

不同促渗剂对三威跌打风湿贴中柚皮苷体外透皮吸收的影响

银杉杉¹, 汪艳秋², 周国良³, 张军^{1*}

(1. 广州中医药大学 新药开发研究中心, 广州 510006;

2. 广东一方制药有限公司, 广东 佛山 528244; 3. 广州市荔湾区骨伤科医院, 广州 510140)

[摘要] 目的:研究三威跌打风湿贴中柚皮苷体外透皮吸收行为,比较不同透皮吸收促进剂对其透皮吸收性能的影响。方法:采用 Franz 扩散池装置,以 HPLC 测定接收液中柚皮苷含量,流动相 0.1% 磷酸-乙腈(81:19),检测波长 283 nm,考察制剂中柚皮苷体外透皮吸收行为及各促透剂的促渗效果。结果:不含促渗剂的凝胶膏剂中柚皮苷体外透皮吸收符合零级释放模型,24 h 体外累积渗透方程 $Q = 1.126t + 2.795$,透皮速率 $1.126 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$;加入促透剂丙二醇、氮酮、薄荷脑后柚皮苷体外透皮吸收速率明显提高,且薄荷脑 > 丙二醇 > 氮酮。结论:凝胶膏剂中柚皮苷可透皮吸收;促透剂丙二醇、氮酮、薄荷脑均能促进柚皮苷透皮吸收,且以薄荷脑作用最明显。

[关键词] 柚皮苷;透皮吸收;丙二醇;氮酮;薄荷脑

[中图分类号] R283.6;R945;R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)07-0015-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016070015

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160215.1130.012.html>

[网络出版时间] 2016-02-15 11:30

Effects of Different Permeation Enhancer on *in Vitro* Percutaneous Absorption of Naringin in Sanwei Dieda Rheumatism Gel Paste

YIN Shan-shan¹, WANG Yan-qiu², ZHOU Guo-liang³, ZHANG Jun^{1*}

(1. Development & Research Center of New Chinese Drugs, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China; 2. Guangdong Yifang Pharmaceutical Co. Ltd., Foshan 528244, China; 3. Liwan District Orthopedics Hospital of Guangzhou, Guangzhou 510140, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate effects of different permeation enhancer on *in vitro* percutaneous absorption of naringin in Sanwei Dieda rheumatism gel paste. **Method:** Taking Franz diffusion cell to perform test, HPLC was adopted to determine the content of naringin in receiving liquid, effects of different permeation enhancer on *in vitro* percutaneous absorption of naringin in Sanwei Dieda rheumatism gel paste were investigated. **Result:** *In vitro* percutaneous absorption of naringin in this gel paste accorded with zero order release model, cumulative permeation equation was $Q = 1.126t + 2.795$ with transdermal rate of $1.126 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$. Either propylene glycol, azone or menthol was added, transdermal rates of naringin were improved, and effect was in order of menthol > propylene glycol > azone. **Conclusion:** Naringin in gel preparation can be percutaneous absorbed. Propylene glycol, azone and menthol all can obviously promote transdermal absorption of naringin, especially for menthol, which plays the highest effect.

[Key words] naringin; percutaneous absorption; propylene glycol; azone; menthol

三威跌打风湿贴(巴布剂)由三七、骨碎补、当归等药味组成,是依据广州“西关正骨”经验开发的

医疗机构制剂,具有活血化瘀、消肿止痛的功效,用于治疗跌打损伤、风湿骨痛等,临床疗效较好。骨碎

[收稿日期] 20150801(008)

