

白花蛇舌草中熊果酸的透皮吸收试验

努尔拉江·帕合尔丁¹, 吐鲁洪·卡地尔², 沈腾^{3*}, 西尔艾力·吐尔逊²

(1. 新疆维吾尔自治区维吾尔医医院, 乌鲁木齐 830049;

2. 新疆维吾尔自治区维吾尔医药研究所, 乌鲁木齐 830049; 3. 复旦大学药学院, 上海 200032)

[摘要] 目的: 考察白花蛇舌草中熊果酸的透皮吸收特性。方法: 采用 HPLC 测定熊果酸含量。选择 SD 大鼠背部皮肤, 通过 Franz 垂直扩散池考察熊果酸的透皮性能, 并考察氮酮 (azone)、桉叶油、冰片、白花蛇舌草水提取物和醇提取物对熊果酸透皮吸收的影响。结果: 熊果酸很难透过皮肤, 需加入透皮吸收促进剂才能有效地透过皮肤。不同质量分数促进剂对熊果酸促透作用顺序为 5% 醇提取物 > 5% 醇提取物 + 2% 冰片 > 5% 水提取物 > 2% azone + 10% 丙二醇 (PG) > 2% 桉叶油 > 4% azone > 3% 桉叶油 > 2% azone > 1% azone。结论: Azone 和桉叶油是白花蛇舌草中熊果酸的良好促透剂, 复方水提取物和醇提取物具有协同促透的作用。

[关键词] 白花蛇舌草; 熊果酸; 透皮吸收; 促进剂

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)12-0049-04

[doi] 10.11653/syfy2013120049

Transdermal Absorption Test of Ursolic Acid in *Hedyotis diffusa*

NURULLA Pahirdin¹, TURGHUN Kadir², SHEN Teng^{3*}, XIERAILI Tuerxun²

(1. Xinjiang Uighur Medical Hospital, Urumqi 830049, China;

2. Institute of Traditional Uyghur Medicine, Urumqi 830049, China;

3. College of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 200032, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate transdermal absorption characteristics of ursolic acid in *Hedyotis*

[收稿日期] 20121127(006)

[基金项目] 上海市科学技术委员会中药现代化专项(07DZ19713); 国家重大科技专项(2009ZX09310-006)

[第一作者] 努尔拉江·帕合尔丁, 主管药师, 学士, 从事中药、民族药有效成分分离测定及药物质量标准的研究, Tel: 13899918109, E-mail: pamir3206@sina.com

[通讯作者] * 沈腾, 博士, 讲师, 从事药剂学研究, E-mail: shenteng@fudan.edu.cn

[3] 牙启康, 卢文杰, 刘布鸣, 等. 岗松化学成分的研究

[J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20(4): 641.

[4] 卢文杰, 牙启康, 陈家源, 等. 岗松中的一个新黄酮醇

苷类化合物[J]. 药学学报, 2008, 40(10): 1032.

[5] 陈家源, 牙启康, 卢文杰. 等. 岗松化学成分的研究

[J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20(5): 827.

[6] 陈明生, 刘布鸣, 林霄, 等. 岗松中杨梅素的含量测定

[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(11): 2771.

[7] 林霄, 刘布鸣, 陈明生. 高效液相色谱法测定岗松中

槲皮素的含量[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(1): 102.

[8] 吴伟, 崔光华. 星点设计-效应面优化法及其在药学中

的应用[J]. 国外医学: 药学分册, 2000, 27(5): 292.

[9] 谢臻, 陈勇, 曾海生, 等. 星点设计-响应面法优选地桃

花中总黄酮的提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,

2011, 17(12): 27.

[10] 刘常青, 谢友良, 赖小平. 星点设计-效应面法优选青

天葵总黄酮提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,

2012, 18(12): 24.

[11] 王国华, 张保献, 聂其霞, 等. 星点设计-效应面法优化

荷叶中荷叶碱与荷叶黄酮的提取工艺[J]. 中国中药

杂志, 2008, 33(20): 2332.

