

酚-黄复方微乳的体外透皮特性考察

邓新焕, 王亚静*, 于悦, 孟亚飞, 任树龙

(天津中医药大学 现代中药发现与制剂技术教育部工程研究中心, 天津 300193)

[摘要] **目的:** 制备酚-黄复方微乳并考察其体外透皮扩散特性。**方法:** 以油酸乙酯为油相, 聚山梨酯-80(tween-80)为乳化剂, 聚乙二醇-400(PEG-400)为助乳化剂, 水相逐步加入到含药混合溶液中, 制备酚-黄复方微乳。测定微乳的外观形态、粒径分布及稳定性。采用 Franze 扩散池法, 考察补骨脂酚、黄芩苷在溶液和微乳中经皮渗透特性。**结果:** 制备的微乳澄清透明, 呈近球形, 平均粒径(17.30 ± 0.17) nm, 稳定性较好。黄芩苷在溶液和微乳中 24 h 累积透过量(Q_{24h})分别为(208.80 ± 5.26), (232.38 ± 15.07) $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$, 经皮渗透特性无显著性差异。补骨脂酚 24 h 累积透过量由溶液中(324.81 ± 56.63) $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ 增加至微乳中的(721.30 ± 108.88) $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$, 增加了 2.22 倍, 稳态渗透速率和表观渗透系数为溶液组的 5.0 倍, 均有显著提高。**结论:** 微乳经皮给药系统具有很好的促透作用, 为酚-黄复方皮肤给药新制剂的设计提供实验依据。

[关键词] 补骨脂酚; 黄芩苷; 酚-黄复方微乳; 经皮渗透特性; 表观渗透系数; 稳态渗透速率

[中图分类号] R283.6; R285.5; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)21-0005-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014210005

Investigation of *in vitro* Transdermal Properties of Bakuchiol-baicalin Compound Microemulsions

DENG Xin-huan, WANG Ya-jing*, YU Yue, MENG Ya-fei, REN Shu-long

(Engineering Research Center of Modern Chinese Medicine Discovery and Preparation Technique, Ministry of Education, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare bakuchiol-baicalin compound microemulsions and investigate its *in vitro* transdermal diffusion characteristics. **Method:** With ethyl oleate as oil phase, tween-80 as emulsifier and polyethylene glycol-400 (PEG-400) as co-emulsifier, aqueous phase was gradually added into mixture containing drug to produce bakuchiol-baicalin compound microemulsions. Morphology, particle size distribution and stability were characterized. Transdermal characteristics of bakuchiol and baicalin in solution and microemulsions were studied by modified Franze diffusion cell. **Result:** Clear and transparent microemulsion were prepared, they were showed nearly spherical under transmission electron microscope, particle size was (17.30 ± 0.17) nm with excellent stability. Cumulative permeation amounts of baicalin in solution and microemulsions were (208.80 ± 5.26) $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ and (232.38 ± 15.07) $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ in 24 h, there were no significant difference of their transdermal characteristics. Cumulative permeation amounts of bakuchiol in solution and microemulsions were (324.81 ± 56.63) $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ and (721.30 ± 108.88) $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ in 24 h, compared with steady-state infiltration rate and apparent permeability coefficient in solution, these two parameters 5.0 times significantly improved. **Conclusion:** Delivery system of microemulsions can significantly improve percutaneous absorption. This study provides experimental foundations for development of a new preparation of bakuchiol-baicalin compound skin delivery system.

[收稿日期] 20140326(010)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2012ZX09304007)

[第一作者] 邓新焕, 在读硕士, 从事药物新剂型与新技术研究, Tel: 15822389615, E-mail: xdengxinhuan@163.com

[通讯作者] * 王亚静, 副研究员, 从事药物制剂设计研究, Tel: 022-59596169, E-mail: yajing022@163.com

[**Key words**] bakuchiol; baicalin; bakuchiol-baicalin compound microemulsions; percutaneous penetration characteristics; apparent permeability coefficient; steady-state infiltration rate