[第一作者] 银杉杉,在读硕士,从事中药新药研究与开发, Tel:020-39358519, E-mail:shansy6@163.com

[通讯作者] *张军,研究员,博士生导师,从事中药新药研究与开发, Tel:020-39358519, E-mail:zhjxsh@aliyun.com

补功能疗伤止痛、补肾强骨,外用消风祛斑^[1],柚皮苷是其成分之一。药理研究表明骨碎补能促进成骨细胞增殖、分化及钙化,还能抑制其凋亡,并能增加骨密度和血钙含量、增加骨强度、防治骨质疏松、改善微循环、抑制血小板聚集等^[2-9];柚皮苷也有部分类似效果^[9],还有抗炎、抗氧化、抗胆固醇、神经保护等作用^[10-11]。周钰等^[12-13]对兔急性软组织损伤的研究表明,以骨碎补为君药的活血镇痛散有较好的消肿抗炎功效,能明显减少损伤局部白细胞,减轻炎症反应,促进损伤局部胶原纤维合成、炎性渗出物吸收及肌纤维组织修复。冯宝民等^[14]发现柚皮苷有较好的抑制皮肤炎作用,投药量为 20 mg·kg⁻¹时即可对耳缘浮肿产生有效的抑制,并认为在抗过敏方面柚皮苷具有一定的开发价值。谢仁峰等^[15]研究观察到柚皮苷能显著减少小鼠扭体次数、耳肿胀度和腹腔渗出液,也能减轻大鼠足跖注射蛋清引起的炎性肿胀,且抗炎强弱与炎症局部前列腺素 E₂ (PGE₂) 水平相关,抗炎机制可能与其抑制了炎性组织 PGE₂ 的合成或释放有关。

目前,柚皮苷研究多以药理活性为主,其透皮吸收情况鲜见报道;而且柚皮苷的药理活性与本制剂功效相关,故选择该成分作为本制剂的指标成分。作为外用贴膏剂,皮肤是其有效成分吸收起效的主要屏障,本实验考察凝胶膏剂中柚皮苷体外透皮吸收行为,比较不同促进剂对其透皮吸收的影响,为三威跌打风湿贴筛选优良的促透剂提供指导,同时为其他含柚皮苷外用制剂的制备提供参考。

1 材料

AB204-N 型 1/万电子分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司),CP 225D 型 1/10 万分析天平(德国 Sartorius 公司),LC-20A 型高效液相色谱仪(日本岛津公司,含 LC-20AT 型泵,SIL-20A 型自动进样器,Labsolution 色谱工作站),TK-12B 型透皮扩散试验仪(上海锴凯科技贸易有限公司),HC-300T2 型多功能粉碎机(永康市绿可食品机械有限公司)。

丙二醇(天津市富宇精细化工有限公司),氮酮(西亚试剂公司),薄荷脑(广州市博亚精细化工有限公司),柚皮苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110722-200610),0.9% 氯化钠注射液(山东鲁抗辰欣药业有限公司),乙二胺四乙酸(EDTA,天津市致远化学试剂有限公司),卡波姆 940(Lubrizol 化工有限公司),聚丙烯酸钠(NP-700,美国国际特品公司),甘羟铝(Kyowa 化工有限公司),甘油(天津市富宇精细化工有限公司),乙腈为色谱

纯,其余试剂为分析纯。

SPF 级雄性 KM 小鼠,体重(30 ± 5) g,购自广州中医药大学实验动物中心,合格证号 SCXK(粤)2013-0020。

2 方法与结果

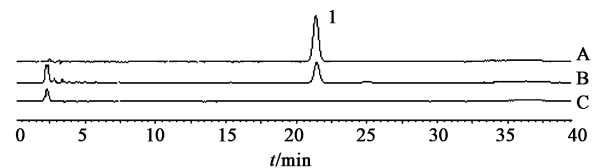
2.1 凝胶膏剂的制备 按处方比例称取饮片共 12 g,粉碎成细粉,加入到含 EDTA 的卡波姆溶液中,混匀,加入 NP-700,甘羟铝和甘油的混合液,搅拌均匀,加入适量柠檬酸溶液,搅拌均匀,取出膏体,涂布,盖衬,切片,包装,得三威跌打风湿贴。柚皮苷阴性凝胶膏剂为本品去除骨碎补的凝胶膏剂。本品除去盖衬,剪碎,加甲醇超声提取 30 min,测得每帖含柚皮苷不少于 3 mg。

2.2 动物离体皮肤的制备 小鼠颈椎脱臼处死,剃净腹部体毛,分离腹部皮肤并小心刮去皮下组织、脂肪及粘连物,生理盐水反复冲洗干净,置于无菌生理盐水中,-20 °C 保存,备用。实验时鼠皮于 <10 °C 解冻,取出放至室温,对光检视皮肤应完整、无破损。

2.3 供试品溶液的制备 将鼠皮平放于 Franz 扩散池结合处(释药面积 1.766 5 cm²,接收池体积 14 mL),角质层朝上,将凝胶膏剂紧贴于角质层上,用铁夹固定接收池与释放池。接收池内注入生理盐水至其与皮肤紧密接触,并排除气泡。接收池 300 r·min⁻¹ 恒速搅拌,水浴温度 32 °C,分别于 2,4,6,8,10,12,24 h 取样,每次 2.0 mL,同时补充等量 32 °C 预热的生理盐水。接收液经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,采用 HPLC 测定柚皮苷含量。