[责任编辑 全燕]

diffusa. **Method:** The content of ursolic acid was determined by HPLC. Utilized skin on the back of SD rats, Franz vertical diffusion cell was adopted to investigate transdermal performance of ursolic acid, and effect of azone, eucalyptus oil, synthetic borneol, water extract and alcohol extract of *H. diffusa* on transdermal performance of ursolic acid was investigated. **Result:** Ursolic acid was difficult to penetrate the skin, it must be added to certain transdermal absorption enhancer. Effect of enhancers on ursolic acid was in order of 5% ethanol extract > 5% ethanol extract + 2% borneol > 5% water extract > 2% azone + 10% PG > 2% eucalyptus oil > 4% azone > 3% eucalyptus oil > 2% azone > 1% azone. **Conclusion:** Azone and eucalyptus oil was good penetration enhancers for ursolic acid in *H. diffusa*, compound water extract and ethanol extract had a collaborative effect in promoting penetration.

[**Key words**] *Hedyotis diffusa*; ursolic acid; transdermal absorption; accelerating agent

经皮给药系统又称经皮治疗系统(TTS),系指在皮肤表面给药,具有起效快、效果好、副作用小等优点,但会受到皮肤角质层的屏障作用及药物本身物理化学性质如相对分子量、熔点、极性等影响,一定程度上影响了该制剂的临床推广。

熊果酸又名乌索酸、乌苏酸,属五环三萜类化合物,具有增强免疫、降血糖、抗病毒和抗肿瘤等药理作用^[1-6],主要分布于女贞子、山楂、白花蛇舌草等植物中,并以游离形式或结合成糖苷形式存在。其主要通过诱导细胞凋亡、抑制肿瘤细胞增殖、抗血管生成、抗促癌和抗突变及抗氧化等作用来抑制肿瘤生长和扩散。1990 年日本将熊果酸列为最有希望的癌化学预防药物之一^[7-9]。本实验根据现代经皮给药理论,选择白花蛇舌草中抗肿瘤活性成分熊果酸为透皮吸收模型^[10-12],考察其透皮特性及透皮吸收促进剂对熊果酸透皮吸收的影响。

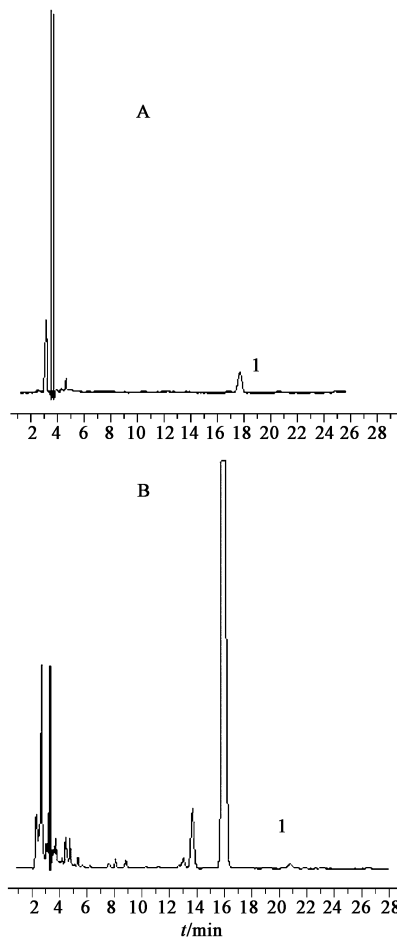
1 材料

岛津 LC-10AD 型高效液相色谱仪(日本岛津公司),Caiesil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),TGL-16C 型台式离心机(上海离心机研究所),DZF-6050 型真空干燥箱(上海精宏实验设备有限公司),BP221S 型电子分析天平(德国赛多利斯公司),TK-6A 型透皮扩散试验仪(上海楷凯科技有限公司)。

