

合成冰片对复方中药湿疹乳膏体外透皮吸收效果的影响

杨豪杰, 王振宜, 刘华*

(上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院, 上海 200437)

[摘要] **目的:**考察合成冰片对复方中药湿疹乳膏体外释放和透皮吸收行为的影响,探讨该复方组成改良的可行性。**方法:**以离体 BALB/c 裸小鼠皮肤为渗透屏障,采用改良 Franz 垂直扩散池,比较含有合成冰片的复方中药湿疹乳膏和不含合成冰片的复方中药湿疹乳膏的透皮吸收效果,初步评价合成冰片的作用。采用 HPLC 测定透皮接收液中苦参碱的含量,流动相乙腈-水(含 0.05% 三乙胺,磷酸调 pH 3.5)(2:98),检测波长 220 nm。**结果:**含合成冰片乳膏中的苦参碱累积渗透量在给药后的各时间点均高于无冰片乳膏,在 12 h 体外经皮渗透达到稳态。含合成冰片 12 h 累积渗透率 6.37%,不含冰片的则为 4.99%,二者具有显著性差异。**结论:**合成冰片对复方中药湿疹乳膏中苦参碱的透皮吸收具有一定促进作用,可在原复方处方中改良加入合成冰片。

[关键词] 中药; 湿疹; 冰片; 透皮吸收试验; 苦参碱; 生物碱

[中图分类号] R283.6;R944.9;R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)18-0027-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2017180027

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170628.1602.004.html>

[网络出版时间] 2017-06-28 16:02

Effect of Synthetic Borneol on *in Vitro* Percutaneous Absorption of Compound Chinese Medicine Eczema Cream

YANG Hao-jie, WANG Zhen-yi, LIU Hua*

(Yueyang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate effect of borneol on *in vitro* release and percutaneous absorption behavior of compound Chinese medicine eczema cream, and to explore the feasibility of composition improvement of this compound. **Method:** Modified Franz diffusion device was employed with isolated BALB/c nude mice skin as a barrier, *in vitro* percutaneous absorption effectiveness of compound Chinese medicine eczema cream with or without borneol was compared by *in vitro* percutaneous test. HPLC was used to determine the content of matrine with mobile phase of acetonitrile-water (containing 0.05% triethylamine, adjusting pH to 3.5 with phosphoric acid) (2:98) and detection wavelength at 220 nm. **Result:** Cumulative permeation amount of matrine in the cream with borneol at various time points after administration was higher than that in cream without borneol. *In vitro* percutaneous absorption behaviors of matrine in cream with or without borneol were in line with zero-level process, *in vitro* percutaneous penetration in 12 h nearly constant speed. Cumulative permeability of matrine in cream with borneol was 6.37% in 12 h, while that of matrine in cream without borneol was 4.99%. **Conclusion:** Borneol has a certain promoting effect on transdermal absorption of matrine in compound Chinese

[收稿日期] 20170414(009)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81273765);上海市科学技术委员会科技支撑计划项目(12401901700);上海市卫生和计划生育委员会重点项目(201440030)

[第一作者] 杨豪杰, 硕士, 医师, 从事中医肛肠研究, Tel:021-65161782, E-mail: tonyhaojie@163.com

[通讯作者] *刘华, 硕士, 主任医师, 从事肛肠病因与诊疗研, Tel:021-65161782, E-mail: yyluhua@126.com

medicine eczema cremor, and it can be added into the original compound.

[**Key words**] traditional Chinese medicine; eczema; borneol; transdermal absorption test; matrine; alkaloids

复方中药湿疹乳膏是由苦参、胡黄连、蛇床子、菴草 4 味中药制成的复方制剂,具有清热解毒、燥湿止痒的功效,主要用于治疗湿疹。湿疹是由多种内外因素引起的一种具有明显渗出倾向的炎症性皮肤病,伴有明显瘙痒,易复发,严重影响着患者的生活质量^[1]。本方为临床验方^[2],疗效确切。课题组前期对该复方进行了临床前药学部分的研究工作,考虑到临床用药的需要,结合该处方用药的性质,确定剂型为软膏剂。然而除了改变剂型,进一步提高该制剂中药物有效成分的透皮吸收依然是课题组的研究重点。

