

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.09.011

芦荟多糖含量测定及芦荟膏体外透皮吸收的实验研究

陈超 毕良佳[△] 孟培松 刘玉三 苏鑫 代佳音

(哈尔滨医科大学附属第四医院口腔科 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的:研究芦荟膏中各功能成分体外透皮吸收的能力。方法:以 Wistar 大鼠的背部皮肤为透皮实验原料,每隔一定时间通过分光光度法和高效液相色谱法测定透皮后接收池内芦荟多糖及蒽醌类含量。结果:随着芦荟膏剂量的增加,渗透量逐渐增加,芦荟膏中芦荟多糖、芦荟大黄素、芦荟苷的渗透量随时间延长逐渐增加,但是渗透速率逐渐降低。结论:芦荟膏有较强的体外透皮吸收能力,芦荟膏经皮给药能充分发挥其作用。

关键词: 芦荟多糖;库拉索芦荟;芦荟膏;透皮吸收

中图分类号:R781 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2015)09-1647-04

Content in Aloe Polysaccharide from Aloe Barbadensis Miller and Transdermal Absorption of Aloe Mastic

CHEN Chao, BI Liang-jia[△], MENG Pei-song, LIU Yu-san, SU Xin, DAI Jia-yin

(Department of Stomatology, Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the invitro transdermal absorption ability. **Methods:** Back skin of Wistar rats were used as the transdermal experiment material. After transdermal absorption, the contents of aloe polysaccharide and anthraquinones in the reception tank were measured at regular intervals by spectrophotometry and HPLC respectively. **Results:** With increasing doses of aloe mastic, the amount of infiltration gradually increased. Permeability of aloe polysaccharide, aloe emodin, aloe extract aloin content increased gradually, while the penetration rate decreased. **Conclusion:** Aloe mastic has a strong ability of invitro transdermal absorption, transdermal delivery of aloe mastic could make full use of its function.

Key words: Aloe polysaccharide; Aloe barbadensis miller; Aloe mastic; Transdermal delivery

Chinese Library Classification(CLC): R781 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)09-1647-04

前言

无论是口腔颌面外科、口腔修复科、口腔种植科,都会经常进行拔牙手术,而拔牙创的早期愈合和剩余牙槽嵴的吸收成为手术操作成败的关键。现代研究发现芦荟具有抗菌、消炎、抗病毒、促进创口愈合、凝血、免疫调节和抗肿瘤等多种生理药理活性。本课题组的前期实验显示局部应用芦荟膏能明显促进拔牙创内成纤维细胞增殖,加速血凝块的机化和肉芽组织的生长,加快新骨组织的形成,从而有效地促进拔牙创的早期愈合^[1-3]。本实验进一步研究芦荟膏中活性成分芦荟多糖的含量及其透皮吸收的能力。

1 材料与方法

1.1 芦荟膏的制备

将库拉索芦荟凝胶冻干粉(云南元江万绿生物集团有限公

司)200:1 和医用甘油(黑龙江友谊甘油场)进行配比,选用无菌调配机进行调配,制成含量 30%的芦荟膏状制剂^[4],使其具有一定的柔软性、流动性,放入茶色磨口瓶中,保存在 4℃ 冰箱中。

1.2 试剂及仪器

无水乙醇,硫酸,苯酚,丙酮(以上试剂购自北京恒通化工有限公司);甘露糖(上海工研生物技术有限公司);紫外分光光度计(上海精科分析仪器厂);JB-1 型搅拌机(南京南达分析仪器应用研究所);LG10-2.4 型高速离心机(北京京立离心机有限公司);赛多利斯 BT25S(十万分之一)电子分析天平;原子吸收光谱仪(AAnalyst 800)(铂金埃尔默仪器有限公司);x 射线能谱仪(美国伊达克斯有限公司);4700Proteomics Analyzer(Applied Biosystems USA)改良 Franz 扩散池(自制)。

