剪小心剔除皮下脂肪组织和黏连物, 生理盐水反复冲洗干净, 剪成适当大小, 置密封袋中冷冻保存备用。实验前检查鼠皮的完整性, 不得有任何破损^[5]。

2.3.3 川芎和香附提取物的透皮实验

取处理的鼠皮, 固定在扩散池 (有效扩散面积 1 cm^2) 的给药池和接受池之间, 吸取川芎 (和/或香附) 超临界 CO_2 提取物置于给药池内, 接受池内加入体积分数为 40% 的乙醇溶液 5 mL 为接收介质, 将扩散池置于智能透皮仪内 (37°C , $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$), 分别于 2、4、6、8、10、12、14 h 取样 3 mL, 同时补加等体积的接收介质, $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 取续滤液 $20 \mu\text{L}$ 注入液相色谱仪, 测定接收介质中各指标成分浓度 (ρ , $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 计算累计透过质量 ($m/\mu\text{g}$), 将 m - t 曲线的直线部分进行线性回归, 直线的斜率为稳态流量 J_s ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)。

由图 1 和图 2 可知, 2 种挥发油中所含的多数成分在经皮透过后的接收介质中均可检测到, 即这些成分均能经大鼠离体皮肤透过。

香附提取物、川芎提取物、以及不同比例的提取物混合液 [$m(\text{川芎提取物}):m(\text{香附提取物})=20:80$ 、 $35:65$ 、 $50:50$ 、 $80:20$] 的累积经皮透过量曲线见图 3。由图 3 可看出, 6 h 后经皮透过基本达稳态, 以累积经皮透过量曲线中达稳态后的数据进行线性回归, 计算稳态流量和通透系数 $P(\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1})$ [$P=J_s/\rho$, $\rho/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$ 为指标成分的质量浓度]。相应的稳态流量、14 h 累积透过量 and 通透系数见表 1。

由透过性结果看 (表 2), 指标成分 lig 和 α -cyp 的稳态流量和 14 h 累积透过量基本上随混合物中相应提取物的质量比的增加而增大, 但通透系数无显著差异。这一结果表明, lig 的透过性未受香附提取物的影响, 反之, α -cyp 透过性也未受川芎提取物的影响。

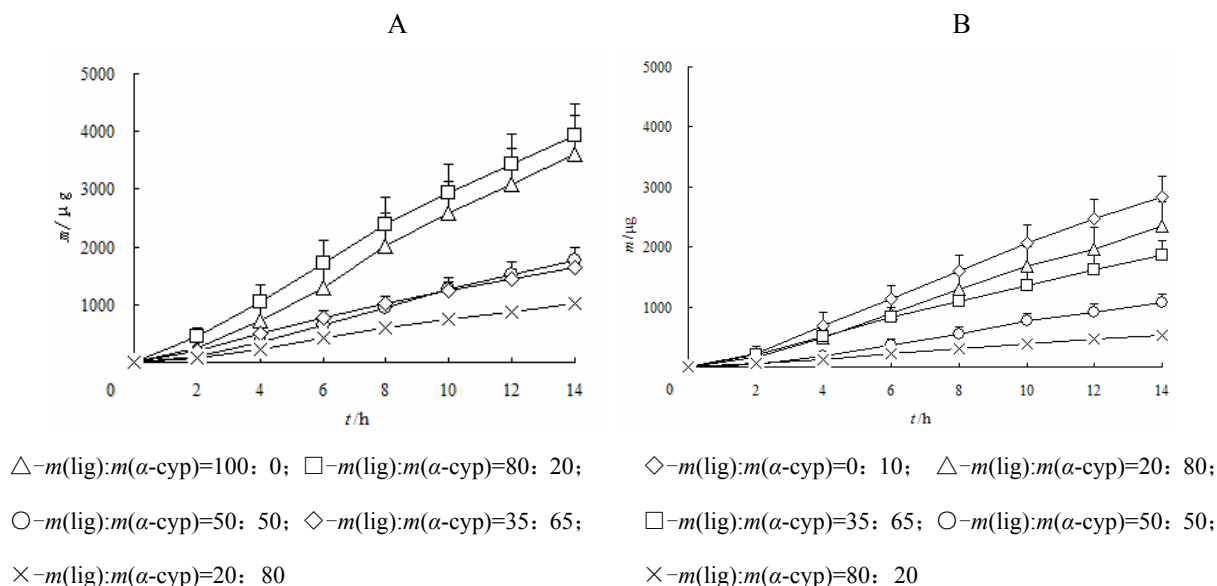


Fig. 3 The *in vitro* permeation profiles of lig (A) and α -cyp (B) through rat full-skin ($n=6$)

