

高效液相色谱法对四种双氯灭痛软膏剂透皮效果的研究

漏德宝¹ 段更利¹ 薛艳² 张彬² 戴小平³(上海 200233 上海市第八人民医院药剂科;¹上海 200032 上海医科大学药物分析教研室;²上海医科大学药学院毕业生;³上海新亚药业公司药物研究所)

摘要 目的:本实验采用高效液相色谱法,以离体小白鼠腹部皮肤为透皮屏障,比较了四种双氯灭痛软膏剂的透皮效果。方法:实验用法国 Gilson 公司的 HPLC 仪,以 C_{18} 为固定相,甲醇-水(含 HAc 0.36%) = 80:20 为流动相,紫外检测波长 280nm。平均回收率为 99.59%, $RSD < 3.28\%$,检测限为 $1.0\mu\text{g/ml}$ 。结果:1 号样品透皮率最高,3 号与 1 号相比较透皮吸收无显著性差异($P > 0.05$),2 号或 4 号分别与 1 号相比,其透皮吸收均有显著性差异($P < 0.05$)。结论:1 号样品值得进一步开发。

关键词 双氯灭痛;软膏剂;透皮吸收;高效液相色谱法

Study on transdermal absorption effects of four diclofenac sodium ointments by HPLC

Lou Debao(Lou DB), Duan Gengli(Duan GL), et al(Shanghai 8th People's Hospital, Shanghai 200233)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** A HPLC method was established to determine the concentration of diclofenac sodium in transdermal absorption liquid. **METHOD:** A YWG- C_{18} ($10\mu\text{m}$) column was used with a mobile phase of $\text{CH}_3\text{OH}-\text{H}_2\text{O}$ (including HAc 0.36%) (80:20) at a flow rate of 1.0ml/min . UV detector was set at 280nm. The average recovery was 99.59% and the RSD were less than 3.28%. **RESULTS:** The No.1 and No.3 ointments had similar good effect on transdermal absorption ($P > 0.05$) while the percutaneous release rate of No.1 was higher. The No.1 was absorbed more quickly than the No.2 and No.4 ($P < 0.05$). **CONCLUSION:** The No.1 ointment is valuable to be further developed. **KEY WORDS** diclofenac sodium, ointment, transdermal absorption, HPLC

双氯灭痛是一种非甾体抗炎、解热镇痛药,对风湿性关节炎、骨关节炎等引起的疼痛有较好的疗效;其常见的副作用是胃肠道不良反应,且首过效应显著。为此,国外已研制了多种双氯灭痛的经皮给药制剂¹⁻³,而国内该产品尚不多。为了寻找具有较好透皮效果的该药软膏剂的配方,本文采用离体鼠皮在恒温条件下进行透皮试验,并用高效液相色谱法测定接收池溶液中双氯灭痛的浓度。比较四种软膏剂

经皮吸收情况,为该药软膏剂的配方改进及该药的临床应用提供参考依据。

1 材料与分析方法

1.1 材料与试剂

昆明种雌性小白鼠,体重 20 ~ 22g(上海医科大学动物房)。微型注射式过滤器及 $0.45\mu\text{m}$ 微孔滤膜(上海医药工业研究院)。双氯灭痛对照品(上海新亚药业公司药物研究

所)。双氯灭痛软膏剂样品:1号2号(实验室研制),3号(瑞士巴塞利尔巴-嘉基有限公司),4号(国内某厂家产品)。

1.2 仪器

法国 Gilson 高效液相色谱仪,六通进样器(Rheodyne 7125型,美国),透皮仪(实验室自制)。

1.3 贮备液的制备 精称双氯灭痛对照品10mg于100ml量瓶中,用双蒸馏水溶解定容,摇匀即可。置4℃冰箱备用。

1.4 色谱条件

色谱柱150mm×4.6mm ID,固定相为 YWG C₁₈(10μm,天津化学试剂二厂)。流动相为甲醇-水(含 HAc 0.36%) = 80:20,流速为1.0ml/min。紫外检测波长280nm,进样量20μl,室温分析。