1.3 动物

Wistar 大鼠,体重 200-220g,购自哈尔滨医科大学附属第三医院。

1.4 方法

1.4.1 色谱条件 色谱柱:ZORBAX-SA-C18 柱(5 μm, 200 mm × 4.6 mm),流动相:甲醇-0.1% 磷酸(75:25),柱温为 30℃,流速为 1.0 mL/min,检测波长为 254 nm,进样量为 20 μL。理论塔

作者简介:陈超(1973-),男,硕士研究生,主要研究方向:牙周病学, E-mail: chenchao1910@126.com

[△] 通讯作者:毕良佳,电话:0451-85576550,

E-mail: biliangjia99@126.com

(收稿日期:2014-10-24 接受日期:2014-11-22)

板数按大黄素峰计算应不低于 3000。芦荟苷检测波长 360 nm, 芦荟大黄素检测波长 430 nm。

1.4.2 对照品溶液制备 多糖: 在 105℃ 甘露糖干燥至恒重, 并精密称取 0.100g 置于 100 mL 容量瓶, 蒸馏水定容。从中精密量取 5 mL 置于 50 mL 容量瓶中, 加蒸馏水定容。分别精密吸取 0、1、2、3、4、5 mL 置于 50 mL 容量瓶中, 加蒸馏水定容。

精密称取芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚对照品 1.74、3.22、2.18、1.78、0.46 置 50 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

1.4.3 供试品溶液制备 芦荟粗多糖的制备: 精确称定 20.000 g 芦荟膏, 加入适量蒸馏水, 调节温度为 60℃, 设定时间 1 h, 反复提取 2 次, 回收液体并进行浓缩, 用 95% 乙醇缓慢稀释, 置于 4℃ 冰箱过夜, 离心后收集沉淀物。取沉淀物溶于蒸馏水, 先过滤, 后摇匀, 再均匀配制成芦荟多糖溶液。

芦荟蒽醌类化合物的制备: 精密吸取样品溶液 2 mL, 置 100 mL 锥形瓶中, 加 10% 盐酸 8 mL, 超声 2 min, 再加入 10 mL 的氯仿, (80±5)℃ 水浴 1h 放至室温, 置分液漏斗中, 分取氯仿层, 滤液再用氯仿萃取 3 次, 合并萃取液, 回收氯仿至干, 残渣加甲醇溶解并转移至 10 mL 量瓶中, 定容, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

1.4.4 芦荟大黄素标准曲线的制备 在 222、254、284、429 nm 波长下测得芦荟大黄素具有吸收峰, 并且峰形良好, 所以以 429 nm 作为检测波长测定芦荟大黄素的含量。分别配制浓度为 0.025、0.050、0.100、0.120、0.400、0.800 mg/mL; 芦荟系列标准溶液和 0.002、0.004、0.008、0.016、0.032、0.108 mg/mL 芦荟大黄素系列标准溶液, 按上述色谱条件分别进样, 进样量为 10 μL, 以峰面积(A)为纵坐标, 以进样浓度(c)为横坐标绘制标准曲线, 得到芦荟苷的回归方程为 $A = -57997 + 17858470c$, $r = 1.000$, 线性范围为 0.025~0.800 mg/mL, 芦荟大黄素的归方程为 $A = -52758 + 84283457c$, $r = 1.000$, 线性范围为 0.0020~0.0800 mg/mL。

1.4.5 芦荟苷标准曲线的制备 精密称取芦荟苷标准品 10 mg, 置于 10mL 容量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 配制 1 mg/mL 的标准储备液, 再分级配制浓度分别为 0.5、1、5、10、25、50、100 μg/mL 的芦荟苷标准品溶液, 微孔滤膜过滤后待用。以芦荟苷标准品浓度(c)为横坐标, 芦荟苷峰面积(A)为纵坐标, 绘制标准曲线, 得到芦荟苷标准品的线性回归方程为: $Y = 35965X + 10251$ ($R = 0.9996$)。结果表明芦荟苷标准品在

