

小茴香挥发油贴剂体外释放和透皮性能的研究

陈雯雯¹, 云琦², 陶亮², 高晓黎^{1*}¹新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011; ²新疆特丰药业股份有限公司, 乌鲁木齐 830054

摘要: 本文主要对小茴香挥发油贴剂体外释放和透皮性能进行了研究。用高效液相色谱法(HPLC)测定小茴香挥发油在不同释放介质中的溶解度, 选择 30% 聚乙二醇 400-生理盐水作为满足漏槽条件的释放介质。按《中国药典》规定方法测定含不同稀释剂的小茴香挥发油贴剂体外释放量, 24 h 体外释放累积量依次为二乙二醇单乙基醚(Transcutol P) > 己二酸二异丙酯 > 辛酸甘油酯 > 空白 > 肉豆蔻酸异丙酯, 说明不同稀释剂对小茴香挥发油贴剂的释放影响较大。Transcutol P 的释放效果最好, 24 h 体外释放百分含量为 64.16%, 其体外释放过程符合 Higuchi 方程, 释放速率常数为 $1762.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^2$ 。因此, 选择 Transcutol P 作为小茴香挥发油贴剂的稀释剂。用选定的稀释剂贴剂进行大鼠和小型猪腹部皮肤体外透皮性能的研究, 体外透皮过程符合零级动力学方程, 透皮速率分别为 $63.943 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$ 、 $6.134 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$, 说明不同皮肤对外透皮速率有影响。

关键词: 小茴香挥发油; 贴剂; 体外释放; 透皮

中图分类号: R944

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.1.012

Release and Transdermal Behavior of Fennel Oil Patch *in vitro*CHEN Wen-wen¹, YUN Qi², TAO Liang², GAO Xiao-li^{1*}¹College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China;²Xinjiang Tefeng Pharmaceutical Co. Ltd, Urumqi 830054, China

Abstract: The release and transdermal behavior of fennel oil patch *in vitro* was studied in this experiment. The fennel oil solubility in different release medium was measured by high performance liquid chromatography (HPLC), 30% PEG400-saline was selected as the release medium which met sink conditions. The *in vitro* release of different dilutes fennel oil patch was studied according to the requirement of Chinese Pharmacopoeia, the 24 h cumulative amount of release followed as the order of Transcutol P > Ceraphyl 230 > O. D. O > Blank control > IPM. The results showed that different diluents on patch had a significant effect on release. Transcutol P was release best, *in vitro* release percentage content was 64.16% in 24 h, the release mechanism coincided with the Higuchi equation, the release rate was $1762.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^2$. Hence, Transcutol P was chosen as diluents. The selected diluent patch was used to study the transdermal behavior *in vitro* of the abdominal skin of rats and minipigs. The transdermal process coincided with zero-order kinetics equation, permeation rate was $63.943 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$ and $6.134 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$, respectively. The result suggested that different skin have an effect on permeation rate.

Key words: fennel oil; patch; *in vitro* release; transdermal

小茴香挥发油为伞形科植物茴香(*Foeniculum vulgare* Mill.)的干燥成熟果实^[1]经水蒸气蒸馏提取所得的挥发油, 具有促进胃肠蠕动、预防术后腹腔粘连^[2]、抗炎镇痛^[3]等多种药理学作用。临床上将小茴香热敷肚脐治疗术后腹胀^[4]、肠梗阻、痛经等。目前未见有关于小茴香挥发油贴剂研究的报道。本研究测定了小茴香挥发油在不同释放介质中的溶解

度, 并制备了含不同稀释剂的贴剂, 考察稀释剂对小茴香挥发油贴剂体外释放性能的影响, 并比较了大鼠和小型猪腹部皮肤对小茴香挥发油贴剂的体外透皮特性, 为小茴香挥发油贴剂的研究提供试验依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

LC-20AD 高效液相色谱仪(日本岛津); ZRS-8G 智能溶出试验仪(天津大学无线电厂); PHS-3C 精密 pH 计(上海雷磁仪器厂); BSA224S 万分之一电子天平(赛多利斯科学仪器北京有限公司); TP-3 型