补骨脂酚是一种异戊二烯基酚萜类化合物^[1],为补骨脂挥发油中主要成分,质量分数 > 60%^[2],具有抗菌抗炎、植物雌激素^[3]等药理作用。黄芩苷是从黄芩中提取分离得到的一种黄酮类化合物,具有抗菌、抗炎、美白、皮肤修复等作用^[4-6]。酚-黄复方由补骨脂酚-黄芩苷两种活性成分组成,可干预痤疮发生的多个环节,研制酚-黄复方制剂将对痤疮的治疗具有积极效果。但补骨脂酚和黄芩苷理化性质相差较大,溶解性不佳,制约了二者复方制剂药理作用的发挥,而且目前尚无关于酚-黄复方制剂的报道。微乳作为一种新型经皮给药载体,具有增加难溶性药物溶解度、促进药物经皮吸收、有利于提高局部药物浓度等优点。本实验拟将酚-黄复方载入微乳中,制成复方微乳并对其体外透皮性质进行考察,为酚-黄复方经皮给药新制剂的研发提供参考。

1 材料

1200 系列高效液相色谱系统(美国 Agilent 公司),ALC-1104 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司),JY92-IIN 型超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司),TK-20A 型透皮扩散测定仪(上海锴凯科技贸易有限公司),Nano-ZS3600 型激光粒度测定仪(英国马尔文仪器有限公司),TG16-WS 型台式高速离心机(上海湘仪离心机仪器有限公司),JEOL100CX-II 型透射电子显微镜(日本电子株式会社)。

补骨脂酚(自制,HPLC 纯度 > 95.0%,批号 20100823),黄芩苷(天津中新药业研究中心,HPLC 纯度 > 94.0%),黄芩苷对照品(中国食品药品检定研究院,纯度 ≥ 98%,批号 110715),补骨脂酚对照品(自制,经结构确证,纯度 ≥ 98%,批号 20111110),聚山梨酯-80(tween-80,天津市北方天医化学试剂厂),聚乙二醇-400(PEG-400,天津市博迪化工有限公司),水为蒸馏水,乙腈、甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

SD 大鼠由天津市山川红实验动物科技有限公司提供,10 只,雄性,体重 180 ~ 220 g,合格证号 SCXK(津)2009-0001。

2 方法与结果

2.1 酚-黄复方微乳的制备与评价

2.1.1 酚-黄复方微乳的处方工艺 在预试验基础上,确定了酚-黄复方微乳的处方为油酸乙酯 10%,

tween-80 26.5%,PEG-400 13.5%,水 49.05%,补骨脂酚和黄芩苷 0.95%。按处方比例将黄芩苷 4 mg 溶于乳化剂 tween-80 和助乳化剂 PEG-400 中,混合均匀,加入补骨脂酚(15 mg)和油酸乙酯,溶解混合为含药内相,室温下采用磁力搅拌器边搅拌边缓慢滴加水到含药内相中,加水完毕后继续搅拌 15 min,适度超声以去除气泡,至澄清稠状液体,即得。

2.1.2 微乳外观与形态 酚-黄复方微乳为淡黄色澄清稠状液体。取适量微乳加水稀释后搅拌均匀,点样于铜网上,干燥,用 1% 磷钨酸染色 5 min,透射电镜下观察,结果显示微乳呈近球状,大小 ≤ 100 nm。

2.1.3 微乳粒径 采用激光粒度测定仪进行粒径测定。取适量微乳样品加水稀释 5 倍,置于粒径测定仪的比色皿中,在 25 °C 下测定粒径,每个样品平行测定 3 次,结果显示微乳的平均粒径(17.30 ± 0.17) nm。

2.1.4 微乳稳定性考察 取微乳适量置于离心管中,于 13 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,观察并记录现象,结果显示微乳离心后无分层现象,仍呈澄清透明状,表明其稳定性较好。

2.2 酚-黄复方微乳的含量测定

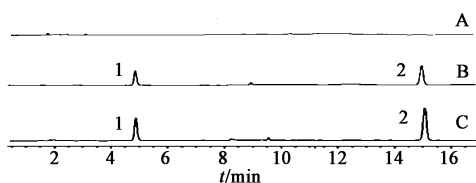
2.2.1 色谱条件 Venusil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 200 mm,5 μm),流动相乙腈(A)-0.1% 甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0 ~ 5 min,32% A;5 ~ 6 min,32% ~ 85% A;6 ~ 15 min,85% A;15 ~ 20 min,85% ~ 32% A),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 °C,检测波长 280 nm,进样量 10 μL。按补骨脂酚和黄芩苷峰分别计算理论塔板数均不低于 3 000。

