

清肺通络膏的体外经皮渗透试验考察

张秀英¹, 王雪峰^{2*}, 刘丽¹

(1. 辽宁中医药大学, 沈阳 110032; 2. 辽宁中医药大学附属医院, 沈阳 110032)

[摘要] **目的:**研究清肺通络膏中大黄游离蒽醌类成分的体外透皮吸收特性,考察辅药大蒜对各成分透皮特性的影响。**方法:**以清肺通络膏中主要成分芦荟大黄素、大黄素、大黄酸为指标,采用体外透皮吸收试验及HPLC考察该制剂的体外透皮特性,并评价该制剂不同配伍组中指标性成分的累积透过量及渗透速率。**结果:**大黄素的单位面积累积透皮量及透皮速率最大,芦荟大黄素次之,大黄酸最小;大黄酸的透皮时滞最长(0.419 h),大黄素时滞最短(0.006 h);清肺通络膏中大黄素、大黄酸、芦荟大黄素的体外经皮渗透曲线分别为 $Q = 12.144t - 14.880 (r = 0.97)$, $Q = 10.111t - 3.886 (r = 0.93)$, $Q = 1.389t - 0.583 (r = 0.95)$ 。全方组中大黄素、芦荟大黄素、大黄酸的8 h累积透过量分别为 (86.059 ± 0.168) , (83.079 ± 3.303) , $(12.819 \pm 0.569) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$,透皮速率分别为12.144, 10.111, 1.389 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$,与主药组比较有显著性差异($P < 0.05$)。**结论:**清肺通络膏的体外经皮渗透符合零级动力学过程,大蒜对清肺通络膏中指标性成分的经皮渗透有促进作用。

[关键词] 清肺通络膏;透皮吸收;大黄;大蒜;芦荟大黄素;大黄酸

[中图分类号] R283.6;R945;R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)14-0031-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016140031

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160426.1021.014.html>

[网络出版时间] 2016-04-26 10:21

Investigation of *in Vitro* Transdermal Absorption of Main Ingredients in Qingfei Tongluo Paste

ZHANG Xiu-ying¹, WANG Xue-feng^{2*}, LIU Li¹

(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Shenyang 110032, China;

2. The First Affiliated Hospital of Liaoning University of TCM, Shenyang 110032, China)

[Abstract] **Objective:** To study *in vitro* transdermal absorption characteristics of main ingredients in Qingfei Tongluo paste (QFTLP) and investigate effect of different compatibility on transdermal characteristics of main ingredients. **Method:** Taking main ingredients in QFTLP as indexes, such as aloe-emodin, emodin, rhein, studies were carried out by *in vitro* transdermal absorption test and HPLC. *In vitro* transdermal properties of QFTLP was investigated, cumulative transdermal amount per unit area and transdermal rate were evaluated. **Result:** Cumulative transdermal amount per unit area and transdermal rate of emodin was the largest, followed by aloe-emodin, and rhein was the least. Transdermal time-lag of rhein was the longest (0.419 h), emodin was the shortest (0.006 h). Penetration curve equations of emodin, aloe-emodin and rhein in QFTLP were $Q = 12.144t - 14.880 (r = 0.97)$, $Q = 10.111t - 3.886 (r = 0.93)$, $Q = 1.389t - 0.583 (r = 0.95)$. In overall prescription group, accumulation permeation amounts of emodin, aloe-emodin and rhein in 8 h were (86.059 ± 0.168) , (83.079 ± 3.303) , $(12.819 \pm 0.569) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$, transdermal rates were 12.144, 10.111, 1.389 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$, respectively; they had significant difference ($P < 0.05$) by comparing with main formula group.

[收稿日期] 20150720(025)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81273800)

[第一作者] 张秀英,在读博士,主治医师,从事中医药防治小儿肺炎系疾病研究,Tel:024-31961175,E-mail:pcxtcm@163.com

[通讯作者] *王雪峰,教授,博士生导师,从事中医药防治小儿病毒性疾病研究,Tel:024-31961175,E-mail:lnzyxf@163.com

Conclusion: *In vitro* percutaneous penetration of QFTLP complies with zero-order kinetics. Adjuvant compatibility can promote transdermal absorption of main ingredients.