智能透皮扩散仪(南京新联电子设备有限公司)。

1.2 试药

小茴香挥发油(自制);小茴香挥发油贴剂(自制);反式茴香脑对照品(梯希爱上海化成工业发展有限公司,ED4XO-ON);辛癸酸甘油酯 O. D. O(河南正通化工有限公司,20131202);肉豆蔻酸异丙酯 IPM(阿拉丁试剂上海有限公司);己二酸二异丙酯 Ceraphyl 230(香港国际特品有限公司上海代表处);二乙二醇单乙基醚 Transcutol P(嘉法狮上海贸易有限公司);聚乙二醇(PEG)400(天津市盛奥化学试剂有限公司,20140814);生理盐水(国药集团新疆制药有限公司,20140208);无水乙醇(天津市富宇精细化工有限公司,20141115);乙腈(SIGMA-ALDRICH,色谱纯);甲醇(SIGMA-ALDRICH,色谱纯);冰乙酸(天津市福晨化学试剂厂,20140225)。

1.3 实验动物

雄性健康大鼠 10 只,体重(180 ± 20)g,许可证号 SYXK(新)2010-0003;雄性小型猪 1 只,体重(20 ± 2)Kg,许可证号 SCXK(川)2013-24。

2 方法与结果

2.1 小茴香挥发油中反式茴香脑分析方法的建立

2.1.1 色谱条件

色谱柱:ZORBAX-C₁₈(4.6 × 150 mm, 5 μm);流动相:乙腈:水:冰乙酸 = 55:45:0.03;流速:0.8 mL/min;检测波长:260 nm;柱温:室温(25 °C);检测时间:25 min;进样量:5 μL。

2.1.2 标准曲线的建立

精密称定反式茴香脑对照品 50 mg 于 100 mL

容量瓶中,用无水乙醇定容至刻度,摇匀,即得对照品储备液。精密吸取对照品储备液 0.2、0.3、0.5、1、2、3 mL 于 25 mL 容量瓶中,用无水乙醇定容至刻度,摇匀,得系列浓度溶液,进入 HPLC 检测,以峰面积为纵坐标,浓度为横坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 50.876X + 8.0332$, $r = 0.9999$ 。结果表明:小茴香挥发油在 4.04 ~ 60.6 μg/mL 范围内线性关系良好。

2.1.3 分析方法的验证

按“2.1.1”项下色谱条件,24 h 稳定性实验 RSD 为 0.773%;重复性实验 RSD 为 1.24%;精密度实验 RSD 为 0.204%;回收率低、中、高三个浓度分别为 99.07%、99.20%、98.17%,RSD 分别为 1.07%、0.86%、0.16%。因此,可用此色谱条件方法用于小茴香挥发油中反式茴香脑的含量测定。

2.2 释放介质的选择

小茴香挥发油为难溶于水的药物,需要在释放介质中加入适宜的有机溶剂增加其溶解度以满足漏槽条件,因此本研究测定小茴香挥发油在 20% 乙醇-生理盐水、30% 乙醇-生理盐水、40% 乙醇-生理盐水、20% PEG400-生理盐水、30% PEG400-生理盐水、40% PEG400-生理盐水中的溶解度,为体外释放研究选择适宜的释放介质。

精密称取 5 mg 小茴香挥发油溶于 10 mL 释放介质中,每隔 5 min 强力振摇 30 s,观察 30 min 内的溶解情况,得小茴香挥发油的过饱和溶液。精密吸取 2 mL 小茴香挥发油过饱和溶液于 25 mL 容量瓶中,用无水乙醇定容至刻度,摇匀,进入 HPLC 检测,求出药物在不同释放介质中的溶解度,结果见表 1。

表 1 小茴香挥发油在不同释放介质中的溶解度

Table 1 Fennel oil solubility in different release mediums

释放介质 Release mediums	溶解度 Solubility (μg/mL)
20% 乙醇-生理盐水 20% Ethanol-saline	89.17
30% 乙醇-生理盐水 30% Ethanol-saline	187.09
40% 乙醇-生理盐水 40% Ethanol-saline	383.07
20% PEG400-生理盐水 20% PEG400-saline	227.94
30% PEG400-生理盐水 30% PEG400-saline	307.67
40% PEG400-生理盐水 40% PEG400-saline	331.84