SD 大鼠(雌性,7~8 周龄,复旦大学药学院实验动物中心提供,动物许可证号 2007000510959),熊果酸对照品(上海东方药品科技实业有限公司,批号 798-9202),桉叶油(上海日用品有限公司),氮酮(azone,南京龙潭精细化工厂),油酸(中国医药上海化学试剂公司),丙二醇(PG,上海华东试剂工业供销公司),白花蛇舌草饮片(上海市华宇药业有限公司,批号 080211,经作者鉴定为茜草科植物白花蛇舌草 *Hedyotis diffusa* Willd. 的干燥全草),甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[13-16] Caiesil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-水(90:10,用磷酸调 pH 3.0),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 203 nm,柱温(30 ± 0.1) °C,检测波长 203 nm,见图 1。



A. 对照品; B. 供试品; 1. 熊果酸
图 1 熊果酸皮肤渗透液 HPLC

2.2 标准曲线的制备 精密称取熊果酸对照品 5.0 mg,置于 10 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻

度。精密吸取该溶液 0.1, 0.16, 0.2, 0.32, 0.4 mL 于 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 制成 5, 8, 10, 16, 20 mg·L⁻¹ 的系列对照品溶液。按上述色谱条件各进样 20 μL, 以峰面积为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 得回归方程 $Y = 6\,563.6X - 4\,388.1$ ($R^2 = 0.9994$), 线性范围 5 ~ 20 mg·L⁻¹。

2.3 精密度试验 精密量取 5, 10, 20 mg·L⁻¹ 3 个质量浓度得熊果酸对照品溶液适量, 每个质量浓度取 3 个样品, 按 HPLC 条件进样, 测定熊果酸含量, 于 1 d 内重复测定 3 次, 计算日内精密度分别为 1.97%, 0.38%, 0.29%; 每日测定 1 次, 连续测定 3 d, 计算日间精密度分别为 1.30%, 0.77%, 0.85%。

2.4 体外透皮试验 于冰箱中取出备用皮肤, 自然解冻, 将皮肤固定于 Franz 垂直扩散池上(扩散池和接受池直径 1.844 cm, 面积 2.671 cm²), 使角质层面向上, 用弹簧夹固定, 在供给池中加入一定量供给液, 接受池中加入接收液 6.5 mL。再将 Franz 扩散池置于 TK-6A 型透皮扩散仪上, 水温 (37 ± 0.2) °C, 磁力搅拌子以 150 r·min⁻¹ 的速度搅拌, 分别于每 2 h 取出接收池中接收液 0.5 mL, 并立即补加等量的新鲜接收介质。将取出的接收液以 8 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液, 测定。

2.5 熊果酸体外透皮特性及其透皮促进剂考察 精密称取熊果酸 5.7 mg, 用 60% 乙醇配制成质量浓度约 1 g·L⁻¹ 的熊果酸溶液作为供给液, 考察透皮促进剂时, 以此供给液配制不同质量浓度的透皮促进剂溶液, 接受液为 60% 乙醇。按 2.4 项下方法进行透皮吸收研究, 测定接受液中熊果酸含量。2% azone 对熊果酸的促透效果最佳^[17], PG 被广泛作为助渗剂^[18], 在预试验基础上, 分别考察 1% azone, 2% azone, 4% azone, 2% azone + 10% PG, 1% 桉叶油, 2% 桉叶油, 3% 桉叶油, 5% 水提物, 5% 醇提物, 5% 醇提物 + 2% 冰片为透皮促进剂对熊果酸透皮的影响, 每隔一定时间测定熊果酸的单位面积透过量, 计算透皮参数^[19-20], 结果见表 1 和图 2 ~ 4。

由图 3 可知, 1% azone, 2% azone 和 4% azone 对熊果酸均具有明显的促渗作用, 且符合零级方程, 其中 2% azone 促透作用最强^[21]。2% azone 和 10% PG 合用的促透作用又明显优于 2% azone ($P < 0.05$)。由图 4 可知, 1% 桉叶油、2% 桉叶油、3% 桉叶油对熊果酸均具有明显的促渗作用, 且符合零级方程, 其中 2% 桉叶油促透作用最强。由图 5 可知, 加入提取物后, 熊果酸的透皮速率明显提高, 且 5% 醇提物组优于 5% 水提物组, 说明复方