1.5 分析方法评价

1.5.1 标准曲线 精密吸取储备液适量,用三蒸水稀释成0.25,5.0,10.0,20.0,40.0和80.0μg/ml,分别进样作 HPLC 分析。以浓度 *c* 为横坐标,峰高为纵坐标进行线性回归处理,得回归方程 $Y = 0.129 + 0.178c$, $r = 0.9996$ ($n = 7$)。

1.5.2 回收率和精密度 配制双氯灭痛溶液5.0,20.0和40.0μg/ml各为三份,测得其回收率为98.20%,100.43%和98.12%。测得天内及日间精密度,见表1。

表1 方法精密度/ $n = 3$

浓度/ μg·ml ⁻¹	天内测得值		日间测得值	
	$\bar{x} \pm s$	RSD/%	$\bar{x} \pm s$	RSD/%
5.0	4.91 ± 0.01	2.15	4.95 ± 0.04	0.84
20.0	21.05 ± 0.43	2.02	20.41 ± 0.04	3.28
40.0	41.51 ± 0.26	0.63	40.05 ± 0.31	0.78

1.5.3 检出限与定量限 将仪器灵敏度置0.01 OD档,进样20μl,检出限为0.5μg/ml($S/N = 2$);定量限为2.5μg/ml($S/N = 10$)。

1.5.4 专一性 在本实验色谱条件下,溶剂峰的 T_R 为2.13min,双氯灭痛的 T_R 为3.12min,无其他峰干扰,见图1。



图1 双氯灭痛透皮样品的 HPLC 图

2 实验方法与结果

2.1 离体鼠皮的制备

取体重20~22g健康小鼠,处死后将腹部皮肤用8%Na₂S脱毛,清水洗净皮肤表面,取下无损伤皮肤,去除皮下脂肪,用生理盐水洗净并浸泡于生理盐水中,置4℃冰箱放置24h使用。

2.2 释放液制备

精称软膏样品1g(标示量为1%),溶于10ml量瓶中,配成含双氯灭痛约1.0mg/ml溶液(为一混悬液)。

2.3 透皮实验装置

见图2。

释放池为长10cm,内径1cm两端开口的玻璃管。接收池为25ml的烧杯,内装生理盐水10ml。将预先处理好的离体

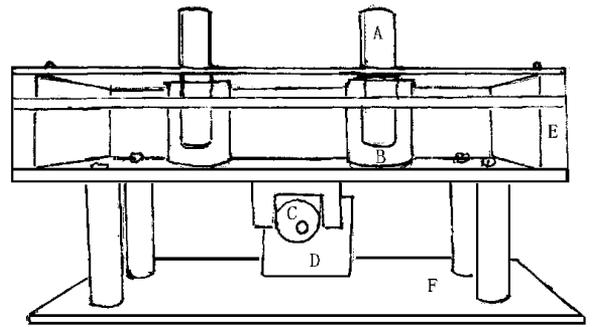


图2 透皮实验装置示意图

A-释放池;B-接收池;C-偏心轮;D-马达;E-支架;F-固定架
鼠皮用丝线固定在释放池一端(皮肤角质层向玻璃管内),从释放池的另一端准确加入释放液1.0ml。将鼠皮端置接收液液面下,再将整个透皮实验装置置于37℃恒温箱中,通电后,装置在马达带动下,水平恒速(120rpm)振摇。

2.4 接收液取样与分析

每隔2h从取液孔吸取接收液1.0ml(同时向接收池中补加生理盐水1.0ml),用水稀释至4.0ml,摇匀后用0.45μm微孔滤膜过滤,弃去初滤液约1ml,将续滤液进样20μl作 HPLC 分析。总透皮时间为10h。