冰片味辛、苦,性微寒,归心、脾、肺经,能抗菌、止痒,还具有引药由肌表直达凑理的功效^[3],作为佐使药广泛应用于临床。近年研究发现冰片可通过改变脂质分子的排列和增加其流动性,增加完整皮肤及其去角质层皮肤的贮库效应^[4-5]等机制促进其他药物透皮吸收。因此,充分利用冰片来提高药物生物利用度,进而提高药物治疗效果,具有非常重要的临床意义。冰片有天然冰片和合成冰片之分,天然冰片主要成分为右旋龙脑(梅片)或左旋龙脑(艾片);合成冰片为消旋体,主含龙脑和异龙脑^[6]。合成冰片生产工艺成熟、成本低廉,且异龙脑和樟脑含量较高^[7],已被广泛用于中成药的生产。目前,关于冰片促透作用的研究已有较多报道,但冰片对苦参碱的作用鲜有报道。本实验以君药苦参中苦参碱为指标,比较合成冰片对复方中药湿疹乳膏体外释放和透皮吸收行为的影响,探讨该复方组成改良的可行性,以提高该制剂的生物利用度,为后续放大研究试验提供基础数据。

1 材料

TT-6B 型透皮吸收试验仪(天津正通科技有限公司, Franz 扩散池,容积 5 mL,内径 9.0 mm), ME155DU 型 1/10 万电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司), LC-20AD 型高效液相色谱仪(日本岛津公司)。复方中药湿疹乳膏(上海中药制药技术有限公司,无冰片、含冰片的批号分别为 141001, 141002),合成冰片(上海中药制药技术有限公司,经上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院药剂科王凌主任药师鉴定,符合 2015 年版《中国药典》的相关要求),苦参碱对照品(中国食品药品检定研究

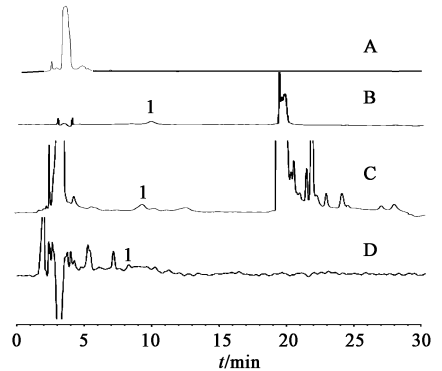
院,批号 110805-200507,纯度 98%),乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

清洁级 4 周龄 BALB/c 裸小鼠,雄性,体重 12 ~ 16 g,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,合格证号 SCXK(沪)2012-0002,于上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院动物中心饲养。经上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院实验动物管理委员会,实验动物保护、福利、伦理领导小组批准,伦理号 15625。

2 方法与结果

2.1 苦参碱的含量测定

2.1.1 色谱条件 VP-ODS C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-水(含 0.05% 三乙胺,磷酸调 pH 3.5)(2:98),流速 1.2 mL·min⁻¹,柱温 25 °C,检测波长 220 nm,进样量 20 μL。见图 1。



A. 阴性样品; B. 对照品; C. 无冰片乳膏样品(甲醇溶解); D. 透皮吸收样品(无冰片, PBS 溶解); 1. 苦参碱

图 1 复方中药湿疹乳膏的 HPLC

Fig. 1 HPLC of compound Chinese medicine eczema cremor

2.1.2 对照品储备液的制备 精密称取苦参碱对照品 3.11 mg,置 10 mL 量瓶中,用甲醇定容至 10 mL,制成 311 mg·L⁻¹储备液。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密称取复方中药湿疹乳膏(无冰片、含冰片)样品各 3.0 g,分别置于 10 mL 量瓶中,加甲醇定容,超声(功率 250 W,频率 33 kHz,下同)30 min,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,得样品溶液。按复方中药湿疹乳膏处方,制备不含苦参的样品,精密称取 3.0 g,置于 10 mL 量瓶中,加甲醇定容,超声 30 min,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,得阴性样品溶液。