表 1 不同促进剂对熊果酸透皮吸收的影响

促进剂	渗透量 /μg·cm ²	透皮速率 /μg·cm ² ·h	t _{lag} /h	渗透系数 × 10 ⁻³ /cm·h
对照组	0	0	0	0
1% azone	15.55 ± 0.72	0.618	9.431	0.852
2% azone	18.14 ± 0.58	0.763	11.071	1.051
4% azone	22.72 ± 1.36	0.987	12.995	1.359
2% azone + 10% PG	25.92 ± 1.63	1.143	11.989	1.575
1% 桉叶油	14.78 ± 0.74	0.651	12.495	0.897
2% 桉叶油	23.53 ± 1.43	1.068	12.504	1.470
3% 桉叶油	19.15 ± 1.12	0.859	12.501	1.184
5% 水提物	97.58 ± 5.24	4.143	7.067	6.413
5% 醇提物	139.41 ± 6.27	6.123	8.576	9.477
5% 醇提物 + 2% 冰片	129.43 ± 6.47	5.520	8.789	9.008

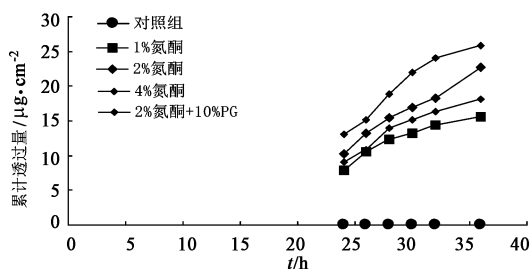


图 2 氮酮对熊果酸透皮吸收的影响

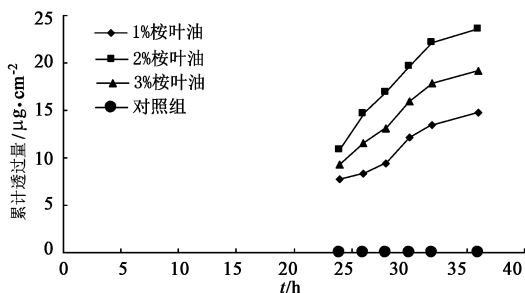


图 3 桉叶油对熊果酸透皮吸收的影响

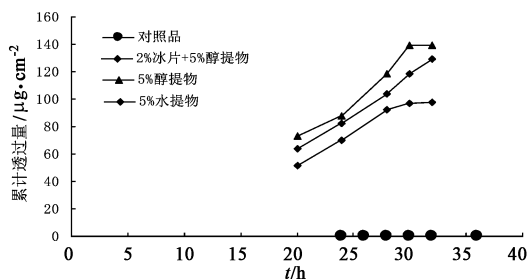


图 4 提取物对熊果酸透皮吸收的影响

配伍对熊果酸的透过具有明显促进作用,且符合零级方程;5%醇提物组与5%醇提物+2%冰片组比较,后者的促透作用无明显提高,且有轻微的抑制作用。

3 讨论

Azone 由亲脂链和环状内酰胺基团两部分组成,其促透机制为内酰胺基团与角质层的脂质双分子层的极性端相互作用,而烷基链插入了脂质链中亲脂性更强的区域,使其致密性改变,增加脂质的流动性,从而改善皮肤角质层的通透性,降低药物的扩散阻力^[22]。本实验研究发现,当各促透剂单独使用时促进作用不明显,有时反而阻滞药物的透过,常与 azone 合用作为协同促进剂;2% azone 和 10% PG 合用对熊果酸的促透作用明显高于 2% azone。综上所述,2% azone + 10% PG 对熊果酸的促透效果最佳,同时复方配伍对熊果酸的促透作用又明显高于一般的透皮吸收促进剂。

[参考文献]

[1] Waltera K A, Hadgraft J. Pharmaceutical skin penetration enhancement [M]. New York, Marcel Dekker, 1993:456.