Table 2 The permeation parameters of lig and α -cyp ($n=6$)

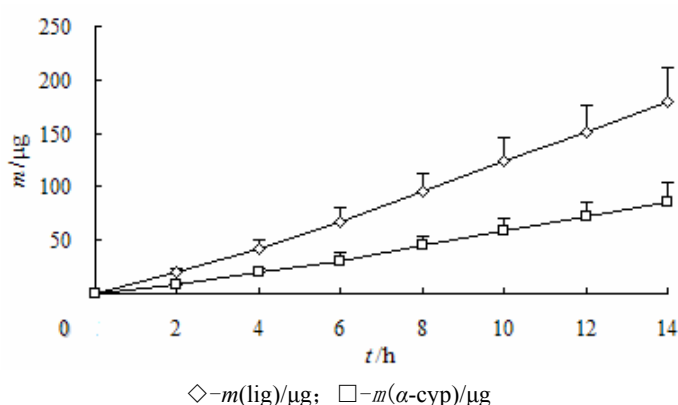
$m(\text{chuanxiong extract}):m(\text{cyperus extract})$	$J_S/(\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1})$		$m/\mu\text{g}$		$P=J_S/\rho \text{ (cm} \cdot \text{s}^{-1})$	
	Lig	α -cyp	Lig	α -cyp	Lig	α -cyp
100:0	266.17 $\pm$ 17.02	—	3613.42	—	22.24	—
80:20	257.55 $\pm$ 10.44	38.29 $\pm$ 3.26	3951.57	530.08	30.16	17.93
50:50	133.21 $\pm$ 11.42	83.74 $\pm$ 8.98	1759.15	1064.20	22.77	15.69
35:65	103.19 $\pm$ 4.52	127.64 $\pm$ 11.49	1631.55	1859.24	27.62	18.40
20:80	71.10 $\pm$ 4.45	174.85 $\pm$ 21.21	1035.55	2346.81	30.66	20.48
0:100	—	83.74 $\pm$ 19.65	—	2838.90	—	19.21

J_S —steady state flux; m —accumulated permeation amount at 14 h; P —transdermal permeation coefficient

2.3.4 川芎香附提取物水凝胶贴剂的透皮实验

实验中, 作者考察了自制川芎香附提取物水凝胶贴剂的经皮透过性, 水凝胶贴剂中川芎提取物和香附提取物的质量比为 1:1, 经测定制剂中指标成分含量为藁本内酯含量为 720.3 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$, α -香附酮含量为 627.9 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ 。

将剪切好的水凝胶贴黏在处理好的鼠皮上, 固定在给药池(有效扩散面积 1 cm^2)和接受池之间, 按“2.3.3”的方法实验, 计算累计透过质量 ($m/\mu\text{g}$)。指标成分的累积经皮透过量曲线见图 4。由图可看出川芎香附提取物水凝胶贴剂中藁本内酯和 α -香附酮的经皮透过性良好。

Fig. 4 The accumulated permeation amount of the hydrogel patch ($n=6$)

3 讨论

药物透皮吸收与其分子量、脂溶性和熔点等因素有关^[6]。相对分子质量大于 600 的物质很难透过角质层, 药物的扩散系数与分子量的平方根或立方根成正比, 分子质量愈大, 分子体积与大扩散系数则愈小。熔点愈高的药物和水溶性或亲水性药物, 在角质层的渗透速率较低。藁本内酯是苯酐(phthaiide)类化合物, 为淡黄色油状液体, 相对相对分子质量 190.24; α -香附酮为淡黄色油状液体, 相对分子质量 218.33; 其结构式见图 5。川芎和香附的超临界 CO₂ 提取物中多为挥发油成分, 具有较强的脂溶性。川芎挥发油中主要药效成分为川芎苯酐类化合物, 包括洋川芎内酯、洋川芎内酯、瑟丹酸内酯、藁本内酯、丁基苯酐(芹菜甲素)、丁烯基苯酐、蛇床内酯、新蛇床内酯、洋川芎内酯等, 其结构和性质均与藁本内酯相似。香附挥发油中主要成分为香附烯 I、香附烯 II、香附醇、异香附醇、香附酮等, 其结构和性质与 α -香附酮相似。从分子量、熔点、脂溶性等理化性质分析, 川芎和香附的 2 个指标成分、以及川芎和香附提取物中的多种成分均可能有一定的经皮透过性。