2.4 柚皮苷的含量测定

2.4.1 色谱条件 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),流动相 0.1% 磷酸-乙腈(81:19),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 283 nm。见图 1。



A. 对照品;B. 供试品;C. 阴性样品;1. 柚皮苷

图 1 三威跌打风湿贴透皮接收液 HPLC

Fig. 1 Receiving liquid chromatograms of Sanwei Dieda rheumatism gel paste detected by HPLC

2.4.2 对照品溶液的制备 精密称取柚皮苷对照品 6 mg,置 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得 0.608 g·L⁻¹ 储备液。

2.4.3 线性关系的考察 取柚皮苷储备液适量,稀释成质量浓度分别为 60.8,6.08,4.864,2.432,

1.216, 0.608 mg·L⁻¹ 的系列对照品溶液。精密吸取系列对照品溶液各 10 μL 进样,按 2.4.1 项下条件测定,以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,得回归方程 $Y = 1.44 \times 10^6 + 1\ 382.24 (R^2 = 0.999\ 9)$,线性范围 0.608 ~ 60.8 mg·L⁻¹。

2.4.4 精密度试验 将 60.8 mg·L⁻¹ 柚皮苷对照品溶液按 2.4.1 项下条件连续重复进样 6 次,每次 10 μL,计算柚皮苷峰面积的 RSD 1.6%,表明仪器精密度良好。

2.4.5 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 按 2.4.1 项下条件进样 10 μL,结果柚皮苷峰面积的 RSD 1.6%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4.6 加样回收试验 在空白接收液中加入一定量柚皮苷对照品,制成质量浓度分别为 1.2, 2.4, 6.0 mg·L⁻¹ 的溶液,按 2.4.1 项下条件测定,计算平均回收率分别为 97.86%, 98.11%, 98.85%, RSD 分别为 1.0%, 0.6%, 1.5%。

2.5 不同透皮吸收促进剂对柚皮苷透皮吸收的影响 同 2.1 项下方法,在基质中加入不同质量分数的促透剂丙二醇(3%, 5%, 7%), 氮酮(3%, 5%, 7%), 薄荷脑(1%, 2%, 3%), 分别制备凝胶膏剂,室温下待其固化成型,作为各供试凝胶膏剂。空白为基质中不加任何促透剂。分别测定各促透剂对凝胶膏剂中柚皮苷体外累积透过量,计算各时间点的单位面积累积透过量(Q),渗透速率常数(J_{ss})和增渗比(ER)。

$$Q = (C_n V + \sum_{i=1}^{n-1} C_i V_i) / A$$

$$J_{ss} = dQ/dt$$

$$ER = J_{ss\text{促透剂}} / J_{ss\text{空白}}$$

式中 V 为接收液体积, V_i 为 i 时间点取样体积, C_n 或 C_i 分别为第 n 个时间点或第 i 个取样点测得的药物质量浓度, A 为有效扩散面积,见表 1 和图 2。结果显示丙二醇、氮酮、薄荷脑都有明显促进柚皮苷透皮吸收的效果,其中 7% 丙二醇, 3% 氮酮和 1% 薄荷脑促渗作用最佳,排序为 1% 薄荷脑 > 7% 丙二醇 > 3% 氮酮。目前,薄荷脑作为促透剂在中药制剂中较为常见^[16]。故考虑选择 1% 薄荷脑为三威跌打风湿贴的促透剂。

3 讨论

结果显示不含促透剂的凝胶膏剂中柚皮苷 24 h 累积渗透方程为 $Q_n = 1.126t + 2.795$,柚皮苷 24 h 的 J_{ss} 1.126 μg·cm⁻²·h⁻¹,加入促透剂后, J_{ss} 增加,

表 1 不同促透剂对三威跌打风湿贴中柚皮苷渗透性能的影响

Table 1 Effects of different permeation enhancer on *in vitro* percutaneous absorption of naringin in Sanwei Dieda rheumatism gel paste