0.5-100ug/mL 浓度范围内与峰面积呈良好的线性关系。

1.4.6 芦荟多糖的标准曲线制备 分别精密吸取甘露糖标准品 2 mL 于试管中, 加苯酚 1 mL 摇匀, 加浓硫酸 5 mL 迅速摇匀后, 静置 5 min, 沸水水浴加热 15 min, 冷却至室温, 分光光度法于 490 nm 波长处测吸收度。得到回归方程: $y = 11.241x + 0.0012$, $R^2 = 0.9993$ 。

1.4.7 芦荟蒽醌类成分量测定 精密称取芦荟膏中的蒽醌类化合物, 参照色谱条件, 在特征波长下进行测定。

1.4.8 芦荟多糖含量测定 取上述芦荟膏溶液 2.5 mL, 置于 25mL 量瓶中, 加入蒸馏水进行溶解、小心反复摇匀, 加水稀释至刻度, 取样 2mL, 精密测定样品溶液吸光度 A 值。再根据样品液 A 值及标准回归方程计算出芦荟多糖含量。

1.4.9 体外透皮吸收实验 取 Wister 大鼠 10 只, 10% 氨基甲酸乙酯腹腔注射麻醉, 背位固定, 将 10% 硫化钠均匀涂于大鼠腹部脱毛后冲洗擦干, 两天后脱臼处死, 手术刀切取 $2 \times 2 \text{ cm}^2$ 背部皮肤, 去除皮下脂肪组织, 储存在生理盐水中, 调整温度至 4℃, 24 h 之内使用。

调配一定量生理盐水, 制成溶液含 PEG400 浓度为 40%, 在 4℃ 下进行存放, 使用前进行预热至 32℃。

将离体鼠皮平放在供给池与接收池之间, 角质层向上, 真皮层向接受池。将释放池固定夹紧, 供给池中加入前述芦荟膏 0.5 g, 均匀涂抹于鼠皮角质层表面, 注入接收液。扩散池内水温控制在 $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$, 开动磁力搅拌器, 控制转速 400 r/min 进行恒速、均匀搅拌。在 0.5、1、3、6、8、16、24 h 抽取接收液 1.0 mL, 补充相同接收液, 确保等量、等温。

将接收液挥干后, 加入 1.0 mL 甲醇离心, 将样品液以 0.2 μm 微孔滤膜过滤, 直接进样, 然后精密测定芦荟多糖、芦荟大黄素、芦荟苷的浓度 C(μg/mL)。

$$\text{累积渗透量的计算: } Q = \frac{C_n \times 7.0 + \sum_{i=1}^{n-1} C_i \times 1.0}{S} \mu\text{g}$$

C_n 为第 n 个取样点的药物浓度(μg/mL);

C_i 为第 i 个取样点测的芦荟多糖浓度(μg/mL);

S 为渗透面积(cm^2)

2 结果

2.1 芦荟膏中功能成分的含量测定

本实验中所配制的芦荟膏中芦荟多糖的含量为 4.060-6.221 mg/mL, 芦荟膏中其它功能成分含量见表 1。

表 1 芦荟膏中各功能成分的含量测定(n=3)

Table 1 Determination of the content of the functional components in Aloe Cream (n=3)

组别 Group	芦荟大黄素 Aloe Emodin μg/mL	芦荟苷 Aloin μg/mL	大黄素 Emodin μg/mL	大黄酚 Chrysophanol μg/mL	大黄素甲醚 Physcion μg/mL	芦荟多糖 Aloe polysaccharide mg/mL
1	36.257	0.095	65.256	44.328	6.985	4.060
2	42.582	0.122	60.258	49.568	8.001	6.221
3	42.366	0.107	63.336	48.211	6.358	5.568