2.5 释放液剩余药量的测定

透皮实验结束后,将释放池中剩余的药液全部洗出,置50ml量瓶中,用水定容并过滤后,将续滤液进样作 HPLC 分析,测定其浓度,并计算出剩余药量。

2.6 透皮百分率计算及显著性检验

累积透皮药量计算公式:累积透皮药量(μg) = 该时间点浓度(μg/ml) × 4 × 10 + 前一时间点浓度 × 4 × 1
上式中:4为稀释倍数,10和1为样品溶液的毫升数。

透皮百分率 = $\frac{\text{该时间点的累积透皮药量}}{\text{所有累积透皮药量} + \text{剩余透皮药量}} \times 100\%$

10h时各样品的透皮百分率见表2(每个样品各用4张鼠皮实验)。

表2 10h时各样品的透皮率比较/ $n = 4$

样品	透皮百分率				$\bar{x} \pm s$
1号	42.11	41.90	32.71	20.38	34.28 ± 10.24
2号	24.31	20.82	10.47	6.60	15.58 ± 8.36
3号	40.00	36.71	28.42	16.83	30.48 ± 10.34
4号	23.61	20.60	20.11	15.32	19.90 ± 3.43

以透皮率最高的1号样品为标准,分别将2~4号样品透皮率与1号样品的透皮率作 *t* 检验,结果见表3。

表3 样品透皮率效果差异的显著性检验

样品号	<i>s</i>	<i>t</i>	<i>t</i> 与 $t_{0.05,6}$ 比较	显著性差异
1~2	0.099	2.842	>	有
1~3	0.103	0.523	<	无
1~4	0.076	2.676	>	有

$\alpha = 0.05$, $f = 6$, 双侧检验 $t_{0.05,6} = 2.447$

3 讨论

3.1 将样品配成1mg/ml混悬液后,基质部分含有不溶于水

的辅料,不能完全溶解,造成吸取同样体积的释放液中药量的不一致。所以计算药物透皮百分率时,要以最后测定的累积透皮药量加上释放池内剩余的药量作为加入释放池的总药量。

3.2 制备离体鼠皮时,应力求去除皮下脂肪并用蒸馏水或生理盐水,反复冲洗鼠皮。但鼠皮上总有残留的脂肪、蛋白质、未脱尽的短毛等杂质存在,这些残留物会逐渐溶解,脱落到释放池和接收池中,测定时会污染色谱柱,严重影响柱效,因而需选用 $0.45\mu\text{m}$ 微孔滤膜对样品溶液进行过滤。

3.3 本实验所用透皮装置的工作原理是由偏心轮的转动来带动框架,使液体发生震荡而促进药物的扩散。该装置主要有以下的优点:①统一的恒温和搅拌系统使各个样品实验条件更趋一致,以便减少样品间接的实验误差。与常用的其他透皮吸收体外实验装置(每个样品都要配备独立的搅拌系统,而每个搅拌系统的情况很难做到一致)相比更显示出其优点。②本装置是组合式,一次可同时进行 10~30 个样品

的透皮吸收实验,效率较高。

3.4 透皮率结果 1号>3号>4号>2号。 t 检验表明1号和3号样品之间无显著性差异($P>0.05$),2号或4号分别与1号相比,均有显著性差异($P<0.05$)。这一结果表明,在这四种软膏剂中,1号(实验室制)和3号(瑞士巴塞尔汽巴-基嘉产品)透皮吸收率较为理想,所以1号样品值得进一步开发。

参考文献

- 1 常天辉,方灵武,程炳香,等.速效去痛霜对离体小鼠皮透皮吸收作用的研究.中国医科大学学报,1992,21(1):18.
- 2 Vaidya R, Parab RS. Spectrophotometric determination of diclofenac diethylammonium and its dosage forms. Indian Drugs, 1995, 32(4): 194.
- 3 Nayak VG, Bhat VR. Rapid liquid chromatographic determination of paracetamol and diclofenac sodium combined pharmaceutical dosage. Drug Dev Ind Pharm, 1992, 18(3): 369.