小茴香挥发油在不同释放介质中的溶解度大小依次为:40% 乙醇-生理盐水 > 40% PEG400-生理盐

水 > 30% PEG400-生理盐水 > 20% PEG400-生理盐水 > 30% 乙醇-生理盐水 > 20% 乙醇-生理盐水。

2.3 不同释放介质 pH 值的测定

用 pH 计分别测定 20% 乙醇-生理盐水、30% 乙醇-生理盐水、40% 乙醇-生理盐水、20% PEG400-生

理盐水、30% PEG400-生理盐水、40% PEG400-生理盐水作为释放介质时的 pH 值。不同释放介质的 pH 值相差不大,结果见表 2。

表 2 不同释放介质的 pH 值

Table 2 Different mediums of pH value

释放介质 Release mediums	pH 值 pH value
20% 乙醇-生理盐水 20% Ethanol-saline	6.93
30% 乙醇-生理盐水 30% Ethanol-saline	6.73
40% 乙醇-生理盐水 40% Ethanol-saline	6.53
20% PEG400-生理盐水 20% PEG400-saline	6.55
30% PEG400-生理盐水 30% PEG400-saline	6.62
40% PEG400-生理盐水 40% PEG400-saline	6.78

通过“2.2”和“2.3”项下试验结果,选定 30% PEG400-生理盐水为体外释放实验的释放介质。小茴香挥发油在 40% 乙醇-生理盐水溶解度最高,但由于接受液应该尽量模拟体液,加入有机溶剂的比例越小越好,因此不选择 40% 乙醇-生理盐水为释放介质;40% PEG400-生理盐水与 30% PEG400-生理盐水中的溶解度相差不大,且均满足漏槽条件。另外,正常皮肤表面偏酸性,pH 值为 5.5 ~ 7.0,上述不同溶媒的 pH 值均在此范围内且相差不大,因此选择 30% PEG400-生理盐水作为体外释放研究的释放介质。

2.4 稀释剂对小茴香挥发油贴剂体外释放度的影响

2.4.1 体外释放度的测定

将处方量的小茴香挥发油用不同溶剂稀释后制备成贴剂,按 2010 年版《中国药典》释放度测定法第三法测定,取经脱气处理过的 30% PEG400-生理盐水 900 mL 作为释放介质,预温至 $(32 \pm 0.5) ^\circ\text{C}$,将贴剂固定于两层不锈钢碟片的中央,释放面朝上,再将网碟置于溶出杯下部,使贴剂与桨底旋转面平行,两者相距 (25 ± 2) mm,转速 100 rpm。分别于 1、2、4、6、8、12、24 h 时取样 2.5 mL,取样位置在介质液面与桨叶上端之间正中,离溶出杯壁距离 1 cm。每次取样后立即补充 2.5 mL 空白释放介质,取出的释放液以 $0.22 \mu\text{m}$ 的微孔滤膜过滤,弃去初滤液,收集续滤液 1 mL,进入 HPLC 检测。释放度测定装置,见图 1。

按公式(2)分别计算不同时间点的单位面积累

积释放量(Q),式(2)中 V 为释放介质体积, V_i 为每次取样体积, C_i 为第 i 次取样时释放液中药物的浓度, A 为渗透面积。不同稀释剂的单位面积累积释放量(Q)的结果见图 2。