不同比例的川芎和香附提取物的混合物的经皮透过实验中, 藁本内酯的累积透过量均大于 30%, α -香附酮的累积透过质量分数均大于 20%, 二者均具有较高的经皮透过性; 同时通透系数无

显著差异,即2种提取物的比例对 lig 和 α -cyp 的经皮透过性无明显影响。

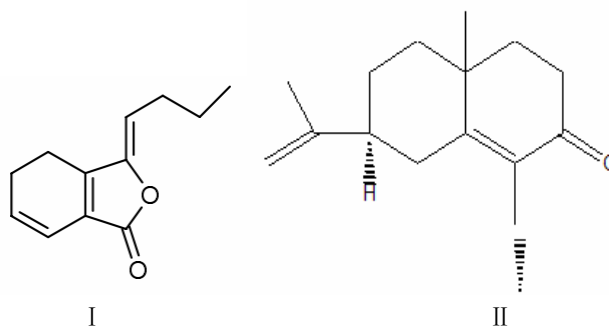


Fig. 5 Chemical structure of Lig (I) and α -cyp (II)

在川芎香附提取物水凝胶贴剂的透皮实验中藁本内酯和 α -香附酮的 14 功尽弃 h 累积透过质量分数分别为 25.0%和 13.7%。两者也均有较高的经皮透过性。

根据中医辨证论治理论,中药复方中有效成分彼此制约平衡、协同发挥作用。由于中药成分复杂,各成分的性质,尤其是经皮透过量、透过速率等可能存在较大差别,并可能会对疗效产生显著影响,这也是制约中药外用制剂现代化发展的关键问题之一。本实验结果显示,川芎和香附提取物指标成分具有较高的经皮透过性,而且提取物中的多个组分均能经皮透过,有利于发挥各成分之间可互相制约、协同的作用。

4 结论

实验结果显示,川芎和香附提取物中指标成分藁本内酯和 α -香附酮,以及其他多个成分均具有较好的经皮透过性,这一经皮透过特点有利于提取物中各成分之间可互相制约、协同作用,发挥中药“内病外治”的特色。经皮给药可望作为川芎和香附提取物的一种新的给药途径。

参考文献:

- [1] 胡凯文,卫月,安超. 芳香中药在疾病外治中的应用 [J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(3): 337-339.
- [2] 周江. 川芎有效成分及其药理作用研究概况 [J]. 浙江中医杂志, 2007, 42 (7): 615-616.
- [3] 曹玫,张洪,张晓燕,等. 香附的药理活性作用研究进展 [J]. 药物流行病学杂志, 2010, 19 (2): 111-113.
- [4] 李莉,韩国柱. 中草药挥发油类透皮吸收促进作用研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2008, 17(11): 914-918.
- [5] 郑俊民. 经皮给药新剂型 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006, 271-275.
- [6] 崔福德. 药剂学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008, : 469-471.

In vitro transdermal permeation behaviors of Supercritical CO₂ Extracted Essential Oil from *Ligusticum chuanxiong* Hort. and *Cyperus rotundus* L. and oil containing hydrogel patch

WANG Xiao-fang GUO Jian-bo XU Hui TANG Xing

(School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: Object To investigate the *in vitro* transdermal permeation behavior of supercritical CO₂ extracted essential oils from *Ligusticum chuanxiong* Hort. and *Cyperus rotundus* L. and the hydrogel patch containing the extracted oil. **Methods** Franz diffusion devices were used for *in vitro* transdermal permeation test with full rat skin as the model membrane. Ligustilide and α -cyperone were used as the index ingredients to evaluate the transdermal permeation of the extracts and the patch formulation. **Results**

The results showed that most of the ingredients in the extracts can permeate across the rat skin *in vitro*, and ratio of two extracts in the mixture did not affect the transdermal permeability of the two index ingredients obviously. **Conclusion** The present results showed great potential of percutaneous administration of the supercritical CO₂ extracted essential oil from *Ligusticum chuanxiong Hort.* and *Cyperus rotundus L.*

Key words: *Ligusticum chuanxiong Hort.*; *Cyperus rotundus L.*; supercritical CO₂ extract; transdermal permeation

(本篇责任编辑：曹 霞)