[Key words] Qingfei Tongluo paste; transdermal absorption; Rhei Radix et Rhizoma; Allii Sativi Bulbus; aloe-emodin; rhein

清肺通络膏由大黄、黄芩、芒硝、大蒜组成,功效清肺泻热、解毒化痰,临床主要用于治疗肺炎迁延不愈、肺部啰音不易吸收的患者^[1]。该疗法作为国家科技部“十五”攻关项目、“十一五”支撑项目及“十二五”行业专项,已经在多家医院儿科得到了临床验证,疗效确切^[2]。本品属于内病外治法范畴,现代研究表明经皮给药系统具有可避免药物首过效应和肠道降解破坏、用药方便、维持有效药物浓度时间长等优点^[3]。目前,清肺通络膏的体外透皮特性及辅药对主要成分的透皮特性的影响尚未进行深入研究,本实验拟采用 HPLC 同时测定芦荟大黄素、大黄素、大黄酸的含量,考察清肺通络膏主要成分的体外透皮特性及辅药对各成分透皮特性的影响,为该制剂的体内药物代谢动力学和新药开发提供参考。

1 材料

LC-20AT 型高效液相色谱仪(日本岛津公司),TF-6 型智能透皮试验仪(天津鑫洲科技有限公司)。大黄素、大黄酸、芦荟大黄素对照品(四川省维克奇生物科技有限公司,批号分别为 131024,131024,131024),清肺通络膏全方[辽宁省中医院院内制剂中心提供,批号辽药制字(2003)Z0012],试剂均为分析纯。

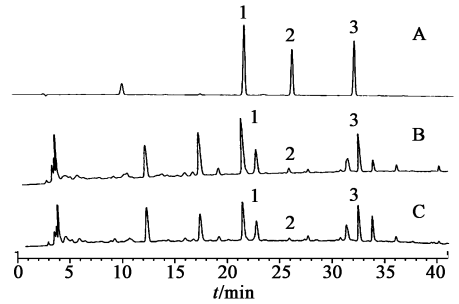
清洁级 Wistar 大鼠,雄性,体重(200 ± 10) g,由辽宁长生生物有限公司提供,许可证号 SYXK(辽)2010-0001。

2 方法与结果

2.1 大黄素、大黄酸、芦荟大黄素的含量测定

2.1.1 色谱条件^[4] Agilent TC-C18 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相 0.2% 甲酸水溶液(A)-甲醇(B)梯度洗脱(0 ~ 40 min, 50% ~ 100% B),检测波长 254 nm,流速 1 mL · min⁻¹,柱温 25 °C,进样量 20 μL。见图 1。

2.1.2 混合对照品溶液的制备 分别精密称取芦荟大黄素、大黄酸、大黄素对照品 2.21, 2.621, 2.312 mg,分别置于 10 mL 量瓶中,加甲醇超声溶解并稀释至刻度,摇匀,精密吸取各对照品溶液 1 mL 置 10 mL 量瓶中,制成质量浓度分别为 22.11, 26.21, 23.12 mg · L⁻¹的混合对照品溶液,置 4 °C 冰箱中保存备用。



A. 对照品; B. 全方供试品; C. 主药供试品; D. 空白样品; 1. 芦荟大黄素; 2. 大黄酸; 3. 大黄素

图 1 清肺通络膏透皮接受液 HPLC

Fig. 1 HPLC of percutaneous absorption liquid of Qingfei Tongluo paste

2.1.3 线性关系考察 分别精密吸取混合对照品溶液 2, 4, 6, 8, 10 mL, 各稀释至 10 mL, 取各稀释液用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 按 2.1.1 项下色谱条件测定, 以进样量为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得芦荟大黄素、大黄酸、大黄素回归方程分别为 $Y = 769.46X + 0.597$ ($r = 0.9999$), $Y = 9451.7X + 20.215$ ($r = 0.9999$), $Y = 3979.8X + 4.439$ ($r = 0.9993$), 线性范围依次为 0.088 ~ 0.442, 0.105 ~ 0.524, 0.092 ~ 0.462 μg。