$$Q = \frac{C_i V + \sum_{i=1}^{i-1} C_{i-1} V_i}{A} \quad (2)$$

按公式(3)计算体外释放百分含量(Pr),式(3)中 Q_i 为不同时间的累积释药量, D 为标示量。不同稀释剂体外释放百分含量(Pr)的结果见图 3。

$$Pr = \frac{Q_i}{D} \times 100\% \quad (3)$$

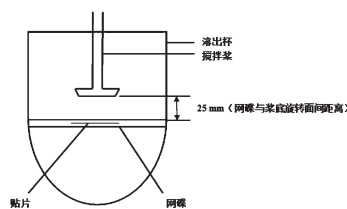


图 1 释放度测定装置

Fig. 1 Apparatus for determination of release rate

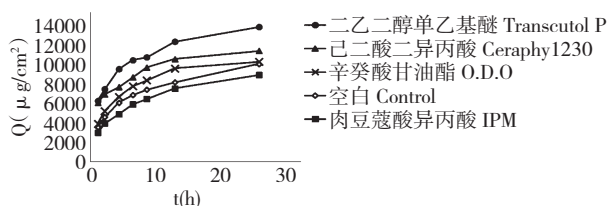


图 2 不同稀释剂的单位面积累积释放量曲线

Fig. 2 The cumulative release profiles of per unit area of different diluents

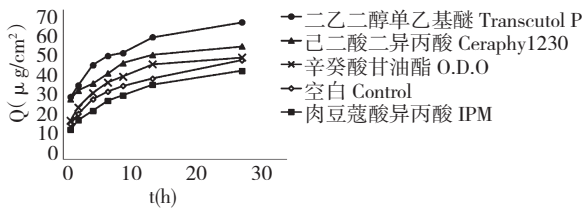


图3 不同稀释剂的体外释放百分含量曲线

Fig. 3 *In vitro* release percentage profiles of different diluents

由图2、图3可知,不同种稀释剂的小茴香挥发

油贴剂 24 h 体外释放累积量大小依次为 Transcutol P 组 > Ceraphyl 230 组 > O. D. O 组 > 空白组 > IPM 组。因此,选择 Transcutol P 作为小茴香挥发油贴剂的稀释剂。

2.4.2 体外释放方程的拟合

以单位面积药物累积释放量和时间分别进行零级动力学方程和 Higuchi 方程拟合,求出药物释放速率常数,并根据 r 值确定其体外释放过程符合的方程, r 值越大,方程拟合越好,结果见表3、表4。

表3 零级动力学方程拟合

Table 3 Fitting of zero-order kinetic equation

稀释剂 Diluents	零级动力学方程 Zero-order kinetic equation	释放速率常数 Release rate ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$)	r 值 r value
空白 Control	$Q = 232.59t + 4200.6$	232.59	0.927 5
IPM	$Q = 219.96t + 3515.7$	219.96	0.932 4
Ceraphyl 230	$Q = 202.24t + 6303.1$	202.24	0.902 6
Transcutol P	$Q = 272.59t + 6988.7$	272.59	0.904 0
O. D. O	$Q = 227.64t + 4905.8$	227.64	0.865 9

表4 Higuchi 方程拟合

Table 4 Fitting of Higuchi Equation

稀释剂 Diluents	Higuchi 方程 Higuchi equation	释放速率常数 Release rate($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^2$)	r 值 r value
空白 Control	$Q = 1484.0t^{1/2} + 2267.0$	1484.0	0.984 5
IPM	$Q = 1399.9 t^{1/2} + 1695.9$	1399.9	0.987 2
Ceraphyl 230	$Q = 1305.5 t^{1/2} + 4582.6$	1305.5	0.969 3
Transcutol P	$Q = 1762.2 t^{1/2} + 4663.1$	1762.2	0.972 3
O. D. O	$Q = 1504.0 t^{1/2} + 2880.1$	1504.0	0.951 7

由表3、表4可知,不同稀释剂对贴剂的释放速率有一定影响,Higuchi 方程拟合较好,其 r 值较大。

2.5 小茴香挥发油贴剂体外透皮的测定

体外透皮实验最理想的皮肤是人的皮肤,因为它求出的参数最接近临床实际,但是人的皮肤很难获得,所以选用合适的动物皮肤来研究透皮吸收具有重要的意义。本研究用大鼠皮肤及小型猪的皮肤进行小茴香挥发油贴剂体外透皮的测定。

2.5.1 离体皮肤的制备

将大鼠及小型猪在处死后立即用电动推子剔除腹部毛发,剪下腹部皮肤,小心剥离皮下脂肪,用生理盐水反复清洗干净,切割成小块皮肤,备用。

2.5.2 体外透皮的测定

用选定的稀释剂制备小茴香挥发油贴剂,将贴剂紧贴于动物皮肤表面,将其夹在扩散室与接受室之间,背衬层向上。接受室加满含 30% PEG400-生理盐水作为接受介质,使液面恰与皮肤接触。夹层以 32 °C 水浴保温,磁力搅拌子以 200 rpm 的速度搅拌,分别于 1、2、4、6、8、12、24 h 取出接受室中 2.5 mL 介质,立即补加等量的新鲜介质。接收液以 0.22 μm 的微孔滤膜过滤,弃去初滤液,收集续滤液 1 mL,进行 HPLC 测定。体外透皮测定装置,见图4。