[2] 何威,陈海燕. 氮酮对班布特罗透皮吸收的促透作用研究[J]. 华西药学杂志, 2004, 19(1):41.

[3] 韩永龙, 王建明, 李士峰, 等. 中药透皮吸收促进剂研究进展[J]. 中医药信息, 2007, 24(2):23.

[4] 王苹. 中医药对乳腺增生病研究的现状与展望[J]. 福建中医学院学, 2002, 12(1):61.

[5] 张贵平, 黎银燕, 吕嘉春, 等. 熊果酸对乳腺癌细胞 Caspase-3 和 PARP 表达的影响[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(2):141.

[6] 陈信义, 高志捷, 王玉芝. 薯蓣皂苷抗移植性小鼠乳腺癌作用的研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2005, 12(5):23.

[7] 芦柏震, 林能明, 何晓波, 等. 白花蛇舌草在我院抗肿瘤治疗中的应用分析[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(18):1150.

[8] 刘义芬, 陈章生. 单味夏枯草治疗乳腺增生病 32 例临床观察[J]. 时珍国医国药, 1999, 10(10):772.

[9] 方岩雄, 张永成, 陈敏敏, 等. 抗肿瘤药物白花蛇舌草及其活性成分[J]. 中成药, 2004, 26(7):577.

[10] Li R, Zhao H R, Li Y M. Anti-tumor effect and protective effect on chemotherapeutic damage of water soluble

extracts from hedyotis diffusa [J]. J Chin Pharm Sci, 2002, 11(2):54.

[11] Horikawa K, Mohri T, Tanaka Y, et al. Moderate inhibition of mutagenicity and carcinogenicity of benzo [a] pyrene. 1, 6-dinitropyrene and 3, 9-dinitrofluoranthene by Chinese medicinal herbs [J]. Mutagenesis, 1994, 9(6):523.

[12] 白向阳. 川乌的毒性与抗肿瘤作用概述[J]. 实用中医药杂志, 2005, 21(2):125.

[13] Xie Y, Jiang Z H, Zhou H, et al. Simultaneous determination of six Aconitum alkaloids in proprietary Chinese medicines by high-performance liquid chromatography [J]. Chromatogr A, 2005, 1093(1/2):195.

[14] 赵世萍, 陈玉武, 付桂香. 高压液相色谱法测定夏枯草中熊果酸的含量[J]. 中日友好医院学报, 1996, 10(3):201.

[15] 周刚, 葛斌, 唐星. 高效液相色谱法测定咳喘宁胶囊中薯蓣皂苷元的含量[J]. 中国中医杂志, 2002, 27(8):625.

[16] 李文兰, 王艳萍, 季宇彬, 等. 渗透促进剂对川乌总生物碱和新乌头碱透皮吸收的影响[J]. 中国药学杂志, 2007, 42(17):1316.

[17] 朱倩云, 李筱青, 李成网. 氮酮对如意金黄乳膏体外透皮吸收的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(20):24.

[18] OH S Y, JEONG S Y, PARK T G, et al. Enhanced transdermal delivery of AZT (Zidovudine) using iontophoresis and penetration enhancer [J]. J Control Release, 1998, 51:161.

[19] 郑梁元, 平其能. 促透剂对水合肼脂类热转变影响的差示扫描热分析研究[J]. 中国药科大学学报, 1994, 25(2):92.

[20] 张志燕, 平其能, 达尤阿博杜拉. 用类脂液晶研究桉叶油的透皮促透机理[J]. 中国药科大学学报, 1998, 29(1):31.

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

[22] Pilgram G S K, Van Der Meulen J, Gooris G S, et al. The influence of two azones and sebaceous lipids on the lateral organization of lipids isolated from human stratum corneum [J]. Biochim Biophys Acta Biomembr, 2001, 1511(2):244.

[责任编辑 仝燕]