2.1.4 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液, 按 2.1.1 项下色谱条件连续进样 6 次, 结果芦荟大黄素、大黄酸、大黄素峰面积的 RSD 分别为 0.2%, 0.5%, 0.3%, 表明仪器精密度良好。

2.1.5 稳定性试验 吸取同一供试品溶液, 分别于制备后 1, 2, 4, 6, 8 h 按 2.2.1 项下色谱条件测定, 结果芦荟大黄素、大黄酸、大黄素峰面积的 RSD 分别为 0.3%, 0.5%, 0.4%, 表明供试品溶液在 8 h 内基本稳定。

2.1.6 重复性试验 取同一样品溶液, 平行制备 6 份供试品溶液, 按 2.2.1 项下色谱条件测定, 计算芦荟大黄素、大黄酸、大黄素峰面积的 RSD 分别为 2.1%, 2.0%, 1.5%, 表明该方法重复性良好。

2.1.7 回收率试验 精密量取已测定的样品 9 份, 等分为 3 组, 分别精密加入一定量芦荟大黄素、大黄酸、大黄素混合对照品溶液, 制成低、中、高 3 个质量浓度的溶液, 按 2.1.1 项下色谱条件测定, 计算回收率, 结果见表 1。

表 1 清肺通络膏中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素的加样回收率试验
Table 1 Recovery tests of aloe-emodin, rhein and emodin in Qingfei Tongluo paste

成分	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
芦荟大黄素	17.06	18.46	35.38	99.24	99.47	1.8
	17.08	18.33	35.31	99.45		
	17.12	17.65	34.72	99.72		
	17.04	20.48	37.04	97.66	97.15	1.4
	16.89	20.02	36.13	96.10		
	17.34	20.33	37.20	97.69		
	16.96	22.65	39.00	97.31	98.24	1.2
	18.01	22.38	40.10	98.70		
	17.02	23.84	40.55	98.70		
	16.36	22.25	38.06	97.53	97.15	1.6
大黄酸	16.78	22.86	39.10	97.64		
	15.96	22.89	38.00	96.29		
	16.32	24.21	40.31	99.09	99.02	1.4
	16.34	24.38	40.44	98.85		
	15.99	24.59	40.36	99.11		
	16.16	26.21	42.05	98.78	98.06	1.6
	16.68	26.64	43.00	98.80		
	16.65	26.24	42.00	96.61		
	21.05	20.12	40.86	98.46	98.25	1.8
	22.32	21.01	42.84	97.67		
大黄素	21.02	20.86	41.59	98.61		
	20.84	23.12	43.12	96.37	97.49	1.5
	21.46	23.28	44.29	98.07		
	22.01	23.69	45.23	98.02		
	21.24	25.46	46.42	98.90	98.64	1.3
	22.23	26.86	48.58	98.10		
	21.21	26.97	47.89	98.92		

表 2 清肺通络膏不同配伍组中大黄素、芦荟大黄素、大黄酸透皮吸收情况 (n=6)

Table 2 In vitro transdermal absorption of emodin, aloe-emodin and rhein in different compatibility group of Qingfei Tongluo paste (n=6)

成分	组别	动力学方程	r	透皮速率 / $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$	$Q_{8\text{h}}(\bar{x}\pm s)$ / $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$
大黄素	全方	$Q = 12.144t - 14.880$	0.97	12.144	86.059 ± 0.168
	主药	$Q = 7.659t - 7.606$	0.97	7.659	$51.762 \pm 0.373^{1)}$
芦荟大黄素	全方	$Q = 10.111t - 3.886$	0.93	10.111	83.079 ± 3.303
	主药	$Q = 6.113t - 1.964$	0.99	6.113	$49.719 \pm 7.515^{1)}$
大黄酸	全方	$Q = 1.389t - 0.583$	0.95	1.389	12.819 ± 0.569
	主药	$Q = 0.863t - 0.048$	0.94	0.863	$8.139 \pm 0.328^{1)}$