促透剂	Q-t 方程	r	J _{ss} /μg·cm ⁻² ·h ⁻¹	ER
空白	Q _n = 1.126t + 2.795	0.975 9	1.126	-
3% 丙二醇	Q _n = 2.658t + 10.950	0.994 8	2.658	2.361
5% 丙二醇	Q _n = 2.391t + 3.638	0.997 0	2.791	2.123
7% 丙二醇	Q _n = 3.017t + 0.869	0.993 5	3.017	2.679
3% 氮酮	Q _n = 2.769t - 5.831	0.996 4	2.769	2.459
5% 氮酮	Q _n = 1.989t + 0.241	0.991 0	1.989	1.766
7% 氮酮	Q _n = 1.956t - 4.222	0.972 1	1.956	1.737
1% 薄荷脑	Q _n = 3.916t + 2.844	0.992 4	3.916	3.480
2% 薄荷脑	Q _n = 3.479t + 10.787	0.992 6	3.479	3.090
3% 薄荷脑	Q _n = 0.815t + 1.596	0.998 5	0.815	0.720

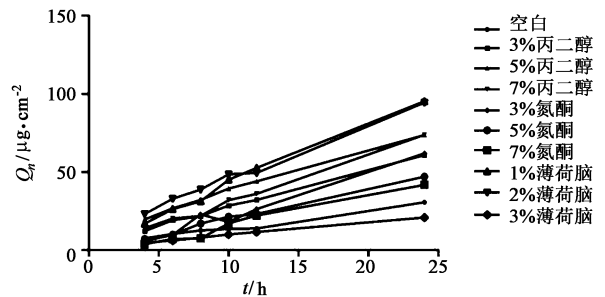


图 2 不同促透剂的三威跌打风湿贴中柚皮苷 24 h 渗透曲线

Fig.2 Penetration curves in 24 h of naringin from Sanwei Dieda rheumatism gel paste caused by permeation enhancers

表明三威跌打风湿贴中柚皮苷可透皮吸收,为骨碎补的外用提供了科学依据,为含柚皮苷的外用制剂开发提供理论依据。此外,加入透皮吸收促进剂后,除 3% 薄荷脑组外,各组 24 h 柚皮苷 J_{ss} 均明显升高,表明丙二醇、氮酮、薄荷脑均能促进柚皮苷透皮吸收,可能与其能使角质细胞疏松、增大细胞间隙、增大毛孔孔径及类脂流动性,进而改变小鼠皮肤超微结构等相关^[17]。

氮酮对亲水性及亲脂性药物均具有促渗作用,最佳促透浓度多为 2% ~ 6%^[18]。但另有文献报道氮酮对水溶性药物有促渗作用,而对一些脂溶性较强的药物促渗作用较弱,甚至可能有负效应^[19];此外,氮酮质量分数过高会增加凝胶的黏稠性,不利于其透皮吸收。丙二醇有助溶和使各成分均匀混合的作用,可渗入角质层并在其中形成蓄积,增加药物在角质层中的溶解度和分配性,从而对药物的经皮渗透产生促进作用^[20],但丙二醇性质黏稠,浓度过高也会增大凝胶的黏稠度。薄荷脑对水溶性和脂溶性化合物的透皮吸收均有显著的促进作用,但对脂溶性化合物的作用更强。

本文研究结果表明柚皮苷的促渗作用薄荷脑 > 丙二醇 > 氮酮,且氮酮浓度增大促透作用有所下降,推测可能因氮酮浓度增大,胶体黏稠度增加,不利于柚皮苷的释放及溶出,进而阻碍了其透皮吸收;且柚皮苷属二氢黄酮类成分,含有 2 个酚羟基,能和氮酮上的羰基形成氢键,不利于柚皮苷从凝胶膏剂中释放出来^[21]。研究显示六白白疤巴布膏^[22]、乳康巴布膏^[23]中加入 3% 氮酮促渗效果最佳,与本文结果一致。而丙二醇组随质量分数增大到 5% 后,继续增大促渗剂质量分数,促渗效果增大不明显,可能与丙二醇稠度较大,加大其用量会增大凝胶的黏稠度,不利于柚皮苷的扩散有关。对于薄荷脑而言,当质量分数增大到 3% 时,反而呈现抑制柚皮苷透皮吸收的行为,与其对芍药苷^[24]、呋塞米^[25]、甲硝唑^[26]的促透行为类似,这可能与皮肤或黏膜的吸收存在饱和现象,或者因薄荷醇质量分数增高而阻塞药物的吸收有关^[25]。本文仅考察了单一促透剂对柚皮苷透皮吸收的促进作用,后续将考察透皮吸收促进剂的组合运用对柚皮苷透皮吸收的不同影响。此外,本方药味较多,后续或将增加其他成分的透皮吸收行为研究。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:239-240.

[2] 李晋玉,徐林,谭荣伟,等. 不同浓度骨碎补总黄酮复合可注射骨修复材料对 MC3T3-E1 成骨细胞作用的实验研究[J]. 生物骨科材料与临床研究,2014,11(2):53-57.