按上述公式(2)计算不同时间点大鼠和小型猪皮肤的单位面积累积经皮渗透量(Q),以 Q 为纵坐标,时间 t 为横坐标作图,得单位面积药物累积经皮渗透量曲线,结果见图5。

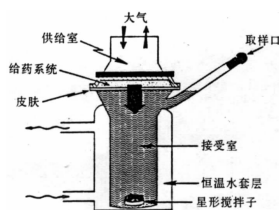


图4 体外透皮扩散仪

Fig. 4 Apparatus of transdermal *in vitro*

由图5可知,不同腹部皮肤的小茴香挥发油贴剂24 h单位面积累积渗透量大小依次为小鼠>小型猪。

2.5.3 体外透皮方程的拟合

以单位面积药物累积经皮渗透量和时间分别进

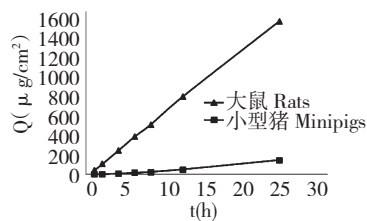


图5 大鼠和小型猪皮肤单位面积累积经皮渗透量曲线

Fig. 5 The penetration curve of per unit area of rats and minipigs skin

行零级动力学方程和 Higuchi 方程拟合,求出药物透皮速率常数,并根据 r 值确定其体外透皮过程符合的方程, r 值越大,方程拟合越好,结果见表5、表6。

表5 零级动力学方程拟合

Table 5 Fitting of zero-order kinetic equation

皮肤 Skin	零级动力学方程 Zero-order kinetic equation	透皮速率常数 Permeation rate ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$)	r 值 r value
大鼠 Rats	$Q = 63.943t - 18.731$	63.943	0.9998
小型猪 Minipigs	$Q = 6.134t - 16.466$	6.134	0.9866

表6 Higuchi 方程拟合

Table 6 Fitting of Higuchi equation

皮肤 Skin	Higuchi 方程 Higuchi equation	透皮速率常数 Permeation rate ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^2$)	r 值 r value
大鼠 Rats	$Q = 376.65t^{1/2} - 469.56$	376.65	0.979 8
小型猪 Minipigs	$Q = 34.764t^{1/2} - 56.186$	34.764	0.930 2

由表5、表6可知,小茴香挥发油贴剂体外透皮过程符合零级动力学方程。24 h 小茴香挥发油贴剂大鼠皮肤透皮速率为 $63.943 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$,小型猪皮肤透皮速率为 $6.134 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$ 。

3 讨论

本研究通过制备不同稀释剂的小茴香挥发油贴剂,测定其在24 h内的体外释放度可知,稀释剂 Transcutol P 的体外释放量最高,24 h 体外释放百分含量为 64.16%。根据不同方程的拟合,表明小茴香挥发油贴剂的体外释放过程更符合 Higuchi 方程,其释放速率常数为 $1762.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^2$ 。

小茴香挥发油贴剂其体外释放量不是很理想,可能的影响因素有释放介质的溶解度、稀释剂等。由于小茴香挥发油为脂溶性药物,其在释放介质中

的溶解度对贴剂的体外释放量及释放速率有一定的影响,因此需要加入适宜的有机溶剂等增加其在释放介质中的溶解度;同时,试验结果表明,不同稀释剂对贴剂的体外释放也有影响。因此,要达到理想的释药程度还有待进一步的研究。

体外释放度的检查作为经皮给药制剂评价的一项重要指标,在各国药典均有所收录^[5]。《中国药典》收录的方法只有桨碟法;《美国药典》有桨碟法、圆筒法、往复支架法;《英国药典》有桨碟法、圆筒法、池法。三国药典共同收录桨碟法的不同之处在于《中国药典》所用碟片的尺寸较大,导致其位置偏高,取样点的位置也与美英两国药典规定的不同;且美英两国药典采用的网碟尺寸较小,网碟放置位置贴近溶出杯底部,使网碟上下部分释放介质的流动性较好,减少了试验过程中溶剂的死体积,测定结果