注:与全方组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

3 讨论

制备离体鼠皮时,毛要刮净,脂肪和皮下组织也要剔除干净,不能损伤鼠皮,尤其是角质层,同时尽

2.2 体外透皮试验

2.2.1 离体皮肤的制备 取 SD 大鼠,按 $25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 腹腔注射苯巴比妥钠的方法麻醉,剥离大鼠腹部皮肤,用生理盐水多次冲洗,直到洗液清澈为止,冻存冰箱保存^[5]。

2.2.2 分组和供试品溶液的检测 设置清肺通络膏全方组和清肺通络膏主药组(不含辅药大蒜,其余与全方组一致)^[6]。采用 TF-6 型智能透皮试验仪,水浴温度 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$,搅拌速度 $350\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,透皮面积 3.40 cm^2 ,接受池体积 17 mL ,接受液为生理盐水-乙醇(70:30)混合液。将皮肤固定于接受池上,精密称取清肺通络膏全方及清肺通络膏主药适量,置于皮肤上,分别于 1,2,4,6,8 h 各取接受液 3 mL (同时补充等量同温介质),经 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,得供试品溶液。按 2.1.1 项下色谱条件测定,计算累积透过量(Q_n)。

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

式中 C_n 为第 n 个取样点的药物质量浓度, C_i 为第 i ($i \leq n-1$) 个取样点的药物质量浓度, V_0 为接收液体积, V 为取样体积, A 为透皮面积。根据 Fick 扩散定律,以 Q 对时间 t 进行回归,得体外透皮动力学方程及透皮速率,直线部分延伸与时间轴相交得截距为时滞。结果显示清肺通络膏全方组中大黄素的 Q 及透皮速率最大,芦荟大黄素次之,大黄酸最小,全方组与主药组比有显著性差异 ($P < 0.05$); 大黄酸的透皮时滞最长 (0.419 h), 大黄素时滞很短 (0.006 h); 大黄素、大黄酸、芦荟大黄素 8 h 内体外经皮渗透 Q 与 t 相关性较好,二者呈线性关系,体外经皮渗透均符合零级动力学过程,见表 2 和图 2。

量使用同一部位的鼠皮,以减少误差。每次要排尽皮肤与接受液间的气泡再加样,以减少气泡对有效透皮面积的影响^[7]。

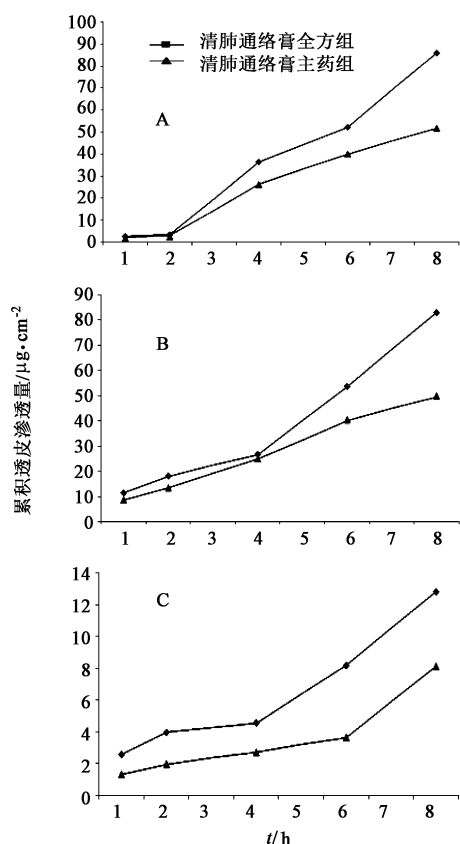


图2 清肺通络膏不同配伍组中大黄素(A),芦荟大黄素(B)和大黄酸(C)的体外渗透曲线(n=6)

Fig. 2 *In vitro* penetration curves of emodin (A), aloec-emodin (B) and rhein (C) in different compatibility group of Qingfei Tongluo paste (n=6)