2.2.2 检测波长考察 分别称取补骨脂酚、黄芩苷对照品适量,加甲醇溶解并分别稀释成 50 mg·L⁻¹ 的溶液,摇匀,按紫外分光光度法进行扫描^[7-8],确定黄芩苷、补骨脂酚的吸收波长分别为 280,260 nm。在这 2 个波长下考察专属性和线性范围,发现采用 260 nm 时,由于空白介质杂质峰较多,影响了补骨脂酚和黄芩苷的准确定量;补骨脂酚和黄芩苷线性回归的相关系数平方(R²)分别为 0.999 8 和 0.996 9,均不及采用 280 nm 时的 R²(0.999 9 和 0.999 7),故选择检测波长 280 nm。

2.2.3 对照品溶液配制 精密称取补骨脂酚和黄芩苷对照品适量至量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇

匀,加接收介质稀释至质量浓度分别为 31.25, 15.63 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

2.2.4 专属性考察 分别精密量取空白皮肤组织浸出液、酚-黄复方微乳样品、混合对照品溶液适量,按 2.2.1 项下色谱条件测定,见图 1,结果表明空白透皮接收液对含量测定无干扰。



A. 空白透皮接收液;B. 供试品;C. 对照品;

1. 黄芩苷;2. 补骨脂酚

图 1 酚-黄复方微乳 HPLC

2.2.5 线性范围考察 分别精密称取补骨脂酚和黄芩苷对照品 5.0, 2.50 mg 至同一量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,作为贮备液。精密量取该贮备液适量,加接收介质稀释,得补骨脂酚 3.91, 7.81, 15.63, 31.25, 62.5, 125, 250 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 黄芩苷 1.95, 3.91, 7.81, 15.63, 31.25, 62.5, 125 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的系列混合对照品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件测定,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程分别为 $Y = 12.226X + 18.428$ ($R^2 = 0.9997$), $Y = 29.698X - 20.416$ ($R^2 = 0.9999$),线性范围依次为 3.91 ~ 250, 1.95 ~ 125 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.2.6 最低检测限 在仪器不关闭、流动相不改变的情况下,取对照品贮备液不断用甲醇稀释,按 2.2.1 项下色谱条件测定,使其能产生相当于 3 倍噪音的信号,记录色谱图,结果显示在 280 nm 处补骨脂酚和黄芩苷的最低检测限分别为 50, 20 ng。

2.2.7 准确度试验 称取空白微乳 0.425 g 进行体外透皮试验,取 8 h 透皮接收液适量,加入一定量混合对照品贮备液,制得补骨脂酚和黄芩苷分别为 7.81, 3.91 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; 31.25, 15.63 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; 125, 62.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的加样回收溶液,按 2.2.1 项下色谱条件测定,计算补骨脂酚和黄芩苷的平均回收率分别为 99.96% 和 99.36%, RSD 分别为 1.26% 和 0.83%。

2.2.8 精密度试验 取 2.2.5 项下对照品贮备液,加接收介质稀释成分别含有补骨脂酚和黄芩苷 7.81, 3.91 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; 31.25, 15.63 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; 125, 62.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的混合溶液,按 2.2.1 项下色谱条件测定,每日进样 3 次,连续进样 3 d,计算各浓度补骨脂酚日内精密度 RSD 分别为 0.20%, 0.04%, 0.07%; 日间精密度 RSD 分别为 2.0%, 0.99%, 1.2%。各浓

度黄芩苷日内精密度 RSD 分别为 0.40%, 0.02%, 0.21%; 精密度日间 RSD 分别为 1.5%, 0.57%, 1.9%, 均符合方法学要求。

2.2.9 稳定性考察 取酚-黄复方微乳的 4 h 透皮接收液,在相应试验条件下放置 0, 4, 8, 24 h,按 2.2.1 项下色谱条件测定,计算补骨脂酚和黄芩苷峰面积的 RSD 分别为 0.12% 和 0.39%,表明透皮接收液在 24 h 内稳定性良好。