2.1.4 标准曲线的绘制 精密称取 311 mg·L⁻¹苦

参素对照品储备液适量,分别加甲醇稀释,得质量浓度为 311,155.5,62.2,31.1,12.44 mg·L⁻¹ 的系列对照品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件测定,以峰面积对质量浓度作线性回归,得回归方程 $Y = 0.2203X + 4.7531$ ($r = 0.9998$),确定线性范围 12.44 ~ 311 mg·L⁻¹。

2.1.5 精密度试验 精密吸取低、中、高 3 个质量浓度的苦参碱对照品溶液,各重复进样 3 次,测定苦参碱的日内精密度。结果苦参碱峰面积的 RSD 分别为 3.3%,0.8% 和 2.2%。精密吸取低、中、高 3 个质量浓度的苦参对照品溶液,每日进样 1 次,连续 3 d,考察苦参碱的日间精密度。结果苦参碱峰面积的 RSD 分别为 3.7%,4.4% 和 1.1%。

2.1.6 重复性试验 精密称取复方中药湿疹乳膏(无冰片)样品 3.0 g,按 2.1.3 项下方法制备样品溶液,平行操作 6 次,按 2.1.1 项下色谱条件测定,计算苦参碱质量分数 0.236 mg·g⁻¹,RSD 2.6%,表明该测定方法重复性良好。

2.1.7 稳定性试验 精密称取复方中药湿疹乳膏(无冰片)样品 3.0 g,按 2.1.3 项下方法制备样品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件分别于 0,1,2,4,6,8 h 进样测定,计算苦参碱峰面积的 RSD 6.0%,说明该测定方法稳定性良好。

2.1.8 加样回收试验 精密称量已知含量的复方中药湿疹乳膏(无冰片)乳膏样品 6 份,分别加入等量 155.5 mg·L⁻¹ 苦参碱对照品溶液,用甲醇定容至 10 mL,超声溶解 30 min,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,按 2.1.1 项下色谱条件测定。计算苦参碱的平均加样回收率 95.6% (RSD ≤ 1.2%)。

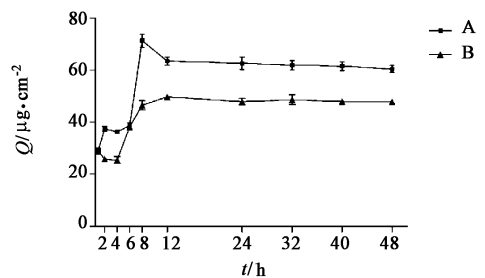
2.2 离体皮肤的制备 将 4 周龄的 BALB/c 裸小鼠颈椎脱臼处死,立即剥离腹部及背部皮肤,刮除皮下组织,用生理盐水洗净,-80 °C 冰箱中保存备用。

2.3 离体透皮试验 取备用鼠皮于 37 °C 生理盐水中解冻,解冻后固定在扩散池上(有效透过面积 2.54 cm²),角质层面向供给室,精密称取复方中药湿疹乳膏(含冰片、不含冰片)各 3.0 g,置于 Franz 扩散池供给室,接收室装满预先加热至 37 °C 的磷酸盐缓冲液(PBS),用于补液的 PBS 置于 37 °C 水浴锅中恒温储存,将透皮扩散池置于药物透皮扩散试验仪中,每个样品分别设置 3 个池,转子转速设定 300 r·min⁻¹,温度设定(37 ± 1) °C,透皮吸收取样时间点分别为 1,2,4,6,8,12,24,32,48 h,每次取接收液 1 mL 并补足接收室接收液,接收液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液进行 HPLC 分析。计算累