清肺通络膏由大黄、黄芩、大蒜等组成。大黄味苦性寒,归脾、胃、大肠、肝、心包经,具有清热泻火、解毒、祛瘀等功效。其有效成分包括蒽醌类和二蒽酮类,前者有游离型蒽醌(芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚)与结合型蒽醌2种形式;后者包括大黄二蒽酮A、B、C,掌叶二蒽酮A、B、C和番泻苷A~F等^[8]。有研究显示大黄中蒽醌类成分具有免疫调节、清除氧自由基、抑菌、抗病毒等药理作用^[9-14]。清肺通络膏以大黄为主药,故进行体外透皮吸收试验时以大黄中蒽醌类成分大黄素、芦荟大黄素、大黄酸为观察指标,其他药效成分的透皮特性有待进一步研究。

本文研究结果显示大黄素的 Q 及透皮速率最大,芦荟大黄素次之,大黄酸最小,大黄素、大黄酸、芦荟大黄素8h体外经皮渗透 Q 与 t 相关性较好,均符合零级动力学过程。大蒜具有解毒杀虫之效,通五脏,达诸窍,故将其作为清肺通络膏的辅药。研究表明全方组中大黄蒽醌类成分 Q_{8h} 显著高于主药

组,说明大蒜对大黄蒽醌类成分的透皮吸收有促进作用,体现了辅药在药物治疗中的作用。本文仅探讨了清肺通络膏主要成分的体外渗透情况,下一步将以此为基础研究清肺通络膏主要成分的在体微透析及药物代谢动力学,为该膏剂的开发和临床推广提供参考。

[参考文献]

- [1] 王雪峰,刘芳,董丹,等. 内外合治法治疗小儿肺炎临床疗效评价[J]. 中国中西医结合杂志,2005,25(6): 536-539.
- [2] 魏巍,白晓红,王雪峰,等. 基于临床科研一体化平台儿童肺炎中医内外合治对主症影响的前瞻性研究[J]. 中国中西医结合儿科学,2013,5(4):323-325.
- [3] 平其能. 现代药剂学[M]. 北京:中国医药科技出版社,2001:543.
- [4] 张秀英,王雪峰,孟宪生,等. 正交设计优选敷胸膏的提取工艺[J]. 世界中西医结合杂志,2015,10(4): 496-499.
- [5] 谢彬,王雪峰,王思源. 敷胸方不同剂型的体外透皮吸收效果比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(15):1-3.
- [6] 梁秉文. 中药经皮给药制剂技术[M]. 北京:化学工业出版社,2006:34.
- [7] 白云凤,宫凯敏,王银洁,等. 不同促渗剂对白芥子散贴剂体外透皮吸收效果的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(2):30-32.
- [8] 王哲,许利嘉,何春年,等. HPLC测定不同来源大黄中蒽醌和二蒽酮类成分[J]. 中草药,2011,42(6): 1114-1118.
- [9] 苗戎,陈静. 大黄对体外内毒素诱生的肺泡巨噬细胞分泌功能的影响[J]. 中草药,1998,29(6):395-397.
- [10] 陈季武,胡天喜. 大黄清除活性氧的作用[J]. 中国药理学杂志,1996,31(8):461-463.
- [11] 韦志军,吴先平,甘小亮,等. 大黄素对小鼠缺血再灌注肠黏膜肥大细胞活性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(16):167-170.
- [12] Kauvar L M, Harcourt J L, Haynes L M, et al. Therapeutic targeting of respiratory syncytial virus G-protein[J]. Immunotherapy,2010,2(5):655-661.
- [13] 梁荣感,刘卫兵,李丽亚,等. 大黄蒽醌类化合物体外抗呼吸道合胞病毒作用的研究[J]. 广西医科大学学报,2007,24(2):280-281.
- [14] 梁荣感,罗伟生,李利亚,等. 大黄蒽醌类化合物体外抗流感病毒作用的研究[J]. 华夏医学,2006,19(3): 396-398.

[责任编辑 刘德文]