

骨愈方中羟基红花黄色素 A 的体外透皮性能考察

温然¹, 郝博², 高瑛^{3*}, 陆洋¹, 李慧云¹, 赵雪姣¹

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102;

2. 国家药典委员会, 北京 100061; 3. 北京市顺义区中医医院, 北京 101300)

[摘要] **目的:** 研究骨愈方中羟基红花黄色素 A 的体外透皮释药情况。**方法:** 采用垂直式 Franz 扩散池进行小鼠离体皮肤透皮吸收试验, 以羟基红花黄色素 A (HSYA) 含量为指标, 考察乙醇体积分数和药物浓度对 HSYA 透皮性能的影响。**结果:** 药液质量浓度和乙醇体积分数的增加均有利于 HSYA 透过皮肤; 选择生药质量浓度 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 乙醇体积分数 70%。**结论:** 70% 乙醇可显著促进 HSYA 的皮肤透过作用, 为骨愈搽剂的制备提供参考。

[关键词] 骨愈方; 羟基红花黄色素 A; 透皮吸收

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)12-0040-03

[doi] 10.11653/syfy2013120040

Investigation of *in vitro* Transdermal Property of Hydroxysafflor Yellow A in Guyu Prescription

WEN Ran¹, HAO Bo², GAO Ying^{3*}, LU Yang¹, LI Hui-yun¹, ZHAO Xue-jiao¹

(1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;

2. Chinese Pharmacopoeia Commission, Beijing 100061, China;

3. Shunyi Traditional Chinese Medicine Hospital, Beijing 101300, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate *in vitro* transdermal behavior of hydroxysafflor yellow A (HSYA) in Guyu prescription. **Method:** Percutaneous absorption test was performed on excised mice skin in Franz diffusion cell, with the content of HSYA as index, effect of the concentration of ethanol and drug on transdermal property of HSYA was investigated. **Result:** The accumulation skin permeation ratio of HSYA with 20% ethanol, 50% ethanol and 70% ethanol were 1.26%, 1.69%, 5.28%, respectively; And results of 0.5, 1, 2 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ of drug solution were 1.06%, 1.26%, 1.50%, respectively. Increasing of the concentration of ethanol and drug solution were conducive HSYA through skin; the concentration of $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ and 70% were selected. **Conclusion:** 70% ethanol could significantly promote transdermal property of HSYA, it could provide a reference for preparing Guyu liniments.

[Key words] Guyu prescription; hydroxysafflor yellow A; percutaneous absorption

骨愈方处方来源于北京中医医院骨外科临床经验方, 由红花、艾叶等 6 味中药组成, 具有活血化瘀

止痛的功效, 临床用于跌打损伤等症, 拟将其制成搽剂, 以便于患者用药。搽剂系指药物用乙醇、油或适当溶剂制成的溶液、乳状液或混悬液, 供无破损皮肤揉擦用的液体制剂。该制剂除红花中羟基红花黄色素 A (HSYA) 成分明确外, 其他药材中无明确指标成分, 且红花为君药, 其活血化瘀的有效成分 HSYA 具有扩张周围血管、降低血压、抗血小板和抗心肌缺血等作用^[1], 因此选择 HSYA 为指标, 考察含醇量及药物浓度对该制剂透皮性能的影响, 为骨愈搽剂

[收稿日期] 20121227(021)

[基金项目] 北京市中医药科技项目(JJ2011-36)

[第一作者] 温然, 硕士, 从事中药制剂研究, Tel: 010-84738615, E-mail: ran09291210@sina.com

[通讯作者] * 高瑛, 硕士, 药师, 从事中药新剂型与新技术研究, E-mail: gaoying446@163.com

的制备提供参考。

1 材料

Agilent 1200 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),Sartorius BS 110S 型电子分析天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司),YB-P6 型智能透皮试验仪(天津药典标准仪器厂)。

红花、艾叶等药材均购自北京盛世龙药业有限公司,经本校生药教研室刘春生教授鉴定,均为 2010 年版《中国药典》中收载品种。羟基红花黄色素 A 对照品(中国食品药品检定研究院,批号 111637-201106),甲醇、乙腈、磷酸为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

ICR 小鼠,雄性,(20 ± 2) g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证编号 SCXK(京)2012-0001。

2 方法与结果

2.1 药物的制备 称取处方量药材,按前期确定的工艺提取,浓缩干燥后,分别用体积分数为 20%,50%,70%的乙醇溶解至生药质量浓度 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,再用 20% 乙醇制成生药质量浓度 $0.5, 2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.2 离体鼠皮的制备 将小鼠断颈处死,取适量脱毛膏均匀涂于小鼠腹部脱去鼠毛,取下腹皮,用干棉花将脂肪及黏液组织擦试干净,生理盐水反复清洗后包于铝箔纸内,于冰箱冷冻保存备用^[2]。试验前自然解冻,目视皮肤完整性,不能有任何破损。