积渗透量(Q_n)。

$$Q_n = V_0 C_n + \sum_{i=1}^{n-1} V_i C_i$$

式中 Q_n 为第 n 个取样点的累积渗透量, C_n 和 C_i 分别为第 n 个和第 i ($i \leq n-1$) 个取样点的苦参碱的质量浓度。 V_0 为接受液的体积 7.8 mL, V_i 为取样的体积 1.0 mL。见图 2。结果显示给药后 12 h 体外经皮渗透达到稳态。给药后 2,4,8,12 h,含合成冰片乳膏中的苦参碱累积渗透量高于无冰片乳膏,两者差异具有统计学意义($P < 0.05$);给药后 1,6 h 两者差异无统计学意义。计算 12 h 累积透过率,含冰片透过 6.37%,不含冰片透过 4.99%。结果提示含冰片的乳膏中苦参碱能够透过皮肤,说明冰片对苦参碱的透皮效果具有一定的促进作用,复方组成改良可行。



A. 含冰片; B. 无冰片

图 2 复方中药湿疹乳膏中苦参碱累积透过曲线($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Cumulative permeation curves of matrine in compound Chinese medicine eczema cream ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3 讨论

历代医家认为冰片“独行则势弱,佐使则有功”,常将其作为佐药用于临床。现代研究发现冰片可导致皮肤超微结构改变,表现为角质细胞疏松、细胞间隙增大、毛囊口径加宽,表明其对药物的透皮吸收有协同作用^[5]。因此冰片作为一种促透剂,具有起效快、效果好、副作用小等特点^[8],已被广泛用于局部皮肤制剂^[9]。研究证实合成冰片与天然冰片均具有促透作用,但合成冰片效果更佳^[10-12]且成本较低,是中药复方改良的理想药物选择。本研究结果表明合成冰片能明显提高中药复方乳膏中有效成分的体外鼠皮渗透效果,与已报道的冰片对鼠皮渗透影响结果相一致^[13-15]。研究结果提示给药后 8 h 效果达到峰值,之后逐渐下降,12 h 体外经皮渗透达到稳态,累积透过率 6.37%,显著高于不含冰片的乳膏($P < 0.05$)。但这一研究结果尚缺少相关数据对比,需进一步验证。此外,在前期研究中,课题组检测了合成冰片对传统汤剂中苦参碱体外透

皮效果的影响,该有效成分 12 h 累积透过率 2.24%。这可能与苦参碱脂溶性较差、透皮吸收效果不好有关^[16]。

苦参生物碱是复方中药湿疹乳膏方中的重要有效成分,本研究主要考察了苦参生物碱的皮肤渗透性。在其含量测定指标的选择上,预试验共同检测了苦参碱及氧化苦参碱。在考察过程中,发现供试品色谱中,在与氧化苦参碱对照品相应的出峰时间处几乎不含氧化苦参碱峰,可能是在提取过程中,样品中的氧化苦参碱已经转化成了苦参碱。故最终选择苦参碱作为检测指标。见图 3。

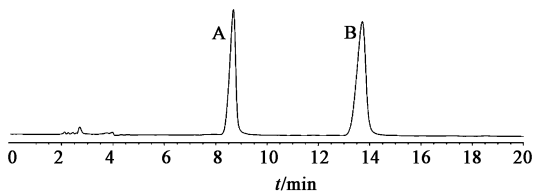


图 3 苦参碱(A)和氧化苦参碱(B)对照品的 HPLC
Fig. 3 HPLC of matrine (A) and oxymatrine (B) reference substances

HPLC 测定过程中,提取方法、提取溶剂及提取时间的选择对整个试验的结果影响较大。预试验中以 2015 年版《中国药典》推荐的方法测定苦参碱含量^[17],但操作繁琐,过程容易出差错,且成本高,因此最终研究选择 2.1.3 项下方法进行供试品的处理。研究分别采用超声 15,30,45 min 进行样品处理,并测定苦参碱的含量,结果发现超声 30 min 已经将苦参碱含量全部提尽,故选择超声时间 30 min。