2.2 体外透皮吸收实验

体外透皮吸收实验中芦荟膏中芦荟多糖、芦荟大黄素等功能成分随着芦荟膏剂量的增加,累积渗透量逐渐增加。计算累

积渗透量和透皮速率,结果见表2。对不同剂量芦荟膏中各功能成分的渗透透过量与时间作关系图,见图1。从图中可以看出随着芦荟膏剂量的增加,各功能成分的渗透量逐渐增加。

表2 芦荟膏中各成分的累积渗透量

Table 2 Cumulative permeation quantity of each component of aloe cream

	0.5h	1h	3h	6h	8h	16h	24h
芦荟多糖 Aloe polysaccharide	0.096	0.396	0.665	0.823	1.283	2.452	4.001
芦荟大黄素 Aloe Emodin	0.125	2.231	5.721	9.342	12.064	14.757	17.432
芦荟苷 Aloin	0.004	0.011	0.025	0.037	0.049	0.055	0.078
大黄素甲醚 Physcion	0.021	0.099	1.988	3.070	4.002	4.880	5.001
大黄素 Emodin	0.157	2.443	6.876	12.221	19.003	21.021	24.077

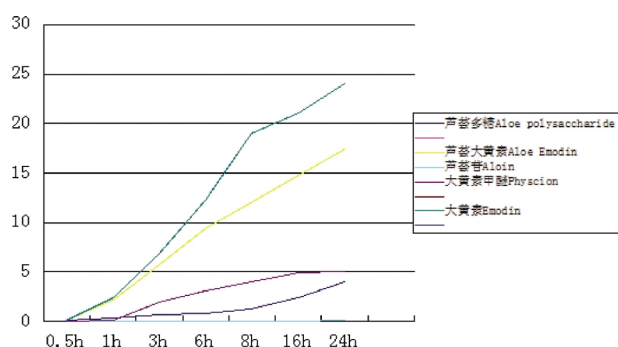


图1 芦荟膏中各成分不同时间渗透量

Fig.1 The compositions of aloe cream in the different time of infiltration

对图中曲线做二次回归方程,一阶导数大于零,二阶导数小于零,说明芦荟膏中芦荟多糖、芦荟大黄素等功能成分的渗透量随时间延长逐渐增加,但是渗透速率逐渐降低。结果见表3。

表3 芦荟中各成分的 Higuchi 方程和透皮速率常数

Table 3 The Higuchi equation of each ingredients in Aloe and percutaneous rate constant

	Higuchi equation	percutaneous rate constant J(ug/cm ² .h)	r
芦荟多糖 Aloe polysaccharide	Q=198.2332X-133.232	198.2323	0.9961
芦荟大黄素 Aloe Emodin	Q=288.2211X-133.244	288.2211	0.9993
芦荟苷 Aloin	Q=104.9773X-99.921	104.9773	0.9987
大黄素甲醚 Physcion	Q=321.1109X-107.2201	321.1109	0.9990
大黄素 Emodin	Q=199.2870X-100.7775	199.2870	0.9992

3 讨论

拔牙术是口腔外科门诊的常见手术。随着物质生活的丰富,人们对医疗服务水准要求也越来越高,自我保健及自我保

护意识逐渐增强,患者期望拔牙痛苦小,创口愈合快,无并发症,这就要求口腔外科医生一方面具有较高的操作水平,另一方面提高创口的愈合速度及质量。牙齿拔除后,拔牙创的愈合情况极大的影响牙槽嵴的状态,包括局部牙槽嵴和剩余牙槽嵴的功能,对邻近牙齿的框架也有一定影响。创口的延迟愈合也会增加感染几率,影响后期修复及种植。拔牙创的愈合包括一系列复杂的过程,包括凝血块形成,骨形成及骨改建。细胞外基质组分的合成是最主要的步骤,伤口愈合的早期在于构建基质,继之形成肉芽组织和合成胶原与弹性蛋白。口腔外科医生应对这一过程充分认识,重点关注。影响拔牙后创口的愈合的因素很多^[4],包括生物学因素如年龄^[5]、唾液腺功能^[6]、激素因素^[7]、药物及理化因素等。