准确度更高。对于释放温度的设定,三国药典均规定为 $(32 \pm 0.5) ^\circ\text{C}$,此温度为人体皮肤的表面温度。另外,有释放研究将释放温度设为 $(37 \pm 0.5) ^\circ\text{C}$,认为此温度应与人体体温相接近。因此,《中国药典》贴剂体外释放度的测定装置及方法还有待进行改进。

通过比较不同皮肤对体外透皮的影响可知,皮肤厚度对体外透皮速率有显著影响。大鼠皮肤较薄,小型猪皮肤较厚,随着皮肤厚度的增加,透皮速率常数减小。因此,经皮给药制剂在体外透皮试验中,应根据实验条件尽量选择与人体皮肤相接近的动物皮肤,以更好地评价药物在皮肤的渗透效果;且所取皮肤最好现取现用,冷冻保存皮肤不宜过久,最好在一个月之内使用,以避免结果偏差。

致谢:感谢新疆特丰药业股份有限公司提供实验场地、检测设备及实验研究相关费用,保证了项目的顺利进行。同时感谢高晓黎教授给予实验上的悉心指导与帮助。

参考文献

- Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会).
- Teng GS(滕光寿), Wang CG(王成果), Mao FF(毛峰峰), *et al.* Study on preventive effect of volatile oil extracted from *Foeniculum vulgare* Mill. Seeds on postoperative intra-abdominal adhesions. *Int J Trad Chin Med*(国际中医中药杂志), 2011, 33:118-120.
- Teng GS(滕光寿), Liu ML(刘曼玲), Mao FF(毛峰峰), *et al.* Anti-inflammatory and analgesic effects of volatile oil extracted from *Foeniculum vulgare* Mill. seeds. *Progr Mod Biomed*(现代生物医学进展), 2011, 11:344-346.
- Huang NJ(黄宁静), Li XB(李小斌), Liu CP(刘春萍), *et al.* Study effects of exhausting by anus after pyrogenic dressing therapy of fennel (Chinese herbs) to abdomen operation. *Med Inf*(医学信息), 2008, 21:1127-1128.
- Mao R(毛睿), Chen H(陈华), Nan N(南楠). Comparison of paddle over disk method used in the release test of transdermal drug deliver system between USP and CHP. *Mod Prev Med*(现代预防医学), 2011, 38:1101-1103.
- Luo FL(罗夫来), Zhang YL(张云淋), Zhao Z(赵致). Optimization of extracting technology for flavonoids in *Blumea balsamifera* Dc with orthogonal design. *Chin Arch Tradit Chin Med*(中华中医药学刊), 2013, 31:2735-2737.
- Qu H(瞿慧), Zhang LL(张璐璐), Cao Y(曹园). Optimization of the extraction technology of flavonoids from *Selaginella pulvinata* by orthogonal test. *Chin Med J Res Prac*(现代中药研究与实践), 2013, 27(6):50-52.
- Iamsaard S, Arun S, Burawat A, *et al.* Phenolic contents and antioxidant capacities of Thai-Makham Pom (*Phyllanthus emblica* L.) aqueous extracts. *J Zhejiang Univ, Sci B*, 2014, 15:405-408.
- Liang XX(梁晓霞), Yin H(尹恒), Kong LQ(孔令茜), *et al.* Antioxidant activity of polysaccharides isolated from *Parthenocissus tricuspidata* (Sieb. et Zucc.) Planch. *in vitro*. *Nat Prod Res Dev*(天然产物的研究与开发), 2015, 27:451-454.
- Jiao Y(焦扬), Li CX(李彩霞), Gao HN(高海宁), *et al.* Antioxidant activity of flavonoids from branches-leaves and berry of *Hippophae rhamnoides* Linn. *Nat Prod Res Dev*(天然产物的研究与开发), 2015, 27:655-660.
- Chun SS, Vattem DA, Lin YT, *et al.* Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Process Biochem*, 2005, 40:810-816.
- Iamsaard S, Burawat J, Kanla P, *et al.* Antioxidant activity and protective effect of *Clitoria ternatea* flower extract on testicular damage induced by ketoconazole in rats. *J Zhejiang Univ, Sci B*, 2014, 15:548-555.
- Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, *et al.* Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J Food Compos Anal*, 2006, 19:669-675.

(上接第 101 页)