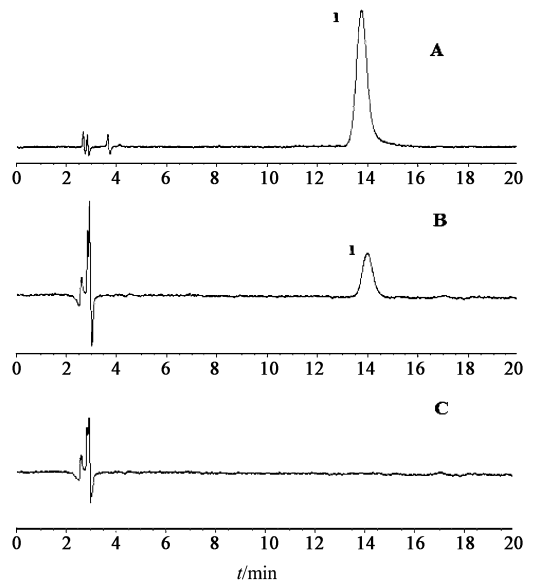
2.3 体外透皮试验 采用 YB-P6 型智能透皮试验仪,上室为扩散室,下室为接收室,扩散池容积 23 mL,有效扩散面积 3.14 cm^2 ,于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温水浴加热。HSYA 为水溶性成分,因此选取生理盐水为接收液,符合漏槽条件。试验时,接收室加满释放介质,将小鼠鼠皮附在接受室上,固定在两室之间,再将药物加于鼠皮上,排除气泡。 $400 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 磁力搅拌,分别于 1,2,4,6,8,12 h 精密移取接收液 0.8 mL ,同时补加同体积的新鲜接收液。取出的接收液用 $0.45 \text{ } \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,取续滤液 $20 \text{ } \mu\text{L}$ 进样,测定 HSYA 含量,计算累积透皮吸收率(Q)。

$$Q = (C_n \times V + \sum C_i \times V_i) / W \times 100\%$$

式中 W 为药液中 HSYA 质量, V 为接受液体积, V_i 为取样体积, C_n 为第 n 次取样测得的接受液中 HSYA 质量浓度, C_i 为第 $i(i \leq n-1)$ 个取样点测得的接受液中 HSYA 质量浓度。以单位面积 Q_n 对 t 进行线性回归得方程,所得斜率(J)即为稳态渗透速率常数。

2.4 羟基红花黄色素 A 含量测定

2.4.1 色谱条件^[3-5] Diamonsil TM-C₁₈ 色谱柱($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}, 5 \text{ } \mu\text{m}$),流动相甲醇-乙腈-0.7% 磷酸(26:2:72),检测波长 403 nm ,流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,柱温 $30 \text{ }^\circ\text{C}$,见图 1。



A. 对照品;B. 供试品;C. 阴性对照溶液;1. 羟基红花黄色素 A

图 1 骨愈方 HPLC

2.4.2 标准曲线的制备 精密称取 HSYA 对照品 3.03 mg 于 10 mL 量瓶中,加 25% 甲醇稀释至刻度,摇匀,即母液。分别精密移取适量母液,加 25% 甲醇制成质量浓度为 $0.015 15, 0.030 3, 0.090 9, 0.151 5, 0.303 0, 0.757 5, 1.212 0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品溶液,各进样 $20 \text{ } \mu\text{L}$,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程为 $Y = 58.120X + 0.015 9$ ($r = 0.999 9$)。

2.4.3 精密度试验 分别取低($0.030 3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、中($0.151 5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、高($0.757 5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)3 种质量浓度的 HSYA 对照品溶液,进样量 $20 \text{ } \mu\text{L}$,重复进样 5 次,计算 HSYA 峰面积的 RSD 分别为 0.30%,2.96%,3.11%,表明仪器精密度良好。

2.4.4 稳定性试验 取供试品溶液适量,分别于制备后 0,1,2,6,8,12 h 进样,每次 $20 \text{ } \mu\text{L}$,测得峰面积,的 RSD 4.22%,表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.4.5 回收率试验 取空白透皮接收液,加入低、中、高 3 个质量浓度的 HSYA 对照品溶液,制备样品溶液,测定 HSYA 含量,平行操作 3 份,计算低、中、高 3 种浓度回收率分别为 $103.20\% \pm 3.28\%$, $97.49\% \pm 1.14\%$, $99.22\% \pm 0.23\%$ 。

2.5 药物浓度对 HSYA 透皮的影响 选用 20% 乙

醇,分别考察生药质量浓度为 0.5, 1, 2 g·mL⁻¹ 的透皮特征,结果见表 1 和图 2。

表 1 不同质量浓度药物中 HSYA 在 12 h 内的稳态渗透速率 (n=5)

生药质量浓度 /g·mL ⁻¹	$Q_n - t$ 方程	r	J / $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$
0.5	$Q_n = 0.120 1t + 0.579 2$	0.988 9	0.120 1 ± 0.033 5
1.0	$Q_n = 0.152 6t + 0.616 3$	0.971 1	0.152 6 ± 0.048 4
2.0	$Q_n = 0.213 6t + 0.272 8$	0.984 8	0.213 6 ± 0.013 8