药物透皮给药系统 (transdermal therapeutic systems TTS)是指在皮肤表面给药,使药物以恒定的速度或接近恒定速度通过皮肤各层,进入体循环,产生全身或局部治疗作用的一种制剂剂型^[8-10],其所依据的是脂质-蛋白分配理论^[11-15]。芦荟是属百合科草本植物,广泛存在于自然界中,已经发现的芦荟种类多达300余种,其中能够应用于临床的种类很少,库拉索芦荟是其中一种。库拉索芦荟凝胶冻干粉是将鲜叶中的叶肉从表皮中分离出来,经一系列科学工艺提取、灭菌、浓缩制成。研究表明,芦荟的化学成分复杂,主要含有蒽醌类化合物、多糖有机酸、蛋白质、氨基酸、多肽、酶类、植物固醇、皂苷多种微量元素等有效化学成分^[16]。其中,芦荟多糖(AP)是芦荟凝胶的主要生物活性成分,具有促进伤口愈合、调节免疫、抗炎、抗病毒、抗肿瘤等多种功效^[17,18]。Hegggers 等的研究表明,芦荟凝胶增加了基质的胶原蛋白的合成,促进了伤口的愈合^[19]。石宇等也报道,芦荟凝胶能明显的增加I型前胶原的表达及成纤维细胞增殖^[20]。甘油是一种无色、澄明的粘稠液体,属极性类透皮吸收的促进剂。我们将上述两种物质制成芦荟膏状制剂,前期实验显示,局部应用芦荟膏能明显促进拔牙创内成纤维细胞增殖,加速血凝块的机化和肉芽组织的生长,加快新骨组织的形成,从而有效地促进拔牙创的早期愈合。本研究结果显示,随着芦荟膏剂量的增加,渗透量逐渐增加,对芦荟膏中各成分不同时间渗透量曲线做二次回归方程,一阶导数大于零,二阶导数小于零,说明渗透量随时

间延长逐渐增加,但是渗透速率逐渐降低,局部用药,可以有效的促进拔牙创的愈合。

参考文献(References)