2.3 体外透皮性考察

2.3.1 接收介质筛选 以单味药补骨脂酚为模型药物,筛选接收介质。分别用生理盐水 (normal saline, NS), 含 1% tween-80 的 NS 溶液, 含 20%, 40% 乙醇的 NS 溶液, 含 20%, 40% PEG-400 的 NS 溶液,超声脱气后作为接收液,筛选最佳接收液体系,绘制累积透过量-时间曲线,见图 2。结果显示含 1% tween-80, 20% 乙醇和 40% 乙醇的 NS 溶液作为接收介质对补骨脂酚的溶解度均很大,能达到漏槽条件,但由于一定量乙醇会改变皮肤通透性,影响试验结果,故选择 1% tween-80 的 NS 溶液作为透皮接收介质。

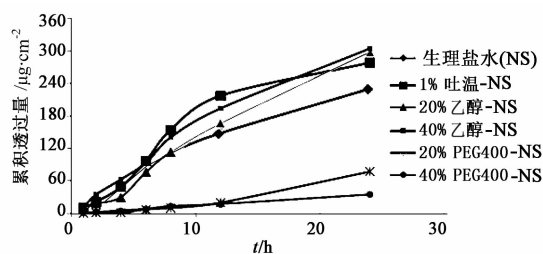


图 2 补骨脂酚在不同接收介质中体外经皮渗透曲线 ($n=3$)

2.3.2 体外透皮试验^[9] 采用改良的 Franz 扩散池,透皮扩散面直径 2 cm,透皮扩散面积 3.14 cm^2 ,接收室体积 18.4 mL。将冷冻于 NS 的离体鼠皮化冻,取适宜大小固定在供给池和接收池间,角质面向供给池。将 1% tween-80 接收液注入接收池,循环水浴 (37 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$,于 300 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 恒速搅拌。其中供给池分别给予含有补骨脂酚 3.75 mg 和黄芩苷 1 mg 的 1% tween-80 水溶液,等剂量的酚-黄微乳各 0.425 g,封口膜封口,并扎若干小孔。试验开始后,分别于 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 取样 1 mL,每次取样后立即补入相同体积的新鲜接收液并排除接收池中气泡。取出的接收液经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,按 2.2.1 项下色谱条件测定,计算累计透过量 and 经皮渗透参数。

$$Q_n = V_0(C_n + \frac{V}{V_0} \sum_{i=1}^{n-1} C_i) / A = (V_0 C_n + V \sum_{i=1}^{n-1} C_i) / A$$

其中 Q_n 为 t 时刻单位面积累积透过量, C_n 为 t 时刻药物质量浓度, C_i 为 t 时刻前药物质量浓度, V_0 为接收池中溶液体积, V 为取样体积, A 为有效扩散面积。 P_{app} 为表观渗透系数, C_0 为供给池初始药物质量浓度, J_{ss} 为稳态渗透速率。 酚-黄复方微乳中补骨脂酚和黄芩苷的经皮渗透参数分别见表 1, 累积

透过量-时间曲线见图 3, 4。 结果发现补骨脂酚在微乳中 Q_{24h} , J_{ss} , P_{app} 较其在溶液中显著提高, 表明微乳制剂能明显改善补骨脂酚的经皮渗透性。 黄芩苷在微乳中 Q_{24h} , J_{ss} , P_{app} 较溶液组均有所提高, 但无显著性差异, 表明微乳对黄芩苷的经皮渗透特性无显著影响。

表 1 酚-黄微乳中指标成分的体外经皮渗透参数 ($n=3$)

成分	组别	$Q_{24h}/\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$	线性方程	R^2	$J_{ss}/\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$	$P_{app}/\times 10^{-3}\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$
补骨脂酚	溶液	324.81 ± 56.63	$Q = 10.97t + 51.743$	0.987 8	10.97 ± 0.84	1.24 ± 0.19
	微乳	$721.30 \pm 108.88^{1)}$	$Q = 55.06t + 84.314$	0.994 0	$55.06 \pm 12.40^{1)}$	$6.24 \pm 1.40^{1)}$
黄芩苷	溶液	208.80 ± 5.26	$Q = 26.252t + 66.894$	0.911 5	26.25 ± 1.30	11.16 ± 0.55
	微乳	232.38 ± 15.07	$Q = 30.684t + 31.734$	0.964 8	30.68 ± 2.17	13.04 ± 0.92