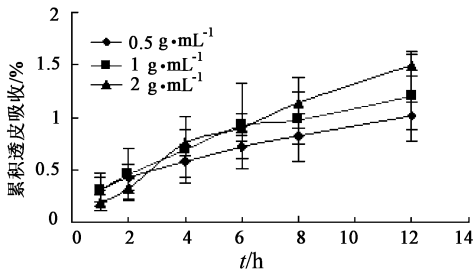


图 2 不同质量浓度药物中 HSYA 透皮吸收曲线 (n=5)

由结果可知,随药物质量浓度增大,HSYA 在 12 h 内的 Q 有所增加,且 2 g·mL⁻¹ 组显著高于 0.5 g·mL⁻¹ 组 ($P < 0.01$),但与 1 g·mL⁻¹ 无差异;2 g·mL⁻¹ 组 HSYA 在 12 h 内的渗透速率 (J) 显著高于另外 2 组 ($P < 0.05$),说明药物质量浓度增加有利于药物透过皮肤。

2.6 乙醇体积分数对 HSYA 透皮的影响 选择药物质量浓度 1 g·mL⁻¹,分别考察 20% 乙醇、50% 乙醇、70% 乙醇对药物透皮吸收的影响,结果见表 2 和图 3。

表 2 不同体积分数乙醇的药液中 HSYA 在 12 h 内的稳态渗透速率 (n=5)

乙醇体积分数/%	$Q_n - t$ 方程	r	J / $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$
20	$Q_n = 0.152 6t + 0.616 3$	0.971 1	0.152 6 ± 0.048 4
50	$Q_n = 0.161 3t - 0.002 1$	0.997 9	0.161 3 ± 0.017 2
70	$Q_n = 0.221 3t + 1.088 7$	0.989 6	0.221 3 ± 0.053 4

由结果可知,随乙醇体积分数增加,HSYA 在 12 h 内 Q 增加,其中 70% 乙醇组显著高于另外两组 ($P < 0.01$),且 70% 乙醇组 HSYA 在 12 h 内的 J 显著高于 50% 乙醇组 ($P < 0.05$),说明 70% 乙醇能较好地促进药物透过皮肤。

3 讨论

药物经皮吸收主要受经皮给药系统、皮肤的生理病理条件和药物理化性质的影响^[6]。HSYA 是水溶性大分子化合物,不易透过皮肤,在有较少促渗剂 (20% 乙醇) 的条件下,其累积透过率仅约 1.26%。

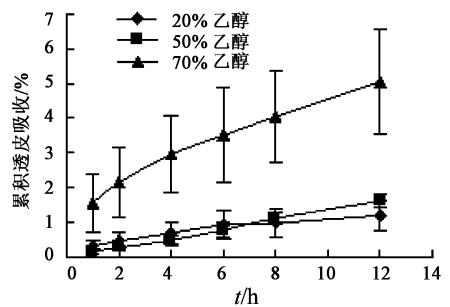


图 3 不同体积分数乙醇的药物中 HSYA 透皮吸收曲线 (n=5)

研究显示,乙醇和薄荷醇合用,不仅会作用于皮肤角质层,还会对活性表皮有影响,可能会促进活性表皮和真皮的水性通道作用,因此对于小分子水溶性药物,化学促渗法要优于物理促渗法,因为乙醇等改变了角质层间的脂质状态而利于药物透过皮肤;而大分子水溶性药物因其不易透过角质层分子间隙,破坏角质层是此类药物最有效的促渗途径^[7]。实验发现当乙醇体积分数增加至 70% 时,HSYA 透过量显著增加,原因可能为高体积分数乙醇改变了皮肤角质层脂质分子结构排列^[8]。此外,可采用电穿孔、超声促渗、微针等物理促渗法与之结合,进而降低制剂中乙醇体积分数。虽然随药物质量浓度的增加,HSYA 累积透过率增大,但 1 g·mL⁻¹ 组与 2 g·mL⁻¹ 组无显著差异,因此考虑最终将药液浓缩至 1 g·mL⁻¹,以减少浓缩过程中药物损失。

[参考文献]

- [1] 姚苗苗,董仲才,任爱农. 羟基红花黄色素 A 的研究进展[J]. 中南药学,2009,7(12):931.
- [2] 刘月环,陆洋,杜守颖,等. 宣痹凝胶帖膏剂有效成分的透皮行为研究[J]. 中国中药杂志,2012,37(9):1202.
- [3] 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,2010:103.
- [4] 王永新,徐荣,白霜. 高效液相色谱法测定红花散瘀胶囊中羟基红花黄色素 A 的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2007,13(1):12.
- [5] 庞来祥,刘艳梅,张丽艳,等. 乳疾一贴灵巴布剂水提工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(22):26.
- [6] 杨森森. 巴布剂[M]. 贵阳:贵州科技出版社,2005:66.
- [7] Toshinobu SEKI, Takaaki KIUCHI, Hiroki SETO, et al. Analysis of the rat skin permeation of hydrophilic compounds using the renkin function[J]. Biol Pharm Bull,2010,33(11):1915.
- [8] 侯雪梅,李国栋,李卫华. 化学促渗剂及其机理的探讨[J]. 上海医药,2008,29(5):231.

[责任编辑 全燕]