- [1] 孟培松,刘馥菲,毕良佳,等.芦荟膏对大鼠拔牙创愈合的促进作[J].吉林大学学报(医学版),2008,34(6):998-1000
Meng Pei-song, Liu Fu-fei, Bi Liang-jia, et al. Promotion of basic aloe mastic on wound healing of tooth extraction in rats[J]. Journal of Jilin University(Medicine Edition), 2008, 34(6): 998-1000
- [2] 孟培松,胡波,胡成己,等.芦荟膏对拔牙创组织愈合的动物实验[J].牙体牙髓牙周病学杂志,2008,18(8):434-437
Meng Pei-song, Hu Bo, Hu Cheng-ji, et al. The effect of aloe mastic on promoting wound healing after tooth extraction in animal model [J]. Chinese Journal of Conservative Dentistry, 2008, 18(8): 434-437
- [3] 孟培松,胡成乙,刘馥菲,等.芦荟膏治疗干槽症的动物实验研究[J].实用口腔医学杂志,2010,26(6):711-715
Meng Pei-song, Hu Cheng-yi, Liu Fu-fei, et al. Treatment of dry socket with aloe mastic in rats [J]. Journal of Practical Stomatology, 2010, 26(6): 711-715
- [4] 孙昕,王颖.拔牙创愈合的生物学特征和影响因素[J].广东牙防治,2004,12(3):239-240
Sun Xi, Wang Ying. Biological characteristics and predictive factors of wound healing of tooth extraction[J]. Journal of Dental Prevention and Treatment, 2004, 12(3): 239-240
- [5] Amler MH. Age factor in human alveolar bone repair [J]. J Oral Implantol, 1993, 19(2): 138-142
- [6] Dayan D, Bodner L, Horowitz I. Effect of salivary gland hypofunction on the healing of extraction wounds: a histomorphometric study in rats[J]. J Oral Maxillofac Surg, 1992, 50(4): 354-358
- [7] Tanaka S, Shimizu M, Debari K, et al. Acute effects of ovariectomy on wound healing of alveolar bone after maxillary molar extraction in aged rats[J]. Anat Rec, 2001, 262(2): 203-212
- [8] 刘雪丽,周雪峰,王晓璐,等.促进药物透皮吸收剂型研究进展[J].中国药业,2012,21(2):77-78
Liu Xue-li, Zhou Xue-feng, Wang Xiao-lu, et al. Research about how to improve the absorption with forms of drug [J]. China Pharmaceuticals, 2012, 21(2): 77-78
- [9] 何忠开,陈灿,黄石安.药物经皮给药系统的研究进展 [J]. 医学综述,2011,17(24):3785-3788
He Zhong-kai, Chen Can, Huang Shi-an. Research Progress of Transdermal Drug Delivery System [J]. Medical Recapitulate, 2011, 17(24): 3785-3788
- [10] 王斐,高中.透皮促渗方法联合应用的研究进展[J].国际药学研究杂志,2007,34(04):285-289
Wang Fei, Gao Shen. Advancement on combined application of percutaneous permeation methods [J]. International Journal of Pharmaceutical Research, 2007, 34(04): 285-289
- [11] Madishetti SK, Palem CR, Gannu R, et al. Development of domperidone bilayered matrix type transdermal patches: physicochemical, in vitro and ex vivo characterization[J]. Daru, 2010, 18(3): 221-229
- [12] Mamatha T, Venkateswara Rao J, Mukkanti K, et al. Development of matrix type transdermal patches of lercanidipine hydrochloride: physicochemical and in-vitro characterization [J]. Daru, 2010, 18(1): 9-16
- [13] Boyom FF, Ngouana V, Kemgne EA, et al. Antiplasmodial volatile extracts from Cleistopholis patens Engler & Diels and Uvariastrium pierreanum Engl. (Engl. & Diels) (Annonaceae) growing in Cameroon[J]. Parasitol Res, 2011, 108(5): 1211-1217
- [14] Gohel MC, Nagori SA. Fabrication of modified transport fluconazole transdermal spray containing ethyl cellulose and Eudragit RS100 as film formers[J]. AAPS PharmSciTech, 2009, 10(2): 684-691
- [15] Dhiman MK, Dhiman A, Sawant KK. Transbuccal delivery of 5-fluorouracil: permeation enhancement and pharmacokinetic study [J]. AAPS PharmSciTech, 2009, 10(1): 258-265
- [16] Atherton P. Aloe vera: magic or medicine [J]. Nurs Stand, 1998, 12(41): 49-52, 54
- [17] 陈晓东,吴伯瑜,江琼,等.芦荟粗多糖对人表皮细胞体外分泌细胞因子的影响[J].中国中药杂志,2005,30(24):1944-1946
Chen Xiao-dong, Wu Bo-yu, Jiang qiong, et al. Effect of aloe coarse polysaccharide on cytokine secretion of keratinocytes in vitro [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2005, 30(24): 1944-1946
- [18] 陈晓东,江琼,吴伯瑜,等.芦荟多糖对体外培养表皮细胞增殖活性及细胞内钙水平的影响 [J]. 中国医院药学杂志,2006,26(6):653-655
Chen Xiao-dong, Jiang Qiong, Wu Bo-yu, et al. Effects of polysaccharide from Aloe vera on proliferation and intracellular calcium level in the in vitro cultured keratinocytes[J]. Chinese Journal of Hospital Pharmacy, 2006, 26(6): 653-655
- [19] Heggers JP, Kucukcelebi A, Listengarten D, et al. Beneficial effect of Aloe on wound healing in an excisional wound model [J]. J Altern Complement Med, 1996, 2(2): 271-277
- [20] 石宇,李德如,闫国富,等.芦荟凝胶对人皮肤成纤维细胞增殖及胶原合成的影响[J].重庆医学,2008,37(12):1271-1273
Shi Yu, Li De-ru, Yan Guo-fu, et al. Effect of aloe gel on cell proliferation and synthesis of collage in cultured human skin fibroblast[J]. Chongqing Medicine, 2008, 37(12): 1271-1273