[3] 田永利,许志宇,葛林,等. 6 种补肾中药对骨愈合及活血化痰作用的比较研究[J]. 河北中医,2009,31(9):1376-1378.

[4] 陈海啸,梁军波,伍海昭. 骨碎补总黄酮对去卵巢大鼠腰椎松质骨骨形态计量学参数的影响[J]. 中医正骨,2011,23(4):18-20.

[5] 伍海昭,朱敏,詹红生,等. 骨碎补总黄酮对去卵巢大鼠骨组织 I 型胶原表达及骨代谢的影响[J]. 中医正骨,2014,26(4):11-14.

[6] 谢雁鸣,秦林林,邓文龙,等. 骨碎补总黄酮对成骨细胞体外培养作用的机制研究[J]. 中华中医药杂志,2005,20(3):161-162.

[7] 刘剑刚,谢雁鸣,徐哲,等. 骨碎补总黄酮的活血化痰作用及对实验性微循环障碍和骨质疏松症的影响[J]. 中国骨质疏松杂志,2006,12(1):46-49.

[8] 张军,李浩鹏,杨平林,等. 骨碎补总黄酮含药血清对成骨细胞增殖、分化、周期及凋亡的影响[J]. 中药材,2009,32(7):1090-1093.

[9] 殷方明,肖涟波,张昀. 骨碎补柚皮苷对炎症及骨作用的相关研究进展[J]. 中国骨伤,2015,28(2):182-186.

[10] Jain M, Parmar H S. Evaluation of antioxidative and anti-inflammatory potential of hesperidin and naringin on the rat air pouch model of inflammation[J]. Inflamm Res, 2011,60(5):483-491.

[11] Gopinath K, Sudhandiran G. Naringin modulates oxidative stress and inflammation in 3-nitropropionic acid-induced neurodegeneration through the activation of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 signalling pathway [J]. Neuroscience, 2012, doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.07.060.

[12] 周钰. 超声电导经皮透入微米中药的镇痛机理和应用基础研究[D]. 广州:南方医科大学,2011.

[13] 周钰,黄国志,梁东辉. 超声电导经皮透入微米活血镇痛散治疗兔急性软组织损伤的实验研究[J]. 时珍国医国药,2015,26(3):756-758.

[14] 冯宝民,蒋革,贾景明,等. 柚皮苷和新橙皮苷抗过敏作用的研究[J]. 大连大学学报,2005,26(4):63-64.

[15] 谢仁峰,文双娥,李洋,等. 柚皮苷抗炎镇痛作用的实验研究[J]. 湖南师范大学学报:医学版,2011,8(4):5-8,12.

[16] 李华. 透皮吸收制剂中辅料的应用进展[J]. 华西药理学杂志,2005,20(1):85-87.

[17] 宇克莉,孙建华. 几种透皮吸收促进剂的作用机理探讨[J]. 山东医药,2007,47(11):30-31.

[18] 杜倩,潘金火. 巴布剂的研究进展[J]. 时珍国医国药,2004,15(11):785-786.

[19] 宛超,黄明亚. 月桂氮酮的促渗和抑菌作用研究进展[J]. 中国药房,2013,24(13):1239-1242.

[20] 张韶慧,肖莉,徐建辰,等. 天然透皮吸收促进剂的研究进展[J]. 中国药房,2005,16(4):303-305.

[21] 王晖,许卫铭,冯小龙. 薄荷醇对两种不同性质化合物体外经兔皮吸收的影响[J]. 中国药房,2002,13(3):13-14.

[22] 张伟,高文勇,张云丽,等. 六白白疤巴布膏剂经皮吸收研究[J]. 齐鲁药事,2010,29(12):710-711.

[23] 林桂涛,齐红,盛华刚. 乳康巴布膏体外透皮吸收研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2007,13(3):16-18.

[24] 温亚,韩彬,戴王强,等. 薄荷醇对芍药苷透皮吸收作用的影响[J]. 湖南中医杂志,2014,30(5):128-130.

[25] 王晖,薛漫清. 呋塞米的鼻腔吸收及薄荷醇的促进作用[J]. 中国临床药理学与治疗学,2000,5(1):59-61.

[26] 许卫铭,王晖,王宗锐,等. 不同浓度薄荷醇对甲硝唑透皮吸收的影响[J]. 中药药理与临床,2001,17(3):10-12.

[责任编辑 刘德文]