离体透皮试验是应用较广、实用性和普及性较好的透皮吸收质量控制方法,但是其对某些微量药物或者难溶性药物不易测定^[18]。若要进一步评价复方中药湿疹乳膏(含冰片)的透皮吸收效果,需通过在体透皮试验检测血药浓度和皮肤滞留药物浓度。然而大量合成冰片的毒理学研究数据显示其具有神经毒性和生殖毒性^[19],使用长期储存的合成冰片存在更大的安全隐患^[20]。因此,在体动物试验需要更多关注用药合理性和安全性,以降低复方中药湿疹乳膏(含冰片)的临床用药风险。目前,国内外对冰片促透作用的研究已有较多报道,但冰片对苦参碱的促透作用的报道较少,研究结果具有一定的创新性及应用价值。然而不同种类及不同剂量的冰片对苦参碱促透作用仍未明确。中药复方作用机制复杂,冰片对方中其他中药有效成分是否具有促透作用,他们之间是否相互影响仍有待进一步研究确认。

[参考文献]

[1] 中华医学会皮肤性病学会免疫学组. 湿疹诊疗指南(2011 年)[J]. 中华皮肤科杂志, 2011, 44(1): 5-6.
[2] 刘丹, 刘华. 夏氏除湿止痒软膏治疗湿热型肛周湿疹 30 例[J]. 中国中医药现代远程教育, 2015, 13(8): 39-41.
[3] 邓博, 贾立群, 邓超. 不同寒热属性中药透皮及促透作用的研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(1): 16-19.
[4] 梁诗婷, 邢丹丹, 梁红萍. 复方丹酚滴丸中冰片对丹酚酸大鼠在体肠吸收特性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(12): 98-101.
[5] 翟志慧, 沈琦. 冰片对药物吸收影响机理研究进展[J]. 现代中药研究与实践, 2010, 24(5): 86-88.
[6] 周志彬. 几种冰片的区分[J]. 中国药业, 2006, 15(9): 57.
[7] 曾池清, 何贵锋. 十批市售冰片的 GC-MS 分析[J]. 中药材, 2004, 27(5): 347.
[8] 黄聪, 王建, 文静, 等. 冰片的妊娠禁忌及现代研究进展[J]. 中药与临床, 2015, 6(4): 54-57.
[9] 魏雪芳, 陈杰. 冰片提高生物利用度的研究进展[J]. 中草药, 2005, 36(7): 1106-1108.
[10] 胡利民, 樊官伟, 高秀梅, 等. 天然冰片、合成冰片对大鼠胃黏膜屏障影响的比较[J]. 天津中医药大学学报, 2005, 24(3): 123-125.
[11] 陆洋, 杜守颖, 姚宗玲, 等. 天然冰片、合成冰片对槲子提取物黏膜促渗作用研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(10): 1207-1210.
[12] 雷玲, 白筱璐, 余悦, 等. 三种冰片促肠吸收的比较研究[J]. 中药药理与临床, 2015, 31(6): 84-87.
[13] 王曙东, 刘文雅, 王争, 等. 不同促渗剂对复方红茴香喷雾剂体外透皮吸收的影响[J]. 南京中医药大学学报: 自然科学版, 2015, 31(1): 84-86.
[14] 高振坤, 王兰, 王建存. 姜黄素体外经皮渗透性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(2): 39-41.
[15] 李熙, 刘玉亭, 吴淑梅, 等. 青藤碱微乳体外透皮特性的研究[J]. 中成药, 2008, 30(8): 1119-1122.
[16] 彭程, 胡晋红, 朱全刚, 等. 苦参方凝胶离体透皮吸收研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(18): 1870-1874.
[17] 田娟, 王智民, 王维皓. HPLC 测定苦参药材中苦参碱和氧化苦参碱的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(2): 23-24.
[18] 张星一. 透皮吸收促进剂在经皮给药系统中的质控和评价方法[J]. 中国新药杂志, 2010, 19(4): 273-276.
[19] 路艳丽, 耿兴超, 汪巨峰, 等. 冰片的安全性评价研究现状[J]. 中国新药杂志, 2016, 25(6): 645-649.
[20] 吴畏, 郭俊华, 马红梅, 等. 中药冰片储存时转化为樟脑的实验观察[J]. 现代中药研究与实践, 2010, 24(5): 81-82.

[责任编辑 刘德文]