注:与溶液组相比¹⁾ $P < 0.05$ 。

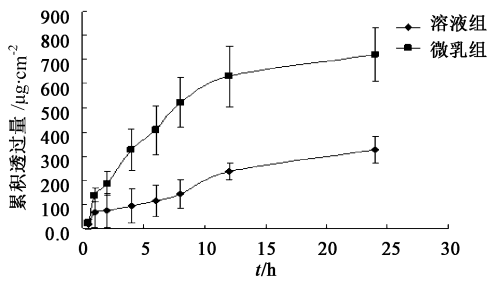


图 3 酚-黄复方微乳中补骨脂酚体外透皮曲线 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

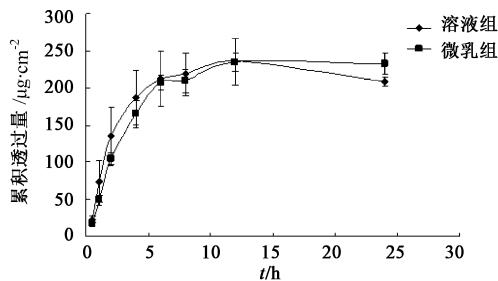


图 4 酚-黄微乳中黄芩苷体外透皮曲线 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3 讨论

微乳是由乳化剂、助乳化剂、油和水以适当比例自发形成的一种均匀、黏度低、热力学稳定的分散体系。预试验对油酸乙酯、乙醇、丙二醇、甘油及 tween-80 等微乳常用辅料进行筛选, 根据溶解度等试验结果确定以油酸乙酯为油相, tween-80 为乳化剂, PGE-400 为助乳化剂, 制备的微乳进行理化性质考察, 结果表明符合微乳的药剂学要求。

体外透皮特性研究是全面了解药物经皮渗透过程的基础, 是皮肤给药系统开发的关键。良好的经皮渗透特性是药物维持局部或全身有效浓度、发挥药效作用的前提。微乳作为经皮给药载体, 具备通过增大药物溶解度来增加药物在皮肤的浓度梯度、提高药物的透皮能力等^[10]独特优势, 对于外用药物

特别是难溶性药物是一种较为理想的外用药物释放载体。本文将溶解性较差的补骨脂酚、黄芩苷制备成复方微乳后, 补骨脂酚的累积透过量 and 经皮渗透系数均得到显著提高, 表明微乳给药系统有效地改善了补骨脂酚的经皮渗透性质, 为充分发挥酚-黄复方药效作用奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Park E J, Zhao Y Z, Kim Y C, et al. Protective effect of (S)-bakuchiol from *Psoralea corylifolia* on rat liver injury *in vitro* and *in vivo* [J]. *Planta Med*, 2005, 71(6): 508.
- [2] 曹金一. 补骨脂本草文献与质量研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2009.
- [3] 于悦, 王亚静, 皮佳鑫, 等. 补骨脂酚研究进展 [J]. *山东中医药大学学报*, 2013, 37(2): 174.
- [4] 李上云, 王岩. 痤疮的中药外治法 [J]. *辽宁中医杂志*, 2003, 30(12): 998.
- [5] 官妍, 谢萌, 汪长中, 等. 连翘苷和黄芩苷对表皮葡萄球菌生物膜抑制作用的研究 [J]. *中国微生态学杂志*, 2010, 22(10): 886.
- [6] 龚盛昭, 揭育科, 袁水明. 黄芩苷在功能性化妆品中的应用研究 [J]. *日用化学工业*, 2003, 33(3): 200.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 二部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 282.
- [8] 刘亚男, 王跃飞, 韩立峰, 等. 高效液相色谱-电喷雾-质谱法分析补骨脂中化学成分 [J]. *中国中药杂志*, 2009, 34(22): 2898.
- [9] 韩旻, 钟韵伟, 李新平, 等. 不同促渗剂对氢溴酸高乌甲素贴片体外经皮渗透的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2008, 33(11): 1252.
- [10] 赵永哲, 胡晋红, 刘继勇. 透皮给药载体微乳的研究进展 [J]. *中国药学杂志*, 2008, 43(24): 1841.

[责任编辑 刘德文]